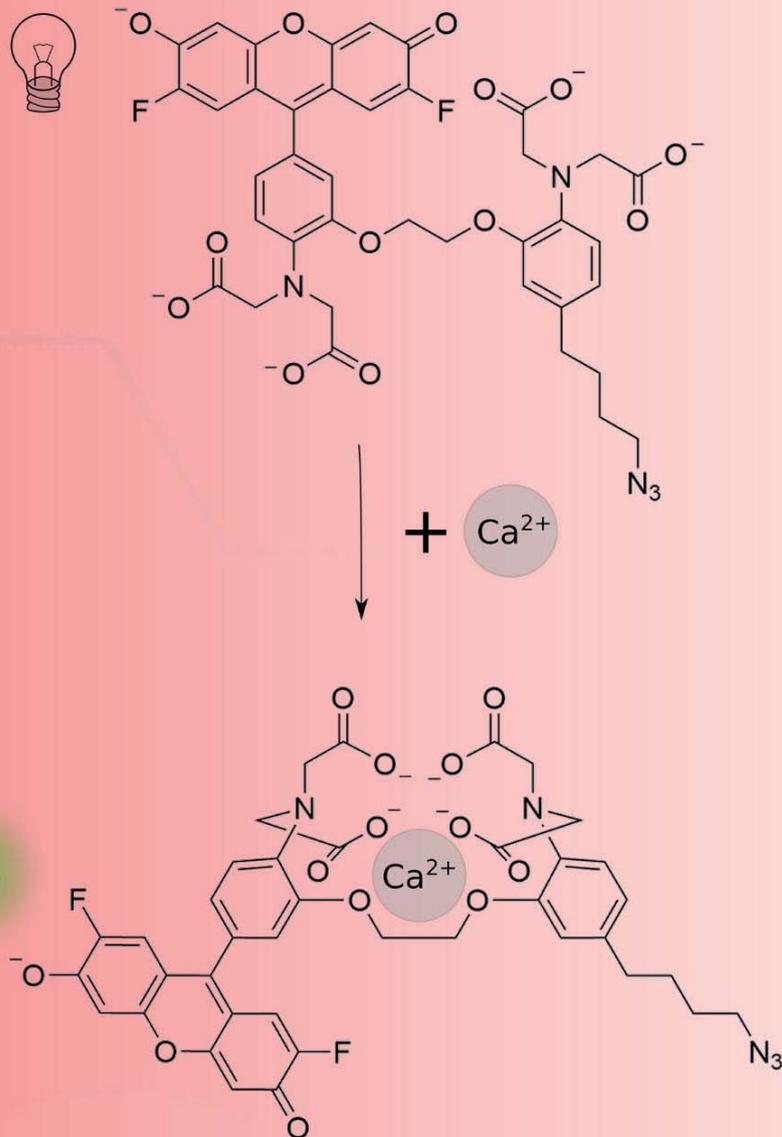


Julia Graf

Synthese von fluoreszierenden Calcium-Sensoren und Biomolekülen zur Untersuchung physiologischer Prozesse



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Julia Graf

**Synthese von fluoreszierenden Calcium-
Sensoren und Biomolekülen zur
Untersuchung physiologischer Prozesse**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2017

Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2016

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2017

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2017

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9567-3

eISBN 978-3-7369-8567-4



Synthese von fluoreszierenden Calcium- Sensoren und Biomolekülen zur Untersuchung physiologischer Prozesse

Dissertation

zur Erlangung

des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

“Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Chemie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Julia Graf

aus Nowoterskij

Göttingen, 2016



Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Ulf Diederichsen *Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen*

Prof. Dr. Claudia Steinem *Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen*

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent

Prof. Dr. Ulf Diederichsen *Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen*

Korreferentin

Prof. Dr. Claudia Steinem *Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen*

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission

Prof. Dr. Claudia Höbartner *Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen*

Prof. Dr. Silvio O. Rizzoli *Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
Universitätsmedizin Göttingen*

Prof. Dr. Kai Tittmann *Institut für molekulare Enzymologie
Georg-August-Universität Göttingen*

Dr. Franziska Thomas *Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen*

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2016



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2012 bis Dezember 2016 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Ulf Diederichsen angefertigt und vom Exzellenzcluster 171 des DFG Forschungszentrums „Mikroskopie im Nanometerbereich und Molekularphysiologie des Gehirns“ (CNMPB) unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulf Diederichsen für die interessanten Themenstellungen, für die wissenschaftliche Freiheit und für die uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion.





Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Entwicklung und Synthese neuer fluoreszierender Verbindungen für die Untersuchung physiologischer Prozesse.

Es wurden neuartige fluoreszierende Calcium-Sensoren synthetisiert und deren Anwendung vorgestellt. Die Innovation dieser Calcium-Sensoren bestand aus der Integration eines Azid-Linkers, der es erlaubt, die Sensoren durch die Cu(I)-katalysierte HUISGEN-Reaktion mit weiteren Biomolekülen zu verknüpfen. Insgesamt konnten vier Calcium-Sensoren erfolgreich synthetisiert werden, die sich in den Absorptions- und Emissionswellenlängen und der Position des Azid-Linkers unterschieden. Die vier neuen Calcium-Sensoren wurden durch Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Es wurde gezeigt, dass bei der Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen keine Emission zu beobachten war, während mit steigender Ca^{2+} -Konzentration ein Anstieg der Emissionsintensität gemessen werden konnte. In einer ersten Anwendung wurden die Calcium-Sensoren erfolgreich mit Polyethylenglycol (PEG) verlinkt. Die PEG-Derivate wurden in einer Kooperation mit D. SCHILD zur Untersuchung der Ca^{2+} -Aktivität in olfaktorischen Zellen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die zusätzlichen PEG-Linker die Extrusion des Sensors aus den Zellen verhinderten und folglich Langzeitmessungen *in vivo* erlaubten. Weiterhin wurden erstmals ein rot- und grünfluoreszierender Calcium-Sensor an einem PEG-Molekül kombiniert, um präzisere Ca^{2+} -Messungen *in vivo* zu ermöglichen.

Desweiteren wurde die Synthese von Fluorophor-markiertem Arginin beschrieben. Es konnten erfolgreich vier Arginin-Derivate synthetisiert werden, die jeweils am N- und am C-Terminus mit einem Fluorophor modifiziert wurden. Die Derivate wurden von S. GLIEM in physiologischen Experimenten zur Untersuchung der Wirkungsweise von olfaktorischen Rezeptoren anhand Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die modifizierten Arginin-



Derivate, ebenso wie das natürlich vorkommende L-Arginin, als Duftstoffe in *Xenopus laevis* agieren.

Weiterhin wurde die Synthese von Fluorophor-markierter Saccharose vorgestellt, deren Modifizierung selektiv an der C4-Position der Glucose-Einheit erfolgte. Die modifizierte Saccharose ermöglicht den Zugang für zukünftige Experimente zur Untersuchung der Lebensdauer synaptischer Vesikel, die bei der Freisetzung von Neurotransmittern in Nervenzellen eine wichtige Rolle spielen.

An der Fusion zwischen synaptischen Vesikeln mit der Plasmamembran sind die sogenannten SNARE-Proteine (engl.: *soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor*- Proteine) beteiligt, die im letzten Abschnitt dieser Arbeit thematisiert wurden. In diesem Projekt wurden SNARE-Protein-Analoga mit artifiziellen Erkennungseinheiten und nativen Transmembrandomänen zur Untersuchung der Membranfusion *in vitro* entwickelt. Als Erkennungseinheit wurden Peptid-nukleinsäuren (PNA) gewählt, die an verschiedenen Nukleobasen mit einer photolabilen Gruppe modifiziert wurden. Dadurch konnte die Erkennung der PNA-Stränge zeitweise blockiert und die Fusion zwischen den Vesikeln inhibiert werden. Nach der Bestrahlung von Licht wurden die photolabilen Schutzgruppen abgespalten und die Fusion initiiert. Infolgedessen konnte die Membranfusion zwischen den Vesikeln sowohl zeitlich als auch räumlich gezielt kontrolliert werden.

Somit wurden, neben der Synthese von artifiziellen SNARE-Protein-Analoga, Biomoleküle direkt mit Fluorophoren markiert und fluoreszierende Sensoren für Calcium-Ionen entwickelt. Die neuen Verbindungen eröffnen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung von physiologischen Prozessen in der Zellforschung.



Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----------|
| Einleitung und Motivation | 1 |
| 1 Synthese fluoreszierender Calcium-Sensoren | 3 |
| 1.1 Einleitung..... | 3 |
| 1.2 Die Bedeutung von intrazellulärem Calcium | 4 |
| 1.2.1 Ca^{2+} -bindende Proteine | 6 |
| 1.3 Fluoreszierende Calcium-Sensoren..... | 8 |
| 1.3.1 BAPTA als Calcium Chelator | 11 |
| 1.3.2 Funktionsweise nicht-ratiometrischer Calcium-Sensoren..... | 13 |
| 1.3.3 Calcium-Affinität nicht-ratiometrischer Calcium-Sensoren | 14 |
| 1.4 Kriterien und Designstrategien neuer Calcium-Sensoren..... | 16 |
| 1.5 Synthese der BAPTA-Derivate | 19 |
| 1.5.1 Synthese des BAPTA-Derivats 10..... | 19 |
| 1.5.2 Synthese des neuen BAPTA-Derivats 11..... | 22 |
| 1.6 Auf Fluorescein basierte Calcium-Sensoren | 25 |
| 1.6.1 Calcium-Sensor <i>Fluo-4</i> | 25 |
| 1.6.2 Synthese der neuen Calcium-Sensoren | 27 |
| 1.6.3 Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzmessungen | 30 |
| 1.6.4 Calcium-Selektivität der Sensoren..... | 35 |
| 1.6.5 Vergleich der neuen Calcium-Sensoren..... | 38 |
| 1.7 Auf Rhodamin-basierte Calcium-Sensoren | 39 |
| 1.7.1 Einleitung | 39 |
| 1.7.2 Synthese der modifizierten Rot-emittierenden Sensoren | 40 |
| 1.7.3 Spektroskopische Untersuchungen | 43 |
| 1.7.4 Calcium-Selektivität | 48 |
| 1.8 Einschleusen in die Zellen als Acetoxymethyl-Ester | 50 |
| 1.9 Calcium-Sensor-Konjugate | 52 |
| 1.9.1 Einleitung | 52 |
| 1.9.2 PEGylierung der neuen Calcium-Sensoren | 54 |
| 1.9.3 Anwendung in olfaktorischen Zellen | 60 |



| | | |
|----------|--|------------|
| 1.9.4 | Kombination eines rot und grün fluoreszierenden Sensors am PEG | 62 |
| 1.10 | Schlussfolgerung und Ausblick..... | 68 |
| 2 | Synthese von Fluorophor-markiertem Arginin | 71 |
| 2.1 | Einleitung und Zielsetzung..... | 71 |
| 2.2 | Design und Synthese | 73 |
| 2.3 | Erste Untersuchungen an olfaktorischen Zellen | 76 |
| 2.4 | Schlussfolgerung und Ausblick | 78 |
| 3 | Synthese von Fluorophor-markierter Saccharose | 79 |
| 3.1 | Einleitung und Zielsetzung..... | 79 |
| 3.2 | Der synaptische Vesikelzyklus | 80 |
| 3.3 | Kriterien und Designstrategien..... | 81 |
| 3.4 | Synthese | 84 |
| 3.5 | Schlussfolgerung und Ausblick | 89 |
| 4 | SNARE-Protein-Analoga mit modifizierten PNA-Erkennungseinheiten | 91 |
| 4.1 | Einleitung und Zielsetzung..... | 91 |
| 4.2 | SNARE-Proteine – Vermittler der Membranfusion | 92 |
| 4.2.1 | Struktur des SNARE-Komplexes | 93 |
| 4.2.2 | Mechanismus der Membranfusion | 94 |
| 4.3 | Photolabile Schutzgruppen | 97 |
| 4.4 | Design der SNARE-Protein Analoga | 98 |
| 4.5 | Synthese modifizierter PNA-Derivate..... | 101 |
| 4.6 | Schlussfolgerung und Ausblick | 105 |
| 5 | Experimenteller Teil | 107 |
| 5.1 | Materialien und Methoden | 107 |
| 5.2 | Spektroskopische Methoden..... | 109 |
| 5.2.1 | Fluoreszenzspektroskopie | 109 |
| 5.2.2 | UV/vis-Spektroskopie | 111 |
| 5.3 | Bestimmung der K_D -Werte | 112 |
| 5.4 | Charakterisierung | 112 |
| 5.5 | Festphasenpeptidsynthese..... | 113 |
| 5.5.1 | Manuelle Festphasenpeptidsynthese von Peptid/PNA-Konjugaten | 113 |
| 5.5.2 | Abspaltung vom Wang-Harz..... | 114 |
| 5.6 | Synthesen | 115 |
| 5.6.1 | Synthese von BAPTA-Derivat 10 ^[84,85] | 115 |
| 5.6.2 | Synthese von BAPTA-Derivat 11 | 124 |
| 5.6.3 | Fluorescein-basierte Calcium-Sensoren..... | 131 |



| | | |
|-----------------------------------|--|------------|
| 5.6.4 | Rhodamin-basierte Calcium-Sensoren | 139 |
| 5.6.5 | PEGylierung der Calcium-Sensoren | 145 |
| 5.6.6 | Fluorophor-markiertes Arginin | 149 |
| 5.6.7 | Fluorophor-markierte Saccharose | 157 |
| 5.6.8 | Synthese von modifizierten PNA und PNA/TMD-Hybriden..... | 164 |
| Abkürzungsverzeichnis..... | | 171 |
| Literaturverzeichnis | | 177 |
| Danksagung | | 189 |





Einleitung und Motivation

Die Verwendung fluoreszierender Moleküle ist für die Untersuchung biologischer Prozesse unerlässlich. Neuste Entwicklungen auf dem Gebiet der Fluoreszenzspektroskopie, wie z. B. die *Stimulated Emission Depletion* (STED)-Mikroskopie, erlauben es Strukturen und molekulare Abläufe in lebenden Zellen auf der Nanometerebene zu beobachten.^[1-3] Da viele biologische Proben keine Eigenfluoreszenz bei der Anregung mit sichtbarem Licht zeigen, gehören fluoreszierende Moleküle in der Zellforschung inzwischen zum Standardrepertoire. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten Fluorophore einzusetzen. Die erste ist die Verwendung eines reaktiven Derivats des Fluorophors zur direkten chemischen Markierung des Zielmoleküls wie z. B. eines Peptids, welches die entsprechende reaktive Funktionalität trägt.^[4,5] Eine häufige verwendete chemische Reaktion ist die 1,3-dipolare Cycloaddition (HUISGEN-Reaktion) zwischen einem Alkin und einem Azid.^[6-8] Die Reaktion ist stark selektiv, unempfindlich gegenüber dem pH-Wert und kann in Wasser ablaufen. Außerdem beinhalten native Biomoleküle keine Azide oder Alkine, womit die Reaktion biokompatibel ist und sogar in lebenden Zellen verwendet werden kann.

Eine weitere Möglichkeit ist der direkte Einsatz von Fluorophoren zum Anfärben von Zellen oder die Verwendung von fluoreszierenden chemischen Sensoren.^[9] Letztere werden als Indikator für nichtfluoreszierende Spezies oder Parameter wie z. B. den pH-Wert, molekularen Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid oder Metallionen verwendet.^[10]

Aufgrund der rasanten Entwicklung im Bereich der Fluoreszenzbildgebung in der Physiologie, der Zellbiologie und den Neurowissenschaften werden konstant verbesserte und innovative fluoreszierende Marker benötigt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Entwicklung und Synthese neuartiger fluoreszierender Moleküle, die neue Anwendungen in der Zellforschung ermöglichen.

Im ersten Kapitel wird die Synthese und Anwendung von fluoreszierenden chemischen Sensoren für Calcium-Ionen beschrieben.



Seit der Einführung durch den Nobelpreisträger ROGER Y. TSIEN im Jahr 1980^[11] werden Calcium-Sensoren zur Untersuchung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse in Zellen verwendet. Die Innovation der vorgestellten Calcium-Sensoren besteht aus einem integrierten Azid-Linker, der die Verknüpfung der Sensoren durch die HUISGEN-Reaktion mit einem Alkin an weitere Moleküle wie z. B. Lipide, Peptide oder Nukleinsäuren erlaubt. Somit werden neue Möglichkeiten zur Erforschung intrazellulärer Prozesse und der Signaltransduktion durch die neuartigen Calcium-Sensoren eröffnet. In einer ersten Anwendung wird für eine Kooperation mit D. SCHILD die Synthese eines an einem Polyethylenglycol (PEG) verknüpften Calcium-Sensors beschrieben. Es wird gezeigt, wie der zusätzliche PEG-Linker die Extrusion aus olfaktorischen Zellen verhindert und damit Langzeitmessungen erlaubt. Außerdem wird erstmals die Verknüpfung von zwei Sensoren, die sich in den Absorptions- und Emissionsmaxima unterscheiden, an einem PEG-Derivat für präzisere Ca^{2+} -Messungen vorgestellt.

Neben der Synthese eines fluoreszierenden Sensors wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Biomoleküle direkt mit Fluorophoren markiert. In Kapitel 2 wird die Synthese von Fluorophor-markierten Arginin-Derivaten vorgestellt. Diese werden in einem Kooperationsprojekt mit D. SCHILD für die Untersuchung in olfaktorischen Zellen eingesetzt, um einen tieferen Einblick in die Funktion und den Mechanismus der olfaktorischen Rezeptoren zu erhalten. Für eine weitere Kooperation mit S. RIZZOLI wird die Entwicklung und Synthese von selektiv markierter Saccharose beschrieben. Damit wird zum ersten Mal eine Möglichkeit eröffnet die Lebensdauer eines synaptischen Vesikels mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden zu untersuchen.

Eine weitere Option biologische Prozesse zu analysieren, besteht neben dem Einsatz von Fluorophoren in der Anwendung photolabiler Gruppen. Dadurch kann die Funktion der Biomoleküle blockiert und nach der Einstrahlung von Licht komplett wiederhergestellt werden. Im vierten Kapitel wird der Einsatz von photolabilen Gruppen zur Untersuchung der SNARE-vermittelten Membranfusion eingesetzt. Es wird die Synthese von SNARE-Protein-Analoga mit artifiziellen Erkennungseinheiten beschrieben, die mit einer photoabspaltbaren Gruppe modifiziert sind. Dadurch kann die Membranfusion *in vitro* räumlich und zeitlich gesteuert werden, um neue Einblicke in die SNARE⁻vermittelte Membranfusion zu erhalten.



1 Synthese fluoreszierender Calcium-Sensoren

1.1 Einleitung

Zellen stehen in ständiger Kommunikation mit ihrer Umgebung. Sie reagieren auf extrazelluläre Reize wie Hormone, Neurotransmitter, Licht oder Temperaturunterschiede und wandeln diese in intrazelluläre Signale um, wodurch eine Kaskade von Reaktionen im Zellinneren ausgelöst wird. Dieser als Signaltransduktion bezeichnete Prozess reguliert viele wichtige biologische Vorgänge wie die Zellteilung, Wundheilung, Lichtwahrnehmung, Gentranskription oder Muskelkontraktion.^[12] Im Inneren der Zellen befinden sich sekundäre Botenstoffe (engl. *second messenger*), die nach dem primären äußeren Signal gebildet werden und dieses innerhalb der Zelle weiterleiten. Zu den *second messengern* gehören z. B. cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Diacylglycerin (DAG), Inositoltriphosphat (IP₃) und Calcium-Ionen (Ca²⁺).^[13]

Die Untersuchung der Ca²⁺-Aktivität in Zellen ist, aufgrund der essentiellen Bedeutung von Calcium-Ionen als sekundäre Botenstoffe, ein Schwerpunkt der zellbiologischen Forschung. Eine gängige Methode ist die Messung der freien Ca²⁺-Konzentrationsänderung mittels fluoreszierender Calcium-Sensoren. Dabei handelt es sich um Moleküle, die Calcium-Ionen komplexieren und dadurch ihre optischen Eigenschaften durch Erhöhung der Fluoreszenzintensität oder Verschiebung der Emissions- bzw. Absorptionsmaxima ändern.^[14] Fluoreszierende Calcium-Sensoren wurden beispielsweise zur Untersuchung der synaptischen Transmission^[15], subzellulärer Ca²⁺-Freisetzungsmechanismen im Nukleus oder Cytosol^[16] und Organellspezifischen Änderungen der Ca²⁺-Konzentration verwendet.^[17]

In diesem Kapitel wird die Synthese und Anwendung von neuartigen Calcium-Sensoren beschrieben. Diese beinhalten einen Azid-Linker wodurch die Verknüpfung mittels der HUISGEN-Reaktion an weitere Moleküle wie z. B. Peptide oder Lipide ermöglicht wird. Dies eröffnet neue Anwendungsmöglichkeiten in der Erforschung Ca²⁺-abhängiger physiologischer Prozesse. In einer ersten Anwendung wird die



Verknüpfung der Calcium-Sensoren an Polyethylenglycol (PEG) zur Untersuchung der Ca^{2+} -Aktivität in olfaktorischen Zellen beschrieben.

1.2 Die Bedeutung von intrazellulärem Calcium

Calcium ist in seiner ionischen Form eines der bedeutendsten Elemente in biologischen Prozessen. Schon im Jahr 1883 konnten RINGER *et al.* zeigen, dass Ca^{2+} -Ionen eine entscheidende Rolle bei der Kontraktion von Herzmuskeln bei Fröschen spielen.^[18] Seitdem wurden zahlreiche Publikationen veröffentlicht, die Calcium als sekundären Botenstoff beschreiben. Dazu gehören viele grundlegende physiologische Vorgänge, wie die Zellteilung^[19], hormonelle Sekretion^[20], Befruchtung einer Eizelle^[21,22], Sinneswahrnehmungen^[23,24], synaptische Transmission^[25-27] und Apoptose.^[28,29]

Die Informationen in der Zelle werden dabei durch einen zeitlich begrenzten Konzentrationsanstieg an intrazellulären Ca^{2+} -Ionen vermittelt.^[30,31] Der Grund ist ein hoher Ca^{2+} -Konzentrationsgradient zwischen dem Cytosol und dem extrazellulären Raum. Innerhalb der Zelle ist die Konzentration von freiem Ca^{2+} mit 10^{-7} M sehr gering, während außerhalb der Zelle eine Konzentration von 10^{-3} M vorliegt.^[30,32] Solche Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten existieren auch zwischen dem Cytosol und bestimmten Kompartimenten innerhalb komplexerer Zellen z. B. in Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum (ER).^[13,33]

Wird eine Zelle durch einen primären Stimulus aktiviert, öffnen sich Calcium-Kanäle und die Konzentration an Ca^{2+} -Ionen im Cytosol steigt in Millisekunden auf bis zu $1-10^{-6}$ M an.^[24] Dadurch werden Calcium-bindende Proteine aktiviert, die weitere Prozesse steuern können (siehe Abschnitt 1.2.1).^[34,35] Die Calcium-Kanäle befinden sich sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran des ERs und werden nach der Art der Aktivierung eingeteilt (Abbildung 1.1).^[36] Im Allgemeinen werden zwei Arten von Calcium-Kanälen unterschieden. Dazu gehören die Rezeptor-vermittelten Kanäle, die durch spezifische Liganden aktiviert werden und die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle. Letztere befinden sich in elektrisch erregbaren Zellen wie z. B. Muskelzellen und Neuronen.^[33] Die Aktivierung erfolgt dabei durch eine Veränderung der Membranspannung, die z. B. durch eine Depolarisation der Zellmembran hervorgerufen wird und schließlich zu einem Ca^{2+} -Fluss in die Zelle führt. Zu den Rezeptor-vermittelten Kanälen gehören



z. B. die Ryanodin-Rezeptor-Kanäle, welche sich in Gegenwart des pflanzlichen Alkaloids Ryanodin öffnen und die Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-(IP₃R-) Kanäle.^[37] Die Aktivität der IP₃R-Kanäle wird durch Inositoltriphosphat (IP₃)-Moleküle, welche durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren gebildet werden, reguliert.^[28]

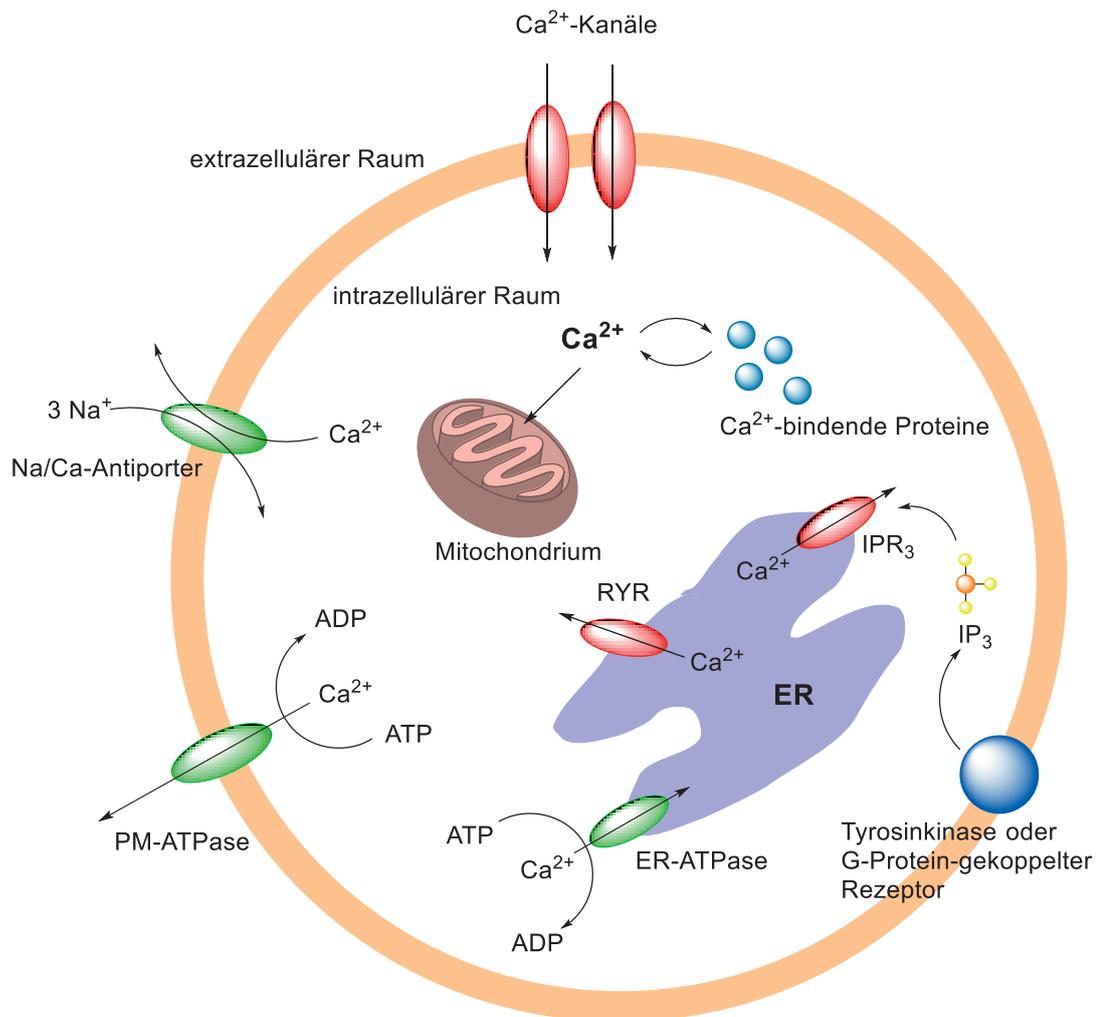


Abbildung 1.1 Vereinfachte Darstellung der Ca²⁺-Signalgebung in einer Zelle. Aufgrund des hohen Ca²⁺-Konzentrationsgradienten kommt es durch liganden- oder spannungsvermittelten Ca²⁺-Kanälen zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen in den intrazellulären Raum, wodurch Ca²⁺-bindende Proteine aktiviert werden. Außerdem werden Ca²⁺-Ionen aus den Ryanodin-Rezeptor (RyR)- und Inositoltriphosphat-Rezeptor (IP₃R)-vermittelten Kanälen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in das Cytoplasma ausgeschüttet. Durch die Na/Ca-Antiporter und Adenosintriphosphatasen (ATPasen) der Plasmamembran (PM) und des ER werden die Ca²⁺-Ionen wieder aus dem Cytoplasma rausbefördert.

Zur Aufrechterhaltung des transmembranen Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten und somit zum Abtransport der Ca^{2+} -Ionen aus dem Cytosol dienen verschiedene Ca^{2+} -Pumpen.^[38] Die Ca^{2+} -Pumpen spielen eine wichtige Rolle, da eine auf Dauer erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol zur sicheren Apoptose führen würde.^[39] Zu den Ca^{2+} -Pumpen gehören die Ca^{2+} -abhängigen Adenosintriphosphatasen (ATPasen) und das Natrium/Calcium-Antiport-System (Abbildung 1.1).^[40] Die Calcium-ATPasen befinden sich sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran des ERs. Die Calcium-ATPase der Plasmamembran pumpt dabei jeweils ein Ca^{2+} -Ion pro hydrolysiertem Adenosintriphosphat (ATP) in den extrazellulären Raum, wohingegen die ATPase in der Membran des ERs zwei Ca^{2+} -Ionen pro ATP in das ER befördert.^[32] Bei dem Natrium/Calcium-Antiport-System wird durch den Einstrom von drei Na^+ -Ionen je ein Ca^{2+} -Ion aus der Zelle rausbefördert.^[41]

1.2.1 Ca^{2+} -bindende Proteine

Das am häufigsten vertretene Calcium-bindende Protein in eukaryotischen Zellen ist Calmodulin (CaM), welches zur Familie der EF-Hand-Proteine gehört.^[42,43] Dabei wird als EF-Hand ein Ca^{2+} -bindendes Motiv aus 29 Aminosäuren bezeichnet, das aus einer α -Helix, einer Schleife (engl. *loop*) und einer weiteren α -Helix besteht (Abbildung 1.2, links).^[44] Das Ca^{2+} -Ion wird von der EF-Hand durch sieben koordinative Bindungen über Sauerstoffatome gebunden. Dieses Motiv wurde erstmals für das Ca^{2+} -bindende Muskelprotein Parvalbumin beschrieben.^[45]

Das CaM wird aktiviert, wenn die Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol auf über 500 nM ansteigt. Es besitzt vier EF-Hand-Motive, die jeweils ein Ca^{2+} -Ion binden können (Abbildung 1.2, rechts). Durch die Komplexbildung von Ca^{2+} -Ionen kommt es zu einer strukturellen Änderung des Proteins, wodurch hydrophobe Oberflächen freigelegt werden und somit zusätzliche Bindungsstellen für weitere Proteine zur Verfügung stehen.^[12] Durch den CaM- Ca^{2+} -Komplex werden z. B. Enzyme wie die Adenylat- und Guanylat-Cyclasen zur Bildung von cAMP und cGMP, die NO-Synthetase, die Ca^{2+} -ATPasen und die NAD-Kinase zur Synthese von NADP aktiviert.^[46] Ein weiteres bekanntes Beispiel ist die Aktivierung der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II, die in den Nervenzellen den Energiestoffwechsel sowie die Generierung und Freisetzung von Neurotransmittern reguliert.^[47,48]



Weitere bekannte Ca^{2+} -bindende Proteine sind Troponin C^[49], welches eine wichtige Rolle bei der Muskelkontraktion spielt, und das biolumineszierende Photoprotein Aequorin aus der Qualle *Aequorea victoria*.^[50] Aequorin besteht aus dem Apoprotein Apoaequorin mit insgesamt drei Calcium-bindenden EF-Hand-Motiven und dem organischen Kofaktor Coelenterazin als Chromophor.^[51] Bei der Komplexierung von drei Ca^{2+} -Ionen an das Aequorin ändert sich die Konformation des Proteins und das Coelenterazin wird durch eine intramolekulare Reaktion zu Coelenteramid oxidiert, was in einer Emission von blauem Licht (465 nm) resultiert (Schema 1.1).^[52] Aufgrund dieser Eigenschaft war Aequorin einer der ersten Calcium-Sensoren, die verwendet wurden, um intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen zu untersuchen.^[53–55] Heutzutage dienen vor allem kleine chemische Moleküle als Calcium-Sensoren, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

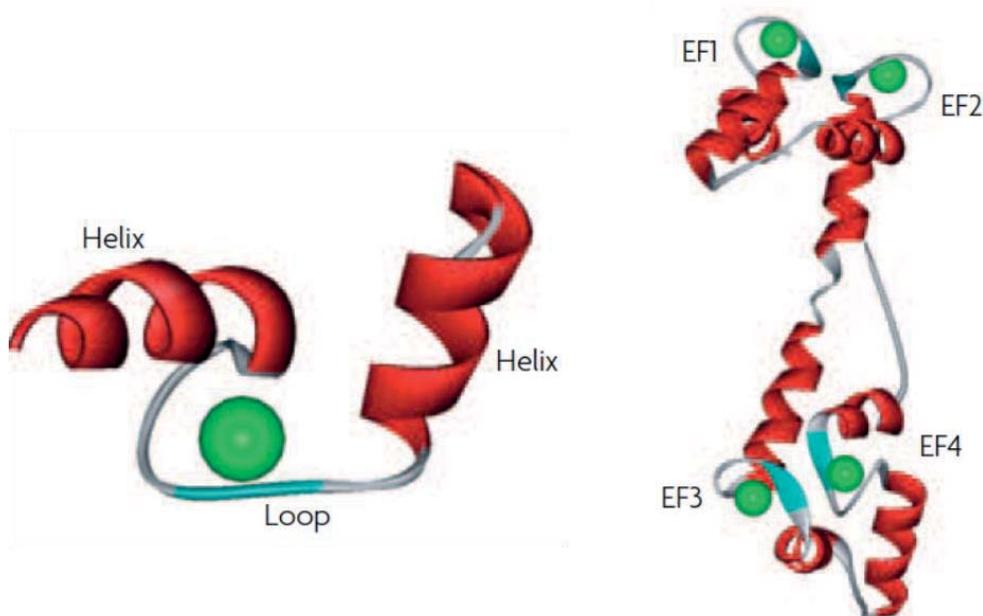
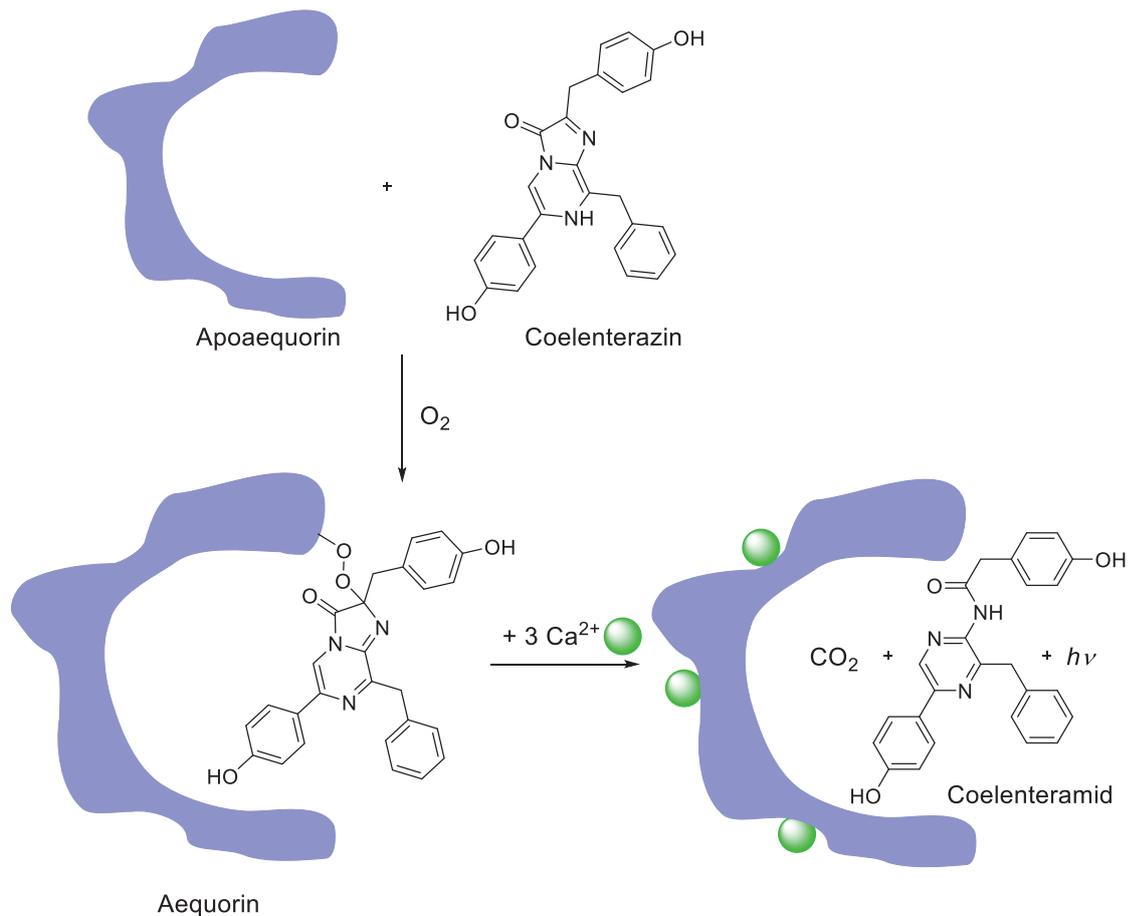


Abbildung 1.2 Links: EF-Hand Motiv mit der typischen Helix-Loop-Helix Struktur. Das Ca^{2+} -Ion (grüne Kugel) wird von Aminosäuren über Sauerstoffatome komplexiert. Rechts: Kristallstruktur des Calmodulins mit vier EF-Hand Motiven, die jeweils ein Ca^{2+} -Ion gebunden haben. Abbildung entnommen aus BURGOYNE.^[35]



Schema 1.1 Schematische Darstellung der Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid durch das Protein Aequorin.

1.3 Fluoreszierende Calcium-Sensoren

Aufgrund der großen Bedeutung von intrazellulärem Calcium in biologischen Prozessen wurden zahlreiche Methoden zur Analyse der Ca^{2+} -Aktivität in Zellen entwickelt. Eine weit verbreitete und am häufigsten verwendete Methode ist der Einsatz von chemisch synthetisierten, fluoreszierenden Calcium-Sensoren. Diese ändern in Anwesenheit von Calcium-Ionen ihre optischen Eigenschaften wie z. B. durch Erhöhung der Fluoreszenzintensität oder Verschiebung der Emissions- oder Absorptionswellenlänge. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist, dass der Sensor eine hohe Selektivität gegenüber Ca^{2+} -Ionen aufweisen muss und gegenüber anderen Ionen wie z. B. Mg^{2+} keine oder sehr geringe Empfindlichkeiten zeigen darf. Fast alle modernen Calcium-Sensoren sind Derivate von Bis(o-aminophenoxy)-ethan- N,N,N',N' -



tetraessigsäure (BAPTA) (siehe Abschnitt 1.3.1), einem selektiven Calcium-Chelator.

Quin-2 (**1**) war der erste von TSIEN *et al.* entwickelte auf BAPTA basierende Calcium-Sensor, der für biologische intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen eingesetzt wurde (Abbildung 1.3).^[56,57] Nach einer Anregung bei 365 nm zeigt **1** einen fünf bis sechsfachen Anstieg der Emission bei der Komplexierung von Calcium-Ionen. Allerdings wird **1** heutzutage aufgrund des kleinen Extinktionskoeffizienten, der geringen Quantenausbeute und der hohen Photobleichung kaum verwendet.^[58]

Seit der Einführung von *Quin-2* wurde eine Vielzahl an fluoreszierenden Calcium-Sensoren entwickelt.^[59–64] Eine generelle Einteilung kann in ratiometrische und nicht-ratiometrische Sensoren erfolgen. Ratiometrische Sensoren weisen in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -gebundenen oder ungebundenen Form eine Verschiebung des Emissions- oder Absorptionsmaximums mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Signalintensität auf.^[65] Die Veränderung der Ca^{2+} -Konzentrationen wird demzufolge als Änderung im Verhältnis (Ratio) der Fluoreszenz gemessen. Ein populärer ratiometrischer Calcium-Sensor ist *Fura-2* (**2**).^[61,66,67] Die Ca^{2+} -ungebundene Form von **2** weist ein breites Absorptionsspektrum von 300–400 nm mit einem Maximum bei ungefähr 370 nm auf. Bei einer Ca^{2+} -Komplexierung steigt die Intensität des Absorptionsmaximums und verschiebt sich zu kürzeren Wellenlängen (340 nm) (Abbildung 1.4, links). Wird der Sensor **2** bei 340 nm angeregt, steigt folglich die Emissionsintensität bei einer Ca^{2+} -Komplexierung, während ein Abnehmen der Emissionsintensität bei einer Anregung mit 380 nm beobachtet wird. Nach einer schnellen nacheinander folgenden Anregung bei 340 und 380 nm kann das Verhältnis der jeweiligen Fluoreszenzsignale für die Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration verwendet werden.^[68] Die Emission wird dabei konstant bei 510 nm gemessen. Im Gegensatz dazu zeigt *Indo-1* (**3**) (Abbildung 1.3) eine Verschiebung und Zunahme des Emissionsmaximums von 485 nm auf 410 nm bei einer Ca^{2+} -Komplexierung, während das Absorptionsmaximum (338 nm) unverändert bleibt (Abbildung 1.4, rechts).^[61,69]

Der Vorteil von ratiometrischen Messungen ist, dass das Verhältnis der Emissionssignale nicht von der Änderung der Sensorkonzentration, resultierend aus dem Ausschleusen des Sensors aus der Zelle oder der

Photobleichung, abhängig.^[68] Ein Nachteil ist, dass die ratiometrischen Sensoren mit UV-Licht angeregt werden, welches eine zellschädigende Wirkung hat.

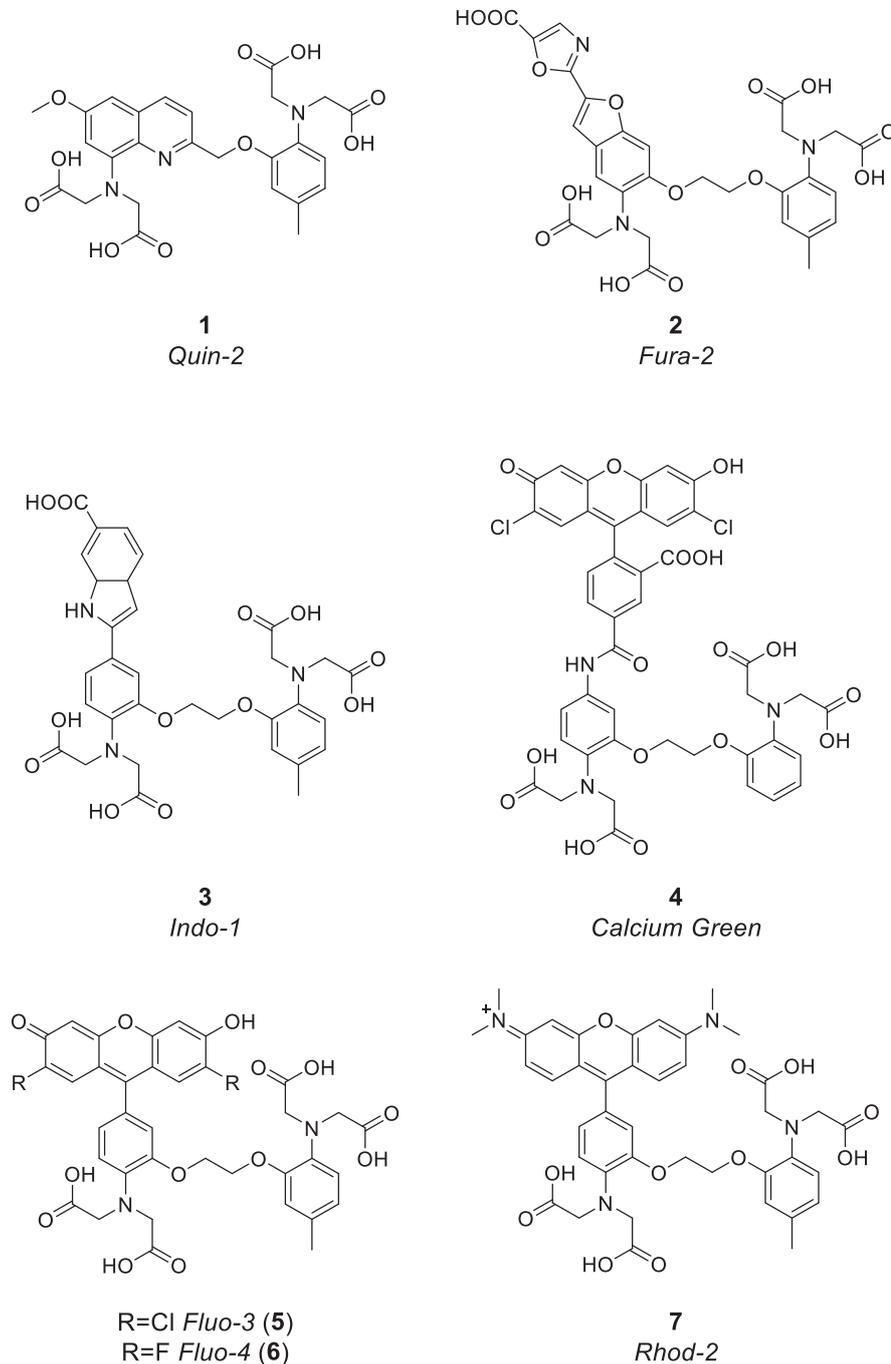


Abbildung 1.3 Übersicht über die populärsten Calcium-Sensoren. *Quin-2* (1), *Fura-2* (2) und *Indo-1* (3) gehören zu den ratiometrischen Calcium-Sensoren und werden im UV-Bereich angeregt. *Calcium Green* (4), *Fluo-3* (5), *Fluo-4* (6) und *Rhod-2* (7) sind nicht-ratiometrische Sensoren, die im sichtbaren Bereich absorbieren bzw. emittieren.



Nicht-ratiometrische Sensoren basieren hauptsächlich auf BAPTA und Fluorescein- und Rhodamin-Derivaten als Fluorophor. Folglich findet die Anregung und Emission im sichtbaren Wellenlängenbereich statt. Bekannte Beispiele sind *Calcium Green* (4)^[70], *Fluo-3* (5), *Fluo-4* (6) und *Rhod-2* (7) (Abbildung 1.3).^[62] Die Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration erfolgt dabei direkt aus der Änderung der Fluoreszenzintensität, welche sich bei der Komplexbildung von Calcium-Ionen erhöht. Dadurch ist die Interpretation der Messungen simpler als bei ratiometrischen Messungen, allerdings spielt die gleichmäßige Verteilung des Sensors in der Zelle eine größere Rolle. Die genaue Funktionsweise und Calcium-Affinität von nicht-ratiometrischen Sensoren wird in den Abschnitten 1.3.2 und 1.3.3 behandelt.

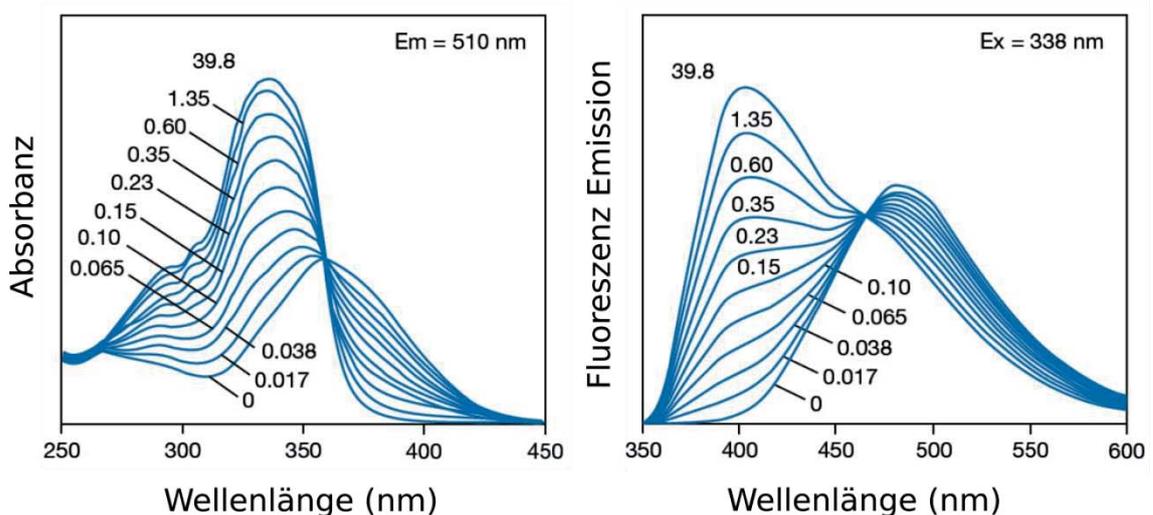


Abbildung 1.4 Links: Absorptionsspektrum von *Fura-2* (2), rechts: Fluoreszenzspektrum von *Indo-1* (3) in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration von 0–39.8 μM .^[71]

1.3.1 BAPTA als Calcium Chelator

Die Entwicklung von BAPTA durch ROGER Y. TSIEN hat die Forschung an intrazellulärem Calcium weit vorangebracht.^[11] Die Struktur von BAPTA ist ähnlich zu dem Chelator Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA) und bietet aufgrund der tertiären Amine erhebliche Vorteile für die Calcium-Komplexierung (Abbildung 1.5). Zwar hat EGTA, genauso wie BAPTA, eine höhere Selektivität für Ca^{2+} gegenüber Mg^{2+} , Na^{+} und K^{+} , aber die Ca^{2+} -Komplexierung ist im

physiologischen Bereich wegen der höheren Basizität der aliphatischen Stickstoffatome stark pH-abhängig.^[72] Die aliphatischen Amine von EGTA haben pK_s-Werte zwischen 8.5–9.5 während die pK_s-Werte von BAPTA zwischen 6–6.3 liegen. Durch die geringeren pK_s-Werte liegen die tertiären Amine von BAPTA im physiologischen pH-Bereich deprotoniert vor und sind unempfindlich gegenüber geringen Änderungen des pH-Werts. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Calcium Aufnahme und Abgabe bei BAPTA schneller erfolgt. Beim EGTA liegen die aliphatischen Amine bei pH = 7 protoniert vor, so dass erst die Protonen dissoziieren müssen bevor Ca²⁺ aufgenommen werden kann. Die Aufnahme erfolgt dabei um zwei bis drei Größenordnungen langsamer als bei unblockierten Liganden.^[72]

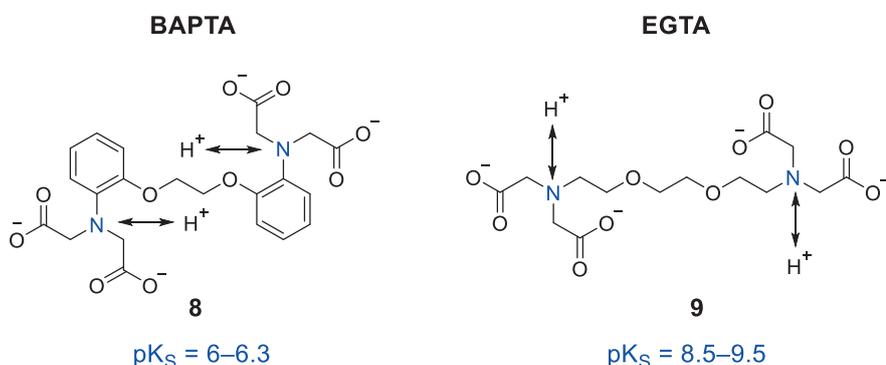


Abbildung 1.5: Vergleich der Calcium-Chelatoren BAPTA und EGTA.

Angeht die oben genannten Vorteile basiert der größte Teil der heutzutage verwendeten Calcium-Sensoren auf BAPTA. Die Calcium-Affinität dieser Sensoren kann durch Modifizierung des aromatischen BAPTA-Gerüsts mit elektronenziehenden bzw. -schiebenden Gruppen beeinflusst werden. Bei der Substitution mit elektronenschiebenden Gruppen wie z. B. einer Methylgruppe wird die Calcium-Affinität verstärkt. Bei einer elektronenziehenden Gruppe wie F⁻, Cl⁻ oder NO₂⁻ wird die Calcium-Affinität verringert.^[73]

Die Struktur des Ca²⁺-BAPTA-Komplexes wurde von GERIG *et al.* anhand des 5,5-difluorierten BAPTA-Derivats aufgeklärt.^[74] Dabei konnte anhand der Kristallstruktur (Abbildung 1.6) gezeigt werden, dass Ca²⁺ achtfach koordiniert vorliegt. Demnach wird ein Ca²⁺-Ion durch die vier Carboxylgruppen, die beiden Sauerstoffatome der Ethylenglycolbrücke und die beiden Stickstoffatome komplexiert.

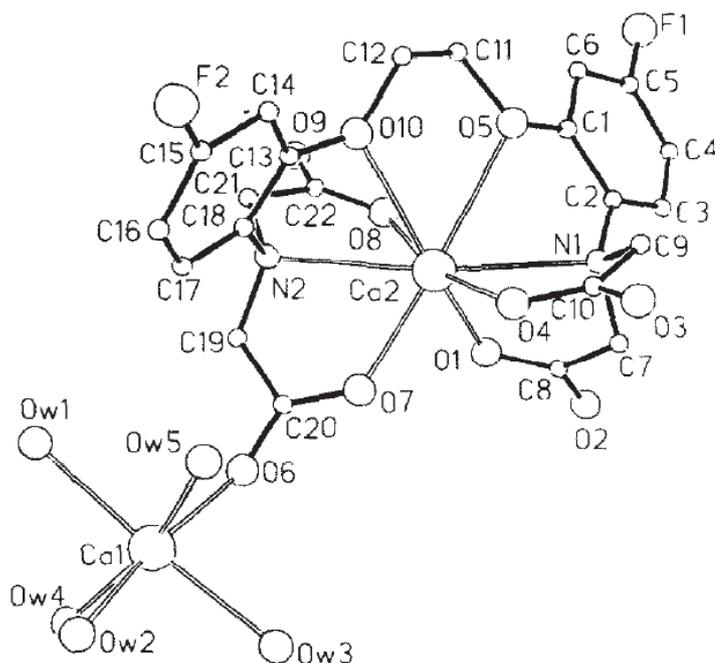


Abbildung 1.6 Kristallstruktur des 5,5-difluorierten BAPTA. Ein dezentrales Ca^{2+} -Ion (Ca1) liegt sechsfachkoordiniert durch ein Carboxylsauerstoff und fünf H_2O vor.^[74]

1.3.2 Funktionsweise nicht-ratiometrischer Calcium-Sensoren

Der Mechanismus, der dem Anstieg der Fluoreszenz bei der Komplexierung von Calcium-Ionen von BAPTA-basierenden nicht-ratiometrischen Sensoren zugrunde liegt, wird als Photoinduzierter Elektronentransfer (PET-Mechanismus) bezeichnet.^[10,75–77] PET-Sensoren kombinieren eine Elektronen-donierende Gruppe, im Fall von BAPTA Anilin, mit dem konjugierten, aromatischen System des Fluorophors. Durch die Anregung des Fluorophors mit elektromagnetischer Strahlung erfolgt der Übergang eines Elektrons aus dem *highest occupied molecular orbital* (HOMO, engl.) in das *lowest unoccupied molecular orbital* (LUMO, engl.) des Fluorophors. In der Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen hat BAPTA aufgrund der Konjugation mit dem Elektronenpaar des Stickstoffs eine hohe Elektronendichte. Dadurch liegt das HOMO des BAPTA energetisch höher und gibt ein Elektron an den Fluorophor ab, wodurch die Lücke im HOMO des Fluorophors wieder gefüllt wird und eine Fluoreszenzlöschung stattfindet, weil das angeregte Elektron nicht mehr in den Grundzustand relaxieren kann (Abbildung 1.7 A).^[58,78] Dieser Vorgang wird als PET bezeichnet.

Im Gegensatz dazu kann Ca^{2+} -gebundenes BAPTA kein Elektron abgeben, weil das Ca^{2+} -Ion zum einen als Lewis-Säure fungiert und die Elektronendichte elektrostatisch anzieht und zum anderen wird durch die Bindung von Ca^{2+} das freie Elektronenpaar der Stickstoffatome durch einen sterischen Twist um ca. 90° vom Rest des Moleküls entkoppelt, wodurch die freien Elektronenpaare der Stickstoffatome nicht mehr mit dem BAPTA konjugiert vorliegen.^[58] Die Folge ist die Erniedrigung der Energie vom HOMO der Donorgruppe wodurch ein Elektronentransfer unterbunden wird. Das Elektron kann so aus dem angeregtem Zustand unter Emission von Licht wieder in den Grundzustand übergehen (Abbildung 1.7 B).

Der PET-Mechanismus und die damit verbundene Fluoreszenzlöschung ist umso effizienter je kürzer die Verlinkung zwischen dem Fluorophor und dem BAPTA ist. Deswegen zeigen Sensoren wie *Fluo-4* und *Rhod-2*, bei welchen die Verlinkung zwischen BAPTA und dem Fluorophor nur aus einer Bindung besteht, die geringste Quantenausbeute bei der Ca^{2+} -freien Form und drastische Erhöhung der Fluoreszenz bei einer Ca^{2+} -Komplexierung.^[78]

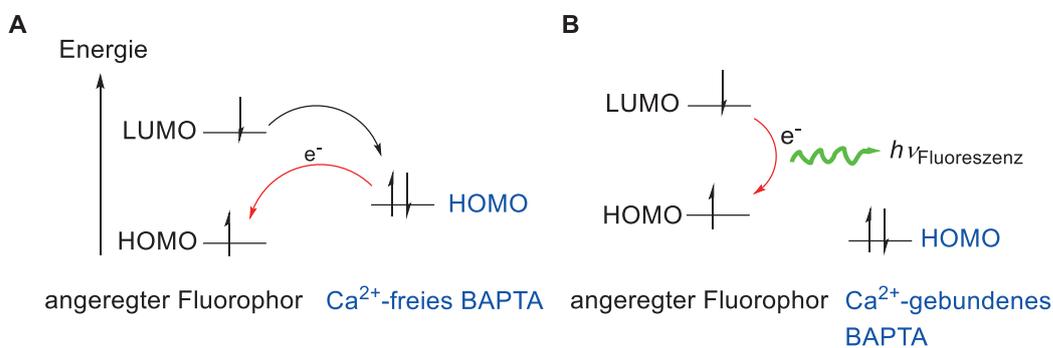


Abbildung 1.7 Energiediagramme zur Erklärung des Fluoreszenzanstiegs bei BAPTA-basierenden Calcium-Sensoren. **A:** In der Abwesenheit von Ca^{2+} findet eine Fluoreszenzlöschung durch das BAPTA aufgrund des PETs statt. **B:** Wenn Ca^{2+} an BAPTA gebunden ist, ist der PET energetisch nicht mehr vorteilhaft. Abbildung modifiziert nach TSIEN.^[73]

1.3.3 Calcium-Affinität nicht-ratiometrischer Calcium-Sensoren

Um quantitative Ca^{2+} -Konzentrationen durch Fluoreszenzintensitätsmessungen zu bestimmen, muss eine Kalibrierung erfolgen.^[65] Eine der wichtigsten Betrachtungen ist hierbei die Ca^{2+} -Bindungsaffinität, die sich in der Dissoziationskonstante K_D des Ca^{2+} -Sensors-Komplexes



widerspiegelt. Dabei beschreibt K_D den Zerfall eines Komplexes in die einzelnen Bestandteile. Im Falle vom Calcium-Sensor-Komplex zu den Calcium-Ionen und dem freien Sensor:



Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich folglich für K_D :

$$K_D = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{Sensor}]}{[\text{Ca}^{2+} - \text{Sensor} - \text{Komplex}]}$$

Je kleiner die Dissoziationskonstante ist, desto stabiler ist der gebildete Komplex. Die zu bestimmende Ca^{2+} -Konzentration sollte innerhalb des Bereichs 0.1 bis $10 \times K_D$ liegen.^[65] Idealerweise liegt die Dissoziationskonstante nah an der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.^[79] Wenn K_D zu groß ist, bleibt der Calcium-Sensor insensitiv gegenüber Ca^{2+} -Ionen. Bei einem zu kleinem K_D und einer hohen Ca^{2+} -Konzentration würde es zu einer Sättigung des Sensors und damit zu ungenauen Messergebnissen kommen. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgt in den meisten Fällen durch eine *in vitro* Kalibrierung. Dazu werden Fluoreszenzkurven bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen in einem Ca^{2+} -EGTA-Puffer durchgeführt.^[65] Die Calcium-Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]$ hängt dabei folgendermaßen von der Dissoziationskonstante K_D ab:^[80]

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)}$$

F ist die experimentell gemessene Fluoreszenzintensität bei der jeweiligen Ca^{2+} -Konzentration, F_{\min} die Fluoreszenzintensität bei der Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen und F_{\max} die Intensität bei der Konzentration des an Ca^{2+} gesättigten Sensors. Der K_D -Wert hängt stark von den Umgebungsbedingungen ab. Dazu gehören Temperatur, pH-Wert, Viskosität, ionische Stärke und andere Metallionen.^[70,81-83] Deswegen kann sich der *in vitro* bestimmte K_D -Wert von dem tatsächlichen K_D -Wert in den Zellen unterscheiden.^[65]

1.4 Kriterien und Designstrategien neuer Calcium-Sensoren

Die meisten heutzutage kommerziell erhältlichen Fluorophore enthalten eine Funktionalität, die es erlaubt Peptide, Proteine, Oligonukleotide, Lipide und andere Biomoleküle zu markieren, um biologische Prozesse fluoreszenzmikroskopisch untersuchen zu können. Zu den Funktionalitäten gehören z. B. Azide und Alkine, die durch eine 1,3-dipolare Cycloaddition (HUISGEN-Reaktion) addiert werden oder Amine und Carboxylgruppen, welche durch eine Amidbindung an das Biomolekül gekoppelt werden können.^[5] Funktionalisierte Calcium-Sensoren sind bisher nicht kommerziell erhältlich. Das Ziel dieses Projektes ist es, Calcium-Sensoren zu entwickeln, die einen Linker mit einer Funktionalität enthalten, so dass der Sensor durch eine effiziente chemische Reaktion mit weiteren Molekülen verknüpft werden kann. Die Sensoren sollen auf BAPTA (siehe Abschnitt 1.3.1) basieren wobei der Linker die Fluoreszenz-eigenschaften und Calcium-Komplexierung nicht beeinflussen darf.

Auf BAPTA basierende Calcium-Sensoren bestehen aus einem aromatischen System mit vier Carboxylgruppen als Calcium-Chelatoren und einem Fluorophor. Für die Position des zusätzlichen Linkers sind demzufolge zwei Möglichkeiten denkbar, die keinen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften oder Ca^{2+} -Chelatisierung haben sollten. Die erste Möglichkeit wäre die Anbringung des Linkers an der Ethylenglycolbrücke und die zweite an den Aromaten. Dabei sollte sich der Linker möglichst weit entfernt von den chelatisierenden Gruppen und dem Fluorophor befinden. Die bevorzugten Positionen sind in Abbildung 1.8 dargestellt.

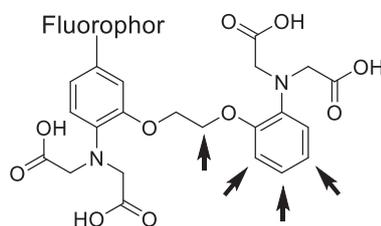


Abbildung 1.8 Struktur eines auf BAPTA basierenden Calcium-Sensors. Die bevorzugten Positionen zur Modifikation mit einem Linker sind mit Pfeilen markiert.



Zielmoleküle sind zwei verschiedene BAPTA-Derivate, die als Vorstufen für die Calcium-Sensoren gewählt wurden. Das BAPTA-Derivat **10** wurde von MALLETT *et al.* beschrieben und enthält einen Azid-Linker an der Ethylenglycolbrücke (Abbildung 1.9, links).^[84,85]

Das BAPTA-Derivat **11** wurde im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt. Als Kupplungsreaktion wurde die HUISGEN-Reaktion gewählt, da diese viele Vorteile bietet.^[8,86,87] Die Reaktion ist schnell und quantitativ, kann in Wasser ablaufen und ist unempfindlich gegenüber dem pH-Wert. Außerdem ist sie stark selektiv, weil die Reaktion nur zwischen einem Alkin und Azid abläuft. Als Funktionalität wurde ebenfalls eine Azidfunktionalität gewählt, welche über eine *n*-Butylgruppe mit dem aromatischen System verbunden ist (Abbildung 1.9, rechts). Eine Azidfunktion hat dabei im Gegensatz zu einem Alkin mehrere Vorteile. Zum einen sind Azide resistent gegenüber Hydrierungen, die bei der Synthese der BAPTA-Derivate unumgänglich sind, zum anderen können Azide mit einem geeigneten Reduktionsmittel zu Aminen reduziert werden. Dadurch kann der Sensor nicht nur über die HUISGEN-Cycloaddition an Alkine gekuppelt werden, sondern auch über eine Peptidbindung zwischen dem Amin und einer aktivierten Säuregruppe z. B. eines NHS-Esters.

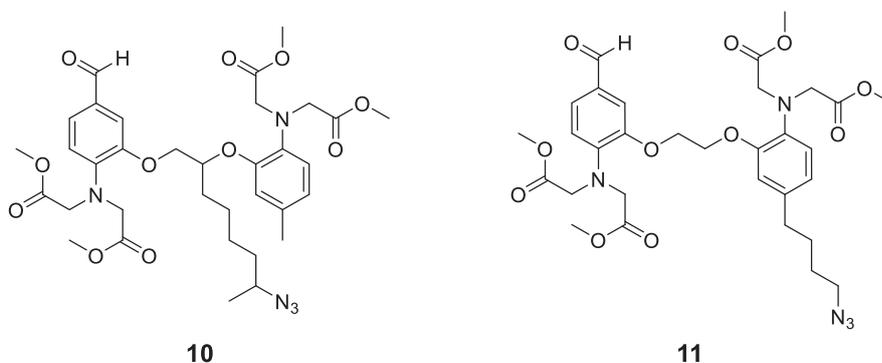


Abbildung 1.9 Strukturen der geplanten BAPTA-Derivate als Calcium-Sensor-Vorstufen. Das BAPTA-Derivat **10**^[84,85] enthält einen Azid-Linker an der Ethylenglycolbrücke und das BAPTA-Derivat **11** einen Azid-Linker am aromatischen Ringsystem.

In dem neu entwickelten BAPTA-Derivat **11** ersetzt der Azid-Linker die Methylgruppe der kommerziell erhältlichen Calcium-Sensoren wie *Fluo-4* (siehe Abschnitt 1.3). Der Hauptzweck dieser Methylgruppe ist es, weitere Substitutionen bei der VILSMEIER-HAACK-Formylierung am aromatischen System zu blockieren, um sicherzustellen, dass nur ein Fluorophor an BAPTA angebracht wird. Außerdem hat die Methylgruppe einen leicht elektronenschiebenden Effekt, was die Affinität des BAPTA zu Ca^{2+} -Ionen erhöht. Neben der Option den Sensor mit einem Biomolekül zu verknüpfen, erfüllt die integrierte Gruppe auch sämtliche oben beschriebenen Anforderungen.

Beide BAPTA-Derivate **10** und **11** enthalten in *para*-Position zu einer der Aminogruppe eine aromatische Aldehydgruppe. An dieser erfolgt die Synthese des Fluorophors. So können mit einer BAPTA-Vorstufe Calcium-Sensoren mit verschiedenen Absorptions- und Emissionswellenlängen hergestellt werden. Die Synthese der beiden BAPTA-Derivate ist in Abschnitt 1.5 beschrieben.

Die an den Sensor gekoppelten Fluorophore sollen Licht im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums (400–700 nm) absorbieren, da die Verwendung von UV-Strahlung eine höhere Cytotoxizität aufweist und häufiger zelluläre Autofluoreszenz auslöst.^[65] Weiterhin ist ein Ziel, Sensoren zu entwickeln, die in verschiedenen Wellenlängenbereichen sichtbares Licht emittieren, um durch Kombination z. B. eines rot- und eines grün-fluoreszierenden Sensors genauere Ca^{2+} -Messungen durchzuführen. Aus diesen Gründen wurden auf Fluorescein (**12** und **13**) und Rhodamin basierende (**14** und **15**) Fluorophore gewählt (Abbildung 1.10). Fluorescein-Derivate werden mit sichtbarem Licht (480–500 nm) angeregt und emittieren im langwelligen grünen Bereich. Die Synthese und Analyse der neuen auf Fluorescein basierten Calcium-Sensoren wird in Abschnitt 1.6 beschrieben. Die Rhodamin-basierten Sensoren werden ebenfalls mit sichtbarem Licht angeregt (540–590 nm) und emittieren im langwelligen roten Bereich (siehe Abschnitt 1.7).

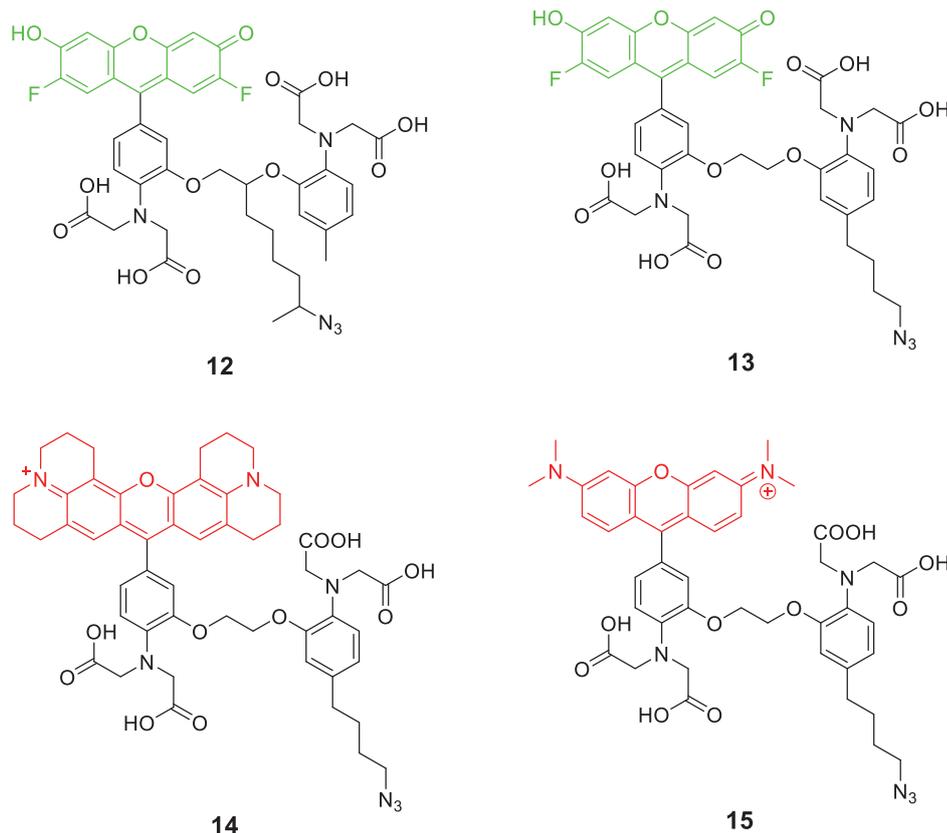


Abbildung 1.10 Strukturformeln der in dieser Arbeit entwickelten Calcium-Sensoren. Die Fluorescein-basierten Calcium-Sensoren Fluo-Azid-1 (**12**) und Fluo-Azid-2 (**13**) unterscheiden sich durch die Position des Azid-Linkers. Die Rhodamin-basierten Calcium-Sensoren X-Rhod-Azid (**14**) und Rhod-Azid (**15**) beinhalten den gleichen Azid-Linker, unterscheiden sich aber in der Struktur des fluoreszierenden Anteils.

1.5 Synthese der BAPTA-Derivate

1.5.1 Synthese des BAPTA-Derivats 10

Das BAPTA-Derivat **10**, bei dem sich der Azid-Linker an der Ethylenglycol-Verbrückung befindet, wurde nach einer literaturbekannten Vorschrift^[84,85] synthetisiert (Schema 1.2). Im ersten Schritt wurde 2-Nitrophenol (**16**) mit dem kommerziell erhältlichen 1,2-Epoxy-7-octen in Gegenwart von Kalium-*tert*-butanolat in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) zu einem Gemisch aus zwei regioisomeren Alkoholen umgesetzt. Um den sekundären Alkohol **17** zu erhalten, wurde die Mischung mit Tritylchlorid in Pyridin versetzt. Dies führte zu der selektiven Tritylierung des nicht gewünschten primären Alkohols zu Verbindung **17a**, welche durch eine säulenchromatographische

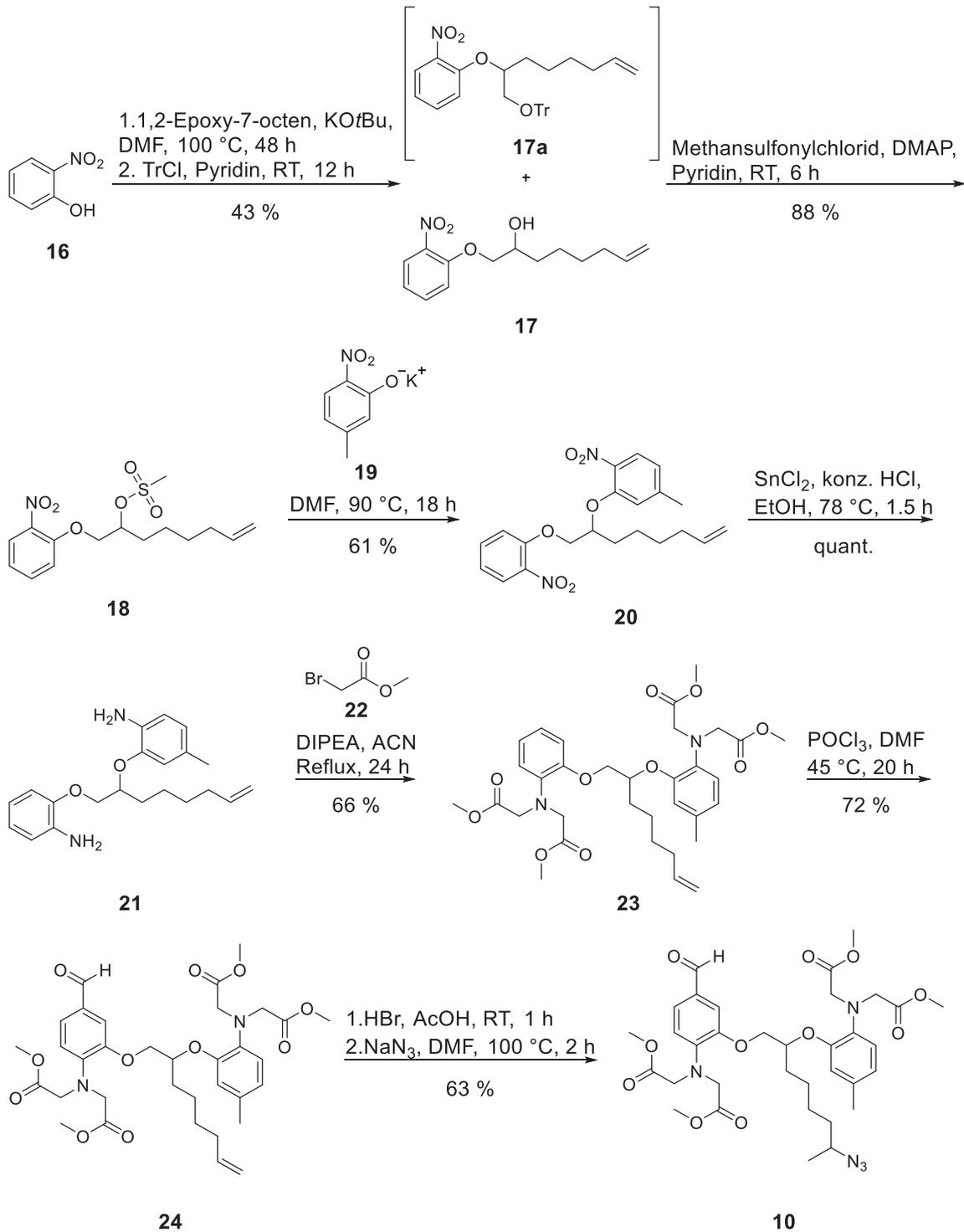


Reinigung abgetrennt wurde. Das gewünschte Produkt **17** konnte nach zwei Schritten mit einer Ausbeute von 43 % erhalten werden. Anschließend wurde die Verbindung **17** mit Methansulfonylchlorid und 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) in Pyridin zu Verbindung **18** mit einer Ausbeute von 88 % mesyliert. Verbindung **18** wurde anschließend mit Kalium-5-Methyl-2-nitrophenolat (**19**) in DMF bei 90 °C zu der Zwischenstufe **20** umgesetzt.

Um die späteren Carboxylgruppen des Calcium-Sensors aufzubauen, erfolgten erst eine Reduktion der beiden Nitrogruppen mit Zinnchlorid in konzentrierter Salzsäure und Ethanol zu Verbindung **21** und anschließend eine Alkylierung mit Methylbromacetat (**22**) in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) zu dem Produkt **23**. Die Carboxylgruppen liegen geschützt als Methylester vor, um Nebenreaktionen zu vermeiden und die Isolierung der Folgestufen zu vereinfachen. Die Entschützung erfolgt erst im letzten Schritt nach der vollständigen Synthese des Fluorophors.

Im nächsten Schritt wurde die aromatische Aldehydgruppe aufgebaut, die unerlässlich für die Synthese des fluoreszierenden Farbstoffs ist. Dazu wurde Verbindung **23** mit Phosphorylchlorid in DMF in einer VILSMEIER-HAACK-Formylierung^[88], bei der bevorzugt *para*-Produkte gebildet werden, zu der gewünschten Verbindung **24** mit einer guten Ausbeute von 72 % umgesetzt. Die Methylgruppe am zweiten aromatischen Ring verhinderte eine doppelte Formylierung.

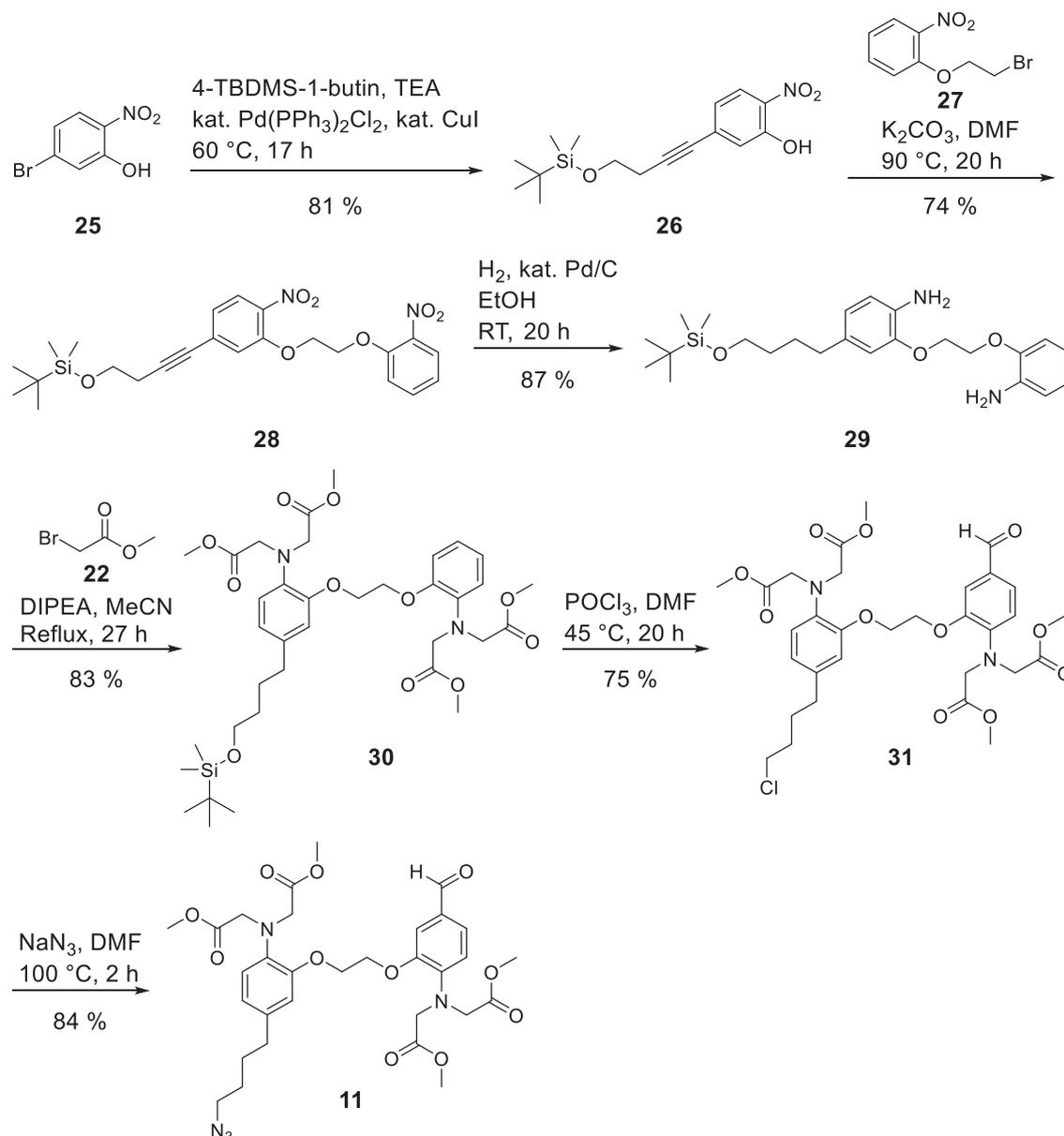
Im letzten Schritt erfolgte die Synthese des Azid-Linkers durch Aktivierung der Doppelbindung in zwei Stufen. Dazu wurde Verbindung **24** erst durch eine ionische Additionsreaktion mit Bromwasserstoff in Essigsäure zur Reaktion gebracht. Das Bromatom wurde anschließend mit Natriumazid durch eine Azid-Gruppe substituiert, um das gewünschte BAPTA-Derivat **10** zu erhalten.



Schema 1.2 Synthese des BAPTA-Derivats **10**. Der Azid-Linker befindet sich an der Ethylenglycolbrücke. Die Verbindung **10** konnte nach 9 Stufen erhalten werden.

1.5.2 Synthese des neuen BAPTA-Derivats 11

Die Synthese des BAPTA-Derivats **11** wurde im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt und das Derivat konnte in insgesamt sechs Stufen mit guten bis sehr guten Ausbeuten synthetisiert werden (Schema 1.3). Im ersten Schritt wurde das kommerziell erhältliche 5-Brom-2-nitrophenol (**25**) mit 4-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1-butin (4-TBDMS-1-butin) mittels einer Palladium- und Kupfer-katalysierten SONOGASHIRA-HAGIHARA-Kreuzkupplung in Anwesenheit von Triethylamin (TEA) zu Verbindung **26** umgesetzt, um den späteren Azid-Linker aufzubauen.



Schema 1.3 Synthese des BAPTA-Derivats **11**. Der Azid-Linker befindet sich am aromatischen Ring. Verbindung **11** konnte nach insgesamt 6 Stufen erhalten werden.



Eine Silyl-Schutzgruppe ist dabei aufgrund von darauffolgenden nukleophilen Substitutionsreaktionen notwendig und kann durch Fluoride (z. B. Tetrabutyl-ammoniumfluorid) leicht wieder entfernt werden.

Im zweiten Schritt wurde das BAPTA-Grundgerüst durch die Umsetzung von **26** mit 1-(2-Bromethoxy)-2-nitrobenzol (**27**) in einer nukleophilen Substitutionsreaktion aufgebaut. Im ersten Versuch wurde die Synthese bei Raumtemperatur in DMF und mit Kaliumcarbonat als Base durchgeführt, allerdings lieferte diese Methode eine nicht zufriedenstellende Ausbeute des Produkts **28** von maximal 33 %. Auch die Verwendung von Kaliumhydroxid als stärkere Base erhöhte nicht die Ausbeute. Letztendlich führte die Erhöhung der Temperatur auf 90 °C, wie in einer ähnlichen Reaktion von LUBOCH *et al.*, zu einer guten Ausbeute von 74 %.^[89]

Im nächsten Schritt ermöglichte eine Palladium-katalysierte Hydrierung in Ethanol die simultane Reduktion des Alkins zum Alkan und der beiden Nitrogruppen zu Aminen. Dazu wurde Verbindung **28** mit Palladium auf Aktivkohle in einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur mit einer Ausbeute von 87 % zu der Verbindung **29** umgesetzt. Hierbei ist zu beachten, dass eine säulenchromatographische Aufreinigung, trotz nur eines durch Fluoreszenzauslöschung detektierten Produkts auf der Dünnschichtchromatographie-(DC-)-Platte, erfolgen muss, um eine höhere Ausbeute der darauffolgenden Reaktion zu erhalten.

Zur Vervollständigung des BAPTA-Grundgerüsts wurde Methylbromacetat (**22**) mit dem Amin **29** in Anwesenheit von DIPEA unter Rückfluss erhitzt, um die späteren Carboxylgruppen zu integrieren. Die Carboxylgruppen liegen dabei wie in BAPTA-Derivat **10** geschützt als Methylester vor, um Nebenreaktionen bei darauffolgenden Syntheseschritten zu vermeiden und um die Aufreinigung der Zwischenstufen zu vereinfachen. Die Entschützung erfolgte erst nach der vollständigen Synthese des Fluorophors.

Um eine spätere Verknüpfung des Fluorophors an das BAPTA-Gerüst zu ermöglichen, wurde im nächsten Schritt eine Aldehydgruppe am aromatischen Ring erzeugt. Dazu wurde eine VILSMEIER-HAACK-Formylierung verwendet, bei der mit POCl₃ in DMF das VILSMEIER-Reagenz gebildet wird. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten



Äquivalente von POCl_3 einen Einfluss auf die Produktbildung haben. Im Falle von 2 Äquivalenten POCl_3 erfolgte nur die Abspaltung der Silylschutzgruppe mit anschließender Chlorierung der Butylgruppe. Bei einem Überschuss von 10 Äquivalenten wurde das Produkt mit einer geringen Ausbeute von 12 % erhalten, jedoch bildete sich in großer Menge ein diformyliertes Nebenprodukt. Schließlich lieferte die Umsetzung von Verbindung **30** mit 4 Äquivalenten POCl_3 in DMF das gewünschte formylierte Produkt **31** mit einer guten Ausbeute von 74 %. Die Position der Aldehydgruppe wurde mit Hilfe von 2D-NMR-Spektren überprüft. Einen großen Vorteil dieser Reaktion bietet die simultane Umsetzung von drei Reaktionsschritten. In nur einer Reaktion wird die Silylschutzgruppe abgespalten und die Hydroxygruppe durch ein Chloratom als bessere Abgangsgruppe substituiert. Außerdem wird im gleichen Schritt die Aldehydgruppe generiert. Dadurch konnte die ursprünglich vorgesehene neunstufige Synthese auf sechs Stufen reduziert werden.

Um die Synthese des BAPTA-Derivats **11** abzuschließen und den Azid-Linker zu generieren, wurde Verbindung **31** mit NaN_3 bei 100 °C mit einer guten Ausbeute von 84 % umgesetzt.

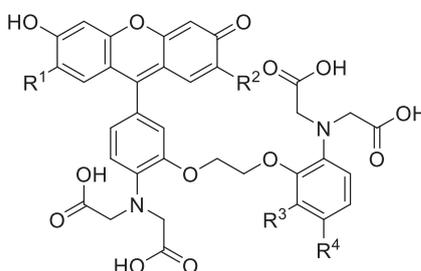
Somit konnte das neuentwickelte BAPTA-Derivat **11**, bei dem sich der Azid-Linker am aromatischen Gerüst befindet, in nur sechs Stufen und mit guten Ausbeuten erhalten werden. Im Gegensatz dazu beinhaltet die Synthese des literaturbekannten BAPTA-Derivats **10** insgesamt 9 Stufen und geringere Ausbeuten.



1.6 Auf Fluorescein basierte Calcium-Sensoren

1.6.1 Calcium-Sensor *Fluo-4*

Die in dieser Arbeit synthetisierten, grün fluoreszierenden Calcium-Sensoren beruhen auf dem kommerziell erhältlichen Calcium-Sensor *Fluo-4*^[90], einer Weiterentwicklung des von MINTA *et al.* beschriebenen *Fluo-3*^[62] (Abbildung 1.11). Beide Sensoren setzen sich zusammen aus dem Calcium-Chelator BAPTA und einem Fluorescein-ähnlichen Xanthen-Derivat als Fluorophor und emittieren im langwelligen, grünen Bereich ($\lambda_{Em,max}$ (*Fluo-3*) = 526 nm, $\lambda_{Em,max}$ (*Fluo-4*) = 516 nm).^[65] Der wesentliche Unterschied ist, dass es sich bei *Fluo-3* um ein Dichlorfluorescein- und bei *Fluo-4* um ein Difluorfluorescein-Derivat handelt. Die Substitution der Wasserstoffatome des Fluoresceins durch Halogenatome verringert die pH-Sensitivität des Calcium-Sensors. Bei *Fluo-3* wird der pK_s-Wert der phenolischen OH-Gruppe von 6.2 auf 4.5 – im Fall von *Fluo-4* auf 4.8 – durch die Halogenatome reduziert. Dadurch wird sichergestellt, dass die phenolische OH-Gruppe bei physiologischem pH-Wert ionisiert vorliegt. Dies ist ein bedeutendes Kriterium, weil protoniertes Fluorescein kein Licht emittiert.^[72]



| Sensor | $K_D / \mu M$ | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ |
|-----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>Fluo-3</i> | 0.39 | Cl | Cl | H | CH ₃ |
| <i>Fluo-4</i> | 0.35 | F | F | H | CH ₃ |
| <i>Fluo-5F</i> | 2.3 | F | F | H | F |
| <i>Fluo-5N</i> | 90 | F | F | H | NO ₂ |
| <i>Fluo-4FF</i> | 9.7 | F | F | F | F |

Abbildung 1.11 Übersicht der auf Fluorescein basierten, kommerziell erhältlichen Calcium-Sensoren. Die in dieser Arbeit synthetisierten Calcium-Sensoren basieren auf *Fluo-4*.^[71]

Sowohl *Fluo-3* als auch *Fluo-4* fluoreszieren kaum in Abwesenheit von Calcium-Ionen. Bei der Bindung von Calcium-Ionen bildet sich ein BAPTA-Ca²⁺-Komplex und die Fluoreszenzintensität steigt drastisch an ohne eine Verschiebung des Emissionsmaximums (Abbildung 1.12). Somit gehören *Fluo-4* und *Fluo-3* zu den nicht-ratiometrischen Calcium-Sensoren, mit denen sich die Konzentration von Ca²⁺-Ionen direkt aus den Intensitätsänderungen der Emission bestimmen lassen. Die Calcium-Affinität von *Fluo-4* ($K_D = 0.35 \mu\text{M}$) ist geringfügig höher als die von *Fluo-3* ($K_D = 0.39 \mu\text{M}$).^[14] Beide gehören somit zu den hochaffinen Calcium-Sensoren, mit denen zelluläre Ca²⁺-Konzentrationen im Bereich von 100 nM bis 1 μM gemessen werden können. Für Ca²⁺-Konzentrationen zwischen 1 μM bis 1 mM werden Sensoren mit einer niedrigeren Bindungsaffinität verwendet, um eine Übersättigung des Sensors zu verhindern. Dazu gehören die Analoga *Fluo-5F*, *Fluo-5N* und *Fluo-4FF* (Abbildung 1.11).^[90] Diese haben aufgrund von elektronenziehenden Substituenten am BAPTA-Grundgerüst eine niedrigere Affinität gegenüber Ca²⁺-Ionen und infolgedessen einen höheren K_D -Wert.

Obwohl *Fluo-3* und *Fluo-4* strukturell sehr ähnlich sind, bietet *Fluo-4* einige Vorteile. Zum einen wird durch die Fluoratome die Emissionsintensität um 40 % erhöht.^[72] Dadurch können bei gleichbleibender Intensität geringere Sensor-Konzentrationen eingesetzt werden. Außerdem kann *Fluo-4* aus diesem Grund mit einer geringeren Intensität angeregt werden, was zu einer geringeren Photobleichung des Sensors und zu einer verringerten zellulären Phototoxizität führt. Zum anderen ist das Absorptionsmaximum von *Fluo-4* ($\lambda_{\text{Abs,Max}} = 494 \text{ nm}$) hypsochrom im Vergleich zu *Fluo-3* ($\lambda_{\text{Abs,Max}} = 506 \text{ nm}$) verschoben.^[72] Dadurch ist *Fluo-4* besser zur Verwendung in der Konfokalmikroskopie und Durchflusszytometrie geeignet, da es effizienter bei der Wellenlänge des häufig verwendeten Argon-Ionen-Lasers (488 nm) angeregt werden kann.^[91] Aus diesen Gründen wurde *Fluo-4* als Vorbild für die in Abschnitt 1.6.2 beschriebene Synthese der neuen Calcium-Sensoren verwendet.

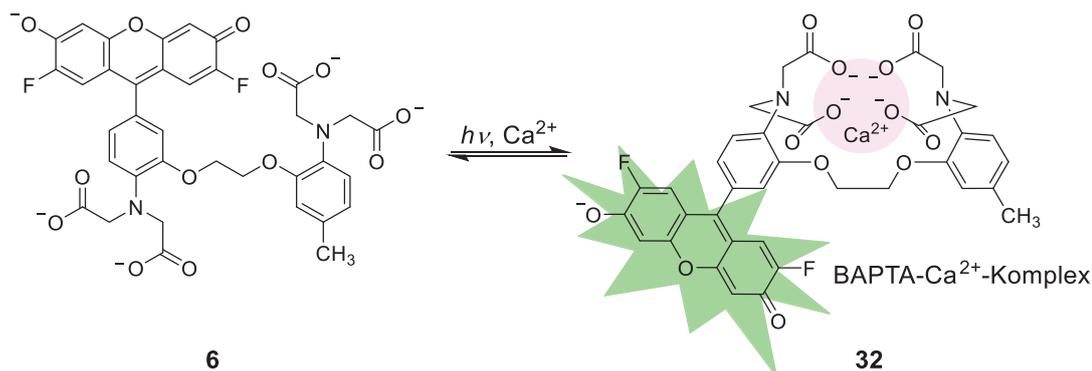


Abbildung 1.12 Bildung des Ca^{2+} -BAPTA-Komplexes am Beispiel des Calcium-Sensors *Fluo-4* (6). In Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen ist die Verbindung 6 kaum fluoreszierend. Mit Ca^{2+} -Ionen bildet sich der Komplex 32 und die Fluoreszenzintensität steigt drastisch an.

1.6.2 Synthese der neuen Calcium-Sensoren

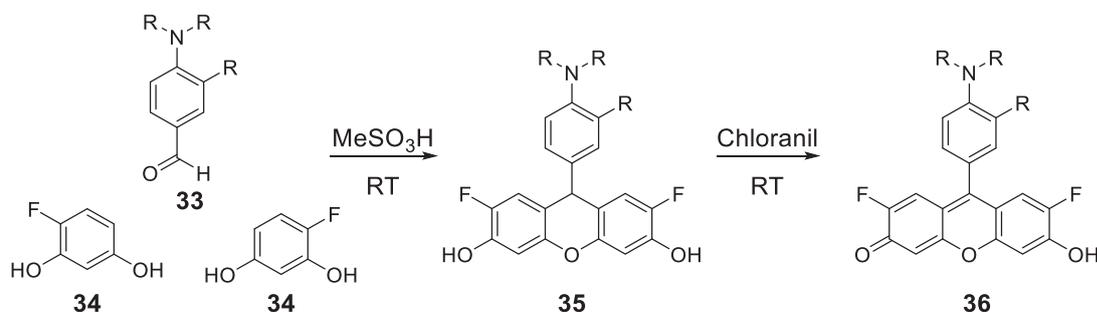
Synthese von Fluo-Azid-1 (12)

Die Präparation von Fluorescein durch Kondensation von Resorcinol mit Phthalsäureanhydrid in Gegenwart von Zinkoxid wurde erstmals im Jahr 1871 durch VON BAYER beschrieben.^[92] Seitdem wurden zahlreiche, unter anderem auch halogenierte Derivate von Fluorescein veröffentlicht.^[93] Die Synthese der Derivate erfolgt dabei zwar in einem Schritt, aber unter harschen Bedingungen, entweder bei hohen Temperaturen von ca. 140 °C oder in Anwesenheit von starken Säuren wie Schwefelsäure.^[94] Diese Bedingungen sind für Calcium-Sensoren aufgrund der aromatischen Substituenten am BAPTA ungeeignet. Fluo-Farbstoffe, bzw. metallsensitive Analoga von Fluorescein, wurden generell in einer mehrstufigen Synthese durch die Addition von nukleophilen Arenen an geschützte Xanthere generiert.^[62,90,95]

GEE *et al.* veröffentlichten eine relativ milde, zweistufige Synthese für die Darstellung von fluorierten Fluorescein-Derivaten, unter anderem für *Fluo-4*.^[93,96,97] Dabei handelt es sich um die Kondensation von 4-Aminobenzaldehyden 33 mit zwei Äquivalenten 4-Fluorresorcin (34) in Methansulfonsäure zu Dihydroxyxanthenen 35 bei Raumtemperatur (Schema 1.4). Eine anschließende Oxidation mit Chloranil erzeugt den Xanthen-Fluorophor 36. Die Methansulfonsäure dient bei der Reaktion nicht nur als Lösungsmittel sondern auch als Lewis-Säure-Katalysator.

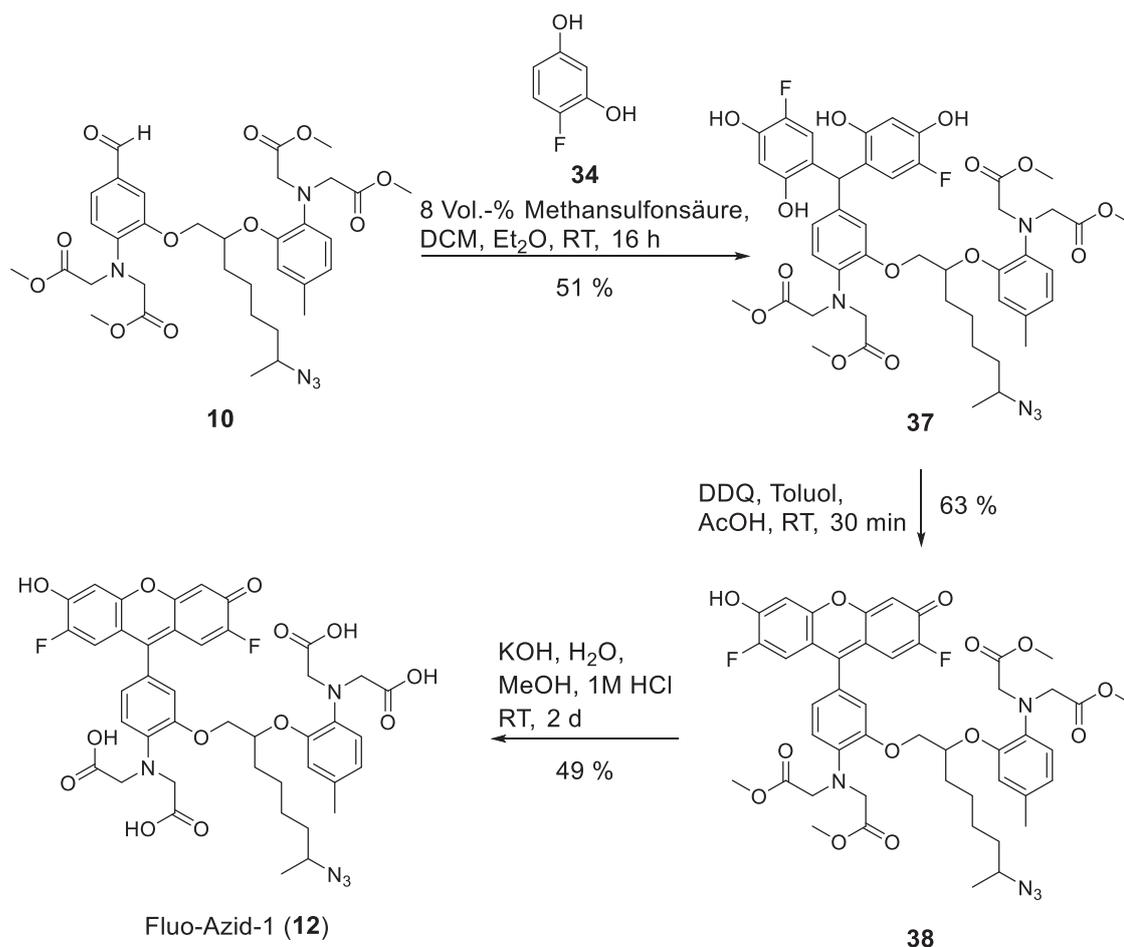
Diese Bedingungen wurden ebenfalls für die Synthese des Fluo-Azid-1 (12) angewandt. Dazu wurde das BAPTA-Derivat 10 mit 4-Fluorresorcin

(**34**) in unverdünnter Methansulfonsäure gelöst und bei Raumtemperatur umgesetzt. Allerdings stellte sich durch ESI-MS- und IR-Spektroskopie heraus, dass die Azidfunktionalität bei diesen Bedingungen nicht stabil ist. Ein möglicher Grund ist die hohe Konzentration an Methansulfonsäure.



Schema 1.4 Darstellung von fluorierten Fluorescein-Derivaten nach GEE *et al.*^[93]

Das Fluo-Azid-1 (**12**) konnte schließlich durch eine alternative Syntheseroute, angelehnt an BACCI *et al.*, erfolgreich hergestellt werden (Schema 1.5).^[98] Dazu wurde das BAPTA-Derivat **10** (Synthese siehe Abschnitt 1.5.1) zusammen mit 4-Fluorresorcin (**34**) in Anwesenheit von 8 Vol.-% Methansulfonsäure in Dichlormethan und Diethylether zu der Triarylmethan-Zwischenstufe **37** kondensiert. Anschließend erfolgte der Ringschluss durch Oxidation von Verbindung **37** zu dem Xanthen-Derivat **38** mit Hilfe von 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) in Toluol und Essigsäure. Die Essigsäure soll Nebenreaktionen, hauptsächlich die Entstehung von Oligomeren, verhindern. Das von BACCI *et al.*^[98] verwendete Benzol wurde dabei aufgrund der Kanzerogenität durch Toluol ersetzt. Der letzte Schritt ist eine basenvermittelte Hydrolyse der Methylester. Dazu wurde Verbindung **37** mit Kaliumhydroxid in Wasser und Methanol entschützt. Eine anschließende Umsetzung mit 1 M-Salzsäure und RP-HPLC-Aufreinigung lieferte das Produkt **12** als Säure.

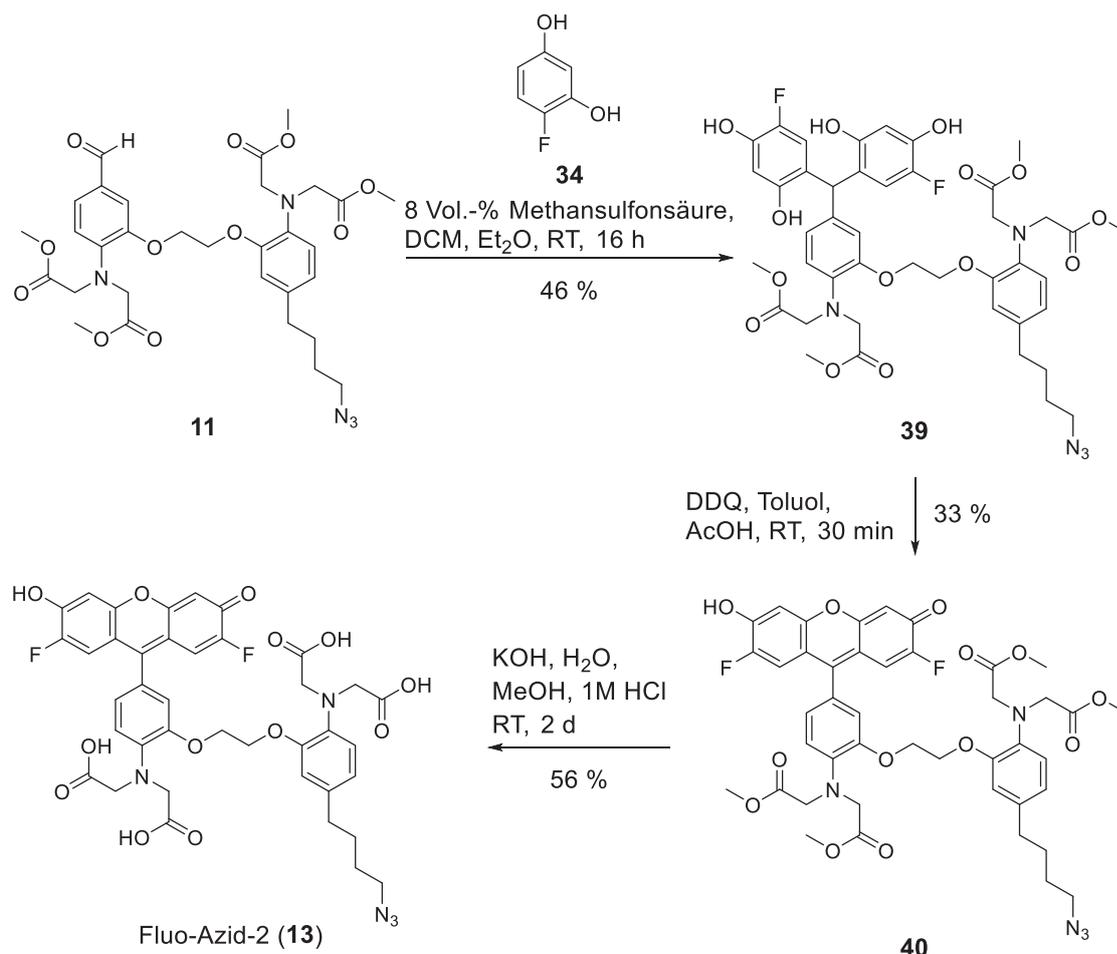


Schema 1.5 Synthese von Fluo-Azid-1 (**12**). Der Ca^{2+} -sensitive Sensor konnte ausgehend vom BAPTA-Derivat **10** in drei Stufen erhalten werden. Der Azid-Linker befindet sich an der Ethylenglycolbrücke.

Synthese von Fluo-Azid-2 (**13**)

Der wesentliche Unterschied von Fluo-Azid-1 (**12**) zu Fluo-Azid-2 (**13**) ist die Position des Azid-Linkers. Die Synthese des Fluorophors an der aromatischen Aldehydgruppe erfolgte somit analog zu der zuvor beschriebenen Synthese von Fluo-Azid-1 (**12**).

Das BAPTA-Derivat **11** (Synthese siehe Abschnitt 1.5.2) wurde in einer Kondensationsreaktion mit 4-Fluorresorcin (**34**) in 8 Vol.-% Methansulfonsäure zu der Zwischenstufe **39** mit einer Ausbeute von 46 % umgesetzt (Schema 1.6). Eine anschließende Oxidation mit DDQ in Toluol und Essigsäure lieferte den gewünschten Fluorophor **40**. Abschließend wurden die Methylester mit Kaliumhydroxid in Methanol und Wasser durch eine basenvermittelte Hydrolyse gespalten. Das Produkt wurde nach Zugabe von 1 M-Salzsäure und RP-HPLC-Aufreinigung als Säure **13** erhalten.



Schema 1.6 Synthese von Fluo-Azid-2 (13). Der Ca²⁺-sensitive Sensor konnte ausgehend vom BAPTA-Derivat 11 in drei Stufen erhalten werden. Der Azid-Linker befindet sich, im Gegensatz zu Fluo-Azid-1 (12), am Phenylring des BAPTA-Systems.

1.6.3 Ca²⁺-abhängige Fluoreszenzmessungen

Nach der erfolgreichen Synthese der neuartigen Calcium-Sensoren Fluo-Azid-1 (12) und Fluo-Azid-2 (13) wurden diese durch verschiedene spektroskopische Untersuchungen auf ihre Eigenschaften charakterisiert und miteinander verglichen. Die UV/vis-Spektren zeigen wie erwartet keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 1.13 B und Abbildung 1.14 B). Im sichtbaren Spektralbereich ist ein Absorptionsmaximum bei 493 nm vorhanden, welches dem Fluorophor zugeordnet werden kann und im typischen Wellenlängenbereich von Fluorescein-Derivaten liegt. Im ultravioletten Spektralbereich sind mehrere Maxima zu sehen, die teilweise von dem aromatischen Grundgerüst von BAPTA stammen. BAPTA zeigt dabei ein Maximum bei 254 nm mit einer Schulter bei 287 nm.^[11]

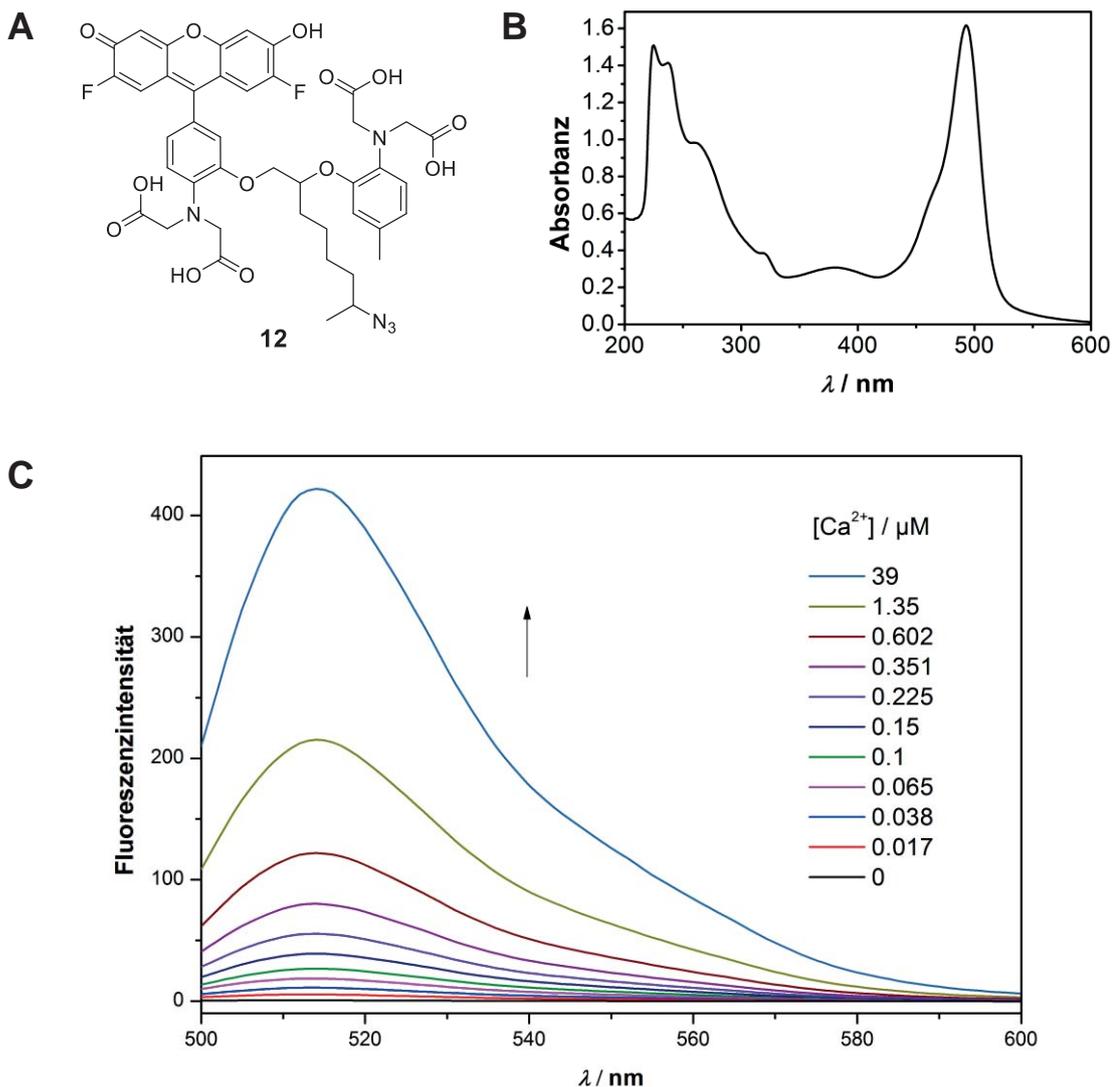


Abbildung 1.13 **A** Strukturformel von Fluo-Azid-1 (**12**). **B** Absorptionsspektrum von Fluo-Azid-1 (**12**) (10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C). **C** Fluoreszenzspektrum der Ca²⁺-abhängigen Messungen ($\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$) von Fluo-Azid-1 (**12**) (2 μM **12**, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C).

Eine wichtige Untersuchung von Calcium-Sensoren stellen die Ca²⁺-abhängigen Fluoreszenzmessungen dar. Dabei wird die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen, freien Ca²⁺-Konzentrationen gemessen. Die Ca²⁺-abhängigen Fluoreszenzmessungen wurden für die neuen Calcium-Sensoren Fluo-Azid-1 (**12**) (Abbildung 1.13 C) und Fluo-Azid-2 (**13**) (Abbildung 1.14 C) und für das kommerziell erhältliche *Fluo-4* (**6**) (Abbildung 1.15) durchgeführt.

Die Ca²⁺-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines speziellen von *Invitrogen* hergestellten *Calcium Calibration Buffer Kits* eingestellt. Dieses

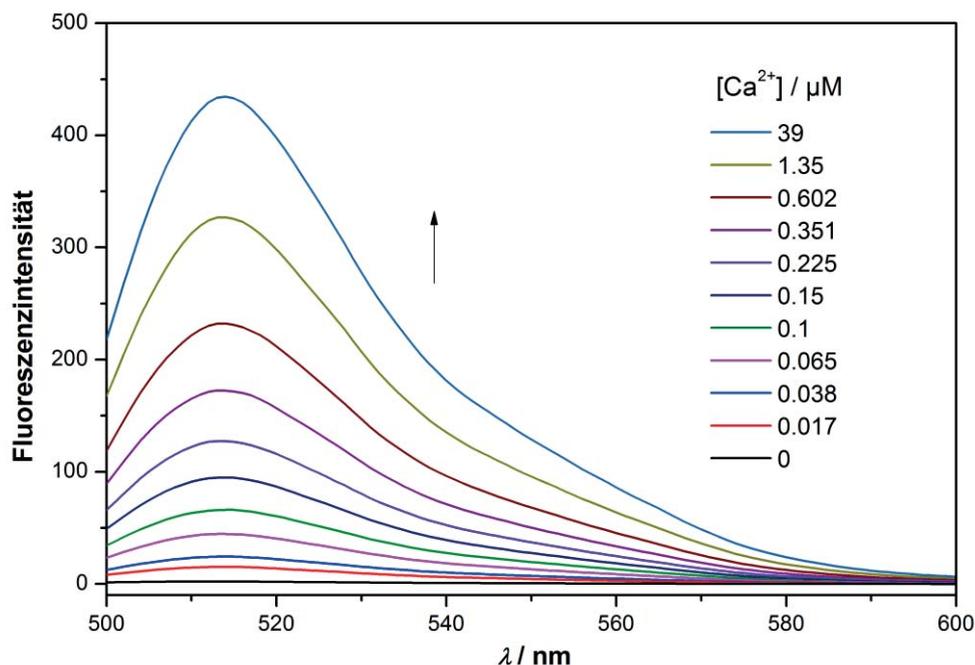


Abbildung 1.15 Fluoreszenzspektrum der Ca^{2+} -abhängigen Messungen ($\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$) des kommerziell erhältlichen *Fluo-4* (**6**) ($2 \mu\text{M}$ **6**, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, $\text{pH} = 7.2$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$).

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen zeigen, dass sowohl Fluo-Azid-1 (**12**) als auch Fluo-Azid-2 (**13**) die in Abschnitt 1.3 beschriebenen Kriterien eines Calcium-Sensors erfüllen. Wie bei *Fluo-4* (**6**) ist bei Abwesenheit von Calcium-Ionen kaum eine Fluoreszenzemission zu verzeichnen. Mit steigender Ca^{2+} -Konzentration ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bis zur Sättigung des Calcium-Sensors bei $39 \mu\text{M}$ zu erkennen. Das Emissionsmaximum liegt, wie für Fluorescein-Derivate erwartet, bei $\lambda_{\text{Em, Max}} = 514 \text{ nm}$ ohne eine Verschiebung der Emissionswellenlänge bei der Komplexbildung von Calcium-Ionen, womit sowohl Fluo-Azid-1 (**12**) als auch Fluo-Azid-2 (**13**) zu den nicht ratiometrischen Calcium-Sensoren gehören (siehe Abschnitt 1.3).

Wird die normierte Fluoreszenzintensität bei 514 nm von *Fluo-4* (**6**), Fluo-Azid-1 (**12**) und Fluo-Azid-2 (**13**) aus den Fluoreszenzmessungen gegen die steigende Calcium-Konzentration aufgetragen, ist zu erkennen, dass im Fall von Fluo-Azid-1 (**12**) (rote Kurve) ein niedrigerer Fluoreszenzintensitätsanstieg gegenüber **6** und **13** messbar ist (Abbildung 1.16). Im Gegensatz dazu liegt der Anstieg der Fluoreszenzintensität im Fall von Fluo-Azid-2 (**13**) (blaue Kurve) im Bereich von *Fluo-4* (**6**) (schwarze Kurve). Dies deutet darauf hin, dass Fluo-Azid-1 (**12**) eine

niedrigere Affinität gegenüber Calcium-Ionen und somit einen höheren K_D -Wert aufweist als *Fluo-4* (6) und *Fluo-Azid-2* (13).

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden die Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) der drei Calcium-Sensoren durch einen HILL-Plot bestimmt (siehe Abschnitt 5.3). Die Ergebnisse sind zusammen mit den Extinktions- und Emissionsmaxima in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Der Calcium-Sensor *Fluo-Azid-1* (12) hat im Vergleich zu *Fluo-4* (6) ($K_D = 0.6 \mu\text{M}$) eine höhere Dissoziationskonstante ($K_D = 1.5 \mu\text{M}$) und somit eine niedrigere Calcium-Affinität. Eine mögliche Erklärung ist, dass die freie Drehbarkeit der Ethylenglycolbrücke durch den Azid-Linker gestört wird und die Ca^{2+} -Komplexierung sterisch gehindert wird, wodurch die Ca^{2+} -Affinität von BAPTA sinkt. Die Position an der Ethylenglycolbrücke ist damit nicht optimal. Im Gegensatz dazu weist *Fluo-Azid-2* (13) mit einem K_D -Wert von $0.7 \mu\text{M}$ eine geringfügig niedrigere Calcium-Affinität auf als *Fluo-4* (6). Eine mögliche Erklärung ist der sterische Anspruch der *n*-Butylgruppe, wodurch die optimale Koordinationsgeometrie für die Ca^{2+} -Komplexierung beeinflusst werden kann.

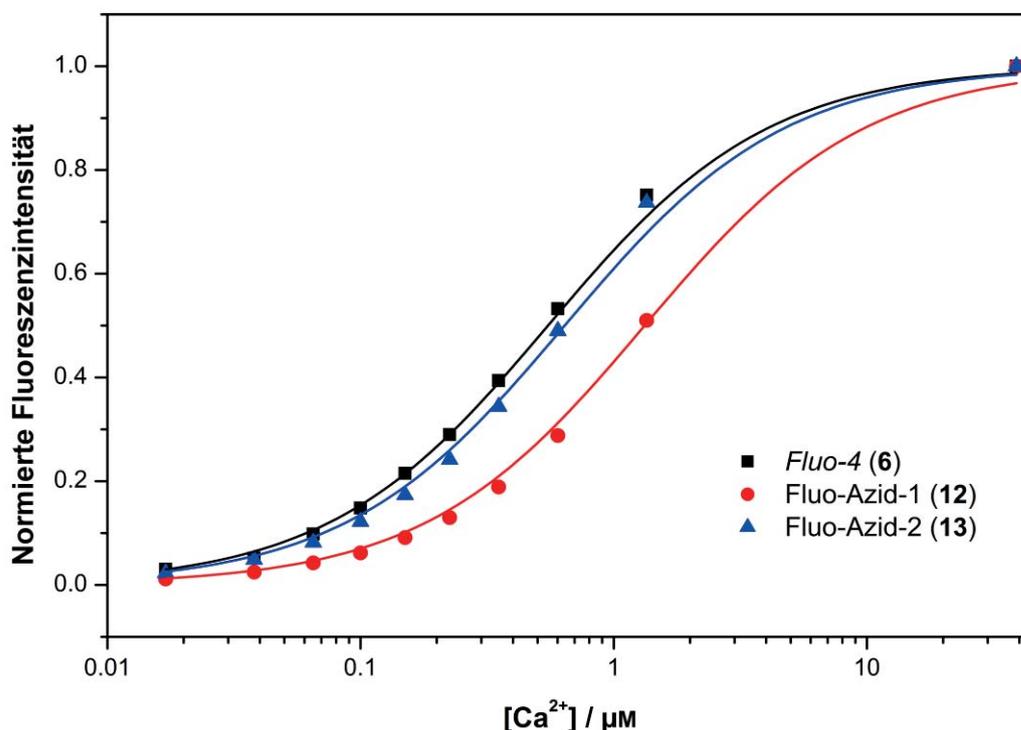


Abbildung 1.16 Auftragung der normierten Fluoreszenzintensität von *Fluo-4* (6) (schwarz), *Fluo-Azid-1* (12) (rot) und *Fluo-Azid-2* (13) (blau) gegen die steigende Ca^{2+} -Konzentration. Im Fall von *Fluo-Azid-1* (12) ist ein niedrigerer Fluoreszenzanstieg in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration zu erkennen als bei *Fluo-4* (6) und *Fluo-Azid-2* (13). Die Kurven wurden durch eine HILL-Funktion angepasst.



Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Fluo-Azid-2 (**13**) aufgrund der höheren Calcium-Affinität, die sich mit dem kommerziell erhältlichen *Fluo-4* (**6**) vergleichen lässt, die bessere Position am Aromaten für den Azid-Linker aufweist.

Tabelle 1.1 Gemessene photophysikalische Daten der auf Fluorescein basierten Calcium-Sensoren.

| | λ_{\max} (Extinktion) | λ_{\max} (Emission) | K_D -Wert |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| <i>Fluo-4</i> (6) | 493 nm | 514 nm | 0.6 μM |
| Fluo-Azid-1 (12) | 493 nm | 514 nm | 1.5 μM |
| Fluo-Azid-2 (13) | 493 nm | 514 nm | 0.7 μM |

1.6.4 Calcium-Selektivität der Sensoren

Die Selektivität der neuen Sensoren Fluo-Azid-1 (**12**) (Abbildung 1.17) und Fluo-Azid-2 (**13**) (Abbildung 1.18) gegenüber Calcium-Ionen wurde im Vergleich zu den divalenten Kationen Mg^{2+} und Zn^{2+} untersucht. Magnesium ist besonders zu berücksichtigen, weil es in höheren Konzentrationen (1 mM) im Cytoplasma vorkommt. Somit ist es von großer Relevanz, dass die Calcium-Sensoren gegenüber Mg^{2+} -Ionen insensitive bleiben, um Hintergrundfluoreszenz und Störungen bei den Messungen auszuschließen.^[99]

Um den Einfluss der Ionen auf die Sensoren zu untersuchen, wurde der Fluoreszenzintensitätsanstieg jeweils bei Zugabe von 50 μM Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Zn^{2+} in Puffer (100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2) und einer konstanten Sensor-Konzentration (5 μM) gemessen. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass der höchste Fluoreszenzanstieg bei Ca^{2+} beobachtet werden konnte (Abbildung 1.17 und Abbildung 1.18). Bei Zugabe von 50 μM Mg^{2+} ist der Anstieg nur sehr gering und kann auf leichte Konzentrationsschwankungen des Calcium-Sensors während der Messung zurückgeführt werden. Dieses Ergebnis bestätigt, dass BAPTA-basierte Calcium-Sensoren eine drastisch höhere Sensitivität gegenüber Ca^{2+} -Ionen aufweisen als gegenüber Mg^{2+} -Ionen. Bei der Zugabe von 50 μM Zn^{2+} ist ein leichter Fluoreszenzanstieg messbar, der aber geringer ist als bei der Zugabe von Ca^{2+} .



Von weitergehendem Interesse ist außerdem die Frage, ob Magnesium die durch Ca^{2+} ausgelöste Fluoreszenz des Sensors beeinflusst. Nach Zugabe einer äquimolaren Mischung von Mg^{2+} ($50 \mu\text{M}$) und Ca^{2+} ($50 \mu\text{M}$) in Puffer ergab sich ein ähnlicher Fluoreszenzanstieg wie bei der Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . Dies lässt darauf schließen, dass Mg^{2+} -Ionen keinen Einfluss auf den Anstieg der Fluoreszenz bei der Ca^{2+} -Komplexierung besitzen.

Weiterhin wurde die Auswirkung einer höheren Mg^{2+} - und Zn^{2+} -Konzentration auf die Sensoren untersucht. Bei der Zugabe von 1mM Mg^{2+} -Ionen wurde kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz festgestellt. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Mg^{2+} -Ionen auch bei großen Konzentrationen, wie sie in den Zellen vorliegen, keine Wirkung auf die Sensoren haben. Im Gegensatz dazu ist bei der Zugabe von 1mM Zn^{2+} ein erhöhter Fluoreszenzanstieg messbar, der im Fall von Fluo-Azid-2 (**13**) annähernd die gleiche Intensität besitzt wie bei $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . Da der Fluoreszenzanstieg bei der Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Zn^{2+} aber viel geringer ist, ist dieser Anstieg für Messungen in Zellen nicht relevant, da die Konzentration von Zn^{2+} im Cytoplasma im nanomolaren Bereich liegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Calcium-Sensoren Fluo-Azid-1 (**12**) und Fluo-Azid-2 (**13**) neben der hohen Sensibilität eine hohe Selektivität gegenüber Calcium-Ionen aufweisen und somit gut für Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzmessungen geeignet sind.

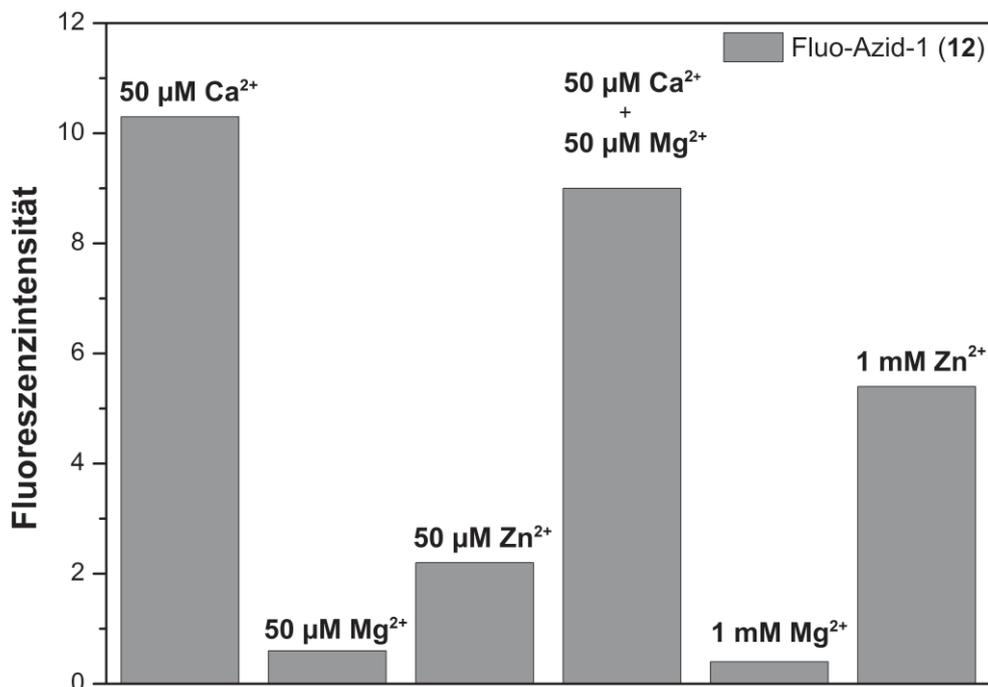


Abbildung 1.17 Fluoreszenzintensitätsanstieg von Fluo-Azid-1 (12) (5 µM) in Anwesenheit von Ca²⁺ (50 µM), Mg²⁺ (50 µM und 1 mM), Zn²⁺ (50 µM und 1 mM) und einer Mischung aus Ca²⁺ (50 µM) und Mg²⁺ (50 µM).

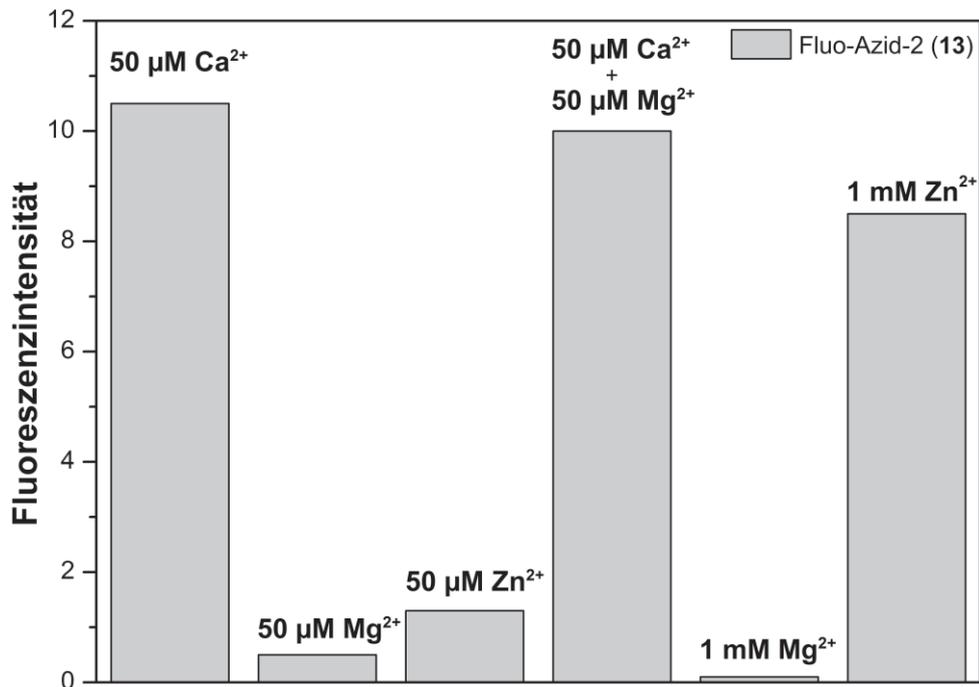


Abbildung 1.18 Fluoreszenzintensitätsanstieg von Fluo-Azid-2 (13) (5 µM) in Anwesenheit von Ca²⁺ (50 µM), Mg²⁺ (50 µM und 1 mM), Zn²⁺ (50 µM und 1 mM) und einer Mischung aus Ca²⁺ (50 µM) und Mg²⁺ (50 µM).



1.6.5 Vergleich der neuen Calcium-Sensoren

In diesem Abschnitt wurde die erfolgreiche Synthese von zwei neuartigen Calcium-Sensoren vorgestellt. Fluo-Azid-1 (**12**) baut dabei auf ein literaturbekanntes BAPTA-Grundgerüst auf, während das BAPTA-Derivat von Fluo-Azid-2 (**13**) im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt wurde.

Letzteres bietet im Gegensatz zu Fluo-Azid-1 (**12**) einige Vorteile. Die Synthese von Fluo-Azid-2 (**13**) beinhaltet insgesamt neun Stufen, während Fluo-Azid-1 (**12**) nach insgesamt zwölf Stufen hergestellt wurde. Außerdem hat die Position des Azid-Linkers einen wesentlichen Einfluss auf die Ca^{2+} -Affinität des Sensors. Bei Fluo-Azid-1 (**12**) befindet sich der Azid-Linker an der Ethylenglykolbrücke, wodurch die Calcium-Affinität gestört wird und der K_D -Wert einen höheren Wert aufweist als bei dem unmodifizierten *Fluo-4* (**6**). Fluo-Azid-2 (**13**) hat im Gegensatz dazu eine ähnliche Calcium-Affinität wie *Fluo-4* (**6**), da sich der Azid-Linker an dem aromatischen Ring von BAPTA befindet und an dieser Position weniger Einfluss auf die Ca^{2+} -Komplexierung hat.

In Anbetracht der Selektivität zeigen die neuen Sensoren keine Unterschiede auf. Beide haben eine deutlich höhere Selektivität gegenüber Ca^{2+} -Ionen als gegenüber Mg^{2+} . Im Fall von Zn^{2+} -Ionen ist erst bei hohen Konzentrationen, die für Zellmessungen keine Rolle spielen, ein Fluoreszenzanstieg messbar.



1.7 Auf Rhodamin-basierte Calcium-Sensoren

1.7.1 Einleitung

Als Vorbild für die Synthese der neuen Rhodamin-basierten Calcium-Sensoren wurden *Rhod-2* (**7**) und *X-Rhod-1* (**41**) gewählt (Abbildung 1.19). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie im langwelligeren, roten Bereich emittieren ($\lambda_{Em, Max} (Rhod-2) = 581 \text{ nm}$, $\lambda_{Em, Max} (X-Rhod-1) = 602 \text{ nm}$) und auf dem BAPTA Calcium-Chelator basieren (siehe Abschnitt 1.3.1). *Rhod-2* (**7**) ist einer der populärsten und am häufigsten verwendeten rot-emittierenden Calcium-Indikatoren. Seit der Einführung durch TSIEN *et al.*^[62] wird er hauptsächlich für die Messung der Ca^{2+} -Konzentration in Mitochondrien verwendet.^[100–102] Aufgrund der delokalisierten positiven Ladung akkumuliert *Rhod-2* (**7**) bevorzugt in Mitochondrien, deren innere Membran ein negatives Potential aufweist. Durch diese Eigenschaft ist es außerdem möglich cytosolische und mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen in einer einzelnen Zelle in Verbindung mit grün-emittierenden (auf Fluorescein-basierten) Calcium-Sensoren zu messen.^[65,100]

X-Rhod-1 (**41**) ist eine Erweiterung von *Rhod-2* (**7**), bei welcher der Tetramethylrhodamin-Fluorophor durch *Texas-Red*^[103] (*Sulforhodamine 101*) ersetzt wurde.^[78] Genauso wie *Rhod-2* (**7**) zeigt es einen hohen 80-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach der Komplexbildung von Ca^{2+} -Ionen. Der Vorteil von *X-Rhod-1* (**41**) ist die Rotverschiebung der Extinktion und Emission, wodurch die spektrale Überlappung mit dem grün-fluoreszierendem Protein (GFP, engl. *green fluorescent protein*) und zellulärer Autofluoreszenz noch geringer ist.

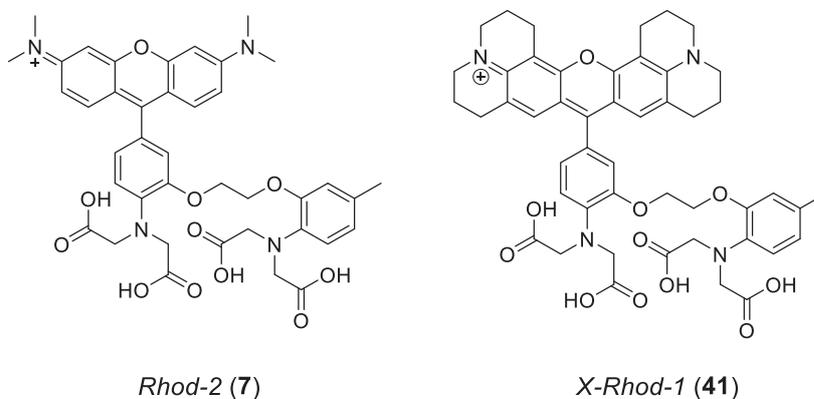


Abbildung 1.19 Rot-emittierende Calcium-Sensoren *Rhod-2* (**7**) und *X-Rhod-1* (**41**).

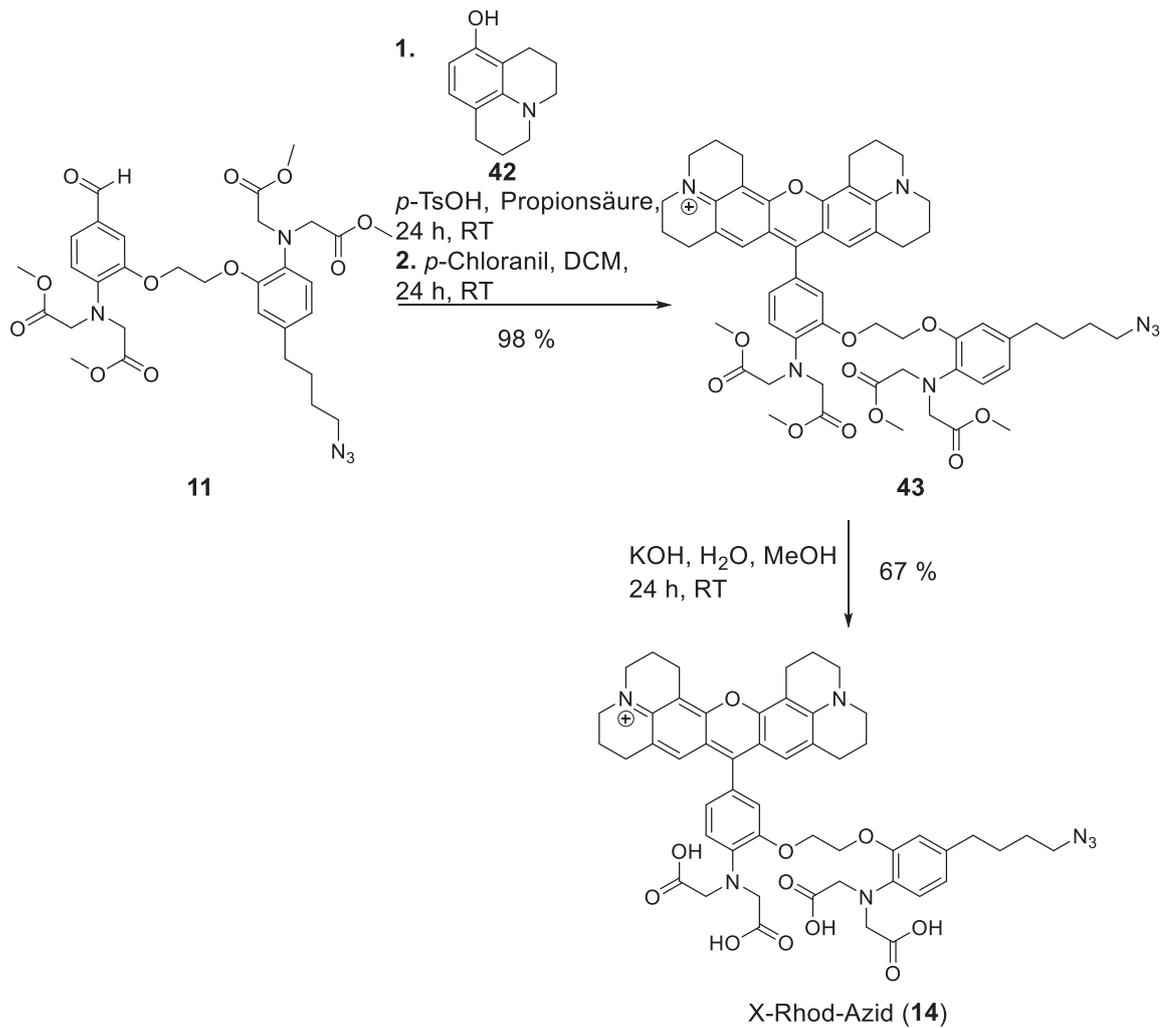
Die K_D -Werte von *Rhod-2* ($K_D = 570$ nm) und *X-Rhod-1* ($K_D = 700$ nm) sind höher als bei den Fluorescein-basierten Calcium-Sensoren.^[58,65] Der Grund ist die delokalisierte positive Ladung, wodurch der Chromophor einen elektronenziehenden Effekt hat und somit die Affinität von BAPTA zu Calcium-Ionen verringert.

1.7.2 Synthese der modifizierten Rot-emittierenden Sensoren

Für die Synthese der Rhodamin-basierten Sensoren wurde das BAPTA-Derivat **11** als Vorstufe gewählt (siehe Abschnitt 1.5.2). Durch Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, dass dieses Derivat weniger Einfluss auf die Calcium-Affinität aufweist als das BAPTA-Derivat **10**.

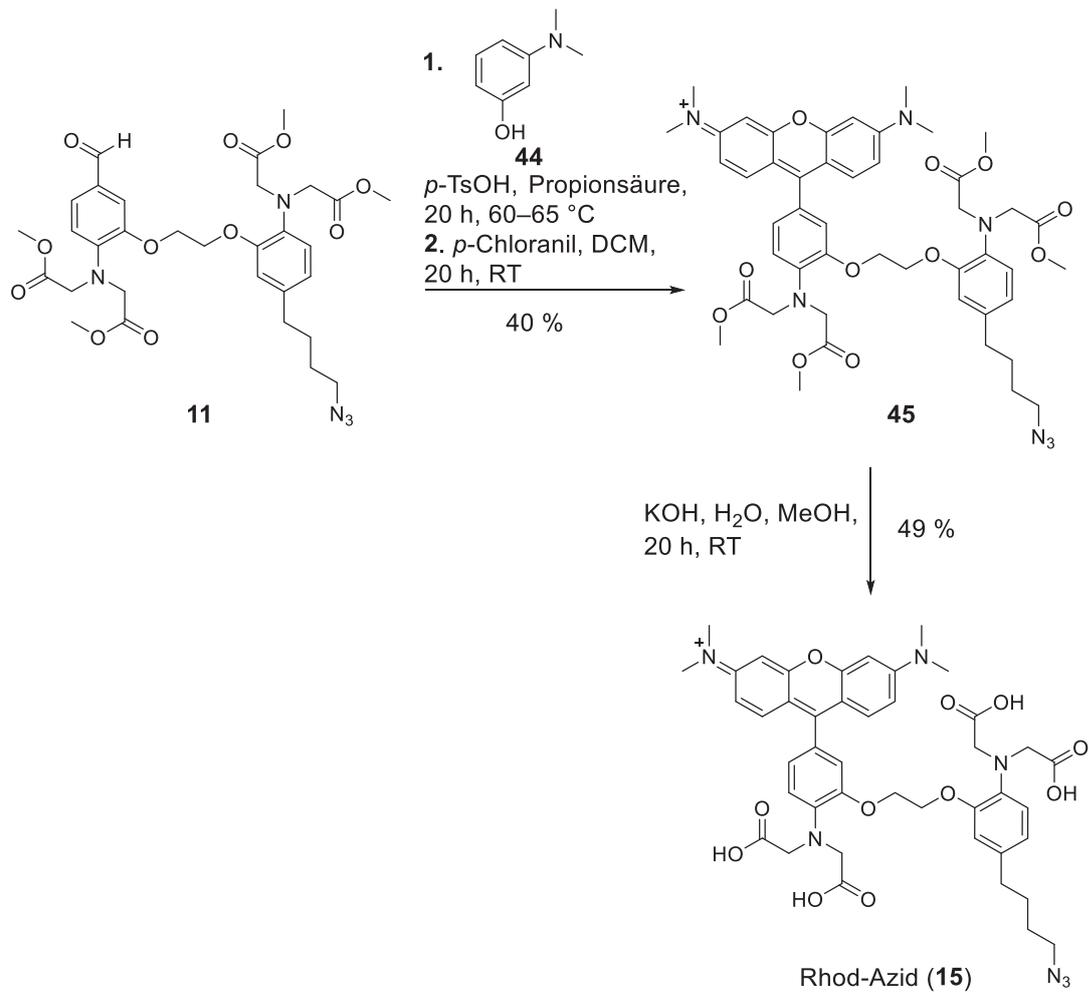
Angelehnt an COLLOT *et al.* konnte X-Rhod-Azid (**14**) ausgehend vom BAPTA-Derivat **11** in zwei Stufen erhalten werden (Schema 1.7).^[99] Das BAPTA-Derivat **11** wurde mit 8-Hydroxyjulolidin (**42**) und *para*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) in Propionsäure gelöst und für 24 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach der Zugabe einer *para*-Chloranil-Lösung in Dichlormethan konnte der als Methylester geschützte Sensor **43** mit einer sehr guten Ausbeute von 98 % erhalten werden. Der letzte Schritt ist eine basenvermittelte Hydrolyse der Methylester. Dazu wurde Verbindung **43** mit Kaliumhydroxid in Wasser und Methanol zum Endprodukt X-Rhod-Azid (**14**) mit einer Ausbeute von 67 % umgesetzt.

Für die Synthese von Rhod-Azid (**15**) wurden die gleichen Synthesebedingungen angewandt wie für X-Rhod-Azid (**14**). Allerdings konnte nach der Reaktion nur das Edukt wieder erhalten werden. Schließlich lieferte eine Erhöhung der Temperatur im ersten Reaktionsschritt das gewünschte Produkt. Dazu wurde das BAPTA-Derivat **11** mit *meta*-Dimethylaminophenol (**44**) und *p*-Toluolsulfonsäure in Propionsäure gelöst und für 20 h bei 65-68 °C unter Lichtausschluss umgesetzt (Schema 1.8). Nach der Zugabe einer *para*-Chloranil-Lösung in Dichlormethan konnte die Zwischenstufe **45** mit einer Ausbeute von 40 % erhalten werden. Als letzter Schritt erfolgte die Hydrolyse der Methylester zu den Säuregruppen. Dazu wurde Verbindung **45** mit Kaliumhydroxid in Wasser und Methanol versetzt. Der Ca^{2+} -sensitive Sensor **15** konnte mit einer Ausbeute von 49 % erhalten werden.



Schema 1.7 Synthese von X-Rhod-Azid (**14**). Der Ca²⁺-Sensor konnte ausgehend von BAPTA-Derivat **11** nach zwei Stufen erhalten werden.

1 Synthese fluoreszierender Calcium-Sensoren



Schema 1.8 Synthese von Rhod-Azid (**15**). Der Ca²⁺-sensitive Sensor konnte ausgehend von BAPTA-Derivat **11** in zwei Stufen erhalten werden.

1.7.3 Spektroskopische Untersuchungen

Nach der erfolgreichen Synthese wurden die neuen Calcium-Sensoren X-Rhod-Azid (**14**) (Abbildung 1.20 A) und Rhod-Azid (**15**) (Abbildung 1.21 A) spektroskopisch charakterisiert und verglichen. Das UV/vis-Spektrum von **14** zeigt ein Extinktionsmaximum bei 579 nm mit einer Schulter bei 544 nm, welches vom Fluorophor stammt und dem Extinktionsmaximum des unmodifizierten X-Rhod-1 (**41**) (580 nm) entspricht (Abbildung 1.20 B).

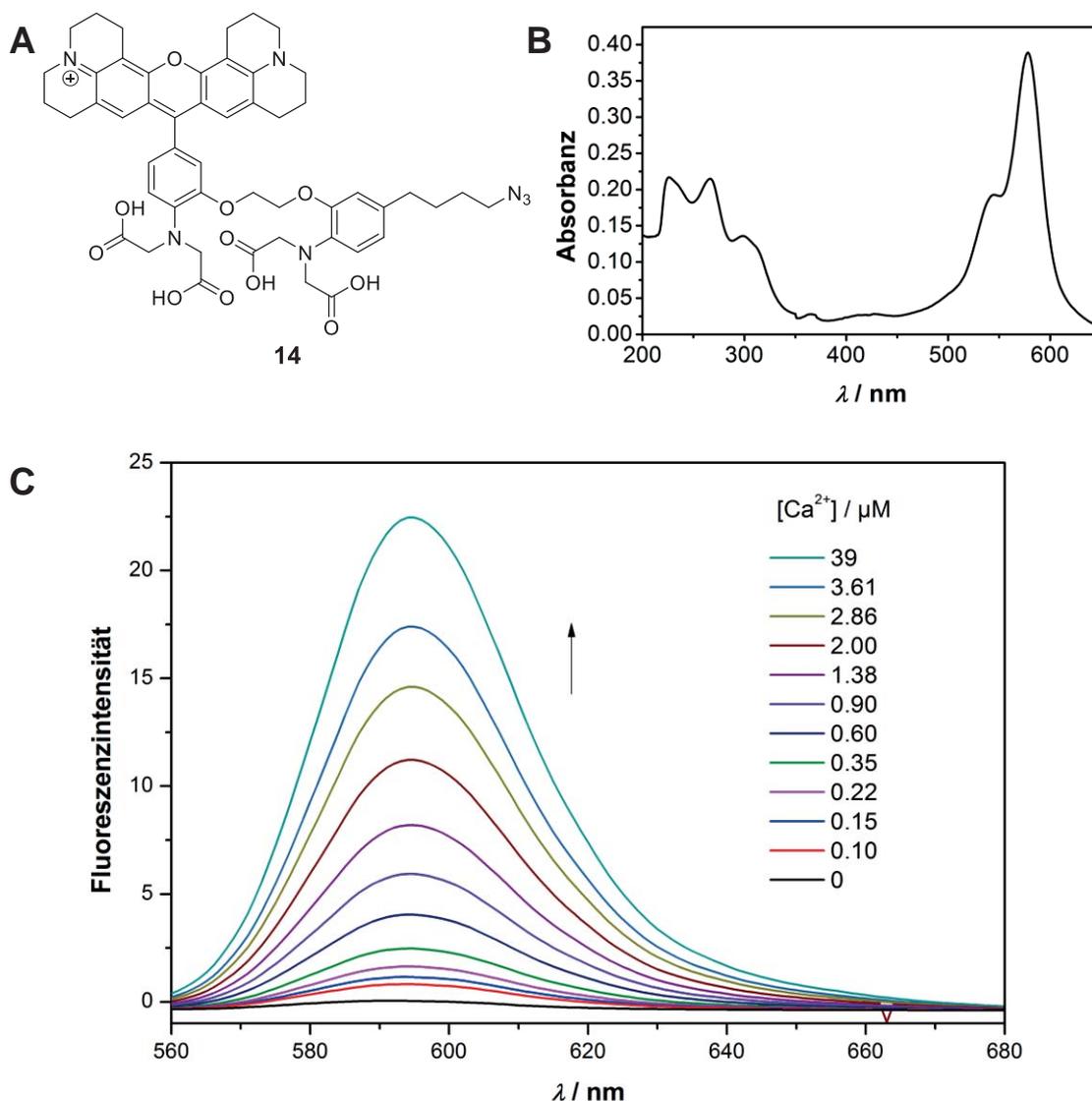


Abbildung 1.20 A Strukturformel von X-Rhod-Azid (**14**). B Absorptionsspektrum von **14** (10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C). C Fluoreszenzspektrum der Ca²⁺-abhängigen Messungen ($\lambda_{\text{Ex}} = 550 \text{ nm}$) von **14** (2 μM **14**, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C).

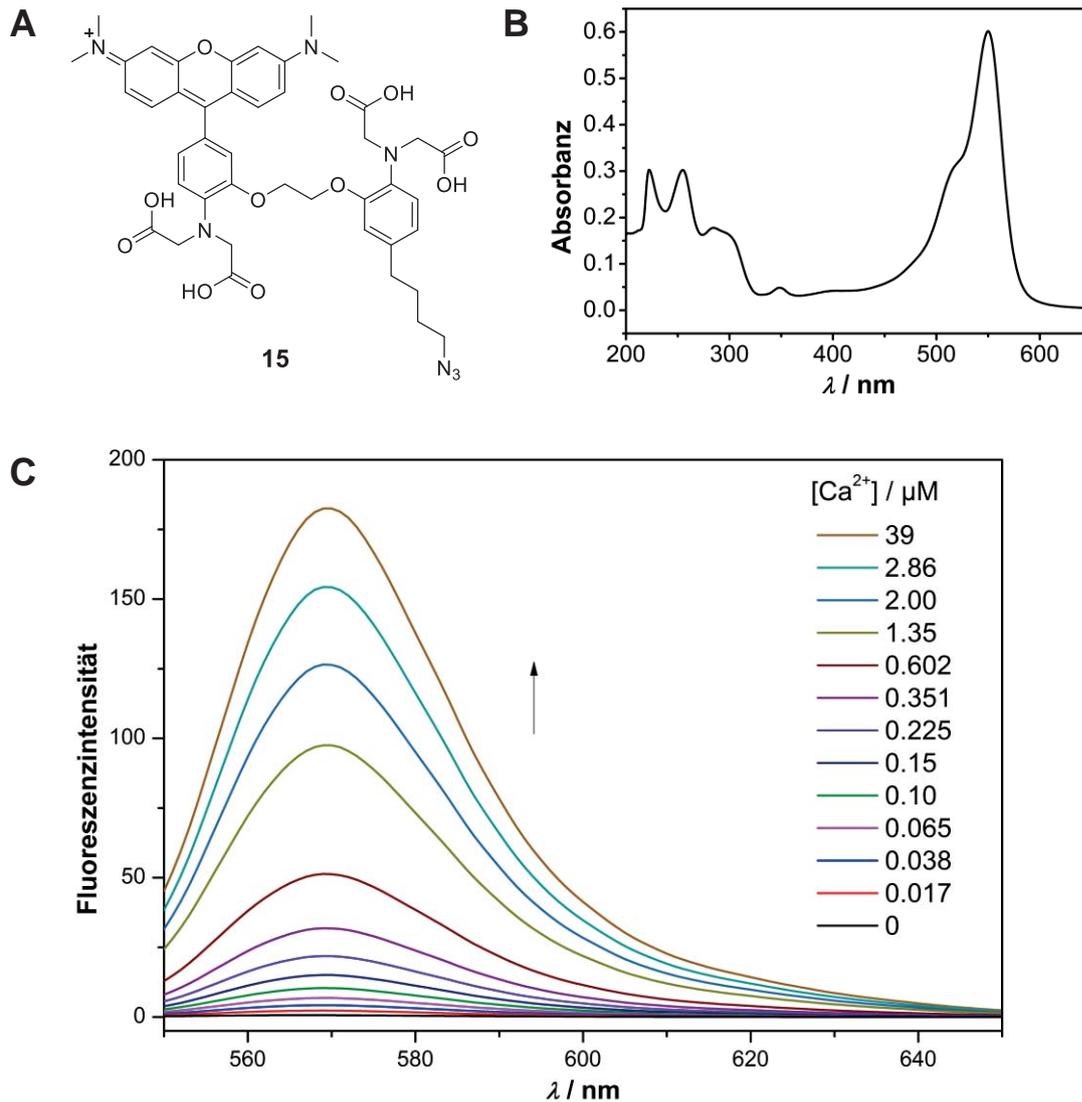


Abbildung 1.21 **A** Strukturformel von Rhod-Azid (**15**). **B** Absorptionsspektrum von **15** (10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C). **C** Fluoreszenzspektrum der Ca²⁺-abhängigen Messungen ($\lambda_{\text{Ex}} = 540 \text{ nm}$) von **15** (2 μM **15**, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C).

Im Fall von **15** ist das Extinktionsmaximum (550 nm) zu kürzeren Wellenlängen verschoben (Abbildung 1.21 **B**). Wie bei vielen auf Rhodamin-basierten Farbstoffen ist auch bei **15** eine Schulter bei 517 nm vorhanden.

Die Existenz der Schulter im UV/vis-Spektrum erlaubt die gleichzeitige Anregung von Rhod-Azid (**15**) mit Fluorescein-basierten-Sensoren bei 488 nm. So können z. B. **15** und Fluo-Azid-2 (**13**) in Zellexperimenten für präzisere Ca²⁺-Messungen kombiniert werden (siehe Abschnitt 1.9.4). Im



ultravioletten Spektralbereich sind mehrere Maxima zu sehen, die vom aromatischen BAPTA-Grundgerüst stammen.

Analog zu den Fluorescein-basierten Calcium-Sensoren (Abschnitt 1.6.3) wurden auch für X-Rhod-Azid (**14**) (Abbildung 1.20, C) und Rhod-Azid (**15**) (Abbildung 1.21, C) Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen, steigenden Ca^{2+} -Konzentrationen gemessen. Zusätzlich wurden die Messungen bei den gleichen Bedingungen für die kommerziell erhältlichen Calcium-Sensoren *Rhod-2* (**7**) und *X-Rhod-1* (**41**) durchgeführt, um die Calcium-Affinität und Eigenschaften zu vergleichen (Spektren sind nicht gezeigt). Die Ca^{2+} -Konzentrationen wurden mit einem speziell von *Invitrogen* vertriebenen *Calcium Calibration Buffer Kit* eingestellt (siehe Abschnitt 5.3). Damit konnten nach der Titrationsmethode von *MINTA et al.* freie Ca^{2+} -Konzentrationen von 0–39 μM eingestellt werden.^[62] Die Temperatur (20 °C), die Konzentration des Calcium-Sensors (2 μM) sowie der pH-Wert von 7.2 wurden bei allen Messungen konstant gehalten. Als Anregungswellenlängen wurden für X-Rhod-Azid (**14**) 550 nm und für Rhod-Azid (**15**) 540 nm gewählt.

Die Fluoreszenzmessungen haben ergeben, dass sowohl **14** als auch **15** die folgenden Kriterien eines Calcium-Sensors erfüllen. Bei Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen war in beiden Fällen nur eine sehr geringe Fluoreszenzemission zu beobachten. Mit steigender Ca^{2+} -Konzentration war ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität bis zur Sättigung des Sensors bei 39 μM messbar. Die Emissionsmaxima liegen wie für Rhodamin-Derivate erwartet im roten Bereich des Spektrums bei 570 nm im Fall von **15** und bei 594 nm für **14**. Bei der Komplexierung von Calcium-Ionen gibt es keine Verschiebung der Emissionswellenlängen, womit **14** und **15** zu den nicht ratiometrischen Calcium-Sensoren gehören.

Die Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität gegen die steigende Ca^{2+} -Konzentration zeigt, dass im Fall von X-Rhod-Azid (**14**) (rote Kurve) im Gegensatz zu dem unmodifizierten X-Rhod-1 (**41**) (schwarze Kurve) ein geringfügig niedrigerer Fluoreszenzanstieg zu erkennen ist (Abbildung 1.22). Dies deutet auf eine geringere Affinität gegenüber Ca^{2+} -Ionen und folglich einen höheren K_D -Wert hin. Im Fall von Rhod-Azid (**15**) (rote Kurve) ist der Fluoreszenzanstieg vergleichbar mit dem kommerziellen *Rhod-2* (**7**) (schwarze Kurve). Der Anstieg von **15** ist sogar

etwas höher (Abbildung 1.23). Dieser geringe Unterschied lässt sich auf Konzentrations-schwankungen des Sensors während der Messungen zurückführen.

Die K_D -Werte der neuen Calcium-Sensoren und deren unmodifizierten Analoga wurden mit Hilfe eines Hill-Plots bestimmt (siehe Abschnitt 5.3). Die Ergebnisse sind zusammen mit den Extinktions- und Emissionsmaxima in Tabelle 1.2 zusammengefasst. Wie erwartet, zeigt das modifizierte X-Rhod-Azid (**14**) ($K_D = 1.6 \mu\text{M}$) einen höheren K_D -Wert als das kommerzielle X-Rhod-1 (**41**) ($K_D = 1.2 \mu\text{M}$). Eine mögliche Erklärung wäre der sterische Anspruch der *n*-Butylgruppe, welche die optimale Koordinationsgeometrie für Ca^{2+} beeinflussen könnte. Interessanterweise unterscheidet sich der K_D -Wert von Rhod-Azid (**15**) nur geringfügig vom unmodifiziertem Rhod-2 (**7**) und ist sogar mit $1.5 \mu\text{M}$ niedriger als bei Verbindung **7** mit $1.6 \mu\text{M}$. In diesem Fall scheint die Butylgruppe keinen Einfluss auf die Calcium-Affinität zu haben. Daraus lässt sich folgern, dass der Unterschied zwischen **14** und **41** andere Ursachen hat und sich auf Messungenauigkeiten oder eventuell vorhandene Verunreinigungen zurückführen lässt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl X-Rhod-Azid (**14**) als auch Rhod-Azid (**15**) die Kriterien eines Calcium-Sensors erfüllen und für Ca^{2+} -abhängige Experimente geeignet sind.

Tabelle 1.2 Photophysikalische Eigenschaften der auf Rhodamin-basierten Calcium-Sensoren.

| | λ_{max} (Extinktion) | λ_{max} (Emission) | K_D -Wert |
|---------------------------|--|--------------------------------------|-------------------|
| Rhod-2 (7) | 552 nm | 570 nm | 1.6 μM |
| Rhod2-Azid (15) | 551 nm | 570 nm | 1.5 μM |
| X-Rhod-1 (41) | 580 nm | 594 nm | 1.2 μM |
| X-Rhod-Azid (14) | 578 nm | 595 nm | 1.6 μM |

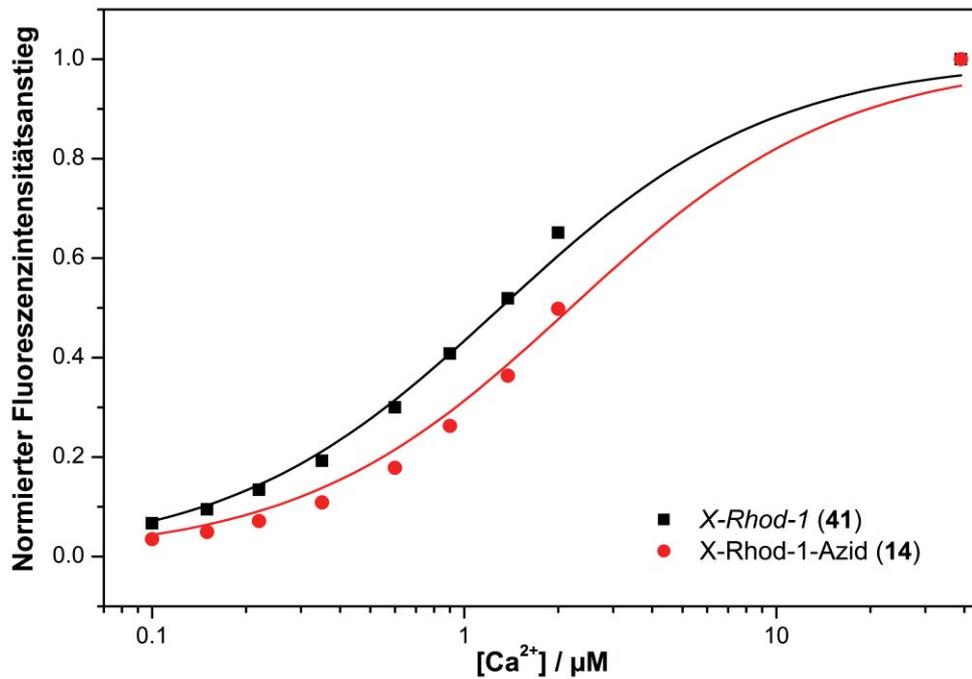


Abbildung 1.22 Auftragung der normierten Fluoreszenzintensität von X-Rhod-1 (41) (schwarz) und des modifizierten X-Rhod-Azid (14) (rot) gegen die steigende Ca²⁺-Konzentration. Im Fall von 14 ist ein niedrigerer Fluoreszenzanstieg zu erkennen. Die Kurven wurden durch eine Hill-Funktion angepasst.

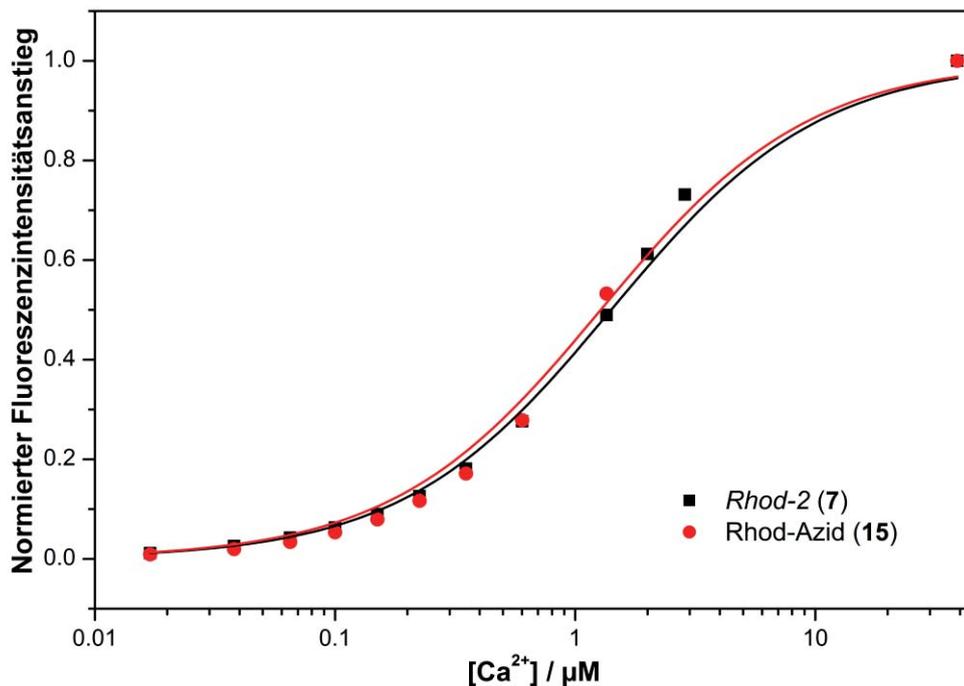


Abbildung 1.23 Auftragung der normierten Fluoreszenzintensität von Rhod-2 (7) (schwarz) und Rhod-Azid (15) (rot). Der Fluoreszenzanstieg ist für beide Sensoren annähernd gleich. Die Kurven wurden durch eine Hill-Funktion angepasst.



1.7.4 Calcium-Selektivität

Die Selektivität der modifizierten Calcium-Sensoren X-Rhod-Azid (**14**) (Abbildung 1.24) und Rhod-Azid (**15**) (Abbildung 1.25) gegenüber Ca^{2+} -Ionen wurde im Vergleich zu den divalenten Kationen Mg^{2+} und Zn^{2+} untersucht. Analog zu den Fluorescein-basierten Calcium-Sensoren (siehe Abschnitt 1.6.4) ist es von großer Relevanz, dass die Sensoren vor allem gegenüber Mg^{2+} -Ionen insensitiv bleiben, da diese in höheren Konzentrationen im Cytoplasma vorkommen.

Der Fluoreszenzintensitätsanstieg wurde jeweils bei der Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Zn^{2+} im Puffer (100 mM KCl , 30 mM MOPS , $\text{pH} = 7.2$) und einer konstanten Sensor-Konzentration ($5 \mu\text{M}$) gemessen. Bei beiden Sensoren konnte der höchste Fluoreszenzanstieg bei der Zugabe von Ca^{2+} beobachtet werden. Bei der Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Mg^{2+} ist der Anstieg in beiden Fällen sehr gering, somit weisen sowohl **14** als auch **15** eine höhere Selektivität, wie bei BAPTA-Sensoren üblich, gegenüber Ca^{2+} -Ionen auf. Bei der Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Zn^{2+} ist ebenfalls nur ein geringer, vernachlässigbarer Fluoreszenzanstieg messbar.

Um zu untersuchen ob Magnesium-Ionen die durch Ca^{2+} ausgelöste Fluoreszenz der Sensoren beeinflussen, wurde eine äquimolare Mischung von Mg^{2+} ($50 \mu\text{M}$) und Ca^{2+} ($50 \mu\text{M}$) in Puffer zugegeben. Die Intensität der Emission entsprach in beiden Fällen der Intensität bei der Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . Daraus lässt sich folgern, dass Mg^{2+} keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Komplexierung besitzt.

Außerdem wurde die Auswirkung einer höheren Mg^{2+} - und Zn^{2+} -Konzentration auf die Sensoren untersucht. Bei der Zugabe von 1 mM Mg^{2+} wurde kein signifikanter Anstieg der Emission festgestellt. Dieses Ergebnis zeigt, dass Mg^{2+} auch in höheren Konzentrationen, wie sie in den Zellen vorliegen, keinen Einfluss auf die Sensoren haben. Im Gegensatz dazu ist bei der Zugabe von Zn^{2+} (1 mM) ein erhöhter Fluoreszenzintensitätsanstieg messbar, der im Fall von X-Rhod-Azid (**14**) sogar deutlich höher ist, als bei der Zugabe von Ca^{2+} . Dieser Anstieg ist allerdings für Messungen in Zellen nicht relevant, da die Konzentration von Zn^{2+} im Cytoplasma im nanomolaren Bereich liegt.^[99]

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die synthetisierten rot-emittierenden Calcium-Sensoren **14** und **15** eine hohe Selektivität gegenüber Ca^{2+} -Ionen aufweisen.

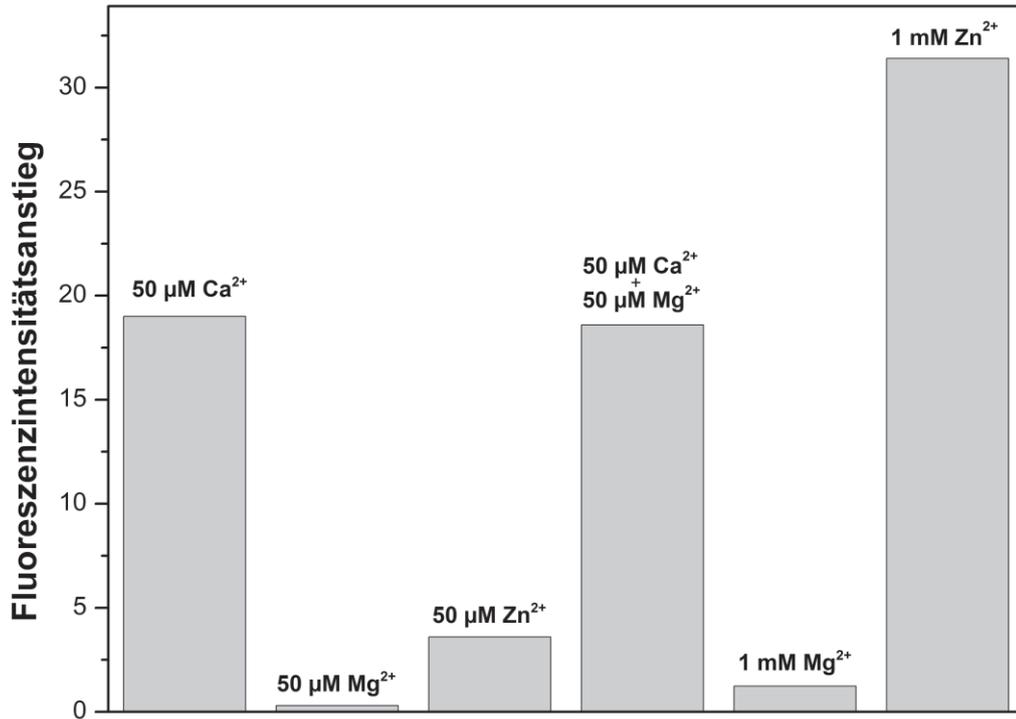


Abbildung 1.24 Fluoreszenzanstieg von X-Rhod-Azid (14) (5 µM) in Anwesenheit von Ca²⁺ (50 µM), Mg²⁺ (50 µM und 1 mM), Zn²⁺ (50 µM und 1 mM) und einer Mischung aus Ca²⁺ (50 µM) und Mg²⁺ (50 µM).

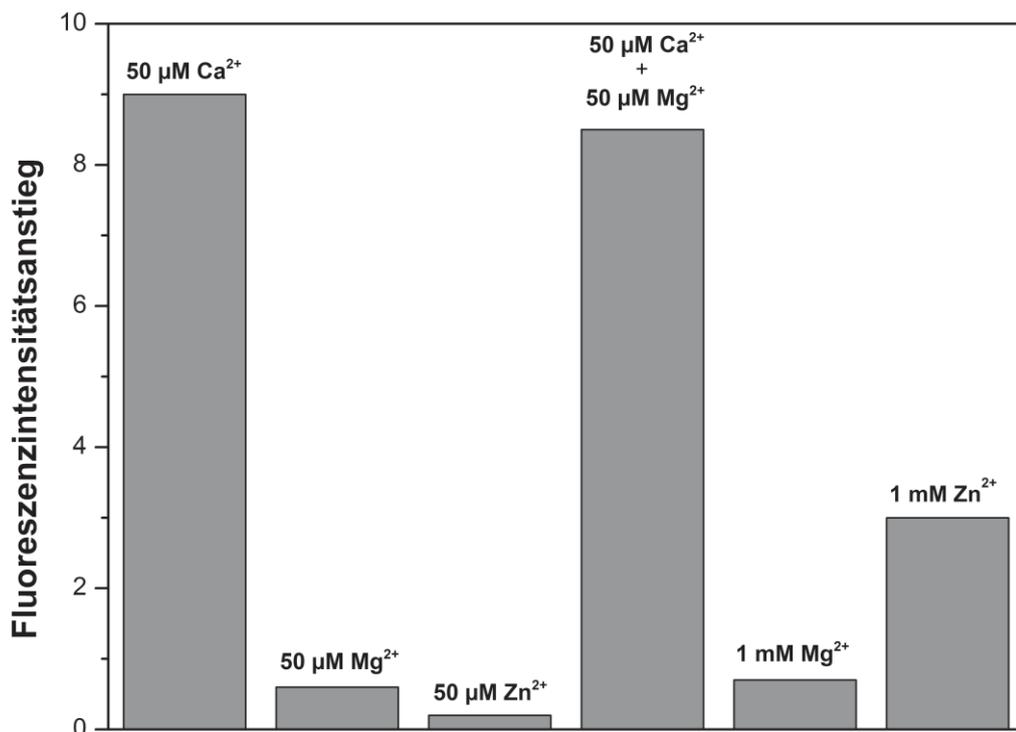
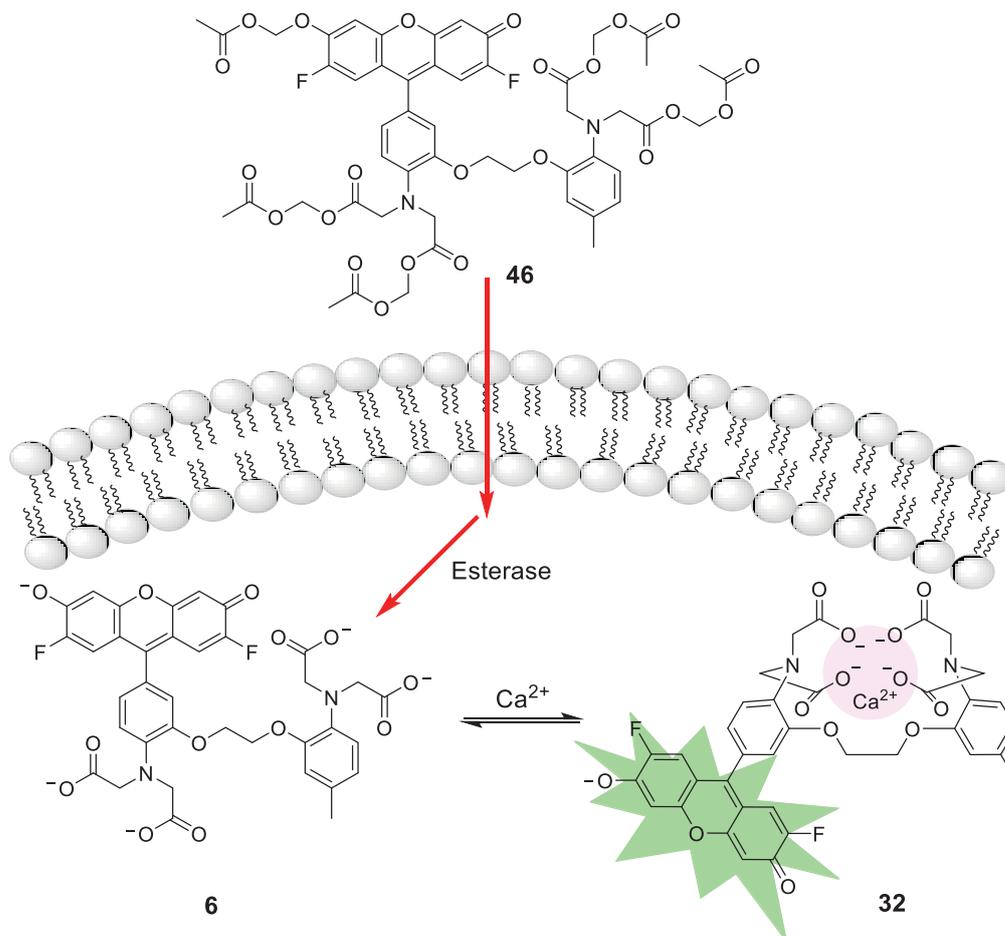


Abbildung 1.25 Fluoreszenzintensität von Rhod-Azid (15) (5 µM) in Anwesenheit von Ca²⁺ (50 µM), Mg²⁺ (50 µM und 1 mM), Zn²⁺ (50 µM und 1 mM) und einer Mischung aus Ca²⁺ (50 µM) und Mg²⁺ (50 µM).

1.8 Einschleusen in die Zellen als Acetoxymethyl-Ester

Der größte Teil der chemisch fluoreszierenden Calcium-Sensoren ist membran-impermeabel. Um die Calcium-Sensoren in die Zelle einzuschleusen, werden hauptsächlich invasive Methoden verwendet, die eine Disruption der Plasmamembran zur Folge haben. Dazu gehören z. B. die Elektroporation, Iontophorese, Perfusion mit einer Patch-Pipette oder die Mikroinjektion.^[58,104] Eine alternative Methode, die nicht invasiv ist, ist der Gebrauch von Acetoxymethyl-Estern (AM-Estern).^[105]



Schema 1.9 Durch die Acetoxymethylester-Gruppen kann Verbindung 46 die Plasmamembran passieren. In den Zellen werden die Ester durch Esterasen wieder gespalten und der Calcium-Sensor 6 wird reaktiviert.

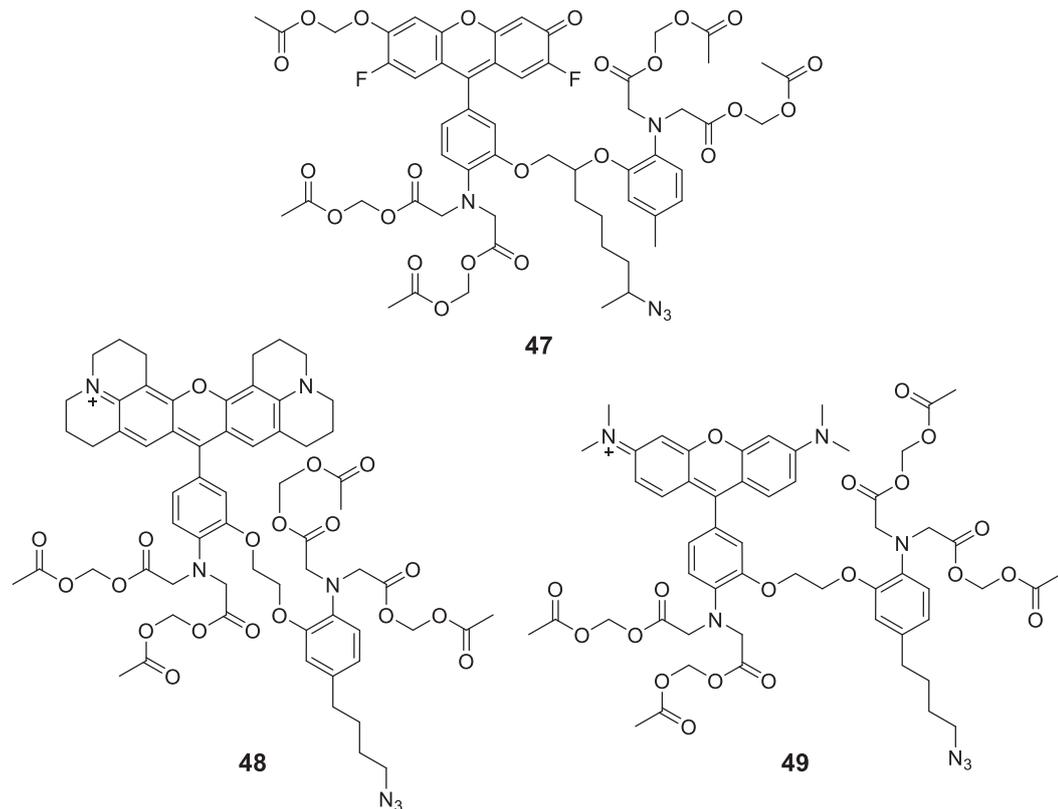


Abbildung 1.26 Strukturen der synthetisierten AM-Ester.

Bei AM-Estern werden die polaren Funktionalitäten, vor allem die negativ geladenen Carboxylgruppen, als Acetoxymethylester maskiert. Dadurch werden die Calcium-Sensoren liphophiler und können die Plasmamembran passieren. Außerdem können AM-Ester kein Ca^{2+} mehr binden und sind demzufolge nicht fluoreszierend. In den Zellen werden die AM-Ester durch zellinterne Esterasen wieder gespalten und der Calcium-Sensor wird wieder aktiviert. Die Esterspaltung ist am Beispiel des AM-Esters von *Fluo-4* **46** in Schema 1.9 gezeigt.

Um zu untersuchen, ob die neu synthetisierten Verbindungen auch *in vivo* als Calcium-Sensoren fungieren, wurden diese in AM-Ester überführt. Dazu wurde der jeweilige Sensor in trockenem Dimethylformamid gelöst. Zu der Lösung wurden anschließend Essigsäurebrommethylester und DIPEA gegeben und es wurde für zwei Tage gerührt. Anschließend erfolgte die Isolierung des Produkts durch Säulenchromatographie. Die AM-Ester der Calcium-Sensoren konnten mit dieser Methode erfolgreich synthetisiert werden (Abbildung 1.26).

Die neuen AM-Ester **47**, **48** und **49** wurden im Rahmen einer Kooperation mit D. SCHILD (Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie, Universität



Göttingen) an G. BAO übergeben, um diese in olfaktorischen Zellen zu testen. Dabei wurde festgestellt, dass die neuen Verbindungen auch *in vivo* die Kriterien eines Calcium-Sensors erfüllen. Strömten Ca^{2+} -Ionen in die Zellen ein, war dies deutlich durch einen Fluoreszenzanstieg messbar. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Leuchtkraft des Sensors X-Rhod-Azid (**14**) eine geringere Intensität aufwies als der von Rhod-Azid (**15**). Aus diesem Grund wurde der Sensor Rhod-Azid (**15**) für weitere Anwendungen als rot fluoreszierender Calcium-Sensor gewählt.

1.9 Calcium-Sensor-Konjugate

1.9.1 Einleitung

Zwei wesentliche Herausforderungen bei der Verwendung von Calcium-Sensoren stellen die Bereichsbildung (engl. *compartmentalization*) und die Extrusion des Sensors aus der Zelle dar. Unter der Bereichsbildung versteht man, dass der Sensor sich in den intrazellulären Organellen ansammelt und nicht homogen in der Zelle verteilt ist. Besonders für Messungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen sollte eine Bereichsbildung vermieden werden, da sich die Ca^{2+} -Konzentration in den Kompartimenten von der im Cytosol unterscheidet.^[65] Der Grad der ungleichen Verteilung hängt dabei von verschiedenen Faktoren wie z. B. der Art der Zelle und vom verwendeten Calcium-Sensor ab.^[65]

Ein weiteres Problem ist, dass der Sensor in vielen Zellarten aus dem Cytosol in das extrazelluläre Medium entweicht.^[65,106] Dieser Vorgang wird zum Teil durch anionische Transportsysteme reguliert und kann durch Probenizid und Sulfinpyrazone oder geringere Temperaturen inhibiert werden.^[65,107–109] Allerdings kann dadurch die Messung verfälscht oder die Interpretation erschwert werden.

Eine bessere Alternative zur Verhinderung der Extrusion des Sensors aus der Zelle und zur Verminderung der ungleichen Verteilung ist die Konjugation des Sensors an Dextrane. Dextrane sind hochmolekulare Polymere aus Glucose-Einheiten, die aufgrund der Größe und beschränkten Mobilität nicht aus der Zelle transportiert werden und somit im Cytosol verbleiben.^[110] Sie sind außerdem aufgrund der untypischen Poly-(α -D-1,6-Glycose)-Verlinkung biologisch inert und somit resistent gegenüber den meisten endogenen zellulären Glycosidasen. Eine Vielfalt von Calcium-Sensoren wurde in der Literatur

an Dextrane konjugiert, unter anderem *Fura-2*, *Rhod-2* und *Fluo-4*.^[91,110–112] Die Calcium-Sensoren werden dabei an Amin-funktionalisierte Dextrane, hauptsächlich durch eine Amidbindung mit einer Carboxyl- oder Carboxymethyl-gruppe, angebracht (Abbildung 1.27).^[111]

Nach der Konjugation der Calcium-Sensoren an Dextrane können diese mehrere Tage in der Zelle verbleiben.^[112,113] Generell gibt es zwei Nachteile von Dextran-Konjugaten. Zum einen wird die Calcium-Affinität des Sensors bei der Anbringung an Dextrane um den Faktor 2 gesenkt.^[72] Zum anderen variiert das Verhältnis von Sensor zu Dextran bei jeder Synthese. *Molecular Probes* bietet z. B. Dextran-Konjugate an, bei denen sich je nach molarer Masse der Grad der Substitution unterscheidet. So enthalten Dextrane mit einer molaren Masse von 10 kDa einen halben bis zwei Farbstoffe pro Dextran-Molekül und zwei bis vier Farbstoffe pro Dextran-Molekül bei einem Molekulargewicht von 40 kDa.^[71] Da das Verhältnis von Indikator zu Dextran einen Einfluss auf die Calcium-Affinität hat, muss der K_D -Wert vor jeder Messung neu bestimmt werden.^[72]

In diesem Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wurden die neuen, modifizierten Calcium-Sensoren mit Polyethylenglycol (PEG) verknüpft und charakterisiert (Abschnitt 1.9.2). Polyethylenglycole sind Polymere mit sich wiederholenden Ethylenglycol-Einheiten und verfügen über eine Reihe positiver Eigenschaften. PEG sind nicht toxisch, enthalten keine geladenen Seitenketten und bieten eine hohe Löslichkeit in Wasser sowie vielen organischen Lösungsmitteln.^[114–116] In der Literatur wurden zahlreiche PEG-Konjugate mit Proteinen, Peptiden, DNA, RNA und anderen Molekülen veröffentlicht, die vor allem in der Medikamentenforschung als Wirkstoffträger Anwendung finden und heutzutage auch schon als kommerzielle Produkte erhältlich sind.^[117]

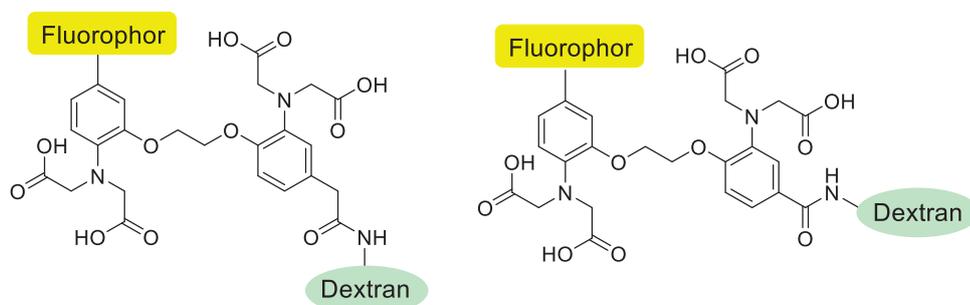


Abbildung 1.27 An Dextran konjugierte Calcium-Sensoren.

Die Synthese und spektroskopische Untersuchung der neuen Calcium-Sensor-PEG-Konjugate werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. In einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von D. SCHILD wurden die Calcium-Sensor-PEG-Konjugate in olfaktorischen Zellen untersucht (siehe Abschnitt 1.9.3).

1.9.2 PEGylierung der neuen Calcium-Sensoren

Die Methode der PEGylierung wurde mit dem Ziel gewählt, die Extrusion und die ungleiche Verteilung der Calcium-Sensoren in der Zelle, ähnlich wie bei den Dextran-Konjugaten, zu inhibieren. Für die PEGylierung wurden Alkin-funktionalisierte PEG von *Iris-Biotech* verwendet. Diese sind in verschiedenen mittleren molaren Massen (2000, 5000, 10000 und 20000 g/mol) erhältlich und haben den Vorteil, dass je PEG-Molekül nur eine Alkin-Funktionalität vorhanden ist (Abbildung 1.28).

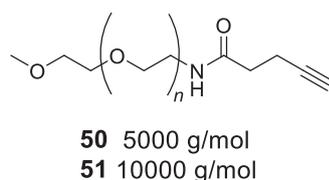
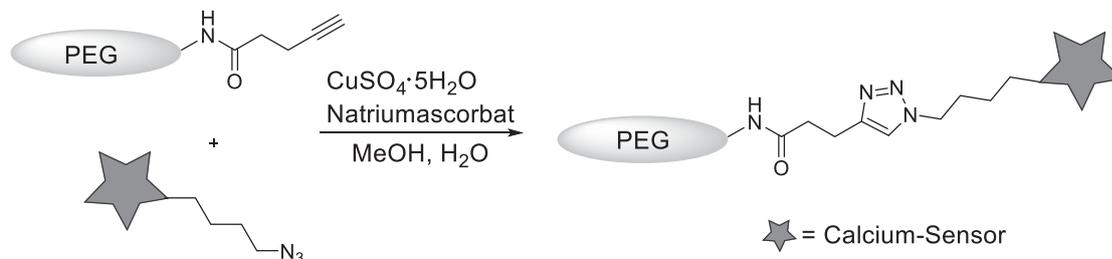


Abbildung 1.28 Verwendete Alkin-funktionalisierte PEG-Derivate.

Für die Synthese wurden die PEG-Derivate mit der mittleren molaren Masse von 5000 und 10000 g/mol verwendet. Angelehnt an MALLETT *et al.*^[85,118] wurden jeweils Verbindung 50 oder 51 mit den Calcium-Sensoren Fluo-Azid-1 (12), Fluo-Azid-2 (13) und Rhod-Azid (15) durch eine HUISGEN-Reaktion verknüpft. Dazu wurde das jeweilige PEG-Derivat (1 Äquivalent) mit dem zu reagierendem Calcium-Sensor (3 Äquivalente) in Methanol gelöst und anschließend mit einer heterogenen Mischung aus $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 Äquivalente) und Natriumascorbat (25 Äquivalente) in bidemineralisiertem Wasser versetzt (Schema 1.10).



Schema 1.10 Allgemeines Reaktionsschema für die HUISGEN-Reaktion zwischen PEG-Alkinen und Azid-funktionalisierten Calcium-Sensoren.



Dadurch konnten fünf verschiedene PEGylierte Calcium-Sensoren (**52–56**) erhalten werden (Abbildung 1.29). Für die Abtrennung der PEGylierten Calcium-Sensoren von dem freien Sensor gibt es zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit ist die Filtration über Sephadex-G50. Dabei handelt es sich um ein Dextran-Epichlorhydrin-Polymer, welches für die Größenausschlusschromatographie verwendet wird. Die zweite Möglichkeit ist die Aufreinigung durch RP-HPLC. Dadurch kann der freie Sensor sehr gut von dem PEGylierten Sensor abgetrennt werden. Die Abtrennung der PEG-Derivate **50** und **51** von dem PEG-Calcium-Konjugat durch RP-HPLC war im Fall der Fluorescein-basierten PEGylierten-Sensoren (**52**, **53** und **54**) nicht möglich. Deswegen war es wichtig, den Calcium-Sensor in einem hohen Überschuss einzusetzen. Die Retentionszeiten der PEG-Derivate und der Calcium-Sensor-Konjugate waren bei allen getesteten Bedingungen (Änderung des Gradienten und des Säulenmaterials) identisch (Abbildung 1.30 A). Im Gegensatz dazu konnte eine Trennung im Fall von dem PEG-Alkin zu den Rhod-PEG-Konjugaten **55** und **56** erfolgreich durchgeführt werden. Ein möglicher Grund ist die delokalisierte positive Ladung und die zusätzlichen Methylgruppen am Chromophor, die stärker mit dem Säulenmaterial wechselwirken und somit eine geringfügige Verschiebung der Retentionszeit ermöglichen. Außerdem konnte anhand der HPL-Chromatogramme gezeigt werden, dass die HUISGEN-Reaktion nahezu quantitativ verläuft, da kein freies PEG-Derivat mehr zu sehen war. Um die gute Trennung bei Rhodamin-basierten Calcium-Sensoren zu verdeutlichen, ist das HPL-Chromatogramm einer Mischung aus dem PEG-Derivat **51** und dem PEGyliertem Calcium-Sensor **55** gezeigt (Abbildung 1.30 B).

Die gereinigten PEGylierten Calcium-Sensoren wurden durch MALDI-MS analysiert. Die MALDI-Spektren zeigten in allen Fällen die typischen Polyethylenglycol-Signale mit einem Massenunterschied von $m/z = 44$. In der Abbildung sind exemplarisch die Spektren für **55** (Abbildung 1.30 C) und **52** (Abbildung 1.30 D) gezeigt. Dabei sind im Fall von **52** zwei Verteilungen zu erkennen, die von dem freiem PEG-Derivat **51** und dem Konjugat **52** stammen.

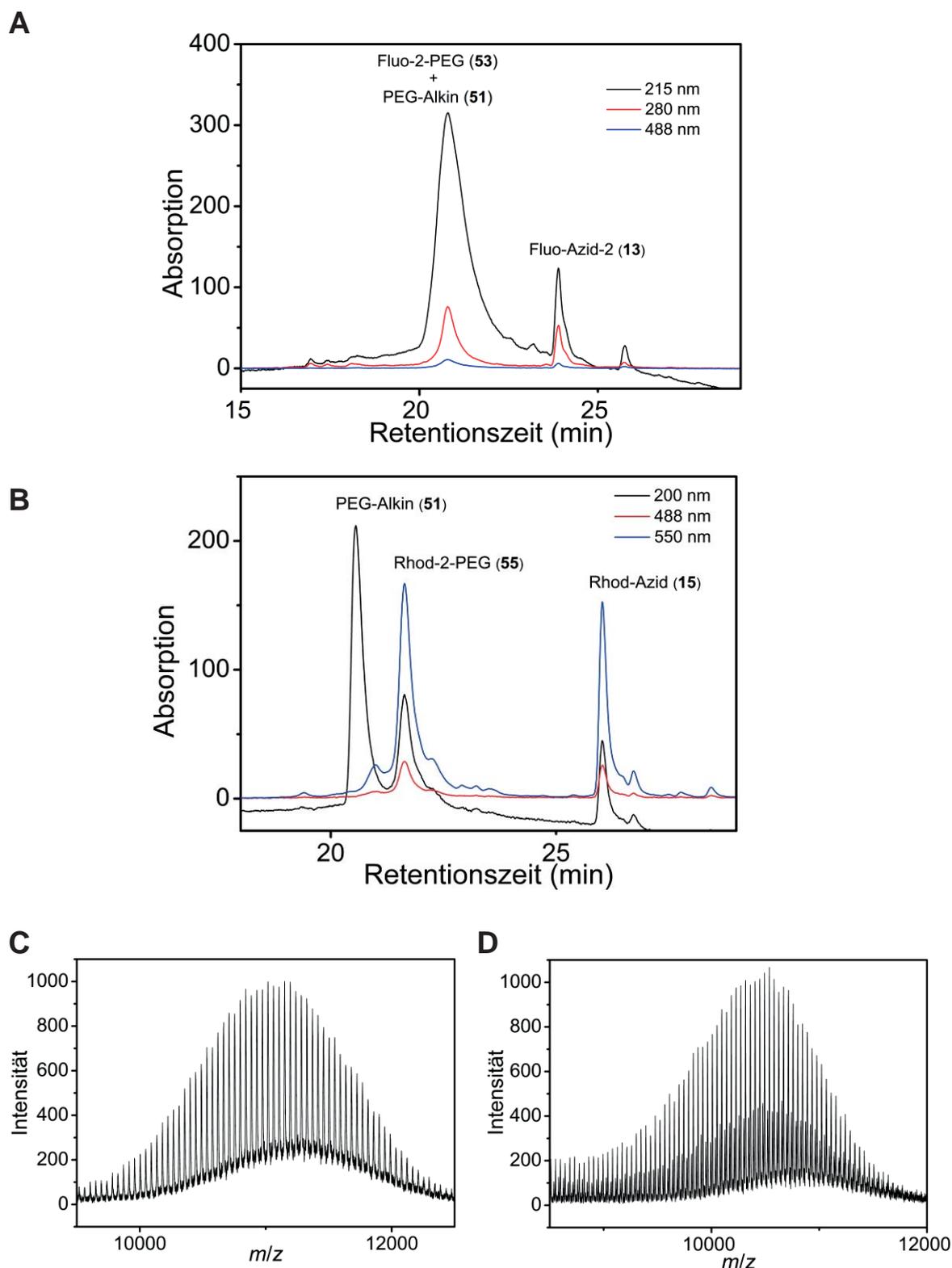


Abbildung 1.30 A HPL-Chromatogramm von Verbindung 53. B HPL-Chromatogramm einer Mischung von 55 und PEG-Alkin 51. C MALDI-Spektrum von 55. D MALDI-Spektrum von 52.

Nach der HPLC-Reinigung wurden die PEGylierten Calcium-Sensoren analog zu den nicht PEGylierten Sensoren (siehe Abschnitt 1.6.3 und 1.7.3) durch Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzmessungen analysiert. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen, steigenden Ca^{2+} -Konzentrationen von 0 bis 39 μM gemessen. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen zeigen, dass auch die PEGylierten Calcium-Sensoren die Kriterien eines Sensors erfüllen. Die Fluoreszenzspektren sind exemplarisch für die Verbindungen **53** (Abbildung 1.31) und **55** (Abbildung 1.32) dargestellt. Wie bei den freien Calcium-Sensoren ist bei den PEG-Derivaten bei Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen eine vernachlässigbare Fluoreszenzemission zu beobachten. Mit steigender Ca^{2+} -Konzentration ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität messbar. Die Emissionsmaxima liegen, wie bei den freien Sensoren, bei 514 nm für die Fluorescein-basierten PEG-Konjugate und bei 570 nm für die Rhodamin-basierten.

Um zu untersuchen, ob die PEG-Derivate einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Komplexierung haben, wurden die Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) der PEGylierten Calcium-Sensoren bestimmt (siehe Abschnitt 5.3) und mit den K_D -Werten der freien Calcium-Sensoren verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1.3 festgehalten. Im Fall der Fluorescein-basierten PEGylierten Calcium-Sensoren hat der Linker keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Komplexierung. Für Fluo-1-PEG (**52**) ($K_D = 1.7 \mu\text{M}$) ist der Unterschied zum nicht modifizierten Calcium-Sensor **12** ($K_D = 1.5 \mu\text{M}$) nur geringfügig. Dies gilt ebenfalls für Fluo-2-PEG (**53**) ($K_D = 0.6 \mu\text{M}$) und Fluo-2-PEG (**54**) ($K_D = 0.6 \mu\text{M}$) im Vergleich zu dem nicht modifizierten Fluo-Azid-2 (**13**) ($K_D = 0.7 \mu\text{M}$). Die vernachlässigbaren Unterschiede lassen sich auf geringe Konzentrationsschwankungen des Calcium-Sensors bzw. PEG-Konjugats während der Messungen zurückführen. Ein weiteres Indiz dafür, dass das PEG-Derivat keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Komplexierung hat, ist der identische K_D -Wert bei einem mittleren molaren Massenunterschied von 5000 g/mol zwischen Fluo-2-PEG (**53**) und Fluo-2-PEG (**54**).

Im Fall der Rhodamin-basierten PEGylierten Calcium-Sensoren hat der PEG-Linker einen höheren Einfluss auf die Calcium-Affinität. Die K_D -Werte sind bei Rhod-PEG (**55**) ($K_D = 2.3 \mu\text{M}$) und Rhod-PEG **56** ($K_D = 2.4 \mu\text{M}$) größer als bei dem nicht PEGylierten Calcium-Sensor **15** ($K_D = 1.5 \mu\text{M}$). Eine mögliche Erklärung ist die positive Ladung des Rhodamin-Fluorophors, welche mit den negativ polarisierten



Sauerstoffatomen des PEG-Linkers schwach elektrostatisch wechselwirken kann und somit die Calcium-Komplexierung aufgrund von sterischen Einflüssen beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle neuen PEGylierten Calcium-Sensoren die in Abschnitt 1.3 beschriebenen Kriterien für einen Calcium-Sensor erfüllen und folglich für Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzmessungen geeignet sind. Die Anwendung *in vivo* in olfaktorischen Zellen wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

Tabelle 1.3 Gemessene photophysikalische Eigenschaften der PEGylierten Calcium-Sensoren.

| PEG-Konjugat | λ_{max} (Emission) | K_D -Wert | K_D -Wert (freier Calcium-Sensor) |
|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------|--|
| Fluo-1-PEG 52 (10000 g/mol) | 514 nm | 1.7 μM | 1.5 μM |
| Fluo-2-PEG 53 (10000 g/mol) | 514 nm | 0.6 μM | 0.7 μM |
| Fluo-2-PEG 54 (5000 g/mol) | 514 nm | 0.6 μM | 0.7 μM |
| Rhod-PEG 55 (10000 g/mol) | 570 nm | 2.3 μM | 1.5 μM |
| Rhod-PEG 56 (5000 g/mol) | 570 nm | 2.4 μM | 1.5 μM |

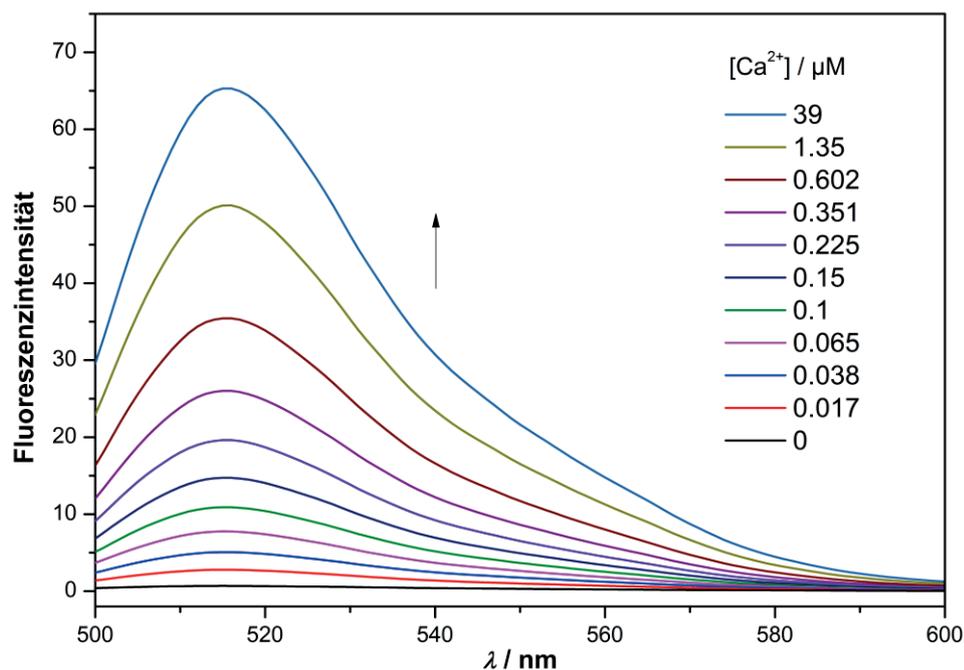


Abbildung 1.31 Fluoreszenzspektrum der Ca^{2+} -abhängigen Messungen ($\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$) von Fluo-2-PEG (53) (2 μM 53, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C).

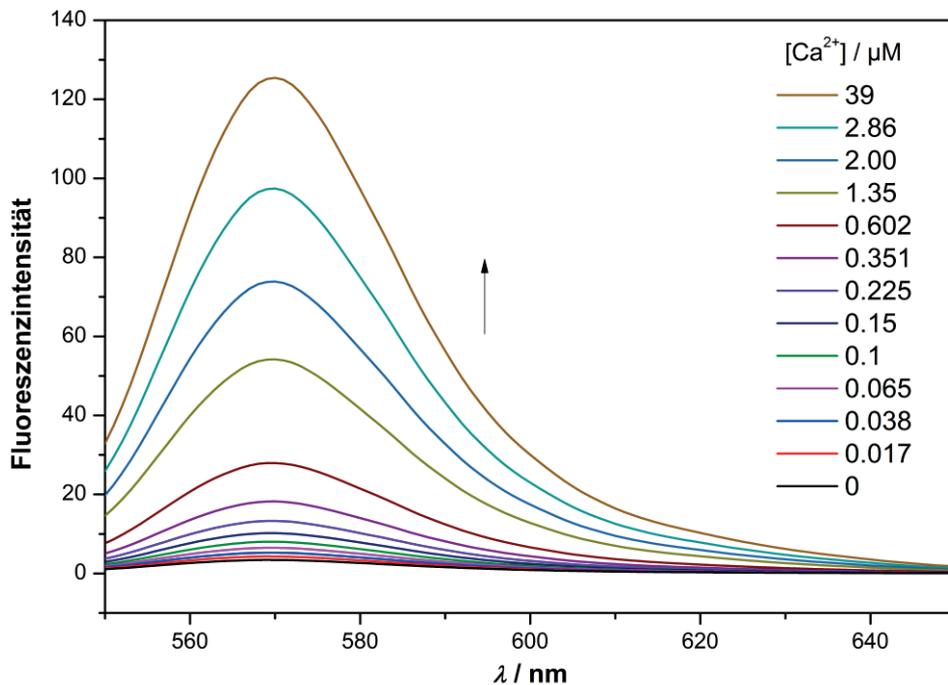


Abbildung 1.32 Fluoreszenzspektrum der Ca²⁺-abhängigen Messungen ($\lambda_{\text{Ex}} = 540 \text{ nm}$) von Rhod-2-PEG 55 (2 μM 55, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C).

1.9.3 Anwendung in olfaktorischen Zellen

Die neuen PEGylierten Calcium-Sensoren wurden im Rahmen einer Kooperation der Arbeitsgruppe von D. SCHILD aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie (Göttingen) übergeben. Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Erforschung des olfaktorischen Systems mit Hilfe des *Calcium-Imaging*.^[119–121] Die Zellexperimente wurden von G. BAO durchgeführt.

Als Modelltier wurden Kaulquappen der Gattung *Xenopus laevis* verwendet (Abbildung 1.33, links). Die Kaulquappen stellen ein sehr gutes Modellsystem für die Erforschung des olfaktorischen Systems dar, weil die Knochen noch nicht verkalkt sind. Dadurch können sehr leicht Gewebeproben hergestellt werden, die alle wichtigen Bereiche des olfaktorischen Systems beinhalten. Zu diesen gehören die olfaktorische Mukosa (OM), der olfaktorische Nerv (ON) und der olfaktorische Bulbus (OB) (Abbildung 1.33, rechts).^[122] In der OM findet die Detektion der Geruchsstoffe durch die olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) statt. Die Information wird über den ON zum OB geleitet und von dort direkt in das Gehirn weitergeleitet. In den olfaktorischen Rezeptorneuronen befinden sich die olfaktorischen Rezeptoren, die intrazellulär an ein G-



Protein gekoppelt sind.^[123] Bindet ein Geruchsstoff an die Rezeptoren, kommt es zu einer Konformationsänderung des G-Proteins, so dass eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird.^[124,125] Eine der am besten beschriebenen ist die cAMP-vermittelte Signalkaskade. Das aus ATP gebildete cAMP verursacht die Öffnung von Ionenkanälen, wodurch die Membran depolarisiert wird und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen.^[126] Durch die Messung der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe von Calcium-Sensoren und anschließende Untersuchung durch fluoreszenzspektroskopische Methoden, das sogenannte *Calcium-Imaging*, kann eine Aussage über die Aktivität der Zellen gemacht werden.

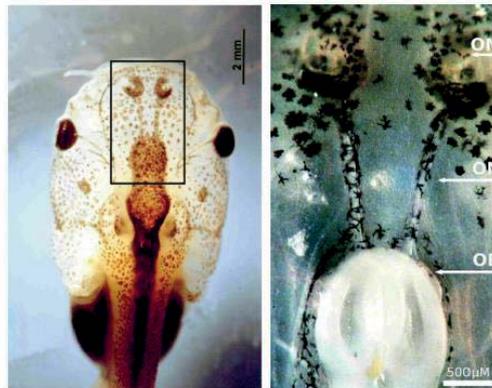


Abbildung 1.33 Als Modellsystem für das olfaktorische System verwendete Kaulquappe *Xenopus laevis* (links). Gewebeausschnitt mit der olfaktorischen Mukosa (OM), dem olfaktorischen Nerv (ON) und olfaktorischem Bulbus (OB).^[122]

Die Axone der ORN bilden innerhalb des olfaktorischen Bulbus Synapsen mit Mitralzellen, den nachgeschalteten zweiten Neuronen. Die Nervenbündel, die die Synapsen beinhalten, werden Glomeruli genannt.^[126] Um die synaptische Transmission und die Calcium-Aktivität in den Glomeruli durch *Calcium-Imaging* zu analysieren, muss der Calcium-Sensor vom OM durch das ON über eine längere Distanz durch den gesamten Nerv in den Bulbus diffundieren. Dies setzt voraus, dass der Calcium-Sensor nicht aus den Zellen ausgeschleust wird, wie es bei kommerziell erhältlichen Calcium-Sensoren wie *Fluo-4* der Fall ist. Die PEG-Ketten an den Calcium-Sensoren sollen die Ausschleusung aus den Zellen verhindern und eine gute Verteilung des gekoppelten Sensors in den Axonterminalen des olfaktorischen Bulbus gewährleisten.

Für die Einbringung der PEGylierten Calcium-Sensoren in das olfaktorische System wurde die Elektroporation verwendet. Dabei werden den Kaulquappen die Farbstoffe direkt in die Nasenhöhle



eingesetzt. Anschließend wird ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die Zellmembran für eine kurze Zeit permeabel und somit für Makromoleküle durchlässig wird.

Abbildung 1.34 zeigt die Verteilung des PEGylierten Calcium-Sensors **52** in den Glomeruli von *Xenopus laevis*. Die Aktivität der Zellen wurde durch 10 μM einer Mischung von Aminosäuren stimuliert. Bei jeder Stimulation war ein Anstieg der Fluoreszenzintensität und somit ein Ca^{2+} -Anstieg messbar. Die Messung wurde eine Woche nach der Elektroporation durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen zeigen, dass sich der Sensor gut in den Zellen verteilt hat und über einen längeren Zeitraum in den Zellen verbleibt ohne ausgeschleust zu werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Experimente bestätigt werden konnten, dass die PEGylierten Calcium-Sensoren sich gut für *in vivo* Messungen und auch für Langzeitmessungen eignen.

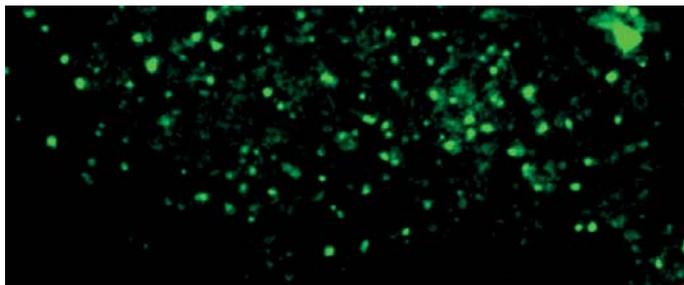


Abbildung 1.34 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Fluo-1-PEG (**52**) markierten olfaktorischen Zellen. Die Messungen wurden von G. BAO durchgeführt.

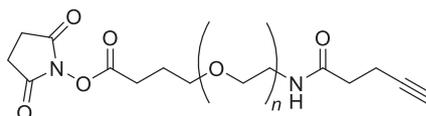
1.9.4 Kombination eines rot und grün fluoreszierenden Sensors am PEG

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es zwei verschiedene Calcium-Sensoren in einem gleichen Verhältnis mit einem PEG-Linker zu verbinden. Die Verknüpfung von zwei verschiedenen Calcium-Sensoren an einem Makromolekül wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal durchgeführt und bietet einige Vorteile. Durch den PEG-Linker wird gewährleistet, dass sich beide Sensoren gleichmäßig in der Zelle verteilen und für längere Zeit im Cytosol verbleiben. Weiterhin werden die Sensoren in der Zelle in einem konstanten Verhältnis von 1:1 vorliegen, da jeweils ein rot und ein grün fluoreszierender Sensor mit PEG verknüpft wurde. Durch das Vorhandensein von zwei verschiedenen Calcium-Sensoren sind außerdem genauere Messungen der Ca^{2+} -Aktivität möglich. Als Calcium-Sensoren wurden Fluo-Azid-2 (**13**) und



Rhod-Azid (**15**) gewählt. Diese können entweder gleichzeitig mit der Argon-Ionen-Laserwellenlänge ($\lambda = 488 \text{ nm}$) oder unabhängig voneinander bei unterschiedlichen Wellenlängen (z. B. 470 nm und 550 nm) angeregt werden. Sie weisen zwei unterschiedliche Emissionsmaxima auf, Fluo-Azid-2 (**13**) emittiert im grünen Bereich ($\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$) und Rhod-Azid (**15**) im roten ($\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$). Da die Calcium-Sensoren unterschiedliche K_D -Werte aufweisen, kann die Messung in Abhängigkeit von den Ca^{2+} -Konzentrationsbereichen erfolgen. Für die Untersuchung geringer Ca^{2+} -Konzentrationen kann gezielt Fluo-Azid-2 (**13**) ($K_D = 0.7 \mu\text{M}$) angeregt werden und für höhere Konzentrationen der weniger Ca^{2+} -affine Sensor Rhod-2 (**15**) ($K_D = 1.6 \mu\text{M}$).

Für die PEGylierung wurden Alkin- und NHS-funktionalisierte PEG-Derivate von *Iris Biotech* mit den mittleren molaren Massen von 5000 und 10000 g/mol verwendet (Abbildung 1.35).



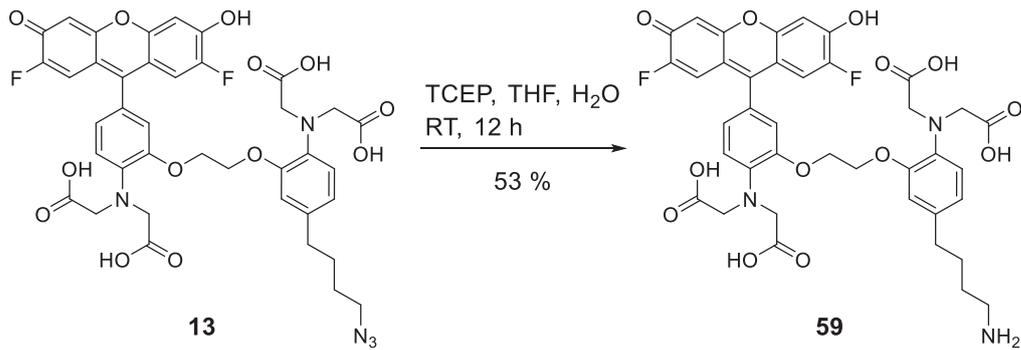
57 5000 g/mol

58 10000 g/mol

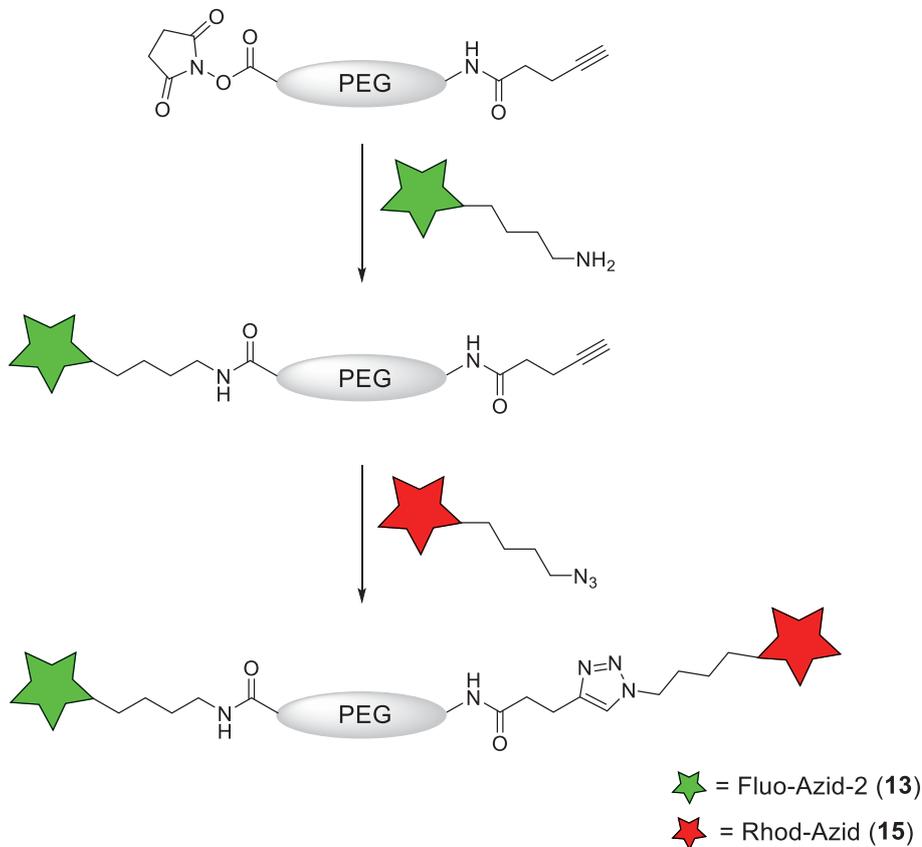
Abbildung 1.35 Verwendete Alkin- und NHS- funktionalisierte PEG-Derivate.

Um den ersten Sensor anzubringen, wurde die Azidgruppe von Fluo-Azid-2 (**13**) mit Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) in Tetrahydrofuran und Wasser zu einer Aminogruppe reduziert (Schema 1.11).

Das Amin **59** wurde anschließend zusammen mit Triethylamin (TEA) in Dimethylformamid gelöst und mit dem PEG-Derivat **57** bzw. **58** zu einer Amidbindung umgesetzt (Schema 1.12). Das resultierende PEG-Konjugat wurde durch RP-HPLC vom freien Calcium-Sensor abgetrennt. Für die Verknüpfung des zweiten Calcium-Sensors wurde das PEG-Konjugat (1 Äquivalent) in einer HUISGEN-Reaktion mit $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (20 Äquivalente), Natriumascorbat (25 Äquivalente) und Rhod-Azid (**15**) (3 Äquivalente) versetzt. Mit dieser Methode wurden insgesamt zwei doppelt modifizierte PEG-Konjugate **60** und **61** mit den mittleren molaren Massen von 5000 und 10000 g/mol erhalten (Abbildung 1.36).



Schema 1.11 Reduktion der Azid-Gruppe mit TCEP.



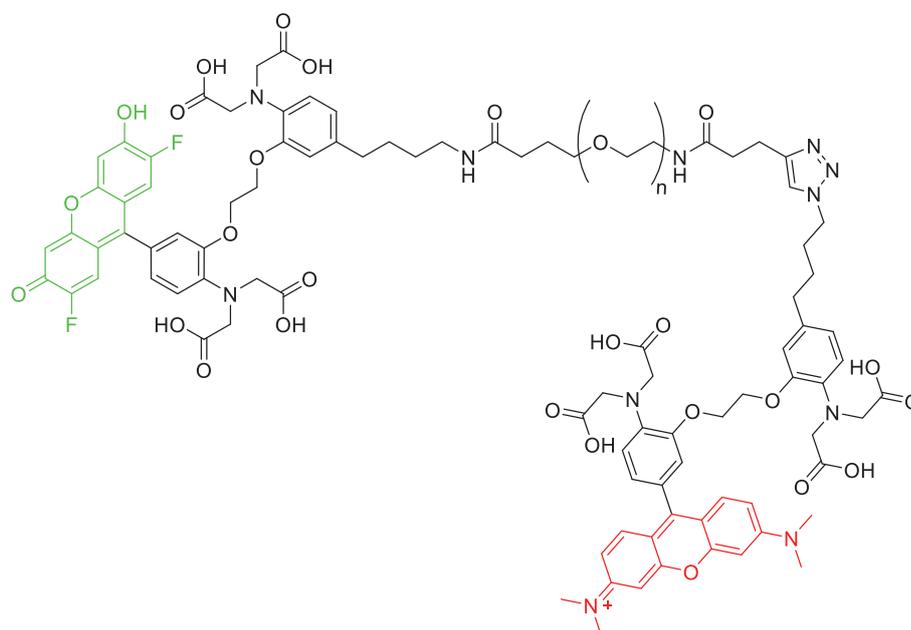
Schema 1.12 Allgemeines Reaktionsschema für die Synthese mit zwei Calcium-Sensoren funktionalisierter PEG-Konjugate.

Um zu analysieren, ob das Verhältnis der beiden an das PEG gekoppelten Calcium-Sensoren äquivalent ist, wurden die Extinktionskoeffizienten der einzelnen freien Sensoren am jeweiligen Absorptionsmaximum in einem Ca²⁺-freien Puffer (10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2) mit Hilfe der UV/vis-Spektroskopie bestimmt. Für Fluo-Azid-2 (13) wurde ein Extinktionskoeffizient von 45975 L/(mol×cm) und für Rhod-2



(15) von 56235 L/(mol×cm) ermittelt. Anschließend wurde das UV/vis-Spektrum der PEG-Konjugate gemessen und die Konzentrationen der einzelnen Calcium-Sensoren durch das LAMBERT-BEER-Gesetz berechnet. Für das PEG-Konjugat **60** (5000 g/mol) wurde ein Konzentrationsverhältnis von 7.6 μM (Fluo-Sensor) zu 7.9 μM (Rhod-Sensor) und für das PEG-Konjugat **61** (10000 g/mol) von 6.1 μM (Fluo-Sensor) zu 6.6 μM (Rhod-Sensor) ermittelt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die beiden Sensoren ungefähr im gleichen Verhältnis vorliegen.

Für die neuen PEG-Konjugate wurden Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzmessungen bei steigenden Ca^{2+} -Konzentrationen durchgeführt. Als Anregungswellenlänge wurde 488 nm gewählt. Die Fluoreszenzspektren (Abbildung 1.37 und Abbildung 1.38) zeigen in beiden Fällen einen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigender Ca^{2+} -Konzentration. In Abwesenheit von Ca^{2+} ist nur eine sehr geringe, vernachlässigbare Emission messbar. Wie erwartet, sind zwei Emissionsmaxima bei 515 nm und 566 nm vorhanden, die von den verschiedenen Calcium-Sensoren stammen.



Fluo-2-PEG-Rhod (**60**) 5000 g/mol
Fluo-2-PEG-Rhod (**61**) 10000 g/mol

Abbildung 1.36 Strukturformel der synthetisierten PEG-Konjugate **60** und **61**.

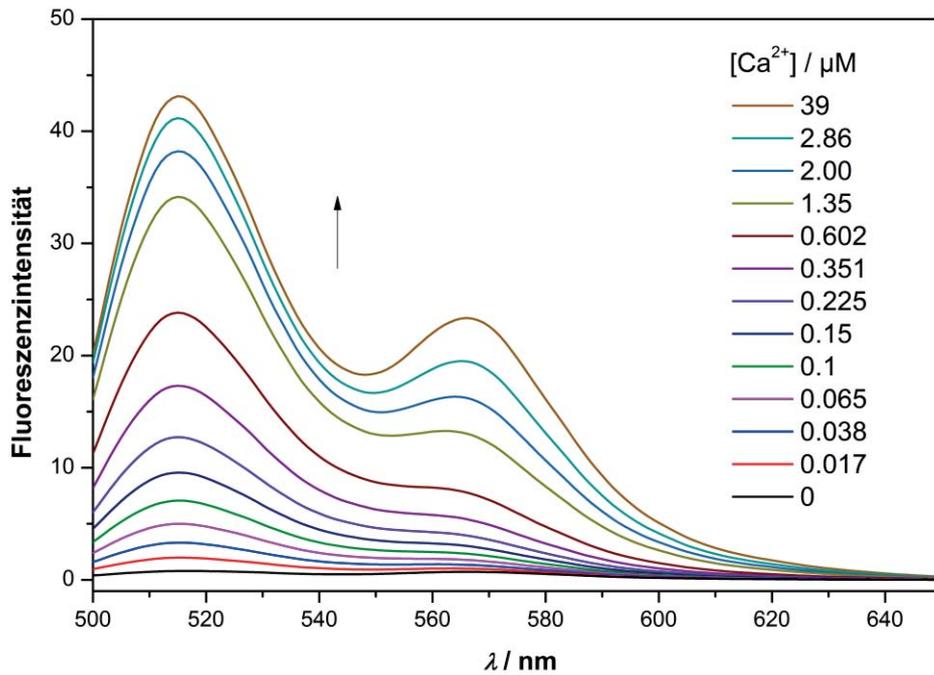


Abbildung 1.37 Fluoreszenzspektrum der Ca^{2+} -abhängigen Messungen ($\lambda_{Ex} = 488$ nm) von Fluo-2-PEG-Rhod (**60**) ($2 \mu M$ **60**, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C).

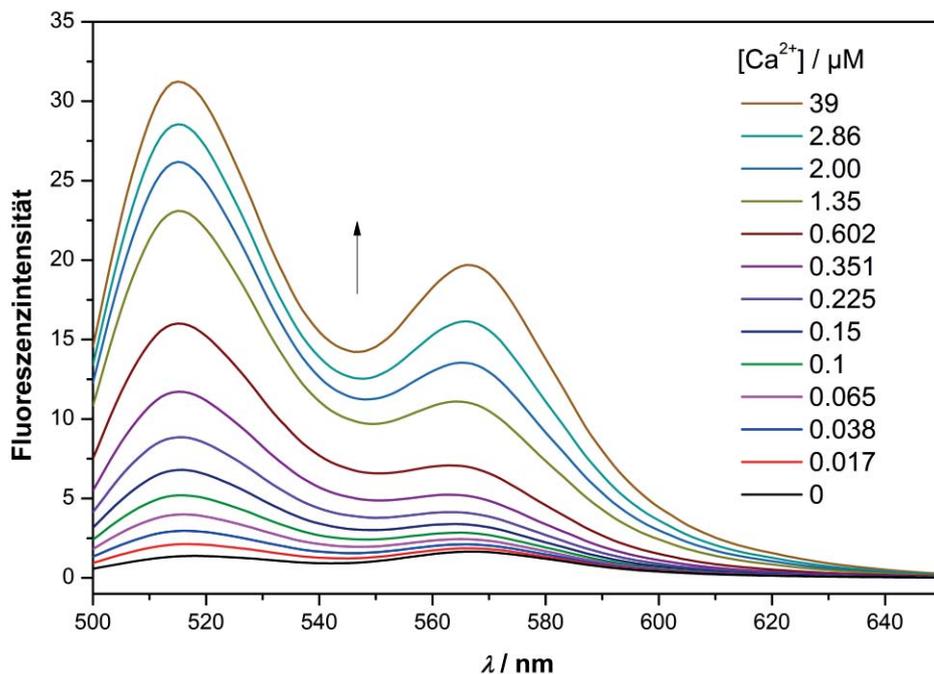


Abbildung 1.38 Fluoreszenzspektrum der Ca^{2+} -abhängigen Messungen ($\lambda_{Ex} = 488$ nm) von Fluo-2-PEG-Rhod (**61**) ($2 \mu M$ **61**, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH = 7.2, 20 °C).



Die synthetisierten PEG-Konjugate wurden im Rahmen einer Kooperation der Arbeitsgruppe von D. SCHILD übergeben. Diese werden in zukünftigen Experimenten für genauere Messungen und zur Untersuchung der Ca^{2+} -Aktivität in olfaktorischen Zellen verwendet.

Mit der neuen Strategie wird außerdem die Möglichkeit eröffnet ratiometrische Langzeitmessungen im sichtbaren Wellenlängenbereich durchzuführen. Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, werden bei ratiometrischen Fluoreszenzmessungen Veränderungen der Calciumkonzentrationen als Änderung im Verhältnis (Ratio) ihrer Fluoreszenz bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Der Vorteil von ratiometrischen Messungen ist, dass Änderungen der Indikatorkonzentrationen keine Rolle spielen, wodurch quantitative Ca^{2+} -Messungen genauer werden.

Die heutzutage kommerziell erhältlichen ratiometrischen Calcium-Sensoren werden im UV-Bereich angeregt. Aufgrund der zellschädigenden Wirkung von UV-Licht ist es allerdings von Vorteil Indikatoren zu verwenden, deren Anregungswellenlängen im langwelligen, sichtbaren Bereich liegen. Dies konnte bisher durch eine Kombination von *Fura-Red* und *Fluo-3* erreicht werden.^[127-130] Durch die Anregung bei 514 nm nimmt die Intensität der Emission im grünen Bereich im Fall von *Fluo-3* (525 nm) zu und im Fall von *Fura-Red* im roten Bereich (600 nm) ab. Dadurch sind durch die Bestimmung der Verhältnisse der jeweiligen Emissionssignale ratiometrische Messungen möglich.^[127] Allerdings sind bei dieser Methode keine Langzeitmessungen möglich, da die Calcium-Sensoren aus den Zellen ausgeschleust werden. Außerdem ist es bei bestimmten Methoden, wie z. B. der Elektroporation, schwierig ein äquivalentes Konzentrationsverhältnis zwischen den beiden Calcium-Sensoren einzustellen. Weiterhin muss durch die Verwendung einer Mischung zweier unterschiedlicher Sensoren eine gleichmäßige Verteilung Beider in der Zelle gewährleistet sein.

Durch die Verknüpfung von dem neuen Sensor *Fluo-Azid-2* (**13**) und einem Azid-modifiziertem *Fura-Red* können zum ersten Mal ratiometrische Langzeitmessungen durch Anregung im sichtbarem Wellenlängenbereich durchgeführt werden, wobei eine gleichmäßige Verteilung der Sensoren aufgrund des konstanten Verhältnisses gewährleistet ist.



1.10 Schlussfolgerung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde die Synthese und Anwendung von neuen Calcium-Sensoren beschrieben. Es konnten insgesamt vier Calcium-Sensoren erfolgreich synthetisiert werden, die sich in den Absorptions- und Emissionswellenlängen unterscheiden. Die Innovation besteht aus dem zusätzlichen Azid-Linker, der es ermöglicht die Sensoren durch eine HUISGEN-Reaktion mit weiteren Molekülen wie z. B. Lipiden oder Peptiden zu verknüpfen. Dies eröffnet weitere Anwendungen in der zellulären Calcium Forschung. Durch Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, dass sich die Fluoreszenzintensität mit steigender Ca^{2+} -Konzentration erhöht. Dadurch kann aus der Fluoreszenzintensität direkt auf die Veränderung der Calcium-Konzentration geschlossen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Sensoren eine viel höhere Selektivität gegenüber Ca^{2+} aufweisen als gegenüber anderen divalenten Kationen wie z. B. Mg^{2+} .

In einer ersten Anwendung wurden die Calcium-Sensoren mit Polyethylenglycol (PEG) verknüpft. Das Ziel war es eine Ausschleusung aus den Zellen zu inhibieren. Die PEGylierten Calcium-Sensoren wurden von G. BAO in olfaktorischen Zellen getestet. Die Auswertung der Ergebnisse belegte, dass die Sensoren auch nach einer längeren Zeitspanne von einer Woche in den Zellen verbleiben und durch einen Fluoreszenzanstieg auf Ca^{2+} -Ionen reagierten.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal jeweils ein rot- und ein grün-fluoreszierender Sensor an einem Makromolekül (PEG) verknüpft, um präzisere Ca^{2+} -Messungen zu ermöglichen. Dieses Design eröffnet die Möglichkeit zukünftig zwei Sensoren, die bei der Ca^{2+} -gebundenen und ungebundenen Form unterschiedliche Emissionsmaxima zeigen, für ratiometrische Messungen im sichtbaren Bereich zu verbinden.

In zukünftigen Experimenten werden die neuen Sensoren an Transmembranpeptide und Lipide angebracht, um diese in Lipidmembranen einzubauen, so dass sich der Sensor in einer definierten Position zur Membranoberfläche befindet. Als Transmembranpeptide sind besonders β -Peptid-Helices aufgrund ihrer Starrheit und Stabilität geeignet.^[131-133] Der jeweilige fluoreszierende Calcium-Sensor wird mit einer Alkin-modifizierten β -Aminosäure durch die HUISGEN-Reaktion



verbunden. Dieses Design eröffnet z. B. die Untersuchung des Ca^{2+} -Ionenflusses bei der SNARE-vermittelten Membranfusion.

Eine weitere Anwendung wäre die gezielte Markierung von Bereichen innerhalb einer Zelle, wie z. B. von Ionenkanälen oder Membranen.



2 Synthese von Fluorophor-markiertem Arginin

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Die fünf Sinne des Menschen bestimmen die Wahrnehmung der Welt. Einer der phylogenetisch ältesten Sinnessysteme ist der Geruchssinn (olfaktorische Wahrnehmung).^[134] Beim Menschen spielt das Riechen eine wichtige Rolle bei der zwischenmenschlichen Kommunikation, der Nahrungsaufnahme, der Vermeidung von Krankheiten und bei der Aufrechterhaltung des psychischen Gleichgewichts. Dennoch wird die Bedeutung des Geruchssinns meist unterschätzt. Dabei zeigen die meisten Menschen mit Riechstörungen depressive Anzeichen und erhöhte soziale Unsicherheiten.^[134] Störungen des Geruchssinns sind außerdem erste Symptome von neurodegenerativen und kognitiven Krankheiten wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer.^[126,135,136]

In Vertebraten kann das olfaktorische System in zwei wesentliche Bereiche eingeteilt werden: das olfaktorische Epithelium (OE, oder Riechepithel) und den olfaktorischen Bulbus (OB, oder Riechkolben) (Abbildung 2.1).^[126] In dem Riechepithel findet die Duftstoffdetektion über die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) statt. An den Rezeptorneuronen befinden sich feine Härchen, die sogenannten Zilien, an deren Enden spezifische Rezeptoren lokalisiert sind.^[125,137] Bindet ein Duftstoff an die Rezeptoren wird unter Aktivierung eines G-Proteins eine Signalkaskade ausgelöst. Das Enzym aktiviert die Bildung von cAMP aus ATP, welches direkt Kationenkanäle öffnet.^[124] Die Membran wird in der Folge depolarisiert und Ca^{2+} -Ionen strömen ein. Die Axone der ORNs bilden innerhalb des olfaktorischen Bulbus Synapsen mit Mitralzellen, den nachgeschalteten zweiten Neuronen. Die Nervenbündel, die die Synapsen beinhalten, werden Glomeruli genannt. Von dort aus wird die Information zu weiteren Zentren im Gehirn geleitet.^[126]

Die olfaktorische Wahrnehmung beginnt mit der Bindung von Duftstoffen an Geruchsrezeptoren im Riechepithel. Über die Interaktion und den Mechanismus der Rezeptoren mit Duftstoffen ist bisher wenig bekannt. In diesem Kooperationsprojekt mit der Gruppe von D. SCHILD (Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie, Universität Göttingen) sollen



neue Erkenntnisse über die olfaktorischen Rezeptoren gewonnen werden. Die Arbeitsgruppe erforscht das olfaktorische System anhand von Kaulquappen der Gattung *Xenopus laevis* (siehe Abschnitt 1.9.3). Diese eignen sich besonders gut als Modellsystem für die Erforschung der olfaktorischen Wahrnehmung, da die Knochen noch nicht verkalkt sind und sich folglich sehr leicht Gewebeproben herstellen lassen, die alle wichtigen Bereiche des olfaktorischen Systems beinhalten. Bei Fischen und anderen im Wasser lebenden Vertebraten fungieren hauptsächlich Aminosäuren als Duftstoffe.^[125] Im Fall der *Xenopus laevis* konnten HASENKLÖVER *et al.* zeigen, dass die olfaktorischen Rezeptoren am stärksten von der Aminosäure L-Arginin stimuliert werden.^[125] Das Ziel dieses Projektes ist die Markierung von L-Arginin mit einem Fluorophor durch eine chemische Reaktion, um die Rezeptoren mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden zu lokalisieren und zu visualisieren.

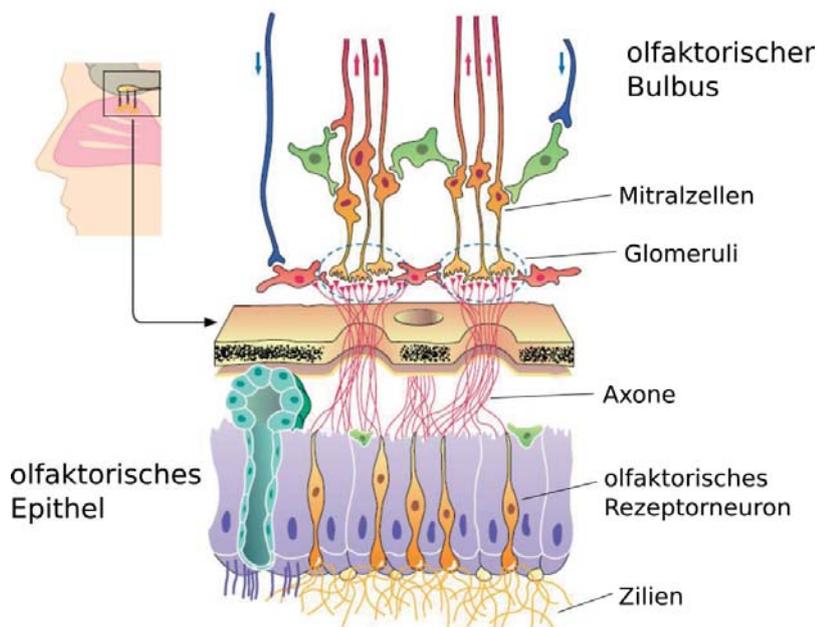


Abbildung 2.1 Aufbau des olfaktorischen Systems mit dem olfaktorischen Bulbus und dem olfaktorischem Epithel. Abbildung modifiziert nach LANG und LANG.^[124]



2.2 Design und Synthese

Ziel dieses Projektes ist es, ein tieferes Verständnis über olfaktorische Rezeptoren zu gewinnen. Dafür wurde L-Arginin, welches als Geruchsstoff in wasserlebenden Vertebraten agiert, mit Farbstoffen markiert. Als Farbstoffe wurden *Alexa647* der Firma *Invitrogen* und *ATTO488* von *ATTO-TEC* gewählt. Diese zeichnen sich beide durch eine hohe Photostabilität, Fluoreszenzquantenausbeute und starke Leuchtkraft aus. Die Absorptionsmaxima (*Alexa647*: $\lambda_{\text{Max}} = 650 \text{ nm}$, *ATTO488*: $\lambda_{\text{Max}} = 501 \text{ nm}$) und Emissionsmaxima (*Alexa647*: $\lambda_{\text{Max}} = 665 \text{ nm}$, *ATTO488*: $\lambda_{\text{Max}} = 523 \text{ nm}$) liegen im sichtbarem Spektralbereich, wodurch Zellschädigungen durch UV-Licht reduziert werden.

Da über die olfaktorischen Rezeptoren noch sehr wenig bekannt ist, gibt es keine bevorzugte Markierungsposition für das L-Arginin. Prinzipiell sind drei mögliche Positionen denkbar. Die Verknüpfung des Farbstoffes kann an die α -Amino-, die α -Carboxy- oder an die Guanidinogruppe erfolgen. In allen drei Fällen ist es möglich, dass dadurch wichtige Bindungsstellen für die Rezeptoren blockiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Arginin-Derivate (**62–65**) synthetisiert, die jeweils am C- und am N-Terminus mit den Farbstoffen verknüpft wurden (Abbildung 2.2).

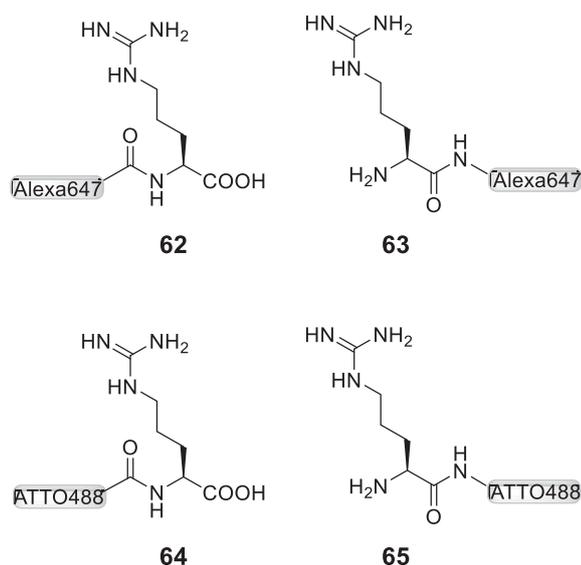
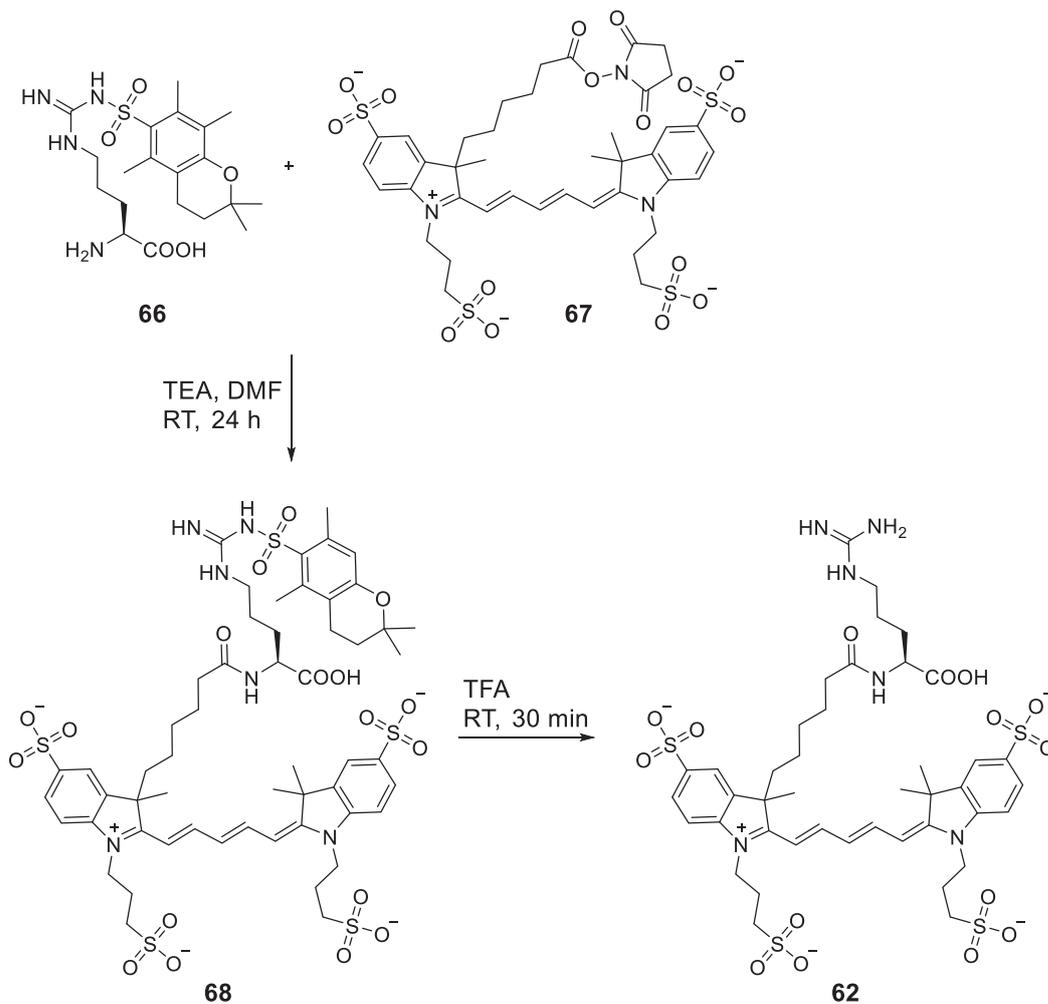


Abbildung 2.2 Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Fluorophor-markierte Arginin-Derivate.



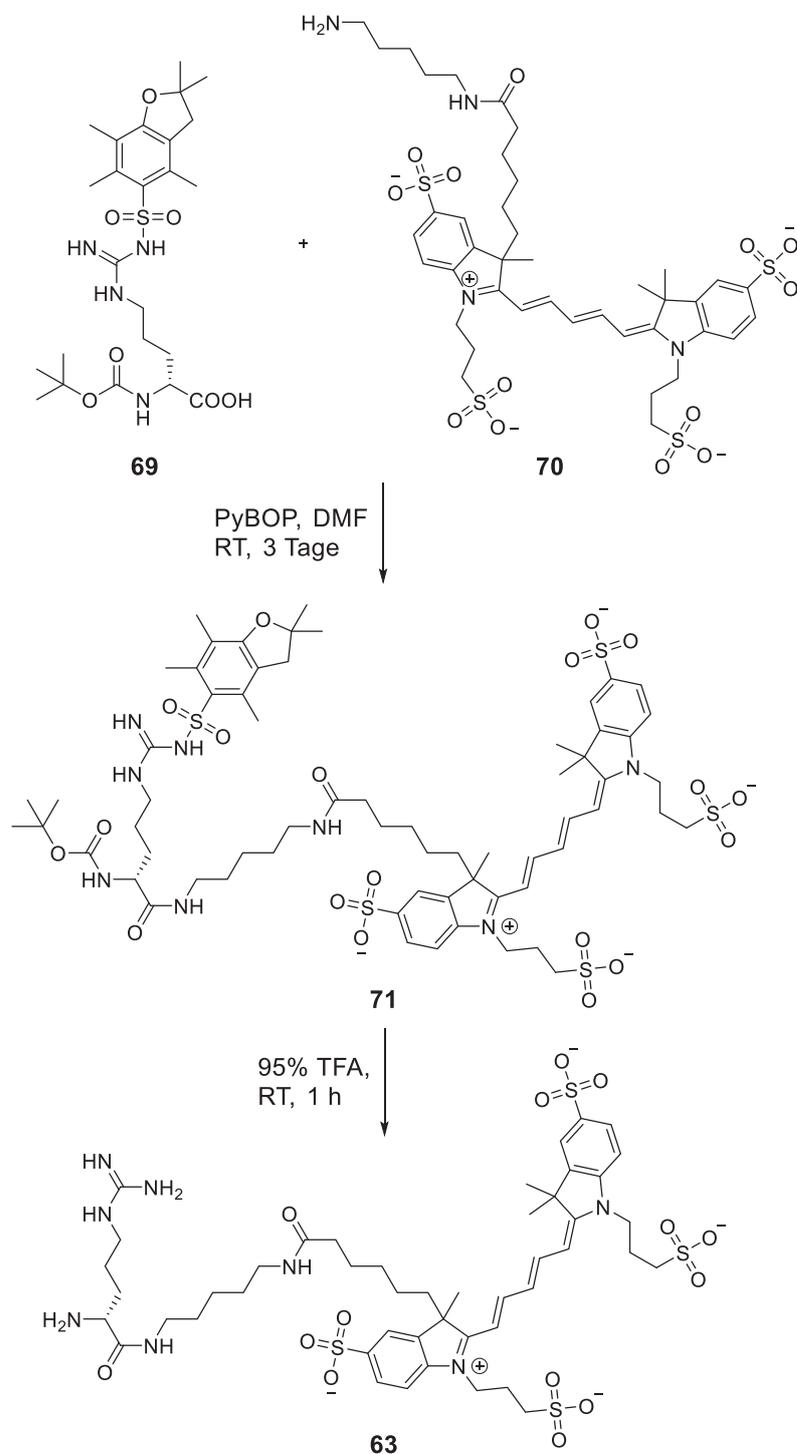
Schema 2.1 Syntheseweg für das am *N*-Terminus Alexa647-markierte Arginin.

Für die Verknüpfung am *N*-Terminus wurde das Guanidin-geschützte H-Arg(Pmc)-OH (**66**) mit dem aktivierten Alexa647-NHS-Ester (**67**) und Triethylamin (TEA) versetzt und für 24 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur umgesetzt (Schema 2.1). Die Zwischenstufe **68** wurde mit RP-HPLC gereinigt und anschließend in Trifluoressigsäure (TFA) gelöst, um die Pmc-Schutzgruppe zu entfernen. Das am *N*-Terminus Fluorophor-markierte Arginin **62** wurde nach einer Reinigung durch RP-HPLC als blauer Feststoff erhalten. Das ATTO488-markierte Arginin wurde analog zu Verbindung **62** mit einem aktivierten ATTO488-NHS Ester synthetisiert (siehe Abschnitt 5.6.6).

Für die Verknüpfung am *C*-Terminus wurde das geschützte Arginin Boc-Arg(Pbf)-OH (**69**) mit dem Amin-funktionalisierten Alexa647 **70** und dem Kupplungsreagenz Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) in DMF gelöst und für 3 Tage bei



Raumtemperatur unter Lichtausschluss umgesetzt (Schema 2.2). Die Zwischenverbindung **71** wurde durch RP-HPLC isoliert und anschließend mit TFA für 1 h bei Raumtemperatur versetzt, um die Schutzgruppen zu entfernen.



Schema 2.2 Syntheseweg für das am C-Terminus Alexa647-markierte Arginin.



Die Zielverbindung **63** wurde nach einer Reinigung mittels RP-HPLC als blauer Feststoff erhalten. Die Synthese des mit *ATTO488* markierten C-Terminus wurde analog mit dem Amin-funktionalisierten *ATTO488* von *ATTO-TEC* durchgeführt (siehe Abschnitt 5.6.6).

Die neuen synthetisierten Arginin-Derivate wurden im Rahmen einer Kooperation der Arbeitsgruppe von D. SCHILD übergeben. Die *Alexa647*-markierten Derivate wurden von S. GLIEM in olfaktorischen Zellen getestet. Die ersten Ergebnisse sind im nächsten Abschnitt beschrieben.

2.3 Erste Untersuchungen an olfaktorischen Zellen

Die neuen Arginin-Derivate **62** und **63** wurden von S. GLIEM in physiologischen *Calcium-Imaging* Experimenten angewandt. Dabei wurde getestet, ob die synthetisierten Derivate so wie das ungekoppelte L-Arginin, als Duftstoffe bei den Kaulquappen der Gattung *Xenopus laevis* agieren. Die Interaktion zwischen Duftstoff und dem modifiziertem Arginin wurde durch die Aufnahme der Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen detektiert. Neben den Arginin-Derivaten wurde eine Mischung aus L-Aminosäuren und nicht modifiziertem L-Arginin getestet. Die Messung der Duftstoffantworten erfolgten in olfaktorischen Rezeptorneuronen auf der Ebene des olfaktorischen Epithels (Abbildung 2.3) und in Mitralzellen auf der Ebene des olfaktorischen Bulbes (Abbildung 2.4).

Es konnte demonstriert werden, dass viele Zellen sowohl auf der Ebene des Epithels als auch auf der Ebene des olfaktorischen Bulbes im Gehirn auf die Fluorophor-markierten Arginin-Derivate reagierten und die Bindung der Derivate an die Arginin-Rezeptoren somit durch die Größe der Fluorophore und Blockierung der funktionellen Gruppen nicht stark eingeschränkt wurde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die olfaktorischen Zellen auf die neuen Arginin-Derivate als Duftstoffe reagieren. Um weitere Erkenntnisse in Bezug auf den Mechanismus und Interaktion der Rezeptoren zu erhalten, sind noch weitere Analysen notwendig. Zum Beispiel kann getestet werden, ob die Zellen auch nur auf den Alexa-Farbstoff reagieren. Eine interessante Option wäre außerdem die Untersuchung der Zellreaktion auf das an der Guanidinogruppe



markierte Arginin, welches im Rahmen dieser Arbeit nicht synthetisiert wurde.

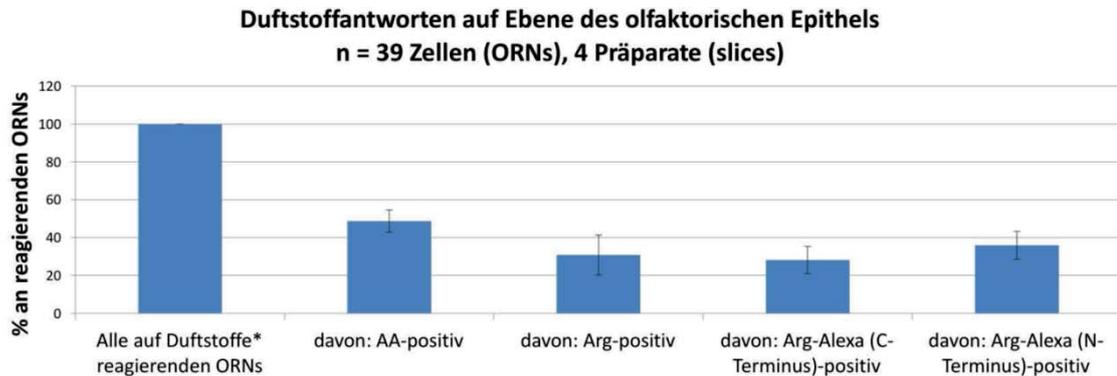


Abbildung 2.3 Duftstoffantworten der olfaktorischen Rezeptorneurone auf eine Mischung aus Aminosäuren (AA), auf unmodifiziertes L-Arginin (Arg), das Arginin-Derivat **63** (Arg-Alexa, C-Terminus) und Arginin-Derivat **62** (Arg-Alexa, N-Terminus) im olfaktorischen Epithel. Die Abbildung wurde von S. GLIEM zur Verfügung gestellt.

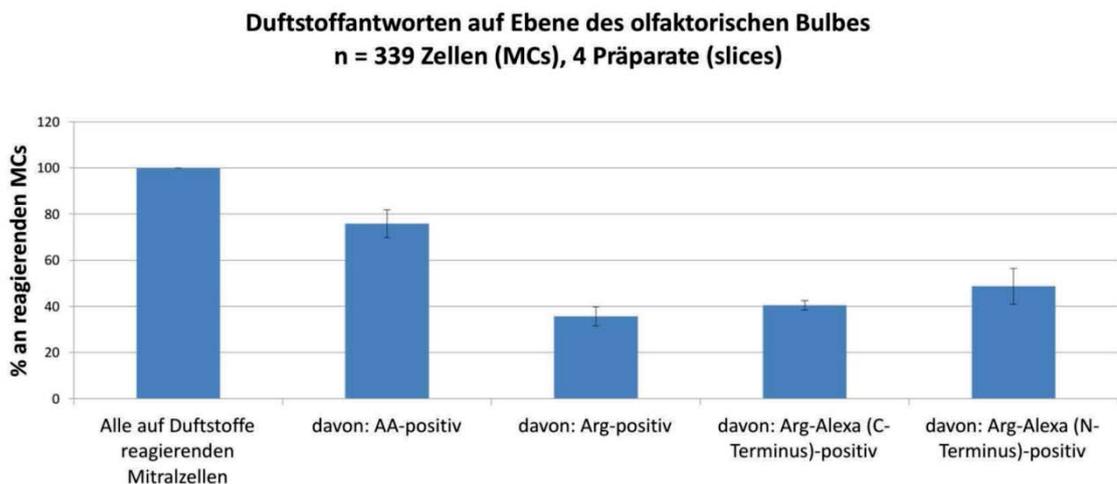


Abbildung 2.4 Duftstoffantworten der Mitralzellen auf eine Mischung aus Aminosäuren (AA), auf unmodifiziertes L-Arginin (Arg), das Arginin-Derivat **63** (Arg-Alexa, C-Terminus) und Arginin-Derivat **62** (Arg-Alexa, N-Terminus) im olfaktorischen Bulbus. Die Abbildung wurde von S. GLIEM zur Verfügung gestellt.



2.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In diesem Kapitel wurden die Synthese und erste Untersuchungen von Fluorophor-markiertem Arginin beschrieben. L-Arginin agiert im Wasser lebenden Vertebraten als Duftstoff und aktiviert olfaktorische Rezeptoren. Insgesamt konnten vier modifizierte Arginin-Derivate erfolgreich synthetisiert werden. Das Arginin wurde am N- und am C-Terminus jeweils mit den Farbstoffen *Alexa647* und *ATTO488* verknüpft. Die *Alexa647*-markierten Moleküle wurden bereits von S. GLIEM in olfaktorischen Zellen getestet, um neue Erkenntnisse über die olfaktorischen Rezeptoren zu gewinnen. In den ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Arginin-Derivate als Duftstoffe agieren und somit die Rezeptoren aktivieren.

In zukünftigen Experimenten wird untersucht, ob und inwiefern die ungekoppelten Farbstoffe die Rezeptoren aktivieren. Außerdem werden die modifizierten Arginin-Derivate zur Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Endocytose in den olfaktorischen Zellen eingesetzt, um die Endocytose gesteuerte Aufnahme der Liganden über die Rezeptoren mittels Fluoreszenzspektroskopischer Methoden zu visualisieren.

Weiterhin kann zukünftig das an der Guanidinogruppe funktionalisierte Arginin synthetisiert werden, um den Einfluss auf die olfaktorischen Zellen zu untersuchen.



3 Synthese von Fluorophor-markierter Saccharose

3.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Funktionsweise von Synapsen zwischen Nervenzellen steht schon lange im Mittelpunkt der Forschung. Eine der wichtigsten Erkenntnisse ist, dass die Synapsen chemische Botenstoffe, die so genannten Neurotransmitter, für die Erregungsübertragung zwischen zwei Zellen verwenden.^[138,139] Die Erregungsübertragung dauert an den meisten Synapsen nur wenige Millisekunden, was für alle Gehirnprozesse von entscheidender Bedeutung ist.^[138] Alle Synapsen arbeiten nach dem gleichen Prinzip. Wird ein Aktionspotential entlang eines Axons weitergeleitet, werden die Nervenendigungen depolarisiert, wodurch die Öffnung von präsynaptischen Calcium-Kanälen erfolgt. Die in die Nervenendigungen einströmenden Calcium-Ionen induzieren innerhalb eines kurzen Zeitintervalls die Freisetzung von Neurotransmittern. Diese befinden sich in hohen Konzentrationen in synaptischen Vesikeln, Membranorganellen mit einem mittleren Durchmesser von 35 nm.^[138] Durch die Ca^{2+} -Ionen wird die Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran ausgelöst (Exocytose), wodurch die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden. Dort binden die Neurotransmitter direkt an die jeweiligen Rezeptoren in der postsynaptischen Membran. Nach der Exocytose werden die synaptischen Vesikel wiedergewonnen, erneut mit Neurotransmittern gefüllt und auf den nächsten Zyklus vorbereitet.^[140-144] Der genaue Ablauf dieses synaptischen Vesikelzyklus wird im nächsten Abschnitt thematisiert.

Obwohl der synaptische Vesikelzyklus in den letzten Jahren intensiv erforscht wurde, ist eine essenzielle Frage unbeantwortet: Wie oft durchläuft ein synaptischer Vesikel diesen Zyklus bevor es abgebaut wird oder in einen Ruhezustand übergeht? Diese Fragestellung wird in einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von S.RIZZOLI (Institut für Sinnes- und Neurophysiologie, Göttingen) analysiert. Das von S. RIZZOLI entwickelte Konzept beinhaltet die Markierung von synaptischen Vesikeln mit einem fluoreszierenden Molekül. Dafür ist vorgesehen



Fluorophor-markierte Saccharose zu verwenden, die von synaptischen Vesikeln bei jedem Zyklus aus dem Medium aufgenommen wird. Nach jedem durchlaufenden Zyklus erhöht sich die Anzahl der Fluorophor-markierten Moleküle im Inneren der Vesikel und folglich die gemessene Fluoreszenzintensität, aus welcher die Lebensdauer des Vesikels ermittelt werden kann.

Der große Vorteil bei der Verwendung von Kohlenhydraten ist, dass es sich um Naturprodukte handelt, die in einer großen Menge produziert werden. Saccharose ist der am meist vorkommende Zucker mit einer jährlichen Produktion von über 120 Millionen Tonnen.^[145]

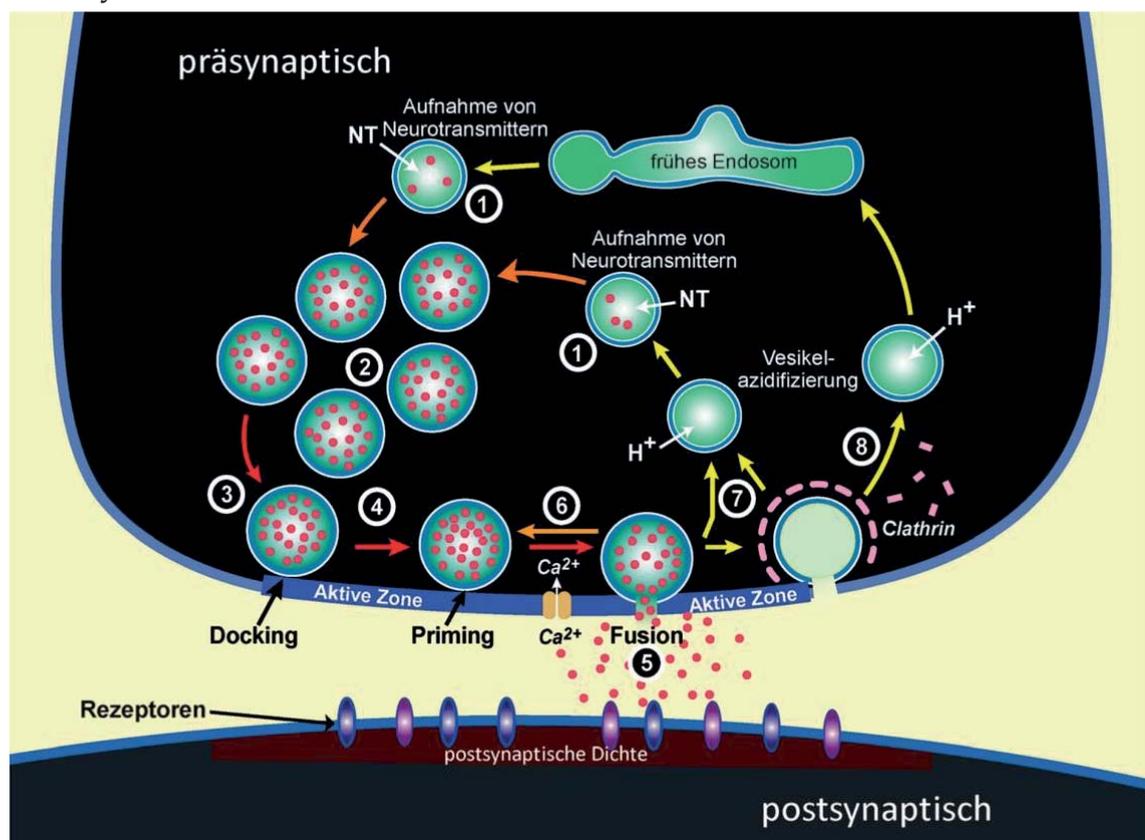
Das Ziel dieses Projektes ist es modifizierte Saccharose zu synthetisieren, die selektiv an einer Hydroxygruppe der Glucose-Einheit mit einem Farbstoff verknüpft wird. Anschließend wird die modifizierte Saccharose im Arbeitskreis von S. RIZZOLI zur Untersuchung des synaptischen Vesikelzyklus verwendet.

3.2 Der synaptische Vesikelzyklus

Die Freisetzung von Neurotransmittern wird durch die Exocytose synaptischer Vesikel an den präsynaptischen Nervenendigungen vermittelt. Die einzelnen Schritte des synaptischen Zyklus sind in Schema 3.1 dargestellt.^[138,139] Im ersten Schritt werden die synaptischen Vesikel mit Neurotransmittern gefüllt und anschließend in die Nähe der aktiven Zone transportiert, wo sie akkumulieren und für die Exocytose vorbereitet werden. In der aktiven Zone befindet sich die Protein-Maschinerie, die die Neurotransmitterfreisetzung reguliert. Im nächsten Schritt erfolgt der *Docking*-Prozess, bei dem die Vesikel durch Proteine an die Plasmamembran der aktiven Zone gebunden werden. Der *Docking*-Prozess findet nur in der aktiven Zone statt, so dass die Neurotransmitter bei der Freisetzung direkt auf die Rezeptoren der postsynaptischen Membran treffen. In Schritt vier werden die Vesikel bei einem Reifungsprozess, dem sogenannten *Priming*, in einen fusionskompetenten Zustand überführt und für die Ca²⁺-vermittelte Fusion vorbereitet. Nach dem Einströmen von Ca²⁺-Ionen durch die Calcium-Kanäle wird die Fusion zwischen der Vesikel- und der Plasmamembran induziert und es entsteht eine Fusionspore, wodurch die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt werden (Schritt 5). Bei diesem Schritt spielen die SNARE-Proteine eine wichtige Rolle, die in Kapitel 5



thematisiert werden. Nach der Exocytose werden die synaptischen Vesikel auf unterschiedlichen Wegen zurückgewonnen. Die erste Möglichkeit ist der direkte Verbleib an der Plasmamembran nach der Öffnung der Fusionspore (Schritt 6) oder ein schneller Clathrin-unabhängiger Weg (Schritt 7) bzw. ein langsamer Clathrin-abhängiger Weg mit anschließendem *Recycling* durch Endosome (Schritt 8). Die wiedergewonnenen Vesikel werden nach der Abschnürung von Endosomen bzw. nach der Endozytose mit Neurotransmittern gefüllt, um den Zyklus erneut zu durchlaufen.^[138,139]



Schema 3.1 Schematische Darstellung des synaptischen Vesikelzyklus. Abbildung entnommen aus SÜDHOF.^[138]

3.3 Kriterien und Designstrategien

Für die Bestimmung der Lebensdauer synaptischer Vesikel wird Saccharose verwendet, die selektiv an der Glucose-Einheit mit einem Fluorophor modifiziert wurde. Die Vesikel können beim Durchlaufen des synaptischen Vesikelzyklus die modifizierte Saccharose aus dem Medium aufnehmen. Nach der Endocytose wird, durch die Verwendung eines



Enzyms (*Weissella* sp. TN610)^[146], im Inneren der Vesikel eine Polymerisation initiiert, wodurch der Fluorophor in der Plasmamembran verankert wird (Abbildung 3.1). Das Enzym katalysiert dabei die Polymerisation von Glucose zu Dextranketten aus Saccharose bei pH 5.5 und ist bei dem physiologischen pH-Wert von 7.4 inaktiv. Dadurch kann die Polymerisation gezielt durch die Veränderung des pH-Wertes gestartet werden. Gleichzeitig wird durch die Acidifizierung der Vesikel ein Protonengradient erzeugt, welcher verwendet wird, um erneut Neurotransmitter mittels eines Antiporters in die Vesikel zu transportieren.

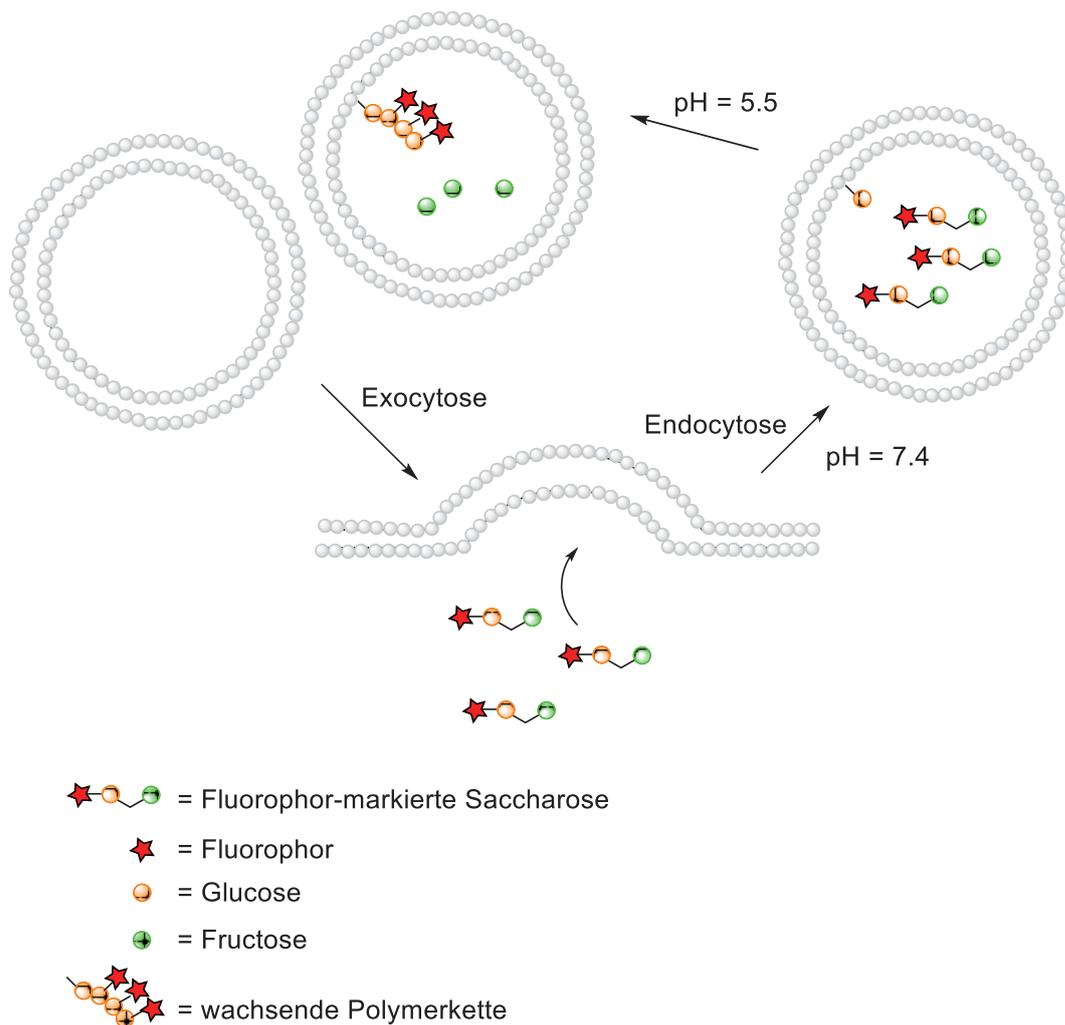


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Aufnahme von Fluorophor-markierter Saccharose durch synaptische Vesikel. Die modifizierte Saccharose wird bei der Endocytose vom Vesikel aufgenommen. Nach der Änderung des pH-Wertes auf 5.5 wird eine Polymerisation des Glucose-Rests initiiert, wodurch der Fluorophor in der Membran verankert wird. Der Fructose-Anteil wird bei der Polymerisation abgespalten und bei dem nächsten Zyklus wieder freigesetzt.



Die Polymerisation der Glucose erfolgt an einem Glucose-Starter, welcher zuvor in der Vesikelmembran verankert wurde. Der Fructose-Anteil wird durch das Enzym abgespalten und während der Fusion im nächsten Zyklus wieder freigesetzt. Beim Durchlaufen der Zyklen nehmen die Vesikel jedes Mal neue markierte Saccharose-Moleküle auf, wodurch die Polymerkette an der Vesikelmembran verlängert wird. Folglich können mehrere Zyklen durch den Anstieg der Fluoreszenzintensität mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden visualisiert werden.

Wie oben erwähnt, wird der Fructose-Anteil bei der enzymkatalysierten Polymerisation abgespalten, so dass die Modifikation mit dem Fluorophor an dem Glucose-Ring erfolgen muss. Die möglichen Positionen zur Modifizierung sind die Hydroxygruppen am C2-, C3- oder C4-Atom (Abbildung 3.2). Eine Modifikation der primären Hydroxygruppe am Glucose-Ring ist nicht möglich, weil an dieser die Verlängerung der Polymerkette erfolgt.

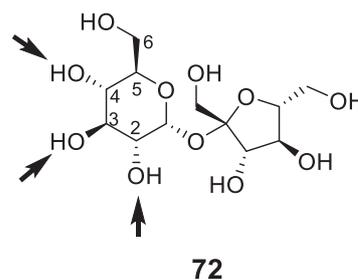


Abbildung 3.2 Struktur von Saccharose. Die bevorzugten Positionen zur Modifikation mit einem Fluorophor sind mit Pfeilen markiert.

Das Ziel ist einen Alkin-Linker an den Glucose-Ring der Saccharose anzubringen. An diesen kann im letzten Schritt ein Azid-modifizierter Farbstoff mittels der HUISGEN-Reaktion verknüpft werden. Als Farbstoff wurde *ATTO-647N* der Firma *ATTO-Tec* gewählt. Dieser emittiert im roten Spektralbereich ($\lambda_{\text{Abs, Max}} = 646 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em, Max}} = 664 \text{ nm}$) und zeichnet sich durch eine starke Absorption, sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeute sowie eine hohe thermische und photochemische Stabilität aus. *ATTO-647N* ist demnach besonders für die hochauflösende Mikroskopie (PALM, STED etc.) geeignet. Außerdem sind die Absorption und Fluoreszenz im pH-Bereich von 2–11 pH-unabhängig.



Die Herausforderungen bei der Synthese sind zum einen die ähnlichen Reaktivitäten der acht Hydroxygruppen. Eine Differenzierung kann nur zwischen den primären und sekundären Hydroxygruppen durch die Verwendung von sterisch anspruchsvollen Reagenzien erfolgen. Zum anderen wird die glykosidische Bindung bei sauren Bedingungen leicht hydrolytisch gespalten.^[147] Bei basischen Bedingungen ist die Saccharose stabil. Weiterhin ist Saccharose in den meisten organischen Lösungsmitteln nur sehr schlecht löslich. Mögliche Lösungsmittel, die für Reaktionen verwendet werden können, sind polare Lösungsmittel wie DMSO, DMF oder Pyridin, die sich aber schwerer aus dem Reaktionsgemisch entfernen lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Saccharose selektiv an der C4-Position mit dem ATTO-647N Farbstoff modifiziert werden (Abbildung 3.3). Die Synthese wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

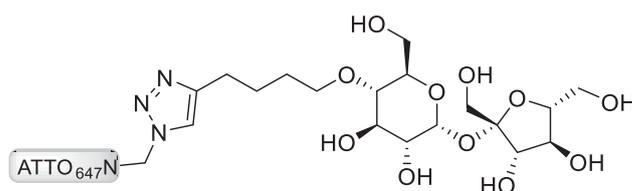


Abbildung 3.3 Strukturformel der in dieser Arbeit entwickelten modifizierten Saccharose.

3.4 Synthese

Für die Synthese der modifizierten Saccharose wurde die kommerziell erhältliche enantiomerenreine D(+)- Saccharose (**72**) verwendet. Über die vorhandenen Diol-Gruppen im Molekül ist es möglich diese durch die Bildung eines Acetals gleichzeitig zu schützen. Die reaktivsten Positionen sind dabei die Hydroxygruppen am C4 und C6 Atom der Glucose.^[147] Für die Acetylierung wurde die Saccharose (**72**) in einer inerten Atmosphäre in trockenem DMF suspendiert.^[148,149] Aufgrund der schlechten Löslichkeit von **72** wurde die Suspension zunächst auf 80 °C erhitzt bis eine klare Lösung entstanden ist. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurde anschließend 2,2-Dimethoxypropan (DMP) und eine katalytische Menge *p*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) zugegeben (Schema 3.2). Nach der Umsetzung wurde das Gemisch säulenchromatographisch aufgereinigt und das an der Position C4 und



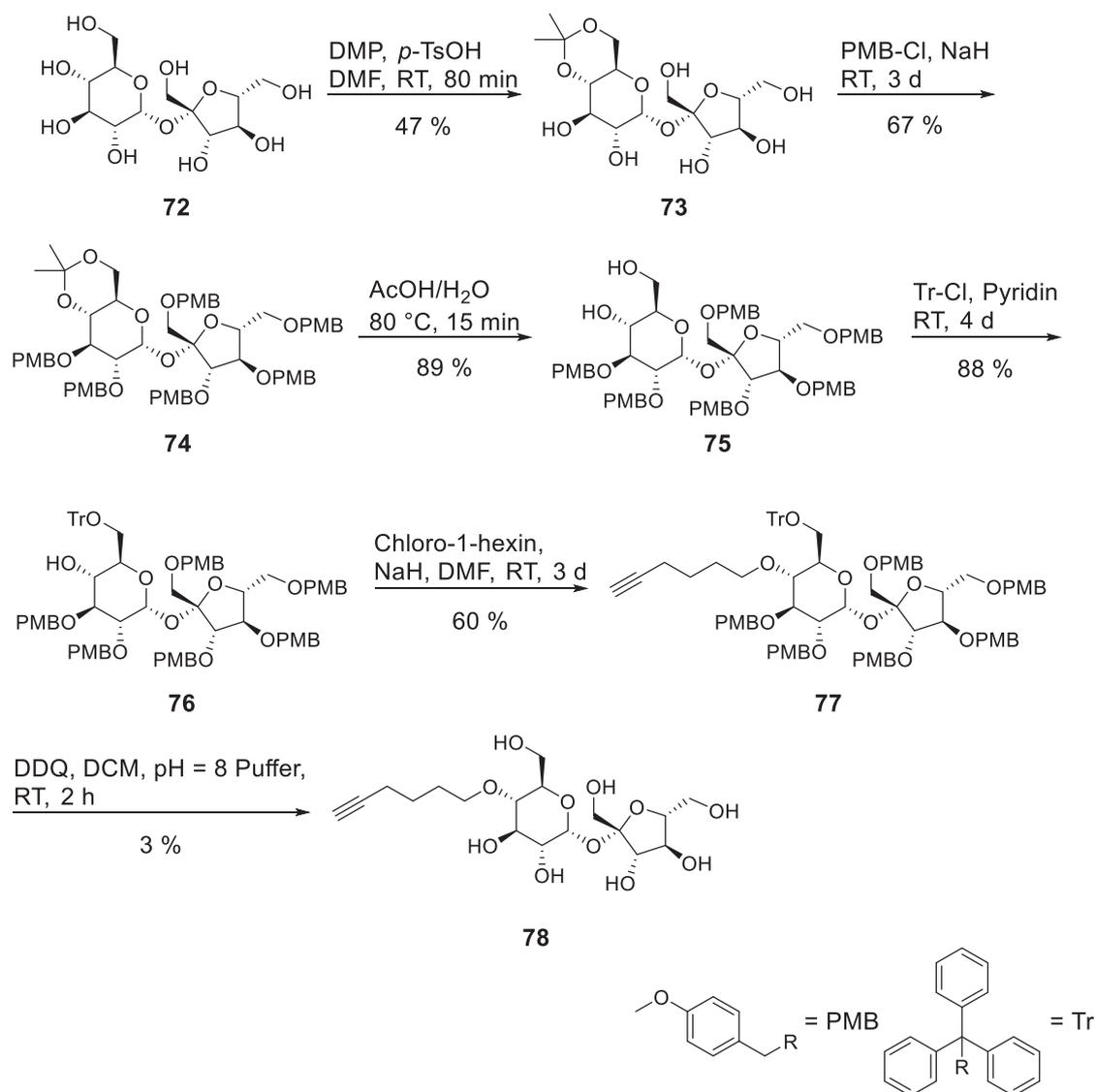
C6 selektiv acetylierte Produkt **73** mit einer Ausbeute von 47 % erhalten. Bei dieser Reaktion muss beachtet werden, dass die säulenchromatographische Reinigung zur Maximierung der Ausbeute direkt nach der Beendigung der Reaktion erfolgen muss.

Der zweite Schritt ist die Schützung der restlichen Hydroxygruppen. Die gewählte Schutzgruppe darf dabei weder basen- noch säurelabil sein, da bei der Verwendung einer Säure die glykosidische Bindung gespalten werden würde und eine Base für die Deprotonierung und Modifizierung der Hydroxygruppen notwendig ist. Eine Schutzgruppe die reduktiv, wie z. B. durch eine katalytische Hydrierung, entfernt wird, kann ebenfalls aufgrund der vorgesehenen Modifikation mit einem Alkin-Linker, nicht verwendet werden. Aus diesen Gründen wurde *p*-Methoxybenzyl (PMB) als Schutzgruppe gewählt. Diese lässt sich unter oxidativen Bedingungen mit DDQ in DCM leicht abspalten. Für die PMB-Schützung wurde die acetylierte Verbindung **73** in DMF gelöst und mit Natriumhydrid und *p*-Methoxybenzylchlorid (PMB-Cl) zu der vollgeschützten Saccharose **74** umgesetzt (Schema 3.2).

Im nächsten Schritt wurde die Acetalschutzgruppe wieder entfernt. Dazu wurde Verbindung **74** in einer wässrigen 60%igen Essigsäurelösung suspendiert und für 15 min bei 80 °C gerührt.^[150] Die Verwendung von verdünnter Essigsäure ist aufgrund der schwachen Acidität ohne die Spaltung der glykosidischen Bindung möglich. Die am C4 und C6-Atom entschützte Verbindung **75** konnte mit einer guten Ausbeute von 89 % erhalten werden.

Anschließend wurde die primäre Hydroxygruppe am C6-Atom selektiv geschützt. Um dies zu erreichen, muss eine sterisch anspruchsvolle Gruppe verwendet werden. Geeignete Schutzgruppen wären z. B. die *tert*-Butyldimethylsilyl (TBS) und die Triisopropylsilyl-(TIPS)-Schutzgruppe. Diese können nicht nur durch saure Bedingungen, sondern auch mit Fluoriden wie Tetrabutylammoniumfluorid gespalten werden. Beide Schutzgruppen wurden getestet und selektiv an die primäre Hydroxygruppe in Gegenwart von Imidazol in DMF angebracht. Allerdings stellte sich heraus, dass die Silylgruppen bei der nächsten Reaktion, vermutlich aufgrund der starken Basizität von Natriumhydrid, nicht stabil waren. Schließlich wurde die sterisch anspruchsvolle Triphenylmethylgruppe (Tritylgruppe) für die selektive Schützung der primären OH-Gruppe verwendet. Diese ist auch bei starken basischen

Bedingungen stabil und kann durch schwache Säure, z. B. Essigsäure, wieder entfernt werden. Für die Reaktion wurde Verbindung **75** und Tritylchlorid (Tr-Cl) unter Schutzgas in Pyridin gelöst und für 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung konnte die Zwischenstufe **76** mit einer guten Ausbeute von 88 % erhalten werden.



Schema 3.2 Syntheschema für die Darstellung der mit einem Alkin-Linker modifizierten Saccharose **78**. Die Verbindung konnte nach insgesamt 6 Stufen erhalten werden. Die Abkürzungen stehen für die Schutzgruppen *p*-Methoxybenzyl-(PMB) und die Triphenylmethyl-(Tr)-Gruppe.



Im nächsten Schritt erfolgte die Verknüpfung der ungeschützten OH-Gruppe an der C4-Position mit einem Alkin-Linker. Dazu wurde eine Lösung aus Verbindung **76** in DMF mit Natriumhydrid und Chloro-1-hexin zur Reaktion gebracht. Nach 3 Tagen wurde das gewünschte Produkt **77** mit einer Ausbeute von 60 % erhalten.

Als nächstes erfolgte die vollständige Entfernung der Schutzgruppen. Um die PMB-Schutzgruppen zu spalten, wurde DDQ verwendet. Dazu wurde Verbindung **77** in DCM und einem Volumenprozent Puffer (pH = 8) gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Produkt **78** konnte nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung mit einer sehr geringen Ausbeute von 3 % erhalten werden. Die geringe Ausbeute resultiert aus der Spaltung der glykosidischen Bindung zu den Nebenprodukten **79** und **80** (Abbildung 3.4), da DDQ in Anwesenheit von Wasser zu Blausäure zersetzt wird. Allerdings ist Wasser für die Abspaltung der PMB-Schutzgruppe notwendig. Um die glykosidische Spaltung zu verhindern, wurde der pH = 8 Puffer und DCM anstatt Wasser und DCM verwendet. Diese Strategie wurde ebenfalls in der Literatur bei der Anwesenheit von glykosidischen Bindungen oder säurelabilen Gruppen während der Verwendung von DDQ angewandt.^[151-153] Trotzdem wurde eine große Menge an Nebenprodukten erhalten. Ein Vorteil ist, dass aufgrund der sauren Bedingungen simultan die Entschützung der Trityl-Gruppe erfolgte und somit ein Reaktionsschritt wegfiel. Weiterhin wurde die Abspaltung der PMB-Gruppe mit Zirkoniumchlorid getestet. Diese Bedingungen wurden in der Literatur bei einem Kohlenhydrat-Derivat mit einer glykosidischen Bindung erfolgreich angewandt, um eine PMB-Schutzgruppe zu entfernen.^[154] Allerdings konnte mit dieser Methode keine Zielverbindung erhalten werden. Da die Substanzmenge ausreichend für die Durchführung der nächsten Reaktion war, wurden weitere Versuche zur Optimierung der sehr geringen Ausbeute im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

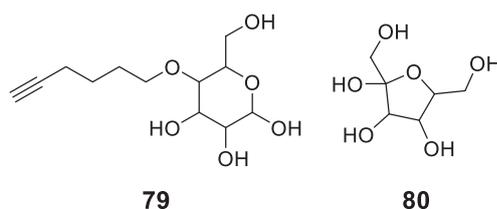
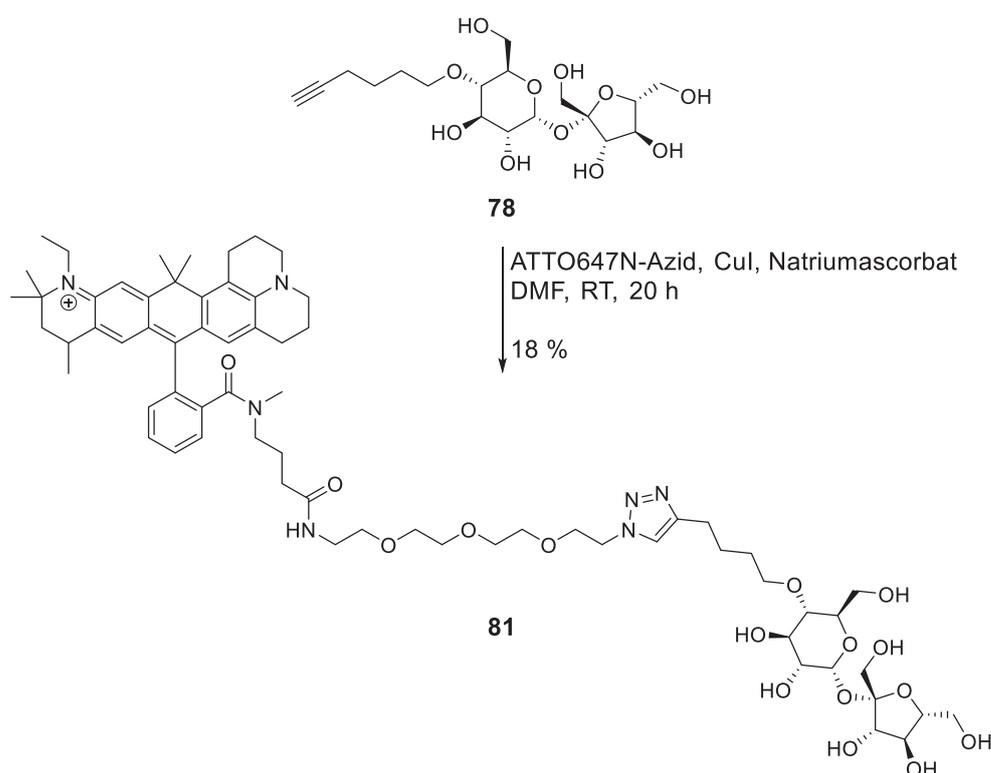


Abbildung 3.4 Durch Spaltung der glykosidischen Bindung entstehende Nebenprodukte bei der Entschützung der PMB-Gruppe mit DDQ.

Der letzte Schritt ist die Verknüpfung der modifizierten Saccharose **78** mit dem Farbstoff durch eine HUISGEN-Reaktion (Schema 3.3). Dazu wurde 5-*O*-1-Hexin-saccharose (**78**) und *ATTO647N*-Azid in trockenem DMF gelöst. Nach der Zugabe von Kupferiodid und Natriumascorbat wurde die Lösung unter Lichtausschluss für 20 Stunden bei Raumtemperatur in einem Mikroreaktionsgefäß maschinell geschüttelt. Das gewünschte Produkt **81** konnte nach einer Isolierung durch RP-HPLC mit einer Ausbeute von 18 % erhalten werden.



Schema 3.3 Verknüpfung der modifizierten Saccharose **78** mit dem Farbstoff *ATTO647N* durch eine HUISGEN-Reaktion zur Fluorophor-markierten Saccharose **81**.



3.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde die erfolgreiche Synthese von einer neuentwickelten Fluorophor-markierten Saccharose beschrieben. Die Anbringung des Farbstoffes erfolgte dabei selektiv an die Hydroxygruppe am C4-Atom der Glucose-Einheit. Das gewünschte Produkt konnte nach insgesamt sieben Stufen erhalten werden. Als Farbstoff wurde *ATTO647N* von *ATTO-Tec* verwendet.

Die Fluorophor-markierte Saccharose wurde im Rahmen einer Kooperation der Arbeitsgruppe S. RIZZOLI übergeben. Damit wurde zum ersten Mal die Möglichkeit eröffnet die Lebensdauer eines synaptischen Vesikels mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden zu untersuchen.





4 SNARE-Protein-Analoga mit modifizierten PNA-Erkennungseinheiten

Bei diesem Projekt handelt es sich um eine interne Kooperation mit S. GUHA und P. KUMAR. Der Fokus wird in diesem Kapitel nur auf die von mir durchgeführten Synthesen gelegt. Die Ergebnisse der von S. GUHA und P. KUMAR durchgeführten Fusionsexperimente werden in der Schlussfolgerung kurz zusammengefasst.

Teile dieses Projekts sind Bestandteile folgender Veröffentlichung:

S. Guha, J. Graf, B. Görlicke, U. Diederichsen

Nucleobase caged peptide nucleic acids: PNA/PNA duplex destabilization and light triggered PNA/PNA recognition

J. Pept. Sci., **2013**, 19, 415–422.

4.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Fusion zwischen zwei Membranen ist ein fundamentaler Prozess in der Natur. Sie spielt bei vielen physiologischen Prozessen wie der Exo- und Endocytose, Befruchtung einer Eizelle, Karzinogenese oder den Eintritt von Viren in eine Zelle, eine wichtige Rolle.^[155,156] Der natürliche Abstand zwischen biologischen Membranen beträgt ungefähr 10 bis 20 nm aufgrund von elektrostatischen Abstoßungen und sterischen Wechselwirkungen zwischen membrangebundenen Proteinen und anderen Makromolekülen.^[157]

An der Membranfusion ist eine in der eukaryotischen Evolution hoch konservierte Proteinfamilie beteiligt. Die sogenannten SNARE-Proteine (engl.: *soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor*-Proteine) sind an gegenüberliegenden Membranen lokalisiert und leiten die Membranfusion unter Bildung eines stabilen Vier-Helix-Bündels (auch SNARE- oder *Core*-Komplex genannt) ein.^[158,159] Durch die Bildung des SNARE-Komplexes wird die Energiebarriere überwunden und die Membranen werden in eine räumliche Nähe von 2 bis 3 nm gebracht.



Trotz intensiver Forschung im Bereich der SNARE-initiierten Membranfusion sind noch viele Details bezüglich des genauen Mechanismus unbekannt. Ziel dieses Projektes ist, SNARE-Protein-Analoga mit einer artifiziellen SNARE-Erkennungseinheit zu synthetisieren, um den Mechanismus der Membranfusion *in vitro* zu untersuchen. Als SNARE-Erkennungseinheit wurden Peptidnukleinsäuren (PNA) verwendet, die stabile und definierte Doppelstränge aufgrund der WATSON-CRICK-Basenpaarung^[160] ausbilden. Die PNA-Erkennungseinheit wurde mit photolabilen Schutzgruppen modifiziert, um die WATSON-CRICK-Basenpaarung temporär zu inhibieren, so dass keine Erkennung der SNARE-Motive und folglich keine Membranfusion entsteht. Durch die Einstrahlung von Licht mit einer bestimmten Wellenlänge wurde die photolabile Schutzgruppe abgespalten und die Membranfusion initiiert.

4.2 SNARE-Proteine – Vermittler der Membranfusion

Die Membranfusion, die Verschmelzung zwei einzelner Lipidmembranen, ist ein fundamentaler Prozess in eukaryotischen Zellen. Dieser Vorgang wird durch die SNARE-Proteine katalysiert. Die SNARE-Proteine ermöglichen die Annäherung der Membranen auf einen Abstand von wenigen Nanometern. Der allgemein anerkannte Mechanismus der Fusion zwischen zwei Membranen ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Durch die Nähe kommt es nach der *stalk*-Hypothese zu einer lokalen Störung der Doppelschichten, wodurch eine punkartige Ausbuchtung entsteht.^[157] Anschließend kommt es zur Bildung des *stalk*-Intermediats, bei dem die äußeren Lipidschichten miteinander verschmolzen sind (Hemifusion). Es wird angenommen, dass sich das Intermediat vergrößert und ein Hemifusionsdiaphragma gebildet wird, bei dem die Kompartimente nur durch die innere Lipidschicht getrennt sind. Im letzten Schritt bildet sich die Fusionspore, die sich bei der Verschmelzung der Lipidschichten vergrößert.^[157]

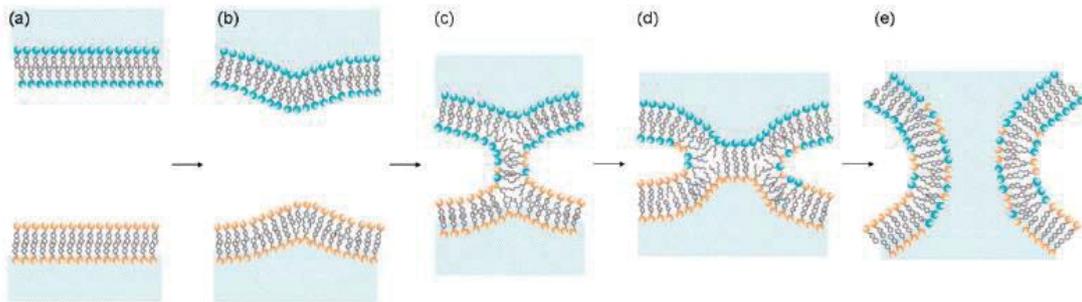


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der Membranfusion zwischen zwei Lipidmembranen. a) Annäherung der Membranen, b) eine punktartige Ausbuchtung minimiert die Energie der Hydratabstoßung zwischen den äußeren Lipidmembranen, c) Bildung des *stalk*-Intermediats, d) Vergrößerung des *stalk*-Intermediats zum Hemifusionsdiaphragma, e) Bildung der Fusionspore.^[155,157]

4.2.1 Struktur des SNARE-Komplexes

Bei den SNARE-Proteinen handelt es sich um kleine (12–35 kDa), membrangebundene Proteine. Sie besitzen eine einfache Domänenstruktur mit dem hochkonservierten, charakteristischen SNARE-Motiv aus 60 bis 70 Aminosäuren.^[161] Am C-Terminus befindet sich die Transmembrandomäne (TMD), die durch eine Linkerregion an das SNARE-Motiv gebunden ist und eine Verankerung in der Membran ermöglicht. Am besten erforscht sind die SNARE-Proteine, die an der Exocytose synaptischer Vesikel in Neuronen beteiligt sind (siehe Abschnitt 3.2).^[162] Dabei handelt es sich um das Vesikelprotein Synaptobrevin-2 (oder VAMP, engl.: *vesicle associated membrane protein*) und die plasmamembranständigen Proteine Syntaxin-1A und SNAP-25 (engl.: *synaptosomal associated protein of 25 kDa*).^[163] Synaptobrevin-2 und Syntaxin-1A besitzen jeweils eine TM-Domäne mit einem SNARE-Motiv, während SNAP-25 durch Palmitoylierung von Cysteinseitenketten in der Membran verankert ist und zwei SNARE-Motive enthält.^[164] Die vier SNARE-Motive bilden bei einer Vereinigung unter starken Konformationsänderungen und Energiefreigabe einen sehr stabilen Komplex, der als SNARE- oder *Core*-Komplex bezeichnet wird.^[165] Dabei handelt es sich um eine langgestreckte *coiled-coil*-Struktur, in der die vier α -Helices der SNARE-Motive parallel angeordnet sind (Abbildung 4.2).^[166] Eine anerkannte Theorie ist, dass die Bildung des SNARE-Komplexes reißverschlussartig (engl.: *Zippering*) vom N- zum C-Terminus der SNARE-Motive verläuft.^[161] Durch dieses *Zippering* werden die

gegenüberliegenden Vesikel- und Plasmamembran in einen Abstand weniger Nanometer gezogen, wodurch die Fusion initiiert wird. Der Mechanismus der SNARE-vermittelten Membranfusion wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

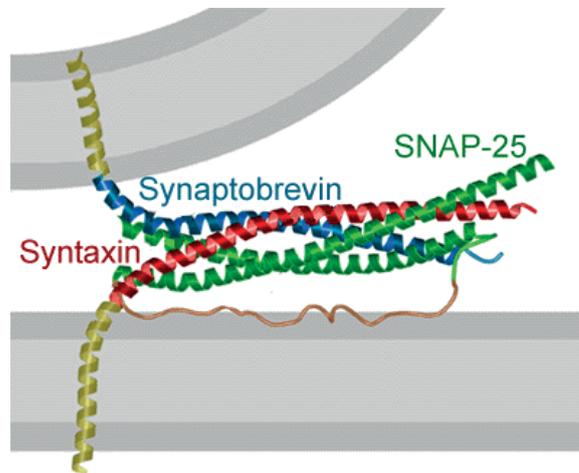


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung des SNARE-Komplexes aus den Proteinen Syntaxin (rot), Synaptobrevin (blau) und SNAP-25 (grün).^[165]

4.2.2 Mechanismus der Membranfusion

Die SNARE-Proteine arbeiten im Prinzip nach einem einfachen Mechanismus.^[138] Sie sind an den gegenüberliegenden Membranen lokalisiert und bilden einen Komplex, in dem sich die vier Helices wie in ein Reißverschluss von *N*- zum *C*-Terminus zusammenfügen und die Membranen auf diese Weise in räumliche Nähe bringen.^[141] Allerdings ist der gesamte Prozess wesentlich komplizierter, da noch eine Reihe weiterer Proteine an der SNARE-vermittelten Fusion beteiligt sind. Abbildung 4.3 A zeigt die wesentlichen an der Fusion beteiligten Proteine. Dazu gehören, neben den SNARE-Proteinen, Complexine und die Calcium-Sensoren Synaptotagmine mit den typischen C2-Bindungsdomänen. Der Zyklus beinhaltet im ersten Schritt die Bildung des *trans*-SNARE-Komplexes aus den Proteinen Syntaxin-1A, Synaptobrevin-2 und SNAP-25 (Abbildung 4.3 B). Bei der Bildung und Stabilisierung des Komplexes spielt wahrscheinlich das Protein Munc-18, welches an das Syntaxin-1 gebunden ist, eine wichtige Rolle.^[167-169] Im zweiten Schritt (*Priming I*) bindet Complexin mit einer hohen Affinität an den gebildeten *trans*-Komplex. Es wird angenommen, dass Complexin



den Komplex aktiviert und dass es ein Cofaktor für das Synaptotagmin darstellt.^[139] Synaptotagmine sind an der Vesikelmembran gebundene Proteine mit zwei Ca^{2+} -bindenden C2-Domänen.^[25,170–172] Durch die Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen an die C2-Domänen und Konformationsänderung der SNARE-Proteine wird die Öffnung der Fusionspore ausgelöst.^[25,26] Bei der Fusion geht der *trans*-Komplex in den *cis*-Komplex über, bei dem die beteiligten Proteine in einer Membran verankert sind. Dabei finden eine Ausdehnung der Fusionspore und die Bindung von NSF und SNAPs statt. NSF und SNAPs stellen die erforderliche metabolische Energie durch die ATP-Hydrolyse für die Dissoziation des *cis*-Komplexes zur Verfügung, was die Wiederverwendung der SNARE-Proteine für eine neue Fusion ermöglicht.^[138]

Die SNARE-Proteine stellen unumstritten die Hauptkomponenten der Membranfusion dar. Dabei sind allerdings noch viele Aspekte des Mechanismus unklar. Eine Möglichkeit, um solche biochemischen Prozesse zu untersuchen, besteht in dem Einsatz von photolabilen Schutzgruppen. Im Idealfall wird die Aktivität der Biomoleküle vollständig blockiert und nach dem Abspalten der photolabilen Gruppen durch die Einstrahlung von Licht wieder komplett hergestellt.

4 SNARE-Protein-Analoga mit modifizierten PNA-Erkennungseinheiten

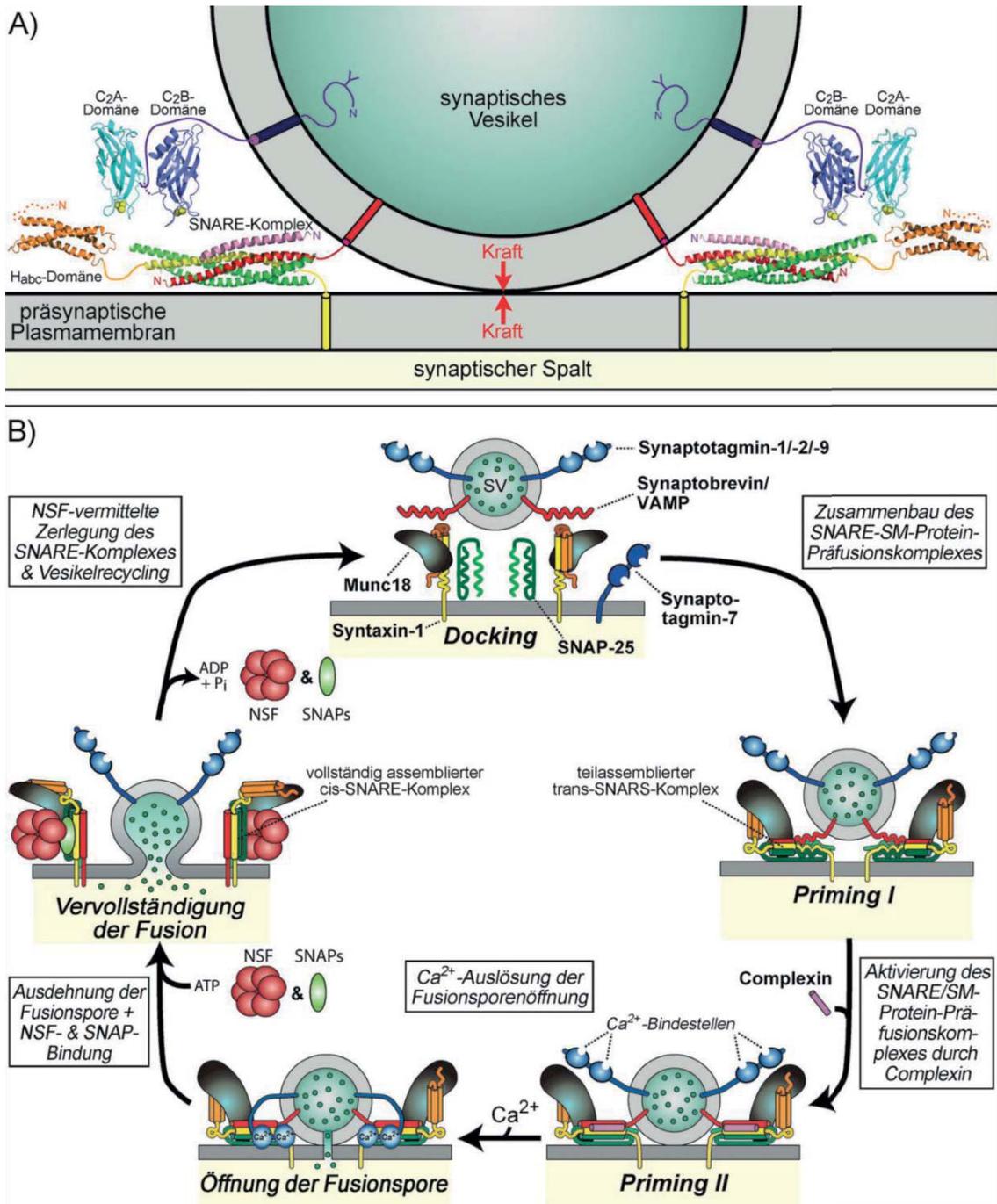


Abbildung 4.3 A) An der Membranfusion beteiligte Proteine: Syntaxin-1A (gelb), Synaptobrevin-2 (rot), SNAP-25 (grün), Complexin (violett) und Synaptotagmin (blau) mit den Ca²⁺-bindenden C2-Domänen. B) Mechanismus der SNARE-vermittelten Membranfusion zwischen Vesikeln und der Plasmamembran.^[138]



4.3 Photolabile Schutzgruppen

Photolabile Schutzgruppen werden nicht nur in der organischen Synthesechemie als Schutzgruppen sondern auch in der Biochemie zur Untersuchung diverser biologischer Prozesse verwendet.^[173–176] Durch die Modifikation einer biologisch aktiven Verbindung durch eine photolabile Gruppe wird die biologische Wirksamkeit im Idealfall vollständig deaktiviert. Nach der Bestrahlung von Licht wird die photolabile Gruppe abgespalten und die Aktivität oder Funktion des Biomoleküls wiederhergestellt.^[177]

Die am meisten verwendeten photolabilen Gruppen sind die *o*-Nitrobenzylgruppe (NB-Gruppe) und deren zahlreichen Derivate (Abbildung 4.4).^[178] Seit der Entdeckung der Photoreaktion im Jahr 1901^[179] wurden diese vielfach als orthogonale Schutzgruppe in der organischen Synthesechemie und als photolabiler Linker in der Festphasensynthese eingesetzt.^[180] Ein großer Nachteil der NB-Gruppe ist, dass bei der Photolyse ein reaktives Nitrosoaldehyd entsteht, welches in einer biologischen Umgebung schädlich ist.

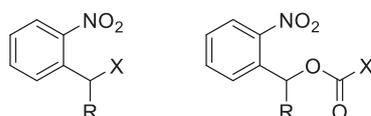
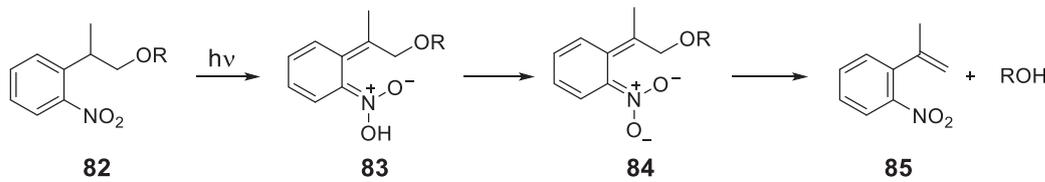


Abbildung 4.4 Derivate der Nitrobenzylgruppe (R = H, Me; X = OR, OCOR, OPO₃R).^[178]

Von PFEIDERER *et al.* wurde die 2-(2-Nitrophenyl)propyl-Gruppe (NPP) vorgestellt.^[181–183] Diese hat den Vorteil nach der Photolyse eine weniger schädliche Nitrostyrol-Spezies zu bilden.^[184] Der Mechanismus der Photolyse ist in Schema 4.1 dargestellt. Im ersten Schritt kommt es zur Bildung der *aci*-Nitroverbindung **83**. Anschließend findet eine β -Eliminierung über die deprotonierte Form der *aci*-Verbindung **84** zu der Nitrostyrol-Verbindung **85** statt.^[184] Die NPP-Gruppe wird oft für die Schützung von Biomolekülen z. B. Nukleotiden verwendet, da sie einerseits bei den basischen Bedingungen während der Festphasensynthese stabil ist und andererseits, wie schon erwähnt, für das biologische System weniger schädliche Verbindungen bildet.^[185]



Schema 4.1 Mechanismus der Photolyse von NPP.^[184]

4.4 Design der SNARE-Protein Analoga

Für die Untersuchung der SNARE-vermittelten Membranfusion *in vitro* wurden artifizielle SNARE-Protein-Analoga, die mit photolabilen Schutzgruppen funktionalisiert wurden, eingesetzt. Als SNARE-Protein-Analoga wurde ein Modellsystem gewählt, welches von A. LYGINA im Rahmen der Dissertation entwickelt wurde.^[186] Modellsysteme stellen eine Vereinfachung der komplexen Proteinmaschinerie dar und ermöglichen die Untersuchung der Vorgänge *in vitro*.^[187] Die SNARE-vermittelte Fusion konnte bislang erfolgreich durch Verwendung artifizieller Erkennungseinheiten wie z. B. *coiled-coil*-bildende Peptide^[188-190], komplementäre DNA-Stränge^[191,192] sowie Wasserstoffbrückenbindende Cyanursäure und Melamin^[193,194] vermittelt werden. Das für dieses Projekt gewählte Modellsystem beruht auf den nativen Transmembrandomänen der neuronalen SNARE-Proteine Syntaxin-1A und Synaptobrevin-2, die über Linker mit PNA-Strängen als artifizielle Erkennungseinheit verbunden sind (Abbildung 4.5). Die Erkennung basiert auf komplementären Basensequenzen der PNA, die eine WATSON-CRICK-Basenpaarung eingehen. In dem Modellsystem ist es möglich eine parallele und antiparallele Anordnung der Erkennungseinheit durch die Basensequenz einzustellen. Für dieses Projekt wurde die parallele Anordnung gewählt, da diese eine erhöhte Fusionsaktivität aufweist und auch im natürlichen SNARE-Komplex vorliegt.^[195]

PNA wurde erstmals im Jahr 1991 von NIELSEN *et al.* vorgestellt.^[196,197] Dabei handelt es sich um ein DNA-Analoga, bei dem das natürliche Desoxyribose-Phosphodiester-Rückgrat durch sich wiederholende *N*-Aminoethylglycin-Einheiten ersetzt wurde. PNA-Stränge formen bevorzugt antiparallele Duplexe mit DNA, RNA oder einem zweitem PNA-Strang.^[198] Durch das neutrale Peptidrückgrat der PNA gibt es im Gegensatz zu dem negativ geladenen DNA-Rückgrat keine elektrostatischen Abstoßungen. Weitere Vorteile sind die Stabilität der



PNA gegenüber Proteasen und Nukleasen und die leichte Zugänglichkeit der PNA und der entsprechenden Derivate durch die Festphasenpeptidsynthese.

Das Ziel ist, die Membranfusion zeitweise zu inhibieren. Dafür wurden die PNA-Stränge mit einer photolabilen Gruppe modifiziert. Als photolabile Gruppe wurde NPP gewählt, da diese nach der Photolyse keine schädlichen Nitrosoverbindung bildet und bei der Wellenlänge 365 nm effektiv abgespalten werden kann. Durch die NPP-Gruppe wird die Erkennung der PNA-Stränge blockiert und folglich die Fusion inhibiert.

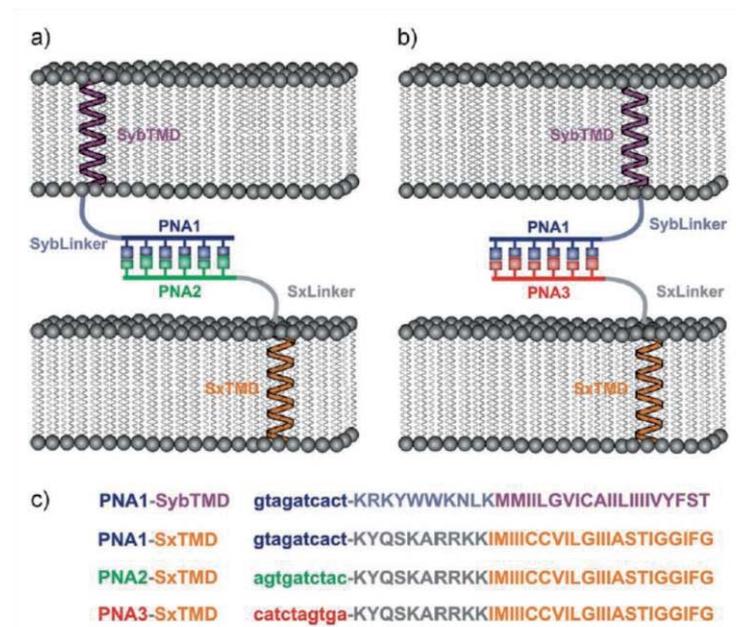
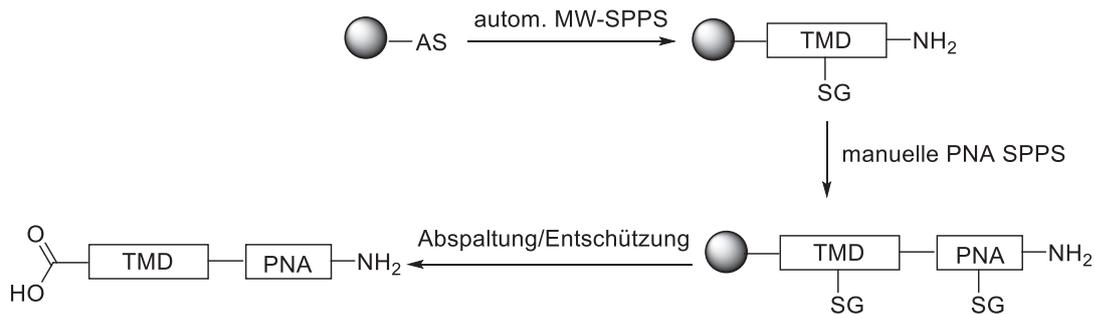


Abbildung 4.5 Vereinfachtes PNA/Peptid-System als SNARE-Protein-Analogon mit den nativen TMDs und Linkern von Synaptobrevin (Syb, violett) und Syntaxin (Sx, orange) und den artifiziellen PNA-Erkennungseinheiten. a) Antiparallele Orientierung der Oligomere (PNA1/PNA2), b) Parallele Orientierung (PNA1/PNA3), c) Peptidsequenzen.^[195]

Das primäre Ziel dieses Projektes ist die Synthese von modifizierten PNA und TMD-PNA-Hybriden als SNARE-Protein-Analoga. Die TMD-Einheiten bestehen aus α -Aminosäuren und können durch eine automatisierte, mikrowellenunterstützte Fmoc-Festphasenpeptidsynthese (autom. MW-SPPS) synthetisiert werden und anschließend durch manuelle Festphasenpeptidsynthese mit der modifizierten PNA verknüpft werden. Nach der Abspaltung der Schutzgruppen an den Seitenketten wird das TMD-PNA-Derivat erhalten (Schema 4.2).



Schema 4.2 Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese von TMD-PNA-Derivaten. AS = Aminosäure, SG = Schutzgruppe.

Für die Synthese der modifizierten PNA-Stränge wurden die Nucleobasen Cytosin und Adenin verwendet, die mit der NPP-Gruppe durch eine chemische Syntheseroute verknüpft wurden (Abbildung 4.6). Das NPP-modifizierte Cytosin **86** wurde im Rahmen der Masterarbeit synthetisiert.^[199] Der modifizierte Adenin-Baustein **87** wurde von S. GUHA zur Verfügung gestellt.

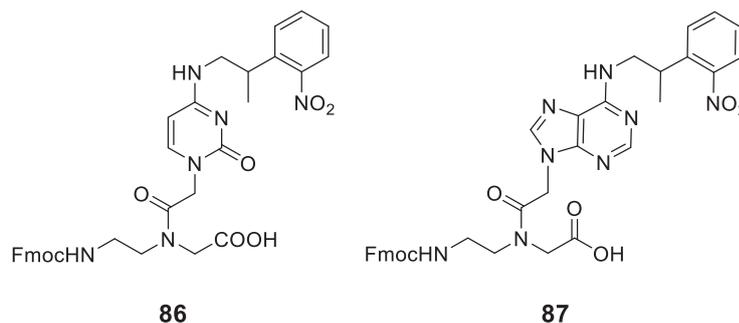
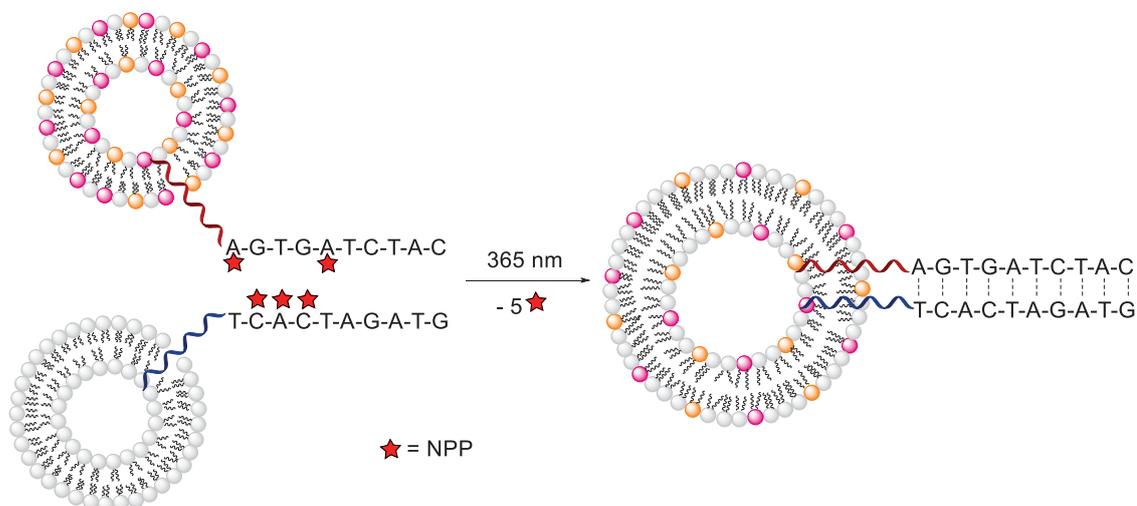


Abbildung 4.6 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete NPP-modifizierte PNA-Bausteine.

Die erhaltenen TMD-PNA-Hybride können anschließend in Vesikel eingebracht werden, um die Fusion *in vitro* durch verschiedene fluoreszenzbasierte Experimente zu untersuchen. Dadurch können neue Einblicke in den Mechanismus der Membranfusion gewonnen werden. Eine Möglichkeit ist die Untersuchung der *Zippering*-Theorie, nach der die Erkennung der SNARE-Motive vom *N*- zum *C*-Terminus verläuft. Wenn die Nucleobasen am *N*-Terminus mit der photolabilen Schutzgruppe modifiziert sind, würde es entsprechend der Theorie zu keiner Erkennung kommen und folglich keine Fusion stattfinden. Bei einer in der Nähe der Transmembrandomäne modifizierten Nucleobase, kann die Erkennung vom *N*-Terminus bis zur modifizierten Base erfolgen. Nach der Einstrahlung von Licht können die NPP-Gruppen



abgespalten und die vollständige Fusion zwischen den Vesikeln induziert werden (Schema 4.3).



Schema 4.3 Schematische Darstellung der mit den TMD/PNA-Derivaten modifizierten Vesikel. Durch die NPP-Gruppe wird die Erkennung der PNA-Stränge und folglich die Fusion der Vesikel inhibiert. Nach der Einstrahlung von Licht bei 365 nm werden die NPP-Gruppen abgespalten und die Fusion initiiert.

4.5 Synthese modifizierter PNA-Derivate

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Festphasenpeptidsynthese (SPPS, engl.: *solid phase peptide synthesis*) nach MERRIFIELD^[200] eingesetzt, um die modifizierten PNA-Derivate und TMD/PNA-Hybride aus den jeweiligen Nucleobasen nach dem Fmoc-Standardprotokoll aufzubauen. Ein großer Vorteil der SPPS ist, dass alle Kupplungsreagenzien, Reaktanden und Nebenprodukte während der Synthese durch Filtration entfernt werden, da die Peptidsequenz kovalent an einem Trägermaterial (Festphase) gebunden ist. Als Festphase wurde ein vorbelegtes Wang-Harz verwendet. Dabei handelt es sich um Polystyrolkugeln, die mit einem TFA-labilen *p*-Alkoxybenzylester-Linker modifiziert und mit der Fmoc-geschützten Aminosäure Glycin vorbelegt sind, so dass nach der Abspaltung eine Säurefunktion am C-Terminus erhalten wird (Abbildung 4.7). Für die Synthese der PNA-Oligomere wurde direkt das Wang-Harz verwendet. Für die TMD/PNA-Hybride erfolgte die Synthese der PNA-Stränge an den Transmembranpeptiden, die vorher durch automatische mikrowellenunterstützte Festphasenpeptidsynthese am Wang-Harz synthetisiert wurden. Die TMD-Peptide wurden von S. GUHA synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

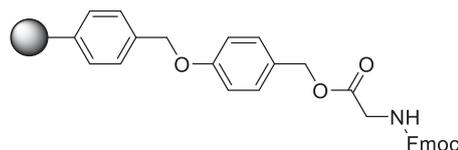


Abbildung 4.7 Struktur des Wang-Harzes für die SPPS mit einem photolabilen *p*-Alkoxybenzylester und Glycin-Rest.

Der Aufbau der PNA-Oligomere erfolgte manuell vom C- zum N-Terminus. Die *N*- α -Amino-gruppe und die funktionellen Gruppen der Seitenketten wurden mit orthogonalen Schutzgruppen geschützt, um Nebenreaktionen zu verhindern. Es wurde die Fmoc/Bhoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl/Benzhydryloxycarbonyl) Schutzgruppen-Strategie verwendet. Die *N*- α -Aminogruppe ist dabei durch die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe und die Nukleobasenseitenketten jeweils durch die säurelabile Bhoc-Gruppe geschützt. Für die Synthese wurden die kommerziell erhältlichen (Abbildung 4.8) und die mit der NPP-Gruppe modifizierten PNA-Bausteine **86** und **87** verwendet. Die Reaktionsbedingungen und die gewählten Reagenzien wurden aus der Arbeit von A. LYGINA übernommen.^[186] Die Fmoc-basierte PNA-Synthese beinhaltet verschiedene Schritte. Dazu gehören die Entschützung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe, die Aktivierung und Kupplung der jeweiligen Nukleobase sowie das *Capping* freier Aminogruppen. Die Schritte wurden in einem Zyklus solange wiederholt, bis die gewünschte Sequenz erreicht wurde. Als Lösungsmittel wurde für alle Reaktionsschritte *N*-Methyl-pyrrolidon (NMP) verwendet.

In Schema 4.4 ist der detaillierte Kupplungszyklus für die PNA-SPPS gezeigt. Im ersten Schritt wurde das Trägerharz vor der ersten Kupplung in NMP aufgequollen und die terminale Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in NMP entfernt. Nach dem Waschen des Harzes in NMP und DCM erfolgte die Aktivierung der Säuregruppe. Als Aktivierungsreagenzien wurden HOAt und HATU verwendet, da diese eine höhere Effizienz in Bezug auf die Ausbeute, schnellere Reaktionszeit und geringere Racemisierung zeigten, als die HOBt-Analoga.^[201] Bei der Verwendung von HOAt-basierenden Kupplungsreagenzien wird aus der Säuregruppe eine reaktive Acyluronium-Verbindung gebildet, die zu dem entsprechenden Aktivester transformiert wird.^[202] Als Basen wurden Lösungen von DIPEA (0.2 M) und Lutidin (0.3 M) in NMP verwendet. Als Konzentration wurde 0.25 M für die PNA-Bausteine und HOAt sowie



0.24 M für HATU benutzt. Nach der Kupplung erfolgte das sogenannte *Capping*. Dabei werden eventuell vorhandene freie, nicht reagierte Aminogruppen durch eine Acetylierung mittels einer Lösung aus Acetanhydrid (1 %) und Lutidin (2 %) in NMP desaktiviert, um Folgereaktionen in nächsten Zyklus zu vermeiden. Anschließend wurde die terminale Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin (20 %) in NMP entfernt und der Kupplungszyklus erneut begonnen. Nach dem Erreichen der gewünschten PNA-Sequenz erfolgte die Abspaltung der PNA-Derivate vom Harz. Dafür wurde eine Mischung aus TFA, *m*-Cresol und Triisopropylsilan (TIS) verwendet. Durch TFA erfolgten simultan die Entschützung der Seitenketten und die Abspaltung vom Harz. Anschließend wurde TFA mittels eines Stickstoffstroms entfernt und die PNA-Derivate aus eiskaltem Diethylether ausgefällt.

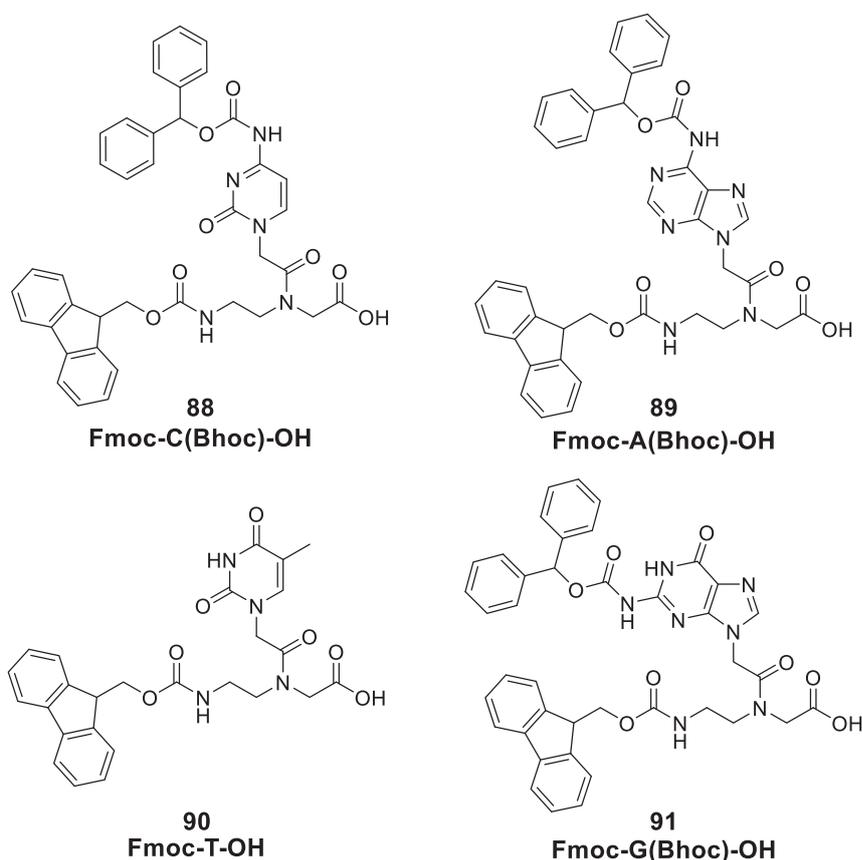
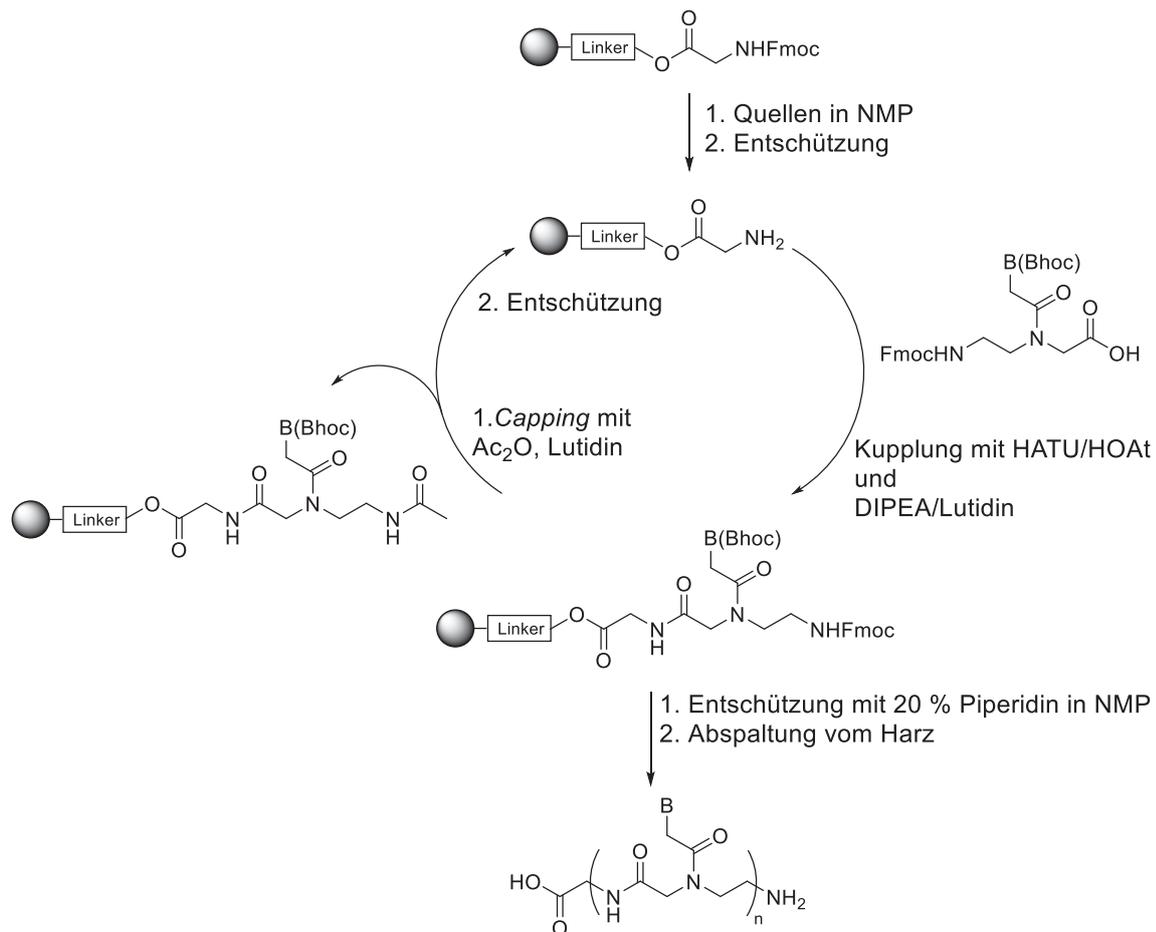


Abbildung 4.8 Verwendete kommerziell erhältliche PNA-Bausteine für die SPPS der PNA-Sequenzen.



Schema 4.4 Schematische Darstellung des Kupplungszyklus der PNA-SPPS.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt vier mit der NPP-Gruppe modifizierte PNA-Derivate und acht modifizierte TMD/PNA-Hybride erfolgreich synthetisiert werden (Abbildung 4.9). Mit den PNA-Derivaten wurden UV-Schmelzkurven aufgenommen, um die Blockierung durch die NPP-Gruppe zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Einbau von einer, zwei oder drei NPP-modifizierten Nucleobasen die Duplexstabilität um $\Delta T_m = 5^\circ\text{C}$, 7°C und 12°C verringerte.^[203] Durch die Modifikation beider PNA-Stränge mit insgesamt fünf modifizierten Nucleobasen konnte die Duplexbildung vollständig inhibiert werden.^[203] Somit ist die photolabile NPP-Gruppe gut geeignet, um die Erkennung der PNA-Stränge zu blockieren.

Die TMD/PNA-Derivate wurden von S. GUHA und P. KUMAR zur Untersuchung der Vesikelfusion mittels fluoreszenzspektroskopischer Methoden verwendet (siehe Abschnitt 4.6).

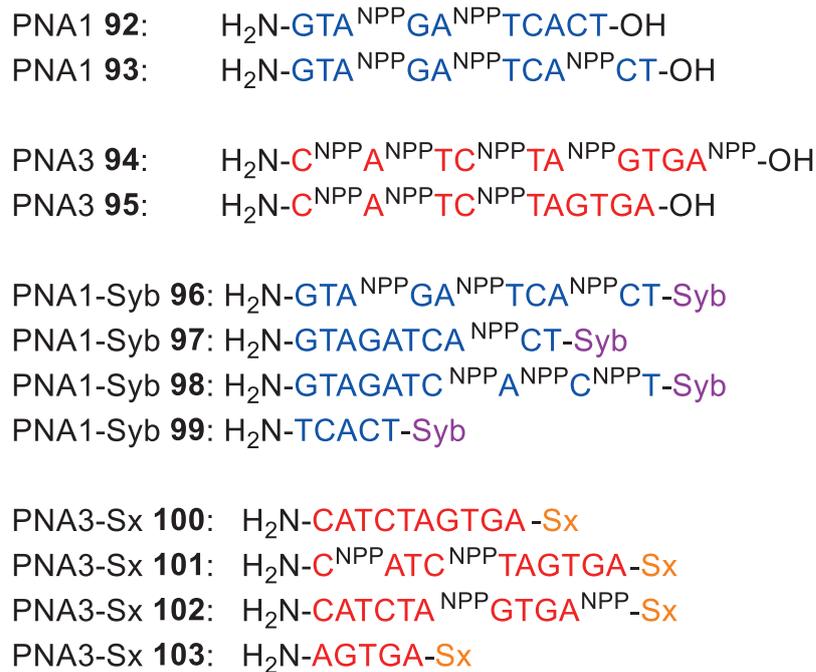


Abbildung 4.9 Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte mit NPP modifizierte PNA und PNA/TMD-Hybride.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde die Synthese von modifizierten PNA/Peptid-Derivaten als SNARE-Protein-Analoga vorgestellt. SNARE-Proteine sind maßgeblich an der Fusion von Membranen beteiligt. Die synthetisierten Analoga enthalten photolabile NPP-Schutzgruppen, welche die Erkennung zwischen den PNA-Oligomeren blockieren und folglich die Fusion inhibieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt acht PNA/TMD-Derivate, die an unterschiedlichen Positionen mit der photolabilen Gruppe modifiziert wurden, synthetisiert werden. Diese wurden in einer internen Kooperation von S. GUHA und P. KUMAR in Fusionsexperimenten verwendet, um die Fusion sowohl räumlich als auch zeitlich zu kontrollieren. Dazu wurden die neuen Hybride in Vesikel aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) und Cholesterol eingebaut. Ein Teil der Vesikel enthielt das Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Paar Nitrobenzoaxadiazol (NBD) und Lissamin Rhodamin, wodurch die Fusion mit unmarkierten Vesikeln aufgrund der Zunahme der NBD-Emission beobachtet werden konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass die Fusion mit zunehmender Anzahl der NPP-Gruppen abnahm. Durch die Kombination von Verbindung **96** und



101 mit insgesamt fünf NPP-Gruppen konnte die Fusion zwischen den Vesikeln sogar ganz inhibiert werden. Durch die Einstrahlung von Licht wurden die NPP-Gruppen innerhalb von 20 s abgespalten und die Fusion wiederhergestellt. Die Derivate **98** und **101** wurden für die Untersuchung der *Zippering*-Theorie verwendet, nach der die Bildung des SNARE-Komplexes vom *N*- zum *C*-Terminus erfolgt. Dabei wurde gezielt die *C*-terminale Hälfte der PNA-Stränge blockiert, um ein Zwei-Stufen-*Zippering* zu erreichen. Wie erwartet, war keine Fusion vor der Abspaltung der NPP-Gruppen messbar. Durch die Abspaltung der photolabilen Gruppen wurde die Erkennung in der *C*-terminalen Hälfte wiederhergestellt und die Fusion initiiert. Bei einer selektiven Markierung der *N*-terminalen Hälfte wurde dagegen eine geringe Fusionsaktivität beobachtet, was auf eine Duplexbildung in der *C*-terminalen Hälfte der PNA hindeutet. Um dies in zukünftigen Experimenten zu bestätigen, wurden die verkürzten unmodifizierten Derivate **99** und **103** synthetisiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fusion zwischen den Vesikeln effizient durch Verwendung von photolabilen Gruppen blockiert werden konnte. Nach der Einstrahlung von UV-Licht (365 nm) wurden die photolabilen Gruppen abgespalten und die Fusion vollständig wiederhergestellt. Die synthetisierten PNA/TMD-Derivate ermöglichen somit neue Möglichkeiten zur Untersuchung der SNARE-vermittelten Membranfusion.



5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Methoden

Reagenzien

Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden von den Firmen *Eurogentec*, *ATTO-TEC*, *Fisher Scientific* und *Invitrogen* bezogen. Die Polyethylenglycol (PEG)-Konjugate stammten von *Iris Biotech*. Die PNA-Bausteine wurden von *ASM Research Chemicals* und *Panagene* erworben. Die restlichen Chemikalien stammten von *Alfa Aesar*, *Fisher Scientific*, *Chem Pur*, *Sigma Aldrich*, *ABCR*, *Bachem*, *VWR International*, *Merck* und *Carl Roth*.

Lösungsmittel

Technische Lösungsmittel für die Flash-Säulenchromatographie wurden vor der Verwendung durch Destillation aufgereinigt. Für Reaktionen unter nicht trockenen Bedingungen wurden Lösungsmittel mit der Qualität p.a. (*pro analysi*) von *VWR*, *Sigma Aldrich* und *Fisher Scientific* benutzt. Trockene Lösungsmittel stammten von *Acros Organics* sowie *Sigma Aldrich* und wurden über Molekularsieb und unter Argonatmosphäre gelagert. Für die HPLC wurden Lösungsmittel mit der Qualität „HPLC grade“ von *Sigma Aldrich* und *Fisher Scientific* sowie Reinstwasser (bidestilliertes Wasser), erhalten durch die Aufbereitungsanlage *Simplicity* von *Millipore*, verwendet.

Reaktionen

Sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden unter einer inerten Schutzgasatmosphäre (Argon oder Stickstoff) durchgeführt. Die verwendeten Glasgeräte wurden ausgeheizt, im Vakuum abgekühlt und mehrmals mit Inertgas gespült. Die Zugabe der Reagenzien erfolgte unter Schutzgasgegenstrom. Lichtempfindliche Reaktionen wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Für Palladium-katalysierte Reaktionen wurden die Lösungsmittel vor der Reaktion durch Einleiten von Argon entgast.



Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Verfolgung des Reaktionsumsatzes und zur Ermittlung der R_f -Werte wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten (Schichtdicke 0.25 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch UV-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 254 und 366 nm. UV-inaktive Substanzen wurden durch Anfärben mit Kaliumpermanganat-Lsg. (2.0 g Kaliumpermanganat, 3.3 ml 5%ige Natronlauge, 200 ml H₂O), Ninhydrin-Lsg. (0.5 g Ninhydrin, 1.5 ml Essigsäure, 250 ml Ethanol) oder Schwefelsäure-Lsg. (20 ml Schwefelsäure in 80 ml Ethanol) sichtbar gemacht.

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (Korngröße 40–63 µm) von *Merck* verwendet. Das Kieselgel wurde im entsprechenden Laufmittelgemisch aufgeschwemmt und in die Säule gefüllt. Das Substanzgemisch wurde entweder als konzentrierte Lösung im Laufmittel oder auf Kieselgel adsorbiert auf die Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einem Überdruck von 0.2–1.0 bar. Die Detektion der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*)

Analytische und semipräparative HPLC wurde an einem Gerät der Firma *Jasco*, ausgestattet mit einem MD-2010 Plus Multiwellendetektor, einer LC-NetII/ADC Schnittstelle, einem DG-2080-53 Entgaser und zwei PU-2080 Plus Pumpen, durchgeführt. Für analytische Läufe wurde die Säule von *Macherey-Nagel* Nucleodur (RP-C18, 250×4.6 mm, 5 µm) und für semipräparative die Säule *Macherey-Nagel* Nucleodur (RP-C18, 250×10.0 mm, 5 µm) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte mit einem linearen Gradienten von A (bidestilliertes Wasser + 1 % TFA) nach B (Acetonitril + 1 % TFA) in 30 min. Die Flussrate lag bei analytischen Läufen bei 1 ml/min und bei semipräparativen bei 3 ml/min. Die Detektion erfolgte für die PNA-Hybride bei einer Wellenlänge von 215 nm, 254 nm und 280 nm. Bei Fluorophoren und Fluorophor-markierten Molekülen erfolgte die Detektion bei 215 nm, 280 nm und beim jeweiligen Absorptionsmaximum des Fluorophors (488 nm für **12** und **13**, 550 nm für **14**, 580 nm für **15**, 647 nm für **62** und **63**).



Lyophilisation

Wässrige Lösungen mit geringen Anteilen an Acetonitril wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und an einem *Christ-Alpha-2-4* Lyophilisator mit angeschlossener Hochvakuumpumpe gefriergetrocknet.

Drehwert

Die optische Aktivität wurde an einem Polarimeter der Firma *Perkin-Elmer* bei der Wellenlänge 589 nm (Natrium-D-Linie) bei 20 °C in Methanol gemessen. Der spezifische Drehwert berechnet sich nach folgender Formel:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}$$

Dabei ist α der gemessene Drehwert, c die Konzentration in mg/ml und l die Küvettenlänge in dm.

5.2 Spektroskopische Methoden

5.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmessungen wurden an einem *Jasco FP-6200* Spektrofluorometer mit einem angeschlossenen *Jasco ETC-272T* Temperaturregler durchgeführt. Die Calcium-abhängigen Messungen wurden bei 20 °C unter Verwendung eines *Calcium Calibration Buffer Kits* von *Invitrogen* aufgenommen. Dieser bestand aus einem *Zero Free Calcium Puffer A* (10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH 7.2) und einem *39 μM Free Calcium Puffer B* (10 mM CaEGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH 7.2). Durch Kombination der beiden Puffer können freie Ca^{2+} -Konzentrationen von 0 bis 39 μM erreicht werden. Es wurden pro Calcium-Indikator mehrere Ca^{2+} -konzentrationsabhängige Fluoreszenzkurven bei konstanter Temperatur, pH-Wert und Indikatorkonzentration aufgenommen. Die Parameter für alle Fluoreszenzmessungen sind in Tabelle 5.1 aufgelistet. Es wurden folgende Schritte, angelehnt an das Protokoll von *Invitrogen*, durchgeführt:

1. Herstellung einer Stammlösung des Calcium-Sensors (Salz-Form) in bidestilliertem Wasser mit einer Konzentration zwischen 0.2–1 mM.



2. Ein geringer Teil der Stammlösung wurde in 2 ml Puffer **A** gelöst, um eine Sensor-Konzentration von 2 μM zu erreichen (Lösung **C**).
3. Ein weiterer Teil der Stammlösung wurde in 6 ml Puffer **B** gelöst, sodass die Sensor-Konzentration ebenfalls 2 μM betrug (Lösung **D**).
4. Das Fluoreszenzspektrum in Abwesenheit von Ca^{2+} wurde unter Verwendung von 1.3 ml der Lösung **C** aufgenommen.
5. Die Fluoreszenzintensität wurde bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen (0.017–39 μM) gemessen. Dazu wurde die Lösung aus der vorherigen Messung durch ein bestimmtes Volumen der Lösung **D** ersetzt (siehe Tabelle 5.2). Dabei blieb die Konzentration des Sensors und von EGTA konstant.

Tabelle 5.1 Verwendete Parameter für die Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzmessungen.

| Calcium-Sensor | λ_{Ex} | Aufnahme | Measurement Mode |
|------------------|-----------------------|------------|------------------|
| 12 und 13 | 488 nm | 500–600 nm | Emission |
| 14 | 540 nm | 550–650 nm | Emission |
| 15 | 550 nm | 560–700 nm | Emission |

Tabelle 5.2 Verdünnungsreihe für die Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzmessungen.

| [CaEGTA] | [Ca^{2+}] | Ersetztes Volumen bei 1.3 ml Probe |
|----------|----------------------|------------------------------------|
| 0 mM | 0 μM | Lösung C |
| 1.0 mM | 0.017 μM | 130 μl |
| 2.0 mM | 0.038 μM | 144 μl |
| 3.0 mM | 0.065 μM | 163 μl |
| 4.0 mM | 0.100 μM | 186 μl |
| 5.0 mM | 0.150 μM | 217 μl |
| 6.0 mM | 0.225 μM | 260 μl |
| 7.0 mM | 0.351 μM | 325 μl |
| 8.0 mM | 0.602 μM | 433 μl |
| 9.0 mM | 1.35 μM | 650 μl |
| 9.3 mM | 2.00 μM | 390 μl |
| 9.5 mM | 2.86 μM | 371 μl |
| 10 mM | 39 μM | Lösung D |



Mg²⁺ und Zn²⁺-abhängige Fluoreszenzmessungen

Es wurden die Salze ZnCl₂, MgCl₂×6H₂O und CaCl₂×2H₂O verwendet. Die Salze wurden in einem EGTA-freien Puffer (100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH 7.2) gelöst und zu einer Lösung aus 5 μM Calcium-Sensor in Puffer (100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH 7.2) gegeben. Die Konzentration der divalenten Kationen in der Lösung betrug jeweils 50 μM bzw. 1 mM. Die Sensor-Konzentration wurde bei allen Messungen konstant gehalten.

5.2.2 UV/vis-Spektroskopie

Die Absorptionsspektren wurden an einem V-650 UV/vis-Spektrometer der Firma JASCO aufgenommen. Die Absorptionsspektren der Calcium-Sensoren wurden in einem Ca²⁺-freien Puffer (10 mM EGTA, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, pH 7.2) bei 20 °C gemessen. Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Calcium-Sensoren **13** und **15** erfolgte durch die Aufnahme der Extinktion bei den Maxima (493 nm für **13** und 549 nm für **15**) bei verschiedenen Calcium-Sensor-Konzentrationen (1, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 μM). Die Extinktionskoeffizienten ε wurden durch eine Auftragung nach dem LAMBERT-BEER-Gesetz bestimmt:

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot d}$$

Dabei ist c die Konzentration in mol/L, A die Absorption bei 493 bzw. 549 nm und d der Durchmesser der benutzen Küvette in cm.

Die Konzentration von Fluorophor-markierten Molekülen wurde am Nanodrop 2000c UV/vis-Spektrometer mit Hilfe des LAMBERT-BEER-Gesetzes bestimmt.

Temperaturabhängige UV/vis-Spektroskopie

Schmelzkurven der PNA-Oligomere wurden mit einem JASCO V-550 UV/vis-Spektrometer und einem angeschlossenen JASCO ETC-505T Peltier Temperaturkontrollgerät aufgenommen. Die Konzentration der PNA-Oligomere betrug jeweils 4 μM in einem HEPES-Puffer (20 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Die Messungen erfolgten bei 260 nm mit einer Heizungsrate von 0.4 °C/min. Die Lösungen wurden in zwei Zyklen auf 80 °C aufgeheizt und anschließend wieder auf 0 °C gekühlt. Die Hyperchromizität H wurde nach folgender Gleichung berechnet:



$$H(\%) = \frac{(A(T) - A_0) \cdot 100}{A_0}$$

Dabei ist $A(T)$ die Absorption bei der jeweiligen Messtemperatur und A_0 die kleinste Absorption einer Messung. Die Schmelztemperatur T_m eines PNA-Doppelstrangs wurde durch eine Auftragung von $H(\%)$ gegen die Temperatur in °C anhand des Wendepunktes der Kurve bestimmt.

5.3 Bestimmung der K_D -Werte

Die Bestimmung der K_D -Werte der Calcium-Sensoren erfolgte durch eine doppelt- logarithmische Auftragung (Hill-Plot) der Ca^{2+} -Konzentration $\log([\text{Ca}^{2+}])$ gegen $\log \left\{ \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)} \right\}$. Dabei ist F die Fluoreszenzintensität bei der jeweiligen Ca^{2+} -Konzentration, F_{\min} die Fluoreszenzintensität bei der Abwesenheit von Ca^{2+} und F_{\max} die Fluoreszenzintensität des gesättigten Calcium-Indikators. Alle drei Werte werden durch Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzmessungen (siehe Abschnitt 5.2.1) bestimmt. Der x-Achsenabschnitt bei $y=0$ entspricht dem Logarithmus des K_D -Werts. Aus der Steigung der Geraden lässt sich ebenfalls die Stöchiometrie bestimmen. Eine Steigung von 1 reflektiert die Komplexierung von einem Ca^{2+} -Ion pro Calcium-Sensor.

5.4 Charakterisierung

Kernresonanzspektroskopie (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*)

^1H - und ^{13}C -NMR Spektren wurden an Spektrometern der Firma *Varian* (Mercury 300, Inova 500 und Inova 600) aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm (TMS = 0 ppm) angegeben. Als interner Standard dienen die Resonanzen der deuterierten Lösungsmittel: 7.26 ppm (^1H) und 77.16 ppm (^{13}C) für CDCl_3 , 2.50 ppm (^1H) und 39.52 ppm (^{13}C) für D^6 -DMSO, 3.31 ppm (^1H) und 49.00 ppm (^{13}C) für CD_3OD .^[204] Die Multiplizität der ^1H -NMR Signale ist mit folgenden Abkürzungen angegeben: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dublett), ddd (Dublett von Dublett von Dublett), t (Triplet) und m (Multiplet). Die Kopplungskonstante $^nJ_{\text{XX}}$ ist in Hertz [Hz] angegeben, dabei ist n die Anzahl der Bindungen und X der Nukleus. Die ^{13}C -NMR-Daten wurden ^1H -entkoppelt aufgenommen. Die Signalzuordnung erfolgte teilweise mit Hilfe von H-, H-Cosy-, HSQC- und HMBC Spektren.



Massenspektrometrie (MS)

Die ESI-Massenspektren wurden an Geräten der Firma *Bruker* (MicrOTOF, maXis, FTICR-MS Apex IV) aufgenommen. Die Angabe der Signale erfolgte durch das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z). Die Aufnahme von MALDI-Spektren wurde an einem MALDI-TOF Autoflex Speed von *Bruker* durchgeführt.

5.5 Festphasenpeptidsynthese

5.5.1 Manuelle Festphasenpeptidsynthese von Peptid/PNA-Konjugaten

Die Festphasenpeptidsynthese der TMD-PNA-Hybride und der modifizierten PNAs wurde manuell in einer *Becton Dickinson Discardit* (BD)-Spritze mit einem eingelegten Polyethylenfilter durchgeführt. Es wurde ein mit Glycin vorbelegtes Wang-Harz (Fmoc-Gly-Wang) mit einer Beladungsdichte von 0.33 mmol/g verwendet. Für jede Kupplung wurde ein Überschuss von 4 Äquivalenten des jeweiligen PNA-Bausteins eingesetzt. Die verwendeten PNA-Bausteine wurden in Stammlösungen der Kupplungsreagenzien (HATU und HOAt in NMP) gelöst und die Aktivierungsbasen (DIPEA und 2,6-Lutidin in NMP) zugegeben. Die Konzentrationen in der Reaktionslösung betragen 0.25 M für HATU und die verwendeten PNA-Bausteine, 0.24 M für HOAt, 0.20 M für DIPEA und 0.30 M für 2,6-Lutidin. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und maschinell in der BD-Spritze geschüttelt.

Vor der ersten Kupplung wurde das Wang-Harz 2 h in NMP gequollen. Nach dem Waschen mit NMP (3×), DCM (3×) und NMP (3×) erfolgte die Fmoc-Entschützung des Harzes mit 20 % Piperidin in NMP (2× 10 min). Nach jeder Entschützung wurde das Harz mit NMP (3×), DCM (3×) und NMP (3×) gewaschen. Nach dem Entschützen des Harzes wurde der Kupplungszyklus solange durchgeführt, bis die gewünschte Sequenz erreicht wurde. Ein Kupplungszyklus besteht dabei aus folgenden Schritten:

- 1. Kupplung:** Der jeweilige PNA-Baustein (4 Äq.) wurde in der HATU/HOAt-Lösung in einem Mikroreaktionsgefäß im Ultraschallbad gelöst. Nach der Präaktivierung von 5 min wurden die Aktivierungsbasen zugegeben und die Reaktionsmischung in die BD-Spritze überführt. Die Standardkupplungszeit betrug 60 min und jeder PNA-Baustein wurde bei RT doppelt gekuppelt.



- 2. Waschen:** Das Harz wurde in NMP (3×), DCM (3×) und erneut in NMP (3×) gewaschen.
- 3. Capping:** Um vorhandene freie Aminofunktionen zu deaktivieren wurde eine Mischung aus Essigsäureanhydrid/2,6-Lutidin/NMP (1/2/7, v/v/v) verwendet. Das Capping wurde zweimal für jeweils 5 min durchgeführt.
- 4. Waschen:** Das Harz wurde nacheinander in DIPEA/NMP (9.5/0.5, v/v) (3×), DCM (3×), NMP (6×) und erneut in DCM (3×) und NMP (3×) gewaschen.
- 5. Entschützung:** Für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen wurde 20 % Piperidin in NMP verwendet. Die Entschützung wurde zweimal für je 5 min bei RT durchgeführt. Nach jeder Entschützung wurde das Harz erneut gewaschen (Schritt 6).
- 6. Waschen:** Das Harz wurde in NMP (3×), DCM (3×) und erneut in NMP (3×) gewaschen. Danach folgte wieder Schritt 1 für den nächsten PNA-Baustein.

Nach der Fertigstellung der gewünschten Sequenz wurde das Harz in NMP (5×), DCM (5×) und Methanol (5×) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Bei einer Unterbrechung der Synthese wurde das Harz vor der Fmoc-Entschützung in NMP bei 4 °C aufbewahrt. Vor der Fortführung der Synthese wurde das Harz 30 min bei Raumtemperatur in NMP maschinell geschüttelt.

5.5.2 Abspaltung vom Wang-Harz

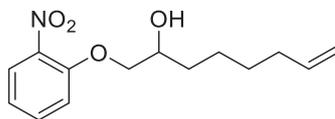
Für die Abspaltung der PNA/Peptid-Konjugate von der Harzoberfläche wurde das Harz in einer Mischung aus TFA/*m*-Cresol/TIS (92.5/5.0/2.5, v/v/v) maschinell geschüttelt. Die Abspalllösung wurde nach der Entschützung in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und TFA durch Einleiten eines Stickstoffstroms an die Oberfläche entfernt. Durch Zugabe von eiskaltem Diethylether wurden die PNA/Peptid-Konjugate ausgefällt und anschließend zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit kaltem Diethylether gewaschen (5×) und anschließend im Vakuum getrocknet.



5.6 Synthesen

5.6.1 Synthese von BAPTA-Derivat 10^[84,85]

1-(2-Nitrophenoxy)-oct-7-en-2-ol (17)^[84]



17

C₁₄H₁₉NO₁₁
265.31 g/mol

2-Nitrophenol (**16**) (5.51 g, 39.6 mmol, 1.00 Äq.) und 1,2-Epoxy-7-octen (5.00 g, 39.6 mmol, 1.00 Äq.) wurden unter Schutzgasatmosphäre in trockenem DMF (20 ml) gelöst. Nach Zugabe von Kalium-*tert*-butanolat (400 mg, 3.57 mmol, 0.09 Äq.) wurde die Reaktionsmischung bei 100 °C für 48 h erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in DCM (20 ml) gelöst. Die organische Phase wurde mit einer 1 M NaOH-Lösung (20 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (2×20 ml) und ges. NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 3:1) gereinigt. Es wurde ein Gemisch aus zwei Regioisomeren erhalten. Das Gemisch (6.01 g, 22.7 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Schutzgasatmosphäre in trockenem Pyridin (10 ml) gelöst und mit Tritylchlorid (1.89 g, 6.81 mmol, 0.30 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt **17** (4.54 g, 17.1 mmol, 43 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 5:1 nach 3:1) als gelbes Öl erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 5:1): $R_f = 0.42$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.36\text{--}1.62$ (m, 6H, 3×CH₂), $2.02\text{--}2.10$ (m, 2H, CH₂), 2.48 (s, 1H, OH), $3.89\text{--}4.06$ (m, 2H, O-CH₂), 4.14 (dd, ³J_{H,H} = 8.6, 2.7 Hz, 1H, O-CH), $4.89\text{--}5.02$ (m, 2H, Alken-CH₂), 5.78 (ddt, ³J_{H,H} = 16.9, 10.2, 6.7 Hz, 1H, Alken-CH), $6.99\text{--}7.08$ (m, 2H, 2×Ar-H), 7.51 (ddd, ³J_{H,H} = 8.7, 7.4, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.85 (dd, ³J_{H,H} = 8.1, 1.7 Hz, 1H, Ar-H) ppm.

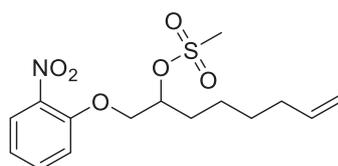


$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : δ = 24.9 (CH_2), 28.7 (CH_2), 32.5 (CH_2), 33.6 (CH_2), 69.9 (O- CH_2), 74.0 (O-CH), 114.5 (Alken- CH_2), 114.9 (Ar-C), 120.8 (Ar-C), 125.8 (Ar-C), 134.4 (Ar-C), 138.7 (Alken-CH), 139.6 (Ar- C_{quart}), 152.3 (Ar-C) ppm.

ESI-MS m/z : 288.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 553.3 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 264.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_{11}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 288.1206, gef.: 288.1206,
ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_{11}$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 264.1241, gef.: 264.1237.

1-(2-Nitrophenoxy)oct-7-en-2-yl-methansulfonat (**18**)^[84]



18

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{S}$
343.39 g/mol

1-(2-Nitrophenoxy)-oct-7-en-2-ol (**17**) (4.54 g, 17.0 mmol, 1.00 Äq.) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (21.0 mg, 170 mmol, 0.01 Äq.) wurden unter Schutzgasatmosphäre in trockenem Pyridin (15 ml) gelöst. Methansulfonylchlorid (2.91 g, 1.97 ml, 25.5 mmol, 1.50 Äq.) wurde tropfenweise zugegeben und die Reaktionslösung wurde bei RT für 6 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM (20 ml) gelöst und nacheinander mit einer 1 M HCl-Lösung (15 ml), ges. NaHCO_3 -Lösung (15 ml) und ges. NaCl-Lösung (15 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **18** (5.14 g, 14.7 mmol, 88 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 3:1) als oranges Öl erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 3:1): R_f = 0.47.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : δ = 1.40–1.50 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.80–1.90 (m, 2H, CH_2), 2.01–2.10 (m, 2H, CH_2), 3.06 (s, 3H, CH_3), 4.16–4.30 (m, 2H, O- CH_2), 4.89–5.03 (3H, O-CH, Alken- CH_2), 5.76 (ddt, $^3J_{\text{H,H}} = 16.9, 10.2, 6.7$ Hz, 1H, Alken-CH), 7.03–7.11 (m, 2H, Ar-H), 7.53 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3, 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, Ar-H), 7.82 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, Ar-H) ppm.

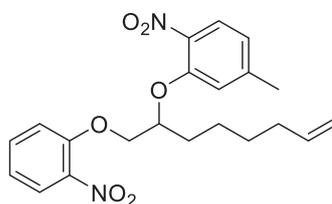


$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : δ = 24.2 (CH_2), 28.4 (CH_2), 31.6 (CH_2), 33.3 (CH_2), 38.3 (CH_3), 70.5 (O- CH_2), 80.0 (O- CH), 114.7 (Alken- CH_2), 114.8 (Ar-C), 121.4 (Ar-C), 125.7 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 138.3 (Alken- CH), 140.0 (Ar- C_{quart}), 151.3 (Ar- C_{quart}) ppm.

ESI-MS m/z : 361.2 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 366.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 709.2 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$): 361.1428, gef.: 361.1423,
ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 366.0982, gef.: 366.0973.

5-Methyl-2-Nitro-1-((1-(2-Nitro-phenoxy)methyl)-oct-7-en-2-yl)oxy)-benzol (20)^[84]



20

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$
400.43 g/mol

5-Methyl-2-nitrophenol (5.00 g, 32.7 mmol, 1.00 Äq.) wurde in DCM (15 ml) gelöst und eine Lösung aus KOH (1.83 g, 32.7 mmol, 1.00 Äq.) in Wasser (10 ml) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bis zur kompletten Auflösung des Feststoffes leicht erwärmt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Kaliumsalz von 5-Methyl-2-nitrophenol (**19**) (5.80 g, 30.3 mmol, 93 %) wurde nach der Lyophilisation als oranger Feststoff erhalten.

Das Kaliumsalz von 5-Methyl-2-nitrophenol (**19**) (2.78 g, 14.6 mmol, 1.00 Äq.) und 1-(2-Nitrophenoxy)oct-7-en-2-yl-methansulfonat (**18**) (5.00 g, 14.6 mmol, 1.00 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in trockenem DMF (30 ml) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde bei 90 °C für 18 h erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (20 ml) gelöst und mit ges. Na_2CO_3 -Lsg. (20 ml) und ges. NaCl -Lsg. (20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Die Zielverbindung **20** (3.58 g, 8.95 mmol, 61 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 4:1) als gelbes Öl erhalten.

**Analytische Daten:**

DC (Pentan:EtOAc, 4:1): $R_f = 0.58$.

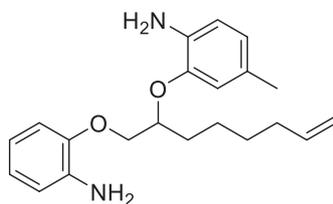
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1.39\text{--}1.57$ (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), $1.77\text{--}1.88$ (m, 2H, CH_2), $2.01\text{--}2.07$ (m, 2H, CH_2), 2.41 (s, 3H, CH_3), 4.18 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.9, 3.8$ Hz, 1H, O- CH_2), 4.35 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.9, 6.9$ Hz, 1H, O- CH_2), $4.79\text{--}4.85$ (m, 1H, O-CH), $4.89\text{--}5.00$ (m, 2H, Alken- CH_2), 5.75 (ddt, $^3J_{\text{H,H}} = 16.9, 10.2, 6.7$ Hz, 1H, Alken-CH), 6.80 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.6, 0.7$ Hz, 1H, Ar-H), $6.99\text{--}7.03$ (m, 1H, Ar-H), $7.06\text{--}7.10$ (m, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 7.49 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3, 7.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, Ar-H), 7.67 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 1H, Ar-H), 7.77 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$ Hz, 1H, Ar-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta = 21.8$ (CH_3), 24.3 (CH_2), 28.6 (CH_2), 31.6 (CH_2), 33.4 (CH_2), 71.7 (O- CH_2), 79.1 (O-CH), 114.6 (Alken- CH_2), 114.7 (Ar-C), 117.6 (Ar-C), 120.9 (Ar-C), 121.9 (Ar-C), 125.4 (Ar-C), 125.6 (Ar-C), 134.2 (Ar-C), 138.4 (Alken-CH), 138.5 (Ar- C_{quart}), 139.9 (Ar- C_{quart}), 145.8 (Ar- C_{quart}), 151.7 (Ar- C_{quart}), 151.9 (Ar- C_{quart}) ppm.

ESI-MS m/z : 418.2 [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$, 423.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 823.4 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 399.1 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6$ ([$\text{M}-\text{H}$] $^-$): 399.1562 , gef.: 399.1558 .

2-Amino-5-Methyl-1-((1-(2-Amino-phenoxy)methyl)-oct-7-en-2-yl)oxy)-benzol (21)^[84]



21

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$
340.47 g/mol

Zu einer Lösung aus Verbindung **20** (3.50 g, 8.74 mmol, 1.00 Äq.) in Ethanol (70 ml) wurden Zinn(II)-chlorid (9.94 g, 52.4 mmol, 6.00 Äq.) und konz. HCl (9.8 ml) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 78°C für 1.5 h erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung tropfenweise mit NaOH-Lsg (20%, w/w) auf $\text{pH} \geq 11$ gebracht. Die entstandene Suspension wurde mit Diethylether (30 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum



entfernt. Das Produkt **21** (2.98 g, 8.75 mmol, quant.) wurde als dunkelbraunes Öl erhalten.

Analytische Daten:

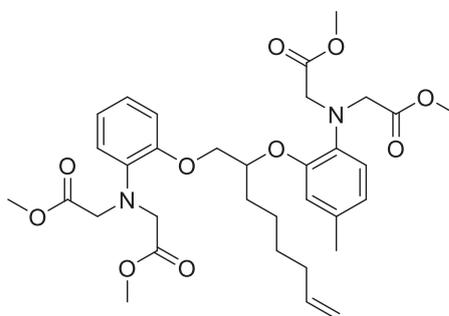
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ = 1.42–1.62 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.78–1.93 (m, 2H, CH_2), 2.03–2.14 (m, 2H, CH_2), 2.24 (s, 3H, CH_3), 3.64 (bs, 4H, $2\times\text{NH}_2$), 4.09–4.12 (m, 2H, O- CH_2), 4.58 (ddt, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.8, 5.6, 4.2 Hz, 1H, O-CH), 4.93–5.05 (m, 2H, Alken- CH_2), 5.81 (ddt, $^3J_{\text{H,H}}$ = 16.9, 10.2, 6.7 Hz, 1H, Alken-CH), 6.58–6.83 (m, 7H, $7\times\text{Ar-H}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ = 20.8 (CH_3), 24.8 (CH_2), 28.8 (CH_2), 31.6 (CH_2), 33.5 (CH_2), 70.2 (O- CH_2), 77.7 (O-CH), 111.9 (Ar-C), 114.5 (Alken- CH_2), 115.2 (Ar-C), 115.6 (Ar-C), 115.7 (Ar-C), 118.2 (Ar-C), 121.6 (Ar-C), 122.2 (Ar-C), 127.9 (Ar- C_{quart}), 135.0 (Ar- C_{quart}), 136.6 (Ar- C_{quart}), 136.6 (Alken-CH), 145.8 (Ar- C_{quart}), 146.2 (Ar- C_{quart}) ppm.

ESI-MS m/z : 341.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 681.5 $[2\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 341.2224, gef.: 341.2223.

[(2-((2-[2-(Bis-methoxycarbonylmethyl-amino)-5-methyl-phenoxy]-oct-7-en-2-yl)oxy}phenyl)-methoxycarbonylmethyl-amino)-essigsäuremethylester (**23**)^[84]



23

$\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}$
628.72 g/mol

Zu einer Lösung aus Amin **21** (2.98 g, 8.75 mmol, 1.00 Äq.) in Acetonitril (20 ml) wurden Methylbromacetat (5.35 g, 3.31 ml, 35.0 mmol, 4.00 Äq.) und DIPEA (4.52 g, 5.95 ml, 35.0 mmol, 4.00 Äq.) zugegeben und die Lösung für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in DCM (20 ml) gelöst. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO_3 -Lsg. (20 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum



entfernt. Das Produkt **23** (3.61 g, 5.74 mmol, 66 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 3:1) als dunkelorange Öl erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 3:1): $R_f = 0.53$.

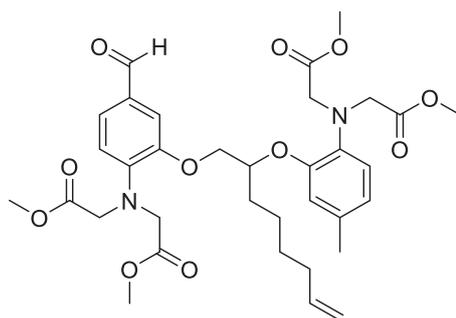
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1.37\text{--}1.55$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), $1.70\text{--}1.85$ (m, 2H, CH_2), $2.00\text{--}2.09$ (m, 2H, CH_2), 2.21 (s, 3H, CH_3), 3.60 (s, 6H, $2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3.61 (s, 6H, $2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$), $4.01\text{--}4.14$ (m, 10H, O- CH_2 , $4\times\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), $4.56\text{--}4.63$ (m, 1H, O-CH), $4.87\text{--}5.01$ (m, 2H, Alken- CH_2), 5.77 (ddt, $^3J_{\text{H,H}} = 16.9, 10.2, 6.7$ Hz, 1H, Alken-CH), $6.61\text{--}6.92$ (m, 7H, $7\times\text{Ar-H}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : $\delta = 20.9$ (CH_3), 24.7 (CH_2), 28.9 (CH_2), 31.4 (CH_2), 33.6 (CH_2), 51.4 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$), 51.5 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$), 53.2 ($2\times\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 53.6 ($2\times\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 69.8 (O- CH_2), 76.9 (O-CH), 113.6 (Ar-C), 114.4 (Alken- CH_2), 116.6 (Ar-C), 119.8 (Ar-C), 119.9 (Ar-C), 121.4 (Ar-C), 122.0 (Ar-C), 122.6 (Ar-C), 132.2 (Ar- C_{quart}), 137.7 (Ar- C_{quart}), 138.7 (Alken-CH), 139.0 (Ar- C_{quart}), 149.5 (Ar- C_{quart}), 150.7 (Ar- C_{quart}), 171.6 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$), 171.9 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$) ppm.

ESI-MS m/z : 629.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 651.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_{10}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 629.3069, gef.: 629.3067,
ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 651.2888, gef.: 651.2886.

[[2-((2-[2-(Bis-methoxycarbonylmethyl-amino)-5-methyl-phenoxy]-oct-7-en-2-yl)oxy)-4-formyl-phenyl]-methoxycarbonylmethyl-amino]-essigsäuremethylester (**24**)^[84]



24

$\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{11}$
656.73 g/mol

Phosphoroxchlorid (1.76 g, 1.05 ml, 11.5 mmol, 2.00 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre zu trockenem DMF (10 ml) zu getropft. Die Lösung



wurde für 2 h bei RT gerührt und anschließend auf 0 °C gekühlt. Verbindung **23** (3.61 g, 5.74 mmol, 1.00 Äq.) wurde als Lösung in DMF (10 ml) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung bei 40–45 °C für 20 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in DCM gelöst. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lsg gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 2:1) lieferte das Produkt **24** (2.72 g, 4.14 mmol, 72 %) als gelbes Öl.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 2:1): $R_f = 0.38$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.34\text{--}1.53$ (m, 4H, 2×CH₂), 1.68–1.79 (m, 2H, CH₂), 2.00–2.09 (m, 2H, CH₂), 2.20 (s, 3H, CH₃), 3.59 (s, 6H, 2×CO₂CH₃), 3.60 (s, 6H, 2×CO₂CH₃), 4.02–4.22 (m, 10H, O-CH₂, 4×CH₂CO₂CH₃), 4.52–4.63 (m, 1H, O-CH), 4.86–5.00 (m, 2H, Alken-CH₂), 5.76 (ddt, $^3J_{H,H} = 16.9, 10.2, 6.7$ Hz, 1H, Alken-CH), 6.61–6.80 (m, 4H, 4×Ar-H), 7.30–7.37 (m, 2H, 2×Ar-H), 9.73 (s, 1H, CHO) ppm.

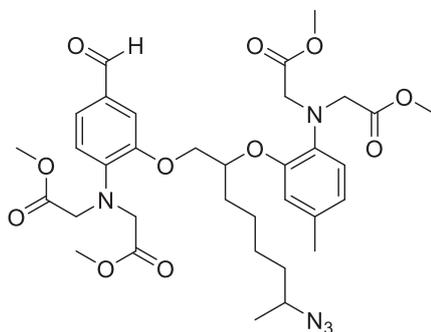
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 20.8$ (CH₃), 24.7 (CH₂), 28.8 (CH₂), 31.1 (CH₂), 33.5 (CH₂), 51.4 (2×CO₂CH₃), 51.8 (2×CO₂CH₃), 53.3 (2×CH₂CO₂CH₃), 53.5 (2×CH₂CO₂CH₃), 70.0 (O-CH₂), 76.8 (O-CH), 111.7 (Ar-C), 114.5 (Alken-CH₂), 117.0 (Ar-C), 117.2 (Ar-C), 120.0 (Ar-C), 122.3 (Ar-C), 126.1 (Ar-C), 130.1 (Ar-C_{quart}), 132.3 (Ar-C_{quart}), 137.8 (Ar-C_{quart}), 138.5 (Alken-CH), 144.7 (Ar-C_{quart}), 149.4 (Ar-C_{quart}), 149.8 (Ar-C_{quart}), 170.9 (2×CO₂CH₃), 171.7 (2×CO₂CH₃), 190.5 (CHO) ppm.

ESI-MS m/z : 657.3 [M+H]⁺, 679.3 [M+Na]⁺, 655.3 [M-H]⁻.

HR-MS (ESI): ber. für C₃₄H₄₅N₂O₁₁ ([M+H]⁺): 657.3018, gef.: 657.3017,
ber. für C₃₄H₄₄N₂O₁₁Na ([M+Na]⁺): 679.2837, gef.: 679.2845.



[(2-((2-[2-(Bis-methoxycarbonylmethyl-amino)-5-methyl-phenoxy]7-azido-octan-2-yl)oxy)-4-formyl-phenyl)-methoxycarbonylmethyl-amino]-essigsäuremethylester (10)^[84]

**10**

$C_{34}H_{45}N_5O_{11}$
699.76 g/mol

Verbindung **24** (500 mg, 760 μ mol, 1.00 Äq.) wurde in DCM (10 ml) gelöst und HBr in Essigsäure (33%, 1.03 ml) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingengt. Der orange Rückstand wurde erneut in DCM (20 ml) gelöst, mit ges. $NaHCO_3$ -Lsg. (20 ml) versetzt und für 10 min bei RT gerührt. Die organische Phase wurde mit DCM (20 ml) extrahiert, mit ges. $NaHCO_3$ -Lsg. gewaschen (15 ml) und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand unter Schutzgas in trockenem DMF (10 ml) gelöst. Natriumazid (60.0 mg, 910 μ mol, 1.50 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei 100 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand erneut in DCM (15 ml) gelöst. Die organische Phase wurde mit ges. $NaHCO_3$ -Lsg. (20 ml) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 2:1) lieferte das Produkt **10** (333 mg, 480 μ mol, 63 %) als gelbes Öl.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 2:1): $R_f = 0.44$.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.20$ (d, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 3H, CH_3CHN_3), 1.29–1.53 (m, 6H, 3 \times CH_2), 1.64–1.79 (m, 2H, CH_2), 2.19 (s, 3H, CH_3), 3.31–3.45 (m, 1H, CH_3CHN_3), 3.58 (s, 6H, 2 \times $CH_2CO_2CH_3$), 3.61 (s, 6H, 2 \times $CH_2CO_2CH_3$), 3.99–4.14 (m, 10H, 4 \times $CH_2CO_2CH_3$, O- CH_2), 4.52–4.61 (m, 1H, O-CH), 6.56–6.83 (m, 4H, 4 \times Ar-H), 7.27–7.40 (m, 2H, 2 \times Ar-H), 9.72 (s, 1H, CHO) ppm.



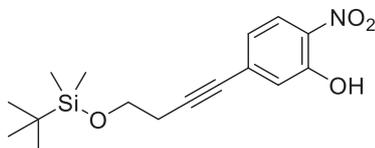
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : $\delta = 19.3$ (CH_3N_3), 20.8 (CH_3), 24.8 (CH_2), 26.0 (CH_2), 31.2 (CH_2), 35.9 (CH_2), 51.4 ($2 \times \text{CO}_2\text{CH}_3$), 51.7 ($2 \times \text{CO}_2\text{CH}_3$), 53.3 ($2 \times \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 53.5 ($2 \times \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 57.7 (CH_3CHN_3), 70.0 (O-CH_2), 76.7 (O-CH), 111.7 (Ar-C), 117.2 (Ar-C), 117.2 (Ar-C), 120.0 (Ar-C), 122.4 (Ar-C), 126.1 (Ar-C), 130.1 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 132.2 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 137.9 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 144.7 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 149.3 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 149.7 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 170.8 ($2 \times \text{CO}_2\text{CH}_3$), 171.7 ($2 \times \text{CO}_2\text{CH}_3$), 190.5 (CHO) ppm.

ESI-MS m/z : 700.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 722.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 698.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_{11}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 700.3188, gef.: 700.3190,
ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 722.3008, gef.: 722.3010.

5.6.2 Synthese von BAPTA-Derivat 11

5-(4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)but-1-in-1-yl)-2-nitrophenol (**26**)



26

C₁₆H₂₃NO₄Si
321.45 g/mol

5-Bromo-2-nitrophenol (**25**) (1.00 g, 4.59 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in THF (2.0 ml) gelöst. Zu der Lösung wurden nacheinander 4-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1-butin (850 mg, 950 µL, 4.59 mmol, 1.00 Äq.), Triethylamin (8.0 ml), Bis(triphenylphosphine)palladium(II)-chlorid (26.0 mg) und Kupferiodid (7.0 mg) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 60 °C für 17 h gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde demineralisiertes Wasser (20 ml) zugegeben und mit Diethylether (3×30 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit demineralisiertem Wasser (3×30 ml), mit einer 1M HCl-Lsg. (30 ml) und ges. NaCl-Lsg. (3×30 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt **26** (1.20 g, 3.74 mmol, 81 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 20:1) als gelber Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 20:1): $R_f = 0.77$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.08$ (s, 6H, 2×CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 2.64 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 3.80 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 6.94 (dd, ³J_{H,H} = 8.8 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.12 (d, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 8.00 (d, ³J_{H,H} = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 10.6 (s, 1H, OH) ppm.

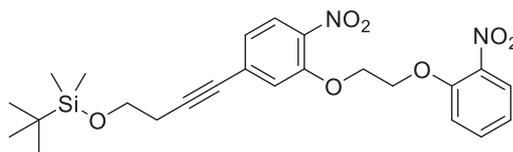
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = -5.31$ (2×CH₃), 18.3 ((CH₃)₃C), 23.9 (CH₂), 25.8 ((CH₃)₃C), 61.4 (CH₂), 80.0 (Alkin-C), 94.5 (Alkin-C), 122.4 (Ar-C), 123.3 (Ar-C), 124.9 (Ar-C), 132.6 (Ar-C_{quart}), 133.6 (Ar-C_{quart}), 154.8 (Ar-C_{quart}) ppm.

ESI-MS m/z : 344.1 [M+Na]⁺, 320.1 [M-H]⁻.

HR-MS (ESI): ber. für C₁₆H₂₃NO₄SiNa ([M+Na]⁺): 344.1289, gef.: 344.1300,
ber. für C₁₆H₂₂NO₄Si ([M-H]⁻): 320.1324, gef.: 320.1329.



***tert*-Butyldimethyl((4-(4-nitro-3-(2-(2-nitrophenoxy)ethoxy)phenyl)but-3-in-1-yl)oxy)silan (28)**



28

$C_{24}H_{30}N_2O_7Si$
486.60 g/mol

Verbindung **26** (2.85 g, 8.88 mmol, 1.25 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in trockenem DMF (30 ml) gelöst. Zu der Lösung wurden 1-(2-Bromethoxy)-2-nitrobenzol (**27**) (1.75 g, 7.10 mmol, 1.00 Äq.) und Kaliumcarbonat (2.25 g, 16.3 mmol, 2.30 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung bei 90 °C für 20 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Ethylacetat (20 ml) gelöst. Die organische Phase wurde anschließend mit demineralisiertem Wasser (20 ml) und ges. NaCl-Lsg. (15 ml) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Die Zielverbindung **28** (2.56 g, 5.23 mmol, 74 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 3:1) als gelber Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 3:1): $R_f = 0.69$.

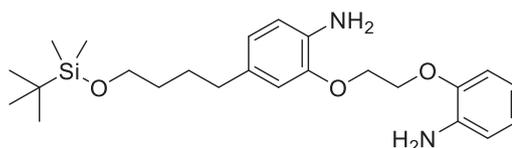
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 0.08$ (s, 6H, 2 \times CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*-Bu), 2.63 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, CH₂), 3.81 (t, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, 2H, CH₂), 4.42–4.54 (m, 4H, 2 \times CH₂), 7.00–7.09 (m, 2H, 2 \times Ar-H), 7.14 (d, $^4J_{H,H} = 1.5$ Hz, 1H, Ar-H), 7.21 (dd, $^3J_{H,H} = 8.5$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.1$ Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (ddd, $^3J_{H,H} = 8.4$, 7.4 Hz, $^4J_{H,H} = 1.7$ Hz, 1H, Ar-H), 7.73–7.81 (m, 2H, 2 \times Ar-H) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = -5.42$ (2 \times CH₃), 18.0 ((CH₃)₃C), 23.9 (CH₂), 25.8 (CH₃)₃C), 61.4 (TBDMSO-CH₂), 68.4 (O-CH₂), 68.5 (O-CH₂), 79.7 (Alkin-C), 92.7 (Alkin-C), 116.1 (Ar-C), 118.2 (Ar-C), 121.4 (Ar-C), 124.2 (Ar-C), 125.5 (Ar-C), 125.8 (Ar-C), 130.4 (Ar-C_{quart}), 134.2 (Ar-C), 138.9 (Ar-C_{quart}), 140.4 (Ar-C_{quart}), 151.7 (Ar-C_{quart}), 151.8 (Ar-C_{quart}) ppm.

ESI-MS m/z : 487.2 [M+H]⁺, 504.2 [M+NH₄]⁺, 509.2 [M+Na]⁺, 525.2 [M+K]⁺.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{24}H_{31}N_2O_7Si$ ($[M+H]^+$): 487.1895, gef.: 487.1890,
ber. für $C_{24}H_{34}N_3O_7Si$ ($[M+NH_4]^+$): 504.2161, gef.: 504.2165,
ber. für $C_{24}H_{30}N_2O_7SiNa$ ($[M+Na]^+$): 509.1714, gef.: 509.1710.

2-(2-(2-Aminophenoxy)ethoxy)-4-(4-*tert*-butyl-dimethylsilyl)oxy)butyl)anilin (29)



29

$C_{24}H_{38}N_2O_3Si$
430.60 g/mol

Verbindung **28** (5.05 g, 10.4 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in trockenem und entgastem Ethanol (80 ml) gelöst. Palladium auf Aktivkohle (218 mg, 10 wt%) wurde zugegeben und Wasserstoff durch die Suspension geleitet. Die Reaktionsmischung wurde für 20 h bei RT unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde das Palladium abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **29** (3.90 g, 9.05 mmol, 87 %) wurde nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 3:1) als farbloser Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 3:1): $R_f = 0.24$.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.08$ (s, 6H, $2 \times CH_3$), 0.92 (s, 9H, *t*-Bu), 1.49–1.72 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 2.55 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.65 (t, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.71 (bs, 4H, $2 \times NH_2$), 4.34 (s, 4H, $2 \times O-CH_2$), 6.64–6.88 (m, 7H, $7 \times Ar-H$) ppm.

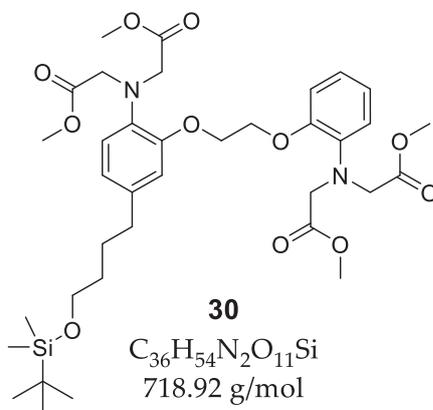
^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -5.33$ ($2 \times CH_3$), 18.3 ($(CH_3)_3C$), 25.9 ($(CH_3)_3C$), 27.9 (CH_2), 32.3 (CH_2), 35.1 (CH_2), 63.0 (TBDMSO- CH_2), 67.3 ($2 \times OCH_2$), 112.4 (Ar-C), 112.7 (Ar-C), 115.2 (Ar-C), 118.2 (Ar-C), 121.4 (Ar-C), 121.8 (Ar-C), 132.9 (Ar- C_{quart}), 134.3 (Ar- C_{quart}), 136.8 (Ar- C_{quart}), 146.1 (Ar- C_{quart}) ppm.

ESI-MS m/z : 431.3 $[M+H]^+$, 453.3 $[M+Na]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{24}H_{39}N_2O_3Si$ ($[M+H]^+$): 431.2724, gef.: 431.2721,
ber. für $C_{24}H_{38}N_2O_3SiNa$ ($[M+Na]^+$): 453.2544, gef.: 453.2537.



Methyl-2-((4-(4-((*t*-butyldimethylsilyl)oxy)-butyl)-2-(2-(2-(bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino)phenoxy)-ethoxy)phenyl)(2-methoxy-2-oxoethyl)amino)acetat (30)



Verbindung **29** (2.00 g, 4.66 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in trockenem Acetonitril (15 ml) gelöst. Nach Zugabe von Methylbromacetat (**22**) (3.56 g, 2.20 ml, 23.2 mmol, 5.00 Äq.) und DIPEA (3.00 g, 3.95 ml, 23.2 mmol, 5.00 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 27 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Lösung auf RT gebracht und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde wieder in DCM (20 ml) gelöst. Die organische Phase wurde mit ges. $NaHCO_3$ -Lsg. gewaschen (30 ml), über $MgSO_4$ getrocknet und anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt **30** (2.77 g, 3.85 mmol, 83 %) wurde nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 5:2) als gelbes Öl erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 5:2): $R_f = 0.53$.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.01$ (s, 6H, $2 \times SiCH_3$), 0.86 (s, 9H, *t*-Bu), 1.43–1.64 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 2.50 (t, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.51 (s, 6H, $2 \times O-CH_3$), 3.52 (s, 6H, $2 \times O-CH_3$), 3.58 (t, $^3J_{H,H} = 6.1$ Hz, 2H, TBS- CH_2), 4.09 (s, 4H, $2 \times CO_2CH_2$), 4.12 (s, 4H, $2 \times CO_2CH_2$), 4.22 (s, 4H, $2 \times O-CH_2$), 6.60–6.91 (m, 7H, $7 \times Ar-H$) ppm.

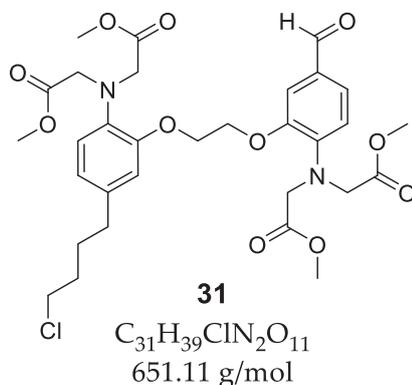
^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -5.47$ ($2 \times SiCH_3$), 18.3 ($(CH_3)_3C$), 25.9 ($(CH_3)_3C$), 27.7 (CH_2), 32.3 (CH_2), 35.1 (CH_2), 51.4 ($2 \times COOCH_3$), 51.4 ($2 \times COOCH_3$), 53.2 ($2 \times CO_2CH_2$), 53.2 ($2 \times CO_2CH_2$), 62.9 (TBDMS- CH_2), 66.8 (O- CH_2), 66.9 (O- CH_2), 112.8 (Ar-C), 113.0 (Ar-C), 118.7 (Ar-C), 118.8 (Ar-C), 120.9 (Ar-C), 121.3 (Ar-C), 122.1 (Ar-C), 136.8 (Ar- C_{quart}), 136.9 (Ar- C_{quart}), 139.1 (Ar- C_{quart}), 150.2 (Ar- C_{quart}), 150.2 (Ar- C_{quart}), 171.9 ($COOCH_3$), 172.0 ($COOCH_3$) ppm.

ESI-MS m/z : 719.4 $[M+H]^+$, 741.4 $[M+Na]^+$, 757.3 $[M+K]^+$.



HR-MS (ESI): ber. für $C_{36}H_{55}N_2O_{11}Si$ ($[M+H]^+$): 719.3570, gef.: 719.3572,
ber. für $C_{36}H_{54}N_2O_{11}SiNa$ ($[M+Na]^+$): 741.3388, gef.: 741.3389.

Methyl-2-((4-(4-(chlorbutyl)-2-(2-(2-(bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino)-5-formylphenoxy)ethoxy)phenyl)(2-methoxy-2-oxoethyl)amino)acetat (31)



$POCl_3$ (1.13 g, 680 μ l, 7.40 mmol, 4.00 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre zu trockenem DMF (6 ml) zu getropft und die Lösung für 2 h bei RT gerührt. Die entstandene leicht bräunliche Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und Verbindung **30** (1.33 g, 1.85 mmol, 1.00 Äq.) in DMF (6 ml) langsam zu getropft. Die Reaktionsmischung wurde für 20 h bei 45 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM gelöst (20 ml) und mit ges. $NaHCO_3$ -Lsg. (30 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und anschließend im Vakuum entfernt. Eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 3:2) lieferte die Zielverbindung **31** (905 mg, 1.39 mmol, 75 %) als gelben Feststoff.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 3:2): $R_f = 0.33$.

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.62$ – 1.76 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 2.50 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.48 (t, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, 2H, CH_2Cl), 3.52 (s, 6H, $2 \times COOCH_3$), 3.52 (s, 6H, $2 \times COOCH_3$), 4.07 (s, 4H, $2 \times COOCH_2$), 4.19 (s, 4H, $2 \times COOCH_2$), 4.20–4.27 (m, 4H, $2 \times O-CH_2$), 6.61–6.65 (m, 2H, $2 \times Ar-H$), 6.69–6.73 (m, 2H, $2 \times Ar-H$), 7.32–7.34 (m, 2H, $2 \times Ar-H$), 9.74 (s, 1H, COH) ppm.

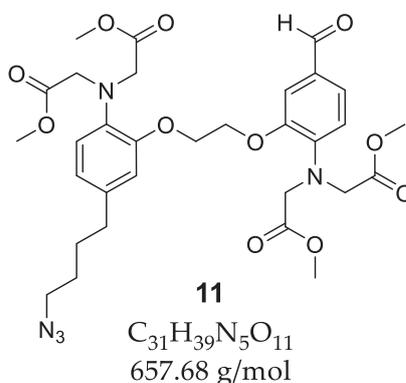


$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) : δ = 28.5 (CH_2), 31.9 (CH_2), 34.4 (CH_2), 44.7 (CH_2Cl), 51.5 ($2\times\text{COOCH}_3$), 53.2 ($2\times\text{COOCH}_3$), 53.2 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 53.4 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 66.6 (O-CH_2), 67.2 (O-CH_2), 110.6 (Ar-C), 113.2 (Ar-C), 116.4 (Ar-C), 118.9 (Ar-C), 121.1 (Ar-C), 126.5 (Ar-C), 129.8 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 135.9 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 137.2 (Ar-C_q), 144.9 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 149.5 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 150.0 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 171.1 ($2\times\text{COOCH}_3$), 171.8 ($2\times\text{COOCH}_3$), 190.4 (COH) ppm.

ESI-MS m/z : 651.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 673.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{ClN}_2\text{O}_{11}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 651.2315, gef.: 651.2318,
ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{ClN}_2\text{O}_{11}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 673.2135, gef.: 673.2138.

Methyl-2-((4-(4-(azidobutyl)-2-(2-(2-(bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino)-5-formylphenoxy)ethoxy)phenyl)(2-methoxy-2-oxoethyl)amino)acetat (11)



Zu einer Lösung aus Verbindung **31** (890 mg, 1.37 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem DMF (15 ml) wurde NaN_3 (134 mg, 2.05 mmol, 1.50 Äq.) unter Argonatmosphäre zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (20 ml) gelöst und mit ges. NaHCO_3 -Lsg. (30 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt **11** (757 mg, 1.15 mmol, 84 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 1:1) als gelber Feststoff erhalten.

**Analytische Daten:**

DC (Pentan:EtOAc, 1:1): $R_f = 0.48$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.51\text{--}1.66$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.50 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.22 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2H, CH_2N_3), 3.52 (s, 6H, $2\times\text{COOCH}_3$), 3.52 (s, 6H, $2\times\text{COOCH}_3$), 4.07 (s, 4H, $2\times\text{COOCH}_2$), 4.18 (s, 4H, $2\times\text{COOCH}_2$), 4.20–4.28 (m, 4H, $2\times\text{O-CH}_2$), 6.60–6.74 (m, 4H, $4\times\text{Ar-H}$), 7.30–7.35 (m, 2H, $2\times\text{Ar-H}$), 9.73 (s, 1H, COH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.3$ (CH_2), 28.4 (CH_2), 34.7 (CH_2), 51.1 (CH_2N_3), 51.5 ($2\times\text{COOCH}_3$), 51.7 ($2\times\text{COOCH}_3$), 53.2 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 53.4 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 66.6 (OCH_2), 67.2 (OCH_2), 110.6 (Ar-C), 113.2 (Ar-C), 116.5 (Ar-C), 119.0 (Ar-C), 121.1 (Ar-C), 126.5 (Ar-C), 129.8 (Ar-C_{quart}), 135.9 (Ar-C_{quart}), 137.2 (Ar-C_{quart}), 144.9 (Ar-C_{quart}), 149.5 (Ar-C_{quart}), 150.1 (Ar-C_{quart}), 171.1 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 171.8 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 190.3 (COH) ppm.

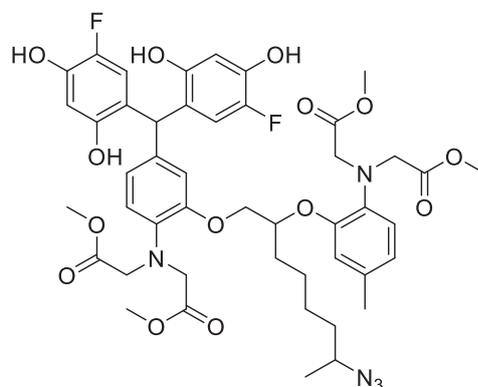
ESI-MS m/z : 658.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 680.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_{11}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 658.2719, gef.: 658.2712,
ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 680.2538, gef.: 680.2537.



5.6.3 Fluorescein-basierte Calcium-Sensoren

Fluo-Azid-1 Triarylmethan-Zwischenstufe **37**



37

$C_{46}H_{53}F_2N_5O_{14}$
937.95 g/mol

Verbindung **10** (300 mg, 430 μ mol, 1.00 Äq.) und 4-Fluororesorcinol (**34**) (121 mg, 940 μ mol, 2.20 Äq.) wurden unter Schutzgasatmosphäre in trockenem DCM (3.5 ml) und trockenem Diethylether (3.5 ml) gelöst. Nach Zugabe von Methansulfonsäure (0.56 ml, 8 vol%) wurde die Lösung bei RT für 16 h gerührt. Anschließend wurde ges. $NaHCO_3$ -Lösung (15 ml) zugegeben und mit DCM (20 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit H_2O (20 ml) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (DCM:MeOH, 10:1) wurde das Produkt **37** (204 mg, 220 μ mol, 51 %) als brauner Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

DC (DCM:MeOH, 10:1): $R_f = 0.51$.

1H -NMR (300 MHz, D^6 -DMSO) : $\delta = 1.17$ (d, $^3J_{HH} = 6.5$ Hz, 3H, CH_3CHN_3), 1.23–1.51 (m, 6H, 3 \times CH₂), 1.52–1.78 (m, 2H, CH₂), 2.17 (s, 3H, CH₃), 3.52 (s, 6H, 2 \times CH₂CO₂CH₃), 3.55 (s, 6H, 2 \times CH₂CO₂CH₃), 3.85–4.13 (m, 10H, 4 \times CH₂CO₂CH₃, O-CH₂), 4.51–4.60 (m, 1H, O-CH), 5.65 (s, 1H, CH), 6.27 (dd, $^3J_{H,H} = 12.5, 3.0$ Hz, 2H, 2 \times Ar-H), 6.36–6.44 (m, 3H, 3 \times Ar-H), 6.55–6.73 (m, 5H, 5 \times Ar-H), 8.95 (s, 2H, 2 \times Ar-OH), 9.37 (s, 2H, 2 \times Ar-OH) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, D^6 -DMSO) : $\delta = 19.0$ (CH₃N₃), 20.3 (CH₃), 24.1 (CH₂), 25.5 (CH₂), 30.5 (CH₂), 35.2 (CH₂), 41.2 (CH), 51.1 (2 \times CO₂CH₃), 51.1 (2 \times CO₂CH₃), 52.8 (2 \times CH₂CO₂CH₃), 53.3 (2 \times CH₂CO₂CH₃), 57.3 (CH₃CHN₃), 69.5 (O-CH₂), 76.2 (O-CH), 104.4 (Ar-C), 114.6 (Ar-C), 115.8 (Ar-C), 115.9 (Ar-C), 116.4 (Ar-C), 118.6

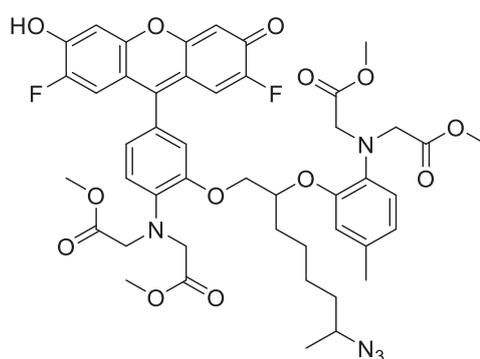


(Ar-C), 118.8 (Ar-C), 121.0 (Ar-C), 121.2 (Ar-C), 121.6 (Ar-C), 130.8 (Ar-C_{quart}), 136.5 (Ar-C_{quart}), 137.3 (Ar-C_{quart}), 137.5 (Ar-C_{quart}), 142.7 (Ar-C_{quart}), 142.8 (Ar-C_{quart}), 143.2 (Ar-C_{quart}), 145.0 (Ar-C_{quart}), 148.7 (Ar-C_{quart}), 149.5 (Ar-C_{quart}), 150.5 (Ar-C_{quart}), 171.0 (2×C_OCH₃), 171.1 (2×C_OCH₃) ppm.

ESI-MS *m/z* : 938.4 [M+H]⁺, 960.4 [M+Na]⁺, 976.4 [M+K]⁺.

HR-MS (ESI): ber. für C₄₆H₅₄F₂N₅O₁₄ ([M+H]⁺): 938.3630, gef.: 938.3633,
ber. für C₄₆H₅₃F₂N₅O₁₄Na ([M+Na]⁺): 960.3449, gef.: 960.3448.

Fluo-Azid-1 Methylester 38



38

C₄₆H₄₉F₂N₅O₁₃
917.92 g/mol

Verbindung **37** (192 mg, 205 μmol, 1.00 Äq.) wurde in Toluol (2 ml) und Essigsäure (2 ml) gelöst. Eine Lösung aus DDQ (93.0 mg, 409 μmol, 2.00 Äq.) in Toluol/Essigsäure (1 ml, 1:1, v/v) wurde tropfenweise zugegeben und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wurde das Produkt **38** (119 mg, 129 μmol, 63 %) nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (DCM:MeOH, 10:1) als oranger Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

DC: (DCM:MeOH, 10:1): *R_f* = 0.49.

¹H-NMR (500 MHz, D⁶-DMSO) : δ = 1.15 (dd, ³J_{H,H} = 6.5, 3.7 Hz, 3H, CH₃CHN₃), 1.29–1.45 (m, 6H, 3×CH₂), 1.59–1.73 (m, 2H, CH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 3.50 (s, 6H, 2×CH₂CO₂CH₃), 3.61 (s, 6H, 2×CH₂CO₂CH₃), 3.91–4.26 (m, 10H, 4×CH₂CO₂CH₃, O-CH₂), 4.52–4.60 (m, 1H, O-CH), 6.53–6.80 (m, 5H, 5×Ar-H), 6.87–6.98 (m, 5H, 5×Ar-H) ppm.

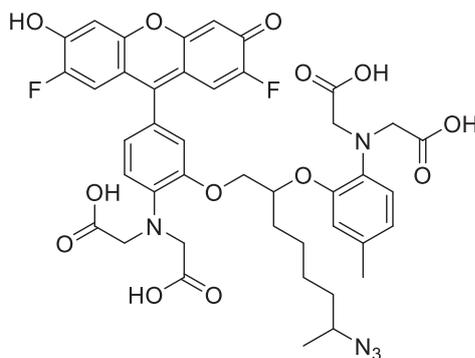


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{D}^6\text{-DMSO}$) : $\delta = 19.0$ (CH_3N_3), 20.2 (CH_3), 24.1 (CH_2), 25.4 (CH_2), 30.6 (CH_2), 35.2 (CH_2), 51.0 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$), 51.3 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$), 52.9 ($2\times\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 53.1 ($2\times\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 57.3 (CH_3CHN_3), 69.8 (O-CH_2), 76.3 (O-CH), 104.8 ($2\times\text{Ar-C}$), 114.6 (Ar-C), 116.7 (Ar-C), 116.8 (Ar-C), 118.0 (Ar-C), 118.9 (Ar-C), 121.7 (Ar-C), 122.4 (Ar-C), 124.1 ($2\times\text{Ar-C}$), 130.8 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 137.4 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 139.9 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 148.7 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 149.2 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 162.9 ($\text{Ar-C}_{\text{quart}}$), 170.9 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$), 171.1 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_3$) ppm.

ESI-MS m/z : 918.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 940.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 956.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 916.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{13}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 918.3368, gef.: 918.3363,
ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{49}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{13}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 940.3187, gef.: 940.3184,
ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{48}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{13}$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 916.3222, gef.: 916.3218.

Fluo-Azid1 (12)



12

$\text{C}_{42}\text{H}_{41}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{13}$
861.81 g/mol

Zu einer Lösung aus Verbindung **38** (5.00 mg, 5.45 μmol , 1.00 Äq.) in Methanol (1 ml) wurde eine Lösung aus KOH (30.0 mg, 545 μmol , 100 Äq.) in H_2O (0.2 ml) zu getropft. Die Reaktionsmischung wurde für 2 d bei RT gerührt. Anschließend wurde eine 1 M HCl-Lösung (5 ml) zugegeben, wobei ein brauner Feststoff ausfiel. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit kaltem H_2O (15 ml) gewaschen. Nach der Aufreinigung mittels semipräparativer RP-HPLC wurde das Produkt **12** (2.31 mg, 2.68 μmol , 49 %) als brauner Feststoff erhalten.

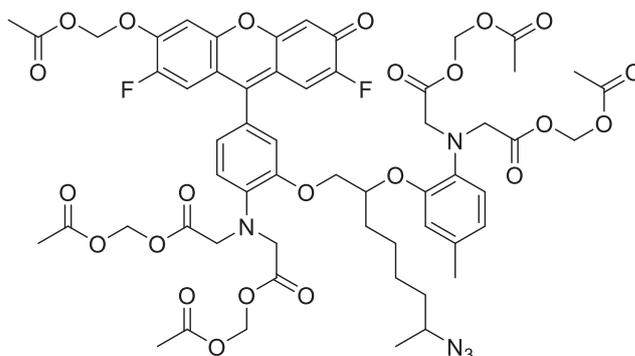
Analytische Daten:

HPLC (Gradient: 25 auf 90 % B in 30 min): $t_R = 19.7$ min.

ESI-MS m/z : 862.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 884.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 900.2 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{42}H_{42}F_2N_5O_{13}$ ($[M+H]^+$): 862.2742, gef.: 862.2716,
ber. für $C_{42}H_{41}F_2N_5O_{13}Na$ ($[M+Na]^+$): 884.2561, gef.: 884.2551.

Fluo-Azid-1 Acetoxymethyl-Ester 47



47

$C_{57}H_{61}F_2N_5O_{23}$
1221.3 g/mol

Verbindung **12** (4.00 mg, 4.64 μ mol, 1.00 Äq.) wurde unter Schutzgasatmosphäre in trockenem DMF (0.5 ml) gelöst. Zu der Lösung wurden $BrCH_2OAc$ (7.13 mg, 4.57 μ l, 46.6 μ mol, 10.0 Äq.) und DIPEA (133 μ l) zugegeben und die Reaktionslösung 2 d bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Ethylacetat (15 ml) gelöst und der dabei entstehende Feststoff abfiltriert. Das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (EtOAc) wurde das Produkt **47** (3.50 mg, 2.87 μ mol, 62 %) als brauner Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

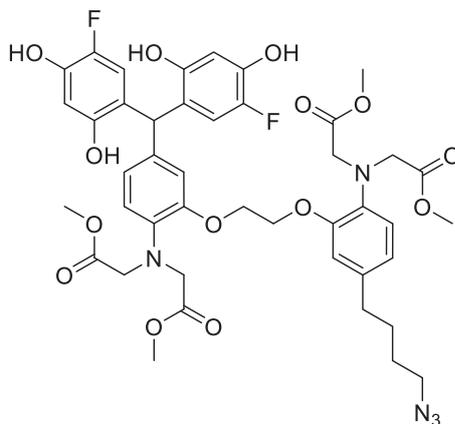
DC (EtOAc): $R_f = 0.49$.

ESI-MS m/z : 630.7 $[M+2K]^{2+}$, 1222.4 $[M+H]^+$, 1260.4 $[M+K]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{57}H_{63}F_2N_5O_{23}$ ($[M+2H]^{2+}$): 611.6935, gef.: 611.6940,
ber. für $C_{57}H_{61}F_2N_5O_{23}K$ ($[M+K]^{2+}$): 630.6715, gef.: 630.6710,
ber. für $C_{57}H_{61}F_2N_5O_{23}K_2$ ($[M+2K]^{2+}$): 649.6494, gef.: 649.6491,
ber. für $C_{57}H_{62}F_2N_5O_{23}$ ($[M+H]^+$): 1222.3798, gef.: 1222.3792,
ber. für $C_{57}H_{61}F_2N_5O_{23}K$ ($[M+K]^+$): 1260.3357, gef.: 1260.3355.



Fluo-Azid-2 Triarylmethan-Zwischenstufe 39



39

$C_{43}H_{47}F_2N_5O_{14}$
895.87 g/mol

Verbindung **11** (200 mg, 304 μmol , 1.00 Äq.) und 4-Fluororesorcinol (**34**) (78.0 mg, 609 μmol , 2.00 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in DCM/Diethylether (4 ml, 1:1, v/v) gelöst. Nach der Zugabe von Methansulfonsäure (8 vol%, 320 μl) wurde die Lösung für 20 h bei RT gerührt. Zu der Lösung wurde ges. NaHCO_3 -Lösung zugegeben und die organische Phase mit DCM (15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (20 ml) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (DCM:MeOH:AcOH, 10:1:0.01) das Produkt **39** (124 mg, 138 μmol , 46 %) als orangenen Farbstoff.

Analytische Daten:

DC (DCM:MeOH:AcOH, 10:1:0.01): $R_f = 0.32$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{D}^6\text{-DMSO}$): $\delta = 1.49\text{--}1.64$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.50 (t, 2H, CH_2), 3.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2H, CH_2N_3), 3.44 (s, 6H, $2\times\text{COOCH}_3$), 3.47 (s, 6H, $2\times\text{COOCH}_3$), 4.03 (s, 4H, $2\times\text{COOCH}_2$), 4.06 (s, 4H, $2\times\text{COOCH}_2$), 4.10–4.14 (m, 4H, $2\times\text{O-CH}_2$), 5.67 (s, 1H, CH), 6.29 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 12.5$ Hz, 2H, $2\times\text{Ar-H}$), 6.41 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.7, 15.0$ Hz, 3H, $3\times\text{Ar-H}$), 6.54–6.75 (m, 5H, $5\times\text{Ar-H}$), 9.30 (bs, 4H, $4\times\text{Ar-OH}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{D}^6\text{-DMSO}$): $\delta = 27.8$ (CH_2), 28.0 (CH_2), 34.0 (CH_2), 41.2 (CH), 50.4 (CH_2N_3), 51.0 ($2\times\text{COOCH}_3$), 51.1 ($2\times\text{COOCH}_3$), 52.9 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 53.0 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 66.8 (OCH₂), 66.9 (OCH₂), 104.4 (Ar-C), 113.2 (Ar-C), 113.5 (Ar-C), 115.7 (Ar-C), 115.8 (Ar-C), 117.3 (Ar-C), 117.6 (Ar-C), 120.4 (Ar-C), 120.8 (Ar-C),

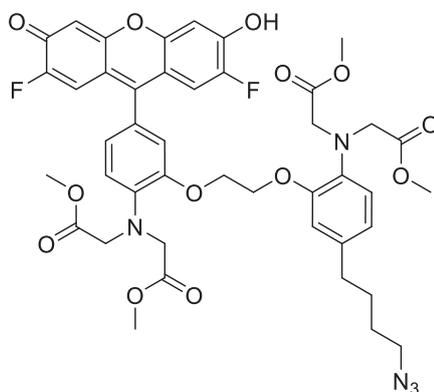


120.9 (Ar-C), 134.7 (Ar-C_{quart}), 136.4 (Ar-C_{quart}), 136.5 (Ar-C_{quart}), 137.0 (Ar-C_{quart}), 142.6 (Ar-C_{quart}), 142.7 (Ar-C_{quart}), 143.0 (Ar-C_{quart}), 149.1 (Ar-C_{quart}), 149.3 (Ar-C_{quart}), 150.4 (Ar-C_{quart}), 150.4 (Ar-C_{quart}), 171.0 (2×CO₂CH₂), 171.1 (2×CO₂CH₂) ppm.

ESI-MS m/z : 896.3 [M+H]⁺, 918.3 [M+Na]⁺, 934.3 [M+K]⁺, 894.4 [M-H]⁻.

HR-MS (ESI): ber. für C₄₃H₄₈F₂N₅O₁₄ ([M+H]⁺): 896.3160, gef.: 896.3153,
ber. für C₄₃H₄₇F₂N₅O₁₄Na ([M+Na]⁺): 918.2980, gef.: 918.2982,
ber. für C₄₃H₄₇F₂N₅O₁₄K ([M+K]⁺): 934.2712, gef.: 934.2719,
ber. für C₄₃H₄₆F₂N₅O₁₄ ([M-H]⁻): 894.3015, gef.: 894.3009.

Fluo-Azid-2 Methylester 40



40

C₄₃H₄₃F₂N₅O₁₃
875.84 g/mol

Verbindung **39** (160 mg, 179 μmol, 1.00 Äq.) wurde in Toluol/AcOH (4 ml, 1:1, v/v) gelöst und eine Lösung aus DDQ (81.0 mg, 358 μmol, 2.00 Äq.) in Toluol/AcOH (4 ml, 1:1, v/v) wurde zu getropft. Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **40** (52.3 mg, 59.7 μmol, 33 %) wurde nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (DCM:MeOH, 10:1) als oranger Feststoff erhalten.



Analytische Daten:

DC (DCM:MeOH, 10:1): $R_f = 0.58$.

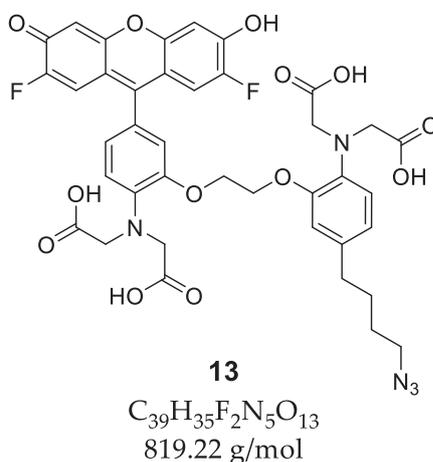
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{D}^6\text{-DMSO}$) : $\delta = 1.51\text{--}1.60$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.50 (verdeckt durch Lösungsmittelsignal, 2H, CH_2), 3.33 (verdeckt durch H_2O , 2H, CH_2N_3), 3.43 (s, 6H, $2\times\text{COOCH}_3$), 3.47 (s, 6H, $2\times\text{COOCH}_3$), 4.02 (s, 4H, $2\times\text{COOCH}_2$), 4.06 (s, 4H, $2\times\text{COOCH}_2$), 4.10–4.20 (m, 4H, $2\times\text{O-CH}_2$), 6.27–7.00 (m, 10H, $10\times\text{Ar-H}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{D}^6\text{-DMSO}$) : $\delta = 27.8$ (CH_2), 28.0 (CH_2), 33.9 (CH_2), 50.4 (CH_2N_3), 51.0 ($2\times\text{COOCH}_3$), 51.1 ($2\times\text{COOCH}_3$), 52.9 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 53.0 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 66.8 (OCH_2), 66.9 (OCH_2), 104.4 (Ar-C), 113.3 ($2\times\text{Ar-C}$), 117.2 (Ar-C), 117.4 (Ar-C), 117.6 (Ar-C), 117.8 (Ar-C), 120.5 (Ar-C), 121.0 (Ar-C), 134.8 (Ar-C), 135.0 (Ar-C), 136.5 (Ar-C), 136.7 (Ar-C), 137.1 (Ar-C), 142.7 (Ar-C), 142.8 (Ar-C), 143.1 (Ar-C), 145.0 (Ar-C), 149.0 (Ar-C), 149.3 (Ar-C), 149.4 (Ar-C), 149.5 (Ar-C), 150.6 (Ar-C), 171.2 (CO_2CH_2), 171.3 ($2\times\text{CO}_2\text{CH}_2$), 171.3 (CO_2CH_2) ppm.

ESI-MS m/z : 876.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 898.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{43}\text{H}_{44}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{13}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 876.2898, gef.: 876.2872,
ber. für $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{13}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 898.2718, gef.: 898.2694,
ber. für $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{13}\text{K}$ ($[\text{M}+\text{K}]^+$): 914.2457, gef.: 914.2439.

Fluo-Azid-2 (13)



Fluo-Azid-2 Methylester **40** (40.0 mg, 46.0 μmol , 1.00 Äq.) wurde in Methanol (4 ml) gelöst. Eine Lösung aus Kaliumhydroxid (256 mg, 4.57 mmol, 100 Äq.) in H_2O (1.5 ml) wurde zugegeben und die Lösung bei RT für 24 h gerührt. Anschließend wurde eine 1 M HCl-Lösung (5 ml) zugegeben, wobei ein brauner Feststoff ausfiel. Der Feststoff wurde

abfiltriert und mit kaltem H₂O (15 ml) gewaschen. Nach Aufreinigung mittels semipräparativer RP-HPLC wurde das Produkt **13** (21.0 mg, 26.0 μmol, 56 %) als brauner Feststoff erhalten.

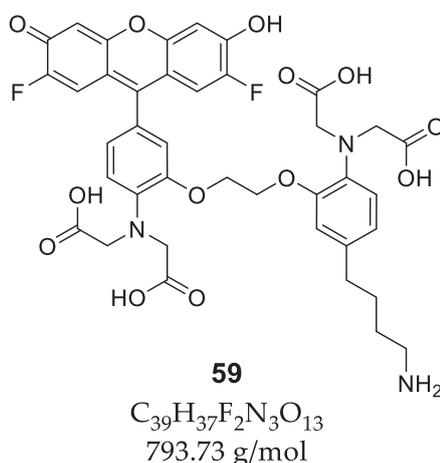
Analytische Daten:

HPLC (Gradient: 25 auf 90 % B in 30 min): $t_R = 18.2$ min.

ESI-MS m/z : 820.2 [M+H]⁺, 842.2 [M+Na]⁺.

HR-MS (ESI): ber. für C₃₉H₃₆F₂N₅O₁₃ ([M+H]⁺): 820.2272, gef.: 820.2264,
ber. für C₃₉H₃₅F₂N₅O₁₃Na ([M+Na]⁺): 842.2092, gef.: 842.2078,
ber. für C₃₉H₃₅F₂N₅O₁₃K ([M+K]⁺): 858.1831, gef.: 858.1810.

Fluo-Amin-2 (**59**)



Fluo-Azid-2 (**13**) (5.00 mg, 6.11 μmol, 1.00 Äq.) wurde in Tetrahydrofuran (0.5 ml) und H₂O (0.5 ml) gelöst. Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid (10.0 mg, 34.9 μmol, 6.00 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktionslösung bei RT für 24 h unter Lichtausschluss in einem Mikroreaktionsgefäß maschinell geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und lyophilisiert. Fluo-Amin-2 **59** (2.50 mg, 3.15 μmol, 52 %) wurde nach einer Aufreinigung mittels RP-HPLC als brauner Feststoff erhalten.

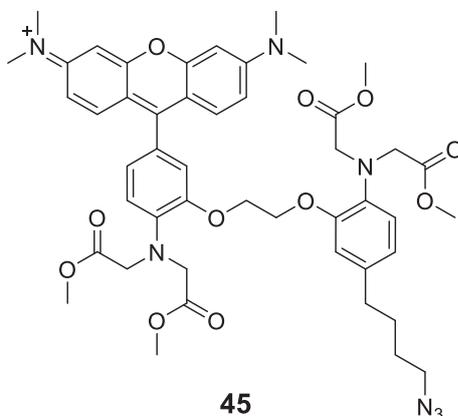
Analytische Daten:

HPLC (Gradient: 10 auf 90 % B in 30 min): $t_R = 15.9$ min.

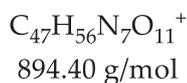


5.6.4 Rhodamin-basierte Calcium-Sensoren

Rhod-2-Azid Methylester 45



45



Zu einer Lösung aus Verbindung **11** (100 mg, 150 μmol , 1.00 Äq.) in Propionsäure (1.5 ml) wurden *m*-Dimethylaminophenol (63.0 mg, 460 μmol , 3.00 Äq.) und eine katalytische Menge *p*-TsOH (5.0 mg) zugegeben. Die Mischung wurde bei 65 °C für 21 h gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde eine Lösung aus *p*-Chloranil (38.0 mg, 150 μmol , 1.00 Äq.) in DCM (3.0 ml) zugegeben. Die Lösung wurde für 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde ges. NaHCO_3 -Lösung (10 ml) zugegeben und mit DCM (15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt **45** (55.0 mg, 6.00 μmol , 40 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (DCM:MeOH, 10:1) als violetter Farbstoff erhalten.

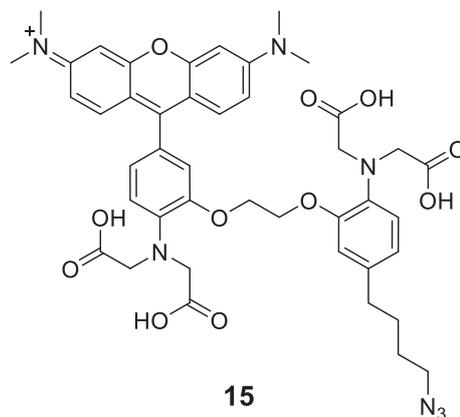
Analytische Daten:

DC (DCM:MeOH, 10:1): $R_f = 0.35$.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D^6 -DMSO, 80 °C): $\delta = 1.52\text{--}1.62$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2.50 (2H, CH_2 , verdeckt von DMSO), 3.29–3.31 (m, 8H, CH_2 , $2\times\text{N-CH}_3$), 3.51 (s, 6H, $2\times\text{COOCH}_3$), 3.62 (s, 6H, $2\times\text{COOCH}_3$), 4.03 (s, s, 4H, $2\times\text{COOCH}_2$), 4.24–4.29 (m, 8H, $2\times\text{COOCH}_2$, $2\times\text{O-CH}_2$), 6.66–7.14 (m, 11H, $11\times\text{Ar-H}$) ppm.

ESI-MS m/z : 894.4 [M].

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{N}_7\text{O}_{11}^+$ ([M] $^+$): 894.4032, gef.: 894.4034.

**Rhod-2-Azid (15)****15** $C_{43}H_{48}N_7O_{11}^+$
838.89 g/mol

Zu einer Lösung aus Verbindung **45** (30.0 mg, 33.5 μmol , 1.00 Äq.) in Methanol (4.0 ml) wurde eine Lösung aus KOH (188 mg, 3.35 mmol, 100 Äq.) in H_2O (1.5 ml) zu getropft. Die Reaktionslösung wurde für 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde eine 1 M HCl-Lösung (10 ml) zugegeben und mit DCM (15 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Produkt **15** (13.9 mg, 16.6 μmol , 49 %) wurde nach einer Aufreinigung durch RP-HPLC als roter Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

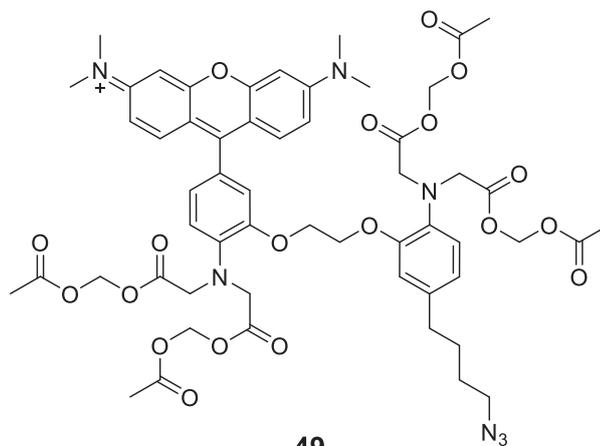
HPLC (Gradient: 20 auf 80 % B in 30 min): $t_R = 23.8$ min.

ESI-MS $m/z = 838.4$ [M].

HR-MS (ESI): ber. für $C_{43}H_{48}N_7O_{11}^+$ ([M]⁺): 838.3406, gef.: 838.3400.



Rhod-Azid Acetoxymethyl-Ester 49



49

$C_{55}H_{64}N_7O_{19}^+$
1126.43 g/mol

Verbindung **15** (1.10 mg, 1.31 μ mol, 1.00 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in einem Mikroreaktionsgefäß in trockenem DMF (200 μ l) gelöst. Anschließend wurden Br_2CH_2OAc (2.00 mg, 1.28 μ l, 13.1 μ mol, 10.0 Äq.) und DIPEA (50 μ l) zugegeben und die Reaktionslösung 2 d bei RT und unter Lichtausschluss maschinell geschüttelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte eine säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (DCM:MeOH, 10:1) das Produkt **49** (700 μ g, 621 nmol, 48 %) als roten Feststoff.

Analytische Daten:

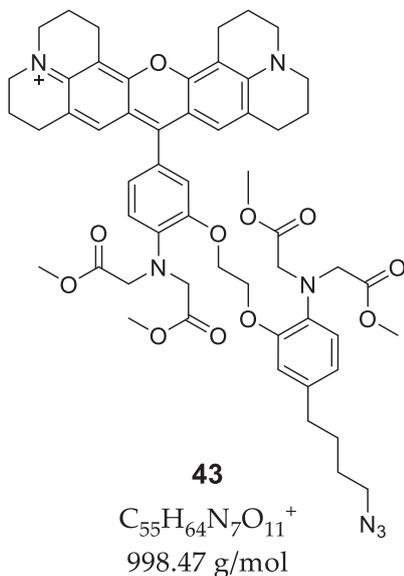
DC (DCM:MeOH, 10:1): $R_f = 0.43$.

ESI-MS m/z : 1126.5 [M].

HR-MS (ESI): ber. für $C_{55}H_{64}N_7O_{19}^+$ ([M]⁺): 1126.4251, gef.: 1126.4255.



X-Rhod-Azid Methylester 43



Zu einer Lösung aus Verbindung **11** (100 mg, 152 μ mol, 1.00 Äq.) in Propionsäure (2.5 ml) wurde 8-Hydroxyjulolidin (57.5 mg, 304 μ mol, 2.00 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäure (3.00 mg, 15.2 μ mol, 0.10 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus *p*-Chloranil (37.4 mg, 152 μ mol, 1.00 Äq.) in DCM (5.0 ml) zugegeben und erneut für 24 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Zu der Reaktionsmischung wurde ges. NaHCO₃-Lösung (10 ml) zugegeben und mit DCM (20 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit H₂O (20 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Produkt **43** (150 mg, 150 μ mol, 98 %) wurde nach dem Entfernen des Lösungsmittels als violetter Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

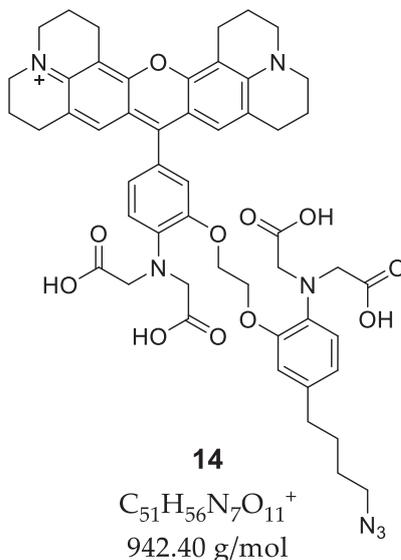
DC (DCM:Methanol, 5:1): $R_f = 0.36$.

ESI-MS m/z : 998.5 [M]⁺.

HR-MS (ESI): ber. für C₅₅H₆₄N₇O₁₁⁺ ([M]⁺): 998.4658, gef.: 998.45659.



X-Rhod-Azid (**14**)



Zu einer Lösung aus Verbindung **43** (150 mg, 150 μ mol, 1.00 Äq.) in Methanol (9 ml) wurde eine Lösung aus Kaliumhydroxid (840 mg, 15.0 mmol, 100 Äq.) in H₂O (3 ml) zu getropft. Die Lösung wurde bei RT für 24 h unter Ausschluss von Licht gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit einer 1M HCl-Lösung gewaschen (10 ml) und mit DCM extrahiert (20 ml), bis sich die rötliche wässrige Phase entfärbt hatte. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Produkt **14** (98.4 mg, 100 μ mol, 67 %) wurde nach einer Aufreinigung durch RP-HPLC als roter Farbstoff erhalten.

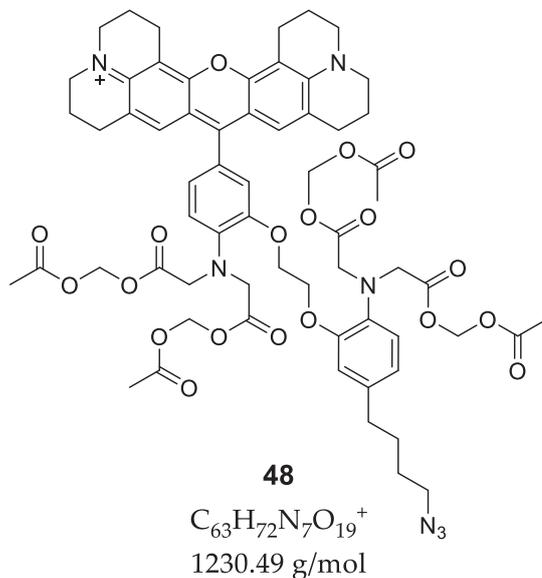
Analytische Daten:

HPLC (Gradient: 50 auf 80 % B in 30 min): $t_R = 21.6$ min.

ESI-MS m/z : 942.4 [M]⁺.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{51}H_{56}N_7O_{11}^+$ ([M]⁺): 942.4032, gef.: 942.4032.

X-Rhod-Azid Acetoxymethyl-Ester **48**



X-Rhod-Azid (**14**) (600 μ g, 640 nmol, 1.00 Äq.) wurde unter Schutzgas in trockenem DMF (0.2 ml) gelöst. Essigsäurebrommethylester (3.12 mg, 2.00 μ l, 20.3 μ mol, 32.0 Äq.) und DIPEA (37.1 mg, 50.0 μ l, 288 μ mol, 449 Äq.) wurde zugegeben und die Lösung für 2 d bei RT unter Ausschluss von Licht in einem Mikroreaktionsgefäß geschüttelt. Das Produkt **48** (500 μ g, 410 nmol, 63 %) wurde nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (DCM:Methanol, 6:1) als roter Farbstoff erhalten.

Analytische Daten:

DC (DCM:Methanol, 6:1): $R_f = 0.63$.

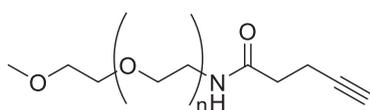
ESI-MS m/z : 1230.5 [M]⁺.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{63}H_{72}N_7O_{19}^+$ ([M]⁺): 1230.4877, gef.: 1230.4874.

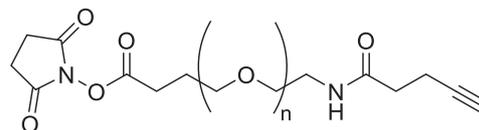


5.6.5 PEGylierung der Calcium-Sensoren

Für die PEGylierung wurden Alkin- (**50** und **51**) bzw. Alkin- und *N*-Hydroxysuccinimid-funktionalisierte (**57** und **58**) PEG-Derivate der Firma *Iris Biotech* mit den mittleren molaren Massen von 5000 und 10000 g/mol verwendet:



50 5000 g/mol
51 10000 g/mol



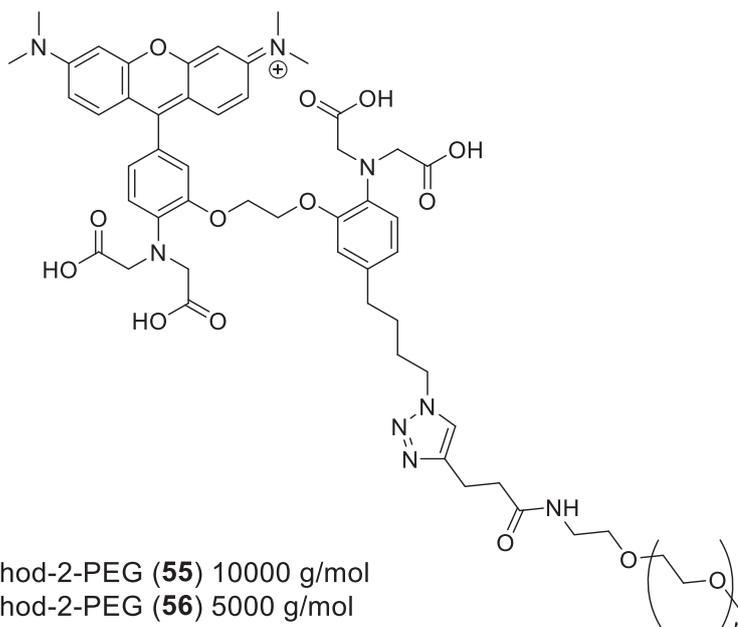
57 5000 g/mol
58 10000 g/mol

Funktionalisierung durch Click-Reaktion (Huisgen-Reaktion)

Angelehnt an Mallet *et al.* wurden das Alkin-funktionalisierte PEG **50** oder **51** (1 Äq.) und der jeweilige Calcium-Sensor **12**, **13** oder **15** (2 bzw. 3 Äq.) in Methanol gelöst.^[85] Anschließend wurde eine heterogene Mischung aus $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (20 Äq.) und Natriumascorbat (25 Äq.) in bidestilliertem Wasser zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT in einem Mikroreaktionsgefäß und Ausschluss von Licht für 24 h geschüttelt. Die organische Phase wurde mit DCM extrahiert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgte anschließend durch eine Filtration über Sephadex-G50 oder durch RP-HPLC. Die entstandenen PEG-Sensor-Konjugate wurden durch MALDI-MS nachgewiesen. Die durchgeführten Reaktionen mit den jeweiligen Bedingungen sind in der nachfolgenden Tabelle 5.3 aufgeführt.

Tabelle 5.3 Durchgeführte Click-Reaktionen.

| Ca ²⁺ - Sensor | PEG | CuSO ₄ × 5H ₂ O | Natrium- ascorbat | MeOH: H ₂ O | Aufreinigung | Produkt |
|------------------------------|---------------------|--|----------------------|---------------------------|--------------|-------------------------------------|
| 0.4 mg 12 | 2.7 mg 51 | 1.2 mg | 1.2 mg | 200:50 µl | Sephadex-G50 | Fluo-1-PEG 52 10000 g/mol |
| 0.5 mg 13 | 2.0 mg 51 | 1.0 mg | 1.0 mg | 400:100 µl | RP-HPLC | Fluo-2-PEG 53 10000 g/mol |
| 0.5 mg 15 | 2.0 mg 51 | 1.0 mg | 1.0 mg | 400:100 µl | RP-HPLC | Rhod-2-PEG 55 10000 g/mol |
| 0.9 mg 13 | 1.8 mg 50 | 1.8 mg | 1.8 mg | 400:100 µl | RP-HPLC | Fluo-2-PEG 54 5000 g/mol |
| 1.0 mg 15 | 2.0 mg 50 | 2.0 mg | 2.0 mg | 400:100 µl | RP-HPLC | Rhod-2-PEG 56 5000 g/mol |



Mit zwei Calcium-Sensoren funktionalisierte PEG-Derivate

Das NHS- und Alkin-funktionalisierte PEG **57** bzw. **58** (0.8 Äq.), der reduzierte Ca-Sensor **59** (1.0 Äq.) und Triethylamin (TEA) wurden unter Schutzgas in trockenem DMF gelöst und für 24 h unter Lichtausschluss bei RT in einem Mikroreaktionsgefäß geschüttelt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das PEG-Calcium-Sensor-Konjugat durch RP-HPLC aufgereinigt. Für die Anbringung des zweiten Calcium-Sensors wurde Rhod-2-Azid (**15**) (2 Äq.) mit dem PEG-Sensor-Konjugat nach der oben beschriebenen Click-Reaktion umgesetzt und anschließend erneut durch RP-HPLC aufgereinigt. Die Reaktionsbedingungen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 5.4 Durchgeführte Reaktionen mit NHS-PEG-Alkin **57** und **58**.

| Ca-Sensor | PEG | TEA | DMF | Produkt |
|------------------|------------------|-------|--------|---|
| 0.5 mg 59 | 5.0 mg 58 | 50 µl | 0.5 ml | Fluo-2-PEG-Alkin 104 10000 g/mol |
| 0.5 mg 59 | 2.5 mg 57 | 50 µl | 0.5 ml | Fluo-2-PEG-Alkin 105 5000 g/mol |

Tabelle 5.5 Durchgeführte Click-Reaktion.

| Ca-Sensor | PEG-Derivat | CuSO ₄ ·5H ₂ O | Natrium-ascorbat | MeOH: H ₂ O | Produkt |
|------------------|-------------------|--------------------------------------|------------------|---------------------------|--|
| 1.3 mg 15 | 2.5 mg 105 | 2.5 mg | 2.5 mg | 400:100 µl | Fluo-2-PEG-Rhod-2 60 5000 g/mol |
| 0.3 mg 15 | 1.5 mg 104 | 0.3 mg | 0.3 mg | 400:100 µl | Fluo-2-PEG-Rhod-2 61 10000 g/mol |

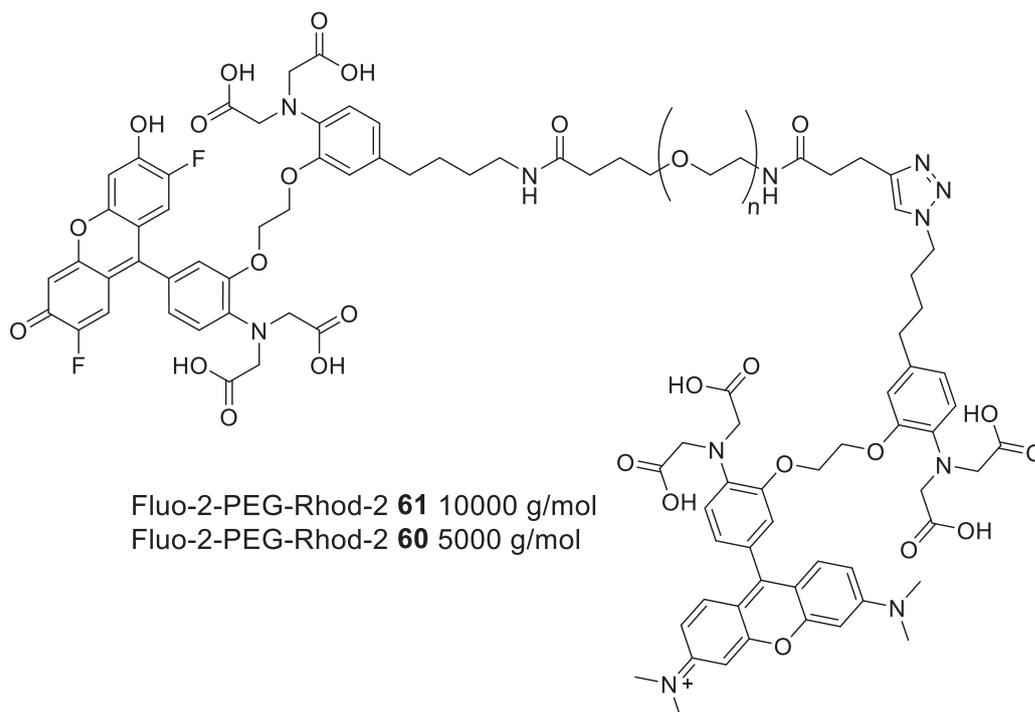
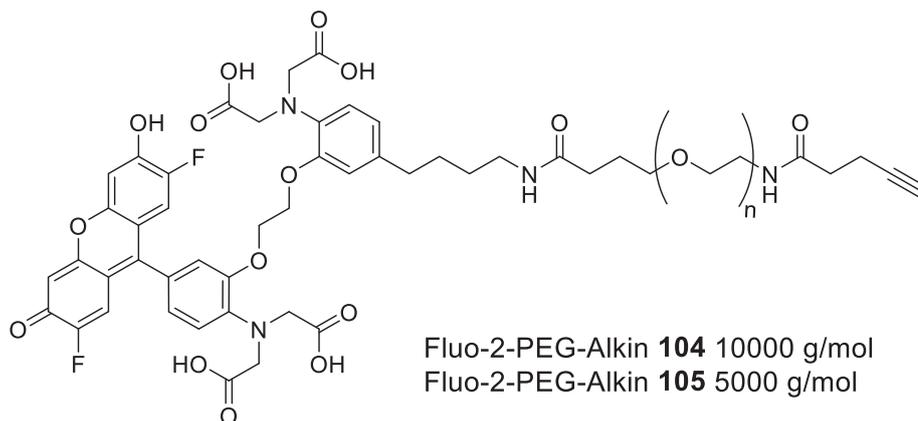
HPLC-Aufreinigung

Fluo-2-PEG-Alkin (**104**): Gradient: 10 auf 90 % B in 30 min, $t_R = 19.5$ min.

Fluo-2-PEG-Alkin (**105**): Gradient: 10 auf 90 % B in 30 min, $t_R = 19.7$ min.

Fluo-2-PEG-Rhod-2 (**60**): Gradient: 10 auf 90 % B in 30 min, $t_R = 26.9-29.6$ min.

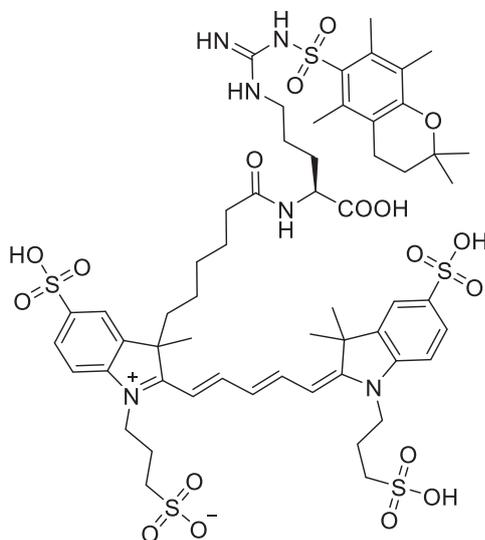
Fluo-2-PEG-Rhod-2 (**61**): Gradient: 10 auf 90 % B in 30 min, $t_R = 26.5-29.3$ min.



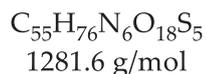


5.6.6 Fluorophor-markiertes Arginin

Alexa647-Arg(Pmc)-OH (**68**)



68



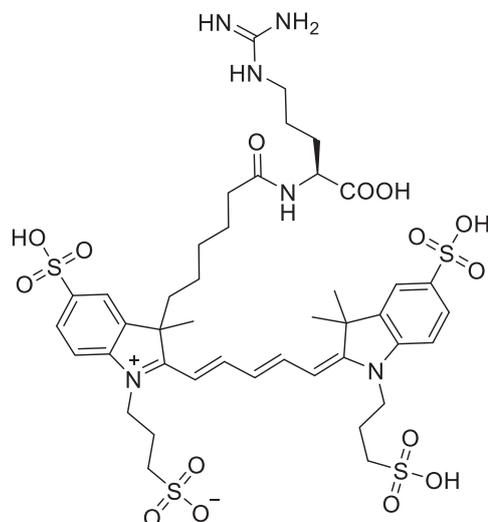
H-Arg(Pmc)-OH (**66**) (300 μg , 700 nmol, 1.30 Äq.) wurde unter Schutzgas in trockenem DMF (1.0 ml) gelöst. Anschließend wurden Triethylamin (100 μl) und Alexa647-NHS-Ester (**67**) (500 μg , 500 nmol, 1.00 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 16 h in einem Mikroreaktionsgefäß unter Lichtausschluss maschinell geschüttelt. Nach der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **68** wurde nach einer Reinigung durch RP-HPLC als blauer Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (Gradient: 5 auf 60 % B in 30 min): $t_R = 25.9$ min.

ESI-MS m/z : 425.6 [M-3H]³⁻, 639.0 [M-2H]²⁻.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{73}\text{N}_6\text{O}_{18}\text{S}_5$ ([M-3H]³⁻): 425.7867, gef.: 425.7866,
ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{74}\text{N}_6\text{O}_{18}\text{S}_5$ ([M-2H]²⁻): 639.1837, gef.: 639.1865.

Alexa647-Arg-OH (**62**)**62**

$$\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{S}_4$$

$$1015.2 \text{ g/mol}$$

Alexa647-Arg(Pmc)-OH (**68**) wurde in Trifluoressigsäure (200 μl) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch Einleiten eines Stickstoffstroms entfernt. Das Produkt **62** wurde nach einer Reinigung durch RP-HPLC als blauer Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

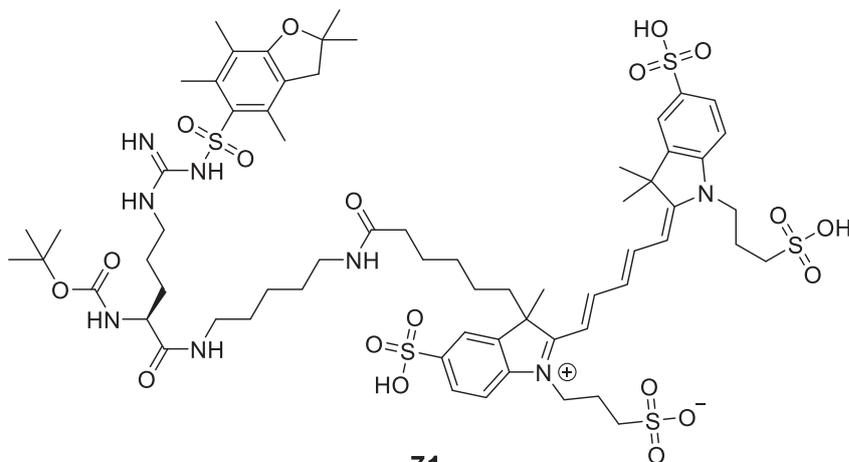
HPLC (Gradient: 5 auf 60 % B in 30 min): $t_R = 14.5$ min.

ESI-MS m/z : 506.1 $[\text{M}-2\text{H}]^2$, 1013.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{S}_4$ ($[\text{M}-3\text{H}]^3$): 337.0875, gef.: 337.0994,
ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{S}_4$ ($[\text{M}-2\text{H}]^2$): 506.1349, gef.: 506.1395,
ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{S}_4$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 1013.2770, gef.: 1013.3004.



Boc-Arg(Pbf)-Alexa647 (71)



71

$C_{65}H_{94}N_8O_{19}S_5$
1451.8 g/mol

Alexa647-Amin (**69**) (500 μ g, 530 nmol, 1.00 \ddot{A} q.), Boc-Arg(Pbf)-OH (**70**) (560 μ g, 1.06 μ mol, 2.00 \ddot{A} q.) und PyBOP (1.10 mg, 2.12 μ mol, 4.00 \ddot{A} q.) wurden unter Schutzgas in trockenem DFM (500 μ l) gelöst. Nach der Zugabe von DIPEA (5 μ l) wurde die Lösung unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 3 d in einem Mikroreaktionsgefäß geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **71** wurde durch eine Reinigung mittels RP-HPLC als blauer Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

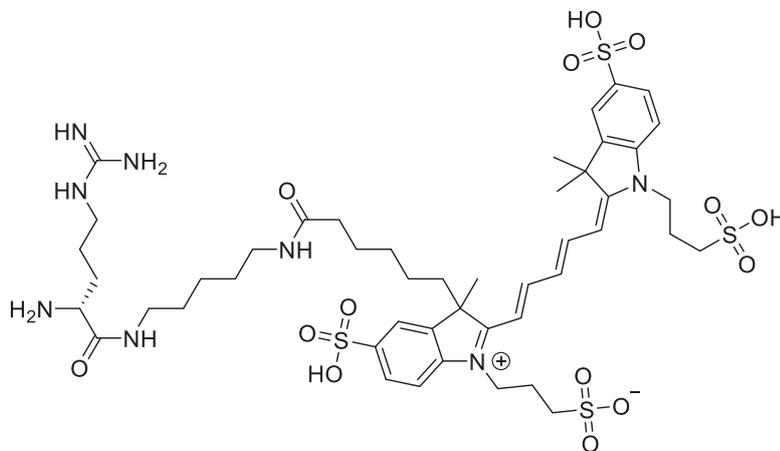
HPLC (Gradient: 5 auf 60 % B in 30 min): $t_R = 27.5$ min.

ESI-MS m/z : 482.5 $[M-H]^{3-}$, 1451.6 $[M+H]^+$, 1473.5 $[M+Na]^+$.

HR-MS (ESI):ber. für $C_{65}H_{91}N_8O_{19}S_5$ ($[M-3H]^{3-}$): 482.5007, gef.: 482.5012,
ber. für $C_{65}H_{94}N_8O_{19}S_5Na_2$ ($[M+2Na]^{2+}$): 748.2512, gef.: 748.2511,
ber. für $C_{65}H_{95}N_8O_{19}S_5$ ($[M+H]^+$): 1451.5312, gef.: 1451.5325,
ber. für $C_{65}H_{94}N_8O_{19}S_5Na$ ($[M+Na]^+$): 1473.5131, gef.: 1473.5138.



H-Arg-Alexa647 (63)



63

$C_{47}H_{70}N_8O_{14}S_4$
1099.3 g/mol

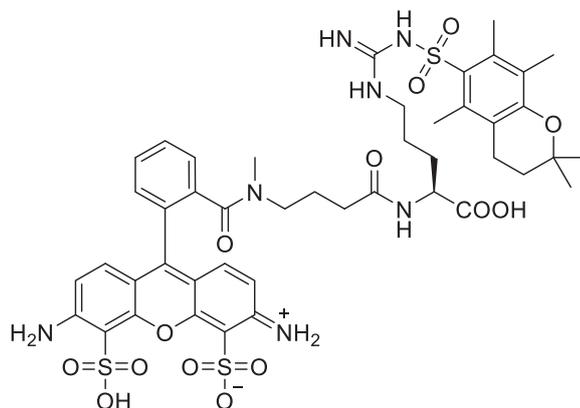
Boc-Arg(Pbf)-Alexa647 (**71**) wurde in 95%-ger Trifluoressigsäure (200 μ l) gelöst und in einem Mikroreaktionsgefäß für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde anschließend durch Einleiten eines Stickstoffstroms an die Oberfläche entfernt. Das Produkt **63** wurde nach einer Reinigung mittels RP-HPLC als blauer Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (Gradient: 5 auf 60 % B in 30 min): $t_R = 13.0$ min.

ESI-MS m/z : 548.2 $[M-2H]^{2-}$, 1097.4 $[M-H]^-$, 1099.4 $[M+H]^+$, 1121.4 $[M+Na]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{47}H_{68}N_8O_{14}S_4$ ($[M-2H]^{2+}$): 548.1874, gef.: 548.1886,
ber. für $C_{47}H_{72}N_8O_{14}S_4$ ($[M+2H]^{2+}$): 550.2020, gef.: 550.2019,
ber. für $C_{47}H_{70}N_8O_{14}S_4Na_2$ ($[M+2Na]^{2+}$): 572.1839, gef.: 572.1833,
ber. für $C_{47}H_{69}N_8O_{14}S_4$ ($[M-H]^-$): 1097.3822, gef.: 1097.3848,
ber. für $C_{47}H_{71}N_8O_{14}S_4$ ($[M+H]^+$): 1099.3967, gef.: 1099.3971,
ber. für $C_{47}H_{70}N_8O_{14}S_4Na$ ($[M+Na]^+$): 1121.3787, gef.: 1121.3788.


ATTO488-Arg(Pmc)-OH (106)

106
 $C_{45}H_{53}N_7O_{14}S_3$
 1011.3 g/mol

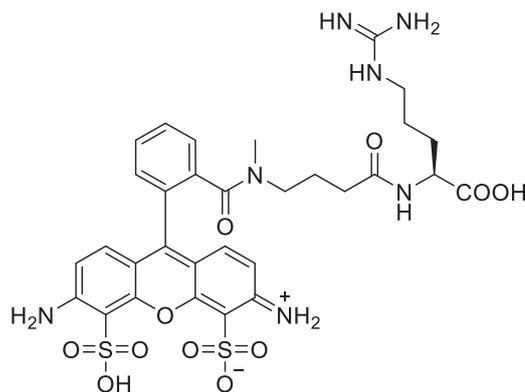
ATTO488-NHS-Ester (1.00 mg, 1.02 μmol , 1.00 Äq.) und H-Arg(Pmc)-OH (900 μg , 2.04 μmol , 2.00 Äq.) wurden unter Schutzgas in trockenem DMF (400 μl) gelöst. Nach der Zugabe von DIPEA (10 μl) wurde die Reaktionslösung unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 16 h in einem Mikroreaktionsgefäß geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **106** wurde nach einer Reinigung mittels RP-HPLC als oranger Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (Gradient: 5 auf 60 % B in 30 min): $t_R = 26.4$ min.

ESI-MS m/z : 1012.3 $[M+H]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{45}H_{54}N_7O_{14}S_3$ ($[M+H]^+$): 1012.2885, gef.: 1012.2897.

ATTO488-Arg-OH (64)**64**

$$\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}_2$$

$$745.8 \text{ g/mol}$$

ATTO488-Arg(Pmc)-OH (**106**) wurde in 95%iger Trifluoressigsäure (200 μl) gelöst und für 1 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure durch Einleiten eines Stickstoffstroms an die Oberfläche entfernt. Das Produkt **64** wurde nach einer Reinigung mittels RP-HPLC als oranger Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

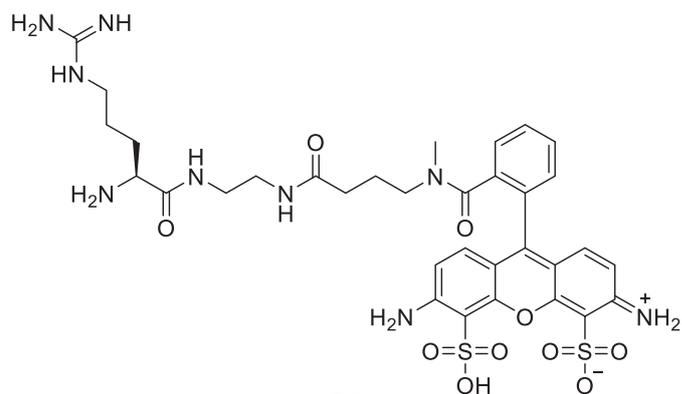
HPLC (Gradient: 5 auf 60 % B in 30 min): $t_R = 13.4$ min.

ESI-MS m/z : 744.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 746.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 768.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 746.1909, gef.: 746.1915,
ber. für $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_{11}\text{S}_2\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 768.1728, gef.: 768.1738.



H-Arg-ATTO488 (65)



65

$C_{33}H_{41}N_9O_{10}S_2$
787.2 g/mol

Boc-Arg(Pbf)-ATTO488 (**107**) wurde in 95%iger Trifluoressigsäure (200 μ l) gelöst und für 1 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure durch Einleiten eines Stickstoffstroms an die Oberfläche entfernt. Das Produkt **65** wurde nach einer Reinigung an RP-HPLC als oranger Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (Gradient: 5 auf 60 % B in 30 min): $t_R = 14.2$ min.

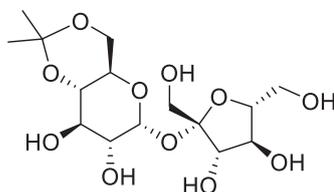
ESI-MS m/z : 786.8 [M-H]⁻, 788.3 [M+H]⁺, 810.3 [M+Na]⁺, 826.2 [M+K]⁺.

HR-MS (ESI):
ber. für $C_{33}H_{40}N_9O_{10}S_2$ ([M-H]⁻): 786.2345, gef.: 786.2359,
ber. für $C_{33}H_{42}N_9O_{10}S_2$ ([M+H]⁺): 788.2491, gef.: 788.2488,
ber. für $C_{33}H_{41}N_9O_{10}S_2Na$ ([M+Na]⁺): 810.2310, gef.: 810.2312.



5.6.7 Fluorophor-markierte Saccharose

4,6-*O*-Iso-propylidensaccharose (73)^[148]



73

$C_{15}H_{26}O_{11}$
382.36 g/mol

D(+)-Saccharose (72) (4.00 g, 11.7 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Schutzgas in trockenem DMF (20 ml) suspendiert. Die Mischung wurde auf 80 °C erhitzt und solange gerührt bis eine klare Lösung entstanden ist. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wurden 2,2-Dimethoxypropan (12.8 g, 15.0 ml, 37.4 mmol, 3.20 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäure (25.0 mg, 145 µmol, 0.01 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde für 80 min bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt **73** (2.10 g, 5.50 mmol, 47 %) wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (DCM:Methanol, 5:1) als weißer Feststoff erhalten. Die säulenchromatographische Aufreinigung musste direkt nach der Reaktion erfolgen, da die Ausbeute sonst um 50 % sank.

Analytische Daten:

DC (DCM:MeOH, 5:1): $R_f = 0.18$.

$[\alpha]_D^{20} = +46$ ($c = 1$, MeOH), Lit.^[205]: $+45.4$ ($c = 1$, MeOH).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) : $\delta = 1.37$ (s, 3H, CH₃), 1.49 (s, 3H, CH₃), 3.44–3.55 (m, 3H, 2×CH, OH), 3.59 (d, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.62–3.94 (m, 10H, 2×CH₂, 3×CH, 4×OH), 4.00–4.14 (m, 3H, 2×CH, OH), 5.36 (d, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, 1H, CH) ppm.

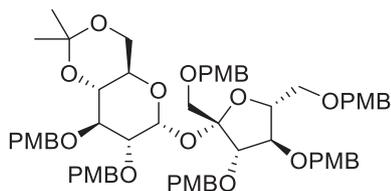
¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) : $\delta = 19.3$ (CH₃), 29.4 (CH₃), 62.9 (CH₂), 63.2 (CH₂), 63.7 (CH₂), 65.4 (CH), 71.9 (CH), 73.8 (CH), 75.1 (CH), 75.1 (CH), 78.9 (CH), 83.7 (CH), 94.2 (CH), 100.8 (*i*Pr-C_{quart}), 105.3 (C_{quart}) ppm.

ESI-MS m/z : 405.1 [M+Na]⁺, 421.1 [M+K]⁺, 787.3 [2M+Na]⁺, 803.3 [2M+K]⁺.

HR-MS (ESI): ber. für C₁₅H₂₆O₁₁Na ([M+Na]⁺): 405.1367, gef.: 405.1366,
ber. für C₁₅H₂₆O₁₁K ([M+K]⁺): 421.1107, gef.: 421.1101.



1',2,3,3',4',6'-Hexa-*O*-*p*-methoxybenzylidensaccharose (74)



74

$C_{63}H_{74}O_{17}$
1103.27 g/mol

Zu einer Lösung aus Verbindung 73 (1.00 g, 2.62 mmol, 1.00 Äq.) in DMF (45 ml) wurden NaH (2.09 g, 52.4 mmol, 20.0 Äq.) und 4-Methoxybenzylchlorid (4.10 g, 3.53 ml, 26.2 mmol, 10.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT für 3 d gerührt. Anschließend wurde ges. NH_4Cl -Lsg. (20 ml) zugegeben und mit Ethylacetat (30 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit H_2O (30 ml) und ges. NaCl-Lsg. (30 ml) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 2:1) wurde das Produkt 74 (1.95 g, 1.77 mmol, 67 %) als farbloses Öl erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 2:1): $R_f = 0.43$.

$[\alpha]_D^{20} = +33$ ($c = 1$, $CHCl_3$).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.43$ (s, 3H, CH_3), 1.48 (s, 3H, CH_3), 3.39 (dd, $^3J_{H,H} = 9.3, 3.9$ Hz, 1H, CH), 3.46–3.65 (m, 7H, CH, $3 \times CH_2$), 3.75 (s, 3H, PMB- CH_3), 3.76 (s, 3H, PMB- CH_3), 3.76 (s, 3H, PMB- CH_3), 3.76 (s, 3H, PMB- CH_3), 3.77 (s, 3H, PMB- CH_3), 3.79 (s, 3H, PMB- CH_3), 3.90–4.16 (m, 3H, $3 \times CH$), 4.31–4.77 (m, 14H, $2 \times CH$, $6 \times PMB-CH_2$), 5.57 (d, $^3J_{H,H} = 3.8$ Hz, 1H, CH), 6.75–6.91 (m, 12H, $12 \times Ar-H$), 7.10–7.31 (m, 12H, $12 \times Ar-H$) ppm.

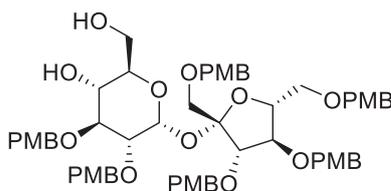
^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 19.2$ (CH_3), 29.2 (CH_3), 55.1 (PMB- CH_3), 55.1 (PMB- CH_3), 55.1 (PMB- CH_3), 55.1 ($2 \times PMB-CH_3$), 55.2 (PMB- CH_3), 55.2 (PMB- CH_3), 62.4 (CH_2), 63.5 (CH_2), 64.8 (CH_2), 70.6, 71.2, 72.0, 72.4, 72.8, 73.0, 74.4, 74.8, 78.6, 78.8, 79.4, 81.4, 83.3, 90.1, 99.0 ($iPr-C_{quart}$), 104.5 (C_{quart}), 113.5 (Ar-C), 113.5 (Ar-C), 113.6 (Ar-C), 113.6 (Ar-C), 113.7 (Ar-C), 113.8 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 129.2 (Ar-C), 129.3 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 130.0 (Ar-C), 130.0 (Ar- C_{quart}), 130.2 (Ar- C_{quart}), 130.2 (Ar- C_{quart}), 130.5 (Ar- C_{quart}), 130.5 (Ar- C_{quart}), 131.4 (Ar- C_{quart}), 158.9 (Ar- C_{quart}), 159.0 (Ar- C_{quart}), 159.0 (Ar- C_{quart}), 159.1 (Ar- C_{quart}), 159.1 (Ar- C_{quart}), 159.1 (Ar- C_{quart}) ppm.



ESI-MS m/z : 1120.5 $[M+NH_4]^+$, 1125.5 $[M+Na]^+$, 1141.5 $[M+K]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{63}H_{78}O_{17}N$ ($[M+NH_4]^+$): 1120.5264, gef.: 1120.5255,
ber. für $C_{63}H_{74}O_{17}Na$ ($[M+Na]^+$): 1125.4818, gef.: 1125.4817,
ber. für $C_{63}H_{74}O_{17}K$ ($[M+K]^+$): 1141.4558, gef.: 1141.4560.

1',2,3,3',4',6'-Hexa-*O*-*p*-methoxybenzyl-saccharose (75)



75

$C_{60}H_{70}O_{17}$
1063.20 g/mol

Verbindung **74** (5.96 g, 5.41 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einer 60%igen wässrigen Essigsäurelösung (15 ml) suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde auf 80 °C erhitzt und 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch Koevaporation mit Toluol im Vakuum entfernt. Das Produkt **75** (5.10 g, 4.79 mmol, 89 %) wurde nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung an Kieselgel (EtOAc:Pentan, 2:1) als farbloses, hochviskoses Öl erhalten.

Analytische Daten:

DC (EtOAc:Pentan, 2:1): $R_f = 0.41$.

$[\alpha]_D^{20} = +31$ ($c = 1$, $CHCl_3$).

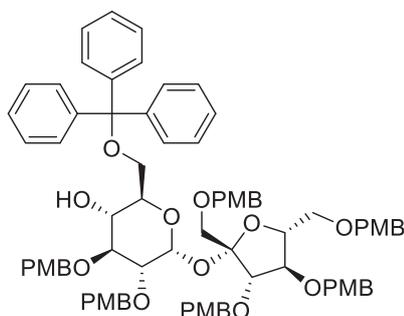
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 3.32$ – 3.73 (m, 8H, $2 \times CH$, $3 \times CH_2$), 3.74 (s, 6H, $2 \times PMB-CH_3$), 3.76 (s, 12H, $4 \times PMB-CH_3$), 3.93–4.00 (m, 2H, $2 \times CH$), 4.23–4.64 (m, 15H, $3 \times CH$, $6 \times PMB-CH_2$), 4.86 (d, $^3J_{H,H} = 11.1$ Hz, 1H, $PMB-CH_2$), 5.77 (d, $^3J_{H,H} = 3.6$ Hz, 1H, CH), 6.77–6.87 (m, 12H, $12 \times Ar-H$), 7.11–7.24 (m, 12H, $12 \times Ar-H$) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 55.1$ ($6 \times PMB-CH_3$), 62.5 (CH_2), 69.6, 70.4, 71.3, 71.3, 72.2, 72.5, 72.7, 73.0, 74.6, 78.9, 79.1, 80.4, 80.7, 83.1, 89.1 (CH), 104.4, 113.6 (Ar-C), 113.6 (Ar-C), 113.6 (Ar-C), 113.7 (Ar-C), 113.8 (Ar-C), 129.1 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 129.7 (Ar-C), 129.9 (Ar-C_{quart}), 129.9 (Ar-C_{quart}), 130.0 (Ar-C_{quart}), 130.1 (Ar-C_{quart}), 130.2 (Ar-C_{quart}), 130.9 (Ar-C_{quart}), 159.0 (Ar-C_{quart}), 159.0 (Ar-C_{quart}), 159.1 (Ar-C_{quart}), 159.1 ($2 \times Ar-C_{quart}$), 159.2 (Ar-C_{quart}) ppm.

ESI-MS m/z : 1080.5 $[M+NH_4]^+$, 1085.5 $[M+Na]^+$, 1101.4 $[M+K]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{60}H_{74}O_{17}N$ ($[M+NH_4]^+$): 1080.4951, gef.: 1080.4939,
ber. für $C_{60}H_{70}O_{17}Na$ ($[M+Na]^+$): 1085.4505, gef.: 1085.4496,
ber. für $C_{60}H_{70}O_{17}K$ ($[M+K]^+$): 1101.4245, gef.: 1101.4242.

1',2,3,3',4',6'-Hexa-*O*-*p*-methoxybenzyl-6-*O*-triphenylmethyl-saccharose (76)



76

$C_{79}H_{84}O_{17}$
1305.52 g/mol

Verbindung **75** (5.10 g, 4.79 mmol, 1.00 Äq.) und Tritylchlorid (2.00 g, 7.19 mmol, 1.50 Äq.) wurden unter Argonatmosphäre in trockenem Pyridin (20 ml) gelöst. Anschließend wurde die Reaktionslösung 4 d bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte eine säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 2:1) das Produkt **76** (5.52 g, 4.23 mmol, 88 %) als ein farbloses, hochviskoses Öl.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 2:1): $R_f = 0.49$.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 3.14$ – 3.26 (m, 2H, CH_2), 3.42 – 3.48 (m, 1H, CH), 3.55 (d, $^3J_{H,H} = 10.9$ Hz, 2H, CH_2), 3.67 (d, $^3J_{H,H} = 4.9$ Hz, 2H, CH_2), 3.72 (s, 3H, PMB- CH_3), 3.74 (s, 3H, PMB- CH_3), 3.76 (s, 6H, 2×PMB- CH_3), 3.76 (s, 3H, PMB- CH_3), 3.78 (s, 3H, PMB- CH_3), 4.01 – 4.67 (m, 18 H, 6×CH, 6×PMB- CH_2), 5.80 (d, $^3J_{H,H} = 3.5$ Hz, 1H, CH), 6.73 – 6.87 (m, 12H, 12×Ar-H), 7.07 – 7.30 (m, 21H, 21×Ar-H), 7.41 – 7.48 (m, 6H, 6×Ar-H) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 55.1$ (PMB- CH_3), 55.2 (3×PMB- CH_3), 55.2 (PMB- CH_3), 55.2 (PMB- CH_3), 63.3 (CH_2), 70.4 , 70.9 , 71.1 , 71.2 , 71.5 , 72.3 , 72.6 , 72.8 , 72.9 , 74.9 , 79.3 , 80.9 (CH_2), 81.9 , 83.6 , 86.5 (Trityl- C_{quart}), 89.6 (CH), 104.4 (C_{quart}), 113.5 (Ar-C), 113.5 (Ar-C), 113.6 (Ar-C), 113.6 (Ar-C), 113.6 (Ar-C), 113.7 (Ar-C), 126.8 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 128.6 (Ar-C), 128.9 (Ar-C), 129.1 (Ar-C), 129.2

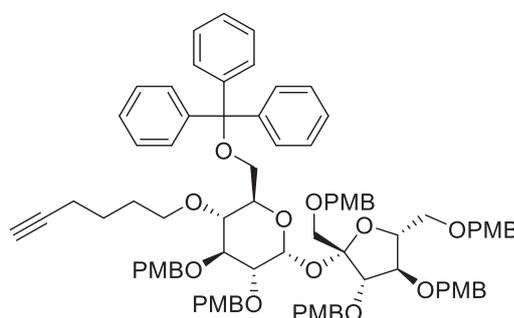


(Ar-C), 129.3 (Ar-C), 129.4 (Ar-C), 129.5 (Ar-C), 130.0 (Ar-C_{quart}), 130.2 (Ar-C_{quart}), 130.2 (Ar-C_{quart}), 130.3 (Ar-C_{quart}), 130.5 (Ar-C_{quart}), 131.0 (Ar-C_{quart}), 143.7 (3×Trityl-Ar-C_{quart}), 158.9 (2×Ar-C_{quart}), 158.9 (Ar-C_{quart}), 158.9 (Ar-C_{quart}), 159.0 (Ar-C_{quart}), 159.0 (Ar-C_{quart}) ppm.

ESI-MS *m/z* : 1322.6 [M+NH₄]⁺, 1327.6 [M+Na]⁺, 1343.5 [M+K]⁺.

HR-MS (ESI): ber. für C₇₉H₈₈O₁₇N ([M+NH₄]⁺): 1322.6047, gef.: 1322.6049,
ber. für C₇₉H₈₄O₁₇Na ([M+Na]⁺): 1327.5605, gef.: 1327.5601,
ber. für C₇₉H₈₄O₁₇K ([M+K]⁺): 1343.5340, gef.: 1343.5348.

1',2,3,3',4',6'-Hexa-*O-p*-methoxybenzyl-5-(*O*-1-hexin)-6-*O*-triphenylmethylsaccharose (77)



77

C₈₅H₉₂O₁₇
1384.65 g/mol

Zu einer Lösung aus Verbindung **76** (500 mg, 383 μmol, 1.00 Äq.) in trockenem DMF (10 ml) wurde NaH (92 mg, 2.29 mmol, 6.00 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde 6-Chloro-1-hexin (132 mg, 137 μl, 1.14 mmol, 3.00 Äq.) zu getropft und für 3 d bei RT gerührt. Ges. NaHCO₃-Lösung (15 ml) wurde zugegeben und mit EtOAc (30 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde mit H₂O (30 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt **77** (318 mg, 230 μmol, 60 %) wurde nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung an Kieselgel (Pentan:EtOAc, 2:1) als ein farbloses, hochviskoses Öl erhalten.

Analytische Daten:

DC (Pentan:EtOAc, 2:1): *R_f* = 0.34.

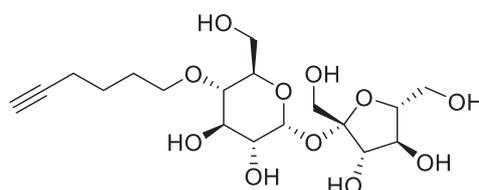
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ = 1.29–1.37 (m, 2H, CH₂), 1.97–2.01 (m, 2H, CH₂), 2.76–2.80 (m, 2H, CH₂-Alkin), 3.16–3.30 (m, 2H, CH₂), 3.47–3.56 (m, 3H, CH₂,

CH), 3.73–3.77 (m, 20H, 6×PMB-CH₃, CH₂), 3.93–4.78 (20H, 6×CH, 6×PMB-CH₂, O-CH₂), 5.86 (d, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, 1H, CH), 6.68–7.43 (m, 39H, 39×Ar-H) ppm.

ESI-MS *m/z* : 1407.6 [M+Na]⁺, 1423.6 [M+K]⁺.

HR-MS (ESI): ber. für C₈₅H₉₃O₁₇ ([M+H]⁺): 1385.6407, gef.: 1385.6396,
ber. für C₈₄H₉₆NO₁₇ ([M+NH₄]⁺): 1402.6673, gef.: 1402.6679,
ber. für C₈₅H₉₂O₁₇Na ([M+Na]⁺): 1407.6227, gef.: 1407.6232,
ber. für C₈₅H₉₂O₁₇K ([M+K]⁺): 1423.5966, gef.: 1423.5963.

5-O-1-Hexin-saccharose (78)



78

C₁₈H₃₀O₁₁
422.43 g/mol

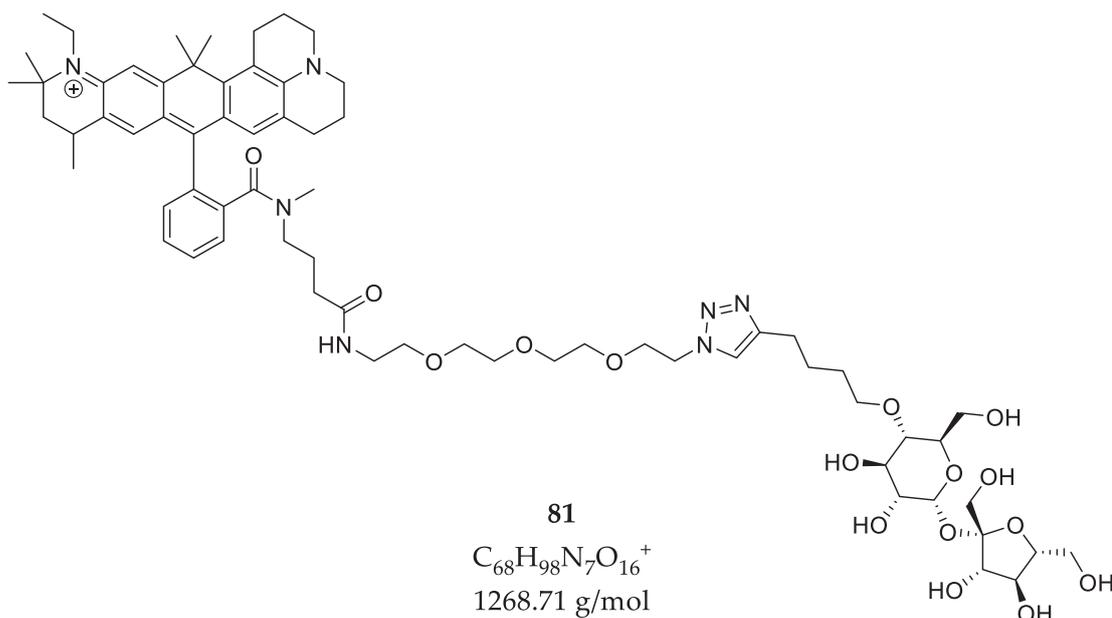
Verbindung **77** (1.00 g, 790 μmol, 1.00 Äq.) wurde in DCM (50 ml) und Puffer (0.5 ml, pH = 8) gelöst. Nach der Zugabe von DDQ (1.26 g, 5.53 mmol, 7.00 Äq.) wurde die Lösung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der entstandene Feststoff abfiltriert und mit DCM (15 ml) gewaschen. Der Feststoff wurde in demineralisiertem Wasser (10 ml) und Ethylacetat (10 ml) gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die wässrige Phase lyophilisiert. Das Produkt **78** (8.73 mg, 720 nmol, 3 %) wurde nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung an Kieselgel (MeOH:DCM, 4:1) als weißer Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

DC (MeOH:DCM, 4:1): *R_f* = 0.33.

ESI-MS *m/z* : 445.2 [M+Na]⁺, 867.4 [2M+Na]⁺.

HR-MS (ESI) : ber. für C₁₈H₃₀O₁₁Na ([M+Na]⁺): 445.1680, gef.: 445.1683.


ATTO647N-Saccharose 81


5-O-1-Hexin-saccharose (**78**) (660 μg , 1.56 μmol , 3.00 Äq.) und ATTO647N-Azid (500 μg , 521 nmol, 1.00 Äq.) wurden in einem Mikroreaktionsgefäß in trockenem DMF (278 μl) gelöst. CuI (100 μg , 526 nmol, 1.40 Äq.) und Natriumascorbat (150 μg , 758 nmol, 1.50 Äq.) wurden zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 h bei RT unter Lichtausschluss maschinell geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **81** (120 μg , 94.6 nmol, 18 %) wurde nach einer RP-HPLC Aufreinigung als blauer Feststoff erhalten.

Analytische Daten:

HPLC (Gradient: 10 auf 90 B in 30 min): $t_R = 23.0$ und 23.4 min.

ESI-MS m/z : 645.9 $[M+Na]^{2+}$, 1268.7 $[M]^+$.

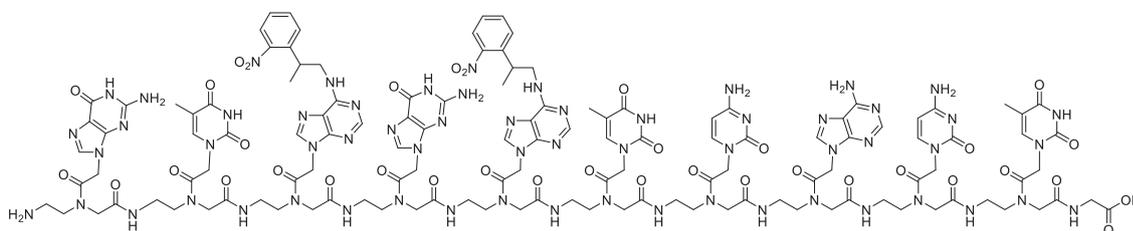
HR-MS (ESI): ber. für $C_{68}H_{99}N_7O_{16}$ ($[M+H]^{2+}$): 634.8569, gef.: 634.8565,
 ber. für $C_{68}H_{98}N_7O_{16}Na$ ($[M+Na]^{2+}$): 645.8478, gef.: 645.8480,
 ber. für $C_{68}H_{98}N_7O_{16}K$ ($[M+K]^{2+}$): 653.8348, gef.: 653.8350,
 ber. für $C_{68}H_{98}N_7O_{16}^+$ $[M]^+$: 1268.7065, gef.: 1268.7066.

ATTO647N-Azid besteht aus einer Mischung von zwei Isomeren mit identischen Eigenschaften. Aus diesem Grund sind in der RP-HPLC zwei Signale mit unterschiedlichen Retentionszeiten vorhanden.

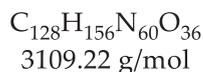
5.6.8 Synthese von modifizierten PNA und PNA/TMD-Hybriden

Die modifizierten PNA und PNA/TMD-Hybride wurden gemäß der Vorschrift in Abschnitt 5.5.1 durch manuelle Festphasenpeptidsynthese an einem mit Glycin vorbelegtem Wang-Harz aus den kommerziell erhältlichen PNA-Bausteinen Fmoc-C(Bhoc)-OH, Fmoc-A-(Bhoc)-OH, Fmoc-T-OH, Fmoc-G(Bhoc)-OH und den synthetisierten PNA-Bausteinen **86** und **87** in einer BD-Spritze synthetisiert. Nach der Synthese wurden die synthetisierten Derivate nach Abschnitt 5.5.2 von Harz abgespalten und im Vakuum getrocknet. Die TMD-Peptide wurden von S. GUHA zur Verfügung gestellt.

PNA1-2NPP 92



92



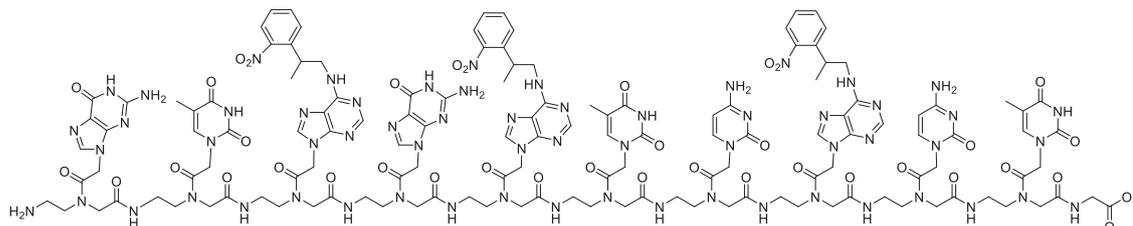
Analytische Daten:

ESI-MS m/z : 623.3 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 778.6 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 1037.8 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1556.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 3109.2 $[\text{M}]^{+}$.

HR-MS (ESI):
ber. für $\text{C}_{128}\text{H}_{161}\text{N}_{60}\text{O}_{36}$ ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$): 623.0522, gef.: 623.0522,
ber. für $\text{C}_{128}\text{H}_{160}\text{N}_{60}\text{O}_{36}$ ($[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$): 778.5634, gef.: 778.5642,
ber. für $\text{C}_{128}\text{H}_{159}\text{N}_{60}\text{O}_{36}$ ($[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$): 1037.7488, gef.: 1037.7499,
ber. für $\text{C}_{128}\text{H}_{158}\text{N}_{60}\text{O}_{36}$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$): 1556.1196, gef.: 1556.1205,
ber. für $\text{C}_{128}\text{H}_{156}\text{N}_{60}\text{O}_{36}$ ($[\text{M}]^{+}$): 3109.2, gef.: 3109.2,
ber. für $\text{C}_{128}\text{H}_{156}\text{N}_{60}\text{O}_{36}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^{+}$): 3131.2, gef.: 3131.2,
ber. für $\text{C}_{128}\text{H}_{156}\text{N}_{60}\text{O}_{36}\text{K}$ ($[\text{M}+\text{K}]^{+}$): 3147.2, gef.: 3147.2.



PNA1-3NPP 93



93

 $C_{137}H_{165}N_{61}O_{38}$

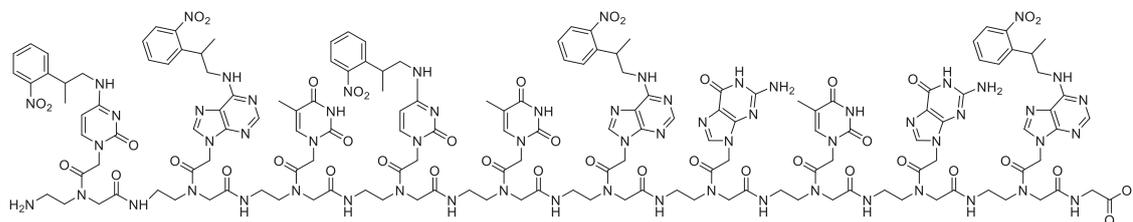
3274 g/mol

Analytische Daten:

ESI-MS m/z : 819.33 $[M+4H]^{4+}$, 1092.10 $[M+3H]^{3+}$, 1638.15 $[M+2H]^{2+}$, 3274.30 $[M]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{137}H_{169}N_{61}O_{38}$ ($[M+4H]^{4+}$): 819.3293, gef.: 819.3286,
 ber. für $C_{137}H_{168}N_{61}O_{38}$ ($[M+3H]^{3+}$): 1092.1033, gef.: 1092.1028,
 ber. für $C_{137}H_{165}N_{61}O_{38}$ ($[M]^+$): 3274.29, gef.: 3274.30.

PNA3-5NPP 94



94

 $C_{155}H_{183}N_{63}O_{42}$

3599.42 g/mol

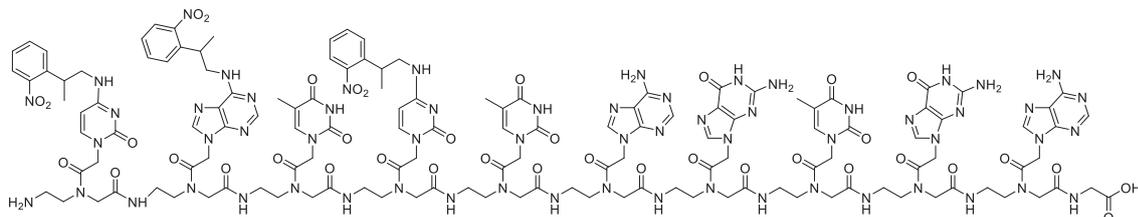
Analytische Daten:

ESI-MS m/z : 901.6 $[M+4H]^{4+}$, 1201.8 $[M+3H]^{3+}$, 3600.4 $[M]^+$.

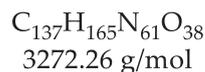
HR-MS (ESI): ber. für $C_{155}H_{187}N_{63}O_{42}$ ($[M+4H]^{4+}$): 901.1116, gef.: 901.1115,
 ber. für $C_{155}H_{186}N_{63}O_{42}$ ($[M+3H]^{3+}$): 1201.1464, gef.: 1201.1471,
 ber. für $C_{155}H_{183}N_{63}O_{42}$ ($[M]^+$): 3600.42, gef.: 3600.43.



PNA3-3NPP 95



95

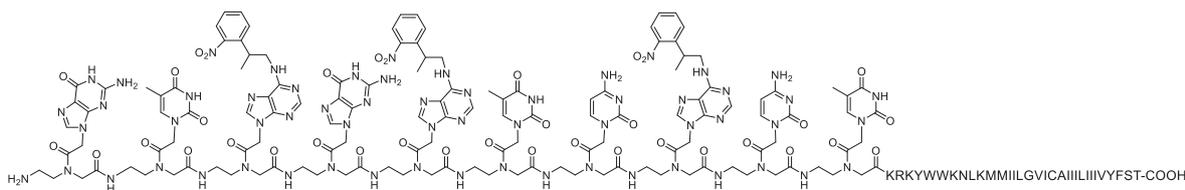


Analytische Daten:

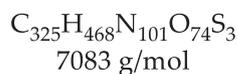
ESI-MS m/z : 655.7 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 819.3 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 1092.1 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1638.1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 3272.3 $[\text{M}]^{+}$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{137}\text{H}_{170}\text{N}_{61}\text{O}_{38}$ ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$): 655.6649, gef.: 655.6646,
 ber. für $\text{C}_{137}\text{H}_{169}\text{N}_{61}\text{O}_{38}$ ($[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$): 819.3293, gef.: 819.3300,
 ber. für $\text{C}_{137}\text{H}_{168}\text{N}_{61}\text{O}_{38}$ ($[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$): 1092.1033, gef.: 1092.1048,
 ber. für $\text{C}_{137}\text{H}_{167}\text{N}_{61}\text{O}_{38}$ ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$): 1637.6513, gef.: 1637.6529,
 ber. für $\text{C}_{137}\text{H}_{165}\text{N}_{61}\text{O}_{38}$ ($[\text{M}]^{+}$): 3272.3, gef.: 3272.3,
 ber. für $\text{C}_{137}\text{H}_{165}\text{N}_{61}\text{O}_{38}\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^{+}$): 3294.3, gef.: 3294.3,
 ber. für $\text{C}_{137}\text{H}_{165}\text{N}_{61}\text{O}_{38}\text{K}$ ($[\text{M}+\text{K}]^{+}$): 3310.2, gef.: 3310.2.

PNA1Syb 96



96



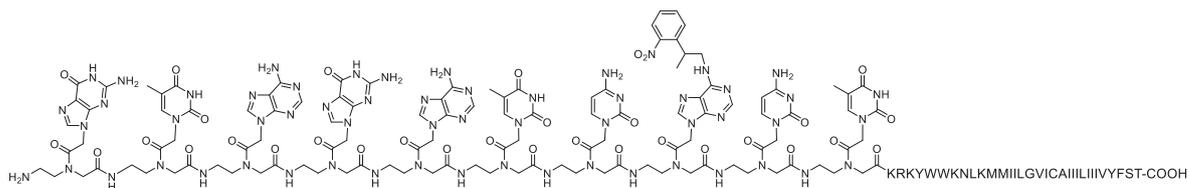
Analytische Daten:

ESI-MS m/z : 7083.6 $[\text{M}]^{+}$.

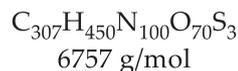
HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{325}\text{H}_{468}\text{N}_{101}\text{O}_{74}\text{S}_3$ ($[\text{M}]^{+}$): 7083.53, gef.: 7083.55.



PNA1Syb 97



97

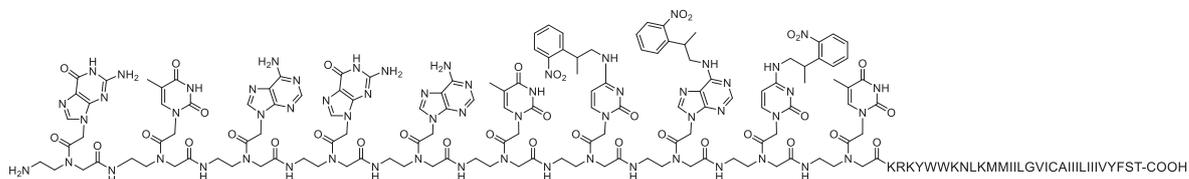


Analytische Daten:

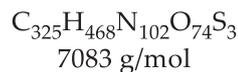
ESI-MS m/z : 1352.51 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 1690.39 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 2253.50 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 6753.52 $[\text{M}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{307}\text{H}_{455}\text{N}_{100}\text{O}_{70}\text{S}_3$ ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$): 1352.49, gef.: 1352.51,
ber. für $\text{C}_{307}\text{H}_{454}\text{N}_{100}\text{O}_{70}\text{S}_3$ ($[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$): 1690.36, gef.: 1690.39,
ber. für $\text{C}_{307}\text{H}_{453}\text{N}_{100}\text{O}_{70}\text{S}_3$ ($[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$): 2253.47, gef.: 2253.50.

PNA1Syb 98



98



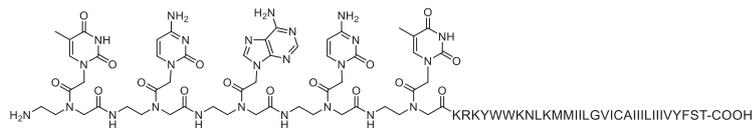
Analytische Daten:

ESI-MS m/z : 1112.80 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$, 1181.60 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 1417.71 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 7083.55 $[\text{M}]^+$.

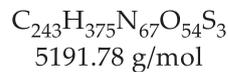
HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{325}\text{H}_{468}\text{N}_{102}\text{O}_{74}\text{S}_3$ ($[\text{M}]^+$): 7083.55, gef.: 7083.53.



PNA1Syb 99



99

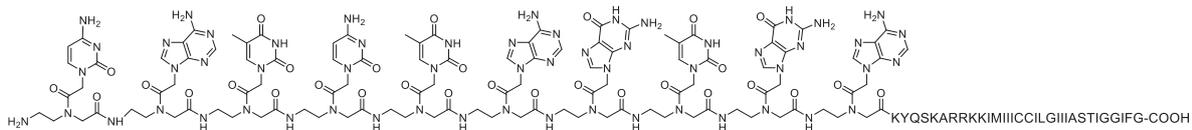


Analytische Daten:

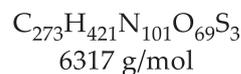
ESI-MS m/z : 743.1 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$, 866.8 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 1040.0 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 1299.7 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 5191.8 $[\text{M}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{243}\text{H}_{382}\text{N}_{67}\text{O}_{54}\text{S}_3$ ($[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$): 743.1204, gef.: 743.1191,
 ber. für $\text{C}_{243}\text{H}_{381}\text{N}_{67}\text{O}_{54}\text{S}_3$ ($[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$): 866.8059, gef.: 866.8053,
 ber. für $\text{C}_{243}\text{H}_{380}\text{N}_{67}\text{O}_{54}\text{S}_3$ ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$): 1039.9656, gef.: 1039.9655,
 ber. für $\text{C}_{243}\text{H}_{379}\text{N}_{67}\text{O}_{54}\text{S}_3$ ($[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$): 1299.7052, gef.: 1299.7059,
 ber. für $\text{C}_{243}\text{H}_{375}\text{N}_{67}\text{O}_{54}\text{S}_3$ ($[\text{M}]^+$): 5191.8, gef.: 5191.8.

PNA3Sx 100



100

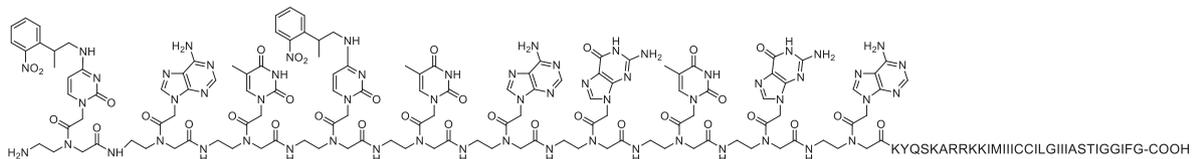


Analytische Daten:

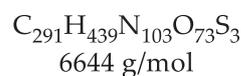
ESI-MS m/z : 1053.7 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 6317.19 $[\text{M}]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $\text{C}_{273}\text{H}_{427}\text{N}_{101}\text{O}_{69}\text{S}_3$ ($[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$): 1053.8702, gef.: 1053.8675,
 ber. für $\text{C}_{273}\text{H}_{421}\text{N}_{101}\text{O}_{69}\text{S}_3$ ($[\text{M}]^+$): 6317.18, gef.: 6317.19.

PNA3Sx 101



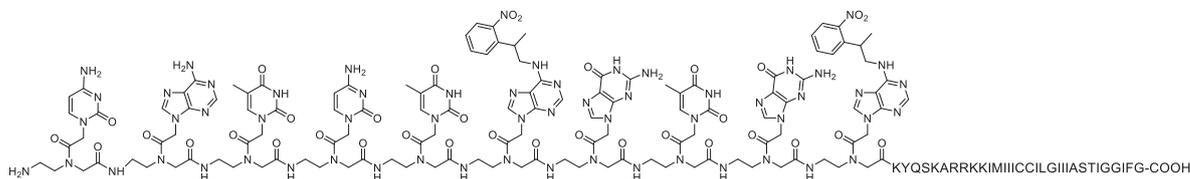
101



**Analytische Daten:**

ESI-MS m/z : 831.4 $[M+8H]^{8+}$, 950.1 $[M+7H]^{7+}$, 1108.2 $[M+6H]^{6+}$, 6644.3 $[M]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{291}H_{439}N_{103}O_{73}S_3$ ($[M]^+$): 6644.31, gef.: 6644.34.

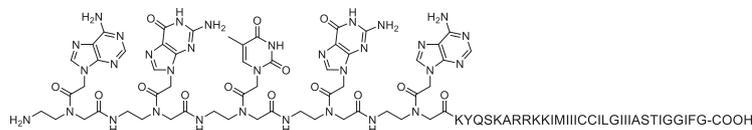
PNA3Sx 102**102**

$C_{291}H_{439}N_{103}O_{73}S_3$
6644 g/mol

Analytische Daten:

ESI-MS m/z : 950.1 $[M+7H]^{7+}$, 6644.3 $[M]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{291}H_{439}N_{103}O_{73}S_3$ ($[M]^+$): 6644.31, gef.: 6644.33.

PNA3Sx 103**103**

$C_{220}H_{354}N_{76}O_{53}S_3$
5003.64 g/mol

Analytische Daten:

ESI-MS m/z : 716.4 $[M+7H]^{7+}$, 835.5 $[M+6H]^{6+}$, 1002.5 $[M+5H]^{5+}$, 1252.9 $[M+4H]^{4+}$, 5003.6 $[M]^+$.

HR-MS (ESI): ber. für $C_{220}H_{361}N_{76}O_{53}S_3$ ($[M+7H]^{7+}$): 716.3873, gef.: 716.3873,

ber. für $C_{220}H_{360}N_{76}O_{53}S_3$ ($[M+6H]^{6+}$): 835.6173, gef.: 835.6168,

ber. für $C_{220}H_{359}N_{76}O_{53}S_3$ ($[M+5H]^{5+}$): 1002.5393, gef.: 1002.5401,

ber. für $C_{220}H_{358}N_{76}O_{53}S_3$ ($[M+4H]^{4+}$): 1252.9222, gef.: 1252.9228.





Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

| | |
|---|--------------|
| A | Alanin |
| C | Cystein |
| F | Phenylalanin |
| G | Glycin |
| I | Isoleucin |
| K | Lysin |
| L | Leucin |
| M | Methionin |
| N | Asparagin |
| Q | Glutamin |
| R | Arginin |
| S | Serin |
| T | Threonin |
| V | Valin |
| W | Tryptophan |
| Y | Tyrosin |

Nukleobasen

| | |
|---|---------|
| A | Adenin |
| C | Cytosin |
| G | Guanin |
| T | Thymin |

Sonstige Abkürzungen

| | |
|------|--------------------|
| ACN | Acetonitril |
| AcOH | Essigsäure |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AM | Acetoxymethyl |



| | |
|---------|---|
| Äq. | Äquivalente |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATPasen | Adenosintriphosphatasen |
| BAPTA | Bis(o-aminophenoxy)-ethan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure |
| BD | <i>Becton Dickinson</i> |
| ber. | berechnet |
| Bhoc | Benzhydrioxycarbonyl |
| Boc | <i>tert</i> -Butoxycarbonyl |
| bs | breites Singulett |
| CaM | Calmodulin |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| Cosy | <i>Correlated Spectroscopy</i> |
| d | Dublett, Tage |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCM | Dichlormethan |
| dd | Dublett von Dublett |
| ddd | Dublett von Dublett von Dublett |
| DDQ | 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DMAP | 4-(Dimethylamino)-pyridin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMP | Dimethoxypropan |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure |
| engl. | Englisch |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| EtOAc | Ethylacetat |



| | |
|-------------------|--|
| EtOH | Ethanol |
| FC | Flash-Säulenchromatographie |
| Fluo | Fluorescein |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl |
| gef. | gefunden |
| ges. | gesättigt |
| GFP | Grün-fluoreszierendes Protein |
| Gly | Glycin |
| cGMP | cyclisches Guanosinmonophosphat |
| h | Stunden |
| HATU | 2-[1H-7-Azabenzotriazol-1-yl]-1,1,3,3-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonat |
| HMBC | <i>heteronuclear multiple bond coherence</i> |
| HOAt | 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HOMO | <i>highest occupied molecular orbital</i> |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HR | <i>High Resolution</i> |
| HSQC | <i>Heteronuclear single quantum coherence</i> |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| IP ₃ R | Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor |
| IR | Infrarotspektroskopie |
| kat. | katalytisch |
| kDa | Kilodalton |
| konz. | Konzentriert |
| Lsg. | Lösung |
| LUMO | <i>lowest occupied molecular orbital</i> |
| m | Multiplett |
| <i>m</i> | <i>meta</i> |
| MALDI | <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> |
| MeOH | Methanol |



| | |
|----------------------|---|
| min | Minuten |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| NAD | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid |
| NB | o-Nitrobenzylgruppe |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| NMP | N-Methyl-2-pyrrolidon |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie) |
| NPP | 2-(2-Nitrophenyl)propyl |
| <i>o</i> | <i>ortho</i> |
| OB | olfaktorischer Bulbus |
| OE | olfaktorisches Epithelium |
| OM | olfaktorische Mukosa |
| ON | olfaktorischer Nerv |
| ORN | olfaktorische Rezeptorneuronen |
| <i>p</i> | <i>para</i> |
| p.a. | <i>pro analysi</i> |
| PALM | <i>Photoactivated Localization Microscopy</i> |
| Pbf | 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PET | Photoinduzierter Elektronentransfer |
| PM | Plasmamembran |
| PMB | <i>p</i> -Methoxybenzyl |
| Pmc | 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl |
| PNA | Peptidnukleinsäure |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| PyBOP | Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosponium-hexafluorophosphat-Salz |
| quant. | quantitativ |
| quart. | Quartett |
| <i>R_f</i> | Retentionsfaktor |



| | |
|------------|---|
| Rhod | Rhodamin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RP | <i>Reversed Phase</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RYR | Ryanodin-Rezeptor |
| s | Singulett |
| SG | Schutzgruppe |
| SNAP-25 | <i>synaptosomal associated protein of 25 kDa</i> |
| SNARE | <i>soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptor</i> |
| SPPS | <i>Solid phase peptide synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese) |
| STED | <i>Stimulated Emission Depletion</i> |
| Sx | Syntaxin |
| Syb | Synaptobrevin |
| <i>t</i> | <i>tert</i> |
| t | Triplett |
| TBS, TBDMS | <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl |
| TCEP | Tris(2-carboxyethyl)phosphin |
| TEA | Triethylamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TIPS | Triisopropylsilyl |
| TIS | Triisopropylsilan |
| TMD | Transmembrandomäne |
| TMS | Tetramethylsilan |
| Tr | Trityl |
| UV | Ultraviolett |
| VAMP | <i>vesicle associated membrane protein</i> |
| z. B. | zum Beispiel |





Literaturverzeichnis

- [1] S. W. Hell, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 8167–8181.
- [2] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [3] B. Turkowyd, D. Virant, U. Endesfelder, *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 6885–6911.
- [4] M. Brinkley, *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 2–13.
- [5] H. Sahoo, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 7017–7029.
- [6] L. Liang, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933–2945.
- [7] M. Meldal, C. W. Tomøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- [8] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249–1262.
- [9] K. Cammann, U. Lemke, A. Rohen, J. Sander, H. Wilken, B. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 516–539.
- [10] M. Schäferling, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3532–3554.
- [11] R. Y. Tsien, *Biochemistry* **1980**, *19*, 2396–2404.
- [12] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 7. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2014**.
- [13] H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, K. C. Martin, *Molecular Cell Biology*, Eight Edition, W. H. Freeman New York, **2016**.
- [14] R. M. Paredes, J. C. Etzler, L. T. Watts, W. Zheng, J. D. Lechleiter, *Methods* **2008**, *46*, 143–151.
- [15] D. A. Rusakov, A. Fine, *Neuron* **2003**, *37*, 287–297.
- [16] M. F. Leite, E. C. Thrower, W. Echevarria, P. Koulen, K. Hirata, A. M. Bennett, B. E. Ehrlich, M. H. Nathanson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 2975–2980.
- [17] G. Csordás, G. Hajnóczky, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 42273–42282.
- [18] S. Ringer, *J. Physiol.* **1883**, *4*, 29–42.
- [19] P. K. Hepler, *Cell Calcium* **1994**, *16*, 322–330.
- [20] W. H. Beierwaltes, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2010**, *298*, F1–F11.
- [21] S. A. Stricker, V. E. Centonze, S. W. Paddock, G. Schatten, *Dev. Biol.* **1992**, *149*, 370–380.



- [22] M. Whitaker, *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 25–88.
- [23] T. Ohsu, Y. Amino, H. Nagasaki, T. Yamanaka, S. Takeshita, T. Hatanaka, Y. Maruyama, N. Miyamura, Y. Eto, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 1016–1022.
- [24] A. K. Campbell, *Intracellular Calcium*, First Edition, Wiley **2015**.
- [25] T. C. Südhof, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a011353.
- [26] Z. P. Pang, T. C. Südhof, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 496–505.
- [27] G. J. Augustine, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, *11*, 320–326.
- [28] M. J. Berridge, *Nature* **1993**, *361*, 315–325.
- [29] M. J. Berridge, M. D. Bootman, P. Lipp, *Nature* **1998**, *395*, 645–648.
- [30] P. Uhlén, N. Fritz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396*, 28–32.
- [31] M. D. Bootman, T. J. Collins, C. M. Peppiatt, L. S. Prothero, L. MacKenzie, P. De Smet, M. Travers, S. C. Tovey, J. T. Seo, M. J. Berridge, F. Ciccolini, P. Lipp, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12*, 3–10.
- [32] D. E. Clapham, *Cell* **2007**, *131*, 1047–1058.
- [33] E. Carafoli, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 326–332.
- [34] D. C. Domínguez, M. Guragain, M. Patrauchan, *Cell Calcium* **2015**, *57*, 151–165.
- [35] R. D. Burgoyne, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 182–193.
- [36] J. W. Putney, *Immunol. Rev.* **2009**, *231*, 10–22.
- [37] M. J. Berridge, *Neuron* **1998**, *21*, 13–26.
- [38] M. J. Berridge, M. D. Bootman, H. L. Roderick, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 517–529.
- [39] S. Orrenius, B. Zhivotovsky, P. Nicotera, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 552–565.
- [40] M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 11–21.
- [41] E. Carafoli, J. Krebs, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 20849–20857.
- [42] D. Chin, A. R. Means, *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 322–328.
- [43] A. R. Means, J. R. Dedman, *Nature* **1980**, *285*, 73–77.
- [44] A. Lewit-Bentley, S. Réty, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 637–643.
- [45] R. H. Kretsinger, C. E. Nockolds, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 3313–3326.



- [46] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioorganische Chemie: Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen*, 4. Auflage, Teubner-Verlag Wiesbaden, **2005**.
- [47] K. P. Hoeflich, M. Ikura, *Cell* **2002**, *108*, 739–742.
- [48] P. Rellos, A. C. W. Pike, F. H. Niesen, E. Salah, W. H. Lee, F. von Delft, S. Knapp, *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000426.
- [49] C. S. Farah, F. C. Reinach, *FASEB J.* **1995**, *9*, 755–767.
- [50] J. F. Head, S. Inouye, K. Teranishi, O. Shimomura, *Nature* **2000**, *405*, 372–376.
- [51] O. Shimomura, F. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 2611–2615.
- [52] O. Shimomura, F. H. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *31*, 2963–2966.
- [53] P. H. Cobbold, P. K. Bourne, *Nature* **1984**, *312*, 444–446.
- [54] P. H. Cobbold, K. S. Cuthbertson, M. H. Goyns, V. Rice, *J. Cell Sci.* **1983**, *61*, 123–136.
- [55] J. Alvarez, M. Montero, *Cell Calcium* **2002**, *32*, 251–260.
- [56] R. Y. Tsien, T. Pozzan, T. J. Rink, *J. Cell Biol.* **1982**, *94*, 325–334.
- [57] R. Tsien, T. Pozzan, *Methods Enzymol.* **1989**, *172*, 230–262.
- [58] R. Y. Tsien, Monitoring Cell Calcium, in: *Calcium as a Cellular Regulator*, (Editor: E. Carafoli und C. Klee), Oxford University Press New York **1999**, 28–54.
- [59] H. A. Behanna, S. I. Stupp, *Chem. Commun.* **2005**, 4845–4847.
- [60] A. Matsui, K. Umezawa, Y. Shindo, T. Fujii, D. Citterio, K. Oka, K. Suzuki, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10407–10409.
- [61] G. Gryniewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440–3450.
- [62] A. Minta, J. P. Y. Kao, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8171–8178.
- [63] A. Zamaleeva, G. Despras, C. Luccardini, M. Collot, M. de Waard, M. Oheim, J.-M. Mallet, A. Feltz, *Sensors* **2015**, *15*, 24662–24680.
- [64] T. Egawa, K. Hirabayashi, Y. Koide, C. Kobayashi, N. Takahashi, T. Mineno, T. Terai, T. Ueno, T. Komatsu, Y. Ikegaya, N. Matsuki, T. Nagano, K. Hanaoka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3874–3877.
- [65] A. Takahashi, P. Camacho, J. D. Lechleiter, B. Herman, *Brain Res. Protoc.* **2000**, *5*, 132–134.



- [66] M. W. Roe, J. J. Lemasters, B. Herman, *Cell Calcium* **1990**, *11*, 63–73.
- [67] A. Malgaroli, D. Milani, J. Meldolesi, T. Pozzan, *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 2145–2155.
- [68] A. W. M. Simpson, Fluorescent Measurement of $[Ca^{2+}]_c$, in *Calcium Signaling Protocols*, Editor: David G. Lambert, Humana Press New Jersey **2013**, 3–36.
- [69] R. M. Sánchez-Martín, M. Cuttle, S. Mittoo, M. Bradley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5472–5474.
- [70] M. Eberhard, P. Erne, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *180*, 209–215.
- [71] I. Johnson, M. Spence, *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th Edition, **2010**.
- [72] M. Poenie, Fluorescent Calcium Indicators based on BAPTA, in: *Calcium Signaling*, Editor: James W. Putney Jr., Second Edition, Taylor and Francis Group, **2006**, 1–50.
- [73] R. Y. Tsien, Monitoring Cell Calcium, in: *Calcium as a Cellular Regulator*, (Editor: E. Carafoli und C. Klee), Oxford University Press New York **1999**, 28–54.
- [74] J. T. Gerig, P. Singh, L. A. Levy, R. E. London, *J. Inorg. Biochem.* **1987**, *31*, 113–121.
- [75] B. Valeur, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 3–40.
- [76] R. A. Bissell, A. Prasanna de Silva, H. Q. Nimal Gunaratne, P. L. Mark Lynch, G. E. M. Maguire, C. P. McCoy, K. R. A. Samankumara Sandanayake, in *Top. Curr. Chem.*, **1993**, 223–264.
- [77] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, **2001**.
- [78] M. Oheim, M. van 't Hoff, A. Feltz, A. Zamaleeva, J. M. Mallet, M. Collot, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 2284–2306.
- [79] T. Meyer, T. Wensel, L. Stryer, *Biochemistry* **1990**, *29*, 32–37.
- [80] J. P. Y. Kao, Practical Aspects of Measuring $[Ca^{2+}]$ with Fluorescent Indicators, in: *A Practical Guide to the Study of Calcium in Living Cells*, Editor: R. Nuccitelli, Academic Press, **1994**, 155–181.
- [81] H. Ikenouchi, G. A. Peeters, W. H. Barry, *Cell Calcium* **1991**, *12*, 415–422.
- [82] F. A. Lattanzio, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *171*, 102–108.



- [83] F. A. Lattanzio, D. K. Bartschat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 177, 184–191.
- [84] S. Gaillard, A. V. Yakovlev, C. Luccardini, M. Oheim, A. Feltz, J.-M. Mallet, *Org. Lett.* **2007**, 9, 2629–2632.
- [85] M. Collot, C. Loukou, A. V. Yakovlev, C. D. Wilms, D. Li, A. Evrard, A. Zamaleeva, L. Bourdieu, J. F. Léger, N. Ropert, J. Eilers, M. Oheim, A. Feltz, J. M. Mallet, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 14923–14931.
- [86] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021.
- [87] E. Lallana, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8794–8804.
- [88] A. P. Rajput, P. D. Girase, *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* **2012**, 3, 25–43.
- [89] E. Luboch, E. Wagner-Wysiecka, M. Fainerman-Melnikova, L. F. Lindoy, J. F. Biernat, *Supramol. Chem.* **2006**, 18, 593–601.
- [90] K. R. Gee, K. A. Brown, W. N. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray, I. Johnson, *Cell Calcium* **2000**, 27, 97–106.
- [91] V. V. Martin, M. Beierlein, J. L. Morgan, A. Rothe, K. R. Gee, *Cell Calcium* **2004**, 36, 509–514.
- [92] A. von Baeyer, *Chem. Ber.* **1871**, 4, 558.
- [93] W. C. Sun, K. R. Gee, D. H. Klaubert, R. P. Haugland, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6469–6475.
- [94] H. Sano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1958**, 31, 974–980.
- [95] C.-A. Chen, R.-H. Yeh, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3840–3841.
- [96] K. R. Gee, Z.-L. Zhou, W.-J. Qian, R. Kennedy, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 776–778.
- [97] V. V. Martin, A. Rothe, Z. Diwu, K. R. Gee, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5313–5316.
- [98] J. P. Bacci, A. M. Kearney, D. L. Van Vranken, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 9051–9053.
- [99] M. Collot, C. Wilms, J.-M. Mallet, *RSC Adv.* **2015**, 5, 6993–7000.
- [100] D. F. Babcock, J. Herrington, P. C. Goodwin, Y. B. Park, B. Hille, *J. Cell Biol.* **1997**, 136, 833–844.



- [101] M. Hoth, C. M. Fanger, R. S. Lewis, *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 633–648.
- [102] D. R. Trollinger, W. E. Cascio, J. J. Lemasters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 738–742.
- [103] J. A. Titus, R. Haugland, S. O. Sharrow, D. M. Segal, *J. Immunol. Methods* **1982**, *50*, 193–204.
- [104] C. Grienberger, A. Konnerth, *Neuron* **2012**, *73*, 862–885.
- [105] R. Y. Tsien, *Nature* **1981**, *290*, 527–528.
- [106] P. M. McDonough, D. C. Button, *Cell Calcium* **1989**, *10*, 171–180.
- [107] F. Di Virgilio, C. Fasolato, T. H. Steinberg, *Biochem. J.* **1988**, *256*, 959–963.
- [108] F. Di Virgilio, T. H. Steinberg, S. C. Silverstein, *Methods Cell Biol.* **1989**, *31*, 453–462.
- [109] F. Di Virgilio, T. H. Steinberg, S. C. Silverstein, *Cell Calcium* **1990**, *11*, 57–62.
- [110] A. C. Kreitzer, K. R. Gee, E. A. Archer, W. G. Regehr, *Neuron* **2000**, *27*, 25–32.
- [111] M. Beierlein, K. R. Gee, V. V. Martin, W. G. Regehr, *J. Neurophysiol.* **2004**, *92*, 591–599.
- [112] C. Schlatterer, G. Knoll, D. Malchow, *Eur. J. Cell Biol.* **1992**, *58*, 172–181.
- [113] D. R. McPherson, A. D. McClellan, M. J. O'Donovan, *Brain Res. Protoc.* **1997**, *1*, 157–164.
- [114] C. Dingels, M. Schömer, H. Frey, *Chemie Unserer Zeit* **2011**, *45*, 338–349.
- [115] B. Obermeier, F. Wurm, C. Mangold, H. Frey, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7988–7997.
- [116] C. Mangold, F. Wurm, H. Frey, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1714–1721.
- [117] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288–6308.
- [118] A. I. Zamaleeva, M. Collot, E. Bahembera, C. Tisseyre, P. Rostaing, A. V. Yakovlev, M. Oheim, M. de Waard, J. Mallet, A. Feltz, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 2994–3001.
- [119] E. Kludt, C. Okom, A. Brinkmann, D. Schild, *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 7892–7902.



- [120] E. Breunig, I. Manzini, F. Piscitelli, B. Gutermann, V. Di Marzo, D. Schild, D. Czesnik, *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 8965–8973.
- [121] G. Bao, D. De Jong, M. Alevra, D. Schild, *Eur. J. Neurosci.* **2015**, *42*, 2985–2995.
- [122] E. Baßfeld, *Imaging-Analyse Dopaminerner Wirkungen an Olfaktorischen Nerven von Xenopus-Laevis-Larven*, Georg-August-Universität Göttingen, **2013**.
- [123] J. Albrecht, M. Wiesmann, *Nervenarzt* **2006**, *77*, 931–939.
- [124] F. Lang, P. Lang, *Basiswissen Physiologie*, 2. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, **2007**.
- [125] T. Hassenklöver, L. P. Pallesen, D. Schild, I. Manzini, *PLoS One* **2012**, *7*, e53097.
- [126] S. Gliem, *Characterization of Olfactory Receptor Gene Expression in the Olfactory Epithelium of Larval Xenopus Laevis*, Georg-August-Universität Göttingen, **2010**.
- [127] P. Lipp, E. Niggli, *Cell Calcium* **1993**, *14*, 359–372.
- [128] P. Lipp, E. Niggli, *Biophys. J.* **1993**, *65*, 2272–2276.
- [129] R. A. Floto, M. P. Mahaut-Smith, B. Somasundaram, J. M. Allen, *Cell Calcium* **1995**, *18*, 377–389.
- [130] P. A. Diliberto, X. F. Wang, B. Herman, *Methods Cell Biol.* **1994**, *40*, 243–262.
- [131] F. Stein, T. Mehmood, T. Plass, J. H. Zaidi, U. Diederichsen, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1576–1583.
- [132] U. Rost, C. Steinem, U. Diederichsen, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5900–5907.
- [133] U. Rost, Y. Xu, T. Salditt, U. Diederichsen, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 1–11.
- [134] I. Manzini, J. Frasnelli, I. Croy, *HNO* **2014**, *62*, 846–852.
- [135] L. K. Takahashi, B. R. Nakashima, H. Hong, K. Watanabe, in *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **2005**, 1157–1167.
- [136] S. Nimmermark, *Ann. Agric. Environ. Med.* **2004**, *11*, 163–173.
- [137] U. B. Kaupp, *Nat. Rev. Neurosci.* **2010**, *11*, 188–200.
- [138] T. C. Südhof, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12906–12931.
- [139] T. C. Südhof, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12696–12717.
- [140] S. O. Rizzoli, *EMBO J.* **2014**, *33*, 788–822.



- [141] T. C. Südhof, J. Rizo, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a005637.
- [142] T. C. Südhof, *Annu. Rev. Neurosci.* **2004**, *27*, 509–547.
- [143] T. C. Südhof, *Nature* **1995**, *375*, 645–653.
- [144] F. E. Schweizer, T. A. Ryan, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2006**, *16*, 298–304.
- [145] M. M. Andrade, M. T. Barros, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9235–9243.
- [146] W. Bejar, V. Gabriel, M. Amari, S. Morel, M. Mezghani, E. Maguin, C. Fontagné-Faucher, S. Bejar, H. Chouayekh, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *52*, 125–132.
- [147] S. Jarosz, M. Mach, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 769–780.
- [148] J. Seibel, R. Moraru, S. Götze, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7081–7086.
- [149] R. Khan, K. S. Mufti, M. R. Jenner, *Carbohydr. Res.* **1978**, *65*, 109–113.
- [150] G. Descotes, J. Mentech, N. Roques, *Carbohydr. Chem.* **1989**, *188*, 63–70.
- [151] J. Zhou, L. Yang, W. Hu, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4718–4726.
- [152] K. K. Pulukuri, T. K. Chakraborty, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2284–2287.
- [153] L. Mola, A. Olivella, F. Urpí, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 900–902.
- [154] G. V. Madhava Sharma, C. G. Reddy, P. R. Krishna, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4574–4575.
- [155] L. V Chernomordik, M. M. Kozlov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 675–683.
- [156] H. J. Risselada, H. Grubmüller, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 187–196.
- [157] H. R. Marsden, I. Tomatsu, A. Kros, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1572–1585.
- [158] D. Ungar, F. M. Hughson, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2003**, *19*, 493–517.
- [159] J. M. Hernandez, A. Stein, E. Behrmann, D. Riedel, A. Cypionka, Z. Farsi, P. J. Walla, S. Raunser, R. Jahn, *Science* **2012**, *336*, 1581–1584.
- [160] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [161] R. Jahn, R. H. Scheller, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 631–643.
- [162] N. A. Ramakrishnan, M. J. Drescher, D. G. Drescher, *Mol. Cell. Neurosci.* **2012**, *50*, 58–69.



- [163] R. Jahn, G. van den Boogart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 11729–11730.
- [164] J. S. Bonifacino, B. S. Glick, *Cell* **2004**, *116*, 153–166.
- [165] R. B. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, A. T. Brunger, *Nature* **1998**, *395*, 347–353.
- [166] D. Fasshauer, R. Jahn, *Biospektrum* **2000**, *6*, 27–31.
- [167] J. W. Barclay, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1084–1093.
- [168] Y. Xu, L. Su, J. Rizot, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1568–1576.
- [169] J. Rowe, F. Calegari, E. Taverna, R. Longhi, P. Rosa, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 3323–32.
- [170] G. van den Bogaart, S. Thutupalli, J. H. Risselada, K. Meyenberg, M. Holt, D. Riedel, U. Diederichsen, S. Herminghaus, H. Grubmüller, R. Jahn, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 805–812.
- [171] N. Brose, A. G. Petrenko, T. C. Südhof, R. Jahn, *Science* **1992**, *256*, 1021–1025.
- [172] E. R. Chapman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 498–508.
- [173] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042.
- [174] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604.
- [175] T. L. Schmidt, M. B. Koeppel, J. Thevarpadam, D. P. N. Goncalves, A. Heckel, *small* **2011**, *7*, 2163–2167.
- [176] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 475–477.
- [177] H. M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427.
- [178] H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 464–473.
- [179] G. Ciamician, P. Silber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2040–2046.
- [180] V. N. Rajasekharan Pillai, *Synthesis* **1980**, *1*, 1–26.
- [181] A. Hasan, K. P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247–4264.
- [182] H. Giegrich, S. Eisele-Bühler, C. Hermann, E. Kvasyuk, R. Charubala, W. Pfeleiderer, *Nucleosides and Nucleotides* **1998**, *17*, 1987–1996.



- [183] S. Buhler, H. Giegrich, W. Pfeleiderer, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1281–1283.
- [184] S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601–1611.
- [185] F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. H. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453.
- [186] A. Lygina, Design, Synthesis and Fusion Activity of PNA/Peptide Hybrids as SNARE Protein Models, Georg-August-Universität Göttingen, **2011**.
- [187] P. Kumar, S. Guha, U. Diederichsen, *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 621–629.
- [188] K. Meyenberg, A. S. Lygina, G. van den Bogaart, R. Jahn, U. Diederichsen, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9405–9407.
- [189] F. Versluis, J. Voskuhl, B. Van Kolck, H. Zope, M. Bremmer, T. Albrechtse, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8057–8062.
- [190] H. Robson Marsden, N. A. Elbers, P. H. H. Bomans, N. A. J. M. Sommerdijk, A. Kros, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2330–2333.
- [191] G. Stengel, R. Zahn, F. Höök, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9584–9585.
- [192] Y.-H. M. Chan, B. van Lengerich, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 979–984.
- [193] M. Ma, A. Paredes, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14456–14458.
- [194] M. Ma, Y. Gong, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16919–16926.
- [195] A. S. Lygina, K. Meyenberg, R. Jahn, U. Diederichsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8597–8601.
- [196] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorganic Med. Chem.* **1996**, *4*, 5–23.
- [197] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [198] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566–568.
- [199] J. Graf, Synthese von SNARE-Protein Analoga mit PNA-Erkennungseinheiten, Georg-August-Universität Göttingen, **2012**.
- [200] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [201] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678–9683.



- [202] E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
- [203] S. Guha, J. Graf, B. Göricke, U. Diederichsen, *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 415–22.
- [204] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [205] E. Fanton, J. Gelas, D. Horton, H. Karl, R. Khan, C. Lee, G. Patel, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4057–4060.



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulf Diederichsen für die Möglichkeit an den interessanten Projekten in seinem Arbeitskreis zu arbeiten, für die wissenschaftliche Freiheit und für die uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion.

Frau Prof. Dr. Claudia Steinem danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Frau Prof. Dr. Claudia Höbartner, Herrn Prof. Dr. Silvio O. Rizzoli, Herrn Prof. Dr. Kai Tittmann und Frau Dr. Franziska Thomas danke ich für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Aiofe Neville und Angela Heinemann danke ich für die organisatorische Unterstützung. Daniel Frank danke ich für die Hilfe bei allen technischen Problemen.

Bei Dr. Sebastian Gliem, Dr. Guabin Bao, Dr. Danielle De Jong aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Detlev Schild und bei Dr. Sven Truckenbrodt aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Silvio O. Rizzoli bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Diskussionen über die gemeinsamen Projekte. Besonders Dr. Guabin Bao danke ich für die schnellen und zahlreichen Messungen mit den Calcium-Sensoren.

Weiterer Dank gilt der NMR-Abteilung unter der Leitung von Dr. Michael John sowie der Massenabteilung unter der Leitung von Dr. Holm Frauendorf für das Messen der zahlreichen Spektren.

Dr. Samit Guha und Dr. Pawan Kumar danke ich für die Zusammenarbeit am SNARE-Projekt.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei Christine Hansen, Dr. Selda Kabatas, Janine Wegner, Barbara Hubrich, Julia Schneider und Dr. Dennis Hübner bedanken. Außerdem danke ich Dennis für die Hilfe bei der Gestaltung des Titelbildes.

Den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises gilt mein Dank für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die netten Pausen zwischendurch.

Meinen Laborkollegen aus Labor 102 sowie P110/112 Brigitte Worbs, Dr. Cornelia Panse, Barbara Hubrich, Jan-Dirk Wehland, Meike Junius, Dr.



Selda Kabatas und Janine Wegner danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit.

Bei Maximilian Marx möchte ich mich für die Hilfe bei der Calcium-Sensor Synthese und sein engagiertes und motiviertes Arbeiten bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie insbesondere meinen Eltern für die grenzenlose Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion.

Dennis, dir danke ich für die schöne gemeinsame Zeit, die Abwechslung besonders in der Endphase dieser Arbeit und dafür, dass du immer für mich da bist. Ich freue mich auf die Zukunft im schönen Bayern mit dir und Niklas.



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Graf
Geburtsdatum: 20.09.1986
Geburtsort: Nowoterskij
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung/Hochschulstudium

12/2016 **Promotionsprüfung**
11/2012 – 12/2016 **Promotion** „Synthese von fluoreszierenden Calcium-Sensoren und Biomolekülen zur Untersuchung physiologischer Prozesse“ unter der Leitung von Prof. Dr. Ulf Diederichsen am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen
04/2012 – 09/2012 **Masterarbeit** „Synthese von SNARE-Protein-Analoga mit PNA Erkennungseinheiten“ am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Ulf Diederichsen
10/2010 – 09/2012 **Masterstudium der Chemie**, Georg-August-Universität Göttingen, Abschluss: Master of Science
04/2010 – 07/2010 **Bachelorarbeit** „Oberflächencharakterisierung von Einkristallen mit Atomkraft-Mikroskopie“ am Institut für Physikalische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. Götz. Eckold
10/2006 – 07/2010 **Bachelorstudium der Chemie**, Georg-August-Universität Göttingen, Abschluss: Bachelor of Science
06/2006 Wilhelm-Busch-Gymnasium Stadthagen
Abschluss: Abitur

Publikationen

S. Guha, J. Graf, B. Göricke, U. Diederichsen, „Nucleobase caged peptide nucleic acids: PNA/PNA duplex destabilization and light triggered PNA/PNA recognition“, *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 415–422.





