

Synthese und Anwendung eines photoschaltbaren zellgängigen Peptids & Struktur, Dynamik und Funktion der LIM2/3 Tandem-Domäne des Proteins Paxillin

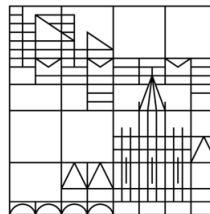
Dissertation

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

vorgelegt von:
Andreas Prestel

an der

Universität
Konstanz



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion
Fachbereich Chemie

Konstanz, 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2016
1. Referent: Prof. Dr. Heiko Möller
2. Referent: Prof. Dr. Valentin Wittmann
3. Referent: JProf. Dr. Michael Kovermann

Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle ganz herzlich bei Prof. Dr. Heiko Möller für die ausgezeichnete Betreuung bedanken, sowohl für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die wissenschaftliche Freiheit, meine eigenen Ideen im Rahmen dieser Arbeit in die Tat umzusetzen, als auch für seine Anregungen, Expertise und die stete Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Problemen und Unwägbarkeiten.

Prof. Dr. Valentin Wittmann möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens denken sowie für seine hilfreichen Ratschläge während der gemeinsamen Seminare.

Der gesamten AG Möller danke ich für die schöne Zeit im und außerhalb des Labors. Vor allem meinem langjährigen Laborpartner und Betreuer Dominik Gauß bin ich zu großem Dank verpflichtet. Ohne seine Inspiration und hervorragende Einführung in die Welt der Peptide, mit ihren Tücken und Möglichkeiten, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Zarko Kulic danke ich für seine Anleitung bei meinen ersten Schritten auf dem Gebiet der Molekularbiologie. Außerdem danke ich ihm und Ruslan Nediakov für ihre stets schnelle und unkomplizierte Hilfe bei technischen Problemen aller Art sowie Anke Friemel und Ulrich Haunz für die Hilfe bei der Aufnahme verschiedenster NMR-Spektren.

Meinen Mitarbeiterpraktikanten, Bachelor- und Masterstudenten Matthias Schuster, David Scheerer, Fabian Dingfelder, Sebastian Helm, Hanna Busch und Johanna Ude danke ich für ihren Einsatz sowie die Beiträge zu dieser Arbeit.

Prof. Dr. Thomas Mayer und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Möglichkeit danken alle Zellkultur-basierten Experimente in ihren Laboren durchzuführen. Ein besonderer Dank geht dabei an Anna Brendel für ihre Zeit und Geduld bei der Einführung in die Handhabung von Zellen in Kultur und ihre Hilfe bei ersten Mikroskopie-Studien sowie Johanna Kastl für eine spannende Kooperation mit dem interessanten Protein Mad2 und aus NMR-Sicht manchmal schwierigen Inhibitoren.

Prof. Dr. Christof Hauck danke ich herzlich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes während der letzten 6 Monate meiner Promotion und seine hervorragenden Beiträge

zur Aufklärung der Interaktion von Paxillin und Integrin. Der gesamten AG Hauck, insbesondere Arnaud Kengmo und Christoph Paone, danke ich für die freundliche Aufnahme in der Gruppe während dieser Zeit. Christoph Paone möchte ich außerdem für die sehr fruchtbare und stets unkomplizierte Zusammenarbeit in diesem Projekt danken. Seine Fähigkeit 10 Dinge gleichzeitig zu machen ohne dabei gestresst zu sein, oder die Übersicht zu verlieren, ist inspirierend und macht ihn mit Sicherheit zu einem ebenso guten Vater wie Forscher. Susanne Feindler-Boeckh danke ich für die Protein-Expression und -Reinigung sowie ihre stete Hilfsbereitschaft.

Vielen weiteren Arbeitsgruppen der Fachbereiche Chemie und Biologie gebührt mein Dank, da ich Geräte und Infrastruktur auf unkompliziertem Wege mitbenutzen konnte: der AG Marx, insbesondere Holger Bußkamp, für ESI-MS Messungen, der AG Groth für die Benutzung der Bestrahlungsapparatur, der AG Hartig für Fluoreszenz-Messungen an ihrem Mikroplattenlesegerät, der AG Stürmer für die Möglichkeit Experimente in ihren S1-Laboren durchzuführen, der AG Groettrup in Person von Dr. Michael Basler für Durchflusszytometrie-Studien sowie der AG Wittmann für die Benutzung der Lyophille und des ITC-Gerätes. Außerdem danke ich Prof. Dr. Elisa May und Daniela Herrmann vom Bioimaging Center der Universität Konstanz für ihre Unterstützung sowie hilfreiche Tipps bei den Mikroskopie-Studien.

Andrea Niederwieser danke ich für die Empfehlung des Rhodaminfarbstoffes sowie die Zurverfügungstellung einer synthetischen Vorstufe. Karin Betz danke ich für die Zeit und Mühen bei Kristallisations-Versuchen. Außerdem danke ich ihr für die schöne, wenn auch leider nur kurze Zeit als Mitbewohnerin.

Johanna Ude danke ich zum einen für die kritische Durchsicht meines Manuskriptes und zum anderen für ihre immerwährende Unterstützung, ihre Liebe und ihr Einfühlungsvermögen, auch in schwierigen Zeiten.

Mein herzlichster Dank geht an meine Eltern für ihr Vertrauen und ihren Rückhalt während meines gesamten Studiums.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Teil I: Synthese und Anwendung eines photoschaltbaren zellgängigen Peptids	3
1. Einleitung	3
1.1 Zellpenetrierende Peptide.....	3
1.1.1 Gezielte Wirkstoffzufuhr mit zellpenetrierenden Peptiden	6
1.1.2 Aktivierbare zellpenetrierende Peptide	6
1.2 Licht-schaltbare Biomoleküle und -konjugate	8
1.2.1 Azobenzol-Derivate und deren Anwendung als Photoschalter	9
1.2.2 Azobenzol-modifizierte, photoschaltbare Peptide.....	12
1.3 Wirkstoff-Konjugate zur gezielten Therapie	14
2. Zielsetzung.....	17
3. Methoden.....	19
3.1 Peptidsynthese	19
3.2 Azobenzolsynthese	22
3.3 UV/Vis-Spektroskopie	24
3.4 NMR-Spektroskopie	25
3.5 Konfokale Mikroskopie	27
3.6 Durchflusszytometrie	29
3.7 Zellbasierte Toxizitätstests.....	30
4. Ergebnisse und Diskussion	33
4.1 Azobenzolsynthese	33
4.1.1 Synthese von alkylsubstituierten 4-Aminobenzoensäuren	33
4.1.2 Synthese von alkylsubstituierten Anilinen	34
4.1.3 Azokupplung	35
4.1.4 Kinetik der thermischen <i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung.....	36
4.1.5 Azobenzol-Bausteine für die Festphasen-Peptidsynthese	40
4.2 Acetylierte PCPPs.....	41
4.2.1 Peptidsynthese	41
4.2.2 Reinigung und Charakterisierung.....	43
4.2.3 NMR-Spektroskopie.....	45
4.3 Fluoreszenzmarkierte PCPPs	47

4.3.1	Farbstoffsynthese und Peptidfunktionalisierung	47
4.3.2	Reinigung und Charakterisierung.....	48
4.3.3	Quantifizierung und Visualisierung der Zellgängigkeit	50
4.3.4	Räumlich begrenzte Anregung und Aufnahme in einzelne Zellen	54
4.4	<i>PCPP-Wirkstoffkonjugate</i>	57
4.4.1	Wirkstoffmodifikation und Peptidsynthese	57
4.4.2	Reinigung und Charakterisierung der Peptide.....	59
4.4.3	Kinetik der Esterhydrolyse	60
4.4.4	Zellkulturbasierte Zytotoxizitätstests	64
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	67
6.	Experimenteller Teil.....	71
6.1	<i>Allgemeine Angaben</i>	71
6.2	<i>Synthesevorschriften</i>	73
6.2.1	Anilin-Derivate	73
6.2.2	Azobenzolsynthese.....	81
6.2.3	Synthese des Rhodamin-Derivates	92
6.2.4	Fluorouracil-Derivate	93
6.2.5	Paclitaxel-Derivate	97
6.3	<i>Peptidsynthese</i>	99
6.3.1	Peptid-Elongation.....	100
6.3.2	Peptid-Abspaltung.....	102
6.3.3	Paclitaxel-Modifikation der Peptide.....	103
6.4	<i>Peptidreinigung und -charakterisierung</i>	104
6.5	<i>Zellkultur und -handhabung</i>	105
	Literaturverzeichnis Teil I	107
	Teil II: Struktur, Dynamik und Funktion der LIM2/3 Tandem-Domäne des Proteins Paxillin.....	119
1.	Einleitung	119
1.1	<i>Zellmigration und Fokale Adhäsionen</i>	119
1.2	<i>Integrine – Zellanker und Signalüberträger</i>	121
1.3	<i>Paxillin – Mehr als passives Gerüst-Protein</i>	122
1.3.1	Paxillin Interaktionen und deren Regulation	123
1.3.2	LIM-Domänen.....	125
2.	Zielsetzung.....	127

3. Methoden.....	129
3.1 <i>Protein NMR-Spektroskopie</i>	129
3.1.1 NMR-Spektroskopische Resonanzzuordnung	130
3.1.2 NMR-Spektroskopische Strukturbestimmung.....	132
3.1.3 <i>Chemical shift perturbation</i> basierte Interaktionsstudien.....	134
4. Ergebnisse und Diskussion	137
4.1 <i>Paxillin- und Integrin-Konstrukte</i>	137
4.2 <i>Strukturaufklärung von Paxillin-LIM2/3</i>	138
4.2.1 Resonanzzuordnung der Rückgratotope	138
4.2.2 Resonanzzuordnung der Seitenkettenatome	140
4.2.3 Struktur und Dynamik von Paxillin-LIM2/3	142
4.3 <i>Paxillin-Deamidierung</i>	146
4.4 <i>Interaktionsstudien mit der zytoplasmatischen Domäne von Integrinβ3</i>	148
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	153
6. Experimenteller Teil.....	155
6.1 <i>Protein-Expression und -Reinigung</i>	155
6.2 <i>NMR-Spektroskopie</i>	156
6.2.1 Bestimmung der Rückgratdynamik aus ^1H - ^{15}N -NOEs.....	159
6.2.2 Untersuchung der Deamidierung.....	159
6.3 <i>Verwendete Computerprogramme</i>	159
Literaturverzeichnis Teil II.....	161
Anhang	169
A1) <i>Restraints zur Definition der Zinkkoordination</i>	169
A2) <i>CD-ROM</i>	171

Abkürzungsverzeichnis

A

AB · Azobenzol
ACPP · *activatable cell penetrating peptide*
AS · Aminosäure
ATNOS · *automated NOESY peak picking*
ATP · Adenosintriphosphat

B

BMRB · *biological magnetic resonance bank*
Boc · *tert-Butyloxycarbonyl*

C

CANDID · *Combined automated NOE assignment and structure determination module*
CARA · *computer aided resonance assignment*
cd · *cytoplasmic domain*
COSY · *correlation spectroscopy*
CPP · *cell penetrating peptide*
CSP · *chemical shift perturbation*
Cyana · *Combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications*

D

DCC · Dicyclohexylcarbodiimid
DCM · Dichlormethan
DIPEA · Diisopropylethylamin
DMEM · *Dulbecco's Modified Essential Medium*
DMF · Dimethylformamid
DMSO · Dimethylsulfoxid
DTT · *Dithiothreitol*

E

ECM · *Extrazelluläre Matrix*
EE · *Essigsäureethylester*
ESI · *electro spray ionization*
Et · *Ethyl*

F

FA · *Fokale Adhäsion*
FID · *free induction decay*
FRET · *Förster-Resonanzenergietransfer*
Fmoc · 9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT · *Fourier Transformation*
FU · *Fluorouracil*

H

HATU · O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexa-fluorophosphat
HBTU · O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluoro-phosphat
HIV · humaner Immundefizienz-Virus
HMBC · *heteronuclear multiple bond correlation*
HMTAB · Hexamethylentetramin-Brom Komplex
HOBt · Hydroxybenzotriazol
HSPG · Heparansulfat-haltige Proteoglykane
HSQC · *heteronuclear single quantum coherence*

I

iPr · iso-Propyl
IPTG · *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid*

L

LB · *lysogeny broth*

LID · *LIM-Interaktions-Domäne*

LIM · *Lin-11, Isl-1, Mec-3*

M

MALDI · *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation*

MD · *Moleküldynamik*

MeCN · *Acetonitril*

MMP · *Matrix-Metalloprotease*

MTBE · *tert-Butylmethylether*

N

Nef · *negative regulatory factor*

NHS · *N-Hydroxy-Succinimid*

NMP · *N-Methyl-2-pyrrolidon*

NMR · *Nuclear Magnetic Resonance*

NOE · *nuclear overhauser effect*

NOESY · *Nuclear Overhauser Enhancement and
Exchange Spectroscopy*

P

Pac · *Paclitaxel*

PBS · *phosphate buffered saline*

PDB · *protein data bank*

PCPP · *photoswitchable cell penetrating peptide*

PE · *Petrolether*

PLE · *porcine liver esterase*

PMSF · *Phenylmethylsulfonylfluorid*

PSS · *Photostationärer Zustand*

R

RDC · *residual dipolar coupling*

RP-HPLC · *Reversed-Phase High Performance Liquid
Chromatography*

rt · *Retentionszeit*

S

SAP · *sweet arrow peptide*

SUMO · *small Ubiquitin-like modifier*

SPPS · *solid phase peptide synthesis*

T

TAT · *Trans-Activator of Transcription*

tBu · *tert-Butyl*

TFA · *Trifluoressigsäure*

TOCSY · *Total Correlation Spectroscopy*

TOF · *time of flight*

TSP · *3-(Trimethylsilyl)-Propionat*

U

ULP1 · *Ubiquitin-like-specific protease 1*

UV/Vis · *Ultraviolett/sichtbar*

Teil I: Synthese und Anwendung eines photoschaltbaren zellgängigen Peptids

1. Einleitung

1.1 Zellpenetrierende Peptide

Die Plasmamembran eukaryotischer Zellen grenzt das Zellinnere gegen den extrazellulären Raum ab, wobei die Aufnahme von bioaktiven Substanzen über vielfältige Mechanismen erreicht wird und meist einer komplexen Regulation unterliegt. Während kleine, hydrophobe Moleküle oftmals direkt durch die Lipiddoppelschicht diffundieren können, werden für hydrophile Substanzen spezifische Transportsysteme genutzt.^[1] Für zellfremde Stoffe, die nicht über einen der oben genannten Mechanismen aufgenommen werden, stellt die Lipiddoppelschicht oftmals eine unüberwindbare Barriere dar, was die Anwendbarkeit vieler Wirkstoffe in biologischen Systemen stark limitiert.^[2]

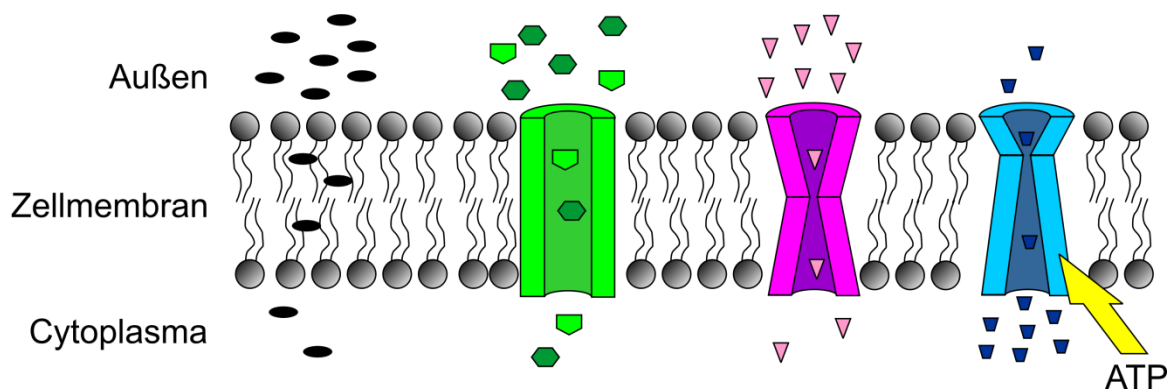


Abbildung 1.1: Verschiedene Mechanismen der Membrantranslokation: Schwarz: Passive Diffusion durch die Lipiddoppelschicht. Grün: Erleichterte Diffusion durch ein Kanalprotein; Pink: Erleichterte Diffusion vermittelt durch einen selektiven Transporter. Blau: Aktiver Transport entgegen einem Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch (ATP-Hydrolyse).

Aus diesem Grund wurden verschiedene Strategien entwickelt, um therapeutische oder bildgebende Substanzen in Zellen einzuschleusen, wie

Mikroinjektion, Elektroporation, sowie Liposom-basierte oder virale Vektoren.^[3] Um 1990 wurden kurze kationische Peptidsequenzen, mit der Fähigkeit die Zellmembran zu durchqueren, identifiziert. Die ersten Peptide stammten dabei aus zwei zellgängigen Proteinen: *Trans-Activator of Transcription TAT* aus dem humanen Immundefizienz-Virus HIV (TAT-Peptid) und *Antennapedia homeodomain* aus *Drosophila melanogaster* (*Transportan*).^[4-5] Seither wurde eine Vielzahl dieser sogenannten zellpenetrierenden Peptide (engl.: *cell-penetrating peptide*, CPP) entdeckt und charakterisiert.^[6] Die meisten dieser Peptide zeichnen sich durch eine positive Nettoladung aus, bedingt durch eine Arginin- (Arg, R) oder Lysin- (Lys, K) reiche Sequenz und besitzen oftmals einen amphiphilen Charakter.^[3] In Tabelle 1.1 sind die wichtigsten Vertreter der CPPs und ihre Aminosäuresequenz aufgelistet.

Tabelle 1.1: Übersicht über einige wichtige Vertreter der CPPs, ihre Aminosäuresequenzen sowie eine grobe Klassifizierung gemäß ihrer Eigenschaften. SAP kurz für 'sweet arrow peptide'^[7].

Peptid	Sequenz	Eigenschaften
Nonaarginin ^[8]	RRRRRRRRR	kationisch
TAT-Peptid ^[4]	GRKKRRQRRRPPQ	kationisch
Penetratin ^[5]	RQIKIWFQNRRMKWKK	kationisch, amphiphil
Transportan ^[9]	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	kationisch, amphiphil
SAP ^[7]	(VRLPPP) ₃	kationisch, amphiphil
SAP(E) ^[10]	(VELPPP) ₃	anionisch, amphiphil

Seit ihrer Entdeckung wurden verschiedenste Studien durchgeführt, um den genauen Mechanismus der Zellaufnahme dieser Peptide aufzuklären.^[11-13] Dabei konnte jedoch kein allgemeingültiges Modell für die Membrantranslokation gefunden werden. Der Aufnahmemechanismus scheint vielmehr variabel zu sein und hängt von Faktoren wie der Konzentration und Art des Peptides^[14], Zelltyp und Zelldichte^[15] sowie der konjugierten Fracht^[16] ab. Dabei konnten zwei elementar verschieden Vorgänge nachgewiesen werden: Zum einen die direkte Translokation durch die Zellmembran, welche vor allem bei hohen Konzentrationen, amphiphilen CPPs und kleinen Frachtmolekülen beobachtet wird und

zum anderen die vesikuläre Aufnahme. Die verschiedenen postulierten Aufnahmemechanismen sind in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Lange Zeit wurde angenommen, dass eine elektrostatische Interaktion zwischen den positiv geladenen Peptiden und den negativ geladenen Bestandteilen der Plasmamembran essenziell für die Aufnahme der Peptide sei, jedoch wurde von Martin et al. ein anionisches, amphiphiles CPP entwickelt, das trotz einer negativen Nettoladung effizient von Zellen aufgenommen wird.^[10]

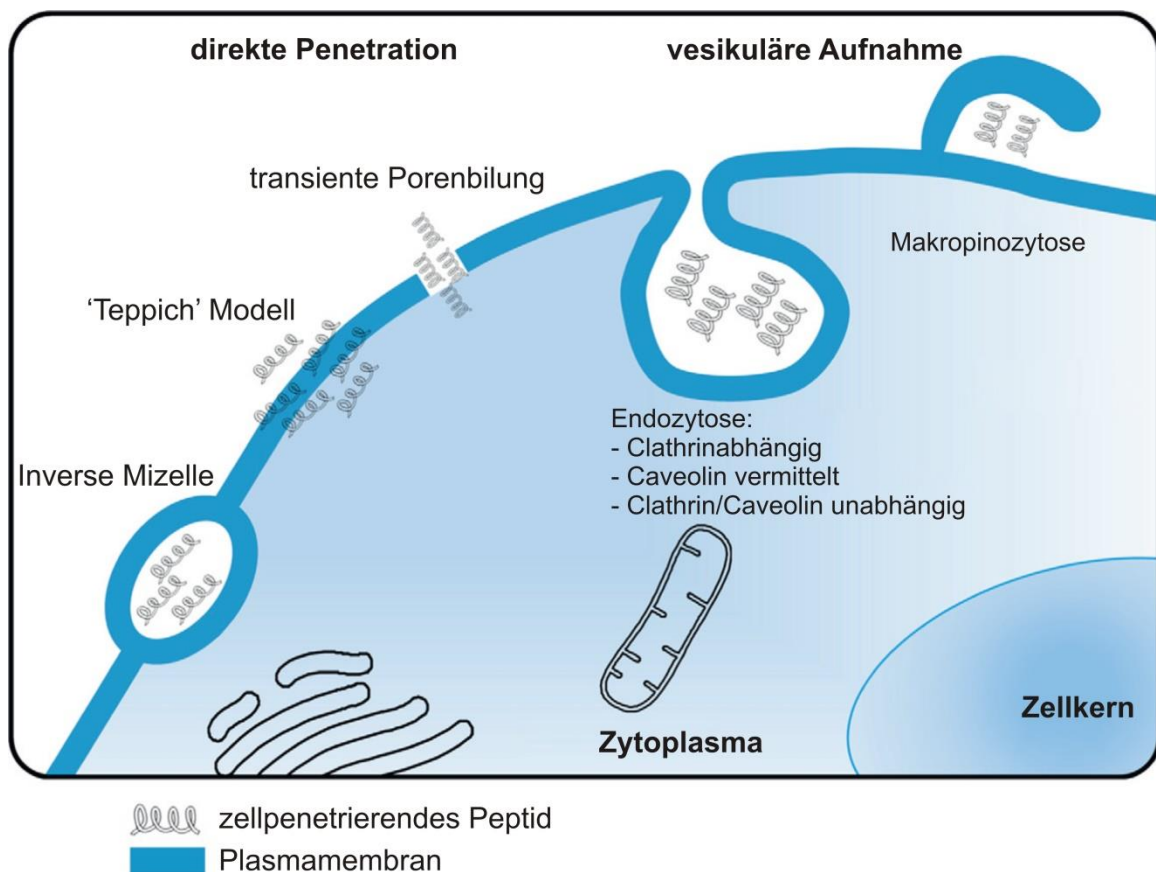


Abbildung 1.2: Verschiedene postulierten Aufnahmemechanismen der CPPs. Auf der linken Seite sind drei Modelle für die direkte Penetration schematisch dargestellt, wobei entweder die Bildung von inversen Mizellen, eine transiente Porenbildung oder eine großflächige Bedeckung und Ausdünnung der Membran ('Teppich'-Modell) als Grundlage für die Membrantranslokation angenommen wird. Im Gegensatz dazu sind im rechten Teil die vesikulären Aufnahmemechanismen dargestellt, die für verschiedene CPPs unter verschiedenen Bedingungen beobachtet wurden. Abbildung entnommen aus ^[17].

Obwohl also der Aufnahmemechanismus nicht komplett geklärt und für eine bestimmte Kombination von Peptid und Fracht nur bedingt vorhersagbar ist, wurden CPPs in unzähligen Studien eingesetzt, um verschiedenste Substanzen in Zellen einzuschleusen. Das Spektrum der transportierten Frachtmoleküle

reicht dabei von relativ kleinen Farb- oder Wirkstoffen^[18] über biologische Makromoleküle wie Proteine^[19] und Oligonukleotide^[20-21] bis hin zu anorganischen Nanopartikeln^[21-22].

1.1.1 Gezielte Wirkstoffzufuhr mit zellpenetrierenden Peptiden

CPPs werden meist unspezifisch von allen Zelltypen aufgenommen. Diese breite Anwendbarkeit ist zwar einerseits von Vorteil, kann jedoch auch zum Problem werden, wenn Substanzen selektiv in ausgewählte Zellen oder Gewebe aufgenommen werden sollen. Diese gezielte Wirkstoffzufuhr ist in der Krebstherapie von besonderem Interesse und seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung.^[23-24] Durch eine gezielte Freisetzung der Chemotherapeutika am Behandlungsort und eine selektive Aufnahme in Krebszellen wird die Effizienz des Wirkstoffs erhöht, bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen in nicht betroffenen Geweben.^[25]

Aus diesem Grund wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Zellgängigkeit der CPPs zu kontrollieren und eine selektivere Aufnahme zu erreichen. Die meisten Systeme beruhen dabei auf einer inaktiven Form des Peptids, die durch einen externen Auslöser wie Hitze^[26], pH-Änderung^[27] oder lichtinduzierte Entschützung^[28] aktiviert und zellgängig wird.

1.1.2 Aktivierbare zellpenetrierende Peptide

Für die Gruppe der kationischen CPPs, zu denen die oft verwendeten Oligoarginine (Arg₈, Arg₉) zählen, wurde gezeigt, dass die Zellaufnahme auf einer initialen elektrostatischen Interaktion mit den stark negativ geladenen Heparansulfat-haltigen Proteoglykanen (HSPG) der Plasmamembran basiert.^[29] Die Zugabe von Heparin, einem löslichen Analogon der HSPG, inhibiert diese Wechselwirkung mit der Zellmembran und verhindert damit die Aufnahme in Zellen.^[30] Dieses Prinzip der Inhibition von CPPs durch polyanionische Substanzen wurde in der Arbeitsgruppe von R. Y. Tsien angewandt, um die sogenannten aktivierbaren zellpenetrierenden Peptide (ACPPs) zu entwickeln.^[31]

Dabei ist ein zellgängiges Oligoarginin über eine spaltbare Haarnadelstruktur (*turn*) mit einer inhibitorischen polyanionischen Peptidsequenz (meist Oligoglutamat) verbunden. Wird die Verbindung nun gespalten, dissoziiert die polyanionische Domäne und das aktivierte CPP wird samt konjugierter Fracht von den Zellen aufgenommen.^[31]

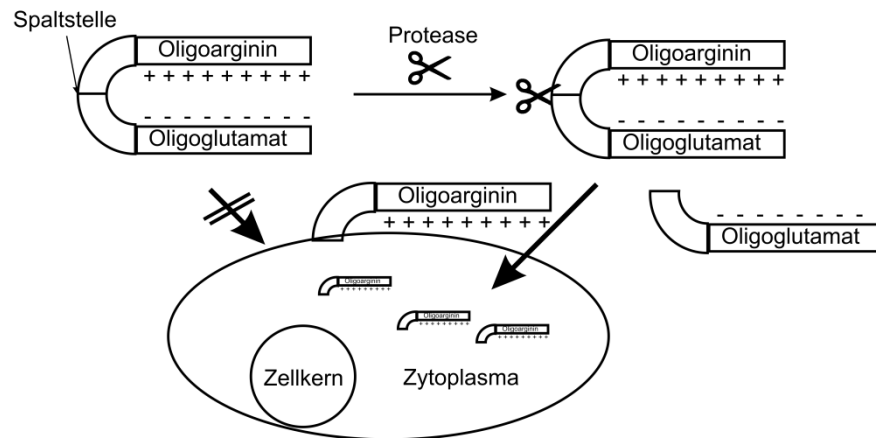


Abbildung 1.3: Funktionsprinzip der ACPPs: In der intakten Form werden die Peptide kaum von Zellen aufgenommen. Erst bei Anwesenheit einer Protease wird die inhibitorische Domäne abgespalten, und das freigesetzte Oligoarginin wird in die Zellen aufgenommen. Abbildung modifiziert entnommen aus^[31].

ACPPs werden hauptsächlich eingesetzt, um verschiedene biologische Prozesse mit hervorragender räumlicher Auflösung sichtbar zu machen, wobei ein Fluorophor am Polykation, oder zwei Förster Resonanzenergietransfer (FRET)-fähige Farbstoffe an beiden Termini der Peptide angebracht sind.^[32] Je nach Fragestellung wurden verschiedene Verbindungselemente zwischen der Oligoarginin- und der Oligoglutamatsequenz eingebracht, die durch unterschiedliche äußere Faktoren spaltbar sind. Zum Beispiel konnte auf diese Weise ein Sensor für Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entwickelt werden, wobei sich ein Borsäure-Derivat im Peptidrückgrat befindet, welches unter Anwesenheit von H_2O_2 gespalten wird.^[33]

Die wichtigste Anwendung der ACPPs ist jedoch im Bereich der Tumorbildgebung zu vermerken. Die spaltbare Verbindungsstelle ist in diesem Fall eine kurze Aminosäuresequenz (PLGLAG), welche ein Substrat der Matrix-Metalloprotease 2 (MMP 2) darstellt.^[31] Die Hauptaufgabe der MMPs ist der Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix, und sie werden von Krebszellen verstärkt

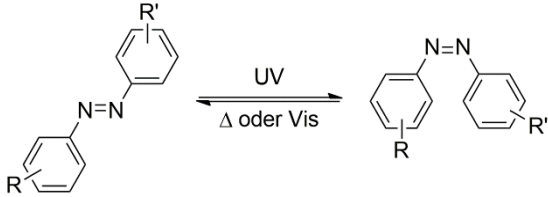
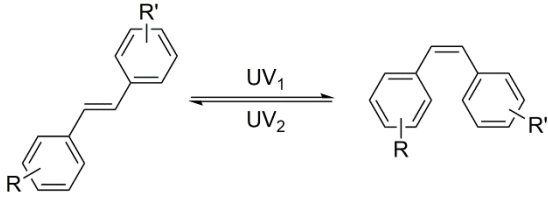
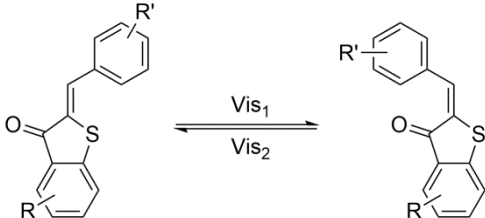
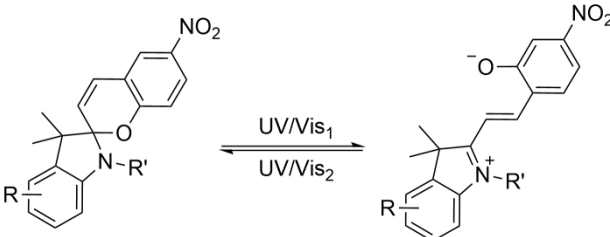
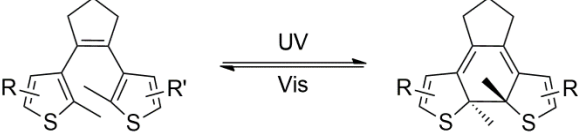
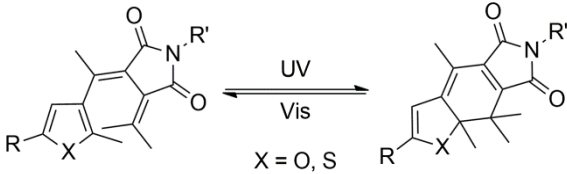
exprimiert, wobei sie eine zentrale Rolle beim Tumorwachstum und der Metastasierung spielen.^[34] Durch die verstärkte Anwesenheit dieser Proteasen in der Umgebung von Krebszellen, werden die ACPs gezielt am Ort des Tumors freigesetzt. Damit stellen diese Peptide eine vielversprechende Möglichkeit zur Identifikation und Lokalisation sowie der Behandlung verschiedener Krebsarten dar.^[31, 35-36]

1.2 Licht-schaltbare Biomoleküle und -konjugate

Die meisten zellulären Prozesse unterliegen einer komplexen Regulierung, sodass sie nur zu bestimmten Zeiten und an definierten Orten innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes ablaufen. Dabei kann ein Biomolekül, abhängig von Ort und Zeit, häufig verschiedene Aufgaben erfüllen.^[37] Will man diese biochemischen Abläufe verstehen und gezielt in diese eingreifen, ist eine ebensolche lokale und temporäre Kontrolle der Wirkstofffreisetzung essenziell. Licht kann mit hoher räumlicher und zeitlicher Präzision angewandt werden, womit sich die Frage nach geeigneten lichtsensitiven Molekülen sowie deren Einbringung in biologische Systeme stellt.

Ein Ansatz zur Entwicklung von Licht-aktivierbaren Biomolekülen ist die Maskierung einer essenziellen Funktionalität durch eine photosensitive Gruppe ('*caging*').^[38] Zu diesem Zweck wurde eine große Anzahl an photolabilen Schutzgruppen entwickelt und beschrieben^[39], wie zum Beispiel *ortho*-Nitrobenzylalkohol und dessen Derivate^[40]. Die Abspaltung der Schutzgruppe ist dabei eine irreversible Photoreaktion, und das Molekül bleibt danach solange aktiv, bis es über andere unbestimmte Mechanismen aus dem System entfernt wird. Im Gegensatz dazu kann bei sogenannten Photoschaltern reversibel zwischen zwei Zuständen ausgewählt werden.^[41] In Tabelle 1.2 ist eine Übersicht über verschiedene photoschaltbare Moleküle gegeben, die bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge eine reversible Änderung ihrer Struktur erfahren. Diese können in zwei Gruppen unterteilt werden, wobei bei Bestrahlung entweder eine Doppelbindung *cis/trans*-isomerisiert wird (Azobenzol, Stilben, Hemithioindigo) oder ein Ringschluss, beziehungsweise eine Ringöffnung stattfindet (Spiropyrane, Diarylethene, Fulgide).^[41]

Tabelle 1.2: Verschiedene photoschaltbare Moleküle und zugehörige Isomerisierungsreaktion.

Substanzklasse	Isomerisierung
Azobenzole	
Stilbene	
Hemithioindigos	
Spiropyrane	
Diarylethene	
(Thiophen-)Fulgide	

1.2.1 Azobenzol-Derivate und deren Anwendung als Photoschalter

Derivate der in Tabelle 1.2 gezeigten Gruppen wurden an diverse Biomoleküle konjugiert um deren Funktion durch Bestrahlung zu steuern, wobei mit Nukleinsäuren^[42], Peptiden^[43], Proteinen^[44], Lipiden^[45] und Kohlenhydraten^[46] ein

sehr breites Spektrum abgedeckt wurde. Die am häufigsten verwendete und am besten untersuchte Verbindung ist dabei das Azobenzol, was durch die meist einfache Synthese, die guten photochemischen Eigenschaften sowie der relativ großen Strukturänderung bei der Isomerisierung zu erklären ist.^[41]

Azobenzol (AB) und einige Derivate sind schon seit dem frühen 19ten Jahrhundert bekannt^[47] und stellen seitdem eine wichtige Molekülklasse unter den synthetischen Farbstoffen dar. Es dauerte jedoch fast 100 Jahre bis Hartley im Jahre 1937 nachweisen konnte, dass Azobenzol in zwei verschiedenen Isoformen vorkommt, welche durch Bestrahlung ineinander umgewandelt werden können.^[48] Die beiden Isomere unterscheiden sich in der Konfiguration der zentralen N-N-Doppelbindung, wobei das *trans*-Isomer eine annähernd planare Struktur annimmt, während die Benzolringe der *cis*-Form aufgrund des sterischen Anspruchs gegeneinander verdrillt sind.^[37]

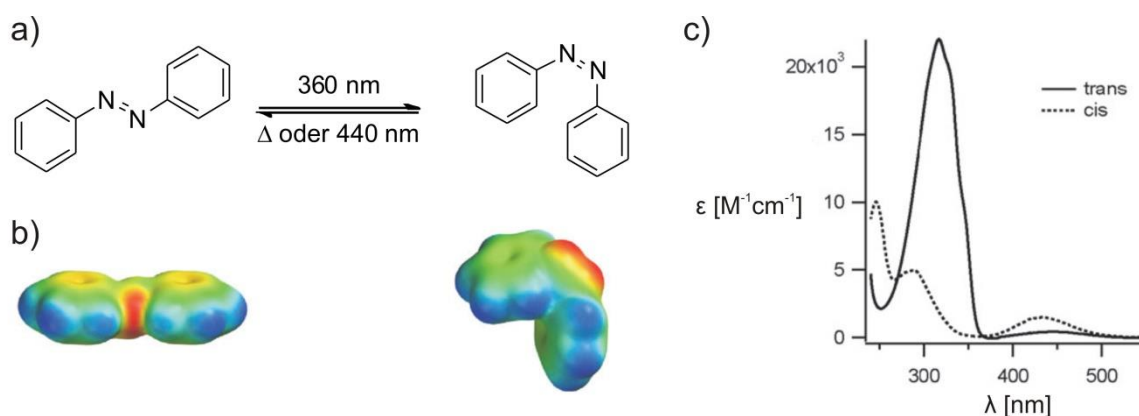


Abbildung 1.4: a) Strukturen und Isomerisierungsreaktion von Azobenzol. b) Raumfüllende Modelle der beiden Isomere, angefärbt nach dem elektrostatischen Potential (rot = negativ, blau = positiv). c) UV/Vis-Absorptionsspektren der *trans*- und der *cis*-Form des Azobenzols in Ethanol. Abbildung modifiziert entnommen aus^[37].

Die UV/Vis-Absorptionsspektren der beiden Azobenzol-Isomere sind in Abbildung 1.4c dargestellt. *Trans*-AB zeigt eine starke Absorptionsbande um 320 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) sowie eine schwächere Bande bei 440 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Die *cis*-Form zeigt eine etwas stärkere Absorption im blauen Spektralbereich während die Absorption bei 320 nm fast verschwindet.^[37] Im Dunkeln liegt fast ausschließlich die energetisch günstigere *trans*-Form vor ($\Delta E = 10\text{-}12$ kcal/mol). Bestrahlt man die Azobenzole jedoch, wird ein photostationärer Zustand (*photo-stationary state*, PSS) erreicht, bei dem, je nach Wellenlänge, entweder die *trans*-Form

($\lambda > 440 \text{ nm}$) oder die *cis*-Form ($\lambda = 320\text{-}360 \text{ nm}$) überwiegt.^[37] Für die meisten biologischen Anwendungen als Photoschalter ist die stark veränderte Geometrie der beiden Isomere entscheidend. So verkürzt sich der Abstand der beiden *para*-ständigen Kohlenstoffe um etwa $3,5 \text{ \AA}$ bei der *trans*→*cis*-Isomerisierung.^[49]

Die thermische *cis*→*trans*-Isomerisierung von unsubstituiertem Azobenzol verläuft bei 25°C mit einer Halbwertszeit von mehreren Stunden bis Tagen und ist dabei stark von der Polarität und dem pH-Wert der Lösung abhängig (Aceton: $\tau_{1/2} = 198 \text{ h}$; Wasser: $\tau_{1/2} = 600 \text{ h}$; $1 \text{ M HCl}_{\text{aq}}$: $\tau_{1/2} = 16 \text{ h}$).^[50] Für diese Isomerisierung wurden zwei verschiedene Mechanismen postuliert: Zum einen eine einfache Rotation um die zentrale N-N-Bindung^[51] und zum anderen eine Inversion mit einem Übergangszustand, der eine lineare N-N-C-Anordnung aufweist^[52] (Abbildung 1.5). Neuere Studien legen hingegen einen konzertierten Vorgang mit Anteilen beider Mechanismen nahe.^[53]

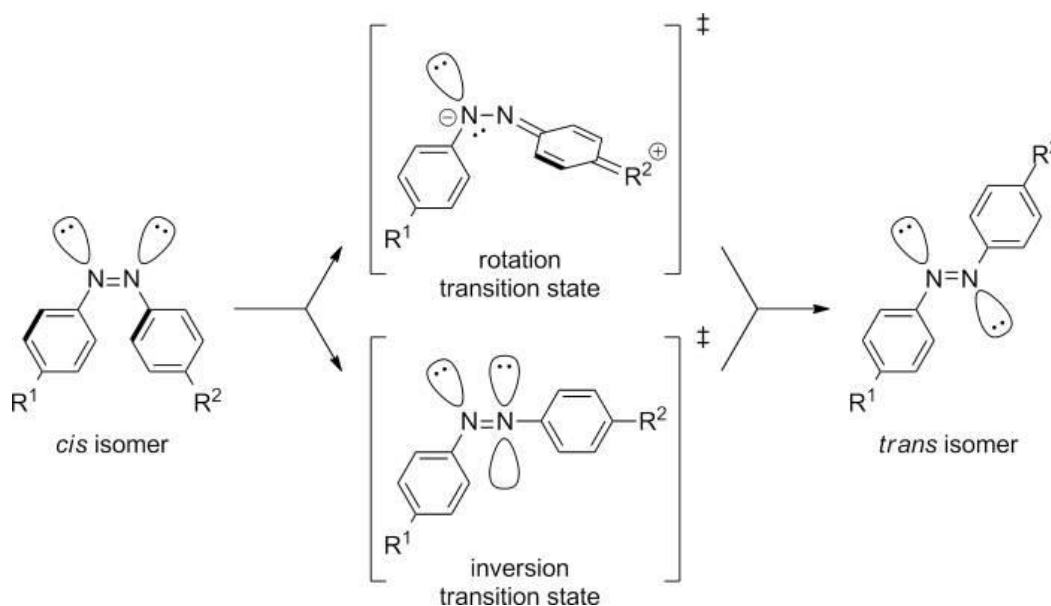


Abbildung 1.5: Postulierte Mechanismen der thermischen Isomerisierung von Azobenzol. Der obere Reaktionsweg beschreibt eine Rotation um die N-N-Bindung, wobei der Doppelbindungscharakter durch eine chinonartige Grenzstruktur aufgehoben wird. Dieser Mechanismus ist bei Substituenten mit freien Elektronenpaaren, wie zum Beispiel Aminen und in polaren Lösungsmitteln bevorzugt. Der untere Mechanismus beschreibt die Inversion über eine lineare Konfiguration an einem der Stickstoffatome. Abbildung entnommen aus^[54].

Die Rate der thermischen Isomerisierung sowie die photochemischen Eigenschaften können durch das Substitutionsmuster an den Benzolringen entscheidend beeinflusst werden, und im Laufe der Jahre wurden unzählige

substituierte Azobenzole synthetisiert und in verschiedenen Bereichen angewendet. Eine Auswahl dieser Verbindungen und der jeweiligen Eigenschaften ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

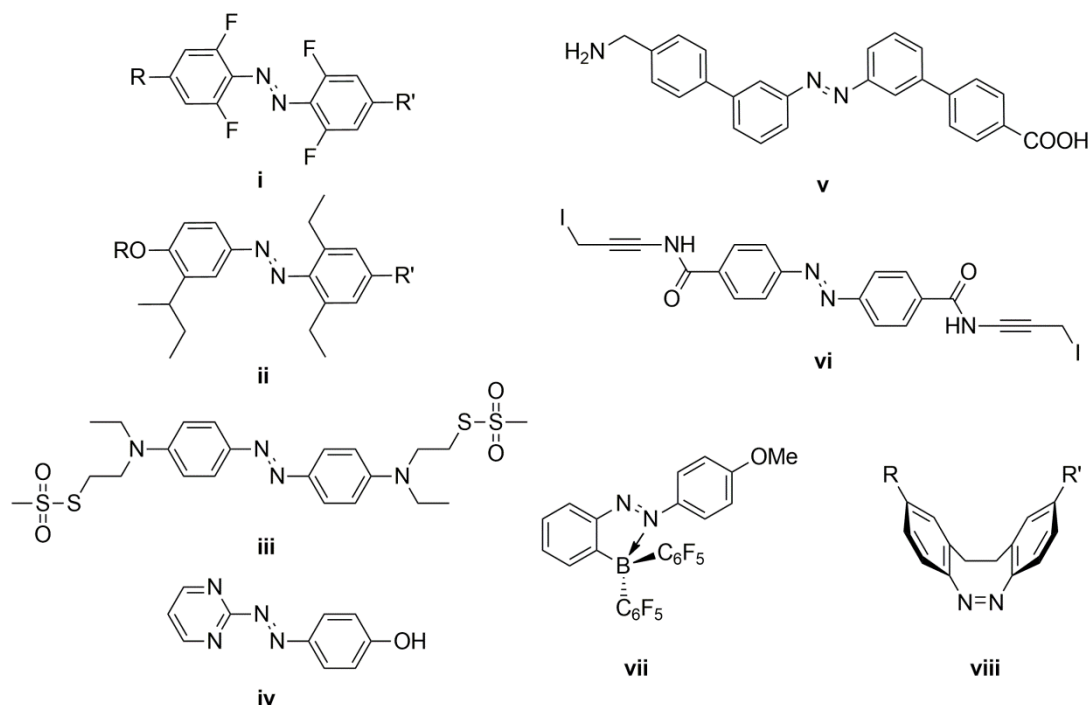


Abbildung 1.6: Ausgewählte Azobenzolderivate und ihre Eigenschaften. **i**^[55], **ii**^[56]: thermostabile Azobenzole mit Substituenten in *ortho*-Position; **iii**^[57], **iv**^[58]: Azobenzole mit einer schnellen thermischen *cis*→*trans*-Isomerisierung durch elektronenreiche Gruppen in *para*-Position; **v**^[59], **vi**^[60]: erweiterte rigide Azobenzolsysteme zur Maximierung der räumlichen Reorientierung bei der *cis*→*trans*-Isomerisierung; **vii**^[61]: fluoreszierendes Azobenzolderivat mit einem Organoboran in *ortho*-Position; **viii**^[62]: Ethylen-überbrücktes AB-Derivat, wobei die *cis*-Form thermodynamisch stabiler ist.

1.2.2 Azobenzol-modifizierte, photoschaltbare Peptide

Peptide sind kurze Ketten von bis zu 100 Aminosäuren, die über Amidbindungen miteinander verknüpft sind. Sie erfüllen vielfältige Aufgaben in einem Organismus, indem sie in verschiedensten Systemen als Hormone oder Liganden für Rezeptoren dienen.^[63] Außerdem finden sie häufig Anwendung bei der Untersuchung und Nachbildung bestimmter Proteinsegmente. Bei vielen dieser Peptide ist die Sekundärstruktur (α -Helix, β -Faltblatt, *turn*-Strukturen) eng mit der Funktionalität verknüpft. Um die Struktur und damit die Funktion von Peptiden photoschaltbar zu kontrollieren, sind zwei Methoden beschrieben

worden, wie Azobenzole an das Peptidgerüst konjugiert werden können. Zum einen die Zyklisierung über zwei Seitenkettenfunktionalitäten^[64] und zum anderen das Einbringen eines Azobenzolderivats in das Peptid-Rückgrat^[65]. In Abbildung 1.7 ist jeweils ein Beispiel für solch eine Funktionalisierung gezeigt, womit die Sekundärstruktur des Peptides reversibel kontrolliert werden kann.

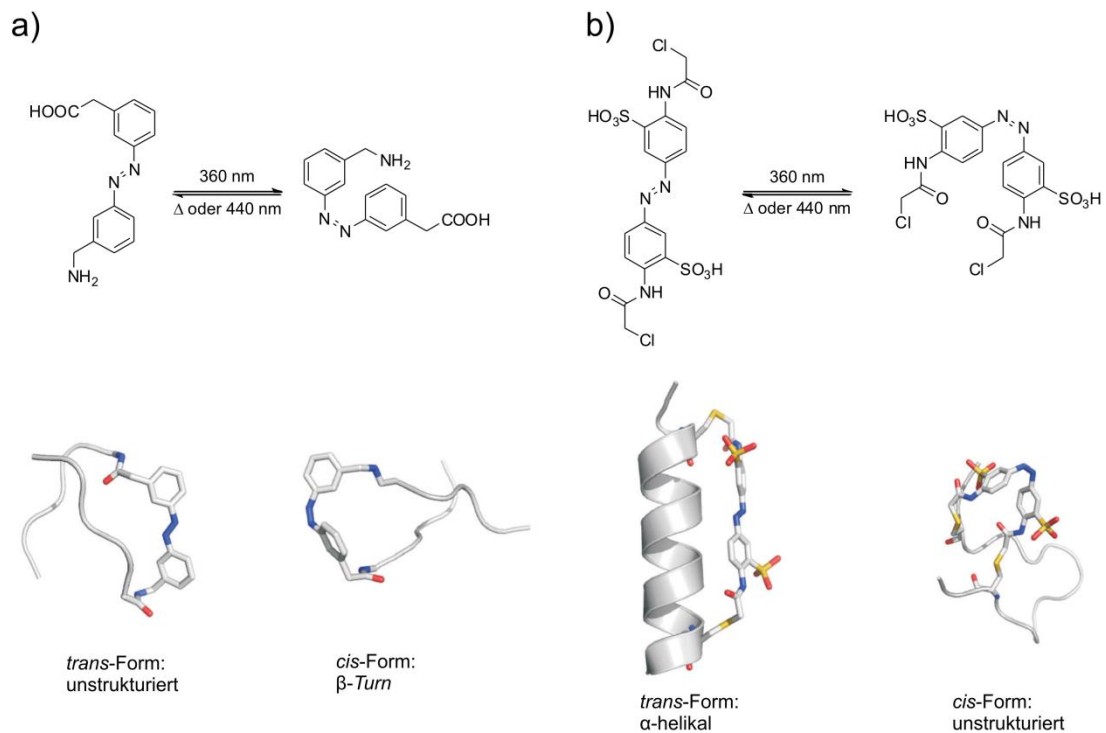


Abbildung 1.7: Beispiele für Azobenzol-modifizierte, photoschaltbare Peptide. a) Azobenzolderivat zur Inkorporation in das Peptidrückgrat. Während die *cis*-Form eine native Haarnadelstruktur ausbildet, ist das Peptid in der *trans*-Form unstrukturiert.^[65] b) Azobenzolderivat zur Zyklisierung über Cysteinseitenketten. Die gestreckte *trans*-Form stabilisiert eine α -helikale Struktur, während die *cis*-Form eine unstrukturierte Konformation des Peptides bevorzugt.^[64] Abbildung modifiziert entnommen aus^[37].

Werden Azobenzole in das Peptidrückgrat eingebracht, soll die *cis*-Form meist eine native β -turn Struktur nachbilden, während die gestreckte *trans*-Form eine ungeordnete Struktur annimmt und damit inaktiv.^[65-66]

Bei der Zyklisierung über Seitenketten wird meist zwischen einem α -helikalen und einem ungeordneten Zustand geschaltet. Dazu befinden sich die beiden zu modifizierenden Aminosäuren in einem Abstand von 4, 7 oder 11 Resten, was einer, zwei oder drei Windungen einer α -Helix entspricht. Das verwendete Azobenzol sollte in einer Konfiguration genau diesen Abstand überbrücken,

wodurch die α -helikale Struktur stabilisiert wird, während in der anderen Konfiguration eine ungeordnete und damit inaktive Peptidstruktur ausgebildet wird.^[43, 67]

1.3 Wirkstoff-Konjugate zur gezielten Therapie

Wie in Abschnitt 1.1.1 erwähnt, ist eine gezielte Anreicherung und Freisetzung von Wirkstoffen in bestimmten Zellen und Geweben (*targeted drug delivery*) von großem Interesse. Die meisten Therapeutika besitzen solch eine Präferenz jedoch nur bedingt und wirken im ganzen Organismus. Dadurch müssen hohe Dosen eingesetzt werden und es treten häufig unerwünschte Nebenwirkungen, wie die Schädigung nicht betroffenen Gewebes, auf. Um bestimmte Zellen zu adressieren, muss der Wirkstoff daher an ein Transportsystem konjugiert werden, welches entweder zellspezifische Marker erkennt und bindet oder durch externe Einflüsse wie magnetische Felder^[68] an den Zielort geschleust werden kann (Abbildung 1.8).

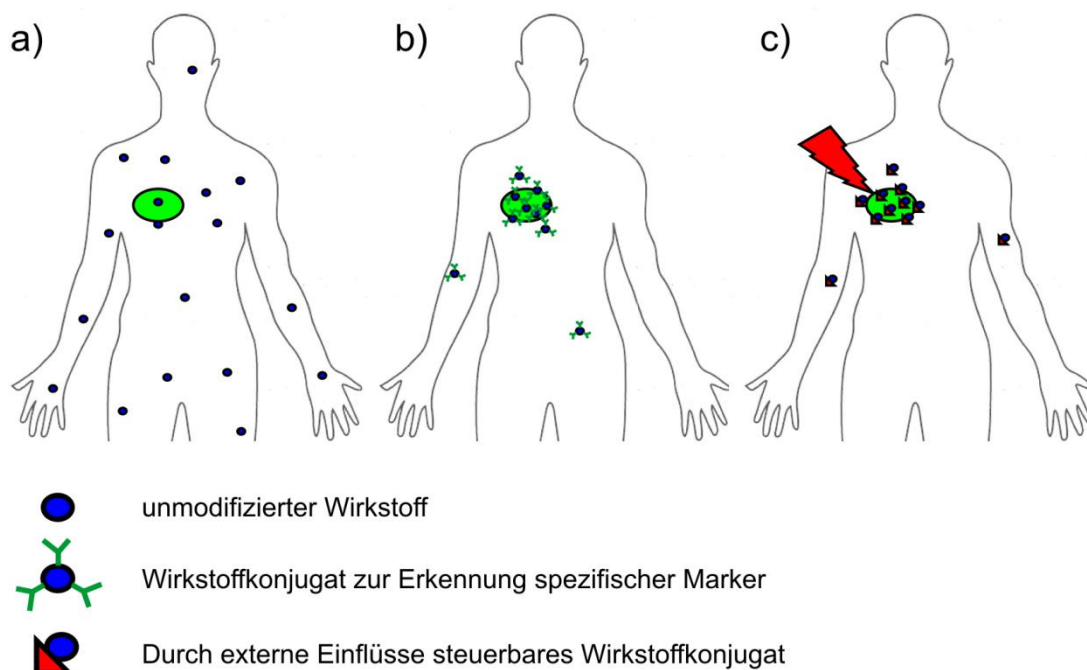


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der gezielten Wirkstoffzufuhr: Da die meisten Wirkstoffe keine Präferenz für bestimmte Zellen oder Gewebe besitzen, wirken sie unspezifisch im ganzen Körper (a). Im Gegensatz dazu kann mit ‚intelligenten‘ Wirkstoffkonjugaten eine Anreicherung im Zielgewebe erreicht werden, wobei entweder zellspezifische Marker konjugiert werden (b) oder Systeme, die durch externe Einflüsse an den Zielort gebracht werden können (c).

Eine Modifikation des Wirkstoffs im Sinne einer kovalenten Konjugation an das Transportsystem verändert dabei meist seine pharmakologischen Eigenschaften, und in vielen Fällen ist eine Freisetzung des nativen Therapeutikums für seine Wirkung unumgänglich. Idealerweise sollte die Verknüpfung zwischen Vektor und Wirkstoff daher außerhalb der Zelle stabil sein und erst nach der Aufnahme in die Zielzelle effektiv gespalten werden. Zum einen kann die Spaltung dabei durch die veränderten intrazellulären Bedingungen, wie dem negativen Redoxpotential^[69] oder dem erniedrigten pH-Wert in Endosomen^[70] erfolgen, zum anderen kann eine Freisetzung durch zellspezifische Enzyme bewirkt werden.^[71]

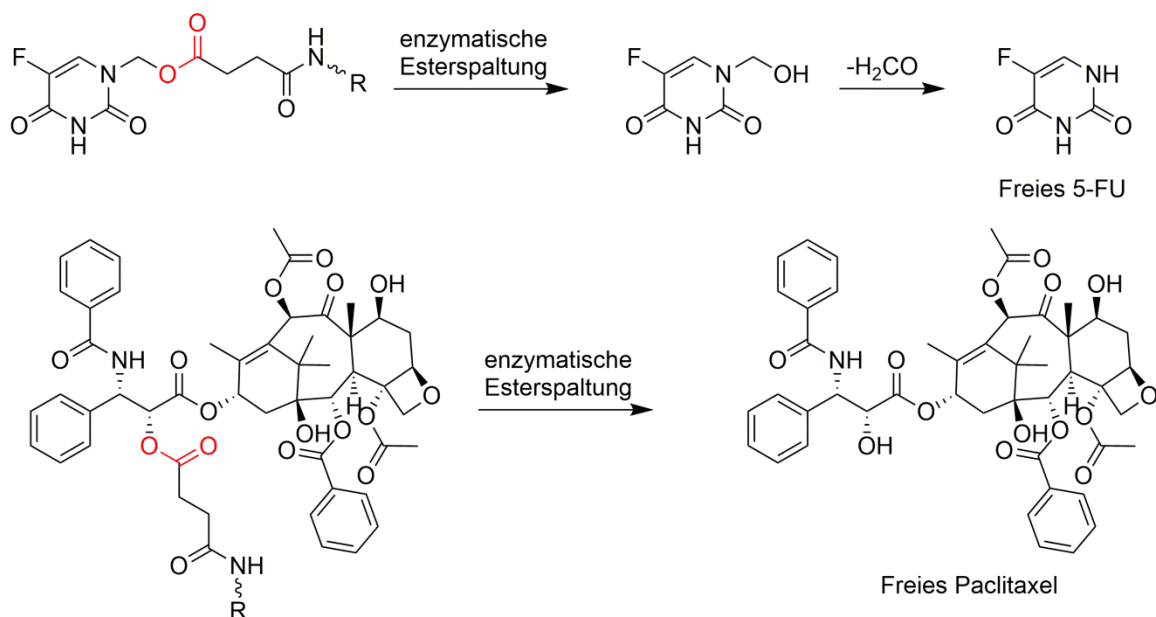


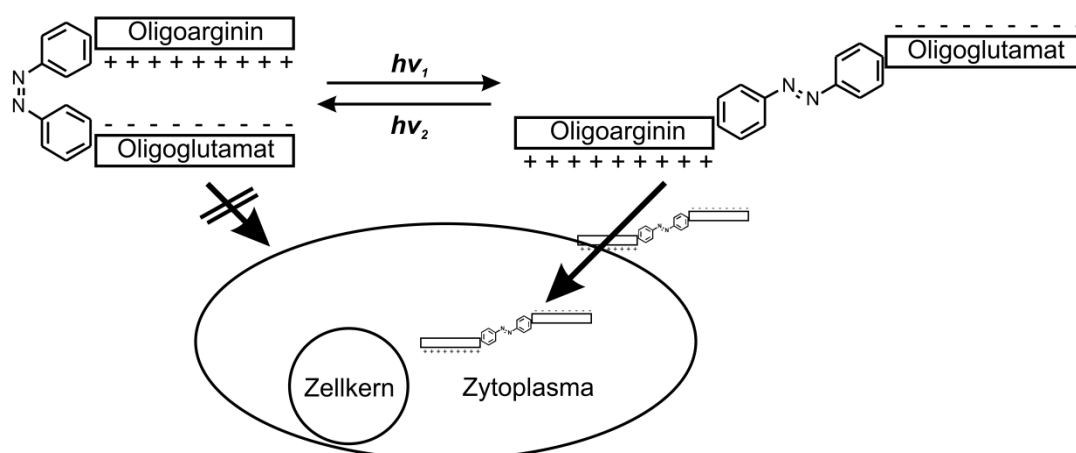
Abbildung 1.9: Wirkstoffvorstufen der Zytostatika 5-Fluorouracil (oben)^[72-73] und Paclitaxel (unten)^[74-75], die über einen Bernsteinsäurelinker an ein Vektormolekül (R) konjugiert sind. Esterasen sollen die rot hervorgehobenen Esterbindungen nach Zellaufnahme spalten und das aktive Zytostatikum freisetzen.

Eine Enzymklasse, die zu diesem Zweck häufig verwendet wird sind die Esterasen, welche die Hydrolyse von Esterbindungen zu einem Alkohol und einer Säure katalysieren. In Abbildung 1.9 sind zwei Beispiele von Wirkstoffkonjugaten gezeigt, welche in der Zelle das aktive Zytostatikum freisetzen und den gezielten Zelltod herbeiführen sollen. Die beiden Zytostatika 5-Fluorouracil^[76] (5-FU, ein Antimetabolit und Inhibitor der Thymidalsynthese) und Paclitaxel^[77] (Pac, ein Inhibitor der Depolymerisation von Mikrotubuli während der Zellteilung) sind

dabei über ein Bernsteinsäurederivat an einen Vektor konjugiert, dessen Estergruppe intrazellulär gespalten werden soll.^[72-75]

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein photoschaltbares zellgängiges Peptid (*photoswitchable cell penetrating peptide*; PCPP) entworfen, synthetisiert und untersucht werden. Ziel war dabei die Verknüpfung einer zellpenetrierenden polykationischen Sequenz mit einer inhibitorischen, polyanionischen Sequenz über ein ins Peptidrückgrat eingebrachtes Azobenzolderivat. Dadurch sollte die Zellaufnahme des Peptides über die lichtinduzierte Azobenzol-Isomerisierung schaltbar sein, wobei die *cis*-Form eine Haarnadel-Struktur ausbildet und eine effektive Inhibition der Zellaufnahme zur Folge haben sollte, während in der gestreckten *trans*-Form keine effektive Paarung der ionischen Peptidfragmente möglich sein und das Peptid daher von Zellen aufgenommen werden sollte (Schema 2.1).



Schema 2.1: Funktionsprinzip der photoschaltbaren zellgängigen Peptide.

Dazu sollten zunächst Azobenzolderivate mit verschiedenen *ortho*-ständigen Alkylsubstituenten synthetisiert werden, um die photochemischen und thermischen Eigenschaften zu optimieren. Anschließend sollte eine Inkorporation in das Peptidrückgrat realisiert werden, und der Einfluss von verschiedenen Peptidsequenzen auf die Aufnahme sollte untersucht werden.

Die Peptide sollten des Weiteren mit unterschiedlichen Fracht-Molekülen am N-Terminus modifiziert werden. Ein Ziel war dabei die Anbringung eines

Fluoreszenzfarbstoffes, um die Zellaufnahme durch konfokale Mikroskopie verfolgen zu können und mittels Durchflusszytometrie zu quantifizieren. Außerdem sollten verschiedene Zytostatika an das Peptid konjugiert werden, um einen gezielten Zelltod durch Photoaktivierung herbeizuführen und die Anwendbarkeit des Systems als Vektor bei der gezielten Wirkstoffzufuhr zu zeigen.

3. Methoden

3.1 Peptidsynthese

Proteine und Peptide sind Makromoleküle, die aus einer sequentiellen Anordnung von Aminosäuren bestehen. Während Proteine und größere Peptide mit mehr als 60 Aminosäuren meist über biotechnologische Methoden hergestellt werden, bietet sich bei kleineren Peptiden eine Synthese auf chemischem Wege, durch sequenzielle Kupplung geschützter Aminosäuren, an. Während man bei der herkömmlichen rekombinanten Protein-Biosynthese auf die 20 kanonischen Aminosäuren beschränkt ist, können bei der chemischen Synthese auch modifizierte und nicht natürliche Aminosäuren eingebaut werden.

Das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) wurde 1963 erstmals von R. B. Merrifield beschrieben^[78] und ist seither eine oft angewandte Methode, um Peptide auf einfachem, effizientem und automatisiertem Wege darzustellen. Ursprünglich wurde dabei die Boc/Benzyl-Schutzgruppenstrategie verwendet, welche jedoch zunehmend von der Fmoc/tBu-Schutzgruppenstrategie^[79] abgelöst wurde.

In beiden Fällen ist das wachsende Peptid während der Synthese kovalent an einen polymeren Träger gebunden, wodurch nicht umgesetzte Edukte leicht durch Wasch- und Filtrationsvorgänge entfernt werden können. Durch die Verwendung von N-terminal- und seitenkettengeschützten Aminosäuren können diese in großem Überschuss (5-10fach) eingesetzt werden, ohne die Gefahr einer möglichen Mehrfachkupplung. Für die Bildung der Amidbindung muss die Carbonsäuregruppe zunächst in einen Aktivester überführt werden, an dem dann ein nukleophiler Angriff der freien Aminogruppe erfolgen kann. Nach der Reaktion werden die Kupplungsreagenzien ausgewaschen und ein neuer Zyklus kann gestartet werden. Dazu wird das N-terminale Amin der wachsenden Peptidkette zunächst entschützt und nach einem erneuten Waschschrift die nächste aktivierte Aminosäure zugegeben. In einem abschließenden Schritt wird das

Peptid vom Träger entfernt, und die Schutzgruppen der Seitenketten werden abgespalten (Abbildung 3.1).

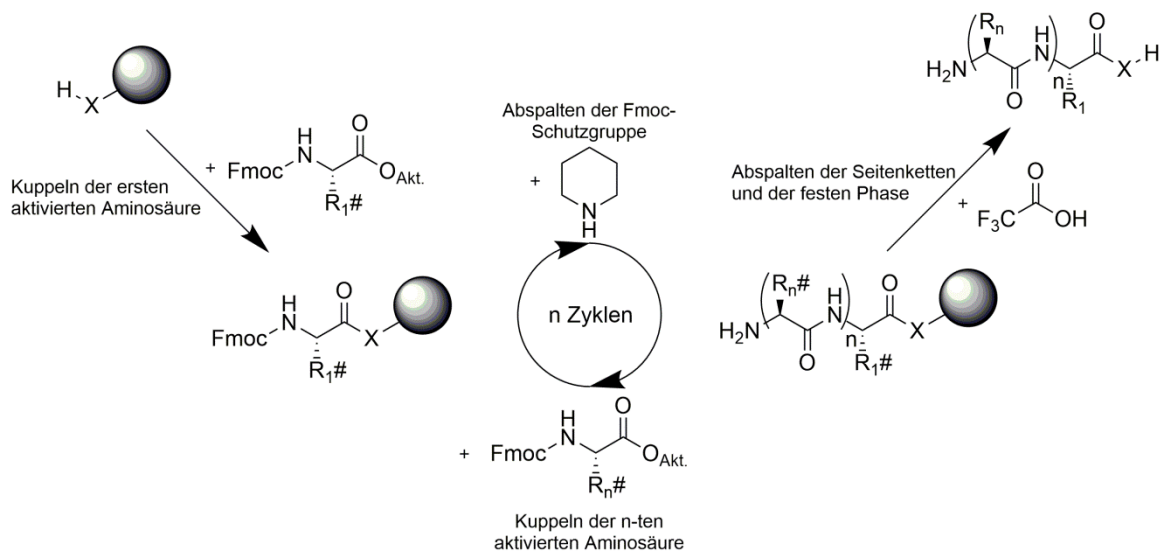


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc/tBu-Schutzgruppenstrategie. X = O oder NH; -COO_{Akt.}: Aktivierte Carbonsäure; R_x#: geschützte Seitenkette; R_x: freie Seitenkette.

Bei der Fmoc/tBu-Schutzgruppenstrategie wird die temporäre N-terminale Fmoc-Schutzgruppe dabei durch die Zugabe von Piperidin in einem E1cB-Mechanismus entfernt (Abbildung 3.2), während die Abspaltung von der festen Phase und die Entschützung der Seitenkettenfunktionalitäten im Säuren abläuft, typischerweise mit 95% Trifluoressigsäure (TFA).

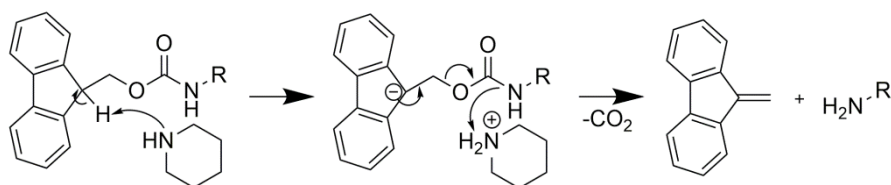


Abbildung 3.2: Mechanismus der Fmoc-Entschützung durch Piperidin. Das entstehende Dibenzofulven kann als Addukt mit Piperidin anhand seiner charakteristischen Absorption quantifiziert werden, was eine einfache Bestimmung der Kupplungsausbeute zulässt.

Zur Aktivierung wurde eine Vielzahl an Reagenzien entwickelt und angewandt^[80], wobei die Säurefunktion meist in einen Aktivester transformiert wird. In Abbildung 3.3 sind die Aktivatoren Dicyclohexylcarbodiimid^[81] (DCC) und O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat^[82] (HBTU) sowie dessen Azaverbindung O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexa-

fluorophosphat^[83] (HATU) gezeigt, und der Mechanismus der Aktivierung wird erläutert. Eine Umesterung durch den Zusatz von Hydroxybenzotriazol (HOBT) verhindert vor allem im Fall der Aktivierung mit Carbodiimiden unerwünschte Nebenreaktionen, wie die Umlagerung des O-Acyl- zum inaktiven N-Acyl-Harnstoffderivat.^[84] Im Falle der Aktivierung mit HBTU/HATU wird zusätzlich die nicht nukleophile Base Diisopropylethylamin (DIPEA) zugesetzt, um die Carbonsäure zu deprotonieren.

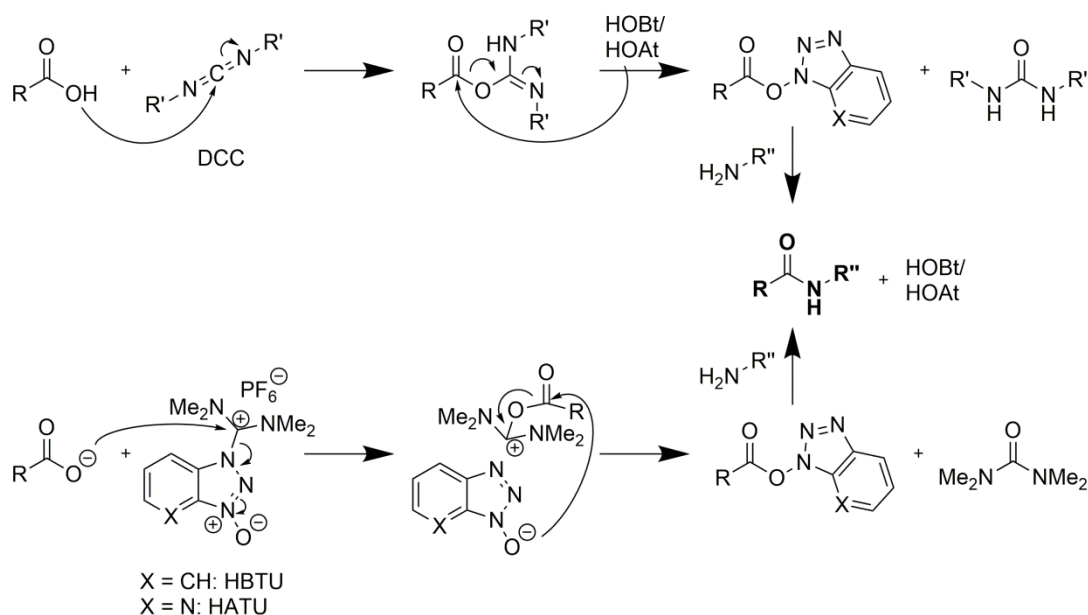


Abbildung 3.3: Mechanismus der Amidkupplung mit DCC + HOBT/HOAt (oben, R'=Cyclohexyl) oder HBTU/HATU (unten).

Die 7-Azaderivate zeichnen sich dabei durch eine erhöhte Reaktivität aus, wobei zum einen eine Stabilisierung der Abgangsgruppe durch die erhöhte Elektronegativität des eingebrachten Ringstickstoffs zum Tragen kommt und zum anderen die Ausbildung eines Nachbargruppeneffekts mit dem eintretenden Amin möglich ist^[83] (Abbildung 3.4).

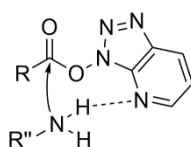


Abbildung 3.4: Nachbargruppeneffekt bei der Amidkupplung eines OAt-Aktivesters.

3.2 Azobenzolsynthese

Azobenzol und seine Derivate können auf vielfältige Weise hergestellt werden, worüber der Übersichtsartikel von E. Merino ^[85] eine ausführliche Zusammenfassung liefert. Die bei weitem am häufigsten eingesetzte Methode ist die Azokupplung zwischen einem Phenyl-Diazoniumsalz und einem elektronenreichen Aromaten. Dabei findet eine elektrophile aromatische Substitution (S_EAr) statt, deren detaillierter Mechanismus in Abbildung 3.5 am Beispiel der Kupplung zweier Anilinderivate dargestellt ist.

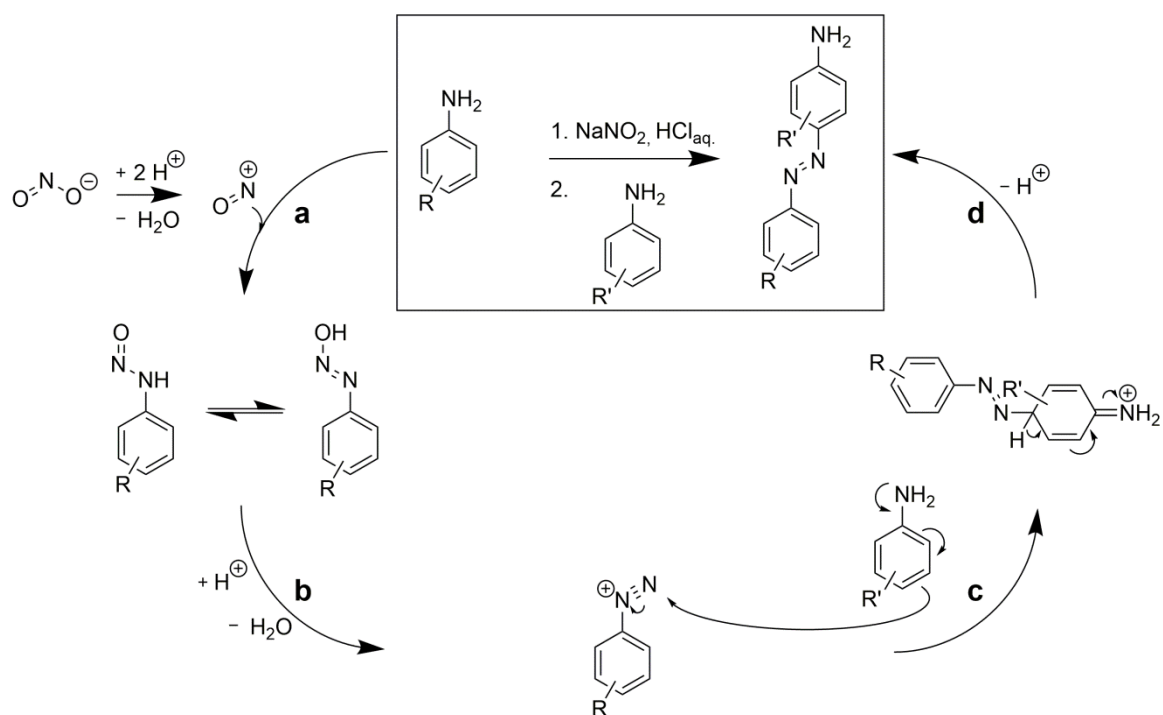


Abbildung 3.5: Mechanismus der Azokupplung zweier substituierter Aniline. Im ersten Schritt reagiert ein Anilinderivat mit dem Nitrosylkation, welches unter stark sauren Bedingungen aus Natriumnitrit gebildet wird, zum Diazohydroxid (a). Nach einer weiteren Protonierung und Wasserabspaltung bildet sich daraus das Diazoniumsalz (b), welches dann unter schwach sauren Bedingungen mit dem zweiten Anilinderivat zum Wheland-Komplex umgesetzt werden kann (c). Durch die finale Deprotonierung wird das aromatische System wiederhergestellt und das Azobenzolderivat erhalten (d).

Der kritische Schritt dieser Reaktion ist meist die elektrophile Substitution am elektronenreichen Aromaten mit dem Wheland-Komplex als Zwischenprodukt ^[86] (Schritt c und d in Abbildung 3.5). Die dafür eingesetzten Diazoniumsalze sind sehr energiereiche Verbindungen und auch wenn die aromatischen Vertreter

durch die Mesomeriestabilisierung - verglichen mit den aliphatischen Derivaten - nicht ganz so reaktiv sind, steht auch ihnen eine Vielzahl von möglichen Nebenreaktionen offen.

Vier verschiedene Reaktionswege sind in Abbildung 3.6 aufgezeigt. Abgesehen von dem gewünschten elektrophilen Angriff in *para*-Position (Abbildung 3.6 rechts oben) mit dem Azobenzol als Produkt, können auch andere Nucleophile zur Reaktion gebracht werden: Mit Hydroxylionen wird das Diazohydroxid gebildet, was vor allem im stark basischen Milieu eine Inaktivierung des Diazoniumsalzes bewirkt (Abbildung 3.6 links oben). Ist der pH-Wert hingegen zu niedrig, wird das Anilinderivat protoniert und dessen Nucleophilie verringert, wodurch ein Angriff des Diazoniumsalzes nicht mehr möglich ist. Aus diesem Grund ist eine exakte Kontrolle des pH-Werts für eine effektive Reaktion essenziell. Für die Kupplung an Amine sind schwach saure Bedingungen (pH = 4-6) optimal, wohingegen Phenolderivate im Alkalischen (pH \approx 10) die besten Ausbeuten liefern.^[85] Aniline können dabei nicht nur mit ihrem *para*-ständigen Kohlenstoff nucleophil reagieren, sondern auch mit dem Amin-Stickstoff (Abbildung 3.6 rechts unten). Diese Reaktion zum Triazen ist prinzipiell reversibel, liefert bei unsymmetrischen Phenylsubstituenten jedoch zwei mögliche Produkte, je nachdem welche N-N-Bindung bei der Rückreaktion gespalten wird. Eine weitere oft beobachtete Nebenreaktion ist die Abspaltung von Stickstoff (N₂), was hauptsächlich beim Erwärmen der Diazoniumsalze auftritt (Abbildung 3.6 links unten). Das dabei entstehende hochreaktive Phenylkation kann dann von Nucleophilen abgefangen werden. In wässrigen Systemen werden so Phenole erhalten, jedoch können auf diese Weise viele andere Substituenten in den Aromaten eingeführt werden wie Nitrile, Chloride und Bromide (Sandmeyerreaktion), Fluoride (Schiemannreaktion) sowie Hydride (Dediazonierung), wobei im Gegensatz zum ionischen Reaktionsverlauf auch ein radikalischer Mechanismus möglich ist.^[87] Einen großen Einfluss auf die thermische Stabilität der Diazoniumsalze hat dabei neben dem Substitutionsmuster auch das zugehörige Anion. Während die Chloride komplett dissoziiert in Lösung vorliegen und meist nicht isoliert werden können, sind Komplexe mit nicht nucleophilen Anionen wie Tetrafluoroborat oder Hexafluorophosphat stabiler und können oftmals ohne Zersetzung in reiner Form erhalten werden.^[88]

Probenkonzentration c , der Schichtdicke d und dem molaren Extinktionskoeffizienten ε_λ ab:

$$A_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_\lambda * c * d \quad (3.1)$$

I_0 ist dabei die Lichtintensität einer Referenzlösung ohne absorbierende Substanz und I die abgeschwächte Lichtintensität der Probenlösung. Durch die lineare Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration ist die UV/Vis-Spektroskopie eine häufig verwendete Methode, um gelöste Stoffe mit bekanntem Extinktionskoeffizienten zu quantifizieren.

3.4 NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie von *nuclear magnetic resonance*) ist eine der wichtigsten Methoden zur chemischen Substanz-Charakterisierung. Routinemäßig werden damit kleine Moleküle identifiziert, jedoch können mit aufwendigeren Experimenten auch Biomakromoleküle auf Struktur, Dynamik und Interaktionen analysiert werden (Details dazu im zweiten Teil der Arbeit). Untersucht wird dabei der Kernspin \vec{P} und das damit verbundene magnetische Moment $\vec{\mu} = \gamma\vec{P}$.^[89] Das gyromagnetische Verhältnis γ ist eine kernspezifische Proportionalitätskonstante. Die Kernspinquantenzahl I kann halb- oder ganzzahlige Werte annehmen und befindet sich ein Kern in einem äußeren Magnetfeld $B_{0,z}$ sind nur $2I+1$ diskrete Spinzustände erlaubt. Bei der NMR-Spektroskopie werden Übergänge zwischen diesen Zuständen beobachtet, für Kerne mit $I = 1/2$ zwischen den beiden möglichen Spinzuständen $m_z = \pm 1/2$ (α und β). Die Energie dieser Zustände errechnet sich folgendermaßen.^[89]

$$E^{\alpha,\beta} = -\mu_z B_{0,z} = -\gamma\hbar m_z B_{0,z} = \pm \frac{\gamma\hbar}{2} B_{0,z} \quad (3.2)$$

Will man nun einen Übergang zwischen diesen Energieniveaus anregen, muss die Energie des eingestrahlt Photons $h\nu$ der Energiedifferenz ΔE der Zustände entsprechen (Resonanzbedingung).^[89]

$$\Delta E = \gamma\hbar B_{0,z} = h\nu \quad (3.3)$$

$$\gamma B_{0,z} = \nu * 2\pi = \omega_0 \quad (3.4)$$

Die Larmorfrequenz ω_0 hängt dabei nicht nur von der Kernsorte ab sondern auch von dessen elektronischer Umgebung, da diese das effektive Magnetfeld B_{eff} am Ort des Kerns beeinflusst. In Molekülen lassen sich daraus Rückschlüsse auf die chemische Umgebung ziehen in welcher sich der Kern befindet. Die Frequenz wird dabei meist nicht als Absolutwert angegeben, sondern im Vergleich zu einer Referenz. Die chemische Verschiebung δ berechnet sich folgendermaßen und wird in *parts per million* (ppm) angegeben:^[89]

$$\delta = \frac{\nu_{Probe} - \nu_{Referenz}}{\nu_{Referenz}} \quad (3.5)$$

Die Signale zeigen dabei zusätzlich eine Feinstruktur, die auf skalaren Kopplungen zu benachbarten Kernen über Bindungen beruht. Gemeinsam mit der chemischen Verschiebung kann damit auf die Struktur eines Moleküls rückgeschlossen werden.^[89]

Als Standardmethode wird heutzutage die Puls-FT-NMR-Technik (FT: Fourier Transformation) verwendet, bei welcher mit einem kurzen Radiowellenpuls auf die Probe eingestrahlt wird und durch das breite Frequenzspektrum alle NMR-Übergänge des betrachteten Kerns angeregt werden. Die Nettomagnetisierung, ursprünglich in Richtung des äußeren Magnetfeldes B_0 ausgerichtet, wird dabei aus der Gleichgewichtslage gekippt und die einzelnen Kernspins beginnen mit ihrer Larmorfrequenz um B_0 zu präzedieren. Diese Präzession induziert in der Empfängerspule eine oszillierende Spannung, die durch Spin-Spin-Relaxation exponentiell abnimmt und als sogenannter *free induction decay* (FID) aufgezeichnet wird. Nach Fourier Transformation wird daraus das NMR-Spektrum in der Frequenzdomäne erhalten. Durch Variation der Pulsabfolge und Einführung von Entwicklungs- und Mischzeiten, in denen Magnetisierung von einem Kern auf andere Kerne übertragen wird, entstehen mehrdimensionale Spektren deren Kreuzsignale Informationen über Konnektivität oder Konformation des Moleküls liefern (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Informationsgehalt verschiedener zweidimensionaler NMR-Spektren.

Experiment	Informationsgehalt
TOCSY ^[90]	Kreuzsignale zwischen allen Protonen eines Spinsystems
COSY ^[91]	Kreuzsignale zwischen geminal und vicinal gekoppelten Protonen
NOESY ^[92]	Kreuzsignale zwischen allen Protonen mit Abstand $r < 5-6 \text{ \AA}$
HSQC ^[93]	Kreuzsignale zwischen Protonen und direkt gebundenen Heteroatomen
HMBC ^[94]	Kreuzsignale zwischen Protonen und Heteroatomen über 2-4 Bindungen

3.5 Konfokale Mikroskopie

Bei der klassischen Mikroskopie wird das Objekt möglichst gleichmäßig ausgeleuchtet, um dann durch eine zweistufige, vergrößernde Abbildung im Detail betrachtet zu werden. Die Auflösung entlang der optischen Achse ist dabei stark limitiert und das erhaltene Bild des Objekts ist eine Überlagerung aus einer scharfen Abbildung der Punkte in der Fokalebene und einer unscharfen Abbildung von Punkten außerhalb der Fokalebene.^[95]

Bei der konfokalen Mikroskopie wird hingegen eine punktförmige Anregungslichtquelle eingesetzt, die ebenso punktuell im Objekt abgebildet wird.^[96] Durch die Fokussierung des Lichts auf ein sehr kleines Volumen ist dessen Intensität in der Fokusebene am größten und die Moleküle werden bevorzugt, jedoch nicht ausschließlich, dort angeregt. Das ausgehende Licht (reflektiertes Licht oder Fluoreszenzlicht) wird anschließend mit derselben Optik wieder in einem Punkt auf der sogenannten Zwischenbildebene fokussiert. Führt man an dieser Stelle nun vor dem Detektor eine Lochblende (*pinhole*) ein, die mit der Fokusebene konfokal ist, wird Licht von Ebenen außerhalb des Fokus effektiv ausgeblendet und es wird eine deutlich verbesserte Auflösung entlang der optischen Achse erreicht (Abbildung 3.7).

Aufgrund der punktförmigen Aufnahmetechnik ist es notwendig, das Objekt abzurastern, und die hierfür am häufigsten eingesetzte Methode ist die konfokale Laser-Rastermikroskopie (*confocal Laser scanning microscopy*, CLSM), wobei der Laserstrahl über ein bewegliches Spiegelsystem in die Probe geleitet wird.^[96]

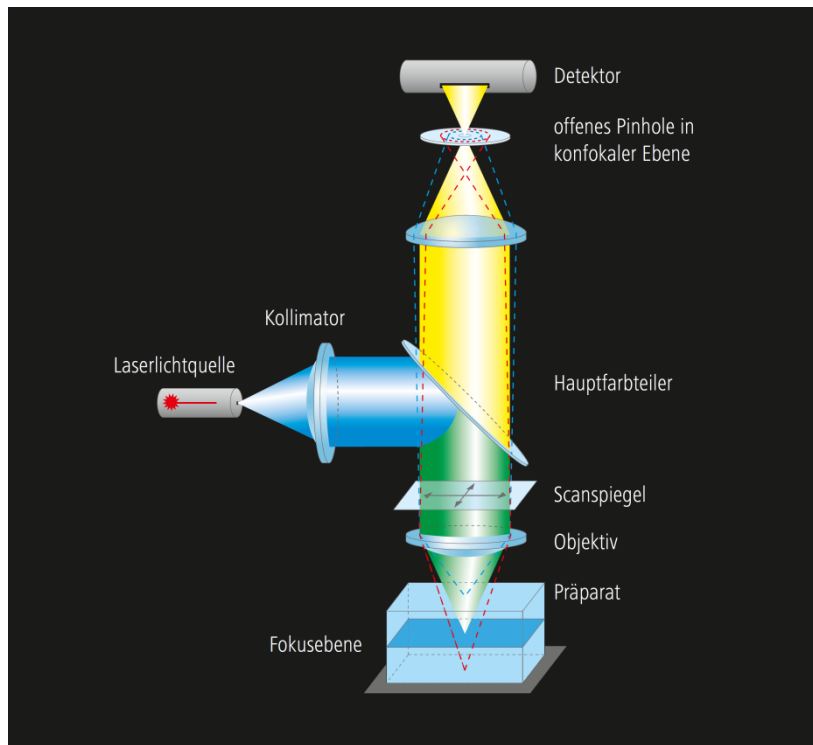


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem konfokalen Laser-Rastermikroskop. Das Anregungslicht (blauer Kegel) wird auf einem Punkt in der Fokusebene gebündelt. Das emittierte Licht wird in der konfokalen Ebene erneut fokussiert, wobei nur Licht aus der Fokusebene (gelber Kegel) die Lochblende effektiv passieren kann während Lichtquellen oberhalb oder unterhalb ausgeblendet werden (blau beziehungsweise rot gestrichelte Linien). Abbildung entnommen aus ^[97].

Das Bild wird anschließend aus den einzelnen Punktaufnahmen rekonstruiert und durch die Verlagerung der Fokusebene ist es möglich, eine dreidimensionale Abbildung des Objekts zu erstellen. Die laterale Auflösung ist dabei klassischerweise durch das Abbe-Limit^[98] begrenzt, jedoch wurden einige supraauflösende Methoden beschrieben um diese Limitierung zu überwinden, wobei auf sättigbare oder schaltbare Fluoreszenzprozesse zurückgegriffen wird.^[99-101]

Durch die Fokussierung des Lichtstrahls auf einen sehr kleinen Teil der Probe eignen sich konfokale Mikroskope auch hervorragend, um photoinduzierbare Prozesse räumlich begrenzt anzuregen und zu beobachten, wie zum Beispiel die Fluoreszenzwiederherstellung nach Photobleichung (*Fluorescence Recovery after Photobleaching, FRAP*).^[102]

3.6 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können große Populationen von suspendierten Zellen sehr schnell auf ihre Zusammensetzung und die zellulären Eigenschaften untersucht werden, indem sie einzeln einen Laserstrahl passieren und das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht detektiert wird.^[103] Der schematische Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 3.8 gezeigt.

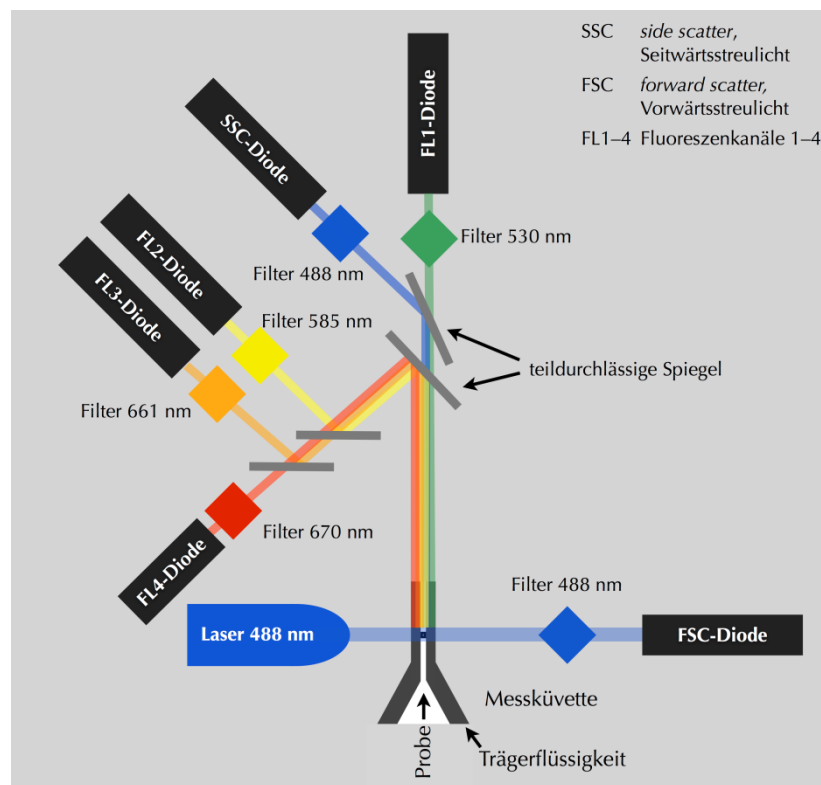


Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Die Zellsuspension wird dabei so mit einer Trägerflüssigkeit gemischt, dass einzelne Zellen nacheinander den Laserstrahl durchqueren. Die Zellen können dann anhand des emittierten Lichts charakterisiert werden, wobei in diesem Beispiel zusätzlich zum Streulicht (SSC und FSC) noch vier Fluoreszenzdetektoren zur Verfügung stehen. Abbildung entnommen aus ^[104].

In einem modernen Durchflusszytometer können mehrere 1000 Zellen pro Sekunde analysiert werden, und es wird gleichzeitig der Betrag der vorwärtsgerichteten Streuung (*forward scatter*, FSC), der Seitwärtsstreuung (*side scatter* SSC) und der Fluoreszenz bei mehreren Wellenlängen bestimmt. Das vorwärts gestreute Licht korreliert dabei grob mit dem Volumen der Zelle, während die Intensität des seitwärts gestreuten Lichts von der Granularität abhängt, ein Maß

für die Unregelmäßigkeit der Zellmembranen. Mit diesen beiden Parametern lassen sich verschiedene Zelltypen häufig bereits recht gut unterscheiden, jedoch kann die Menge der gewonnenen Informationen durch die Einführung von fluoreszenten Markern zusätzlich gesteigert werden. Meist stehen verschiedene Kanäle zur parallelen Detektion von mehreren Fluorophoren zur Verfügung. Die Zellen können je nach verwendetem Gerät zusätzlich mit einem nachgeschalteten Selektionsmechanismus gemäß ihrer Eigenschaften sortiert werden (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS)^[105].

3.7 Zellbasierte Toxizitätstests

Um die Toxizität einer Substanz zu testen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei meist kultivierte Zellen verschiedenen Konzentrationen des zu untersuchenden Stoffes ausgesetzt werden und die Überlebensrate bestimmt wird. Dabei können verschiedene Parameter detektiert werden, wie die Freisetzung von cytosolischen Enzymen, die metabolische Umsetzung von Substraten, die Membranpermeabilität, die Zell-Proliferation oder die Platingeffizienz.^[106]

Beim *colony forming assay* werden einzelne Zellen in hoher Verdünnung auf einem Substrat ausgelegt, für eine gewisse Zeit einer Konzentrationsreihe der Substanz ausgesetzt und nach einer weiteren Inkubationszeit (>10 Tage) werden die entstandenen Kolonien fixiert, angefärbt und ausgezählt.^[107-108] Ein Nachteil dieser Methode ist die lange Wartezeit und aufgrund der großen Verdünnung ist der Verbrauch an Substraten und Medien relativ hoch. Außerdem ist die Toxizität bei isolierten Zellen nicht immer direkt mit der bei Zellen im Verbund vergleichbar.^[106]

Als Alternative wurden viele kolorimetrische Methoden entwickelt, die auf einer spezifischen Aufnahme oder Umsetzung eines Farbstoffs von gesunden Zellen beruhen. So wird Trypanblau nur von toten Zellen aufgenommen, während Neutralrot exklusiv von lebenden Zellen endozytotisch aufgenommen wird.^[109-110] Ein weiterer oft eingesetzter Farbstoff zur Detektion der Zell-Proliferation ist Resazurin (Handelsname: AlamarBlue®).^[111] Das blaue, nicht fluoreszente

Resazurin wird von lebenden Zellen zum pinken Resorfurin umgesetzt, dessen Fluoreszenz dann quantifiziert werden kann. Bei zu langen Inkubationszeiten und zu hohen Zellkonzentrationen kann Resorfurin jedoch weiter bis zum farblosen Dihydroresorfurin reduziert werden, was eine Fehlerquelle bei der Quantifizierung darstellen kann (Abbildung 3.9).^[112]

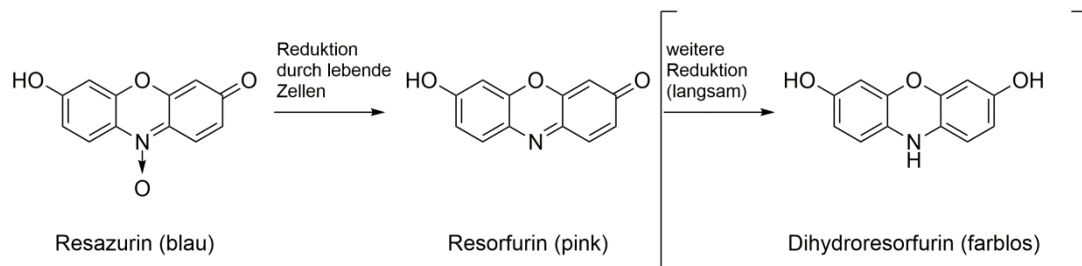


Abbildung 3.9: Reduktion von Resazurin. In Gegenwart von lebenden Zellen wird das fluoreszente Resorfurin gebildet, welches weiter zum farblosen Dihydroresorfurin reduziert werden kann.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Azobenzolsynthese

Das Azobenzolderivat für die Anwendung in den photoschaltbaren zellpenetrierenden Peptiden sollte über eine Azokupplung einer 4-Aminobenzoessäure an ein Anilinderivat hergestellt werden. Nach dem Einbau in das Peptidrückgrat liefert es an beiden *para*-ständigen Positionen sehr rigide aromatische Amide, wodurch die räumliche Reorientierung bei der Isomerisierung maximiert wird. Außerdem sollten *ortho*-ständige Alkylsubstituenten eingebracht und deren Einfluss auf die thermische *cis*→*trans*-Isomerisierung untersucht werden. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Reihe von alkylsubstituierten 4-Aminobenzoessäuren und Anilinen synthetisiert.

4.1.1 Synthese von alkylsubstituierten 4-Aminobenzoessäuren

Während die unsubstituierte 4-Aminobenzoessäure kommerziell erhältlich ist, wurden die alkylsubstituierten Derivate ausgehend von 2,6-Dimethylanilin (**1a**) und 2,6-Diisopropylanilin (**1b**) gemäß Abbildung 4.1 synthetisiert. Zunächst wurde dabei eine Bromierung in *para*-Position unter Verwendung von Hexamethylentetramin-Brom-Komplex (HMTAB) durchgeführt.^[113] Die erhaltenen Arylbromide (**2a,b**) wurden anschließend in einer Rosenmund-von-Braun Reaktion zu den Arylcyaniden (**3a,b**) umgesetzt,^[114] welche schließlich zur jeweiligen Benzoessäure hydrolysiert wurden (**4a,b**).

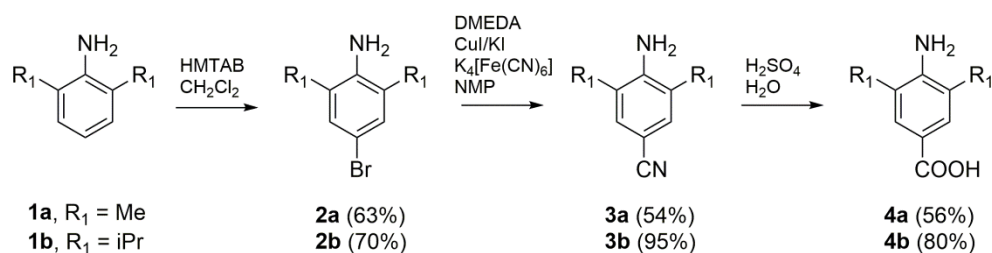


Abbildung 4.1: Synthese der alkylsubstituierten 4-Aminobenzoessäurederivate.

4.1.2 Synthese von alkylsubstituierten Anilinen

Anilin und 3,5-Dimethylanilin sind kommerziell erhältlich, wohingegen die Derivate mit sperrigeren Alkylsubstituenten (Et, iPr, tBu) nur synthetisch zugänglich waren. Das 3,5-Di-tert-butylanilin (**6**) wurde über eine Schmidt-Umlagerung aus 3,5-Di-tert-butylbenzoesäure (**5**) hergestellt (Abbildung 4.2).^[115]

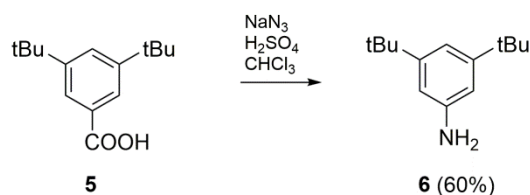


Abbildung 4.2: Synthese von 3,5-Di-tert-butylanilin aus 3,5-Di-tert-butylbenzoesäure.

3,5-Diethylanilin (**12a**) und 3,5-Diisopropylanilin (**12b**) wurden ausgehend von den entsprechenden 2,6-Dialkylanilinen in 5 Stufen realisiert (Abbildung 4.3). Dazu wurde das Amin zunächst Tosyl-geschützt (**8a,b**) und anschließend *para*-ständig nitriert (**9a,b**)^[116]. Die Tosylgruppe wurde danach sauer hydrolysiert und das freie Amin mittels einer Hydrodeamidierung zum 3,5-Dialkylnitrobenzol umgesetzt (**11a,b**), welches dann abschließend mit Zinnchlorid zum Amin reduziert wurde.^[117]

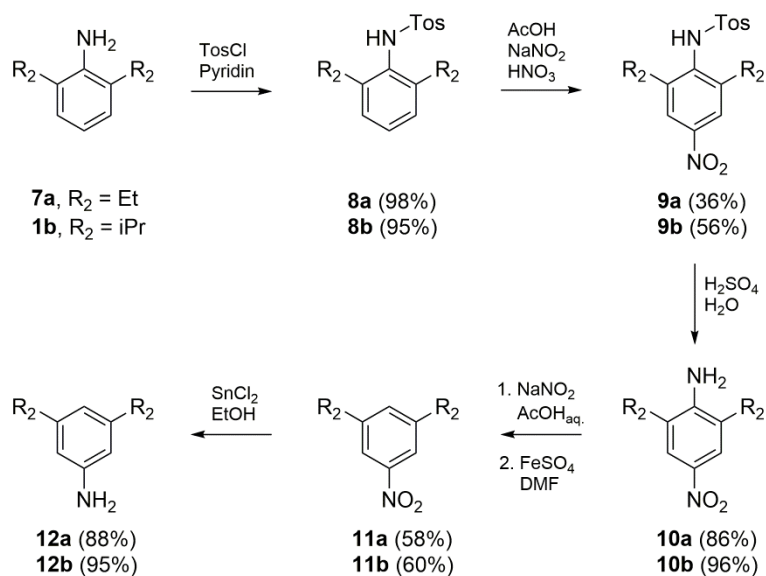


Abbildung 4.3: Synthese von 3,5-Dialkylanilinen aus den entsprechenden 2,6-Dialkylanilinen.

4.1.3 Azokupplung

Die so erhaltene Bibliothek an alkylsubstituierten Anilinderivaten sollte anschließend zu den entsprechenden Azobenzolen umgesetzt werden. Um die thermische Stabilität der Derivate zu untersuchen, wurde die Aminofunktionalität zusätzlich acetyliert mit einem Amid als Resultat, in Analogie zur Situation nach dem Einbau in das Peptidrückgrat.

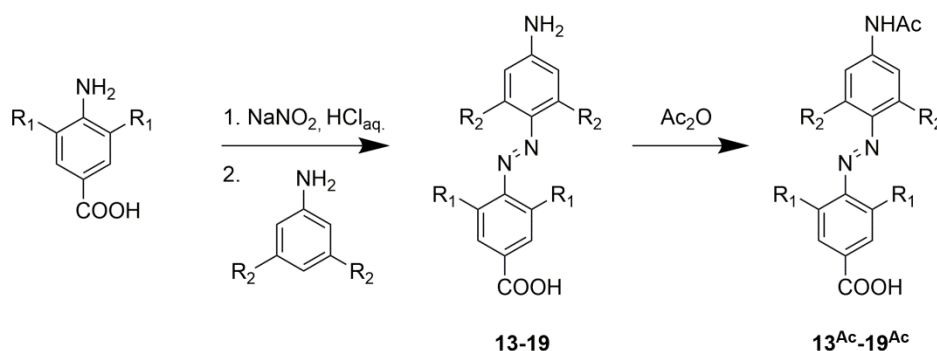


Abbildung 4.4: Schema der Synthese von Azobenzolderivaten zur Inkorporation in das Peptidrückgrat eines PCPPs (**13-19**) sowie deren acetylierte Varianten (**13^{Ac}-19^{Ac}**).

Vor allem die Synthesen der höher substituierten Azobenzole gestalten sich jedoch schwierig, weshalb in einigen Fällen nur Spuren der gewünschten Verbindung erhalten wurden (experimentelle Details in Abschnitt 6.2.2). Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Derivate.

Tabelle 4.1: Alkylsubstituierte Azobenzolderivate die über eine Azokupplung zugänglich waren. λ_{max} ist die Wellenlänge bei der die jeweilige Verbindung ein lokales Absorptionsmaximum aufweist.

Verbindung	R ₁	R ₂	Ausbeute	λ_{max} [nm]
13^{Ac}	H	H	40%	361
14^{Ac}	H	Me	65%	354
15^{Ac}	H	Et	25%	351
16^{Ac}	H	iPr	<5%	348
17^{Ac}	Me	H	<5%	353
18^{Ac}	Me	Me	<5%	340
19^{Ac}	iPr	Me	<5%	328

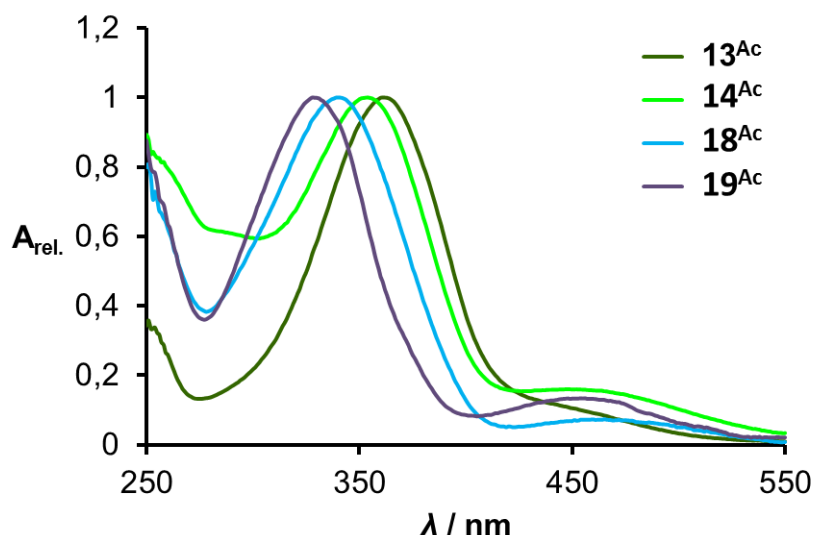


Abbildung 4.5: Absorptionsspektren der *trans*-Formen von vier ausgewählten Azobenzolen (13^{Ac} , 14^{Ac} , 18^{Ac} und 19^{Ac}). Die Spektren wurden jeweils auf eine maximale Absorption von 1 normiert.

Mit zunehmendem sterischen Anspruch der *ortho*-ständigen Substituenten ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu kleineren Wellenlängen zu beobachten (Tabelle 4.1, Abbildung 4.5). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Planarität des *trans*-Azobenzols zu einem gewissen Teil aufgegeben werden muss, um den sterischen Interaktionen der Substituenten auszuweichen, wodurch die Konjugation der Benzolringe gestört wird.

4.1.4 Kinetik der thermischen *cis*→*trans*-Isomerisierung

Um die thermische Stabilität der *cis*-Formen der gewonnenen Azobenzolderivate zu untersuchen, wurden das *trans*-Isomer zunächst für 20-40 Minuten bei 366 nm bestrahlt. Dabei bildete sich das jeweilige *cis*-Azobenzol, was anhand der Abnahme der Hauptabsorptionsbande verfolgt werden konnte. Nachdem sich ein photostationärer Zustand eingestellt hatte und auch bei weiterer Bestrahlung keine Änderung des Absorptionsspektrums mehr zu beobachten war, wurden die Proben im Dunkeln aufbewahrt und in bestimmten Zeitabständen UV/Vis-Spektren aufgenommen um die thermische Rückreaktion zu verfolgen (Abbildung 4.6).

Die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge λ zu einer bestimmten Zeit t berechnet sich dabei aus der Summe der beiden Anteile der *cis*- und *trans*-Form.

$$A_{\lambda,t} = \varepsilon_{trans,\lambda} * c_{trans,t} * d + \varepsilon_{cis,\lambda} * c_{cis,t} * d \quad (4.1)$$

Die Gesamtkonzentration des Azobenzols c_{ges} ist konstant und ergibt sich aus der Summe der beiden Isomere.

$$c_{ges} = c_{trans,t} + c_{cis,t} \quad (4.2)$$

Außerdem kann das Verhältnis der beiden Extinktionskoeffizienten durch einen Proportionalitätsfaktor κ beschrieben werden.

$$\varepsilon_{cis,\lambda} = \kappa * \varepsilon_{trans,\lambda} \quad (4.3)$$

Führt man die obigen Formeln zusammen erhält man folgenden Zusammenhang:

$$A_{\lambda,t} = \varepsilon_{trans,\lambda} * c_{ges} * d - \varepsilon_{trans,\lambda} * c_{cis,t} * d + \kappa * \varepsilon_{trans,\lambda} * c_{cis,t} * d \quad (4.4)$$

Der erste Term auf der rechten Seite von Gleichung 4.4 entspricht der Absorption einer Probe mit allen Moleküle n in der *trans*-Form ($A_{\lambda,max}$).

$$A_{\lambda,t} = A_{\lambda,max} - c_{cis,t} * ((1 - \kappa) * \varepsilon_{trans,\lambda} * d) \quad (4.5)$$

Durch Umformen der Gleichung wird ersichtlich, dass die Konzentration des *cis*-Azobenzols proportional zur Differenz der maximalen Absorption und der Absorption zum Zeitpunkt t ist.

$$c_{cis,t} = \frac{A_{\lambda,max} - A_{\lambda,t}}{(1 - \kappa) * \varepsilon_{trans,\lambda} * d} \quad (4.6)$$

Die thermische *cis*→*trans*-Isomerisierung ist eine Reaktion erster Ordnung. Die Reaktionsgeschwindigkeit v hängt also nur von der Konzentration der *cis*-Form und der Reaktionskonstante k ab (Gleichung 4.7), wodurch sich der zeitliche Verlauf der Konzentration durch einen exponentiellen Zerfall beschreiben lässt (Gleichung 4.8).

$$v = -\frac{dc_{cis,t}}{dt} = k * c_{cis,t} \quad (4.7)$$

$$c_{cis,t} = c_{cis,0} * e^{-k*t} \quad (4.8)$$

Trägt man also den Term $(A_{\lambda,max} - A_{\lambda,t})$ gegen die Zeit auf erhält man eine Exponentialfunktion, aus deren Verlauf sich die Reaktionskonstante ableiten lässt, mit der wiederum die Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ des Zerfalls berechnet werden kann.

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (4.9)$$

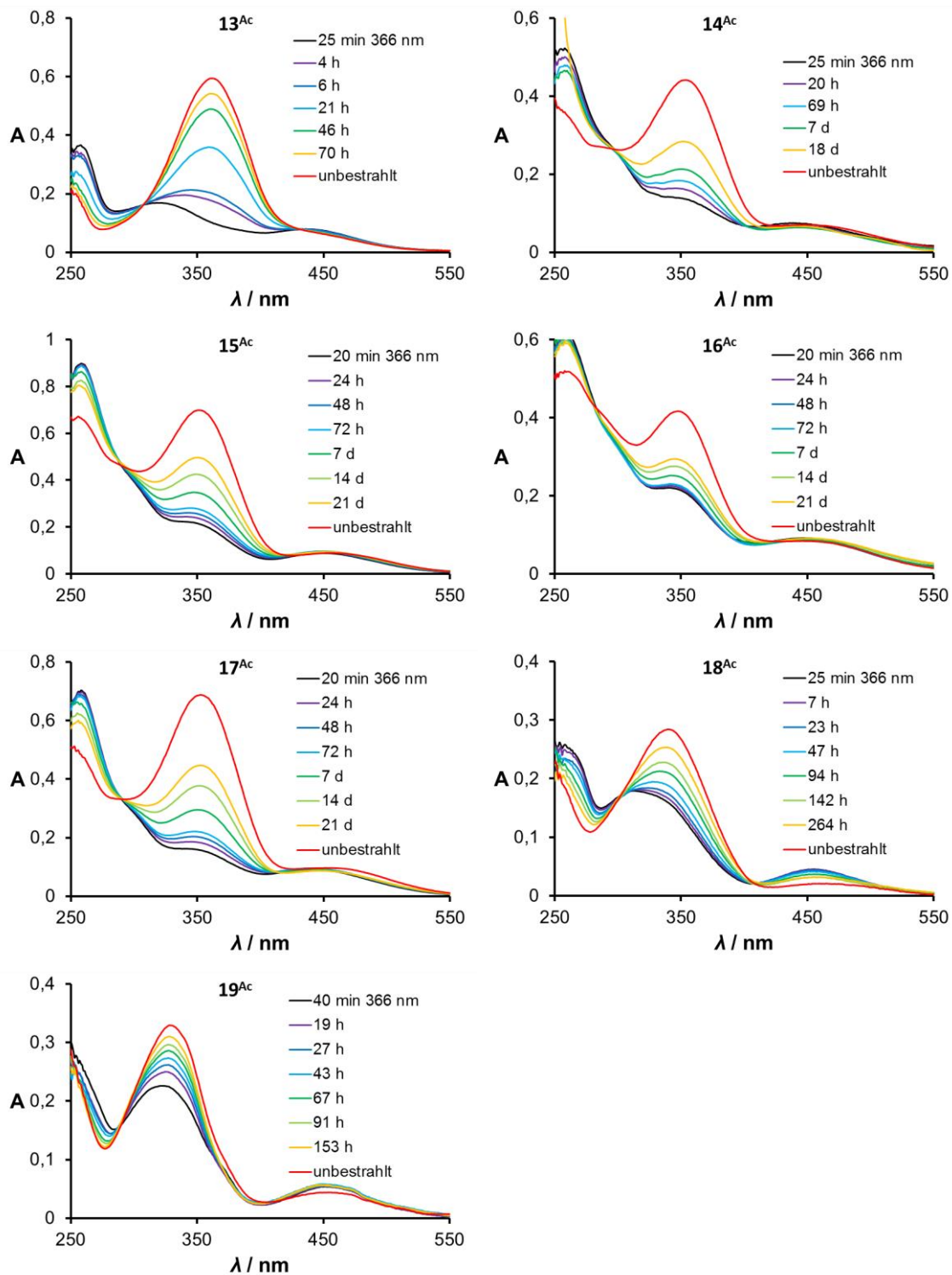


Abbildung 4.6: UV/Vis-Absorptionsspektren der verschiedenen Azobenzolderivate zur Untersuchung der Kinetik der themischen *cis*→*trans*-Isomerisierung. Die Azobenzole wurden dazu in DMSO:PBS (1:1) gelöst. PBS: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH=7,4.

Zur Auswertung wurden die Absorptionswerte bei der Wellenlänge analysiert, bei der die *trans*-Form ihren maximalen Extinktionskoeffizienten aufweist (λ_{max}). Die

Absorption der unbestrahlten Probe diene als Maximalwert $A_{\lambda,max}$, da hier näherungsweise die komplette Probe in der thermodynamisch stabileren *trans*-Form vorliegen sollte. Die erhaltenen Messwerte wurden mit einer Funktion der Form $y(t) = y_0 * e^{-k*t} + C$ angenähert. Durch den Korrekturterm C wird einerseits berücksichtigt, dass in der unbestrahlten Probe nicht alle Moleküle *trans*-ständig vorliegen (C negativ), andererseits wurde bei den sehr langsamen Reaktionskinetiken beobachtet, dass die Absorptionsspektren nicht wieder die ursprünglichen Werte der unbestrahlten Probe erreichten. Vermutlich treten während des langen Beobachtungszeitraums andere Reaktionen auf (Hydrolyse, Oxidation) deren Einfluss ebenfalls in diesem Korrekturterm berücksichtigt werden können (C positiv). Die ermittelten Parameter der Funktionen und die daraus abgeleiteten kinetischen Konstanten der Reaktion sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Parameter der thermischen *cis*→*trans*-Isomerisierung ermittelt durch Regression mit einer Funktion der Form: $y(t) = y_0 * e^{-k*t} + C$. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Funktionen auf einen Startwert $y_0 = 1$ normiert.

	R₁	R₂	y₀	C	k [1/h]	τ_{1/2} [h]
13^{Ac}	H	H	1,00 ± 0,02	0,04 ± 0,02	3,7E-2 ± 1,7E-3	18,7 ± 0,9
14^{Ac}	H	Me	1,00 ± 0,19	0,30 ± 0,20	2,1E-3 ± 6,7E-4	330 ± 95
15^{Ac}	H	Et	1,00 ± 0,06	0,21 ± 0,06	1,9E-3 ± 1,8E-4	356 ± 35
16^{Ac}	H	iPr	1,00 ± 0,06	0,40 ± 0,06	2,0E-3 ± 2,0E-4	348 ± 35
17^{Ac}	Me	H	1,00 ± 0,05	0,20 ± 0,06	2,1E-3 ± 1,9E-4	329 ± 30
18^{Ac}	Me	Me	1,00 ± 0,02	0,04 ± 0,03	5,7E-3 ± 2,4E-4	121 ± 6,0
19^{Ac}	iPr	Me	1,00 ± 0,03	-0,03 ± 0,03	1,7E-2 ± 1,2E-3	40,1 ± 2,9

Während das unsubstituierte Azobenzol (**13^{Ac}**) eine relativ kurze Halbwertszeit von 19 h aufweist, sind alle einfach substituierten Verbindungen deutlich stabiler, mit Halbwertszeiten im Bereich von 2 Wochen, wobei der sterische Anspruch der Substituenten nur eine untergeordnete Rolle einnimmt (**14^{Ac}**-**16^{Ac}**). Außerdem scheint es keinen großen Einfluss zu haben an welchem Benzolring sich die Alkylgruppen befinden, wie der Vergleich der beiden methylsubstituierten Derivate **14^{Ac}** und **17^{Ac}** zeigt. Tragen jedoch beide Benzolringe

Alkylsubstituenten in *ortho*-Position, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder deutlich zu.

Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte anhand der verschiedenen Mechanismen der Isomerisierung geliefert werden, welche in Abschnitt 1.2.1 kurz vorgestellt wurden. Während in Verbindung **13^{Ac}** eine Rotation um die zentrale N-N-Bindung vermutlich recht einfach stattfinden kann, ist diese bei den alkylsubstituierten Derivaten durch die sterischen Interaktionen gehindert und die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt ab. Sperrige Substituenten an beiden *ortho*-ständigen Positionen könnten jedoch eine Aufweitung der zentralen C-N-N-Bindungswinkel bewirken, was eine Reaktion über einen Inversionsmechanismus begünstigen könnte (Abbildung 4.7). Die Reproduktion dieser Ergebnisse war Teil der Bachelorarbeit von D. Scheerer und lieferte vergleichbare Daten.^[118]

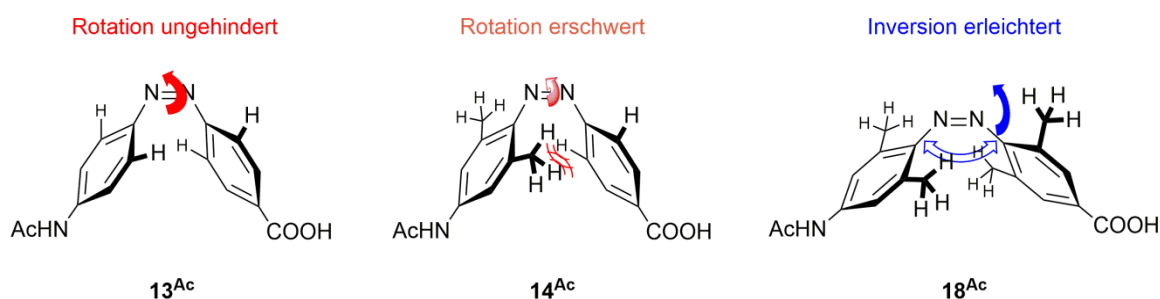


Abbildung 4.7: Modell zur Erklärung der Isomerisierungsraten der verschiedenen Azobenzolderivate unter dem Einfluss der *ortho*-ständigen Alkylsubstituenten. Die Rotation um die N-N-Bindung sollte bei unsubstituierten Azobenzolen relativ ungehindert vonstattengehen, während im Fall der einseitig substituierten Derivate eine sterische Hemmung dieser Rotation angenommen werden kann. Im Fall der beidseitig substituierten Derivate könnte eine Inversion über einen linearen Übergangszustand bevorzugt ablaufen, da die zusätzlichen sterischen Interaktionen durch eine Aufweitung der N-N-C-Bindungswinkel minimiert werden.

4.1.5 Azobenzol-Bausteine für die Festphasen-Peptidsynthese

Zum Einbau in das Peptidrückgrat mittels SPPS sollten die Azobenzole zu Fmoc-geschützten Derivaten umgesetzt werden. Aufgrund der thermischen Stabilität der *cis*-Form und der einfachen Synthese in guten Ausbeuten fiel die Wahl dabei auf das Methyl-substituierte Derivat **14**. Das aromatische Amin wurde dabei zum einen direkt mit einer Fmoc-Gruppe geschützt, zum anderen wurde eine

Amidkupplung mit einem geschützten Glutaminsäurederivat durchgeführt (Abbildung 4.8).

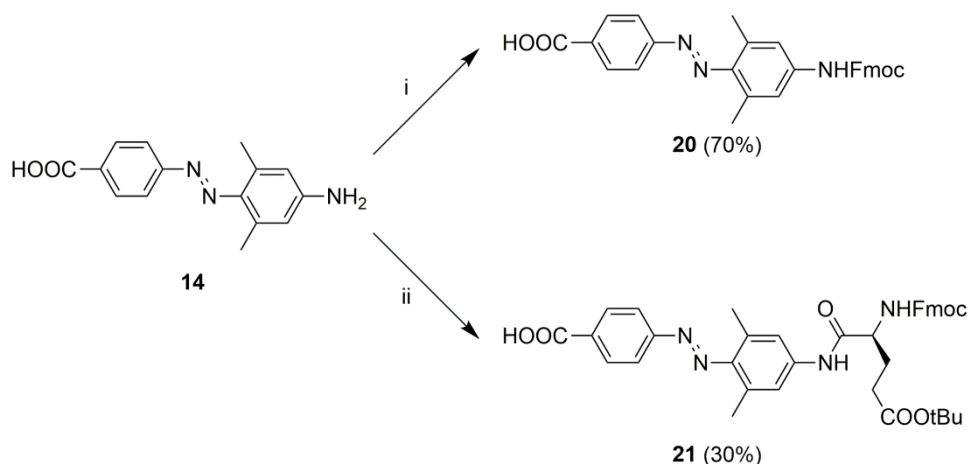


Abbildung 4.8: Synthese von Fmoc-geschützten Azobenzolderivaten in Lösung als Bausteine für die SPPS. i) Fmoc-Cl, Aceton, 10% Na₂CO_{3,aq}; ii) Fmoc-Glu(OtBu)-OH, HATU, HOAt, DIPEA, NMP.

4.2 Acetylierte PCPPs

4.2.1 Peptidsynthese

Die erhaltenen Azobenzolbausteine **20** und **21** wurden zusammen mit den geschützten Derivaten der Aminosäuren Arginin (R) und Glutaminsäure (E) per Festphasensynthese unter Verwendung der Fmoc-tBu-Schutzgruppenstrategie zu den gewünschten Peptiden umgesetzt (Abbildung 4.9). Auf diese Weise sollten zunächst die beiden Peptide ^{Ac}E₆R₉ und ^{Ac}E₉R₉ synthetisiert werden.

Als feste Phase wurde ein Aminomethyl-Polystyrol-Harz mit Rink-Amid-Linker^[119] verwendet, der nach Abspaltung C-terminale Carboxamide liefert. Um eine positive Ladung am N-Terminus zu vermeiden, wurde das Amin acetyliert.

Fmoc-Glu(OtBu)-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH wurden mit HBTU/HOBt aktiviert, während die aromatischen Carbonsäuren der Verbindungen **20** und **21** nur bei einer Aktivierung mit DCC/HOBt gekuppelt werden konnten. Die Ausbeute wurde über die charakteristische Absorption des bei der Fmoc-Entschützung entstehenden Dibenzofulven-Piperidin-Addukts bestimmt und lag für alle

Bausteine typischerweise bei über 95%. Bei der Verwendung von Verbindung **20** wurden jedoch bei der sukzessiven Kupplung des folgenden Glutaminsäure-Bausteins an das aromatische Amin deutlich geringere Ausbeuten erzielt (~20%). Auch durch die Verwendung des stärkeren Aktivators HATU/HOAt konnte die Ausbeute nicht über 50% gesteigert werden. Verbindung **21** hat den Vorteil, dass die schwierige Kupplung des weniger nukleophilen aromatischen Amins nicht an der festen Phase stattfindet, sondern in einer vorgeschalteten Reaktion in Lösung. Dadurch wird die Gesamtausbeute der Peptidsynthese nicht durch diesen ineffektiven Schritt reduziert, da in diesem Fall sowohl die Kupplung von Verbindung **21** als auch die Kupplung des nächsten Glutaminsäure-Bausteins in quantitativen Ausbeuten durchgeführt werden konnte.

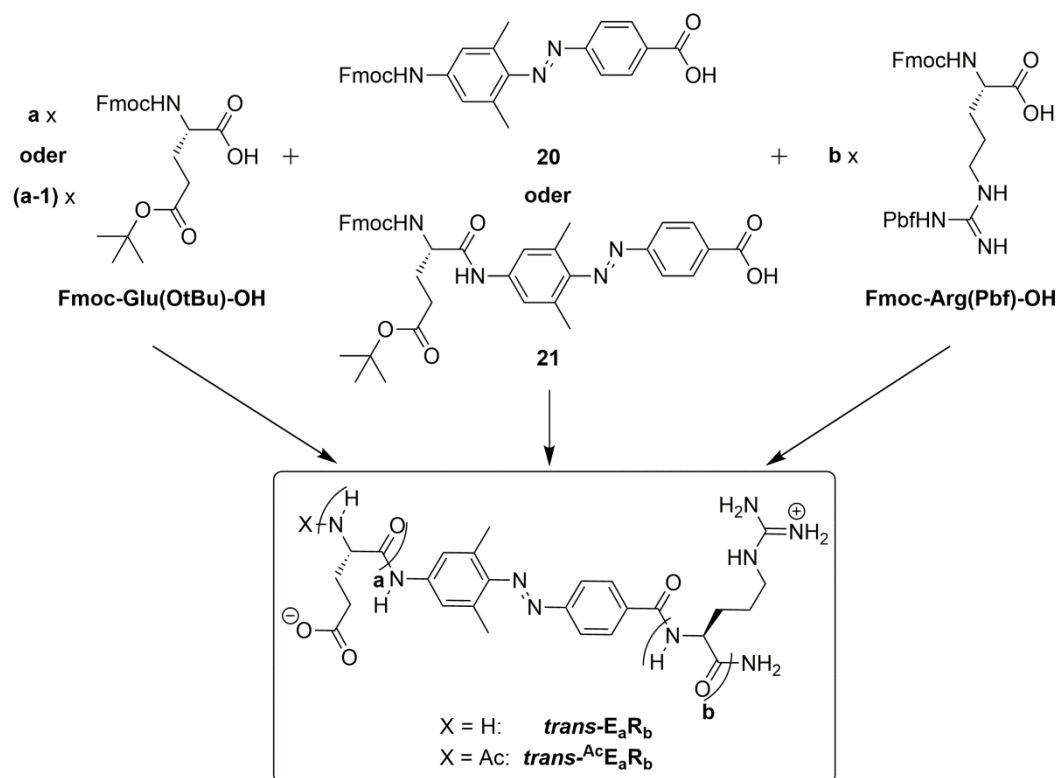


Abbildung 4.9: Schema der Peptidsynthese ausgehend von den 4 oben dargestellten Bausteinen. Die Struktur der erhaltenen Peptide ist im unteren Teil dargestellt und die Nomenklatur ist folgendermaßen festgelegt: die Konfiguration der N-N-Doppelbindung des Azobenzols wird durch den Präfix *cis*- oder *trans*- spezifiziert, die Anzahl der Glutaminsäure (E)- und Arginin (R)-Bausteine wird jeweils durch eine tiefgestellte Nummer ($E_a R_b$) festgelegt und eine N-terminale Acetylierung wird durch ein hochgestelltes ‚Ac‘ bezeichnet.

4.2.2 Reinigung und Charakterisierung

Die so erhaltenen Peptide wurden über RP-HPLC gereinigt und zunächst massenspektrometrisch charakterisiert (Tabelle 6.1, Seite 105). Anschließend wurden die photochemischen Eigenschaften der Peptide durch Bestrahlung bei verschiedenen Wellenlängen untersucht. Die unbestrahlten Proben zeigen jeweils eine starke Absorptionsbande mit einem Maximum bei 355 nm, da die Peptide fast ausschließlich in der thermodynamisch günstigeren *trans*-Form vorliegen. Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 nm führt zur Bildung der *cis*-Form, wobei die Absorptionsbande abnimmt und nach etwa 5 Minuten ein photostationärer Zustand, mit 60-80% der Moleküle in *cis*-Konfiguration, erreicht wird. Wird mit blauem Licht der Wellenlänge 438 nm oder 495 nm bestrahlt läuft die Rückreaktion bevorzugt ab und es wird erneut ein PSS erreicht, wobei jedoch mehr als 95% der Peptide die *trans*-Form annehmen (Abbildung 4.10). Die bei der Bestrahlung verwendeten Wellenlängen sind Emissionsbanden der verwendeten Quecksilberdampfampe und konnten jeweils über einen optischen Filter ausgewählt werden.

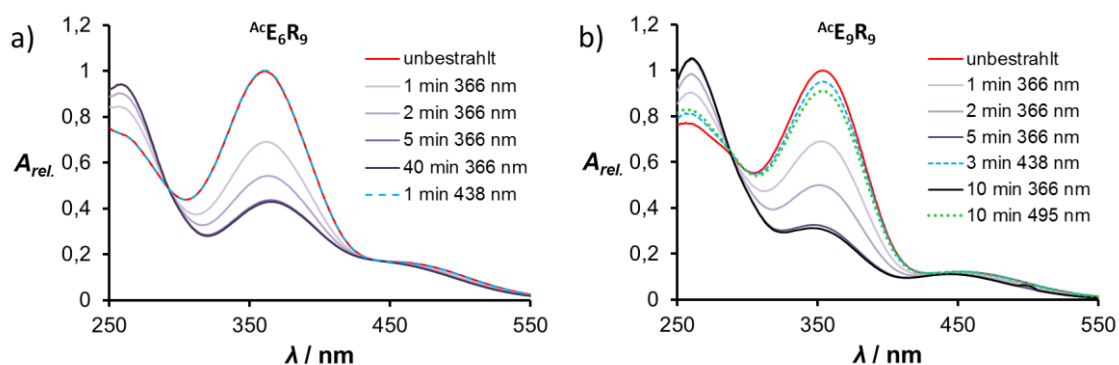


Abbildung 4.10: UV/Vis-Spektren zur Untersuchung der photochemischen Eigenschaften der acetylierten Peptide. Bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 nm nimmt A_{355} ab, bis nach etwa 5 Minuten ein photostationärer Zustand erreicht wird (schattierte violette Kurven). Bei Bestrahlung mit blauem Licht bildet sich die *trans*-Form der Peptide bevorzugt sowohl bei 438 nm (gestrichelte blaue Kurve; in a) deckungsgleich mit dem roten Spektrum der unbestrahlten Probe) als auch bei 495 nm (gepunktete grüne Kurve; nur in b)). Die Spektren wurden bei Raumtemperatur ($\sim 22^\circ C$) in Wasser aufgenommen.

Um die Peptide in ihrer *cis*-Form zu isolieren wurde ein weiterer RP-HPLC Reinigungsschritt durchgeführt, nachdem die Probe für 20 Minuten bei 366 nm

bestrahlt worden war. Die beiden Isomere besitzen dabei leicht verschiedene Retentionszeiten und konnten durch Anwendung eines optimierten Gradienten quantitativ voneinander getrennt werden. Der erste Peak im Chromatogramm ($rt = 33 \text{ min}$, Abbildung 4.11a) entspricht $cis\text{-}^{Ac}E_6R_9$ mit einer sehr schwachen Absorption bei 355 nm, während der zweite Peak mit einer Retentionszeit von 40 Minuten von $trans\text{-}^{Ac}E_6R_9$ stammt, erkennbar an einer intensiven Absorption bei 355 nm. Zur Bestimmung der Rate der thermischen $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung wurde eine Probe des ersten Peaks im Dunkeln aufbewahrt, und es wurden in bestimmten Zeitabständen UV/Vis-Spektren aufgenommen (Abbildung 4.11b). Das schwarze Spektrum wurde direkt nach der Elution aufgenommen und entspricht der cis -Form in einer Reinheit von über 95%, was anhand der fast komplett verschwundenen Absorptionsbande bei 355 nm ersichtlich ist. Durch Auftragen des Terms $(A_{355,max.} - A_{355,t})$ gegen die Zeit wurde die Halbwertszeit der thermischen $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung analog zum Vorgehen in Abschnitt 4.1.4 auf $35,1 \pm 2,6 \text{ h}$ bestimmt.

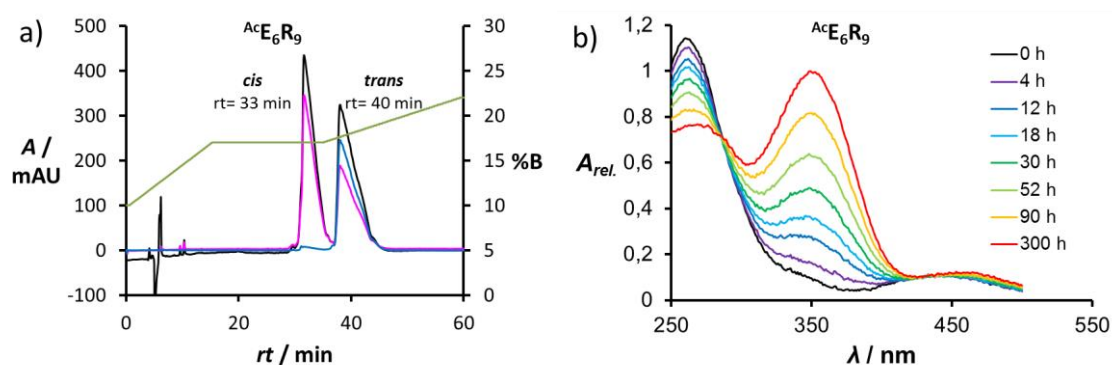


Abbildung 4.11: a) RP-HPLC-Chromatogramm der Reinigung von $^{Ac}E_6R_9$ nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 nm für 20 Minuten. In grün ist der verwendete Lösungsmittelgradient dargestellt (A: 5% Acetonitril, 0,1% TFA in Wasser; B: 5% Wasser, 0,1% TFA in Acetonitril). Detektiert wurde die Absorption bei 3 verschiedenen Wellenlängen A_{220} (schwarz), A_{270} (pink) und A_{355} (blau). b) UV/Vis-Spektren zur Verfolgung der thermischen $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung von $^{Ac}E_6R_9$ nach der Isolierung der cis -Form. Aufgenommen in 21% Acetonitril, 0,1% TFA in Wasser bei 22°C .

4.2.3 NMR-Spektroskopie

Während sich die Peptide im sauren (pH ~ 3) gut lösen, nimmt die Löslichkeit unter neutralen oder basischen Bedingungen stark ab. Vor allem von der *trans*-Form des Peptides konnten deshalb keine qualitativ hochwertigen NMR-Spektren in diesem pH-Bereich erhalten werden. Vermutlich kommt es bei den hohen Konzentrationen, die für die NMR-Spektroskopie nötig sind, zu intermolekularen Interaktionen der polyionischen Sequenzen, die zu einer Aggregation innerhalb weniger Minuten führen. Für die *cis*-Peptide trat dieses Problem zwar ebenfalls auf, jedoch verlief die Aggregation deutlich langsamer, sodass es möglich war, diese mit zweidimensionalen NMR-Spektren zu untersuchen. In Abbildung 4.12 ist eine Überlagerung eines TOCSY- und NOESY-Spektrums des Peptids ***cis*-^{Ac}E₆R₉** bei pH 5,3 gezeigt. Eine detaillierte Analyse und exakte Zuordnung aller Resonanzen ist aufgrund der starken Überlagerung der Signale nicht möglich, wie am Bereich der H^N- (8,2 bis 8,8 ppm) und H^α- (4,3 bis 4,6 ppm) Kreuzsignale ersichtlich ist.

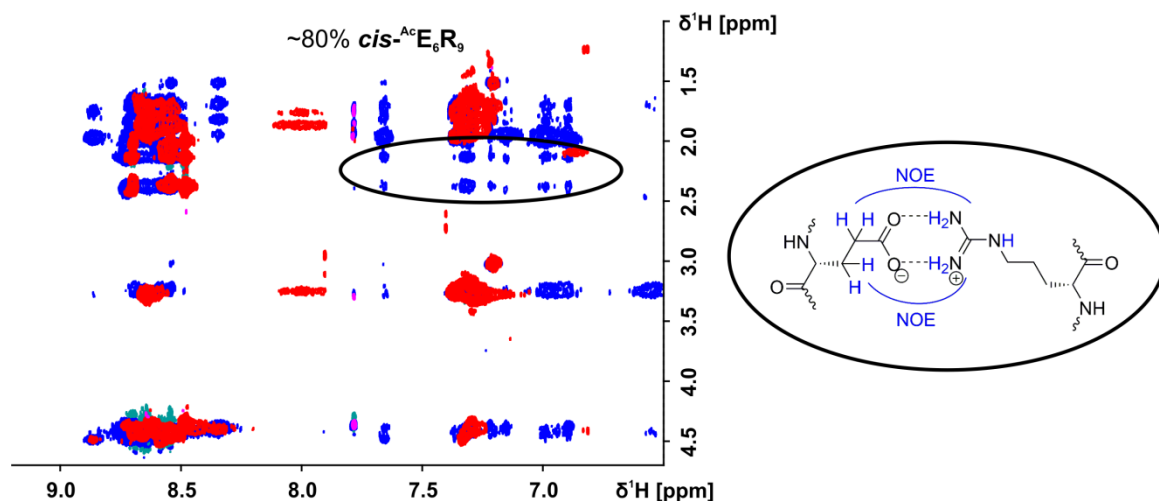


Abbildung 4.12: Überlagerung des TOCSY-Spektrums (rot) und des NOESY-Spektrums (blau) einer bei 366 nm bestrahlten Probe von ^{Ac}E₆R₉ (~80% der Moleküle in *cis*-Konfiguration). Von besonderem Interesse sind die eingekreisten NOESY-Kreuzsignale zwischen den H^β-/H^γ-Protonen der Glutaminsäuren (2,0 bis 2,5 ppm) und den stickstoffgebundenen Protonen der Guanidingruppen der Arginine (6,8 bis 7,7 ppm). Die Anwesenheit dieser Kreuzsignale spricht für eine effektive Paarung der beiden Aminosäureseitenketten wie im Schema rechts dargestellt. 0,9 mM ^{Ac}E₆R₉; 4 mM NaN₃; 0,1 mM TSP in Wasser pH = 5,3; 17°C.

Nichtsdestotrotz konnten einzelne Signale zweifelsfrei einem der beiden Aminosäuretypen zugeordnet werden und vor allem die NOESY-Kreuzsignale zwischen den H^β- und H^γ-Protonen der Glutaminsäuren (2,0 bis 2,5 ppm) und den stickstoffgebundenen Protonen der Guanidgruppen der Arginine (6,8 bis 7,7 ppm) lassen auf einen engen Kontakt der beiden Aminosäuren schließen, wie es im Falle einer Paarung der beiden polyionischen Sequenzen zu erwarten ist. Eine weitere NMR-spektroskopische Beobachtung stützt diese These der effektiven intramolekularen Paarung der polykationischen und der polyanionischen Sequenz bei den Peptiden mit dem Azobenzol in *cis*-Konfiguration. In Abbildung 4.13 ist ein Ausschnitt aus Protonenspektren der Verbindung ^A**E**₆**R**₉ bei verschiedenen *cis/trans*-Verhältnissen dargestellt. Aufgetragen ist der Bereich zwischen 9,56 ppm und 9,66 ppm mit dem isolierten Signal des aromatischen Amidprotons; das gezeigte Verhalten wurde jedoch auch bei vielen weiteren Signalen im Spektrum analog beobachtet. Die Signallage des Amidprotons zeigt dabei eine Abhängigkeit vom Verhältnis der beiden Isomere in der Lösung. In der unbestrahlten Probe mit einem *trans*-Anteil von 99% besitzt das Proton eine chemische Verschiebung von 9,606 ppm, nach Bestrahlung bei 366 nm liegt das Signal bei 9,630 ppm, wobei noch 25% der Moleküle in *trans*-Form vorliegen. Der pH-Wert der Probe wurde ursprünglich auf 3,05 eingestellt, nach der Bestrahlung wurde erneut gemessen und der pH war auf 2,95 gefallen, was wiederum die Änderung der chemischen Verschiebungen erklärt, da der pH-Wert hierauf einen großen Einfluss haben kann. Ein Grund für die erhöhte Acidität der Peptidlösung nach Bestrahlung könnte ein geänderter Protonierungszustand der Seitenketten der Glutaminsäuren sein. Normalerweise sollten diese bei pH ~ 3 zum größten Teil protoniert vorliegen (pKs = 4,3; Seitenkette der freien Glutaminsäure). Ist jedoch in der *cis*-Form eine effektive Paarung mit den Guanidinfunktionalitäten der Arginine möglich, würde die deprotonierte Form stabilisiert und Protonen freigesetzt. Eine pH-Änderung von 3,05 auf 2,95 entspricht dabei der Freisetzung von 0,23 mM H⁺-Ionen (Peptidkonzentration 0,9 mM).

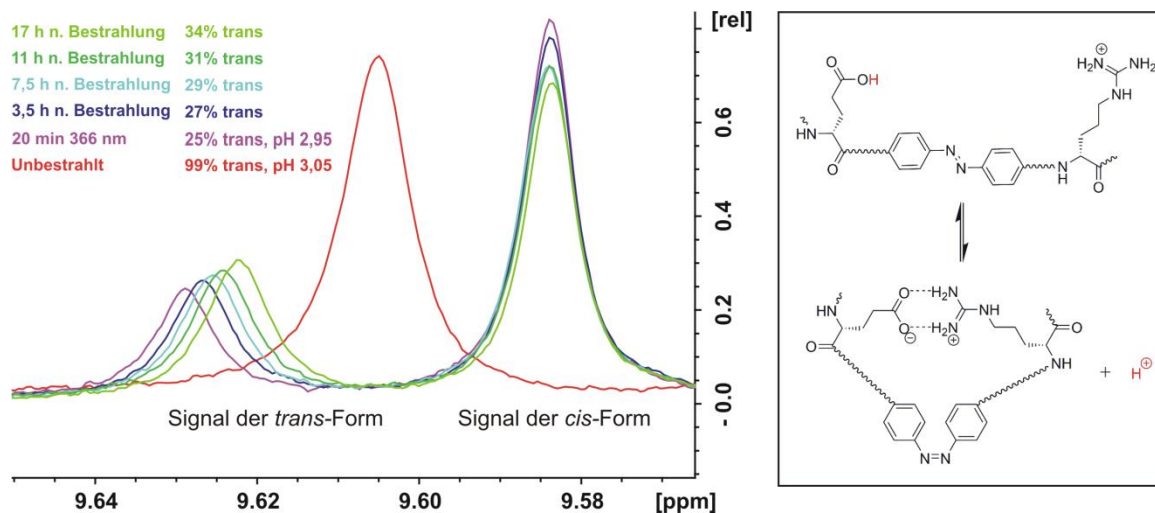


Abbildung 4.13: Ausschnitt aus Protonenspektren des Peptides ${}^{\text{Ac}}\text{E}_6\text{R}_9$. Die chemische Verschiebung des Signals des charakteristischen Amidprotons der *trans*-Form zeigt eine Abhängigkeit vom Verhältnis der beiden Isomere in der Probe. Eine pH-Messung vor und nach der Bestrahlung zeigte, dass der pH-Wert leicht abgesenkt wurde. Das Schema auf der rechten Seite gibt eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten: Die deprotonierte Form der Glutaminsäure könnte in der *cis*-Form durch die effektive Paarung mit Arginin stabilisiert werden, wodurch Protonen freigesetzt und der pH-Wert erniedrigt würde. 0,9 mM ${}^{\text{Ac}}\text{E}_6\text{R}_9$; 4 mM NaN_3 ; 0,1 mM TSP in Wasser; 17°C.

Zusammengenommen zeigen die NMR-spektroskopischen Untersuchungen, dass die gewünschte intramolekulare Paarung der polyionischen Peptidsequenzen vor allem bei der *cis*-Form zustande kommt und somit eine photoschaltbare Inhibition der zellpenetrierenden Eigenschaften der Oligoarginine angenommen werden kann.

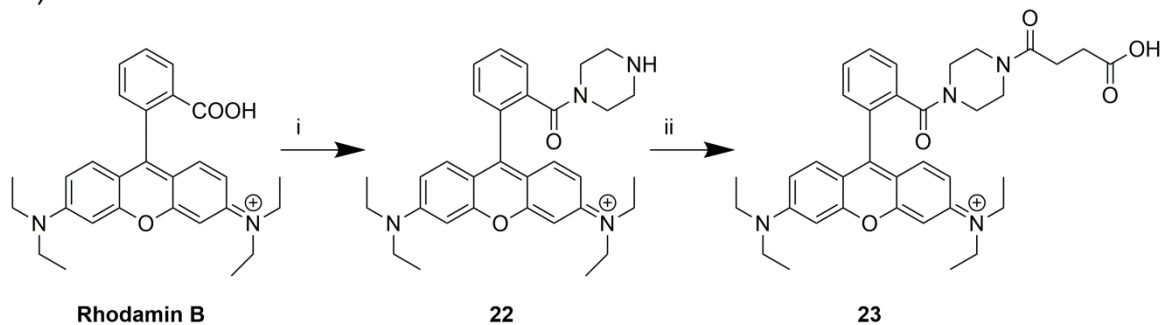
4.3 Fluoreszenzmarkierte PCPPs

4.3.1 Farbstoffsynthese und Peptidfunktionalisierung

Um die Zellgängigkeit der Peptide zu visualisieren, sollte ein Fluoreszenzfarbstoff an den N-Terminus konjugiert werden. Die Absorption des Fluorophors sollte dabei nicht mit der des Azobenzols überlagern, um eine Anregung des Farbstoffs zu ermöglichen, ohne gleichzeitig den Isomerisierungsstatus des Azobenzols zu verändern. Die Wahl fiel dabei auf das Rhodaminderivat **23** mit einem Absorptionsmaximum bei 567 nm. Synthetisiert wurde dieses aus Rhodamin B in

2 Stufen gemäß der Vorschrift von Nguyen et al.^[120]. Dieses Derivat konnte bei der SPPS unter Standardbedingungen mit HBTU/DIPEA aktiviert und an den N-Terminus der Peptide konjugiert werden. Auf diese Weise sollten die drei fluoreszenzmarkierten Peptide $^{\text{fl}}\text{E}_6\text{R}_9$, $^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$ und $^{\text{fl}}\text{E}_8\text{R}_8$ hergestellt und charakterisiert werden.

a)



b)

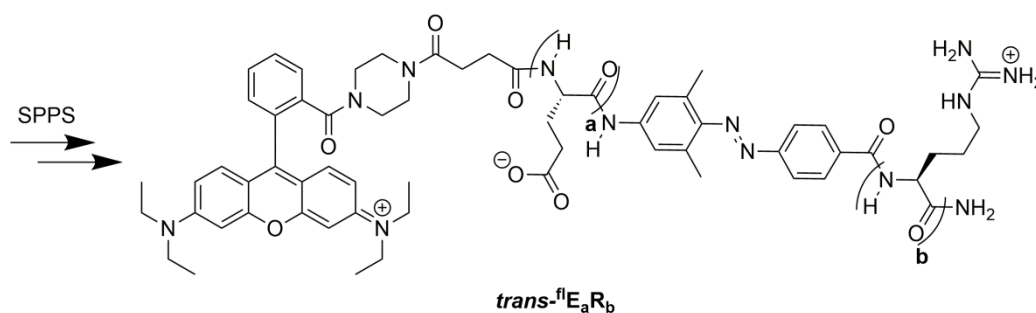


Abbildung 4.14: a) Synthese des Fluoreszenzfarbstoffes **23** aus Rhodamin B. Reaktionsbedingungen: i) NaOH, AlEt₃, Piperazin ii) Bernsteinsäureanhydrid, NEt₃, DMAP, CH₂Cl₂, 70%. b) Struktur der durch SPPS erhaltenen fluoreszenzmarkierten Peptide, welche im Folgenden durch ein hochgestelltes ‚fl‘ bezeichnet werden.

4.3.2 Reinigung und Charakterisierung

Die fluoreszenzmarkierten Peptide wurden per RP-HPLC gereinigt und massenspektrometrisch charakterisiert (Tabelle 6.1, Seite 105). Die photochemische Charakterisierung und die Isolierung der *cis*-Form wurde analog zu den acetylierten Peptiden durchgeführt, und die Ergebnisse sind in Abbildung 4.15 am Beispiel von $^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$ zusammengefasst. Das UV/Vis-Spektrum der Peptide wird dominiert von der starken Absorptionsbande des Fluoreszenzfarbstoffes **23** bei 566 nm (Abbildung 4.15a, b). Bei Bestrahlung bei 366 nm stellte sich ebenfalls nach etwa 5 Minuten ein photostationärer Zustand ein, wobei der *cis*-Anteil mit ~40% jedoch geringer war als bei den acetylierten Peptiden (Abbildung 4.15b, c).

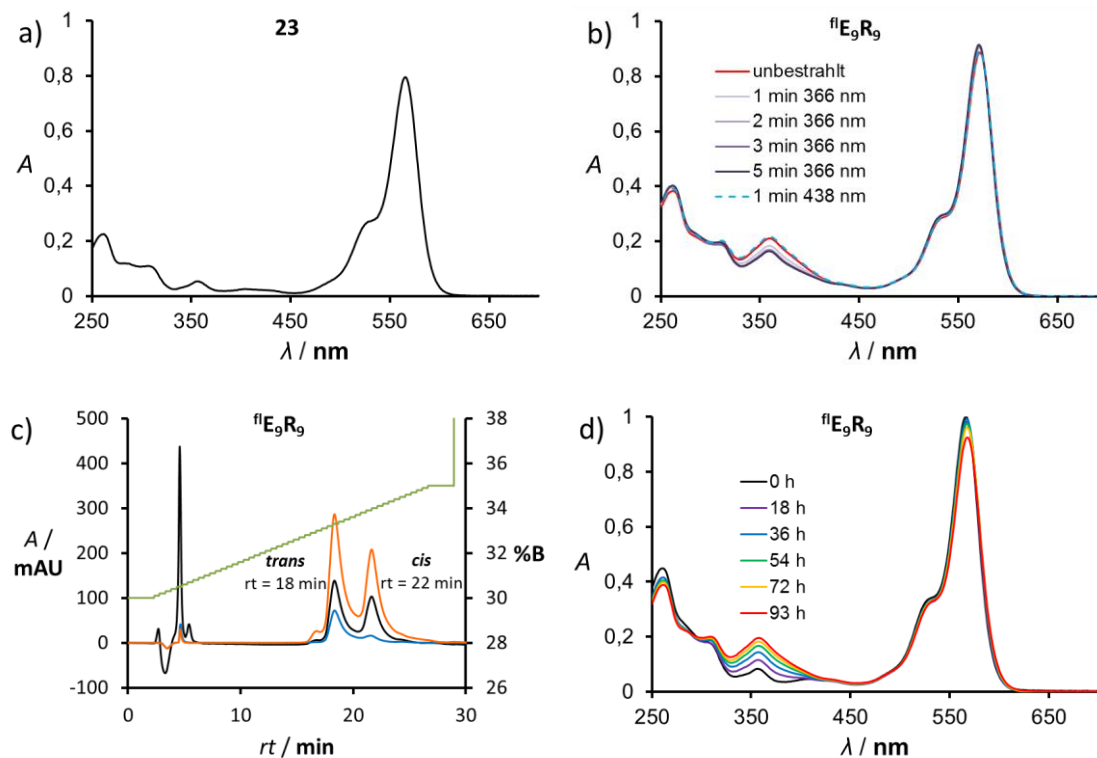


Abbildung 4.15: a) UV/Vis-Absorptionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs **23** in Wasser bei 22°C b) Photochemische Eigenschaften des Fluoreszenzmarkierten Peptids ${}^f\text{E}_9\text{R}_9$ in Wasser bei 22°C c) RP-HPLC-Chromatogramm der Reinigung von ${}^f\text{E}_9\text{R}_9$ nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 nm für 20 Minuten. In grün ist der verwendete Lösungsmittelgradient dargestellt (A: 5% Acetonitril, 0,1% TFA in Wasser; B: 5% Wasser, 0,1% TFA in Acetonitril). Detektiert wurde die Absorption bei 3 verschiedenen Wellenlängen A_{220} (schwarz), A_{355} (blau) und A_{566} (orange) d) UV/Vis-Spektren zur Verfolgung der thermischen *cis*→*trans*-Isomerisierung von ${}^f\text{E}_9\text{R}_9$ nach Isolierung der *cis*-Form. Aufgenommen in ~33% Acetonitril, 0,1% TFA in Wasser bei 22°C.

Dieser Einfluss eines konjugierten Fluorophors auf das Gleichgewicht im photostationären Zustand wurde zwar schon für andere azobenzolhaltige Peptide beschrieben, jedoch ist der genaue Mechanismus nicht geklärt.^[121] Da auch der Fluorophor bei 366 nm eine schwache Absorptionsbande besitzt, wird dieser bei der Bestrahlung ebenso angeregt. Es wäre möglich, dass der angeregte Fluorophor seine Energie anschließend strahlungslos bei längeren Wellenlängen auf das Azobenzol überträgt, wodurch die ineffektive direkte Anregung des *cis*-Azobenzols bei 366 nm umgangen würde. Dieser zusätzliche Weg der *cis*→*trans*-Isomerisierung könnte die Verschiebung des Gleichgewichts im photostationären Zustand erklären und ist im folgenden Jablonski-Schema dargestellt.

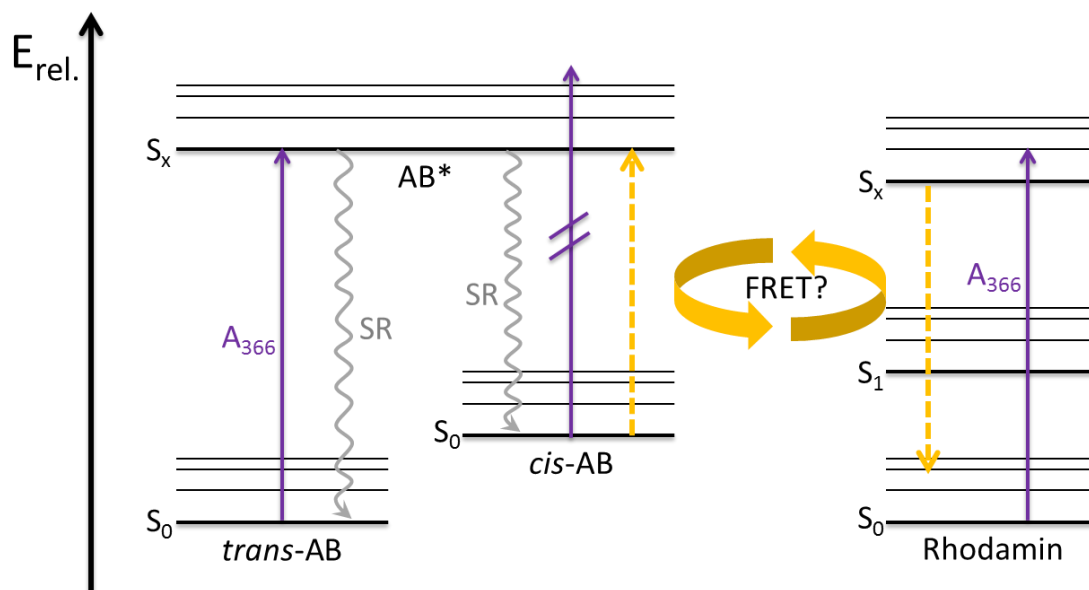


Abbildung 4.16: Vereinfachtes Jablonski-Schema zur Erklärung der Verschiebung des PSS in Gegenwart des Rhodaminfarbstoffes. Dem angeregten Azobenzol (AB^*) stehen 2 Wege der strahlungslosen Relaxation (SR) offen, wobei entweder *cis*-AB oder *trans*-AB gebildet wird. Da jedoch nur *trans*-AB effizient bei 366 nm angeregt werden kann (A_{366}) kommt es in diesem Fall zu einer Anreicherung *cis*-Form. In Gegenwart des Rhodamins ist eine alternative Depopulation des S_0 -Zustands des *cis*-AB denkbar: Dabei wird zunächst das Rhodamin bei 366 nm angeregt, um seine Energie dann auf das *cis*-AB zu übertragen (gestrichelte gelbe Pfeile), wodurch das Gleichgewicht im PSS verschoben wird.

Die beiden Isomere konnten nach Bestrahlung durch einen sukzessiven RP-HPLC-Lauf voneinander getrennt werden (Abbildung 4.15c) und die Halbwertszeit der thermischen *cis*→*trans*-Isomerisierung wurde auf $50,2 \pm 4,7$ h bestimmt (Abbildung 4.15d).

4.3.3 Quantifizierung und Visualisierung der Zellgängigkeit

Die so erhaltenen Peptide sollten anschließend auf ihre Zellgängigkeit hin untersucht werden. Dazu wurden HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Cervixkarzinoms) 30 Minuten lang bei einer Konzentration von $3 \mu\text{M}$ des jeweiligen Peptids inkubiert und anschließend per Durchflusszytometrie analysiert. Die Verteilung der Zellfluoreszenz ist in Abbildung 4.17a dargestellt. Während die *trans*-Formen der drei Peptide ähnlich effektiv aufgenommen werden, ist die Zellaufnahme der *cis*-Peptide in allen Fällen stark verringert (Vergleichbar mit der Aufnahme des Fluorophors **23**). Am größten ist der

Unterschied zwischen den beiden Konformeren bei ${}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$ und mit Abstrichen bei ${}^{\text{fl}}\text{E}_8\text{R}_8$ (12- bzw. 9-fach geringere Zellaufnahme der *cis*-Form). Beim unsymmetrischen Peptid ${}^{\text{fl}}\text{E}_6\text{R}_9$ ist die Aufnahme der *cis*-Form weniger stark eingeschränkt (3-fach geringer verglichen mit der *trans*-Form), vermutlich weil hier nicht alle Arginin-Seitenketten durch Paarung inaktiviert werden können.

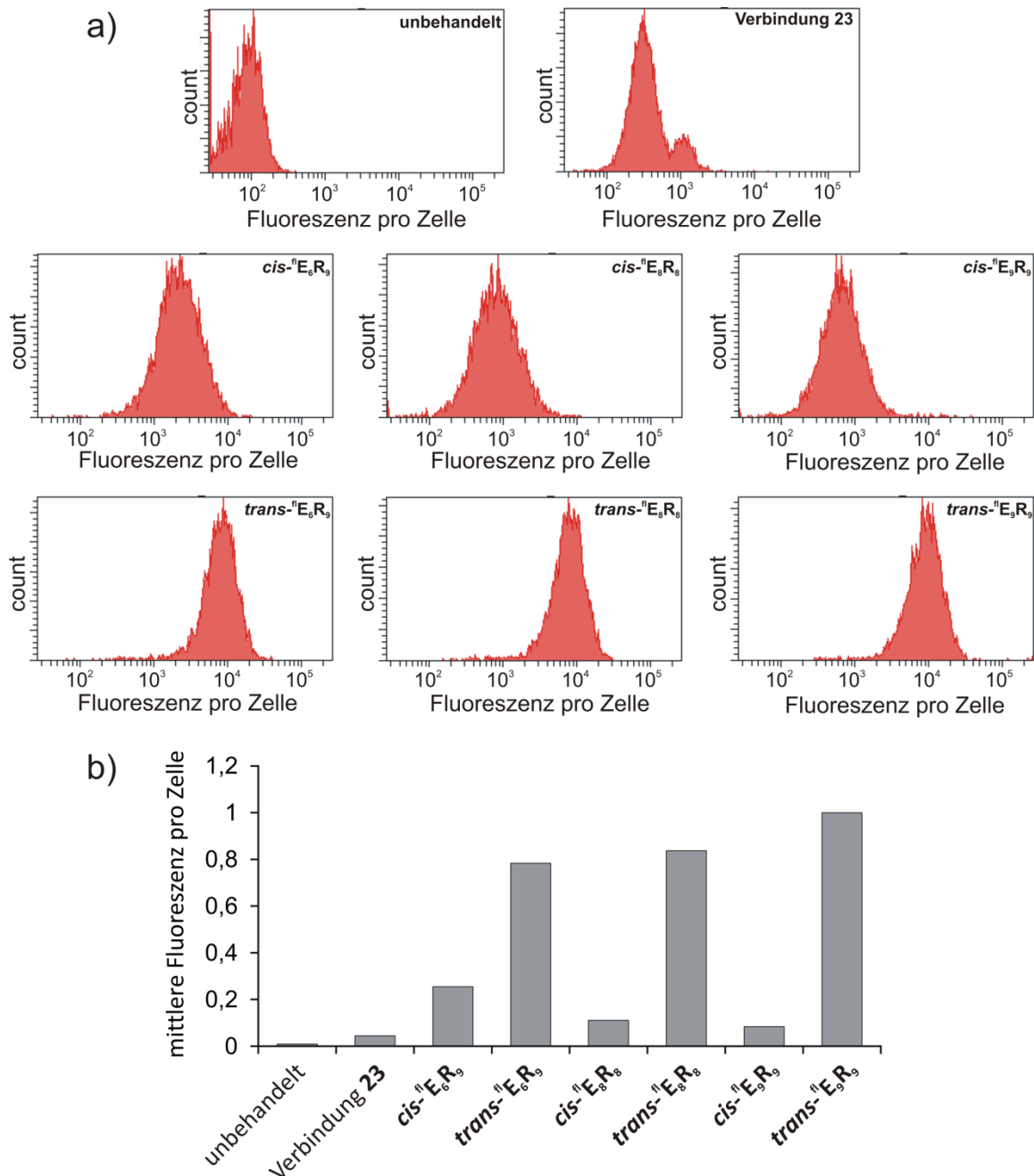


Abbildung 4.17: Quantifizierung der Zellaufnahme der fluoreszenzmarkierten Peptide mittels Durchflusszytometrie. **a)** Histogramme der Zellfluoreszenz nach Inkubation mit der jeweiligen Verbindung (3 μM) für 30 Minuten bei 37° C. **b)** Gemittelte Zellfluoreszenz relativ zu *trans*- ${}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$. Für jede Verbindung wurden 10.000 HeLa-Zellen ausgewertet.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte die Zellaufnahme durch konfokale Mikroskopie visualisiert werden und die Photoaktivierung durch lokale Bestrahlung untersucht werden, wobei jeweils das effektivste Peptid ${}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$ verwendet wurde.

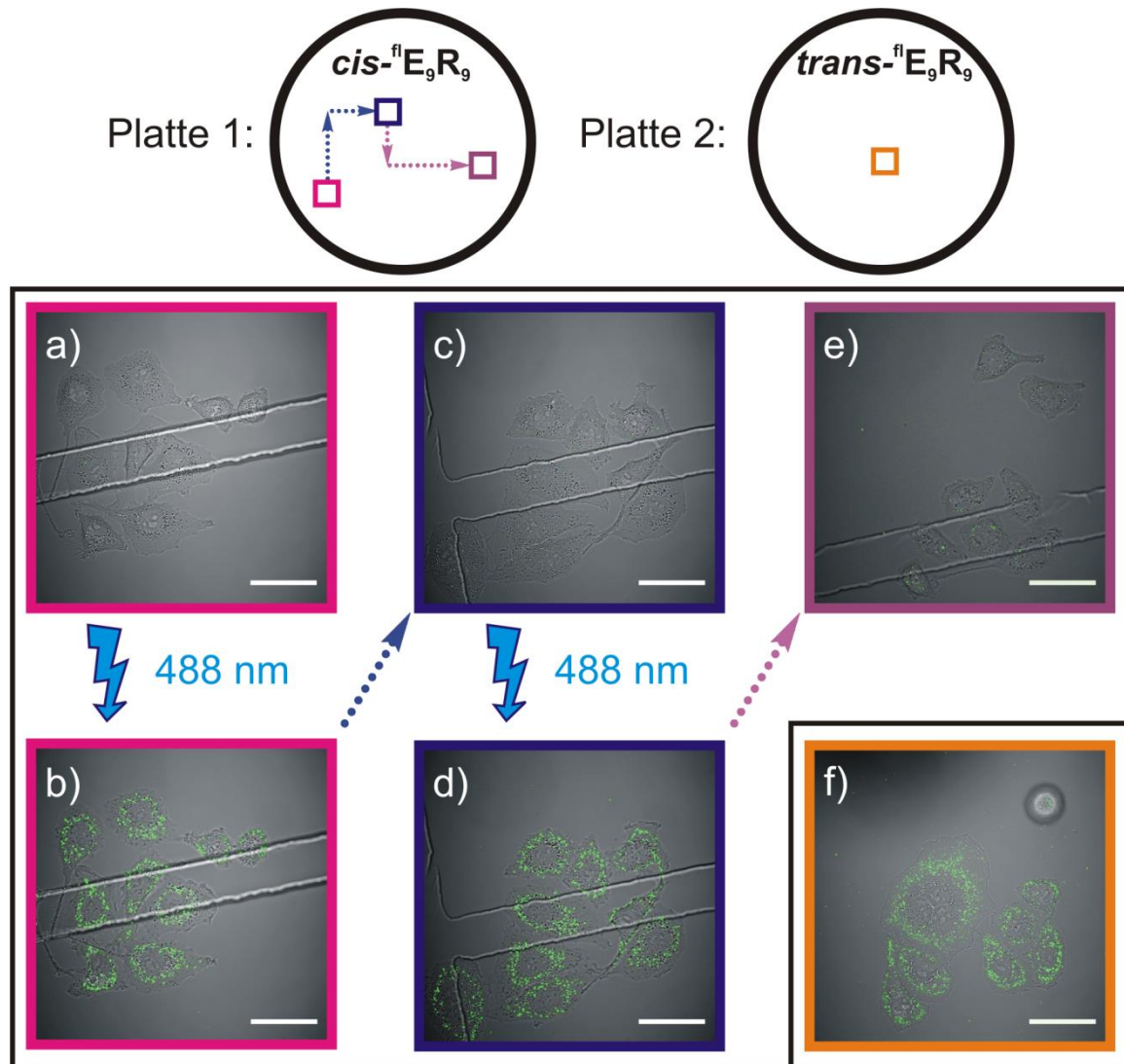


Abbildung 4.18: Photoinduzierte Zellaufnahme visualisiert durch konfokale Mikroskopie. Dargestellt ist jeweils die Überlagerung des Fluoreszenzbildes (grün) und des Hellfeldbildes (graustufen, Maßstab: 50 μm). a-e) Sequenzielle Abfolge von Bildern aus 3 Ausschnitten (pink, blau und violett) auf Platte 1, inkubiert mit 1 μM $\text{cis-}{}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$. a) 40 Minuten inkubiert; b) 85 Minuten inkubiert, 40 Minuten nach Bestrahlung des pinkfarbenen Ausschnitts bei 488 nm c) 90 Minuten inkubiert d) 130 Minuten inkubiert, 40 Minuten nach Bestrahlung des blauen Ausschnitts bei 488 nm e) 135 Minuten inkubiert. Die gepunkteten Pfeile deuten die Auswahl eines neuen Ausschnittes (>1 mm entfernt) auf derselben Platte an. f) Ausschnitt aus Platte 2, 65 Minuten inkubiert mit 1 μM $\text{trans-}{}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$.

Während $\text{cis-}{}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$ nach 40, 90 und 135 Minuten kaum von Hela Zellen aufgenommen wird (Abbildung 4.18a, c und e), kommt es bei der Inkubation mit trans-

${}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$ zu einer schnellen Akkumulation des Peptides im Zytoplasma (Abbildung 4.18f).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das inaktive *cis*- ${}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$ in definierten Bereichen sukzessive aktiviert werden kann, durch lokale Bestrahlung bei 488 nm und einer Laserleistung von 240 μW . Dabei wurde der ausgewählte Bildausschnitt (512 x 512 Pixel; 250 x 250 μm) für etwa 30 s punktförmig bestrahlt ($\sim 0,4 \text{ ms} / \mu\text{m}^2$). Abbildung 4.18 b) und d) zeigen zwei dieser Bereiche 40 Minuten nach Bestrahlung, wobei die intrazelluläre Fluoreszenz vergleichbar mit einer direkten Zugabe von *trans*- ${}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$ ist, was für eine quantitative Aktivierung spricht. In Abbildung 4.19 ist der zeitliche Verlauf der Zellaufnahme dargestellt. Der abgebildete Bereich entspricht dem pinkfarbenen Ausschnitt in Abbildung 4.18. Bereits wenige Minuten nach der Bestrahlung ist eine Anreicherung der Peptide im Zytoplasma zu beobachten, während der Zellkern ausgespart bleibt (besser sichtbar in der digitalen Version der Arbeit auf der beigelegten CD-ROM). Die Fluoreszenz zeigt dabei eine unregelmäßige punktförmige Verteilung, was für einen vesikulären Aufnahmemechanismus der Peptide spricht.

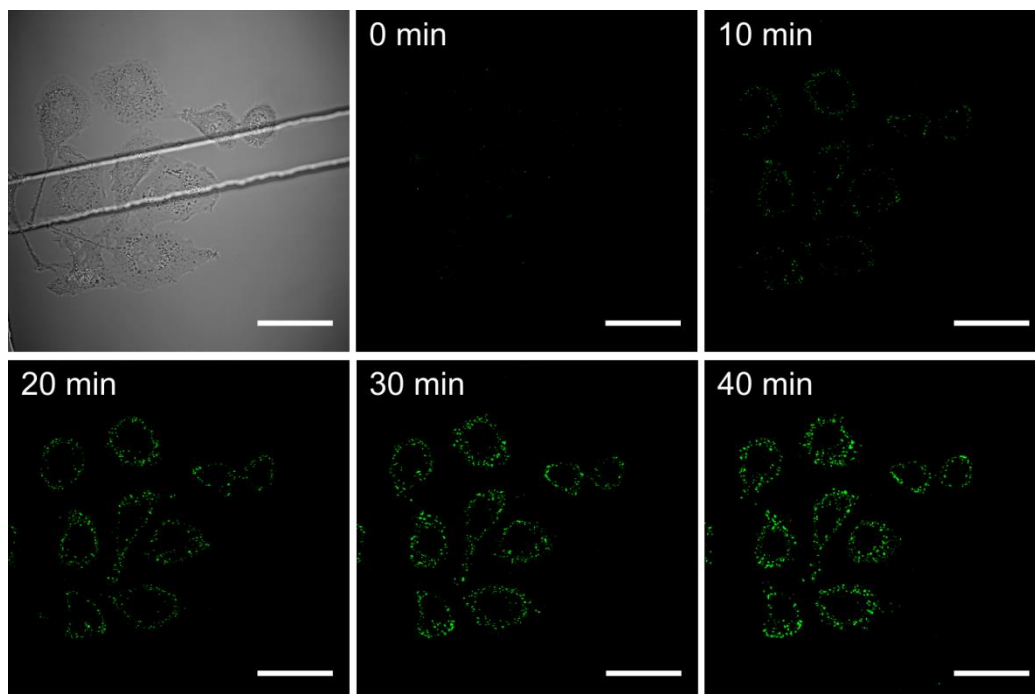


Abbildung 4.19: Zeitabhängige Aufnahme von ${}^{\text{fl}}\text{E}_9\text{R}_9$ (1 μM) in HeLa-Zellen nach Aktivierung durch Bestrahlung bei 488 nm. Hellfeldbild (oben links) und Fluoreszenzbilder zu den angegebenen Zeiten (Maßstab: 50 μm).

Ein analoges Verhalten konnte auch für alle 4 weiteren getesteten Zelllinien gezeigt werden, was die breite Anwendbarkeit dieses Vektors in allen Zelltypen veranschaulicht (Abbildung 4.20). Dabei wurden sowohl die Krebszelllinien HeLa, HCT116 (humane Epithelzellen eines Colonkarzinoms) und MCF7 (humane Epithelzellen eines Adenokarzinoms) als auch die nicht Krebszelllinien RPE1 (immortalisierte, humane Epithelzellen der Retina) und BSC1 (Epithelzellen der Niere aus Primaten) untersucht, wobei in allen Fällen der Vektor in der *cis*-Form kaum aufgenommen wurde, jedoch durch Bestrahlung bei 488 nm und einer Laserleistung von 240 μW ($\sim 0,4 \text{ ms} / \mu\text{m}^2$) quantitativ aktiviert werden konnte.

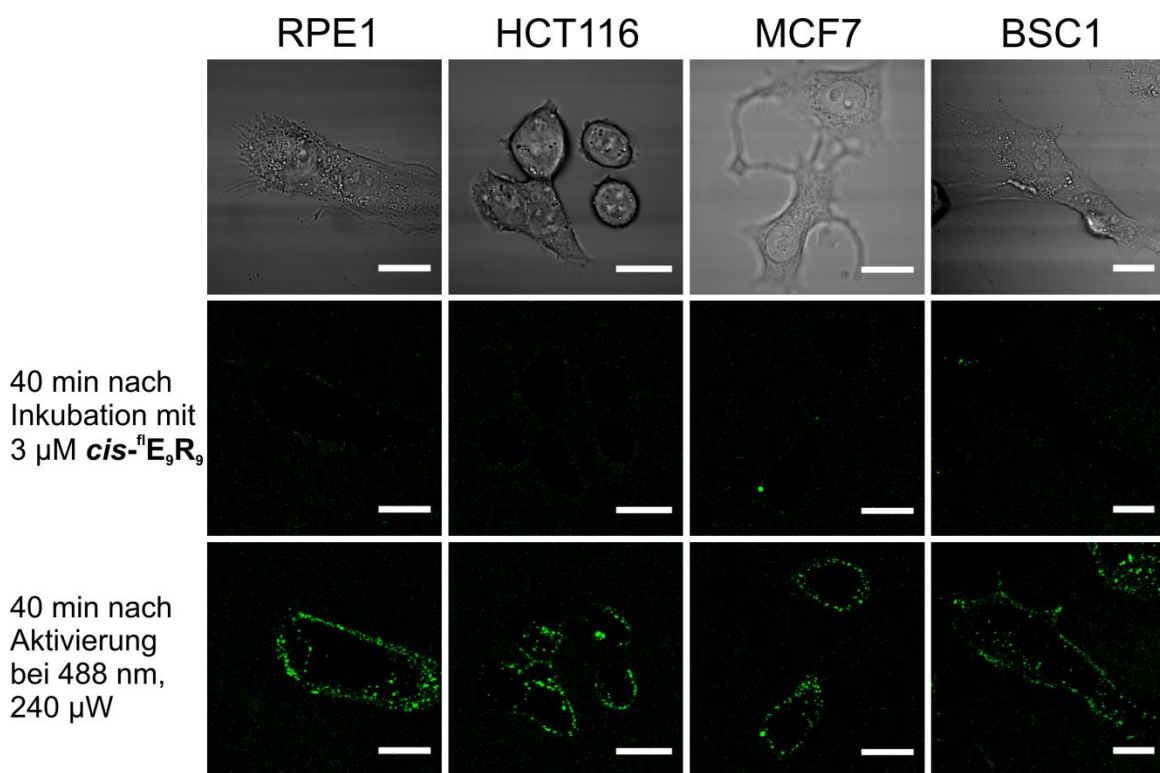


Abbildung 4.20: Photoinduzierte Aufnahme des Peptids ^{125}I - E_9R_9 in verschiedenen Zelltypen (Maßstab: 50 μm).

4.3.4 Räumlich begrenzte Anregung und Aufnahme in einzelne Zellen

In den obigen Beispielen wurde immer ein kompletter Ausschnitt mit einer hohen Lichtintensität bestrahlt, und die Zellaufnahme der Peptide konnte in allen Zellen des betreffenden Bereichs festgestellt werden. Im Folgenden sollte die räumliche

Auflösung der Photoaktivierung untersucht und optimiert werden, mit dem Ziel einer Peptidaufnahme in einzelne Zellen.

Bei der konfokalen Mikroskopie trifft das Licht in einem Kegel auf das Substrat und die Lichtintensität ist durch die Bündelung in der Fokusebene am höchsten. Wird jedoch mit einer sehr hohen Laser-Leistung auf die Probe eingestrahlt ist die Lichtintensität auch in Ebenen oberhalb und unterhalb des Fokus groß genug, um eine effektive Isomerisierung des Azobenzols von *cis* nach *trans* zu bewirken. Dadurch ist das Volumen, in dem eine Aktivierung stattfindet, nicht auf den ausgewählten Bereich der Fokusebene begrenzt, es wird vielmehr ein großes Volumen oberhalb der Zellen aktiviert, von wo aus die Peptide schnell in weiter entfernte Bereiche diffundieren und dort von Zellen aufgenommen werden können. Dieses Verhalten wurde bei der Bestrahlung mit Laser-Intensitäten $>200 \mu\text{W}$ beobachtet. In Abbildung 4.21 ist ein Ausschnitt gezeigt, in dem nur ein kleiner Bereich (rotes Rechteck) durch Bestrahlung aktiviert werden sollte, jedoch zeigen auch benachbarte Zellen eine Aufnahme des Peptids nach 30 Minuten. Die Effizienz der Aufnahme nimmt dabei wie zu erwarten mit zunehmendem Abstand vom bestrahlten Bereich ab.

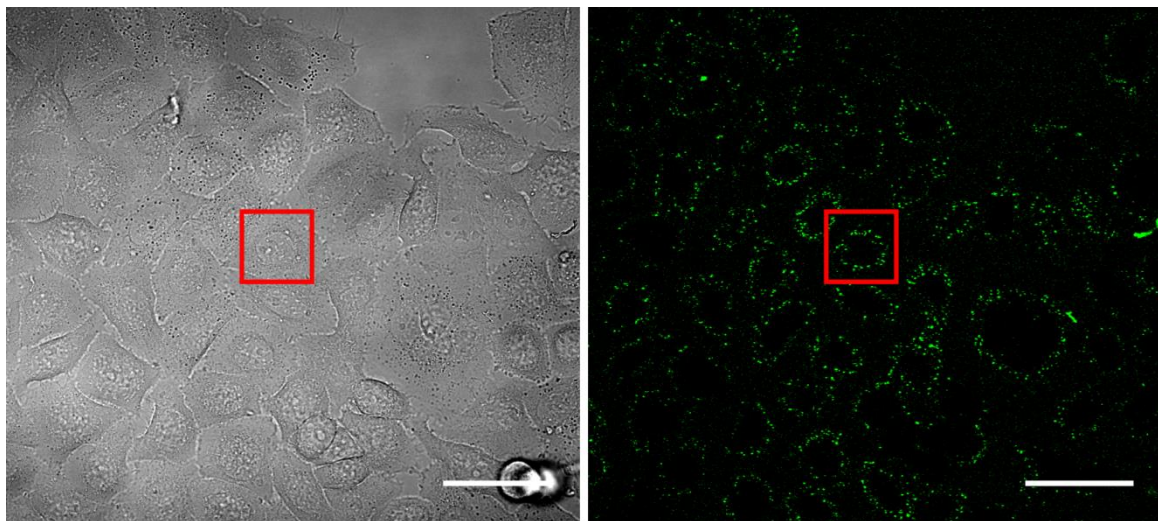


Abbildung 4.21: Hellfeldbild (graustufen, links Maßstab $50 \mu\text{m}$) und Fluoreszenzbild (grün, rechts) von dicht gewachsenen HeLa-Zellen. Die Probe wurde mit $3 \mu\text{M}$ *cis*- $^{\text{fl}}$ E_9R_9 Inkubiert, der rote Ausschnitt bei 488 nm mit hoher Laserintensität ($200 \mu\text{W}$; $\sim 0,4 \text{ ms} / \mu\text{m}^2$) bestrahlt, und 30 Minuten später wurden die Bilder aufgenommen.

Um das Volumen der Anregung zu beschränken, wurde versucht, die Laserleistung schrittweise zu verringern, sodass die Lichtintensität nur in der

Fokusebene für eine effektive Anregung ausreichend ist. Im Gegenzug wurde nicht nur einmalig bestrahlt, sondern mehrmals über einen Zeitraum von 30 Minuten. Durch diese Vorgehensweise konnte eine Aufnahme in wenige Zellen erreicht werden, während benachbarte Zellen (~50 µm entfernt) kaum betroffen sind, wie Abbildung 4.22 zeigt. In Bild c) ist sogar ein deutlicher Unterschied innerhalb einzelner Zellen zu erkennen. Hier wurde der Bereich der Aktivierung direkt neben den Zellen gewählt und eine bevorzugte Aufnahme von dieser Seite beobachtet.

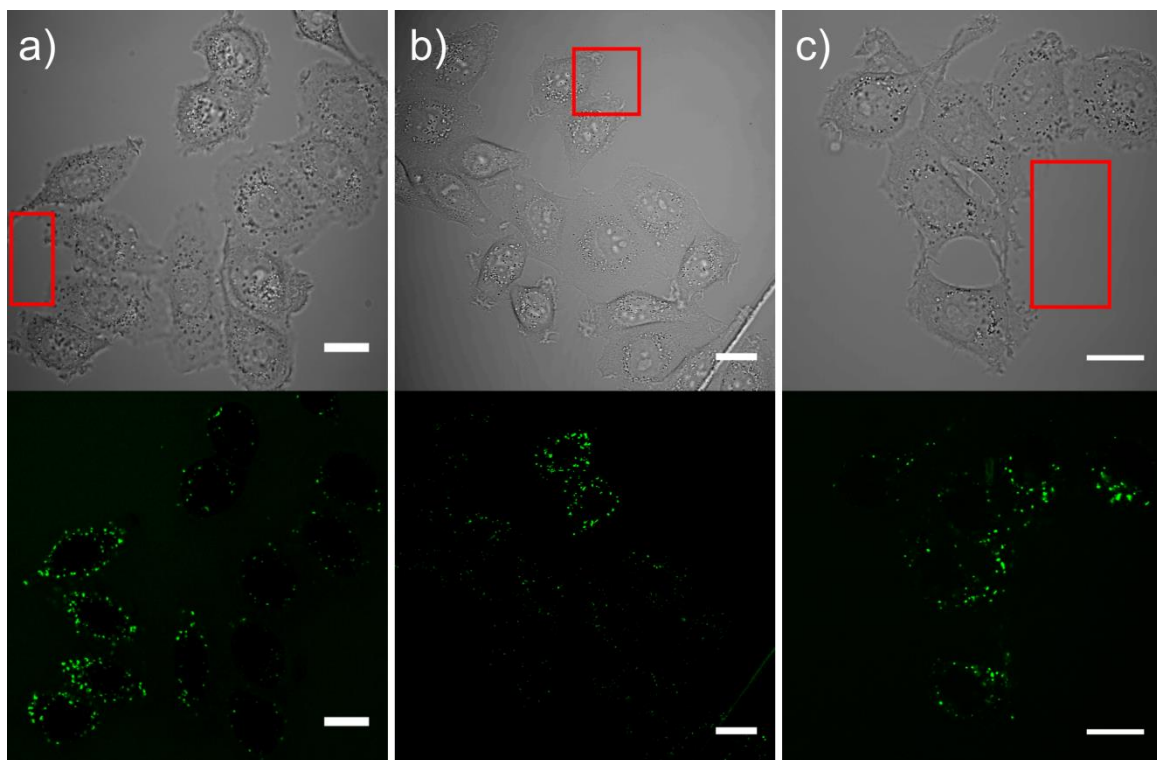


Abbildung 4.22: Räumlich begrenzte Aufnahme durch repetitive Bestrahlung ausgewählter Bereiche (rote Rechtecke) mit niedriger Lichtintensität bei 488 nm. Bedingungen der Bestrahlung: a) 1,5 µW Laserleistung, 16 scans pro Zyklus, 1 Zyklus pro Minute, 30 Minuten lang. b) und c) 1 µW Laserleistung, 16 scans pro Zyklus, 1 Zyklus pro Minute, 20 Minuten lang. Die Bilder wurden jeweils 40 Minuten nach Beginn der Bestrahlung aufgenommen (Maßstab: 20 µM).

Prinzipiell sollte auch die Rückreaktion, also die Deaktivierung der *trans*-Peptide durch Bestrahlung mit UV-Licht möglich sein, jedoch wurde aufgrund der geringen Effizienz der photoinduzierten *trans*→*cis*-Isomerisierung in Gegenwart des Fluorophors (vgl. Absatz 4.3.2) auf diese Experimente verzichtet.

4.4 PCPP-Wirkstoffkonjugate

Nachdem die Funktionalität der PCPPs mit konjugiertem Fluorophor erfolgreich gezeigt werden konnte, sollte anschließend ein Zytostatikum an die Peptide konjugiert werden, um dieses selektiv durch lokale Bestrahlung in Zellen einzuschleusen und dort einen gezielten Zelltod (Apoptose) herbeizuführen. Als Zytostatikum wurde zum einen 5-Fluorouracil (5-FU) ausgewählt, ein Antimetabolit und Inhibitor der Thymidalsynthese, und zum anderen Paclitaxel (Pac), ein Hemmer der Depolymerisation von Mikrotubuli während der Zellteilung. 5-FU ($IC_{50} \sim 20 \mu M^{[122]}$) bietet dabei den Vorteil, dass es ein sehr kleines, günstiges und stabiles Molekül ist, während Paclitaxel eine komplizierte polyzyklische Verbindung mit vielen funktionellen Gruppen und hydrolysierbaren Bindungen ist. Der Vorteil von Paclitaxel besteht in seiner sehr hohen Wirksamkeit ($IC_{50} \sim 5 \text{ nm}^{[123]}$), wodurch schon bei deutlich geringeren Konzentrationen und Inkubationszeiten ein Effekt erzielt werden sollte. Die Wirkstoffe wurden über hydrolysierbare Esterbindungen an den N-Terminus der Peptide konjugiert, wobei verschiedene Dicarbonsäuren als Linkermoleküle getestet wurden.

4.4.1 Wirkstoffmodifikation und Peptidsynthese

In Abbildung 4.23 ist die Synthese der 5-Fluorouracil-Derivate **32** und **33** schematisch dargestellt. Ausgegangen wurde dabei von Bersteinsäureanhydrid oder Adipinsäure, die im ersten Schritt zu den einfach Benzyl geschützten Derivaten umgesetzt wurden^[124-125] (**24**, **25**). Die verbliebene freie Carbonsäurefunktionalität wurde anschließend in 2 Stufen zum Chlormethylester umgesetzt^[73] (**28**, **29**), woraus dann in einer nukleophilen Substitution mit Fluorouracil die Verbindungen **30** und **31** erhalten wurden^[73]. Nach der reduktiven Abspaltung der Benzylschutzgruppe konnte die Carbonsäure mit DCC/HOBt aktiviert und unter SPPS-Standardbedingungen an das N-terminale Amin der Peptide gekuppelt werden.

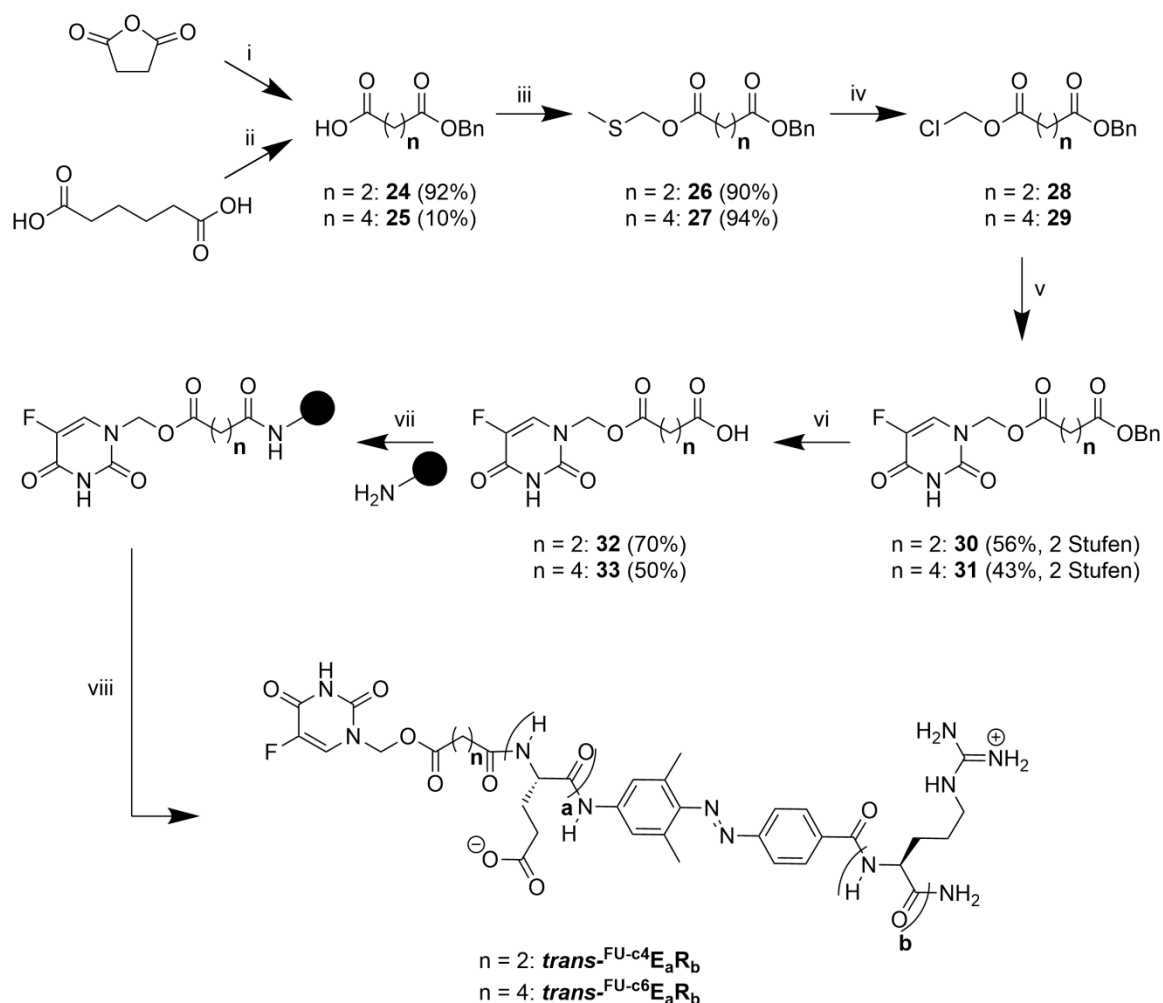


Abbildung 4.23: Schema der Synthese von 5-Fluorouracil-Derivaten zur Konjugation an das N-terminale Amin der PCPPs. Reaktionsbedingungen: i) BnOH, DMAP, CH₂Cl₂; ii) BnOH, pTos-OH, Toluol; iii) ClCH₂SCH₃, Cs₂CO₃, DMF; iv) SO₂Cl₂, CH₂Cl₂; v) 5-FU, NEt₃, DMF; vi) 10% Pd/C, AcOH, 1,4-Cyclohexadien; vii) DCC, HOBT, NMP; viii) 95% TFA, 2,5% TIS, 2,5% Wasser. Die erhaltenen Peptide werden durch ein hochgestelltes ‚FU‘ und der verwendete Linker mit ‚c4‘ (Bernsteinsäure) bzw. ‚c6‘ (Adipinsäure) gekennzeichnet.

Die Paclitaxel-Derivate **34** und **35** konnten durch eine direkte Umsetzung mit Bersteinsäureanhydrid oder Glutarsäureanhydrid nach Ryppa et al. erhalten werden, wobei selektiv die 2'-OH-Gruppe modifiziert wird.^[126] Diese wurden anschließend in die beiden NHS-Aktivester **36** und **37** überführt.^[126] Da Paclitaxel unter den stark sauren Abspaltbedingungen bei der SPPS nicht stabil ist, wurde das Peptid erst mit freiem N-terminalen Amin synthetisiert und von der festen Phase abgespalten, um dann mit den jeweiligen Aktivestern in Lösung umgesetzt zu werden.

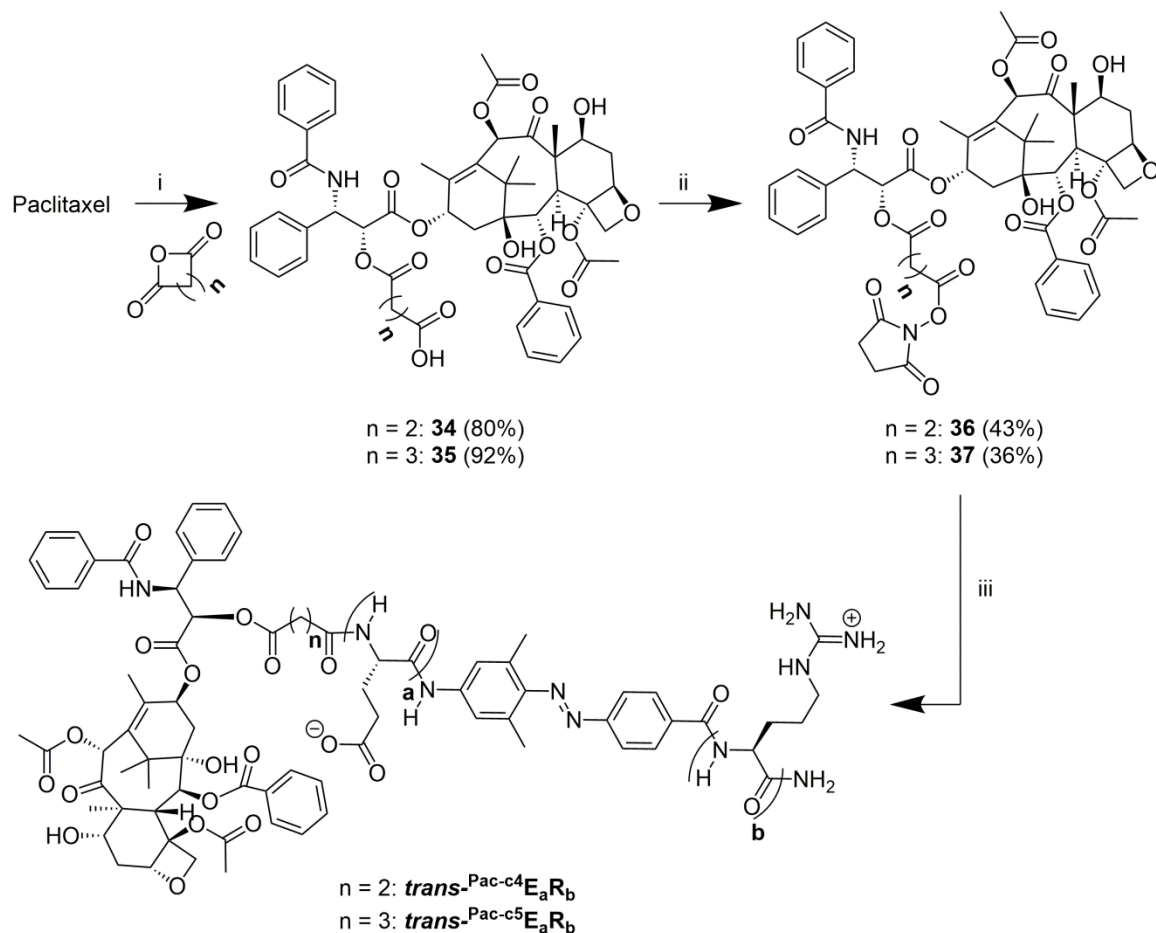


Abbildung 4.24: Schema der Synthese von Paclitaxel-Derivaten zur Konjugation an das N-terminale Amin der PCPPs. Reaktionsbedingungen: i) Pyridin, Bernsteinsäureanhydrid bzw. Glutarsäureanhydrid; ii) DCC, NHS, THF; iii) **E_aR_b**, DMF. Die erhaltenen Peptide werden durch ein hochgestelltes ‚Pac‘ und der verwendete Linker mit ‚c4‘ (Bernsteinsäure) bzw. ‚c5‘ (Glutarsäure) gekennzeichnet.

4.4.2 Reinigung und Charakterisierung der Peptide

Die erhaltenen Peptid-Wirkstoff-Konjugate wurden per RP-HPLC gereinigt und massenspektrometrisch charakterisiert (Tabelle 6.1, Seite 105). Die photochemische Charakterisierung und die Isolierung der *cis*-Form wurde analog zu den acetylierten und fluoreszenten Peptiden durchgeführt. In Abbildung 4.25 ist beispielhaft die Reinigung der Peptide ^{FU-c4}**E₉R₉** und ^{Pac-c4}**E₉R₉** nach 20-minütiger Bestrahlung bei 366 nm gezeigt. Man erkennt wiederum, dass sich die beiden Isomere in ihren Retentionszeiten unterscheiden und durch Anwendung eines flachen Gradienten quantitativ voneinander getrennt werden konnten.

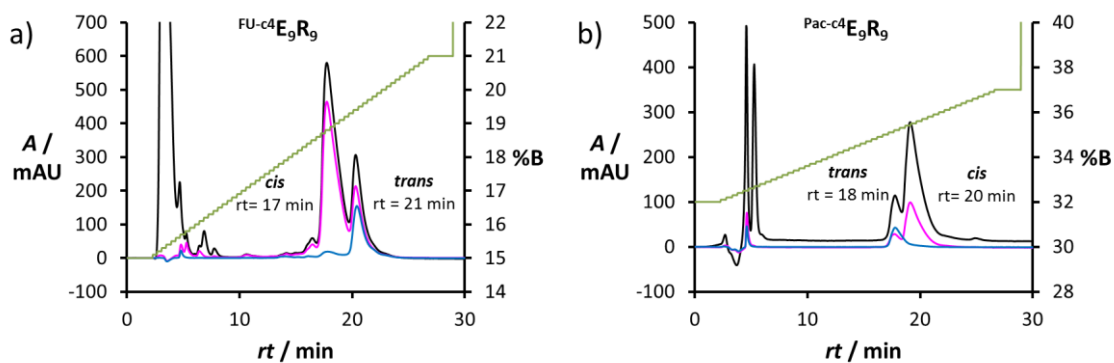


Abbildung 4.25: RP-HPLC-Chromatogramme der Reinigung der PCPP-Wirkstoffkonjugate nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 nm für 20 Minuten. In grün ist der verwendete Lösungsmittelgradient dargestellt (A: 5% Acetonitril, 0,1% TFA in Wasser; B: 5% Wasser, 0,1% TFA in Acetonitril). Detektiert wurde die Absorption bei 3 verschiedenen Wellenlängen A_{220} (schwarz), A_{280} (pink) und A_{355} (blau).

4.4.3 Kinetik der Esterhydrolyse

Die Freisetzung des Therapeutikums aus dem Peptidkonjugat beruht auf einer selektiven intrazellulären Spaltung der Esterbindung. Um die Kinetik der Esterhydrolyse unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren wurden drei Modellverbindungen (Abbildung 4.26) per SPPS synthetisiert. Zum einen sollte der Einfluss der letzten konjugierten Aminosäure untersucht werden, wobei Glutaminsäure (primäres Amin wie in den Zielpeptiden) und Prolin (sekundäres Amin) getestet wurden. Zum anderen sollte der Einfluss des verwendeten Linkers untersucht werden.

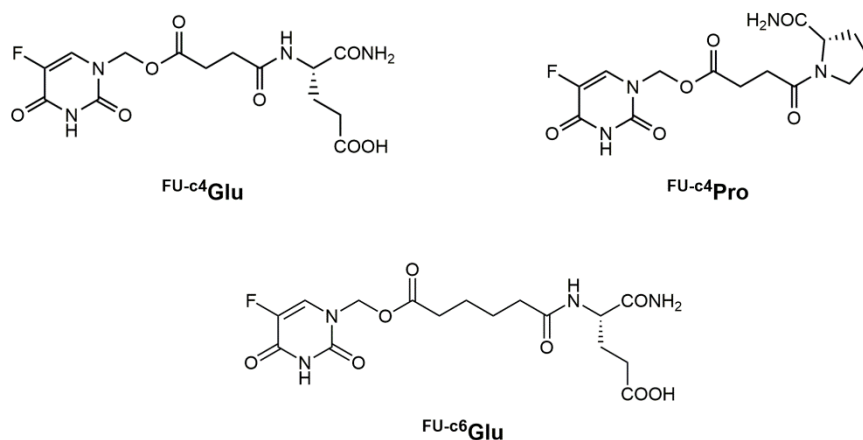


Abbildung 4.26: Modellverbindungen zur Untersuchung der Esterhydrolyse. Die Di-Peptide wurden per SPPS synthetisiert, über RP-HPLC gereinigt und massenspektrometrisch charakterisiert (Tabelle 6.1, Seite 105).

Die Esterhydrolyse wurde per NMR-Spektroskopie verfolgt, indem zeitabhängig Protonenspektren aufgenommen wurden. In Abbildung 4.27 sind Ausschnitte der überlagerten NMR-Spektren gezeigt, wobei der Zerfall der Ausgangsverbindungen durch Integration der abnehmenden Signale quantifiziert wurde. Zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde eine Reaktion erster Ordnung angenommen, und die Daten konnten durch Annäherung mit einer Exponentialfunktion ($y(t) = y_0 * e^{-k*t}$) beschrieben werden, aus deren Parametern wiederum die Halbwertszeit der Esterhydrolyse bei 37°C errechnet wurde. Während die Verbindungen ^{FU-c4}**Pro** und ^{FU-c6}**Glu** nur langsam mit Halbwertszeiten von 3-4 Tagen hydrolysieren, wird Fluorouracil aus der Verbindung ^{FU-c4}**Glu** deutlich schneller freigesetzt ($\tau_{1/2} = 2,9 \pm 0,1 h$). Der Grund hierfür ist eine zweistufige Reaktion, wobei zunächst eine schnelle intramolekulare Ringschluss-Reaktion zum Succinimid-Derivat stattfindet, welches dann in einer zweiten langsameren Reaktion ($\tau_{1/2} \approx 3 d$) mit Wasser zur freien Säure reagiert (Abbildung 4.27a). Die Bildung des zyklischen Intermediates konnte dabei sowohl NMR-spektroskopisch anhand des scharfen, symmetrischen Signals der Methylengruppen bei 2,87 ppm, als auch massenspektrometrisch als Natriumaddukt ($m/z_{calc.} = 251,06$; $m/z_{obs.} = 251,10$) nachgewiesen werden. Die Ringschlussreaktion wurde nur bei ^{FU-c4}**Glu** beobachtet, da die Bildung eines Fünfrings (Succinimid) kinetisch deutlich begünstigt ist, verglichen mit der Reaktion zum Adipinimid (Siebenring). Prolin bildet im Gegensatz zu den restlichen proteinogenen Aminosäuren tertiäre Amide und kann daher keine zusätzliche Ringschlussreaktion eingehen.

Im weiteren Verlauf sollte die enzymatische Freisetzung des Fluorouracils unter dem Einfluss von Esterasen untersucht werden. Zum einen wurde dabei Schweineleberesterase (*porcine liver esterase*, *PLE*) zugegeben, ein häufig verwendetes Enzym, das in mehreren Isoformen vorliegt, wodurch ein breites Substratspektrum abgedeckt wird. In unserem Fall wurde eine Einheit PLE pro mL Reaktionslösung zugesetzt. Die Kinetik der Reaktion wurde jedoch im Vergleich zu den obigen Fällen nicht verändert, was dafür spricht, dass die untersuchten Verbindungen kein Substrat der PLE darstellen. Die Aktivität des Enzyms wurde mit Essigsäureethylester getestet, welcher innerhalb weniger Stunden komplett hydrolysiert wurde.

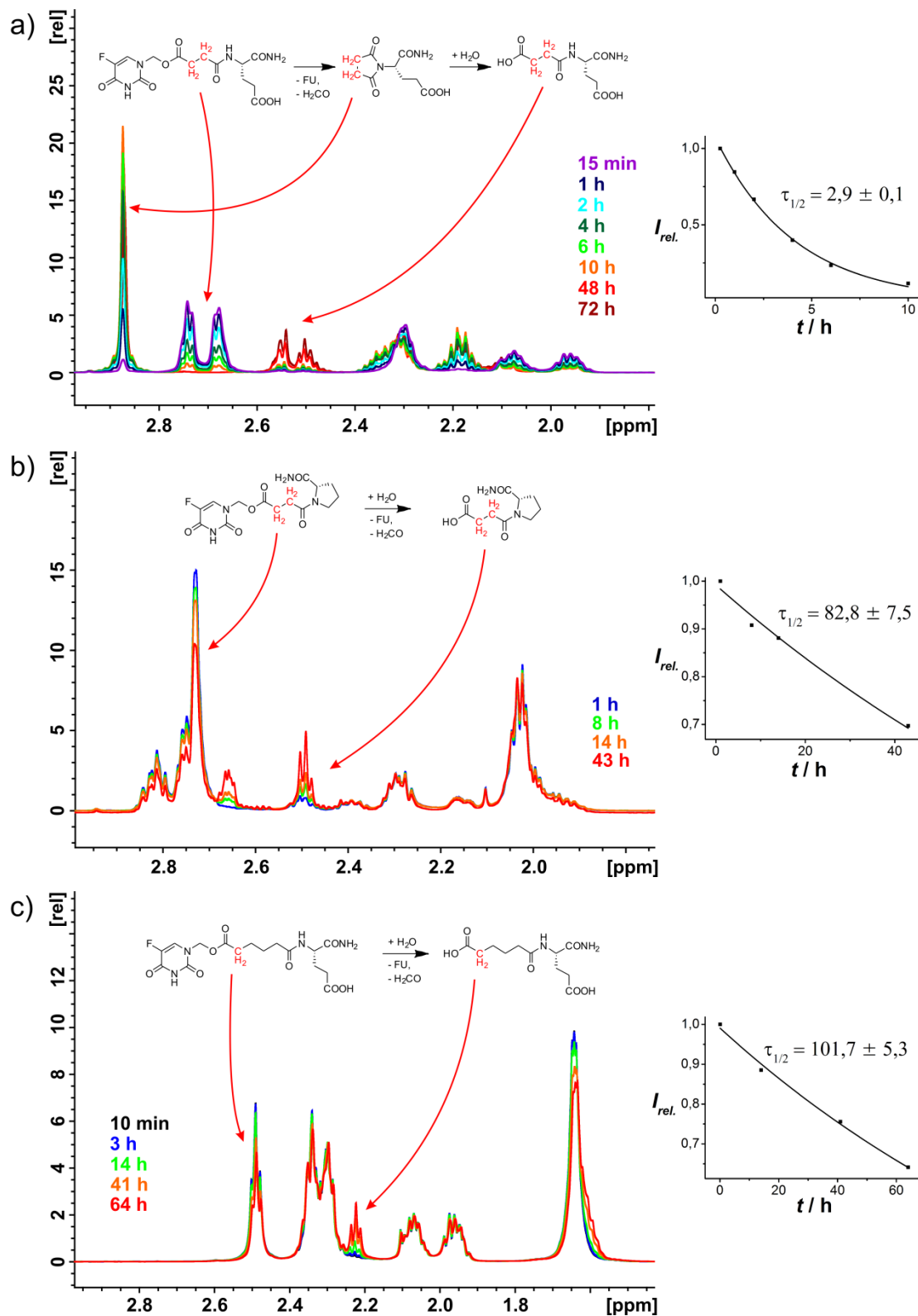


Abbildung 4.27: Zeitlicher Verlauf der Esterhydrolyse der drei Modellverbindungen ^{FU-c4}Glu (a), ^{FU-c4}Pro (b) und ^{FU-c6}Glu (c) beobachtet per ¹H-NMR-Spektroskopie. Bedingungen: ~3 mM der jeweiligen Verbindung; 50mM Na₂HPO₄ (pH = 7,4); 5% D₂O; 0,1 mM TSP; 37°C.

Außerdem wurde getestet ob im Lysat eukaryotischer Zellen eine Esterase vorkommt, welche die Modellverbindungen effektiv spalten kann. Dazu wurde zu zwei Teilen einer 3 mM Probe von ^{18}F -Glu, ein Teil eines Extraktes aus HeLa-Zellen (~2 mg Protein pro mL) gegeben. Die Esterhydrolyse war unter diesen Bedingungen zwar leicht beschleunigt ($\tau_{1/2} = 55,9 \pm 0,8 \text{ h}$), jedoch folgt die Reaktion immer noch einem exponentiellen Zerfall und damit einer Reaktion erster Ordnung.

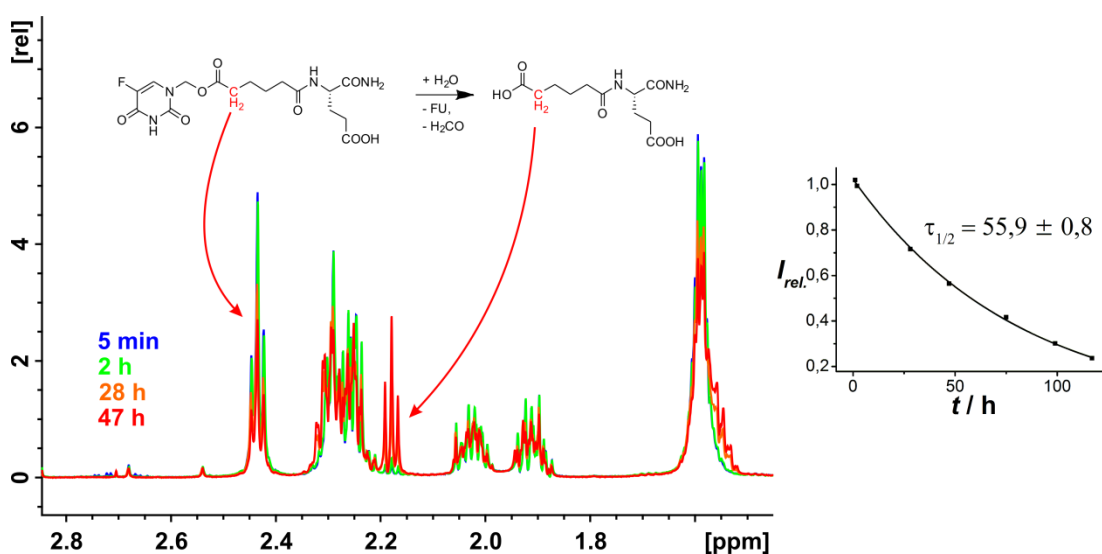


Abbildung 4.28: Zeitlicher Verlauf der Esterhydrolyse der Modellverbindung ^{18}F -Glu in Gegenwart eines Extraktes aus HeLa-Zellen, beobachtet per ^1H -NMR-Spektroskopie. Bedingungen: ~2 mM ^{18}F -Glu; 33,3 mM Na_2HPO_4 (pH = 7,4); 3,33% D_2O ; 66 μM TSP; 0,66 mg/mL HeLa-Extrakt; 37°C.

Im Falle einer enzymkatalysierten Hydrolyse mit einer Substratkonzentration, die deutlich über der Enzymkonzentration liegt, würde man jedoch eine Reaktion pseudo nullter Ordnung, mit einem annähernd linearen Abfall der Substratkonzentration erwarten. Möglicherweise wird die Reaktion durch die leicht veränderten Pufferbedingungen geringfügig beschleunigt.

Zusammengefasst lässt sich konstatieren, dass die hergestellten Fluorouracilkonjugate vermutlich keine Substrate für gängige Esterasen darstellen. Der Wirkstoff wird jedoch trotzdem auf nicht enzymkatalysierten Wege freigesetzt, wobei die Halbwertszeit der Esterhydrolyse je nach verwendetem Linker wenige Stunden oder mehrere Tage beträgt. Im weiteren Verlauf sollten die verschiedenen Peptid-Wirkstoff-Konjugate auf ihre Zytotoxizität getestet werden.

4.4.4 Zellkulturbasierte Zytotoxizitätstests

Um die Toxizität der Peptide zu untersuchen wurden AlamarBlue[®]-Assays unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Zunächst sollten die Fluorouracil-Peptid-Konjugate untersucht werden, wobei nur bei hohen Konzentrationen (>10 μM) und langen Inkubationszeiten eine signifikante Inhibition der Zellproliferation festgestellt werden konnte. Die symmetrischen Peptide (E_9R_9 und E_8R_8) zeigten in den fluoreszenzbasierten Studien zwar die größten Unterschiede bei der Zellaufnahme der beiden Isomere, jedoch war die Anwendbarkeit in diesem Fall auf Grund ihrer geringeren Löslichkeit eingeschränkt. Deshalb wurde auf die weniger effektiven aber besser löslichen E_6R_9 -Peptide zurückgegriffen. Um eine extrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffs sowie eine thermische *cis*→*trans*-Isomerisierung während der langen Inkubationszeit zu vermeiden wurde das Inkubationsmedium mehrmals ausgetauscht. Außerdem wurde das Derivat mit dem stabileren Adipinsäure-Linker verwendet.

In Abbildung 4.29 ist das Ergebnis eines AlamarBlue[®]-Assays unter optimierten Inkubationsbedingungen dargestellt. Man erkennt, dass bei hohen Peptidkonzentrationen ein Unterschied zwischen der Toxizität von *cis*- und *trans*- $\text{FU-c}_6\text{E}_6\text{R}_9$ besteht. Im Fall des *trans*-Peptides konnte eine Abnahme der Proliferation auf etwa 20% beobachtet werden, vergleichbar mit der Behandlung mit 5-Fluorouracil oder Verbindung **33** (Fluorouracil konjugiert an Adipinsäure). Die Überlebensrate der Zellen bei der Inkubation mit *cis*- $\text{FU-c}_6\text{E}_6\text{R}_9$ liegt etwas höher bei 50%, was mit einer verringerten Aufnahme dieses Peptides erklärt werden kann. Das acetylierte Peptid zeigt auch bei der höchsten untersuchten Konzentration von 50 μM keinen zytotoxischen Effekt.

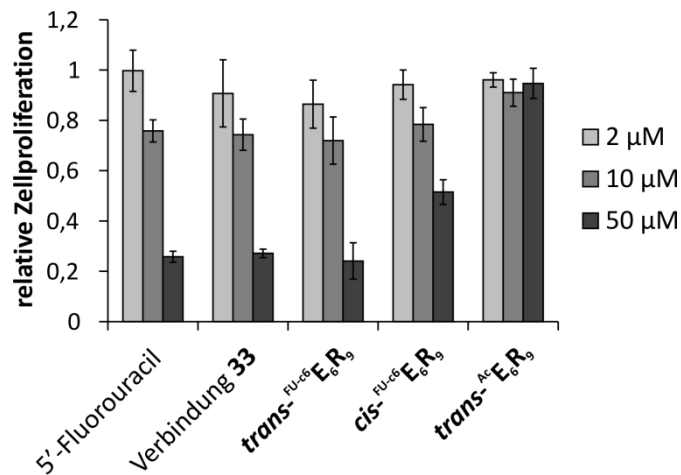


Abbildung 4.29: AlamarBlue®-Assay zur Quantifizierung der Zytotoxizität. Die Zellproliferation wurde photometrisch anhand der Fluoreszenz des von gesunden Zellen gebildeten Resorfurins bestimmt und auf unbehandelte Zellen normiert. HeLa-Zellen wurden 48 h mit der jeweiligen Verbindung inkubiert, wobei das Medium nach 10 h, 24 h und 34 h gewechselt wurde. Verbindung **33** ist Fluorouracil konjugiert an Adipinsäure. Der AlamarBlue®-Assay wurde vier Tage nach Inkubationsende durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier unabhängiger Messungen an.

Die Paclitaxel-Konjugate zeigten sich schon in geringeren Dosen wirksam, weshalb in diesem Fall schon bei kürzeren Inkubationszeiten und geringeren Konzentrationen Effekte beobachtet und die effektiveren E_9R_9 -Peptide eingesetzt werden konnten. In Abbildung 4.30 ist das Ergebnis eines optimierten AlamarBlue®-Assays gezeigt. Die Toxizität des Peptids $^{Pac-c4}E_9R_9$ ist vergleichbar mit der von freiem Paclitaxel. Vermutlich findet auch hier eine schnelle extrazelluläre Hydrolyse des Succinyl-Linkers statt, wie sie bereits beim Fluorouracil-Derivat beobachtet wurde (Abbildung 4.27, Seite 62). Der Glutaryl-Linker sollte stabiler sein und es ist ersichtlich, dass die Toxizität des Peptids $^{Pac-c5}E_9R_9$ dementsprechend geringer ist, da der aktive Wirkstoff vermutlich langsamer aus dem Peptid freigesetzt wird.

Vergleicht man die beiden Peptid-Isomere kann festgestellt werden, dass sowohl bei $^{Pac-c4}E_9R_9$ als auch bei $^{Pac-c5}E_9R_9$ die *cis*-Form toxischer ist. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen, nämlich einer schlechteren Zellaufnahme der *cis*-Peptide. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte ein veränderter Aufnahmemechanismus sein, wenn das sehr große und hydrophobe Paclitaxel ans Peptid konjugiert ist. Ein weiteres Problem könnte die vesikuläre Aufnahme der Peptide darstellen, wie sie für die

fluoreszenzmarkierten Peptide beobachtet wurde. Da Paclitaxel seine Toxizität nur im Zytosol der Zelle entfaltet, muss es erst aus den Vesikeln austreten, was im peptidgebundenen Zustand aufgrund des polyionischen Charakters wahrscheinlich nicht möglich ist. Zusätzlich sollte bedacht werden, dass der pH in endosomalen Vesikeln erniedrigt ist (pH 5,5 – 6,5^[127]), was eine verlangsamte Esterhydrolyse unter diesen Bedingungen zur Folge haben könnte. Somit könnte auch die höhere Toxizität der *cis*-Peptide erklärt werden, wenn diese schneller extrazellulär hydrolysiert werden, als die in Endosomen aufgenommenen *trans*-Peptide. Außerdem könnte auch eine endosomale Degradation des Paclitaxels, dessen Wirksamkeit verringern. Das acetylierte Peptid zeigt wiederum keine signifikante Zytotoxizität bei einer Konzentration von 5 μ M und einer Inkubationszeit von 2 Tagen (Abbildung 4.30b).

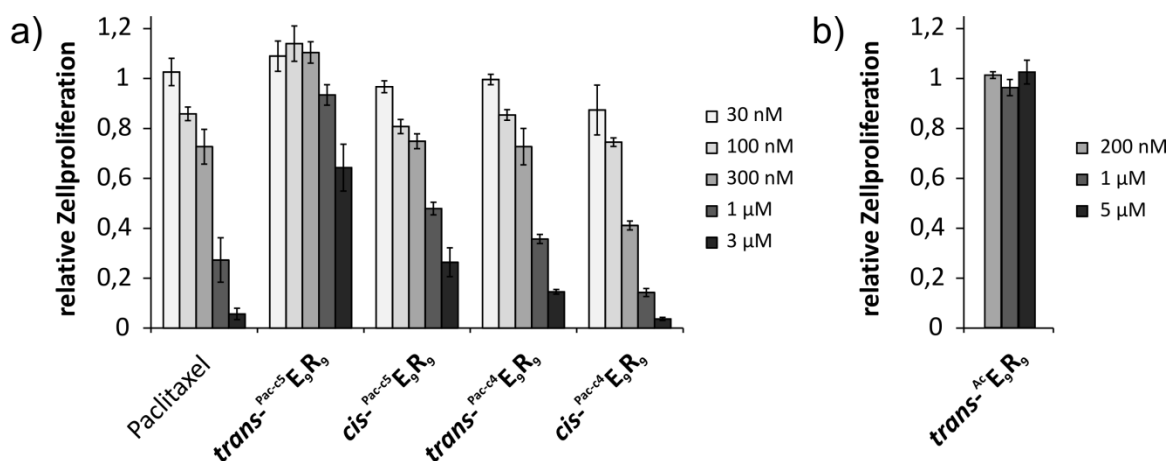


Abbildung 4.30: AlamarBlue[®]-Assay zur Quantifizierung der Zytotoxizität der Paclitaxel-Peptid-Konjugate. Die Zellproliferation wurde photometrisch anhand der Fluoreszenz des von gesunden Zellen gebildeten Resorfurins bestimmt und auf unbehandelte Zellen normiert. a) HeLa-Zellen wurden 2 h mit der jeweiligen Verbindung inkubiert und der AlamarBlue[®]-Assay wurde einen Tag nach Inkubationsende durchgeführt. b) HeLa-Zellen wurden 48 h mit der jeweiligen Verbindung inkubiert, wobei das Medium nach 10 h, 24 h und 34 h gewechselt wurde. Der AlamarBlue[®]-Assay wurde vier Tage nach Inkubationsende durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier unabhängiger Messungen an.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vielfältigen Abläufe in Zellen und Organismen unterliegen einer hochkomplexen räumlichen und zeitlichen Regulation, und es ist seit jeher Teil der Forschung, diese Vorgänge zu verstehen und gezielt in diese einzugreifen. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren viele artifizielle Konstrukte entwickelt, die eine Kontrolle biologischer Systeme durch externe Einflüsse zulassen. Dabei sind lichtgesteuerte Prozesse von besonderem Interesse, da Licht mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Präzision angewandt und dosiert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war die Synthese eines photoschaltbaren zellpenetrierenden Peptids (PCPP), mit dessen Hilfe verschiedene Frachten gezielt in ausgewählte Zellen oder Gewebe geschleust werden können. Die Peptide zeichnen sich dabei durch eine zellgängige polykationische Sequenz (Oligoarginin; R_8 oder R_9) aus, die mit einer inhibitorischen, polyanionischen Sequenz (Oligoglutamat; E_6 , E_8 oder E_9) über einen im Peptidrückgrat eingebrachten Photoschalter verknüpft ist.

Dazu wurden zunächst verschiedene, neuartige Azobenzolderivate synthetisiert und ihre photochemischen Eigenschaften sowie ihre Thermostabilität analysiert. Ein Azobenzol mit zwei Methylgruppen in ortho-Position stellte sich dabei als am besten geeignet dar, da es zum einen in guten Ausbeuten synthetisiert (70%) und photoisomerisiert (~80% *cis*-Form nach Bestrahlung bei 366 nm, >95% *trans*-Form nach Bestrahlung bei 438 nm) werden konnte, und zum anderen eine langsame Kinetik der thermischen *cis*→*trans*-Isomerisierung ($\tau_{1/2} = 330 \pm 95$ h, N-terminal acetylierte Form) zeigte.

Dieses Derivat wurde anschließend per Festphasenpeptidsynthese in die PCPPs eingebaut und die erhaltenen Peptide wurden per NMR-Spektroskopie analysiert. Dabei konnte eine effiziente Paarung der beiden gegensätzlich geladenen Peptidsequenzen beobachtet werden, wenn das Azobenzol in der *cis*-Form vorliegt, was die Grundlage für eine inhibierte Zellaufnahme darstellt.

Zur Quantifizierung und Visualisierung wurden die Peptide mit einem fluoreszenten Rhodamin-Farbstoff markiert. Bei der Analyse der Zellaufnahme mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie konnte in allen Fällen

festgestellt werden, dass die *cis*-Peptide kaum von Zellen aufgenommen werden, während sich die *trans*-Formen innerhalb weniger Minuten im Cytoplasma der Zellen anreichern (12-mal effizientere Aufnahme). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die inaktiven *cis*-Peptide durch Bestrahlung mit blauem Licht quantitativ aktivieren lassen. Eine Optimierung der Bestrahlungsintensität erlaubte sogar eine selektive Aufnahme der PCPPs in einzelne Zellen, während benachbarte Zellen (~50 µm entfernt) nicht betroffen waren.

Im weiteren Verlauf wurden die Zytostatika 5-Fluorouracil und Paclitaxel mit verschiedenen bifunktionellen Carbonsäuren an die PCPPs konjugiert, um diese durch Bestrahlung in ausgewählte Zellen einzuschleusen und dort einen gezielten Zelltod herbeizuführen. Auf diese Weise sollte die Anwendbarkeit des Systems bei der gezielten Wirkstoffzufuhr nachgewiesen werden, jedoch stellten sich die verwendeten Ester-basierten Konjugate nur bedingt als geeignet dar. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass die Wirkstoffs-Abspaltung nicht durch Esterasen katalysiert wird, wodurch eine selektive intrazelluläre Freisetzung nicht gegeben ist. Zum anderen legen die Mikroskopiestudien eine vesikuläre Aufnahme der Peptide in Endosomen nahe, aus denen der Wirkstoff seinerseits erst freigesetzt werden muss, um seine Wirksamkeit zu entfalten.

Zusammengefasst lässt sich konstatieren, dass im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal ein photoschaltbares zellgängiges Peptid synthetisiert werden konnte, welches durch selektive Bestrahlung mit einer exzellenten raum-zeitlichen Auflösung in Zellen eingeschleust werden kann. Prinzipiell sollten sich mit diesem Vektor verschiedenste Frachtmoleküle in Zellen einschleusen lassen, jedoch sollte die Konjugation der Wirkstoffe modifiziert werden, da eine Freisetzung aus den Ester-basierten Systemen nicht selektiv intrazellulär möglich ist. Bedenkt man die vesikuläre Aufnahme der Peptide, könnte die Verwendung von säurelabilen Linkersystemen^[128-129] eine deutliche Verbesserung bewirken, wobei das Therapeutikum unter den sauren endosomalen Bedingungen freigesetzt werden würde.

Die begrenzte Löslichkeit der verwendeten Peptide bei physiologischen pH-Werten (maximale Löslichkeit ≈ 5-50 µM) stellt eine weitere Limitation dar, jedoch könnte die Einbringung einer Oligoethylenglycol-Kette Abhilfe schaffen, wie es bereits für die aktivierbaren zellpenetrierenden Peptide gezeigt werden konnte.^[32] Außerdem könnte das verwendete Azobenzol weiter optimiert werden. Es zeigt

zwar eine hervorragende Thermostabilität der *cis*-Form, weshalb die ungewollte thermische Aktivierung größtenteils unterdrückt werden kann, jedoch könnte die Verwendung von ethylen-überbrückten Azobenzolen^[62, 130] weitere Vorteile bieten: Bei diesen ist die *cis*-Form die thermodynamisch stabile Konfiguration, wodurch die Peptide in ihrem Grundzustand inaktiv wären und exklusiv nach Bestrahlung aktiviert werden können. Außerdem zeigen diese Derivate hervorragende photochemische Eigenschaften und sind in hohen Ausbeuten durch Bestrahlung im längerwelligen Spektralbereich isomerisierbar^[131].

6. Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Angaben

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden von kommerziellen Quellen bezogen und, wenn nicht explizit angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet.

Die **RP-HPLC** wurde an einem ÄKTApurifier[®] (GE Healthcare) durchgeführt unter Verwendung von 250/4 oder 250/10 Nucleosil[®] 100-5 C18-Säulen (Macherey-Nagel) und einer Flussrate von 1 mL/min bzw. 4 mL/min. Als Laufmittel wurden 5% Acetonitril (MeCN) und 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser (Eluent A) sowie 5% Wasser und 0,1% TFA in MeCN (Eluent B) verwendet, wobei der verwendete Gradient an das jeweilige Trennproblem angepasst wurde.

UV/Vis-Spektren wurden an einem Cary 50 Einstrahl-Spektrophotometer (Varian) aufgenommen. Die Azobenzolisomerisierung wurde durch Bestrahlung mit einer Quecksilberdampfampe (Oriol) bewirkt, wobei durch den Einsatz von Interferenzfiltern die Wellenlängen 366 nm (*trans*→*cis*) oder 438 nm bzw. 495 nm (*cis*→*trans*) ausgewählt wurden.

Die **NMR-Spektren** zur Charakterisierung der Syntheseprodukte (Abschnitt 736.2) wurden an Bruker Avance III 400 MHz Spektrometern mit BBFO-plus Probenkopf aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind relativ zu den jeweiligen Lösungsmittelsignalen angegeben (DMSO: $\delta^1\text{H} = 2,50$ ppm; $\delta^{13}\text{C} = 39,5$ ppm; Chloroform: $\delta^1\text{H} = 7,21$ ppm; $\delta^{13}\text{C} = 77,2$ ppm; Methanol: $\delta^1\text{H} = 3,31$ ppm; $\delta^{13}\text{C} = 49,1$ ppm). Die NMR-Spektren der Peptide wurden an einem Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer mit H/C/N-TCI-*cryo*-Probenkopf aufgenommen. Prozessiert und analysiert wurden die Spektren mit dem Programm Topspin[®] v2.1-3.2 (Bruker).

Die **konfokale Mikroskopie** wurde an einem Zeiss LSM 780 oder einem Zeiss LSM 510 Meta am Bioimaging Center (BIC) der Universität Konstanz durchgeführt. Die Photoaktivierung wurde mit der 458 nm oder 488 nm Linie des Argon⁺-Lasers bewirkt und die Leistung wurde mithilfe einer Punkt-Messung durch die Mitarbeiter des BIC bestimmt. Der Fluorophor wurde bei 543 nm (HeNe1-Laser; Zeiss LSM 510 Meta) oder 561 nm (Dioden gepumpter Festkörperlaser; Zeiss LSM 780) angeregt, und die Fluoreszenz wurde von 580 bis 660 nm detektiert. Bei der Anregung des Fluorophors mit Licht der oben genannten Wellenlängen wurde immer auch eine Aktivierung des Azobenzols beobachtet, weshalb die Zellen bei den Experimenten mit Photoaktivierung zunächst mithilfe des HeNe2-Lasers bei 633 nm ausgewählt und fokussiert wurden. Die erhaltenen Bilder wurden mit der Software ImageJ^[132] prozessiert und auf Helligkeit und Kontrast optimiert.

Die **Durchflusszytometrie** wurde an einem BD FACSAria™ III cell sorter (BD Biosciences), der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Groettrup an der Universität Konstanz realisiert. Pro Messung wurden 10.000 Zellen untersucht, von denen 4.000 bis 6.000 Zellen anhand ihrer vorwärtsgerichteten Streuung und ihrer Seitwärtsstreuung ausgewählt und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht wurden. Dafür wurde der Fluorophor bei 561 nm angeregt und die Fluoreszenz in einem Bereich von 580 - 600 nm detektiert

ESI Massenspektren wurden an einem Esquire 3000 plus (Bruker), der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Marx an der Universität Konstanz aufgenommen.

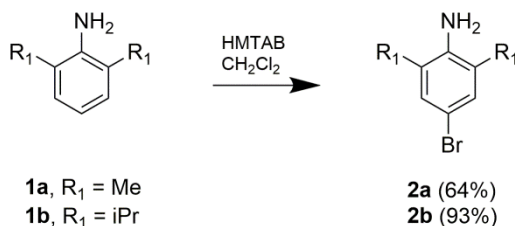
MALDI-TOF Massenspektren wurden an einem Microflex MALDI-TOF (Bruker) der Proteomics Facility an der Universität Konstanz gemessen.

Die **Kurvenanalysen** der beobachteten exponentiellen Zerfallsreaktionen, wurden mit dem Programm Origin v6.8.0G durchgeführt.

6.2 Synthesevorschriften

6.2.1 Anilin-Derivate

I Bromierung von 2,6-Dialkylanilinen^[113]



Der Hexamethylentetraamin-Brom Komplex (HMTAB) wurde nach Heravi et al. aus Urotropin und elementarem Brom hergestellt.^[113] Dazu wurde 60 mmol (8,4 g) Urotropin in 100 mL Chloroform gelöst und bei Raumtemperatur tropfenweise mit 125 mmol (20 g) Br₂ in 100 mL Chloroform versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, wobei HMTAB als gelber Feststoff ausfiel. Das Chloroform wurde am Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff (2,6 g; 57 mmol; 94%) ohne weitere Reinigung zur Bromierung eingesetzt.

Dazu wurden 10 mmol des 2,6-Dialkylanilins (1,21 g **1a** oder 1,77 g **1b**) in je 50 mL Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur schrittweise unter Rühren mit HMTAB (5 mmol; 2,3 g) versetzt. Nach 10 Minuten wurde der Feststoff abfiltriert und mit wenig Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde sukzessive mit 3% Na₂CO₃ und Wasser gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

2a; 4-Bromo-2,6-Dimethyl-Anilin: 1,3 g (6,4 mmol; 64%) braunes Öl.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl₃): 2,17 (s; 6H); 3,58 (s; breit; 2H); 7,09 (s; 2H).

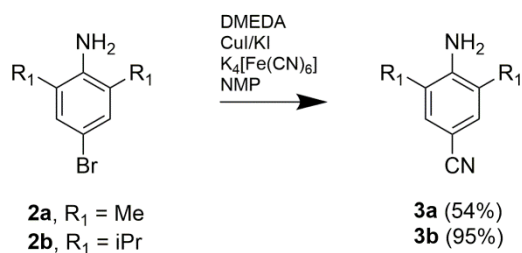
$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CDCl₃): 17,4; 109,5; 123,7; 130,6; 141,8.

2b; 4-Bromo-2,6-Diisopropyl-Anilin: 2,4 g (9,3 mmol; 63%) orangenes Öl.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl_3): 1,29 (d; 6,8Hz; 12H); 2,91 (sept.; 6,8Hz; 2H); 3,74 (s; breit; 2H); 7,15 (s; 2H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CDCl_3): 22,3; 28,5; 111,2; 125,8; 134,6; 139,4.

II Rosenmund-von-Braun-Reaktion zu den Arylcyaniden **3a**, **3b**^[114]



5 mmol des Arylbromids **2a** (1,00 g) oder **2b** (1,28 g) wurden mit KI (2,5 mmol; 0,42 g), CuI (0,5 mmol; 95 mg), Na_2CO_3 (1 mmol; 106 mg) und frisch destilliertem N-N'-Dimethylethylendiamin (DMEDA; 7,5 mmol; 633 μL) in 10 mL N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) gelöst/suspendiert und im Ölbad auf 130°C erhitzt. Zu dieser Mischung wurde 1 mmol $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (422 mg) gegeben und 14 h bei 140°C unter Rückflusskühlung gerührt. Nach Abkühlung wurden 40 mL DCM zugegeben und der schwarze Feststoff wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde 4-mal mit je 30 mL Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene dunkle Öl wurde über Kieselgel chromatographiert mit Petrolether (PE)/Essigsäureethylester (EE) im Verhältnis 3:1 ($R_f = 0,3$).

3a; 4-Amino-3,5-Dimethyl-Benzonitril: 0,40 g (2,7 mmol; 54%) grauer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl_3): 2,09 (s; 6H); 3,98 (s; breit; 2H); 7,14 (s; 2H).

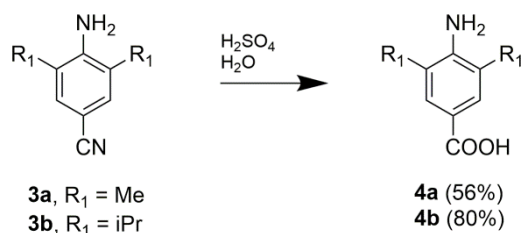
$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CDCl_3): 17,3; 99,6; 120,5; 131,4; 132,2; 147,1.

3b; 4-Amino-3,5-Diisopropyl-Benzonitril: 0,98 g (4,8 mmol; 95%) gelber Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl_3): 1,29 (d; 6,8Hz; 12H); 2,87 (sept.; 6,8Hz; 2H); 4,24 (s; breit; 2H); 7,31 (s; 2H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CDCl_3): 22,0; 27,8; 100,3; 121,0; 127,3; 132,2; 144,7.

III Saure Nitril-Hydrolyse zu den Benzoesäurederivaten 4a, 4b



2,7 mmol des Arylcyanids **3a** (0,40 g) oder **3b** (0,55 g) wurden in 10 mL 30%iger Schwefelsäure suspendiert und 20 h bei 120°C unter Rückfluß gekocht. Die Reaktion wurde durch schrittweise Zugabe von 5% Na₂CO_{3, aq.} neutralisiert. Der ausgefallene Feststoff wurde anschließend abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und über P₂O₅ getrocknet.

4a; 4-Amino-3,5-Dimethyl-Benzoesäure:

0,25 g (1,5 mmol; 56%) beiger Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 2,16 (s; 6H); 5,34 (s; 2H); 7,49 (s; 2H); 11,93 (s, breit, 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 17,8; 116,8; 119,5; 129,6; 148,9; 167,7.

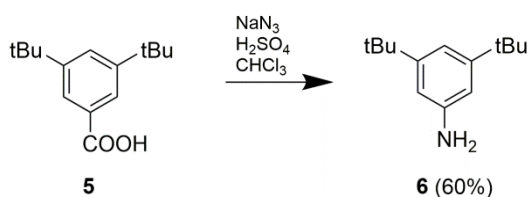
4b; 4-Amino-3,5-Diisopropyl-Benzoesäure:

0,43 g (2,2 mmol; 80%) beiger Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 1,17 (d; 6,8Hz; 12H); 3,06 (sept.; 6,8Hz; 2H); 6,65 (s; breit; 3H); 7,55 (s; 2H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 22,9; 26,8; 119,0; 124,7; 131,7; 145,1; 168,2.

IV Schmidt-Umlageung zu 3,5-Di-tert-Butyl-Anilin^[115]



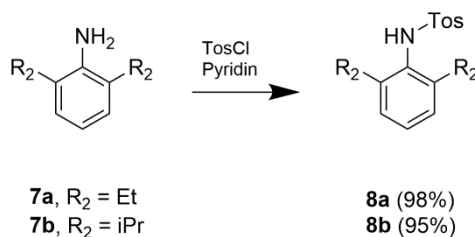
7,1 mmol 3,5-Di-tert-Butyl-Benzoessäure (**5**; 1,66 g) wurde in 5 mL $\text{H}_2\text{SO}_{4,\text{konz.}}$ und 10 mL CHCl_3 suspendiert und auf 45°C erwärmt. Dazu wurde über einen Zeitraum von einer Stunde 7,7 mmol NaN_3 (0,5 g) in kleinen Portionen zugegeben und weitere 3 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 5% $\text{Na}_2\text{CO}_{3,\text{aq.}}$ neutralisiert und 3-mal mit 50 mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeeengt und der erhaltene Feststoff über Kieselgel chromatographiert, mit PE/EE im Verhältnis 4:1 ($R_f = 0,35$).

6; 3,5-Di-tertButyl-Anilin: 0,84 g (4,1 mmol; 60%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl_3): 1,16 (s; 18H); 6,67 (s; breit; 2H); 6,74 (s; 2H); 6,92 (s; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CDCl_3): 31,3; 34,8; 112,7; 116,5; 140,1; 152,2.

V Tosylierung von 2,6-Dialkyl-Anilinen^[116]



100 mmol 2,6-Dialkyl-Anilin (14,9 g **7a** oder 17,7 g **7b**) wurden in 35 mL Pyridin gelöst und bei 0°C schrittweise mit Tosylchlorid (130 mmol; 24,8 g) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 10 Minuten auf 80°C erhitzt (**7a**) bzw. 4 h bei 150°C unter Rückfluss gekocht (**7b**). Nach Abkühlung wurde die Lösung auf 125 mL 2N $\text{HCl}_{\text{aq.}}$ gegeben, wobei ein Feststoff ausfiel, welcher nachfolgend durch Umkristallisation aus 200 mL Ethanol isoliert werden konnte.

8a; N-(2,6-Diethylphenyl)-4-Methylbenzolsulfonamid:

32 g (98 mmol; 98%) weiße Kristalle.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d_6): 0,95 (t; 7,7 Hz; 6H); 2,38 (m; 3H + 4H); 7,05 (d; 7,5 Hz; 2H); 7,17 (t; 7,5 Hz; 1H); 7,37 (d; 8,3 Hz; 2H); 7,58 (d; 8,3 Hz; 2H); 9,29 (s; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d6): 15,1; 21,4; 24,4; 126,7; 126,8; 128,2; 129,9; 132,4; 139,7; 143,0; 144,1.

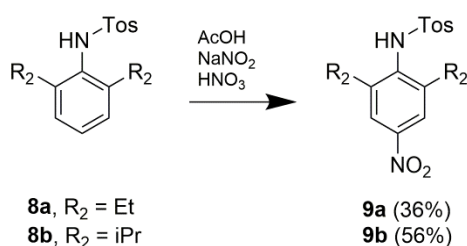
8b; N-(2,6-Diisopropylphenyl)-4-Methylbenzolsulfonamid:

29,5 g (95 mmol; 95%) beige Plättchen.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d6): 0,93 (d; 6,7 Hz; 12H); 2,38 (s; 3H); 3,12 (sept.; 6,7 Hz, 2H); 7,01 (d; 7,5 Hz; 2H); 7,22 (t; 7,5 Hz; 1H); 7,38 (d; 8,3 Hz; 2H); 7,60 (d; 8,3 Hz; 2H); 9,37 (s; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d6): 21,4; 24,4 (breit); 28,5; 124,0; 126,9; 128,5; 129,9; 130,4; 139,6; 143,0; 148,9.

VI *Para*-Nitrierung zu den Nitroaromaten **9a**, **9b**^[116]



21 mmol **8a** (7 g) oder **8b** (6,41 g) wurden gemörsert und in einer Mischung aus 30 mL $\text{HNO}_{3,\text{konz.}}$, 140 mL Wasser und 140 mL Essigsäure suspendiert und bei 40°C mit NaNO_2 (32 mmol; 2,23 g) versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionsmischung anschließend für 5 h unter intensivem Rühren bei 135°C unter Rückfluss gekocht. Bei der Abkühlung auf 4°C fiel innerhalb einer Stunde ein weißer Feststoff aus, der abfiltriert, mit reichlich Wasser gewaschen und über P_2O_5 getrocknet wurde.

9a; N-(2,6-Diethyl-4-Nitrophenyl)-4-Methylbenzolsulfonamid:

2,67 g (7,7 mmol; 36%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d6): 1,01 (t; 7,5 Hz; 6H); 2,45 (s; 3H); 2,49 (q; 7,5 Hz; 4H); 7,40 (d; 8,1 Hz; 2H); 7,58 (d; 8,1 Hz; 2H); 7,93 (s; 2H); 9,79 (s; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d6): 14,6; 21,5; 24,6; 121,5; 126,8; 130,2; 139,1; 142,8; 143,7; 146,2; 146,9.

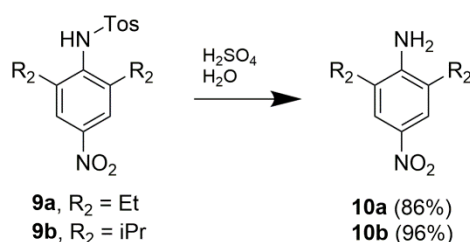
9b; N-(2,6-diisopropyl-4-Nitrophenyl)-4-Methylbenzolsulfonamid:

4,43 g (11,8 mmol; 56%) beiger Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d6): 0,99 (d; 6,7 Hz; 12H); 2,40 (s; 3H); 3,19 (sept.; 6,7 Hz, 2H); 7,41 (d; 8,2 Hz; 2H); 7,62 (d; 8,2 Hz; 2H); 7,91 (s; 2H); 9,93 (s; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d6): 21,6; 23,5 (breit); 29,2; 119,0; 127,0; 130,2; 136,8; 139,0; 143,6; 147,7; 151,3.

VII Detosylierung zu den Nitroanilinen **10a**, **10b**^[116]



7,7 mmol **9a** (2,67 g) oder **9b** (2,90 g) wurden in einer Mischung aus 15 mL $\text{H}_2\text{SO}_{4,\text{konz.}}$ und 0,75 mL Wasser 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 30 mg Eis gekippt, mit NaOH-Plätzchen neutralisiert und mit Dichlormethan (DCM; 3 x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

10a; 2,6-Diethyl-4-Nitroaniline: 1,29 g (6,6 mmol; 86%) gelbe Nadeln.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d6): 1,17 (t; 7,5 Hz; 6H); 2,54 (q; 7,5 Hz; 4H); 6,22 (s; 2H); 7,77 (s; 2H).

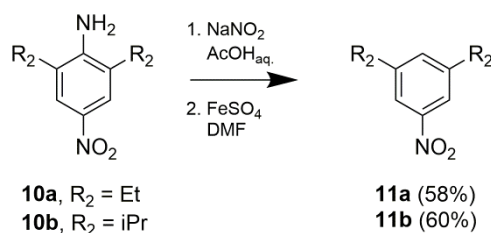
$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d6): 13,1; 23,8; 122,5; 126,3; 136,1; 151,3.

10b; 2,6-Diisopropyl-4-Nitroaniline: 1,64 g (7,4 mmol; 96%) gelbe Nadeln.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d6): 1,18 (d; 6,7 Hz; 12H); 3,09 (sept.; 6,7 Hz, 2H); 6,29 (s; 2H); 7,80 (s; 2H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d6): 22,5; 26,9; 119,7; 131,0; 136,5; 150,0.

VIII Hydro-Dediazonierung zu den Nitrobenzolen **11a**, **11b**^[117]



6 mmol **10a** (1,16 g) oder **10b** (1,33 g) wurden in einer Mischung aus 28 mL Essigsäure und 12 g Eis suspendiert und tropfenweise mit 6,6 mmol NaNO₂ (456 mg) in 1 mL Wasser versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 30 Minuten bei 0°C gerührt, wobei die vorher trübe Suspension unter Bildung des Diazonium-Salzes aufklarte.

Diese Mischung wurde anschließend zu einer eisgekühlten Lösung von FeSO₄·7H₂O (6 mmol; 1,67 g) in 20 mL Dimethylformamid (DMF) getropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 30 min gerührt und daraufhin mit 200 mL Wasser verdünnt. Das Produkt wurde mit DCM (3 x 75 mL) extrahiert, mit 10%iger NaOH_{aq.} (2 x 50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde über eine kurze Kieselgelsäule (~2 cm) mit Petrolether eluiert und das Lösungsmittel wiederum evaporiert.

11a; 3,5-Diethyl-Nitrobenzol: 0,63 g (3,5 mmol; 58%) gelbliches Öl.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl₃): 1,29 (t; 7,6 Hz; 6H); 2,74 (q; 7,6 Hz; 4H); 7,37 (s; 1H); 7,89 (s; 2H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CDCl₃): 15,3; 28,6; 120,1; 134,0; 145,9; 148,5.

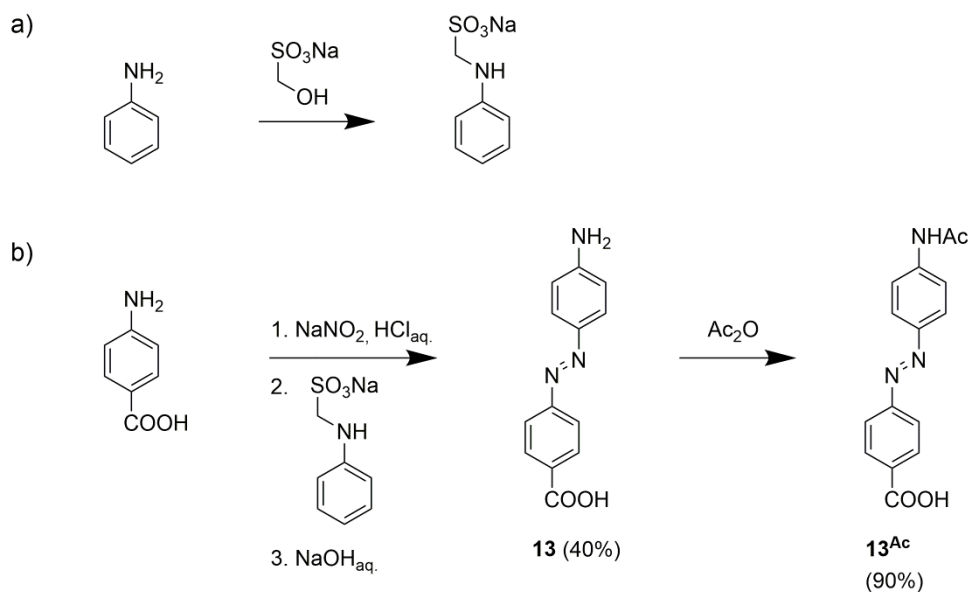
11b; 3,5-Diisopropyl-Nitrobenzol: 0,75 g (3,6 mmol; 60%) gelbliches Öl.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl₃): 1,31 (d; 7,0 Hz; 12H); 3,02 (sept.; 7,0 Hz, 2H); 7,42 (t; 1,5Hz; 1H); 7,93 (d; 1,5 Hz; 2H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CDCl₃): 15,2; 28,6; 120,1; 134,0; 145,9; 148,5.

6.2.2 Azobenzolsynthese

I Nicht alkyliertes Azobenzolderivat **13**^[133]



Das Azobenzolderivat **13**, ohne Alkylgruppen in *ortho*-Position, wurde nach Morishima et al. aus Anilin und 4-Amino-Benzoessäure synthetisiert.^[133] Dazu wurde im ersten Schritt die Aminofunktionalität des Anilins als Methylsulfonat geschützt (a) um die Triazenbildung zu vermeiden. Dazu wurde Formaldehyd-Natriumbisulfid (53 mmol; 7,1 g) in 25 mL Wasser vorgelegt und unter starkem Rühren tropfenweise mit Anilin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min auf 70°C erhitzt, und beim Abkühlen kristallisiert Natrium-Anilinomethylen-Sulfonat in weißen Nadeln aus (7,2 g). Diese wurden mit Diethylether gewaschen, getrocknet und ohne weitere Reinigung im zweiten Reaktionsschritt verwendet (b). Dabei wurde 4-Amino-Benzoessäure (3,9 mmol; 536 mg) in 2,3 mL HCl_{aq} (5,5 M) suspendiert und bei 0°C tropfenweise mit einer Lösung von 4,4 mmol NaNO_2 (306 mg) in 840 μL Wasser versetzt. Die resultierende Lösung wurde unter Eiskühlung zu 5 mmol Natrium-Anilinomethylen-Sulfonat (1,04 g) in 14 mL NaAc_{aq} (0,86 M) getropft, wobei sich ein intensiv orangener Niederschlag bildete. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionsmischung 14 h auf 4°C gekühlt und die gebildeten orangefarbenen Kristalle abfiltriert. Diese wurden anschließend in 1N NaOH_{aq} gelöst und 2 h unter Rückfluss auf 90°C erhitzt.

Beim Abkühlen kristallisierte das Azobenzol **13** in orangefarbenen Nadeln, welche abfiltriert und am Vakuum getrocknet wurden.

Zur Acetylierung wurden 0,35 g der Verbindung **13** in 2 mL Ac₂O gelöst und 2 h gerührt. Anschließend wurden 5 mL Et₂O zugegeben, wobei **13^{Ac}** als orangefarbener Feststoff ausfiel, welcher abfiltriert, mit Et₂O gewaschen und getrocknet wurde.

13; 4-(4-Aminophenyl)Diazenyl-Benzoessäure:

0,40 g (1,66 mmol; 40%) orangefarbene Nadeln.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 6,16 (s; 2H); 6,69 (d; 8,8 Hz; 2H); 7,67 (m; 2 x 2H); 8,04 (d; 8,3Hz; 2H).

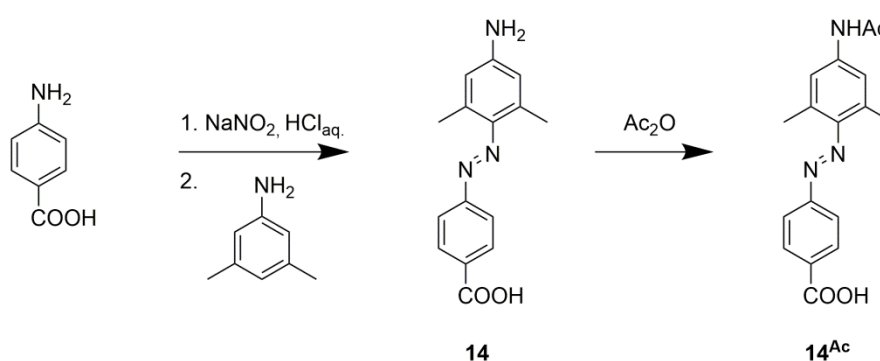
$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 113,4; 120,6; 128,1; 129,9; 140,8; 142,9; 152,7; 152,8; 169,7.

13^{Ac} 4-(4-Acetamidophenyl)Diazenyl-Benzoessäure:

0,37 g (1,30 mmol; 90%) orangefarbener Feststoff ($\lambda_{\text{max}} = 361 \text{ nm}$).

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 2,17 (s, 3H); 7,84 (d; 8,8 Hz; 2H); 7,90 (m; 2 x 2H); 8,12 (d; 8,4Hz; 2H); 10,41 (s; 1H).

II Dimethyl-Azobenzolderivat **14**



Das Azobenzolderivat **14** konnte durch direkte Azokupplung von 4-Amino-Benzoessäure an ungeschütztes 3,5-Dimethyl-Anilin synthetisiert werden. Dazu wurde eine Suspension von 4-Amino-Benzoessäure (20 mmol, 2,74 g) in 60 mL Wasser und 14 mL HCl_{konz.} auf 0°C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit

20 mmol NaNO_2 (1,38 g) in 5 mL Wasser versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde 20 min bei 0°C gerührt, wobei die Suspension unter Bildung des Diazoniumsalzes aufklarte.

Im zweiten Schritt wurden 10 mL Wasser zu 20 mmol 3,5-Dimethylanilin (2,49 mL) gegeben und tropfenweise mit 25 % HCl_{aq} auf pH 5-6 angesäuert, wobei sich das Anilin auflöste. Die Lösung wurde unter Eiskühlung schrittweise mit der Lösung des Diazoniumsalzes versetzt, wobei ein intensiv orangefarbener Feststoff ausfiel. Nach vollständiger Zugabe wurde mit 2 M NaOH ein pH-Wert von ~ 4 eingestellt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit gesättigter NaHCO_3 , aq . neutralisiert, der orangefarbene Feststoff abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in EE gelöst. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeeengt und der erhaltene orangefarbene Feststoff aus Toluol umkristallisiert.

Zur Acetylierung wurde 0,37 mmol von Verbindung **14** (100 mg) in 2 mL Essigsäureanhydrid gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 5 mL Wasser zugegeben und über Nacht gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, in EE gelöst, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

14; 4-(4-Amino-2,6-Dimethylphenyl)Diazenyl-Benzoessäure:

3,43 g (13 mmol; 65 %) rot-violette Nadeln.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO- d_6): 2,46 (s; 6H); 6,07 (s; 2H); 6,36 (s; 2H); 7,75 (d; 8,6 Hz; 2H); 8,05 (d; 8,6 Hz; 2H); 12,94 (s; breit; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO- d_6): 21,4; 114,0; 121,3; 130,1; 130,5; 137,5; 139,4; 152,0; 156,1; 167,0.

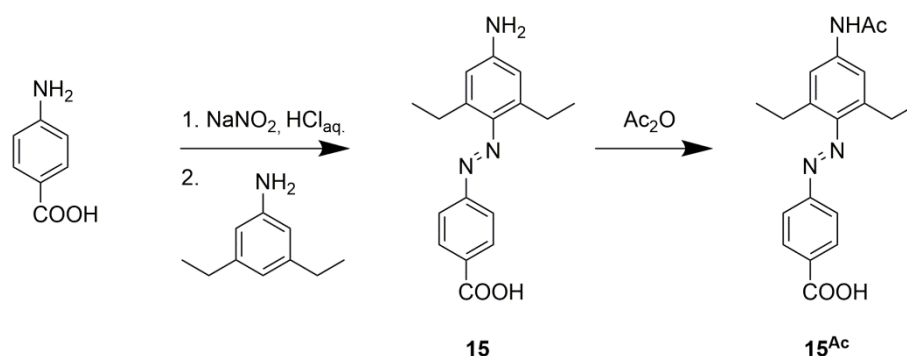
14^{Ac}; 4-(4-Acetamido-2,6-Dimethylphenyl)Diazenyl-Benzoessäure:

95 mg (0,34 mmol; 90%) orangefarbener Feststoff ($\lambda_{\text{max}} = 354 \text{ nm}$).

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO- d_6): 2,08 (s; 3H); 2,44 (s; 6H); 7,47 (s; 2H); 7,90 (d; 8,7 Hz; 2H); 8,12 (d; 8,7 Hz; 2H); 10,10 (s; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO- d_6): 20,5; 24,6; 119,7; 122,4; 131,7; 132,2; 134,2; 142,0; 144,3; 155,4; 167,3; 173,0.

III Diethyl-Azobenzolderivat 15



Das Azobenzolderivat **15** konnte durch direkte Azokupplung von 4-Amino-Benzoessäure an ungeschütztes 3,5-Diethyl-Anilin synthetisiert werden. Dazu wurde eine Suspension von 4-Amino-Benzoessäure (0,7 mmol; 95 mg) in 2,1 mL Wasser und 0,5 mL HCl_{konz.} auf 0°C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 0,7 mmol NaNO₂ (49 mg) in 0,7 mL Wasser versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde 20 min bei 0°C gerührt, wobei die Suspension unter Bildung des Diazoniumsalzes aufklarte.

Im zweiten Schritt wurden 0,5 mL Wasser zu 0,67 mmol 3,5-Diethylanilin (100 mg) gegeben und mit ~200 µL 25% HCl_{aq.} auf pH 5-6 angesäuert, wobei sich das Anilin auflöste. Die Lösung wurde unter Eiskühlung schrittweise mit der Lösung des Diazoniumsalzes versetzt, wobei ein intensiv orangefarbener Feststoff ausfiel. Nach vollständiger Zugabe wurde mit 2 M NaOH ein pH-Wert von ~4 eingestellt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 25% HCl_{aq.} ein pH-Wert von 1 eingestellt und mit EE (3 x 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeeengt und der erhaltene orangefarbene Feststoff über Kieselgel chromatographiert mit PE/EE 1:1 (R_f = 0,6).

Zur Acetylierung wurde 0,17 mmol von Verbindung **15** (50 mg) in 2 mL Essigsäureanhydrid gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 5 mL Wasser zugegeben und über Nacht gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, in EE gelöst, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

15; 4-(4-Amino-2,6-Diethylphenyl)Diazenyl-Benzoessäure:

71,3 mg (0,24 mmol; 35%) orangefarbener Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 1,15 (t; 7,3 Hz; 6H), 2,48 (q; 7,3 Hz; 4H); 6,10 (s; breit 2H); 6,39 (s; 2H); 7,75 (d; 8,6 Hz; 2H); 8,07 (d; 8,6 Hz; 2H); 12,5 (s; breit; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 16,4; 27,5; 113,0; 121,2; 130,9; 131,8; 139,0; 144,4; 152,8; 156,6; 167,3.

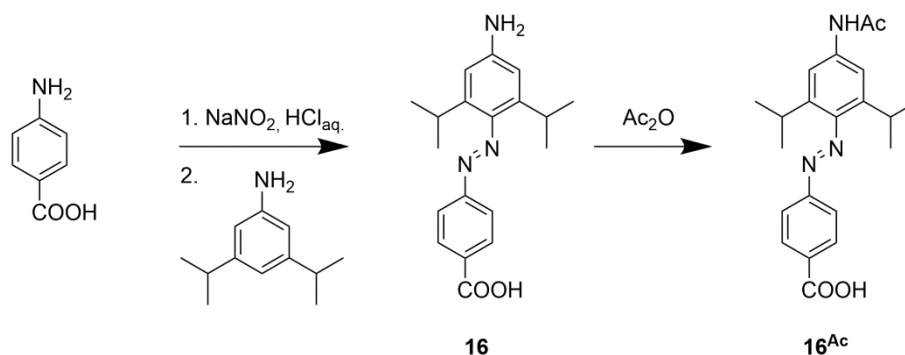
15^{Ac}; 4-(4-Acetamido-2,6-Diethylphenyl)Diazenyl-Benzoessäure:

55 mg (0,24 mmol; 100%) orangefarbener Feststoff ($\lambda_{\text{max}} = 351 \text{ nm}$).

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 1,11 (t; 7,4 Hz; 6H); 2,08 (s; 3H); 2,72 (q; 7,4 Hz; 4H); 7,48 (s; 2H); 7,74 (d; 8,7 Hz; 2H); 8,12 (d; 8,7 Hz; 2H); 10,22 (s; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 16,3; 24,6; 26,0; 118,3; 121,5; 130,7; 138,9; 140,6; 141,6; 145,4; 153,6; 169,0; 170,2.

IV Diisopropyl-Azobenzolderivat 16



Das Azobenzolderivat **16** konnte durch direkte Azokupplung von 4-Amino-Benzoessäure an ungeschütztes 3,5-Diisopropyl-Anilin synthetisiert werden. Dazu wurde eine Suspension von 4-Amino-Benzoessäure (0,7 mmol; 95 mg) in 2,1 mL Wasser und 0,5 mL $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ auf 0°C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 0,7 mmol NaNO_2 (49 mg) in 0,5 mL Wasser versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde 20 min bei 0 C gerührt, wobei die Suspension unter Bildung des Diazoniumsalzes aufklarte.

Im zweiten Schritt wurden 0,5 mL Wasser zu 0,67 mmol 3,5-Diethylanilin (100 mg) gegeben, mit 25%iger HCl_{aq} auf pH 5-6 angesäuert, und nach Zugabe

von 1 mL Ethanol löste sich das Anilin auf. Die Lösung wurde unter Eiskühlung schrittweise mit dem Diazoniumsalz versetzt, wobei ein orangefarbener Feststoff ausfiel. Nach vollständiger Zugabe wurde mit 2 M NaOH ein pH-Wert von ~4 eingestellt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 25 % HCl_{aq.} ein pH-Wert von 1 eingestellt und mit EE (3 x 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene orangene Feststoff (23 mg) direkt acetyliert.

Dazu wurde das Produktgemisch in 2 mL Essigsäureanhydrid gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 5 mL Wasser zugegeben und über Nacht gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, und über Kieselgel chromatographiert mit PE/EE 1:1 (R_f = 0,6).

16: 4-(4-Amino-2,6-Diisopropyl)Diazenyl-Benzoessäure:

23 mg orangefarbener Feststoff (verunreinigt).

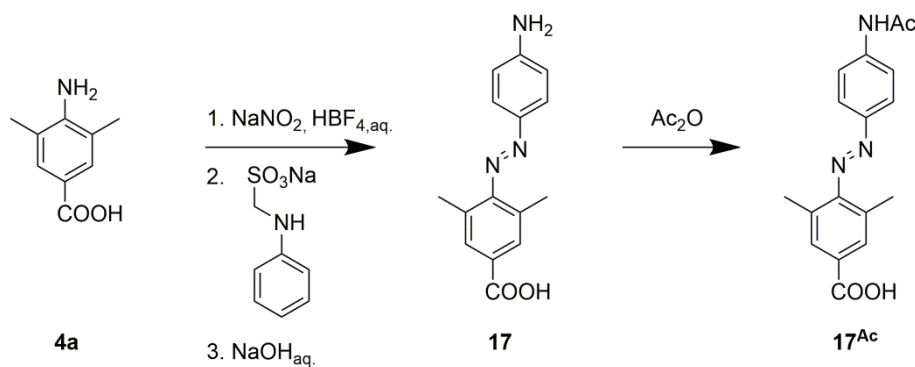
16^{Ac}: 4-(4-Acetamido-2,6-Diisopropylphenyl)Diazenyl-Benzoessäure:

~10 mg (35 µmol; < 5%) orangefarbener Feststoff (λ_{max} = 348 nm).

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 1,20 (d; 6,8 Hz; 12H); 2,13 (s; 3H); 3,32 (sept.; 6,8 Hz; 2H); 7,66 (s; 2H); 7,94 (d; 8,3 Hz; 2H); 8,21 (d; 8,3 Hz; 2H); 10,22 (s; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 24,1; 24,6; 28,1; 114,8; 122,7; 131,3; 134,4; 140,9; 142,1; 145,4; 154,8; 167,7; 169,1.

V Dimethyl-Azobenzolderivat 17



Das Azobenzolderivat **17** wurde durch eine Azokupplung von **4a** an Methylensulfonat geschütztes Anilin synthetisiert.

Dabei wurde 4-Amino-3,5-Dimethyl-Benzoessäure (3,9 mmol; 650 mg) in 2,3 mL $\text{HBF}_{4,\text{konz.}}$ (5,5 M) und 4 mL EtOH suspendiert und im Eis/Salz-Bad bei -10°C tropfenweise mit einer Lösung von 4,4 mmol NaNO_2 (306 mg) in 1 mL Wasser versetzt. Die resultierende Lösung wurde unter Eiskühlung zu 5 mmol Natrium-Anilinomethylen-Sulfonat (1,04 g) in 14 mL $\text{NaAc}_{\text{aq.}}$ (0,86 M) getropft, wobei sich ein intensiv orangefarbener Niederschlag bildete. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionsmischung für 14 h auf 4°C gekühlt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Dieser wurde anschließend in 1N $\text{NaOH}_{\text{aq.}}$ gelöst und 2 h unter Rückfluss auf 90°C erhitzt. Anschließend wurde mit HCl ein pH-Wert von 1 eingestellt, wobei ein orangefarbener Feststoff ausfiel, welcher abfiltriert und am Vakuum getrocknet wurde.

Zur Acetylierung wurden 0,35 g der Verbindung **13** in 2 mL Ac_2O gelöst und 2 h gerührt. Anschließend wurden 5 mL Wasser zugegeben und über Nacht gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und über Kieselgel chromatographiert mit PE/EE 2:3 ($R_f = 0,5$).

17; 4-(4-Aminophenyl)Diazenyl-3,5-Dimethyl-Benzoessäure:

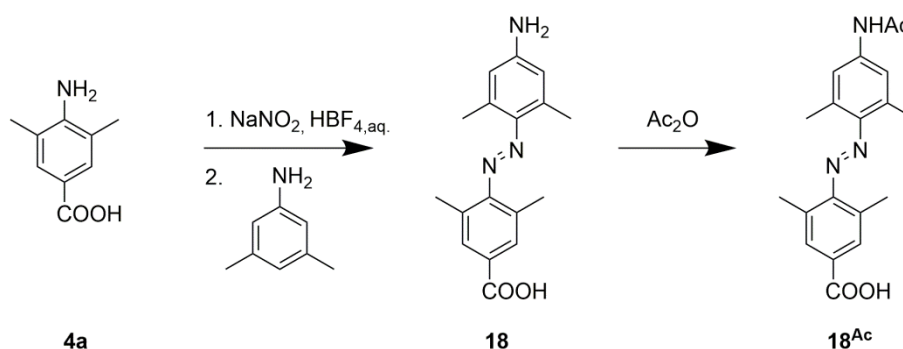
300 mg orangefarbener Feststoff (verunreinigt).

17^{Ac}; 4-(4-Acetamidophenyl)Diazenyl-3,5-Dimethyl-Benzoessäure:

~20 mg (64 μMol ; < 5%) orangefarbener Feststoff ($\lambda_{\text{max}} = 353 \text{ nm}$).

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d_6): 2,11 (s; 3H); 2,28 (s; 6H); 7,50 (m; 2H); 7,66 (m; 2H); 7,83 (s; 2H); 10,42 (s; 1H).

VI Tetramethyl-Azobenzolderivat 18



Das Azobenzolderivat **18** konnte durch direkte Azokupplung von **4a** an ungeschütztes 3,5-Dimethyl-Anilin synthetisiert werden. Bei der Diazotierung wurde Tetrafluorborsäure verwendet und auf -10°C gekühlt um das Diazoniumsalz zu stabilisieren und eine Stickstoffabspaltung zu vermeiden. Dazu wurde eine Suspension von **4a** (1,85 mmol; 305 mg) in 3 mL Wasser und 2 mL HBF_{4, konz.} im Eis/Salz-Bad auf -10°C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 1,85 mmol NaNO₂ (127 mg) in 1 mL Wasser versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde 20 min bei -10°C gerührt. Der erhaltene Feststoff wurde bei 0°C abzentrifugiert und in eiskaltem Ethanol gelöst.

Im zweiten Schritt wurden 1 mL Wasser zu 7,4 mmol 3,5-Dimethylanilin (923 µL) gegeben und mit HBF_{4, konz.} auf pH 5-6 angesäuert. Die Lösung wurde unter Eiskühlung schrittweise mit dem Diazoniumsalz versetzt, wobei ein intensiv orangefarbener Feststoff ausfiel. Nach vollständiger Zugabe wurde 3 h bei 0°C gerührt. Anschließend wurde 20 mL EE zugegeben und mit 1 M HCl_{aq.} (3 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene orangefarbene Feststoff direkt acetyliert. Dazu wurde das Produktgemisch in 2 mL Essigsäureanhydrid gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 5 mL Wasser zugegeben und über Nacht gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, und über Kieselgel chromatographiert mit PE/EE 2:3 (R_f = 0,55).

18; 4-(4-Amino-2,6-Dimethylphenyl)Diazenyl-3,5-Dimethyl-Benzoessäure:
100 mg orangefarbener Feststoff (verunreinigt).

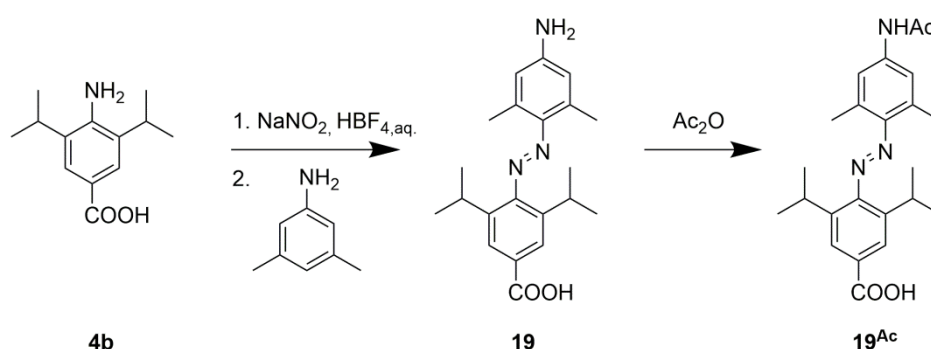
18^{Ac}; 4-(4-Acetamido-2,6-Dimethylphenyl)Diazenyl-3,5-Dimethyl-Benzoessäure:

~15 mg (44 μ Mol; < 5%) orangefarbener Feststoff (λ_{max} = 340 nm).

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 2,14 (s; 3H); 2,38 (s; 6H); 2,51 (s; 6H); 7,54 (s; 2H); 7,82 (s; 2H); 10,20 (s; 1H); 12,88 (s; breit; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 19,0; 20,7; 24,2; 119,5; 129,3; 129,8; 130,2; 134,0; 140,9; 145,2; 155,0; 167,1; 169,0.

VII Diisopropyl-dimethyl-Azobenzolderivat 19



Das Azobenzolderivat **19** konnte durch direkte Azokupplung von **4b** an ungeschütztes 3,5-Dimethyl-Anilin synthetisiert werden. Bei der Diazotierung wurde Tetrafluorborsäure verwendet und auf -10°C gekühlt um das Diazoniumsalz zu stabilisieren und eine Stickstoffabspaltung zu vermeiden. Dazu wurde eine Suspension von **4b** (0,92 mmol; 180 mg) in 1,5 mL Wasser und 1 mL HBF_{4,konz.} im Eis/Salz-Bad auf 0°C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 0,92 mmol NaNO₂ (63 mg) in 0,5 mL Wasser versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde 20 min bei -10°C gerührt. Der erhaltene Feststoff wurde bei 0°C abzentrifugiert und in eiskaltem Ethanol gelöst.

Im zweiten Schritt wurde 1 mL Wasser zu 3,7 mmol 3,5-Dimethylanilin (461 μ L) gegeben und mit HBF_{4,konz.} auf pH 5-6 angesäuert. Die Lösung wurde unter Eiskühlung schrittweise mit dem Diazoniumsalz versetzt, wobei ein intensiv orangefarbener Feststoff ausfiel. Nach vollständiger Zugabe wurde 3 h bei 0°C gerührt. Anschließend wurde 20 mL EE zugegeben und mit 1 M HCl_{aq.} (3 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, am

Rotationsverdampfer eingengt und das erhaltene orangefarbene Öl direkt acetyliert.

Dazu wurde das Produktgemisch in 2 mL Essigsäureanhydrid gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 5 mL Wasser zugegeben und über Nacht gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, und über Kieselgel chromatographiert mit PE/EE 3:2 ($R_f = 0,65$).

19; 4-(4-Amino-2,6-Diisopropylphenyl)Diazenyl-3,5-Dimethyl-Benzoessäure:

120 mg orangefarbenes Öl (verunreinigt).

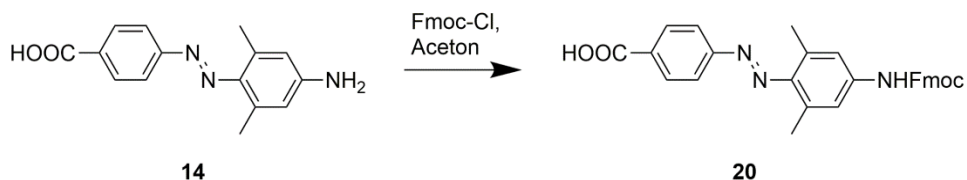
19^{Ac}; 4-(4-Acetamido-2,6-Diisopropylphenyl)Diazenyl-3,5-Dimethyl-Benzoessäure:

~10 mg (25 μ Mol; < 5%) orangefarbener Feststoff ($\lambda_{max} = 328$ nm).

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO- d_6): 1,14 (d; 6,8 Hz; 12H); 2,09 (s; 3H); 2,44 (s; 6H); 2,94 (sept.; 6,8 Hz; 2H); 7,49 (s; 2H); 7,85 (s; 2H); 10,17 (s; 1H); 12,79 (s; breit; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO- d_6): 20,5; 23,4; 24,3; 27,2; 119,5; 124,7; 129,4; 134,4; 139,0; 141,1; 144,6; 154,6; 167,3; 167,9.

VIII Fmoc-geschütztes Azobenzolderivat **20**



2 mmol des Dimethyl-substituierten Azobenzols **14** (538 mg) wurden in 10 mL Aceton gelöst und mit 10 mL $\text{Na}_2\text{CO}_{3,\text{aq}}$ (10%ig) versetzt. Zu dieser Lösung wurde bei 0°C tropfenweise 2 mmol Fmoc-Cl (517 mg in 10 mL Aceton) gegeben und 20 Minuten gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 40 Minuten gerührt. Der ausgefallene orangefarbene Feststoff wurde abfiltriert mit Aceton gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde der Feststoff in 50 mL siedendem Aceton suspendiert 15 Minuten gekocht und warm abfiltriert.

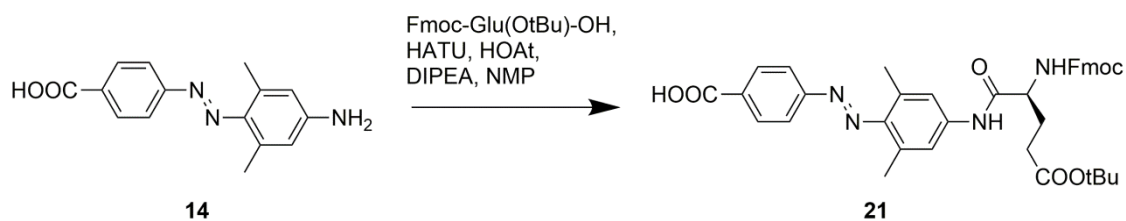
20: 4-((4-(((9H-Fluoren-9-yl)Methoxy)Carbonyl)Amino)-2,6-dimethylphenyl)-Diazenyl-Benzoesäure:

653 mg (1,37 mmol; 70%) orangefarbener Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 2,37 (s; 6H); 4,33 (t; 6,7 Hz; 1H); 4,51 (d; 6,7 Hz; 2H); 7,31 (s; breit; 2H); 7,36 (m; 2H); 7,44 (m; 2H); 7,70 (d; 8,3 Hz; 2H); 7,77 (d; 7,6 Hz; 2H); 7,82 (d; 8,3 Hz; 2H); 8,00 (d; 8,1 Hz; 2H); 9,89 (s; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 20,6; 47,0; 66,3; 119,1; 120,7; 122,4; 125,7; 127,7; 128,3; 131,1; 132,6; 134,7; 141,0; 141,3; 144,2; 145,2; 153,8; 155,8; 167,3.

IX Azobenzol-Glutaminsäure-Konjugat 21



Fmoc-Glu(OtBu)-OH (2,5 mmol; 1,12 g), HATU (2,5 mmol; 0,95 g) und HOAt (4 mmol; 0,54 g) wurden in 20 mL NMP gelöst. Nach vollständiger Auflösung wurde 850 μL DIPEA (5 mmol) zugegeben und 5 min gerührt. Zu dieser Lösung wurde **14** (2,5 mmol; 0,71 g) in 10 mL NMP gegeben und über Nacht (14 h) bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 200 mL eiskaltes Wasser gekippt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Der orangefarbene Feststoff wurde in Ethylacetat aufgenommen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung über Kieselgel mit DCM/MeOH (15:1) wurde **21** als orangefarbener Feststoff erhalten ($R_f = 0,25$).

21; (S)-4-(4-(2-(((9H-Fluoren-9-yl)Methoxy)Carbonyl)Amino)-5-(tert-Butoxy)-5-Oxopentanamido)-2,6-Dimethylphenyl)Diazenyl-Benzoesäure:

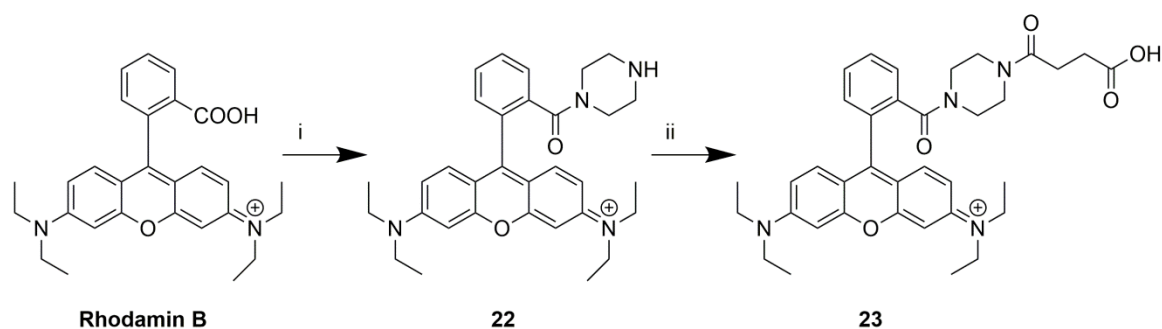
510 mg (0,75 mmol; 30%) orangefarbener Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO- d_6): 1,39 (s; 9H) ; 1,81-2,01 (m; 2H); 2,39-2,23 (m; 2H) ; 2,45 (s; 6H); 4,17-4,35 (m; 4H); 6,38 (s; 1H) ; 7,31-7,36 (m; 2H); 7,40-7,44 (m; 2H) ; 7,52 (s; 2H); 7,74-7,78 (m; 2H); 7,90 (m; 4H) ; 8,14 (m; 2H); 10,26 (s; 1H); 13,00 (s; breit; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO- d_6): 20,1; 27,0; 27,7; 31,4; 46,6; 54,8; 65,7; 79,9; 119,7; 120,1; 122,0; 125,2; 127,0; 127,6; 130,5; 132,6; 133,7; 139,4; 140,8; 143,7; 145,2; 155,1; 167,3; 171,4; 171,7; 172,4.

m/z: 699,4 [$\text{M}+\text{Na}^+$] (berechnet: 699,7).

6.2.3 Synthese des Rhodamin-Derivates



Verbindung **22** wurde von A. Niederwieser (AG Wittmann, Universität Konstanz) nach Nguyen et al. aus Rhodamin B synthetisiert^[120] und zur weiteren Modifikation zur Verfügung gestellt.

Dabei wurde Verbindung **22** (1,17 mmol; 600 mg) mit Bernsteinsäureanhydrid (1,14 mmol; 114 mg) und 4-Dimethylamino-Pyridin (1,14 mmol; 139 mg) in 3,6 mL DCM gelöst und tropfenweise mit Triethylamin (1,14 mmol; 157 μL) versetzt. Nach 20 h wurde das Reaktionsgemisch zwischen 10 mL EE und 10 mL 1 M K_2CO_3 ,_{aq.} separiert und die wässrige Phase 3-mal mit 10 mL EE gewaschen. Anschließend wurde NaCl bis zur Sättigung zugegeben und mit 10 mL eines Gemischs aus Isopropanol und DCM (2:1) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde in Chloroform gelöst, filtriert und wiederum eingengt, wobei ein violetter Feststoff ausfiel.

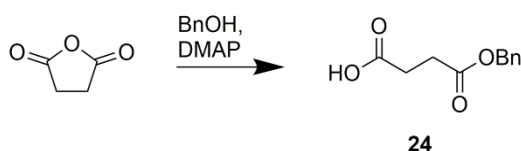
23: 605 mg (0,99 mmol; 80%) violetter Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CD_3OD): 1,30 (t; 7,0 Hz 12H); 2,54 (m; 2H); 2,59 (m; 2H); 3,41 (m; 8H); 3,69 (q; 7,0 Hz; 8H); 6,96 (m; 2H); 7,09 (s; 2H); 7,28 (m; 2H); 7,52 (m; 1H); 7,70 (m; 1H); 7,77 (m; 2H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CD_3OD): 13,0; 28,9; 30,3; 40,4; 43,1; 47,1; 50,0; 97,5; 115,0; 115,6; 129,1; 131,4; 131,9; 132,4; 133,3; 136,7; 140,1; 157,1; 157,3; 169,6; 172,8; 176,7.

6.2.4 Fluorouracil-Derivate

I Bernsteinsäure-Monobenzylester **24**^[124]



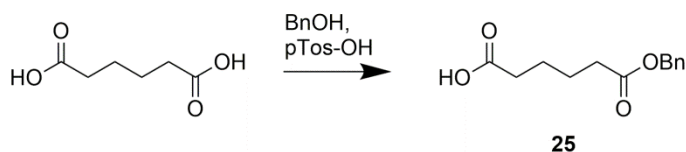
Benzylalkohol (24,9 mmol; 2,59 mL) wurde mit Bernsteinsäureanhydrid (30 mmol; 3 g) und 4-Dimethylamino-Pyridin (24,9 mmol; 3,04 g) in 100 mL DCM gelöst und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 100 mL $\text{Na}_2\text{CO}_{3,\text{aq}}$ (10%ig) zugegeben und die wässrige Phase isoliert. Diese wurde anschließend mit 25%iger HCl_{aq} angesäuert und 2-mal mit 25 mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend 2-mal mit 25 mL $\text{NaCl}_{\text{aq.,ges.}}$ gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt.

24: Monobenzyl-Succinat: 4,74 g (22,8 mmol; 92%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d_6): 2,51-2,54 (m; 2H); 2,57-2,61 (m; 2H); 5,11 (s; 2H); 7,31-7,41 (m; 5H); 12,25 (s; breit; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d_6): 28,6; 28,7; 65,5; 127,8; 127,9; 128,4; 136,2; 172,0; 173,4.

II Adipinsäure-Monobenzylester **24**^[134]



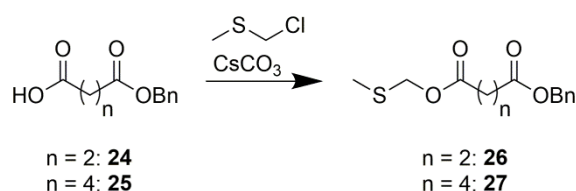
Benzylalkohol (360 mmol; 41,0 mL) wurde mit Adipinsäure (250 mmol; 36,5 g) und *para*-Toluolsulfonsäure (2,5 mmol; 0,5 g) in 200 mL Toluol gelöst und unter Verwendung eines Wasserabscheiders bei 140°C gekocht. Nachdem 6,5 mL Wasser abgeschieden waren, wurde die Reaktionsmischung abgekühlt, mit 150 mL Wasser versetzt, mit NaOH_{aq., konz.} auf einen pH von ~8 eingestellt und die wässrige Phase 2-mal mit 100 mL Diethylether gewaschen. Anschließend wurde mit 25%iger HCl_{aq.} auf pH 1,5 angesäuert und mit 100 mL Et₂O extrahiert. Die organische Phase wurde dann 2-mal mit 50 mL NaCl_{aq., ges.} gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt.

25; Monobenzyl-Adipat: 6,00 g (25 mmol; 10%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl₃): 1,64-1,79 (m; 4H); 2,41 (m; 4H); 5,14 (s; 2H); 7,32-7,43 (m; 5H); 10,96 (s; breit; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CDCl₃): 24,1; 24,3; 33,7; 33,9; 66,3; 128,2; 128,3; 128,6; 135,9; 173,2; 179,6.

III Synthese der (Methylsulfanyl)Methylester **26** und **27**^[73]



Die einfach benzylgeschützten Carbonsäuren **24** (21 mmol; 4,54 g) oder **25** (21 mmol; 5,00 g) wurden jeweils mit CsCO₃ (21 mmol; 6,9 g) in 25 mL DMF suspendiert, tropfenweise mit Chlormethylsulfid versetzt und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten auf

70°C erhitzt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit 50 mL Wasser verdünnt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 mL EE extrahiert und die organische Phase 3-mal mit 50 mL $\text{NaCl}_{\text{aq., ges.}}$ gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt.

26; Benzyl-(Methylthio)methyl-Succinat: 5,38 g (19,5 mmol; 90%) gelbes Öl.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d6): 2,22 (s; 3H); 2,68-2,74 (m; 4H); 5,15 (s; 2H); 5,16 (s; 2H); 7,29-7,42 (m; 5H).

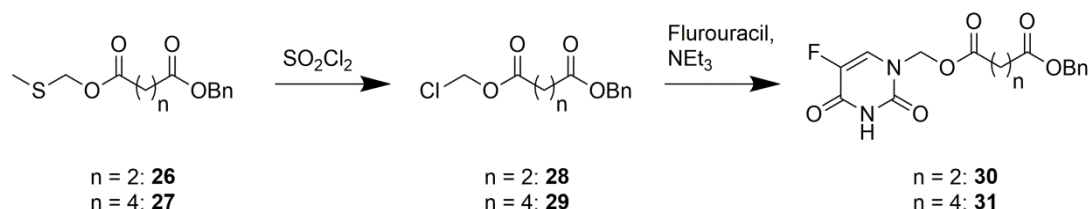
$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d6): 15,3; 29,0; 29,2; 66,6; 68,5; 128,2; 128,3; 128,6; 135,8; 171,9; 171,9.

27; Benzyl-(Methylthio)methyl-Adipat: 5,89 g (20 mmol; 94%) gelbes Öl.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d6): 1,51-1,63 (m; 4H); 2,18 (s; 3H); 2,32-2,42 (m; 4H); 5,10 (s; 2H); 5,15 (s; 2H); 7,29-7,41 (m; 5H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d6): 15,1; 24,3; 24,3; 33,5; 33,6; 65,8; 67,9; 128,4; 128,4; 128,9; 136,7; 172,9; 173,0.

IV Synthese der Benzyl-geschützten Fluorouracilderivate **30** und **31**^[73]



Verbindung **26** (10 mmol; 2,68 g) oder **27** (10 mmol; 2,96 g) wurde jeweils in 20 mL DCM gelöst und bei 0°C tropfenweise mit Sulfurylchlorid (11 mmol in 11 mL DCM) versetzt. 10 min nach Beendigung der Zugabe wurde das Eisbad entfernt und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Vakuum entfernt und das erhaltene gelbe Öl (Verbindung **28**, **29**) direkt weiterverwendet.

Dieses Öl wurde in 10 mL DMF gelöst und tropfenweise zu einer Lösung von 5'-Fluorouracil (7,7 mmol; 1 g) und Triethylamin (23,1 mmol; 3,22 mL) in 10 mL DMF gegeben. Nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das entstandene Triethylamin-Hydrochlorid abfiltriert und das Lösungsmittel am Hochvakuum

entfernt. Der Rückstand wurde anschließend über Kieselgel mit DCM/EE (3:2, Verbindung **30** (Rf = 0,5); 3:1, Verbindung **31** (Rf= 0,4)) chromatographiert.

30; Benzyl-((5-Fluoro-2,4-Dioxo-3,4-Dihydropyrimidinyl)Methyl)-Succinat:

1,5 g (4,12 mmol; 54%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 2,64 (m; 4H); 5,09 (s; 2H); 5,58 (s; 2H); 7,29-7,41 (m; 5H); 8,11(d; 6,8 Hz; 1H); 12,00 (s; breit; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 28,3; 28,4; 65,6; 70,5; 127,9; 128,0; 128,5; 129,5 (d; 32 Hz); 135,9; 139,2 (d; 230 Hz); 149,2; 157,4 (d; 26 Hz); 171,7; 171,7.

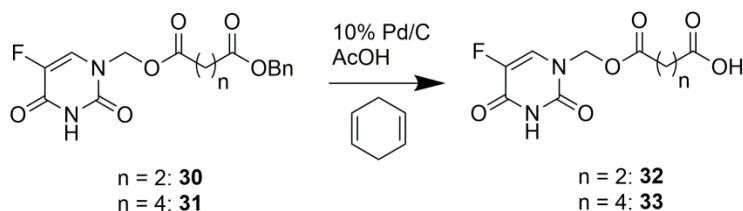
31; Benzyl-((5-Fluoro-2,4-Dioxo-3,4-Dihydropyrimidinyl)Methyl)-Adipat:

1,25 g (3,30 mmol; 43%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d₆): 1,49-1,59 (m; 4H); 2,32-2,42 (m; 4H); 5,08 (s; 2H); 5,57 (s; 2H); 7,29-7,41 (m; 5H); 8,13 (d; 6,7 Hz; 1H); 11,99 (s; breit; 1H).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (DMSO-d₆): 24,0; 24,2; 33,2; 33,5; 65,8; 71,0; 128,4; 128,4; 128,9; 129,5 (d; 32 Hz); 136,7; 139,9 (d; 231 Hz); 149,7; 157,9 (d; 26 Hz); 172,9; 173,0.

V Benzylentschützung der Fluorouracilderivate **32** und **33**^[73]



Verbindung **30** (3,3 mmol; 1,2 g) oder **31** (3,3 mmol; 1,25 g) wurde jeweils in 19 mL entgaster Essigsäure gelöst und unter Argon-Atmosphäre mit 1,1 g Palladium auf Aktivkohle (10%) sowie 1,4-Cylohexadien (17,4 mmol; 1,66 mL) versetzt. Diese Suspension wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Aktivkohle abfiltriert und das Lösungsmittel am Hochvakuum entfernt wurde.

32; ((5-Fluoro-2,4-Dioxo-3,4-Dihydropyrimidin-1-yl)Methyl)-Succinat:

0,6 g (2,31 mmol; 70%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d6): 2,41-2,61 (m; 4H); 5,58 (s; 2H); 8,11(d; 6,6 Hz; 1H); 12,00 (s; breit; 2H).

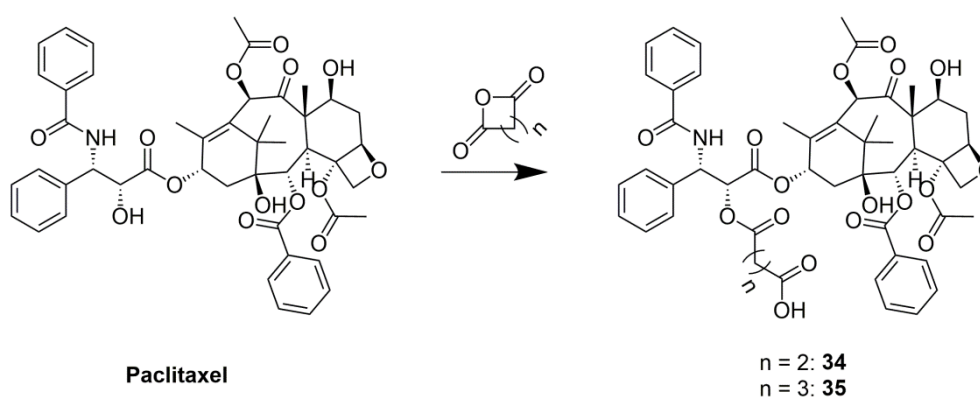
33; ((5-Fluoro-2,4-Dioxo-3,4-Dihydropyrimidin-1-yl)Methyl)-Succinat:

0,48 g (1,65 mmol; 50%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (DMSO-d6): 1,43-1,57 (m; 4H); 2,21 (m, 2H); 2,36 (m; 2H); 5,57 (s; 2H); 8,13 (d; 6,7 Hz; 1H); 11,99 (s; breit; 2H).

6.2.5 Paclitaxel-Derivate

I Paclitaxel-Bernsteinsäureester und -Glutarsäureester **34**, **35**^[135]



Paclitaxel (234 μMol ; 200 mg) wurde mit Bernsteinsäureanhydrid (3,6 mmol; 360 mg) oder Glutarsäureanhydrid (3,6 mmol; 411 mg) in 5 mL Pyridin gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Pyridin am Hochvakuum entfernt und der erhaltene weiße Feststoff in ~4 mL Aceton gelöst. Diese Lösung wurde in eine Kristallisierschale gegeben und 2 mL Wasser zugesetzt. Mit zunehmender Verdunstung des Acetons fällt ein weißer Feststoff aus, der abfiltriert und mit Wasser gewaschen wurde.

34: 180 mg (187 μMol ; 80%) weißer Feststoff.

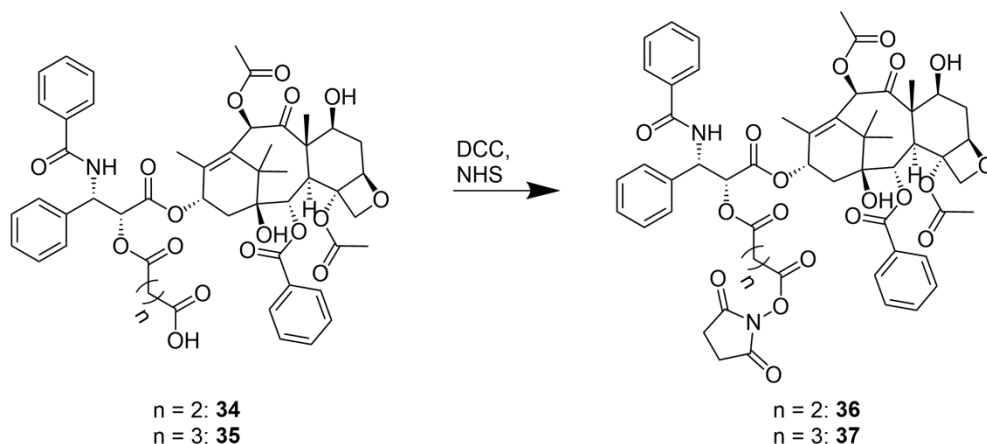
$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl_3): In Übereinstimmung mit der Literatur^[135] (Abbildung 6.1a, violettes Spektrum).

m/z: 976,7 [$\text{M}+\text{Na}^+$] (berechnet: 976,3).

35: 208 mg (215 μMol ; 92%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl_3): In Übereinstimmung mit der Literatur^[135] (Abbildung 6.1b, violettes Spektrum).

II Paclitaxel-Aktivester-Derivate **36**, **37**^[126]



Verbindung **34** (105 μMol ; 100 mg) oder **35** (105 μMol ; 102 mg) wurde mit DCC (105 μMol ; 22 mg) in 1 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und unter Argon-Atmosphäre zu N-Hydroxy-Succinimid (100 μMol ; 12 mg) gegeben. Nach 13 h bei Raumtemperatur wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit 0,8 mL THF gewaschen. Das Filtrat wurde anschließend am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene weiße Feststoff über Kieselgel mit DCM/Aceton (4:1) chromatographiert.

36: 45 mg (43 μMol ; 43%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl_3): In Übereinstimmung mit der Literatur^[136] (Abbildung 6.1a, blaues Spektrum).

m/z: 976,7 [$\text{M}+\text{Na}^+$] (berechnet: 976,3).

37: 38 mg (36 μMol ; 36%) weißer Feststoff.

$\delta^1\text{H}$ [ppm] (CDCl_3): In Übereinstimmung mit der Literatur^[136] (Abbildung 6.1b, blaues Spektrum).

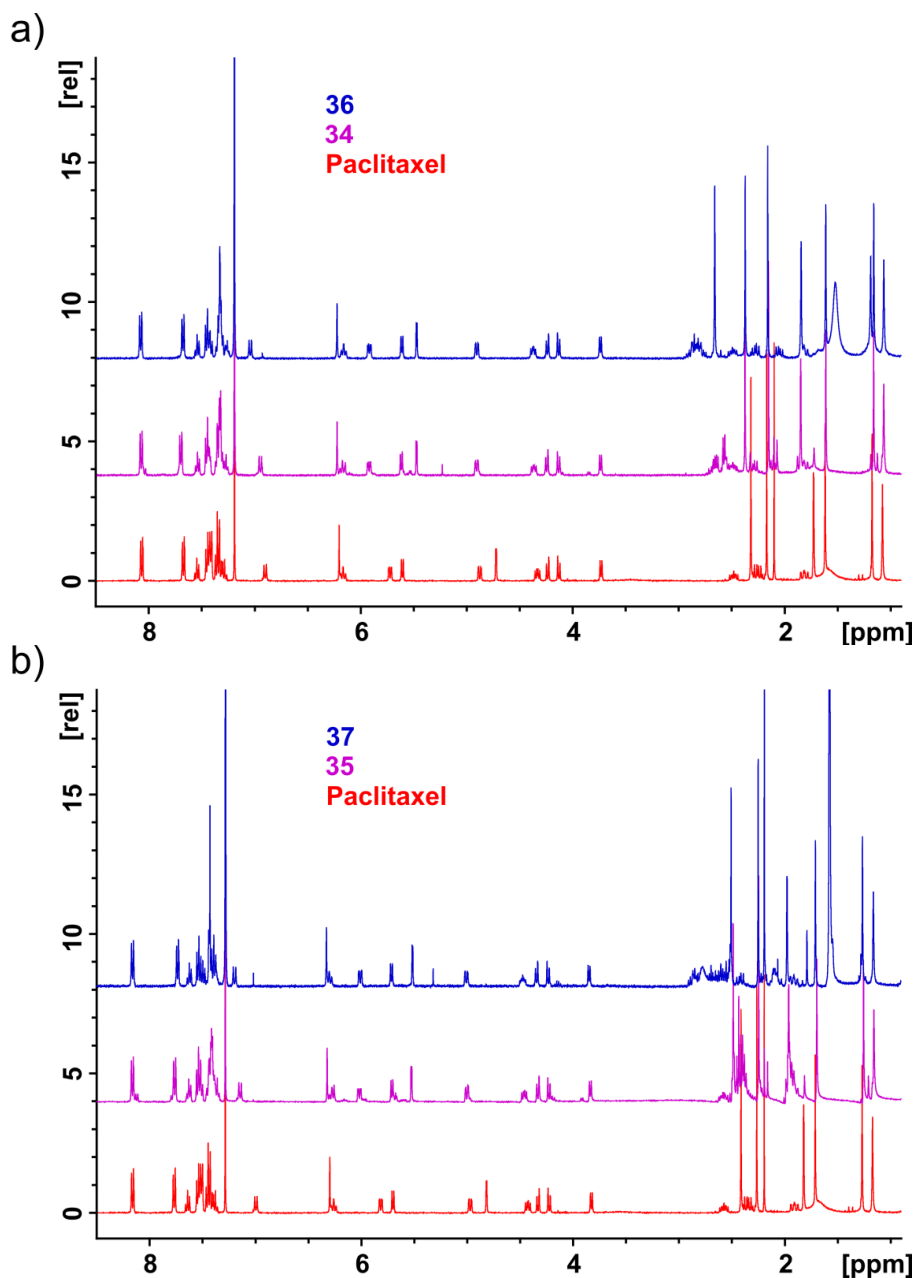


Abbildung 6.1: ¹H-NMR-Spektren (CDCl₃) der Paclitaxel-Derivate **34** und **36** (a) sowie **35** und **37** (b), jeweils im Vergleich zu freiem Paclitaxel (rote Spektren). Charakteristisch sind die hinzukommenden Signale im aliphatischen Bereich (1,8 - 3,0 ppm) sowie die Änderung der chemischen Verschiebung des Protons geminal zur modifizierten OH-Gruppe von 4,82 ppm im freien Paclitaxel auf 5,47 ppm bzw. 5,52 ppm in den modifizierten Derivaten.

6.3 Peptidsynthese

Alle Peptide wurden per Festphasenpeptidsynthese manuell in einer Kunststoffspritze (2 mL oder 5 mL, Norm-Ject[®] HSW) mit eingesetztem

Polyethylen-Filter synthetisiert. Dabei wurde mit einer Ansatzgröße von 50 μmol begonnen und dieser im Verlauf der Synthese in kleinere Ansätze (5-20 μmol) aufgeteilt, um die verschiedenen Peptidsequenzen mit den jeweiligen Modifikationen herzustellen. Als polymerer Träger wurde Polystyrol AM RAM[®] (Rapp Polymere) verwendet.

6.3.1 Peptid-Elongation

Ein kompletter Synthesezyklus für die Elongation des Peptids an der festen Phase um eine Aminosäure ist in folgendem Schema für eine Ansatzgröße von 20 μmol exemplarisch dargestellt:

- | | | |
|----|---|------------|
| 1) | Quellen des Harzes in DMF (nur bei erster Kupplung) | ca. 1 h |
| 2) | Fmoc-Abspaltung mit 2 mL 20% Piperidin (in DMF) | 5 x 5 min |
| 3) | Photometrische Bestimmung der Ausbeute | |
| 4) | Waschen mit | |
| | a) ~1 mL DMF | 10 x 1 min |
| | b) ~1 mL DCM | 2 x 3 min |
| 5) | Kupplung mit 5 eq der aktivierten Carbonsäure | 2-16 h |
| 6) | Waschen mit | |
| | a) ~1 mL DMF | 10 x 1 min |
| | b) ~1 mL DCM | 2 x 3 min |
| 7) | Kaiser-Test | |
| 8) | Capping mit 2 mL 10% Ac ₂ O (in DMF) | 2 x 15 min |
| 9) | Waschen mit | |
| | a) ~1 mL DMF | 10 x 1 min |
| | b) ~1 mL DCM | 2 x 3 min |

Für größere bzw. kleinere Ansätze wurden die Volumina der eingesetzten Lösungen bei gleichbleibenden Reaktionszeiten entsprechend angepasst.

Zu Schritt 3) Photometrische Bestimmung der Ausbeute

Anhand der charakteristischen Absorption des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts, das bei der Fmoc-Entschützung entsteht, wurde mit dessen bekanntem Extinktionskoeffizienten bei 301 nm ($\epsilon_{301} = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)^[137] die Konzentration über das Lambert-Beer'sche-Gesetz berechnet (Gleichung 6.1). Durch Vergleich mit dem vorherigen Wert konnte außerdem die Ausbeute der Kupplung bestimmt werden.

$$c = \frac{A_{301}}{\varepsilon_{301} \cdot d} \quad (6.1)$$

Die Ausbeuten aller Kupplungen lagen typischerweise über 95%. Eine Gesamtausbeute der Peptidsynthese war aufgrund der divergenten Synthesestrategie mit mehrmaligem Aufteilen des Reaktionsansatzes nicht möglich.

Zu Schritt 5) Aktivierung und Kupplung der Carbonsäure

In Abbildung 6.2 sind die Carbonsäure-Derivate aufgelistet, welche bei der Festphasen-Peptidsynthese als OBt-Aktivester eingesetzt wurden.

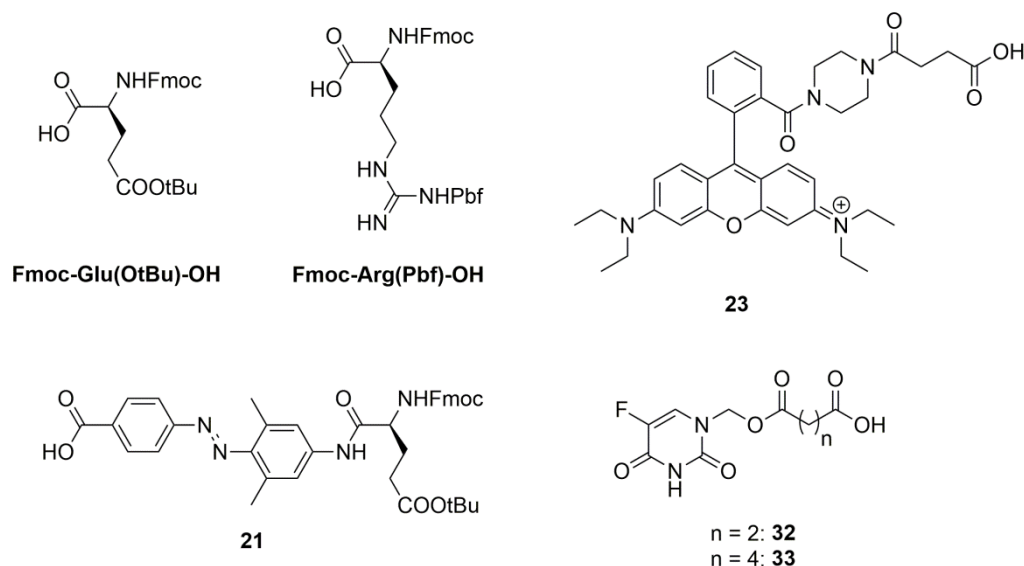


Abbildung 6.2: Verwendete Bausteine bei der Festphasen-Peptidsynthese.

Fmoc-Glu(OtBu)-OH, **Fmoc-Arg(Pbf)-OH** und Verbindung **23** wurden mit HBTU/DIPEA aktiviert. Für eine Ansatzgröße von 20 μmol wurden dazu 100 μmol der jeweiligen Substanz mit 95 μmol HBTU und 200 μmol DIPEA in 1 mL NMP gelöst und nach 5 min in die Spritze mit dem entschützten Harz aufgezogen.

Die Verbindungen **21**, **32** und **33** wurden mit DCC/HOBt aktiviert. Für eine Ansatzgröße von 20 μmol wurden dazu 100 μmol der jeweiligen Substanz mit 100 μmol DCC und 150 μmol HOBt in 1 mL NMP gelöst und nach 5 min zum entschützten Harz gegeben.

Zu Schritt 7) Kaiser-Test

Zur Überprüfung der Vollständigkeit einer Kupplung diene der Kaiser-Test, ein sehr empfindlicher Nachweis auf freie Aminofunktionen ^[138]. Dazu werden wenige Polymerkugeln mit jeweils 2-3 Tropfen der unten aufgeführten Lösungen versetzt und 10 Minuten im Wasserbad auf 80°C erhitzt. Sind aufgrund unvollständiger Kupplung freie Aminogruppen vorhanden, wird der intensiv blaue Farbstoff Ruhemanns Purpur gebildet (Abbildung 6.3). In diesem Fall wurde die Kupplung mit frischen Reaktanden wiederholt (Schritt 5-7).

Lösung 1: 5 g Ninhydrin in 100 ml Ethanol

Lösung 2: 2 mL 1 mM KCN_{aq.} in 98 mL Pyridin

Lösung 3: 80 mg Phenol in 20 mL Ethanol

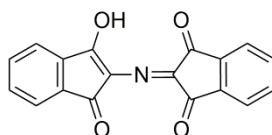


Abbildung 6.3: Aus Ninhydrin entstehender Farbstoff beim Kaisertest (Ruhemanns Purpur).

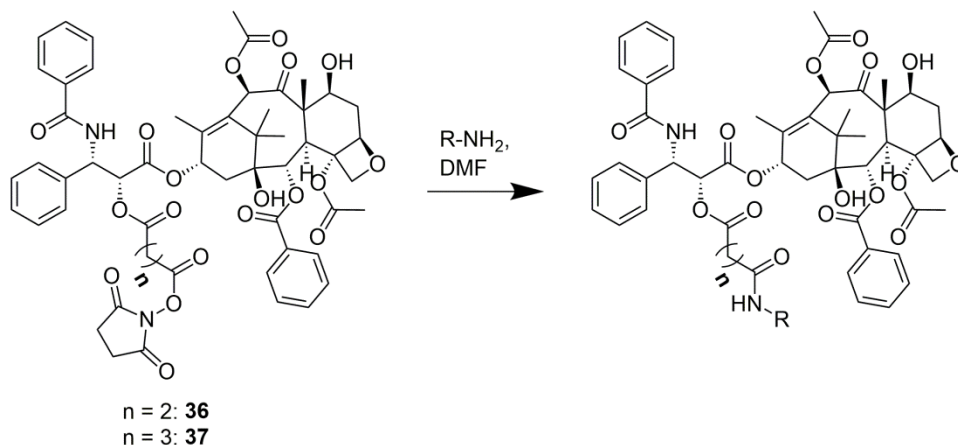
Um Peptide mit freiem N-terminalen Amin zu erhalten wurde vor der Abspaltung vom Harz noch die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (Schritt 2-4); für die N-terminal acetylierten Peptide wurde zusätzlich Schritt 8 und 9 durchgeführt.

6.3.2 Peptid-Abspaltung

Zur Abspaltung von der festen Phase und der Entfernung der Seitenketten-schutzgruppen wurden 2 mL einer Lösung von 2,5% Wasser und 2,5% Triisopropylsilan in TFA in die Spritze mit dem Harz aufgezogen, für 2 h geschüttelt und anschließend in -20°C kalten *tert*-Butylmethylether (MTBE) getropft. Danach wurde noch 2-mal mit jeweils 1,5 mL frischer Abspalllösung für 5 min gewaschen und wiederum in -20°C kalten MTBE getropft. Die MTBE-Lösung wurde bei -20°C gelagert und der ausgefallene Feststoff am nächsten Tag abzentrifugiert (30 min, 4°C, 5000 g). Das Produkt wurde noch zwei weitere

Male in MTBE aufgeschlämmt, abzentrifugiert und abschließend in Wasser gelöst und lyophilisiert.

6.3.3 Paclitaxel-Modifikation der Peptide



Zur Modifikation mit Paclitaxel wurden 1,5 μmol des jeweiligen Peptids in 600 μL DMF gelöst und zu 10,5 μmol des Paclitaxelaktivesters **36** oder **37** gegeben. Nach 48 h bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in 10 mL MTBE bei -20°C ausgefällt, abzentrifugiert und mit weiteren 5 mL MTBE gewaschen. Die modifizierten Peptide konnten durch RP-HPLC gereinigt werden und durch Integration der Absorption der Produkt- und Eduktfraktionen bei 355 nm, wo nur das Azobenzol absorbiert, konnten die Ausbeuten der Reaktionen auf 70% ($^{\text{Pac-c}^4}\mathbf{E}_9\mathbf{R}_9$) bzw. 65% ($^{\text{Pac-c}^5}\mathbf{E}_9\mathbf{R}_9$) bestimmt werden.

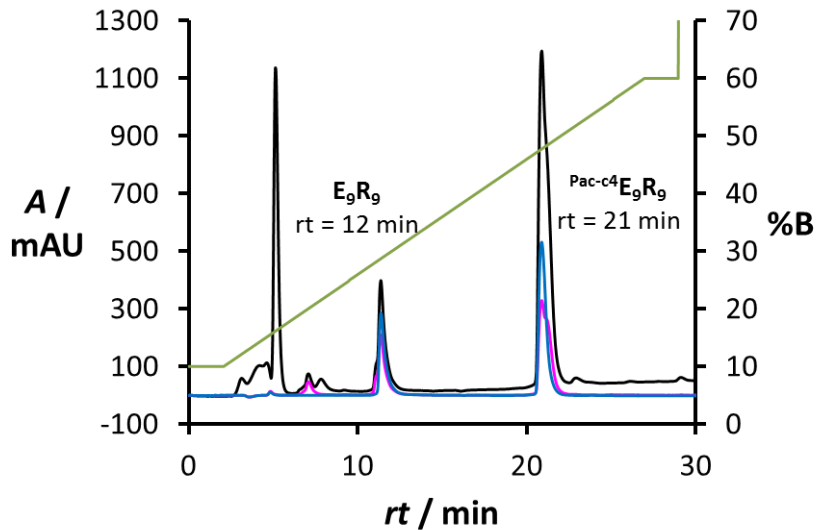


Abbildung 6.4: RP-HPLC Chromatogramm der ausgefällten Reaktionsmischung nach der Modifikation des Peptides E_9R_9 mit Verbindung **36**. In grün ist der verwendete Lösungsmittelgradient dargestellt (A: 5% Acetonitril, 0,1% TFA in Wasser; B: 5% Wasser, 0,1% TFA in Acetonitril). Detektiert wurde die Absorption bei 3 verschiedenen Wellenlängen A_{220} (schwarz), A_{280} (pink) und A_{355} (blau). Nach 12 min eluiert das unmodifizierte Peptid, während das gewünschte Konjugat eine Retentionszeit von 21 min aufweist. Durch Integration der beiden Peaks bei 355 nm konnte die Ausbeute der Reaktion auf 70 % bestimmt werden.

6.4 Peptidreinigung und -charakterisierung

Die erhaltenen Peptide wurden anschließend über RP-HPLC gereinigt. Diese wurde an einem ÄKTApurifier® (GE Healthcare) unter Verwendung von 250/4 oder 250/10 Nucleosil® 100-5 C18-Säulen (Macherey-Nagel) und einer Flussrate von 1 mL/min bzw. 4 mL/min durchgeführt. Als Laufmittel wurden 5% Acetonitril (MeCN) und 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser (Eluent A) sowie 5% Wasser und 0,1% TFA in MeCN (Eluent B) verwendet, wobei der verwendete Gradient an das jeweilige Trennproblem angepasst wurde.

Tabelle 6.1: Parameter der Reinigung der Peptide per RP-HPLC, sowie deren Charakterisierung per ESI-MS (bzw. MALDI-TOF-MS für das Peptid ^{fl}E₉R₉).

Peptid	m/z _{obs.}	m/z _{calc.}	RP-HPLC Retentionszeit	RP-HPLC Gradient
^{Ac} E ₆ R ₉	2490,2	2490,3 [M+H] ⁺	28 min	10-32% B in 50 min
^{Ac} E ₉ R ₉	2877,0	2877,4 [M+H] ⁺	13 min	15-35% B in 25 min
^{fl} E ₆ R ₉	1014,3	1014,5 [M+3H] ³⁺	20 min	28-48% B in 30 min
^{fl} E ₈ R ₈	1048,8	1048,5 [M+3H] ³⁺	24 min	20-50% B in 30 min
^{fl} E ₉ R ₉	1714,2	1714,8 [M+2H] ²⁺	26 min	20-50% B in 35 min
^{FU-c4} E ₆ R ₉	2690,2	2690,3 [M+H] ⁺	14 min	15-40% B in 30 min
^{FU-c4} E ₉ R ₉	1539,9	1539,3 [M+2H] ²⁺	23 min	15-25% B in 35 min
^{FU-c6} E ₆ R ₉	2718,8	2718,4 [M+H] ⁺	18 min	15-33% B in 30 min
^{FU-c6} E ₉ R ₉	1553,2	1553,3 [M+2H] ²⁺	16 min	15-30% B in 25 min
^{FU-c4} Glu	411,0	411,1 [M+Na] ⁺	12 min	0-20% B in 25 min
^{FU-c4} Pro	379,0	379,1 [M+Na] ⁺	17 min	0-20% B in 25 min
^{FU-c6} Glu	439,1	439,1 [M+Na] ⁺	18 min	0-20% B in 25 min
E ₉ R ₉	1418,3	1418,2 [M+2H] ²⁺	11 min	15-30% B in 30 min
^{Pac-c4} E ₉ R ₉	1885,7	1885,9 [M+2H] ²⁺	21 min	10-60% B in 25 min
^{Pac-c5} E ₉ R ₉	1892,8	1892,9 [M+2H] ²⁺	31 min	20-40% B in 32 min

6.5 Zellkultur und -handhabung

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem wassergesättigten Inkubator bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Medium wurde *Dulbecco's Modified Essential Medium* (DMEM) verwendet, welches mit 100 µL/mL fötalem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) und Antibiotika (100 Einheiten/mL Penicillin; 100 µg/mL Streptomycin) ergänzt wurde.

Für die **Durchflusszytometrie** wurden pro Well 20.000 Zellen in 1 mL DMEM in 6-Well-Platten ausgelegt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 30 Minuten mit

den fluoreszenzmarkierten Peptiden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3-mal mit ~1 mL PBS gewaschen, durch Trypsinverdau vom Substrat abgelöst und in CO₂-unabhängigem Medium resuspendiert.

Für die **Konfokale Mikroskopie** wurden 24 h vor Gebrauch 40.000 Zellen in 2 mL Medium in einer Mikroskopierschale (μ -Dish^{35mm, high} oder μ -Dish^{35mm, high, Grid-500}; ibidi GmbH) ausgelegt. Vor der Analyse wurde DMEM gegen CO₂-unabhängiges Medium ausgetauscht, welches ebenfalls mit 100 μ L/mL FBS und Antibiotika (100 Einheiten/mL Penicillin; 100 μ g/mL Streptomycin) ergänzt wurde und die entsprechenden Peptide in einer Konzentration von 1 μ M oder 3 μ M enthielt.

Für den **AlamarBlue®-Toxizitätstest** wurden pro Well 100 μ L einer Zelllösung (5.000 bis 20.000 Zellen/mL) in einer 96-Well-Platte ausgelegt. Nach 24 h wurden die Zellen mit der jeweiligen Verbindung für unterschiedliche Zeiträume inkubiert, bevor die Viabilität bestimmt wurde. Das dazu verwendete Medium wurde entweder mit 10% der kommerziell erhältlichen AlamarBlue®-Lösung (Invitrogen) oder mit 10% einer Resazurin-Lösung (1,25 mg/mL) versetzt, wobei die Ergebnisse, wie in der Literatur beschrieben^[112], vergleichbar waren. Die Zellen wurden 40 Minuten mit diesem Medium inkubiert, bevor die Fluoreszenz des gebildeten Resorfurins an einem *infinite*[®]200 *plate reader* (Tecan), der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Hartig an der Universität Konstanz, ausgelesen wurde. Das Resorfurin wurde dabei in einem Bereich von 535 - 545 nm angeregt und die Fluoreszenz zwischen 580 nm und 600 nm detektiert.

Literaturverzeichnis Teil I

- [1] B. Alberts; A. Johnson; J. Lewis, in *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Science, New York, **2002**.
- [2] T. M. Allen; P. R. Cullis, *Drug delivery systems: entering the mainstream*, *Sci*, **2004**, *303*, 1818-1822.
- [3] D. M. Copolovici; K. Langel; E. Eriste; U. Langel, *Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications*, *ACS Nano*, **2014**, *8*, 1972-1994.
- [4] A. D. Frankel; C. O. Pabo, *Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus*, *Cell*, **1988**, *55*, 1189-1193.
- [5] D. Derossi; A. H. Joliot; G. Chassaing; A. Prochiantz, *The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 10444-10450.
- [6] C. Bechara; S. Sagan, *Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?*, *FEBS Lett*, **2013**, *587*, 1693-1702.
- [7] S. Pujals; E. Giralt, *Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 473-484.
- [8] S. Futaki; T. Suzuki; W. Ohashi; T. Yagami; S. Tanaka; K. Ueda; Y. Sugiura, *Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery*, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 5836-5840.
- [9] M. Pooga; M. Hallbrink; M. Zorko; U. Langel, *Cell penetration by transportan*, *FASEB J.*, **1998**, *12*, 67-77.
- [10] I. Martín; M. Teixidó; E. Giralt *Design, Synthesis and Characterization of a New Anionic Cell-Penetrating Peptide: SAP(E)*, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 896-903.
- [11] I. D. Alves; A. Walrant; C. Bechara; S. Sagan, *Is there anybody in there? On the mechanisms of wall crossing of cell penetrating peptides*, *Curr. Protein Peptide Sci.*, **2012**, *13*, 658-671.
- [12] R. Brock, *The Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Putting the Puzzle Together*, *Bioconjug. Chem.*, **2014**.
- [13] F. Madani; S. Lindberg; U. Langel; S. Futaki; A. Graslund, *Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides*, *J. Biophys.*, **2011**, *2011*, 414729.
- [14] F. Duchardt; M. Fotin-Mleczek; H. Schwarz; R. Fischer; R. Brock, *A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides*, *Traffic*, **2007**, *8*, 848-866.

- [15] M. Hallbrink; J. Oehlke; G. Papsdorf; M. Bienert, *Uptake of cell-penetrating peptides is dependent on peptide-to-cell ratio rather than on peptide concentration*, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, 1667, 222-228.
- [16] J. R. Maiolo; M. Ferrer; E. A. Ottinger, *Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, 1712, 161-172.
- [17] E. Koren; V. P. Torchilin, *Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side*, *Trends Mol. Med.*, **2012**, 18, 385-393.
- [18] C. Rousselle; P. Clair; J. M. Lefauconnier; M. Kaczorek; J. M. Scherrmann; J. Temsamani, *New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy*, *Mol. Pharmacol.*, **2000**, 57, 679-686.
- [19] M. Silhol; M. Tyagi; M. Giacca; B. Lebleu; E. Vivès, *Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat*, *Eur. J. Biochem.*, **2002**, 269, 494-501.
- [20] T. Lehto; K. Kurrikoff; U. Langel, *Cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids*, *Expert opinion on drug delivery*, **2012**, 9, 823-836.
- [21] B. R. Liu; J. S. Liou; Y. J. Chen; Y. W. Huang; H. J. Lee, *Delivery of nucleic acids, proteins, and nanoparticles by arginine-rich cell-penetrating peptides in rotifers*, *Mar. Biotechnol. (NY)*, **2013**, 15, 584-595.
- [22] L. Yan; H. Wang; Y. Jiang; J. Liu; Z. Wang; Y. Yang; S. Huang; Y. Huang, *Cell-penetrating peptide-modified PLGA nanoparticles for enhanced nose-to-brain macromolecular delivery*, *Macromol. Res.*, **2013**, 21, 435-441.
- [23] D. Peer; J. M. Karp; S. Hong; O. C. Farokhzad; R. Margalit; R. Langer, *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*, *Nat. Nano.*, **2007**, 2, 751-760.
- [24] G. Poste; R. Kirsh, *Site-Specific (Targeted) Drug Delivery in Cancer Therapy*, *Nat. Biotech.*, **1983**, 1, 869-878.
- [25] W. Arap; R. Pasqualini; E. Ruoslahti, *Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model*, *Sci*, **1998**, 279, 377-380.
- [26] R. L. Bartlett, 2nd; S. Sharma; A. Panitch, *Cell-penetrating peptides released from thermosensitive nanoparticles suppress pro-inflammatory cytokine response by specifically targeting inflamed cartilage explants*, *Nanomedicine*, **2013**, 9, 419-427.
- [27] E. Jin; B. Zhang; X. Sun; Z. Zhou; X. Ma; Q. Sun; J. Tang; Y. Shen; E. Van Kirk; W. J. Murdoch; M. Radosz, *Acid-active cell-penetrating peptides for in vivo tumor-targeted drug delivery*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 933-940.
- [28] Y. Shamay; L. Adar; G. Ashkenasy; A. David, *Light induced drug delivery into cancer cells*, *Biomaterials*, **2011**, 32, 1377-1386.
- [29] S. M. Fuchs; R. T. Raines, *Pathway for polyarginine entry into mammalian cells*, *Biochem. J.*, **2004**, 43, 2438-2444.

- [30] M. Mano; C. Teodosio; A. Paiva; S. Simoes; M. C. Pedroso de Lima, *On the mechanisms of the internalization of S4(13)-PV cell-penetrating peptide*, *Biochem. J.*, **2005**, 390, 603-612.
- [31] T. Jiang; E. S. Olson; Q. T. Nguyen; M. Roy; P. A. Jennings; R. Y. Tsien, *Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**, 101, 17867-17872.
- [32] M. Whitney; E. N. Savariar; B. Friedman; R. A. Levin; J. L. Crisp; H. L. Glasgow; R. Lefkowitz; S. R. Adams; P. Steinbach; N. Nashi; Q. T. Nguyen; R. Y. Tsien, *Ratiometric Activatable Cell-Penetrating Peptides Provide Rapid In Vivo Readout of Thrombin Activation*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 325-330.
- [33] R. Weinstein; E. N. Savariar; C. N. Felsen; R. Y. Tsien, *In vivo targeting of hydrogen peroxide by activatable cell-penetrating peptides*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 874-877.
- [34] C. Chang; Z. Werb, *The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis*, *Trends Cell Biol.*, **2001**, 11, Supplement 1, S37-S43.
- [35] E. S. Olson; T. A. Aguilera; T. Jiang; L. G. Ellies; Q. T. Nguyen; E. H. Wong; L. A. Gross; R. Y. Tsien, *In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer*, *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, **2009**, 1, 382-393.
- [36] Q. T. Nguyen; E. S. Olson; T. A. Aguilera; T. Jiang; M. Scadeng; L. G. Ellies; R. Y. Tsien, *Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2010**, 107, 4317-4322.
- [37] A. A. Beharry; G. A. Woolley, *Azobenzene photoswitches for biomolecules*, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 4422-4437.
- [38] G. C. Ellis-Davies, *Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology*, *Nat. Meth.*, **2007**, 4, 619-628.
- [39] P. Klan; T. Solomek; C. G. Bochet; A. Blanc; R. Givens; M. Rubina; V. Popik; A. Kostikov; J. Wirz, *Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: reaction mechanisms and efficacy*, *Chem. Rev.*, **2013**, 113, 119-191.
- [40] S. Bühler; I. Lagoja; H. Giegrich; K.-P. Stengele; W. Pfeleiderer, *New Types of Very Efficient Photolabile Protecting Groups Based upon the [2-(2-Nitrophenyl)propoxy]carbonyl (NPPOC) Moiety*, *Helv. Chim. Acta*, **2004**, 87, 620-659.
- [41] W. Szymanski; J. M. Beierle; H. A. Kistemaker; W. A. Velema; B. L. Feringa, *Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches*, *Chem. Rev.*, **2013**, 113, 6114-6178.
- [42] X. Liang; T. Yoshida; H. Asanuma; M. Komiyama, *Photo-regulation of DNA/RNA duplex formation by azobenzene-tethered DNA towards antisense strategy*, *Nucleic acids symposium series*, **2000**, 277-278.

- [43] J. R. Kumita; O. S. Smart; G. A. Woolley, *Photo-control of helix content in a short peptide*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2000**, 97, 3803-3808.
- [44] M. Banghart; K. Borges; E. Isacoff; D. Trauner; R. H. Kramer, *Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing*, Nat. Neurosci., **2004**, 7, 1381-1386.
- [45] E. H. G. Backus; J. M. Kuiper; J. B. F. N. Engberts; B. Poolman; M. Bonn, *Reversible Optical Control of Monolayers on Water through Photoswitchable Lipids*, J. Phys. Chem. B, **2011**, 115, 2294-2302.
- [46] O. Srinivas; N. Mitra; A. Surolia; N. Jayaraman, *Photoswitchable cluster glycosides as tools to probe carbohydrate–protein interactions: synthesis and lectin-binding studies of azobenzene containing multivalent sugar ligands*, Glycobiology, **2005**, 15, 861-873.
- [47] A. Noble, *III. Zur Geschichte des Azobenzols und des Benzidins*, Liebigs Ann. Chem., **1856**, 98, 253-256.
- [48] G. S. Hartley, *The cis-form of azobenzene*, Nature, **1937**, 140, 281-281.
- [49] H. Fliegl; A. Kohn; C. Hattig; R. Ahlrichs, *Ab initio calculation of the vibrational and electronic spectra of trans- and cis-azobenzene*, J. Am. Chem. Soc., **2003**, 125, 9821-9827.
- [50] G. S. Hartley, *The cis-form of azobenzene and the velocity of the thermal cis→trans-conversion of azobenzene and some derivatives*, J. Chem. Soc., **1938**, 633-642.
- [51] D. Schulte-Frohlinde, *Über die Thermische und Katalytische cis → trans-Umlagerung Substituierter Azobenzole*, Liebigs Ann. Chem., **1958**, 612, 138-152.
- [52] E. R. Talaty; J. C. Fargo, *Thermal cis-trans-isomerization of substituted azobenzenes: a correction of the literature*, Chem. Commun., **1967**, 65-66.
- [53] H. M. Bandara; T. R. Friss; M. M. Enriquez; W. Isley; C. Incarvito; H. A. Frank; J. Gascon; S. C. Burdette, *Proof for the concerted inversion mechanism in the trans→cis isomerization of azobenzene using hydrogen bonding to induce isomer locking*, J. Org. Chem., **2010**, 75, 4817-4827.
- [54] J. Garcia-Amoros; D. Velasco, *Recent advances towards azobenzene-based light-driven real-time information-transmitting materials*, J. Org. Chem., **2012**, 8, 1003-1017.
- [55] D. Bléger; J. Schwarz; A. M. Brouwer; S. Hecht, *o-Fluoroazobenzenes as Readily Synthesized Photoswitches Offering Nearly Quantitative Two-Way Isomerization with Visible Light*, J. Am. Chem. Soc., **2012**, 134, 20597-20600.
- [56] M. R. Han; D. Hashizume; M. Hara, *Self-assembly of long-lived cis-azobenzenes into crystalline nanoparticles*, New J. Chem., **2007**, 31, 1746-1750.
- [57] L. Chi; O. Sadovskii; G. A. Woolley, *A Blue-Green Absorbing Cross-Linker for Rapid Photoswitching of Peptide Helix Content*, Bioconjug. Chem., **2006**, 17, 670-676.

- [58] J. Garcia-Amorós; M. Díaz-Lobo; S. Nonell; D. Velasco, *Fastest Thermal Isomerization of an Azobenzene for Nanosecond Photoswitching Applications under Physiological Conditions*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 12820-12823.
- [59] U. Kusebauch; S. A. Cadamuro; H. J. Musiol; M. O. Lenz; J. Wachtveitl; L. Moroder; C. Renner, *Photocontrolled folding and unfolding of a collagen triple helix*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 7015-7018.
- [60] R. F. Standaert; S. B. Park, *Abc amino acids: design, synthesis, and properties of new photoelastic amino acids*, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 7952-7966.
- [61] J. Yoshino; N. Kano; T. Kawashima, *Synthesis of the most intensely fluorescent azobenzene by utilizing the B-N interaction*, *Chem. Commun.*, **2007**, 559-561.
- [62] R. Siewertsen; H. Neumann; B. Buchheim-Stehn; R. Herges; C. Näther; F. Renth; F. Temps, *Highly Efficient Reversible Z-E Photoisomerization of a Bridged Azobenzene with Visible Light through Resolved S1(nπ*) Absorption Bands*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 15594-15595.
- [63] K. Boonen; J. W. Creemers; L. Schoofs, *Bioactive peptides, networks and systems biology*, *Bioessays*, **2009**, *31*, 300-314.
- [64] G. A. Woolley, *Photocontrolling peptide alpha helices*, *Acc. Chem. Res.*, **2005**, *38*, 486-493.
- [65] S. L. Dong; M. Loweneck; T. E. Schrader; W. J. Schreier; W. Zinth; L. Moroder; C. Renner, *A photocontrolled beta-hairpin peptide*, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 1114-1120.
- [66] C. Renner; L. Moroder, *Azobenzene as conformational switch in model peptides*, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 868-878.
- [67] O. Sadvski; A. A. Beharry; F. Zhang; G. A. Woolley, *Spectral tuning of azobenzene photoswitches for biological applications*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 1484-1486.
- [68] M. Arruebo; R. Fernández-Pacheco; M. R. Ibarra; J. Santamaría, *Magnetic nanoparticles for drug delivery*, *Nano today*, **2007**, *2*, 22-32.
- [69] Z. Luo; K. Cai; Y. Hu; L. Zhao; P. Liu; L. Duan; W. Yang, *Mesoporous Silica Nanoparticles End-Capped with Collagen: Redox-Responsive Nanoreservoirs for Targeted Drug Delivery*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 640-643.
- [70] D. Schmaljohann, *Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2006**, *58*, 1655-1670.
- [71] T. L. Andresen; D. H. Thompson; T. Kaasgaard, *Enzyme-triggered nanomedicine: Drug release strategies in cancer therapy (Invited Review)*, *Mol. Membr. Biol.*, **2010**, *27*, 353-363.
- [72] F. M. Menger; M. J. Rourk, *Synthesis and Reactivity of 5-Fluorouracil/Cytarabine Mutual Prodrugs*, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 9083-9088.

- [73] T. B. Cai; X. Tang; J. Nagorski; P. G. Brauschweiger; P. G. Wang, *Synthesis and cytotoxicity of 5-fluorouracil/diazoniumdiolate conjugates*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 4971-4975.
- [74] F. Dosio; P. Brusa; P. Crosasso; S. Arpicco; L. Cattel, *Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel–albumin conjugate*, *J. Controlled Release*, **1997**, *47*, 293-304.
- [75] A. Régina; M. Demeule; C. Ché; I. Lavallée; J. Poirier; R. Gabathuler; R. Béliveau; J. P. Castaigne, *Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2*, *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, *155*, 185-197.
- [76] C. Heidelberger; N. K. Chaudhuri; P. Danneberg; D. Mooren; L. Griesbach; R. Duschinsky; R. J. Schnitzer; E. Plevin; J. Scheiner, *Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds*, *Nature*, **1957**, *179*, 663-666.
- [77] M. C. Wani; H. L. Taylor; M. E. Wall; P. Coggon; A. T. McPhail, *Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2325-2327.
- [78] R. B. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.
- [79] E. Atherton; C. J. Logan; R. C. Sheppard, *Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using N[small alpha]-fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1981**, 538-546.
- [80] A. El-Faham; F. Albericio, *Peptide coupling reagents, more than a letter soup*, *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 6557-6602.
- [81] J. C. Sheehan; G. P. Hess, *A new method of forming peptide bonds*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 1067-1068.
- [82] V. Dourtoglou; J.-C. Ziegler; B. Gross, *L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N, N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace*, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *19*, 1269-1272.
- [83] L. A. Carpino, *1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 4397-4398.
- [84] W. König; R. Geiger, *Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen*, *Chem. Ber.*, **1970**, *103*, 788-798.
- [85] E. Merino, *Synthesis of azobenzenes: the coloured pieces of molecular materials*, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 3835-3853.
- [86] G. W. Wheland, *A Quantum Mechanical Investigation of the Orientation of Substituents in Aromatic Molecules*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1942**, *64*, 900-908.

- [87] C. Galli, *Radical reactions of arenediazonium ions: an easy entry into the chemistry of the aryl radical*, Chem. Rev., **1988**, 88, 765-792.
- [88] A. Roglans; A. Pla-Quintana; M. Moreno-Mañas, *Diazonium salts as substrates in palladium-catalyzed cross-coupling reactions*, Chem. Rev., **2006**, 106, 4622-4643.
- [89] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: eine Einführung*, John Wiley & Sons, **2013**.
- [90] A. Bax; D. G. Davis, *MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy* J. Magn. Reson., **1985**, 65, 355-360.
- [91] A. E. Derome; M. P. Williamson, *Rapid-pulsing artifacts in double-quantum-filtered COSY*, J. Magn. Reson., **1990**, 88, 177-185.
- [92] J. Jeener; B. H. Meier; P. Bachmann; R. R. Ernst, *Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy*, J. Chem. Phys., **1979**, 71, 4546-4553.
- [93] A. G. Palmer; J. Cavanagh; P. E. Wright; M. Rance, *Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy*, J. Magn. Reson., **1991**, 93, 151-170.
- [94] A. Bax; M. F. Summers, *Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR*, J. Am. Chem. Soc., **1986**, 108, 2093-2094.
- [95] G. Cox, *Optical imaging techniques in cell biology*, CRC Press, **2012**.
- [96] D. M. Shotton, *Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens*, J. Cell Sci., **1989**, 94, 175-206.
- [97] Zeiss, *Broschüren und Produktinformation - 'LSM 780 - Mehr Einblick. Mehr Erkenntnis'*, **2009**.
- [98] E. Abbe, *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*, Archiv für mikroskopische Anatomie, **1873**, 9, 413-418.
- [99] T. A. Klar; S. W. Hell, *Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy*, Opt. Lett., **1999**, 24, 954-956.
- [100] E. Betzig; G. H. Patterson; R. Sougrat; O. W. Lindwasser; S. Olenych; J. S. Bonifacino; M. W. Davidson; J. Lippincott-Schwartz; H. F. Hess, *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*, Sci, **2006**, 313, 1642-1645.
- [101] M. J. Rust; M. Bates; X. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*, Nat. Meth., **2006**, 3, 793-796.
- [102] T. K. Meyvis; S. C. De Smedt; P. Van Oostveldt; J. Demeester, *Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research*, Pharm. Res., **1999**, 16, 1153-1162.

- [103] W. Dittrich; W. Gohde, *Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium*, **1973**.
- [104] FabianK, *Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers, hier mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und vier Fluoreszenzkanälen*, **2012**, <https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Duchflusszytometer.png>, 18.08.2015.
- [105] M. J. Fulwyler, *Electronic separation of biological cells by volume*, *Sci*, **1965**, *150*, 910-911.
- [106] P. Bourdeau, *Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects*, Wiley, Chichester; New York, **1990**.
- [107] T. T. Puck; P. I. Marcus, *Action Of X-Rays On Mammalian Cells*, *J. Exp. Med.*, **1956**, *103*, 653-666.
- [108] N. A. P. Franken; H. M. Rodermond; J. Stap; J. Haveman; C. van Bree, *Clonogenic assay of cells in vitro*, *Nat. Prot.*, **2006**, *1*, 2315-2319.
- [109] E. Borenfreund; J. A. Puerner, *A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)*, *J. Tissue Cult. Methods*, **1985**, *9*, 7-9.
- [110] W. Strober, *Trypan blue exclusion test of cell viability*, *Curr. Protoc. Immunol.*, **2001**.
- [111] B. Page; M. Page; C. Noel, *A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro*, *Int. J. Oncol.*, **1993**, *3*, 473-476.
- [112] J. O'Brien; I. Wilson; T. Orton; F. Pognan, *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*, 5421-5426.
- [113] M. M. Heravi; N. Abdolhosseini; H. A. Oskooie, *Regioselective and high-yielding bromination of aromatic compounds using hexamethylenetetramine–bromine*, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 8959-8963.
- [114] T. Schareina; A. Zapf; M. Beller, *An environmentally benign procedure for the Cu-catalyzed cyanation of aryl bromides*, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 2585-2588.
- [115] N. Roy; S. Sproules; E. Bill; T. Weyhermuller; K. Wieghardt, *Molecular and electronic structure of the square planar bis(o-amidobenzenethiolato)iron(III) anion and its bis(o-quinoxalinedithiolato)iron(III) analogue*, *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 10911-10920.
- [116] F. J. Carver; C. A. Hunter; D. J. Livingstone; J. F. McCabe; E. M. Seward, *Substituent Effects on Edge-to-Face Aromatic Interactions*, *Chem. Eur. J.*, **2002**, *8*, 2847-2859.
- [117] A. V. Malkov; M. Figlus; M. R. Prestly; G. Rabani; G. Cooke; P. Kočovský, *Soluble Polymer-Supported Organocatalysts: Asymmetric Reduction of Imines with Trichlorosilane Catalyzed by an Amino Acid Derived Formamide Anchored to a Soluble Polymer*, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 9651-9654.
- [118] D. Scheerer, *Photoschaltbare Proteindimerisierung mit einem thermostabilen, polyionischen Peptidtag*, Bachelor's thesis, Universität Konstanz **2013**.

- [119] H. Rink, *Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin*, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3787-3790.
- [120] T. Nguyen; M. B. Francis, *Practical Synthetic Route to Functionalized Rhodamine Dyes*, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 3245-3248.
- [121] A. A. Beharry; L. Wong; V. Tropepe; G. A. Woolley, *Fluorescence imaging of azobenzene photoswitching in vivo*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 1325-1327.
- [122] P. Johnston; F. Geoffrey; J. Drake; D. Voeller; J. Grem; C. Allegra, *The cellular interaction of 5-fluorouracil and cisplatin in a human colon carcinoma cell line*, *Eur. J. Cancer*, **1996**, 32, 2148-2154.
- [123] J. Liebmann; J. Cook; C. Lipschultz; D. Teague; J. Fisher; J. Mitchell, *Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines*, *Br. J. Cancer*, **1993**, 68, 1104.
- [124] S. Isomura; P. Wirsching; K. D. Janda, *An immunotherapeutic program for the treatment of nicotine addiction: hapten design and synthesis*, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 4115-4121.
- [125] M. Keller; S. Teng; G. Bernhardt; A. Buschauer, *Bivalent Argininamide-Type Neuropeptide Y Y1 Antagonists Do Not Support the Hypothesis of Receptor Dimerisation*, *ChemMedChem*, **2009**, 4, 1733-1745.
- [126] C. Ryppa; H. Mann-Steinberg; M. L. Biniössek; R. Satchi-Fainaro; F. Kratz, *In vitro and in vivo evaluation of a paclitaxel conjugate with the divalent peptide E-[c (RGDFK) 2] that targets integrin $\alpha v \beta 3$* , *Int. J. Pharm.*, **2009**, 368, 89-97.
- [127] A. Sorkin; M. von Zastrow, *Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2002**, 3, 600-614.
- [128] K. Maier; E. Wagner, *Acid-labile traceless click linker for protein transduction*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 10169-10173.
- [129] X. Cai; C. Dong; H. Dong; G. Wang; G. M. Pauletti; X. Pan; H. Wen; I. Mehl; Y. Li; D. Shi, *Effective gene delivery using stimulus-responsive cationomer designed with redox-sensitive disulfide and acid-labile imine linkers*, *Biomacromolecules*, **2012**, 13, 1024-1034.
- [130] S. Samanta; C. Qin; A. J. Lough; G. A. Woolley, *Bidirectional photocontrol of peptide conformation with a bridged azobenzene derivative*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 6452-6455.
- [131] M. Böckmann; N. L. Doltsinis; D. Marx, *Unraveling a chemically enhanced photoswitch: bridged azobenzene*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 3382-3384.
- [132] C. A. Schneider; W. S. Rasband; K. W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*, *Nat. Meth.*, **2012**, 9, 671-675.
- [133] Y. Morishima; M. Tsuji; M. Seki; M. Kamachi, *Synthesis, NMR relaxation, and photoisomerization of amphiphilic polyelectrolytes covalently tethered with azobenzene moieties having bulky hydrophobic substituents*, *Macromolecules*, **1993**, 26, 3299-3305.

- [134] A. R. English; D. Girard; V. J. Jasys; R. J. Martingano; M. S. Kellogg, *Orally effective acid prodrugs of the beta.-lactamase inhibitor sulbactam*, J. Med. Chem., **1990**, 33, 344-347.
- [135] H. Deutsch; J. Glinski; M. Hernandez; R. Haugwitz; V. Narayanan; M. Suffness; L. H. Zalkow, *Synthesis of congeners and prodrugs. 3. Water-soluble prodrugs of taxol with potent antitumor activity*, J. Med. Chem., **1989**, 32, 788-792.
- [136] F. Dosio; P. Brusa; P. Crosasso; S. Arpicco; L. Cattel, *Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel-albumin conjugate*, J. Controlled Release, **1997**, 47, 293-304.
- [137] S. K. Shannon; G. Barany, *4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)phenylhydrazine (FmPH): a new chromophoric reagent for quantitative monitoring of solid-phase aldehydes(1-3)*, J. Org. Chem., **2004**, 69, 4586-4594.
- [138] E. Kaiser; R. L. Colescott; C. D. Bossinger; P. I. Cook, *Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides*, Anal. Biochem, **1970**, 34, 595-598.

Teil II: Struktur, Dynamik und Funktion der LIM2/3

Tandem-Domäne des Proteins Paxillin

1. Einleitung

1.1 Zellmigration und Fokale Adhäsionen

Die gerichtete und koordinierte Bewegung von Zellen und Zellverbänden ist ein elementarer Prozess in verschiedenen Lebensstadien eines Organismus. Sie spielt dabei bei vielen physiologischen Vorgängen wie der Embryogenese, der Entwicklung des neuronalen Netzwerks, bei Entzündungsprozessen oder der Gewebereparatur eine zentrale Rolle.^[139]

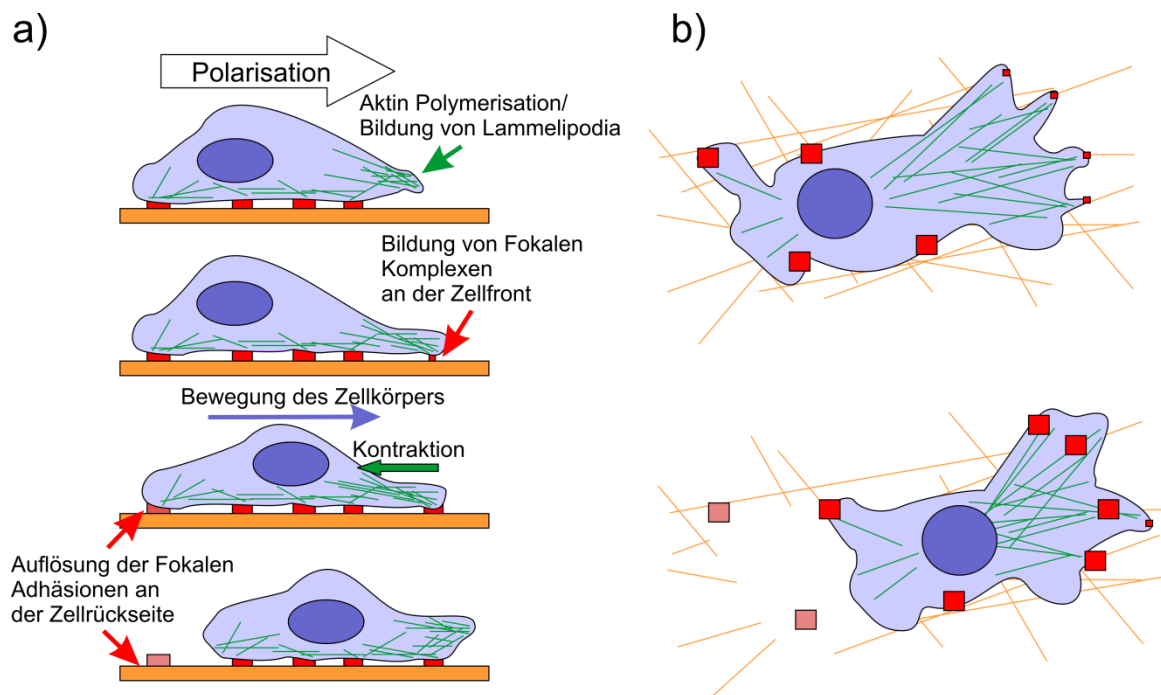


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der zweidimensionalen, mesenchymalen Zellmigration im Querschnitt (a) und als Aufsicht auf eine Zelle (b). Orange ist jeweils die Extrazelluläre Matrix dargestellt, grün das Aktinzytoskelett und rot die Fokalen Komplexe/Adhäsionen.

Jedoch sind auch viele pathologische Prozesse eng mit einer veränderten Zellmotilität verknüpft, wobei eine erhöhte Beweglichkeit vor allem für die Entwicklung und Metastasierung von Tumoren charakteristisch ist.^[140] Ein detailliertes Verständnis der Zellbewegung und der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen ist daher von großem Interesse und in den letzten Jahrzehnten wurden bedeutende Fortschritte bei deren Aufklärung erzielt.^[139-144] Essenziell für die Bewegung sind drei grundlegende Prozesse: Eine Polarisation der Zelle entlang der Bewegungsrichtung, die Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts sowie der Auf- und Umbau von Kontakten zur Umgebung der Zelle (Abbildung 1.1).^[145] Die Verbindungspunkte der Zelle mit der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) sind dabei hochkomplexe und dynamische Gebilde, aufgebaut aus einer Vielzahl an Proteinen. Hierbei unterscheidet man meist zwischen den transienten, noch relativ kleinen Fokalen Komplexen ($d < 0,5 \mu\text{m}$) und den daraus durch weitere Proteinanlagerungen entstehenden Fokalen Adhäsionen ($d = 1-5 \mu\text{m}$).^[146] Diese Fokalen Adhäsionen (FA) bilden einerseits einen Angriffspunkt für Kontraktionskräfte, wodurch die oben beschriebene Zellbewegung möglich wird, andererseits stellen sie eine Plattform für die bidirektionale Signalübertragung über die Zellmembran dar.^[147-148] In Abbildung 1.2 ist eine solche Fokale Adhäsion schematisch dargestellt, und die beteiligten Proteine sind aufgelistet.

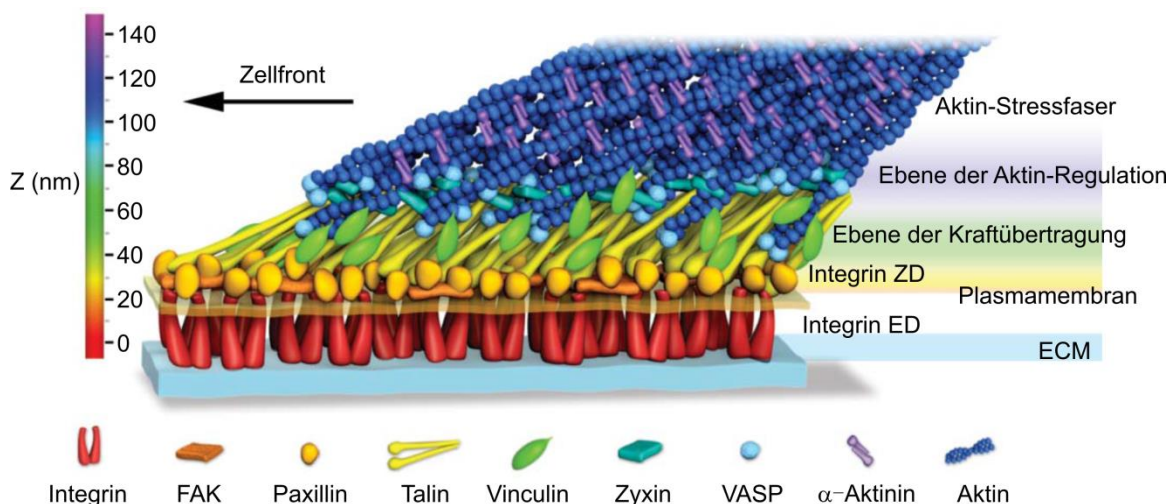


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer Fokalen Adhäsion. Die Positionierung der jeweiligen Proteine entlang der Z-Achse wurde experimentell durch hochauflösende Mikroskopie bestimmt^[149], die Stöchiometrie ist hingegen nur abgeschätzt. (ZD – Zytoplasmatische Domäne; ED – Extrazelluläre Domäne). Abbildung entnommen aus ^[149].

Im Zentrum stehen dabei die Integrine, Transmembranproteine, welche die Vernetzung des Zytoskeletts in der Zelle mit der extrazellulären Matrix bewirken und auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

1.2 Integrine – Zellanker und Signalüberträger

Integrine sind Transmembranrezeptoren, die als heterodimere Komplexe aus einer α - und einer β -Einheit aufgebaut sind. In Säugetieren existieren 18 α -Integrine und 8 β -Integrine, woraus 24 nachgewiesene Kombinationen ausgebildet werden und ein breites Spektrum an Substraten erkannt werden kann.^[150] Beide Sub-Einheiten besitzen große extrazelluläre Domänen (> 600 Aminosäuren) an deren Kontaktflächen Liganden binden und eine umfassende Konformationsänderung auslösen können. Diese Änderungen wirken sich auch auf die Orientierung der beiden Transmembranhelices zueinander aus, wodurch nachgeschaltete Signalkaskaden in der Zelle ausgelöst werden (*outside-in signalling*). Die meist kurzen zytoplasmatischen Domänen (cd) der beiden Einheiten (< 50 Aminosäuren, mit Ausnahme von β 4-Integrin) stellen den Kontakt zum Zellinneren her, indem sie als Andockstelle für verschiedene zytoplasmatische Proteine dienen, an denen wiederum die Fokalen Adhäsionen aufgebaut werden. Dabei kann auch eine intrazelluläre Interaktion eine Separierung der Transmembranhelices und eine darauffolgende Aktivierung der extrazellulären Domänen der Integrine bewirken (*inside-out signalling*).^[151]

Ein prototypisches Protein, das diese Art der Integrinaktivierung bewirkt, ist das FA-assoziierte Talin, welches an die zytoplasmatische Domäne von β 3-Integrin bindet.^[152] Der Mechanismus dieser Interaktion wurde auf molekularer Ebene aufgeklärt^[153] wobei Talin als eines derjenigen Proteine identifiziert wurde, das sehr früh an fokale Komplexe lokalisiert. Ein weiteres Protein, das ähnlich früh an Fokalen Komplexen nachgewiesen wurde ist Paxillin^[146], welches ebenfalls in der untersten Schicht der Adhäsionen in unmittelbarem Kontakt zu den zytoplasmatischen Domänen der Integrine lokalisiert^[149]. In diesem Fall sind jedoch keine molekularen Details bekannt, wie Paxillin an die frühen Fokalen Komplexe rekrutiert wird.

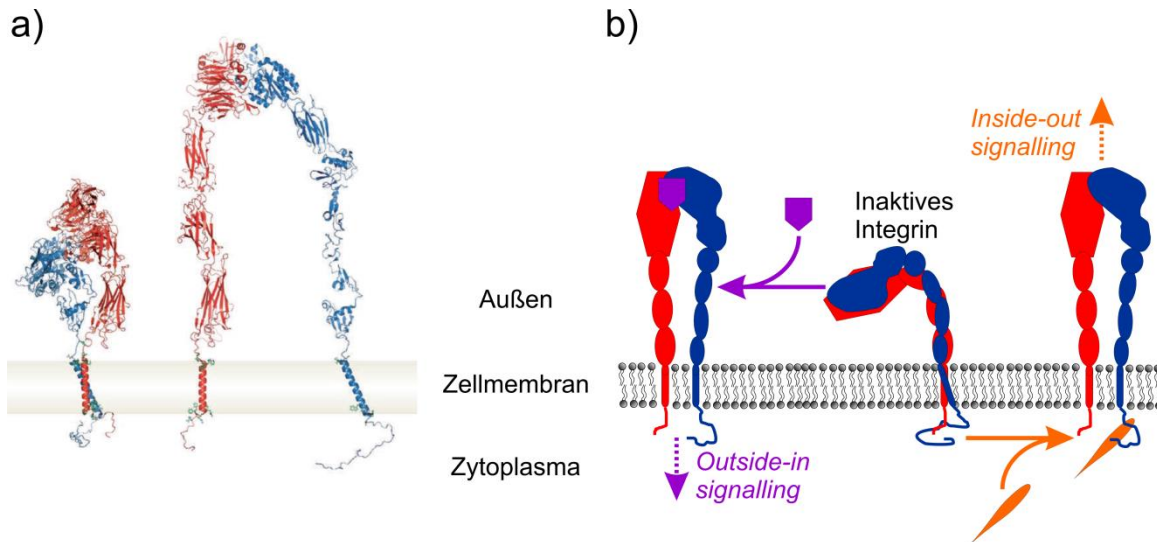


Abbildung 1.3: a) Strukturelles Modell eines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Heterodimers in seiner geschlossenen, inaktiven Form (links) und nach der Aktivierung (rechts). Abbildung entnommen aus ^[154] b) Schematische Darstellung der Integrinaktivierung durch einen extrazellulären Liganden (lila) oder ein zytoplasmatisches Protein (orange). Die α -Untereinheit der Integrine ist jeweils rot dargestellt, die β -Untereinheit blau.

1.3 Paxillin – Mehr als passives Gerüst-Protein

Paxillin ist ein Multidomänen-Protein mit einer Größe von 68 kDa, das exklusiv in Eukaryoten vorkommt und zwischen den Spezies hoch konserviert ist.^[155] Es konnten zwei alternative Splice-Varianten nachgewiesen werden (β , γ), und die Proteinfamilie umschließt noch drei weitere Vertreter: Hic-5, Leupaxin und PaxB (Abbildung 1.4). Die Varianten unterscheiden sich dabei hauptsächlich in den N-terminalen Sequenzen, wobei nicht endgültig geklärt ist, ob und welche Paxillin-Funktionalitäten durch die homologen Proteinen komplementiert werden und wann sie als Antagonisten fungieren.^[156] Eine Deletion von Paxillin in transgenen Mäusen führt zum Tod in einem frühen embryonalen Stadium, was die Bedeutung dieses Proteins bei der Entwicklung demonstriert.^[156] Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Paxillin-Expression in vielen malignen Tumoren hochreguliert ist.^[157-158]

Strukturell lässt sich Paxillin in zwei große Segmente unterteilen: Der N-terminale Bereich besitzt eine Prolin-reiche Sequenz und 5 Leucin- und Asparaginsäure-reiche Motive (LD-Motive) und dient nicht nur als Interaktionsplattform für eine Vielzahl an Proteinen, sondern kann über verschiedene Phosphorylierungsstellen

auch komplex reguliert werden.^[156] Der C-terminale Bereich besteht aus vier LIM-Domänen (LIM = **L**in-11, **I**sl-1, **M**ec-3), über deren Funktion und Interaktionen jedoch bedeutend weniger bekannt ist im Vergleich zum N-terminalen Teil von Paxillin. LIM-Domänen sind jedoch ein weit verbreitetes Motiv, welches hauptsächlich in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist und auf deren genaue Struktur in Abschnitt 1.3.2 näher eingegangen wird.

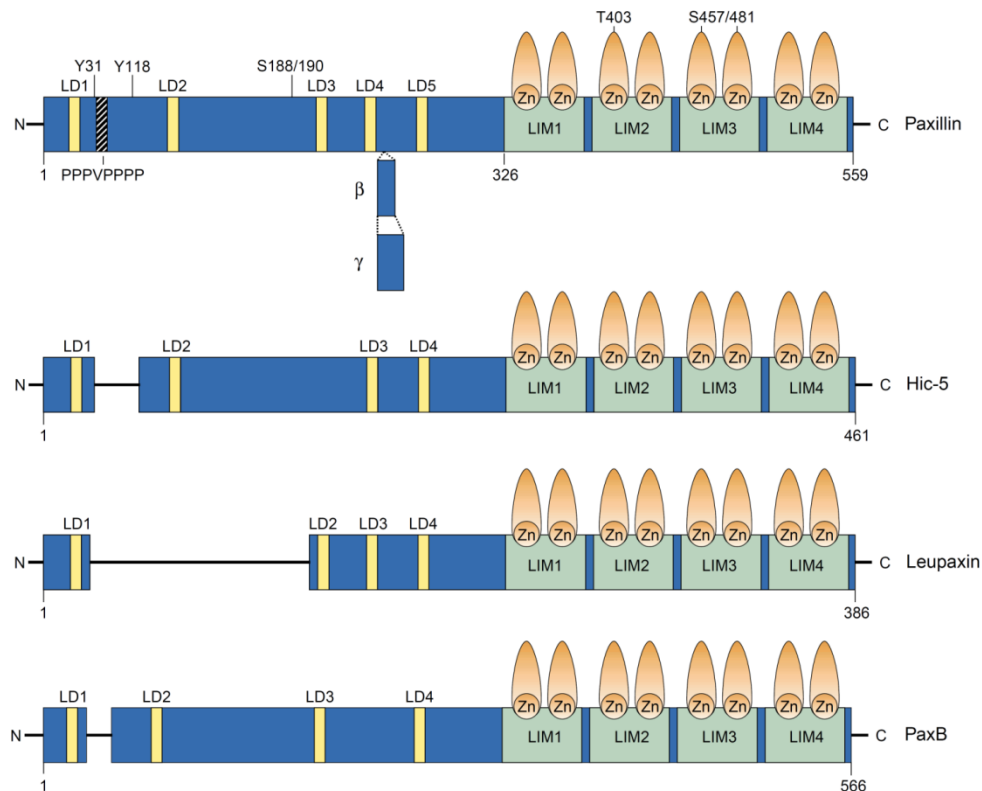


Abbildung 1.4: Domänenstruktur von Paxillin, seinen Splice-Varianten (β , γ) und den weiteren Proteinen der Paxillin-Proteinfamilie. Abbildung entnommen aus ^[156].

1.3.1 Paxillin Interaktionen und deren Regulation

Durch die modulare Aneinanderreihung der verschiedenen Protein-Protein-Interaktionsstellen (LD-Motive und LIM-Domänen) fungiert Paxillin in erster Linie als vielseitiges Adapter-Protein. Dabei werden neben strukturellen Proteinen wie Vinculin^[159] auch eine Vielzahl an regulatorischen Proteinen an die Fokalen Adhäsionen rekrutiert. Zu diesen Proteinen zählen die Proteintyrosin-Kinasen FAK^[159] (Fokale Adhäsions Kinase) und Src^[160], die durch die Adhäsion aktiviert

werden und, unter anderem, auch Reste am N-Terminus von Paxillin phosphorylieren. Auf diese Weise können zusätzliche nachgeschaltete Effektoren gebunden werden, wie zum Beispiel das Adapterprotein Crk^[161], wodurch intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden. Aber auch für negative Regulatoren wie dem Src-Inhibitor CSK (C-terminale Src-Kinase) oder die Phosphotyrosin-Phosphatase(PTP)-Pest konnte eine direkte Interaktion nachgewiesen werden^[162-163], womit Paxillin eine zentrale Rolle bei den über Fokale Adhäsionen vermittelten Signalprozessen zukommt.

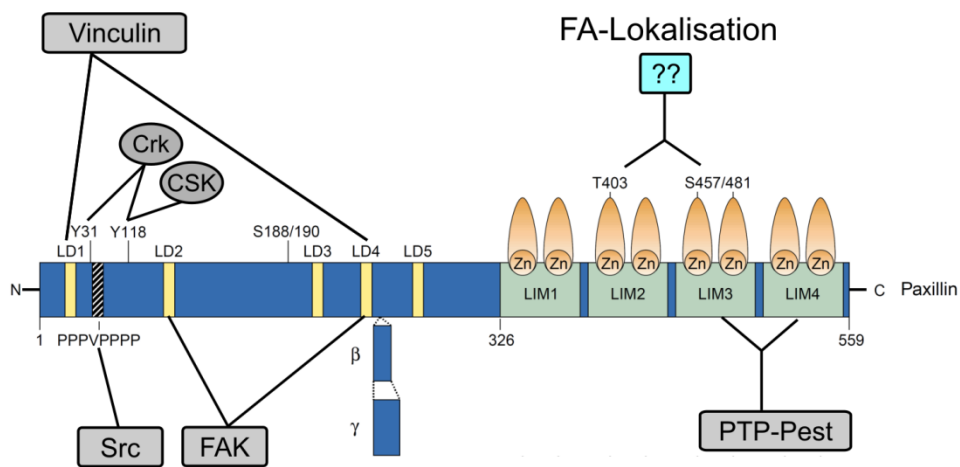


Abbildung 1.5: Überblick über einige zentrale Paxillin-Interaktionspartner und deren Bindestellen. Die phosphorylierbaren Tyrosine (Y), Serine (S) und Threonine (T) sind annotiert. FAK – Fokale Adhäsions Kinase, CSK – C-terminale Src Kinase, PTP - Phosphotyrosin-Phosphatase. Abbildung teilweise entnommen aus ^[156].

Zusätzlich konnte in Deletionsstudien gezeigt werden, dass LIM2 und LIM3 für die Paxillin-Lokalisation an Fokalen Adhäsionen essenziell sind.^[164] Des Weiteren wurden drei putative Phosphorylierungsstellen identifiziert (T403, S457, S481), wodurch eine Möglichkeit zur Regulation der Adhäsionskinetik nahe liegt.^[165] Der Interaktionspartner an der Plasmamembran, der die unmittelbare Lokalisation von Paxillin an neu gebildeten Fokalen Komplexen bewirkt, ist jedoch noch nicht abschließend bekannt. Experimente basierend auf Immunopräzipitation legen eine Interaktion mit den zytoplasmatischen Domänen der β -Integrine nahe^[166-168], jedoch fehlt bisher ein definitiver Nachweis einer direkten Wechselwirkung sowie eine Aufklärung der exakten Bindestellen.

1.3.2 LIM-Domänen

LIM-Domänen sind Tandem-Zinkfinger-Domänen, die aus etwa 55 Aminosäuren aufgebaut sind, wobei die 8 zinkkoordinierenden Reste, meist Cysteine oder Histidine, hochkonserviert sind (Abbildung 1.6).^[169] Der Abstand zwischen den beiden Zinkfingern ist invariant und besteht aus zwei meist hydrophoben Aminosäuren.^[170] Auch die Abstände zwischen den koordinierenden Resten 1 und 2, 3 und 4, 5 und 6 sowie 7 und 8 betragen bis auf wenige Ausnahmen zwei Aminosäuren und sind konformationell daher stark eingeschränkt. Die restlichen Bereiche (zwischen den koordinierenden Resten 2 und 3 sowie 6 und 7) sind hingegen sowohl sequenziell als auch strukturell flexibel und damit hauptsächlich für die Erkennung und Bindung der vielfältigen Substrate verantwortlich, wobei meist Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden.^[169]

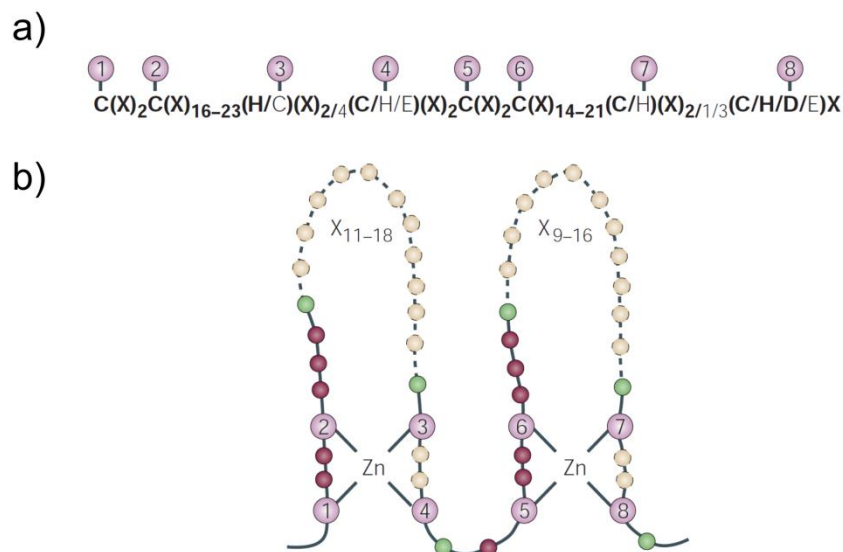


Abbildung 1.6: a) Konsensus-Sequenz einer LIM-Domäne: Die 8 Zinkkoordinierenden Aminosäuren sind mit violetten Kreisen gekennzeichnet. Die nicht fett annotierten Varianten treten in weniger als 10% der Fälle auf. X – beliebige Aminosäure, C – Cystein, H – Histidin, D – Asparaginsäure, E – Glutaminsäure. b) Topologie der LIM-Domänen: Die Zink-koordinierenden Aminosäuren sind mit violetten Kreisen gekennzeichnet. Für die Faltung essenzielle Reste sind zusätzlich hervorgehoben: Konservierte hydrophobe Aminosäuren sind grün; Reste, deren Anwesenheit für einen korrekten Abstand wichtig ist, sind rot gekennzeichnet. Abbildung entnommen aus ^[169].

In vielen Proteinen, wie auch in Paxillin, sind mehrere LIM-Domänen hintereinander angeordnet. Diese Modularität bringt verschiedene

Bindungspartner gleichzeitig in räumliche Nähe, wodurch indirekt Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden können. Eine gleichzeitige Bindung von mehreren identischen Interaktionspartnern an solche modularen LIM-Domänen hätte eine Bündelung dieser zur Folge.

Strukturell wurden diverse LIM-Domänen per NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie aufgeklärt, teilweise auch im Komplex mit gebundenen Interaktionspartnern (Abbildung 1.7).^[171-174] Die Strukturbestimmung einer freien Tandem-LIM-Domäne ohne gebundenen Interaktionspartner wurde jedoch noch nicht realisiert.^[169]

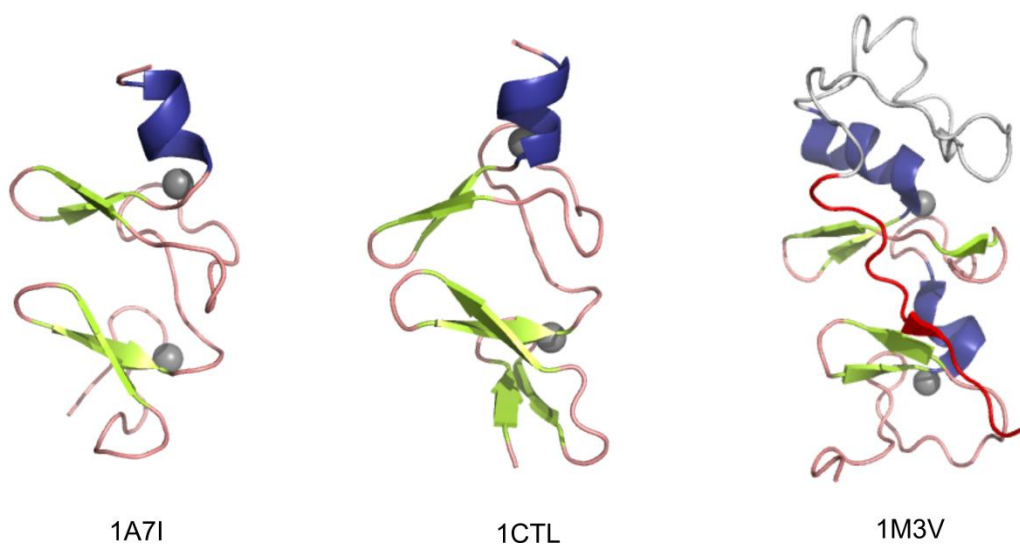


Abbildung 1.7: Drei Beispielstrukturen für LIM-Domänen, die per NMR-Spektroskopie aufgeklärt und unter den angegebenen 4-Zeichen-Codes in der *protein data bank* (PDB) hinterlegt wurden. Die grauen Kugeln entsprechen jeweils den gebundenen Zinkatomen. 1A7I: N-terminale LIM-Domäne des Proteins CRP2 (*cysteine rich protein 2*, Wachtel)^[175]; 1CTL: C-terminale LIM-Domäne des Proteins CRP1 (Huhn)^[171]; 1M3V: N-terminale LIM-Domäne des Proteins LMO4 (*LIM-domain only 4*, Maus) im Komplex mit der LIM-Interaktions-Domäne (LID) des Proteins IDB1 (*inhibitor of DNA-binding 1*). Zur Aufklärung der Komplexstruktur wurde die LID (rot) dabei über einen Glycin-reichen, flexiblen Linker (grau) an den C-Terminus der LIM-Domäne fusioniert.^[176]

2. Zielsetzung

Paxillin ist ein zentrales Protein in Fokalen Adhäsionen, Proteinkomplexen, die den Integrin-vermittelten Kontakt zwischen dem Zellinneren und der Extrazellulären Matrix herstellen und sowohl an der Signalübermittlung über die Zellmembran beteiligt sind, als auch eine zielgerichtete Zellbewegung ermöglichen. Der N-terminale Bereich des Multidomänen-Proteins Paxillin ist relativ gut charakterisiert, wohingegen über die vier C-terminalen LIM-Domänen strukturell und funktionell nur wenig bekannt ist.

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Strukturbestimmung der LIM2/3-Tandem-Domäne aus humanem Paxillin, die essenziell für die Lokalisation des Proteins an Fokalen Adhäsionen ist. Dazu sollte das Proteinkonstrukt ^{13}C - und ^{15}N -markiert und per multidimensionaler, heteronuklearer NMR-Spektroskopie analysiert werden. Zunächst sollte hierfür eine komplette Resonanzzuordnung durchgeführt werden, die dann zusammen mit NMR-basierten Abstands- und Winkelinformationen in einer Molekül-Dynamik-basierten Strukturberechnung verwendet werden sollten, um eine hochaufgelöste Struktur der LIM-Tandem-Domäne zu erhalten. Diese könnte nicht nur einen Einblick in die Funktion von Paxillin geben, sondern auch von modularen LIM-Domänen im Allgemeinen, da bisher noch keine Struktur einer freien LIM-Tandem-Domäne ohne gebundenen Interaktionspartner gelöst werden konnte.

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit die direkte Interaktion von Paxillin-LIM2/3 mit der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- $\beta 3$ mittels *chemical shift perturbation*-Experimenten nachgewiesen und charakterisiert werden. Dadurch würde ein weiteres Puzzleteil des hochkomplexen Interaktionsnetzwerks an den Fokalen Adhäsionen eingefügt und eine Antwort auf die Frage nach dem Mechanismus der frühzeitigen Rekrutierung von Paxillin an neu gebildete Fokale Komplexe erhalten.

3. Methoden

3.1 Protein NMR-Spektroskopie

Die Grundlagen der NMR-Spektroskopie wurden im ersten Teil dieser Arbeit bereits erläutert und die wichtigsten zweidimensionalen NMR-Experimente mit dem jeweiligen Informationsgehalt vorgestellt. Mit zunehmender Größe der zu untersuchenden Moleküle stoßen diese einfachen Experimente jedoch schnell an ihre Grenzen, da die Signale zunehmend überlagern und die Empfindlichkeit aufgrund der schnelleren Relaxation meist geringer ist. Die detaillierte Analyse von Biomakromolekülen per NMR-Spektroskopie bedarf daher einer Optimierung der Messbedingungen und der verwendeten Pulssequenzen.^[177-178]

Zur Verringerung der Signalüberlagerung werden multidimensionale NMR-Spektren aufgenommen, wobei verschiedene Kerne des untersuchten Systems korreliert werden können. Um auch Kohlenstoff- und Stickstoff-Kerne untersuchen zu können, werden die Proteine isotoopenmarkiert exprimiert. Dabei werden die ansonsten seltenen Isotope ^{13}C (1,1% nat. Häufigkeit) und ^{15}N (0,4% nat. Häufigkeit) eingeführt, da diese einen Kernspin von $I = 1/2$ aufweisen und daher im Gegensatz zu den häufigsten natürlichen Isotopen ^{12}C ($I = 0$; 98,9% nat. Häufigkeit) und ^{14}N ($I = 1$; 99,6% nat. Häufigkeit) für die NMR-Spektroskopie geeignet sind. Das allgemeine Vorgehen bei der Erzeugung mehrdimensionaler Spektren ist in Abbildung 3.1 schematisch gezeigt. Dabei werden Entwicklungszeiten in die Pulssequenz eingeführt, während derer sich eine ausgewählte Kohärenz des Systems unter dem Einfluss bestimmter Faktoren wie der chemischen Verschiebung des jeweiligen Kerns entwickelt. Durch eine Inkrementierung dieser Zeit kann bei der finalen Fourier-Transformation (FT) eine weitere Dimension im frequenzbasierten Spektrum generiert werden. Die Einführung von Mischsequenzen erlaubt schließlich eine Kohärenz-Übertragung von einem Kern auf skalar oder dipolar gekoppelte Kerne, wodurch Informationen über Konnektivitäten und räumliche Anordnungen gewonnen werden können.

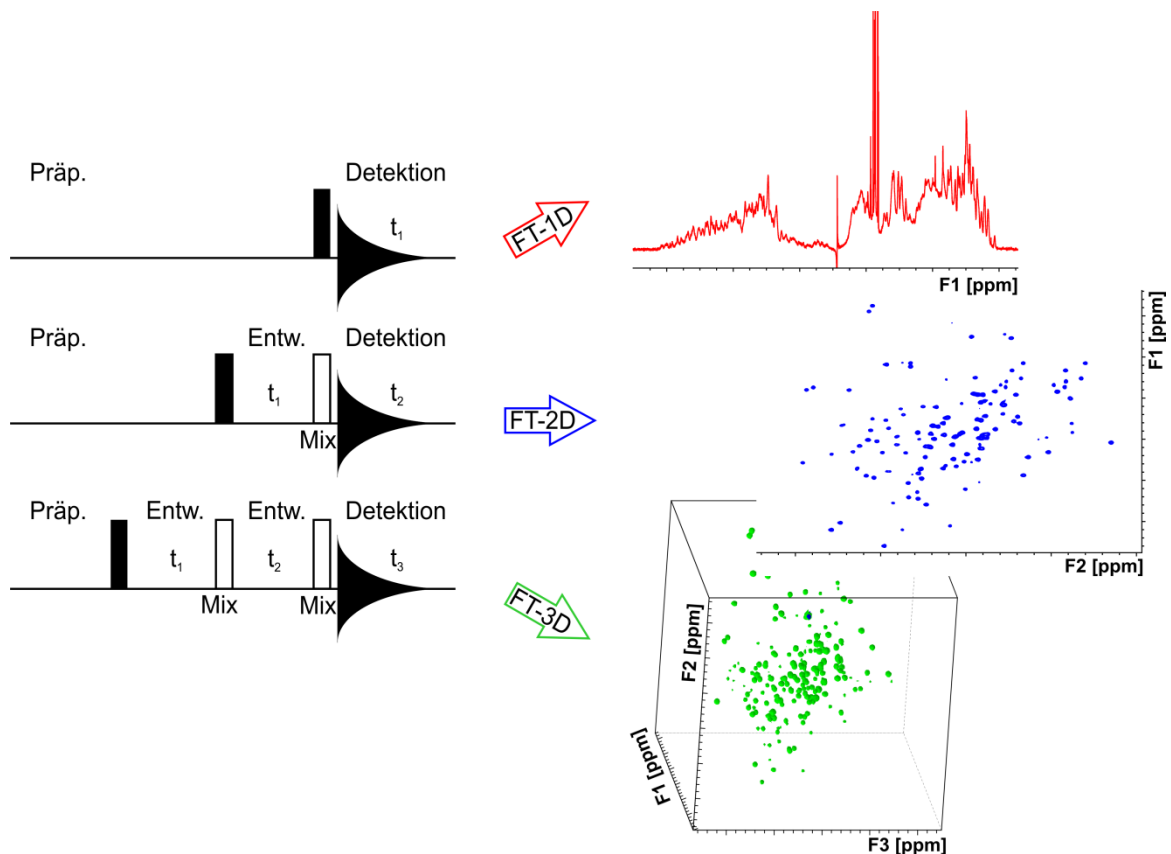


Abbildung 3.1: Schematisches Vorgehen bei der Erzeugung mehrdimensionaler NMR-Spektren.

3.1.1 NMR-Spektroskopische Resonanzzuordnung

Essenziell für die Strukturbestimmung von Proteinen ist eine möglichst komplette Zuordnung aller Resonanzen. Die Grundlagen hierfür wurden vor etwa 25 Jahren gelegt, indem verschiedene mehrdimensionale Experimente entwickelt wurden, die eine sequenzielle Zuordnung der Resonanzen der Rückgrat-Atome erlauben.^[177, 179-181] In Tabelle 3.1 sind einige wichtige Experimente hierfür aufgelistet. Das zentrale Spektrum dieser Zuordnungsstrategie ist das ^1H - ^{15}N -HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*), welches Stickstoffatome mit direkt gebundenen Protonen korreliert, wobei in Proteinen für jedes Amid des Rückgrats genau ein Signal erhalten wird (außer für Prolin, das tertiäre Amide bildet). Die Lage und Verteilung der Signale ist dabei für jedes Protein charakteristisch, und aus diesem Spektrum können bereits Rückschlüsse auf Homogenität und Faltung der betrachteten Proteinprobe gezogen werden.

Tabelle 3.1: Ausgewählte mehrdimensionale NMR-Spektren zur Resonanzzuordnung der Rückgrat-Atome, sowie deren Informationsgehalt.

Experiment	Informationsgehalt
$^1\text{H}-^{15}\text{N}\text{-HSQC}^{[182]}$	Korreliert Stickstoffe und direkt gebundene Protonen
$\text{HNCO}^{[180]}$	Korreliert die NH-Resonanzen eines Amids mit dem Carbonyl-Kohlenstoff der vorhergehenden AS
$\text{HN(CA)CO}^{[183]}$	Korreliert die NH-Resonanzen eines Amids mit dem Carbonyl-Kohlenstoff der vorhergehenden und der eigenen AS
$\text{CBCANH}^{[184]}$	Korreliert die NH-Resonanzen eines Amids mit den C^α - und C^β -Kohlenstoffen der vorhergehenden und der eigenen AS
$\text{CBCA(CO)NH}^{[181]}$	Korreliert die NH-Resonanzen eines Amids mit den C^α - und C^β -Kohlenstoffen der vorhergehenden AS

Aufbauend auf diesem Experiment werden dann verschiedene 3D-Spektren aufgenommen, wobei in der zusätzlichen Dimension Korrelationen zu Rückgrat- und Seitenkettenatomen der vorhergehenden und/oder der eigenen Aminosäure aufgelöst werden. Dadurch werden Informationen über die Verknüpfungen der Aminosäuren erhalten und bei der sequenziellen Analyse der einzelnen Spinsysteme sollten idealerweise alle Resonanzen des Proteinrückgrats zugeordnet werden können. Die Software CARA^[185] (*computer aided resonance assignment*) mit dem implementierten Programm Autolink^[186] bietet dabei die Möglichkeit einer semiautomatisierten Zuordnung.

Für eine Strukturbestimmung reichen diese Informationen jedoch nicht aus, und eine komplette Zuordnung aller Kerne inklusive der Seitenketten ist nötig, wobei wiederum eine Vielzahl von mehrdimensionalen Spektren mit zum Teil redundantem Informationsgehalt eingesetzt wird (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Ausgewählte mehrdimensionale NMR-Spektren zur Resonanzzuordnung der Seitenketten, sowie deren Informationsgehalt.

Experiment	Informationsgehalt
^1H - ^{13}C -HSQC ali/aro ^[187]	Korreliert Kohlenstoffe und direkt gebundene Protonen, optimiert auf den aliphatischen oder aromatischen Bereich
H(C)CH-TOCSY/ (H)CCH- TOCSY ^[188]	Korreliert CH-Resonanzen mit allen weiteren Protonen bzw. Proton-gebundenen Kohlenstoffen eines Spinsystems
H(C)CH-COSY/ (H)CCH-COSY ^[189]	Korreliert CH-Resonanzen mit allen geminal (^3J) oder vicinal (^2J) gekoppelten Protonen bzw. Proton-gebundenen Kohlenstoffen
TOCSY- ^{15}N - HSQC ^[190]	Korreliert die NH-Resonanzen eines Amids mit allen weiteren Protonen des Spinsystems
H(CCCO)NH/ (H)C(CCO)NH ^[191]	Korreliert die NH-Resonanzen eines Amids mit allen aliphatischen Protonen bzw. Kohlenstoffatomen der vorhergehenden AS

3.1.2 NMR-Spektroskopische Strukturbestimmung

Ausgehend von einer kompletten Resonanzzuordnung können mit weiteren NMR-Experimenten strukturelle Informationen des betrachteten Moleküls erhalten werden. Aus skalaren Kopplungen können gemäß der Karplus-Beziehung Torsionswinkel berechnet werden^[192], und residuale dipolare Kopplungen (RDCs) beinhalten Informationen über die relative Orientierung verschiedener Gruppen des Moleküls zueinander.^[193] Die bei weitem wichtigsten und meist verwendeten Strukturinformationen sind jedoch Abstandsbeziehungen, die aufgrund der dipolaren Interaktion zweier räumlich benachbarter Kerne und dem daraus resultierenden Kern-Overhauser-Effekt (NOE) messbar sind.^[194-195]

Als NOE wird die Änderung der Intensität von NMR-Übergängen eines Kerns i bezeichnet, wenn die Besetzungszustände eines dipolar gekoppelten Kerns j aus der thermodynamischen Gleichgewichtslage gestört werden (Sättigung oder Inversion). Die dipolare Kreuzrelaxationsrate ($\sigma_{i,j}$) und damit die Intensität des transienten NOEs ($\eta_{i,j}$) hängt dabei vom Abstand $r_{i,j}$ der Kerne ab und die Aufbaurrate des NOE ist proportional zu $1/r^6$, wodurch unter der Voraussetzung kurzer Mischzeiten auch die Intensitäten der Kreuzsignale im NOESY (*nuclear*

Overhauser enhancement and exchange spectroscopy)-Spektrum diese Abhängigkeit zeigen.^[196]

$$\sigma_{i,j} = \frac{k}{r^6}, \text{ mit: } k = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \frac{\hbar^2 \gamma^4}{10} \left(\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} - \tau_c\right) \quad (3.1)$$

$$\eta_{i,j} = \tau_m * \sigma_{i,j} \quad (3.2)$$

Da sich die Beweglichkeit und damit die Rotationskorrelationszeit (τ_c) in verschiedenen Teilen von Biomakromolekülen deutlich unterscheiden können, hat auch dieser Faktor einen Einfluss auf die Intensität des NOEs. Für Kernpaare mit annähernd konstantem Abstand kann aus der Intensität des NOEs daher direkt auf τ_c und damit auf die Flexibilität des betrachteten Kernpaars rückgeschlossen werden. Hierbei wird oft der heteronukleare NOE zwischen Amid-Stickstoffatomen und direkt gebundenen Amid-Protonen bestimmt, woraus die Dynamik des Protein-Rückgrats in der ps- μ s-Zeitskala abgeschätzt werden kann.

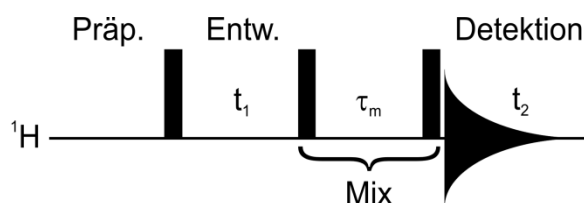


Abbildung 3.2: Pulssequenz eines Homonuklearen 2D-NOESY-Experiments, bei dem Protonen korreliert werden, die sich in räumlicher Nähe befinden. Die schwarzen Balken entsprechen jeweils 90°_x -Pulsen.

Die einfachste 2D-NOESY-Pulssequenz ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Eine teilweise Inversion der Besetzung wird durch den zweiten 90°_x -Puls bewirkt, wodurch sich der NOE während der Mischzeit entwickeln kann. Für die Protein-NMR-Spektroskopie wurden wiederum mehrdimensionale Spektren entwickelt, um die Auflösung zu verbessern und eine eindeutige Zuordnung der Kreuzsignale zu erleichtern.

Tabelle 3.3: Mehrdimensionale NOESY-Spektren zur Bestimmung internuklearer Abstände, sowie deren Informationsgehalt.

Experiment	Informationsgehalt
NOESY- ¹⁵ N-HSQC ^[190]	Korreliert ¹⁵ N-gebundene Protonen und räumlich benachbarte Protonen
NOESY- ¹³ C-HSQC ^[190]	Korreliert ¹³ C-gebundene Protonen und räumlich benachbarte Protonen

Die Auswahl und Zuordnung der typischerweise über 1000 NOESY-Kreuzsignale kann dabei wiederum von Computerprogrammen unterstützt werden: ATNOS^[197] (*automated NOESY peak picking*) identifiziert und quantifiziert die Kreuzsignale während CANDID^[198] (*Combined automated NOE assignment and structure determination module*) diese dann unter Berücksichtigung der Resonanzzuordnung einem Kernpaar zuschreibt und einen Abstand zwischen diesen definiert. Im Optimalfall wird so ein engmaschiges Abstandsnetzwerk generiert, das im finalen Schritt der Moleküldynamik-basierten Strukturberechnung mit Programmen wie Cyana^[199] (*Combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications*) oder Xplor-NIH^[200] eingesetzt wird, um eine hochaufgelöste Molekülstruktur zu berechnen.

3.1.3 *Chemical shift perturbation* basierte Interaktionsstudien

Die Larmorfrequenz eines Kernspins hängt von seiner elektronischen Umgebung ab, und Veränderungen dieser Umgebung führen meist zu einer Störung der chemischen Verschiebung (*chemical shift perturbation*, CSP). Dieses Phänomen kann ausgenutzt werden, um Protein-Ligand-Interaktionen oder strukturelle Änderungen von Proteinen nachzuweisen und charakterisieren.

Um eine Interaktion eines Proteins mit einem Liganden zu untersuchen, bedient man sich oft ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren, da diese schnell aufgenommen werden können, eine große Dispersion der Signale zeigen und bei vorhandener Resonanz-Zuordnung direkt eine Lokalisation der Bindungstasche erlauben. Dazu wird das zu untersuchende Protein ¹⁵N-markiert vorgelegt und mit zunehmenden Konzentrationen des unmarkierten Liganden versetzt. Bindet der

Ligand an das Protein, äußert sich dies in einer Veränderung der Signallagen, wobei in Abhängigkeit der Austauschkinetik und der Differenz der chemischen Verschiebungen im freien und gebundenen Zustand verschiedene Effekte beobachtet werden können: Unter der Bedingung eines schnellen Austauschs zwischen gebundenem und freiem Zustand beobachtet man eine graduelle Verschiebung der Signale mit zunehmender Ligandkonzentration (Abbildung 3.3b links), während beim langsamen Austausch das ursprüngliche Signal der freien Form schrittweise abnimmt und das Signal des gebundenen Komplexes in gleichem Maße an einer anderen Position im Spektrum erscheint (Abbildung 3.3b rechts).

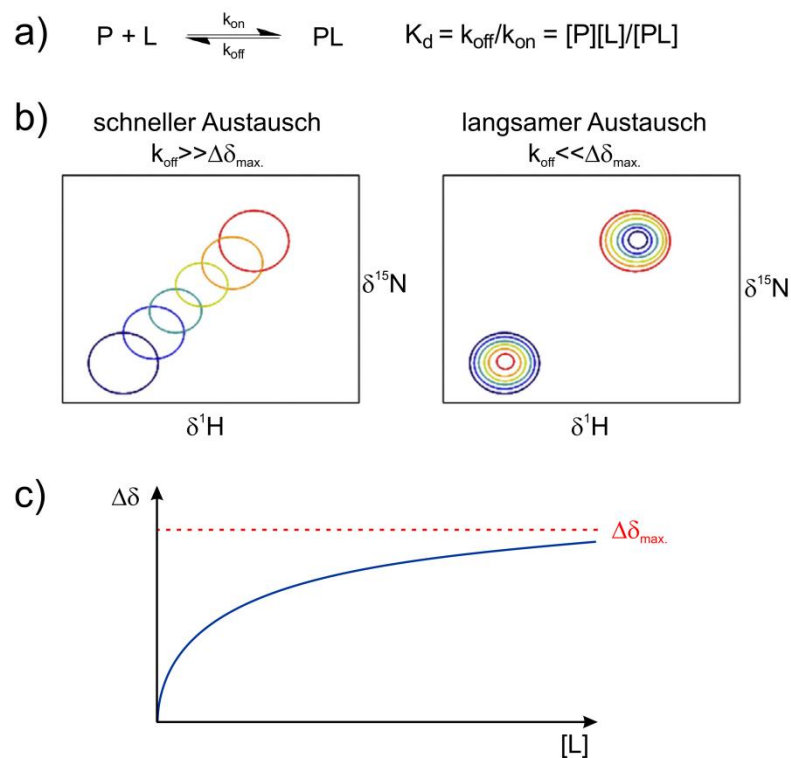


Abbildung 3.3: a) Reaktionsgleichung zur Beschreibung der Bindung eines Liganden (L) an ein Protein (P) zum Protein-Ligand-Komplex (PL), sowie die thermodynamischen und kinetischen Parameter der Reaktion. b) Schematische Darstellung eines Amid-Signals eines Proteins im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum bei der Titration mit einem Bindungspartner (blau: geringe Ligandkonzentration, rot: hohe Ligandkonzentration). k_{off} : Dissoziationsrate des Protein-Ligand-Komplexes in Hz; $\Delta\delta$: Unterschied der chemischen Verschiebung des Signals der freien und gebundenen Form in Hz. c) Schematische Titrationskurve einer Interaktion mit schneller Austauschkinetik, woraus die Dissoziationskonstante K_d durch Regression mit Funktion 3.3 (siehe nächste Seite) bestimmt werden kann. Abbildung teilweise entnommen aus ^[201].

Liegt die Dissoziationsrate des Protein-Ligand-Komplexes im Bereich der Differenz der chemischen Verschiebungen ($k_{off} \approx \Delta\delta_{max}$, intermediärer Austausch), kommt es zu einer Signalverbreiterung. Diese kann dazu führen, dass Signale mit zunehmender Ligandkonzentration verschwinden und erst bei sehr großen Überschüssen an Ligand wieder mit der chemischen Verschiebung des Komplexes auftauchen.

Zusätzlich zur qualitativen Beschreibung einer Protein-Ligand-Interaktion können die thermodynamischen Parameter der Bindung per CSP auch quantifiziert werden. Durch die Auftragung der Änderung der chemischen Verschiebung gegen die Ligandkonzentration und einer Annäherung der erhaltenen Kurve mit Funktion 3.3 kann die Dissoziationskonstante K_d bestimmt werden. Diese Funktion ist für eine 1:1 Interaktion von Protein und Ligand gültig. Die Herleitung dieser Gleichung sowie komplexere Fälle mit multivalenten Interaktionen werden im Übersichtsartikel von Williamson ausführlich beschrieben.^[201]

$$\Delta\delta ([L]) = \Delta\delta_{max} \frac{([P] + [L] + K_d) - \sqrt{([P] + [L] + K_d)^2 - 4[P][L]}}{2[P]} \quad (3.3)$$

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Paxillin- und Integrin-Konstrukte

Zur Aufklärung der Struktur der zweiten und dritten LIM-Domäne von Paxillin (Paxillin-LIM2/3) und für die Interaktionsstudien mit der zytoplasmatischen Domäne von Integrin $\beta 3$ (Integrin $\beta 3$ -cd) wurden zwei Konstrukte als His₆-SUMO-Fusionsproteine rekombinant exprimiert (Abbildung 4.1).

His₆-SUMO-Paxillin-LIM2/3:

```

MGHHHHHGS DSEVNQEAKP EVKPEVKPET HINLKVSDGS SEIFFKIKKT TPLRRLMEAF
                                     380           393
                                     1 4           14
AKRQ GKEMDS LRFLYDGIRI QADQTPEDLD MEDNDIIEAH REQIGGSPRC YYCNGPILDK
                                     X
      403           413           423           433           443           453
      24           34           44           54           64           74
VVTALDRTWH PEHFFCAQCG AFFGPEGFHE KDGKAYCRKD YFDMFAPKCG GCARAILENY
      463           473           483           493           499
      84           94           104          114           124
ISALNTLWHP ECFVCRECFT PFVNGSFFEH DGOPYCEVHY HERRGSPPEYF KNG
  
```

His₆-SUMO-Integrin $\beta 3$ -cd:

```

MGHHHHHGS DSEVNQEAKP EVKPEVKPET HINLKVSDGS SEIFFKIKKT TPLRRLMEAF
                                     742           750
                                     1 4           14
AKRQ GKEMDS LRFLYDGIRI QADQTPEDLD MEDNDIIEAH REQIGGRPDP GKLLITIHDR
                                     X
      760           770           780           788
      24           34           44           52
KEFAKFEER ARAKWDTANN PLYKEATSTF TNITYRGT
  
```

Abbildung 4.1: Aminosäuresequenzen der exprimierten His₆-SUMO-Fusionsproteine. Rot dargestellt ist der N-Terminale His₆-tag, grün die SUMO-Domäne, blau der C-Terminale Nef-tag und violett Artefakte der Klonierung. Die ULP1-Schnittstelle ist durch eine Schere gekennzeichnet und die finalen AS-Sequenzen, mit denen die NMR-Experimente durchgeführt wurden, sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Im weiteren Verlauf werden die 127 bzw. 52 Aminosäurereste dieser Konstrukte von eins beginnend gezählt (schwarze Nummerierung), die jeweilige Aminosäureposition im Volllängenprotein ist orange dargestellt.

Am N-Terminus befindet sich dabei jeweils ein His₆-tag wodurch das Protein mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt werden kann.^[202] Die Expression als SUMO-Fusionsprotein (SUMO: *small Ubiquitin-like modifier*) erlaubt eine Herstellung des Zielproteins in großen Mengen und unterstützt dessen korrekte Faltung^[203]. Außerdem kann die SUMO-Domäne sehr selektiv und rückstandslos durch die Protease ULP1 (*Ubiquitin-like-specific protease 1*) abgespaltet werden.^[204] Paxillin-LIM2/3 besitzt zusätzlich einen Nef-tag (C-terminale Sequenz des lentiviralen Proteins *negative regulatory factor*), der ein Antigen für einen etablierten und sehr selektiven Antikörper darstellt und für einen immunologischen Nachweis des Proteins verwendet werden kann.

4.2 Strukturaufklärung von Paxillin-LIM2/3

Zur Strukturaufklärung von Paxillin-LIM2/3 wurde einerseits versucht das Protein zu kristallisieren, wobei jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen Kristalle erhalten wurden, die eine Analyse per Röntgenbeugung ermöglicht hätten. Daher wurde eine Aufklärung der Struktur per NMR-Spektroskopie angestrebt, wobei das Protein für die Resonanzzuordnung ¹³C- und ¹⁵N-markiert exprimiert wurde.

4.2.1 Resonanzzuordnung der Rückgratome

Zunächst sollten die Resonanzen der Rückgratome zugeordnet werden. Grundlage hierfür war das ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum, das eine große Signaldispersion und einheitliche Signalintensitäten und Halbwertsbreiten aufweist, wie es für globulär gefaltete Proteine typisch ist (Abbildung 4.2a). Zur Resonanzzuordnung wurden zusätzlich verschiedene dreidimensionale NMR-Spektren aufgenommen (vgl. Tabelle 3.1). In Abbildung 4.2b sind beispielhaft Ausschnitte aus dem HNCO- und dem HN(CA)CO-Spektrum gezeigt. Im HNCO (jeweils linker Streifen mit blauen Signalen) wird die Amidresonanz mit dem Carbonyl-Kohlenstoff der vorhergehenden Aminosäure korreliert, das HN(CA)CO (jeweils rechter Streifen mit roten Signalen) zeigt üblicherweise ein intensives

Kreuzsignal zum eigenen Carbonyl-Kohlenstoff und ein schwächeres Kreuzsignal zum Carbonyl-Kohlenstoff der vorhergehenden Aminosäure.

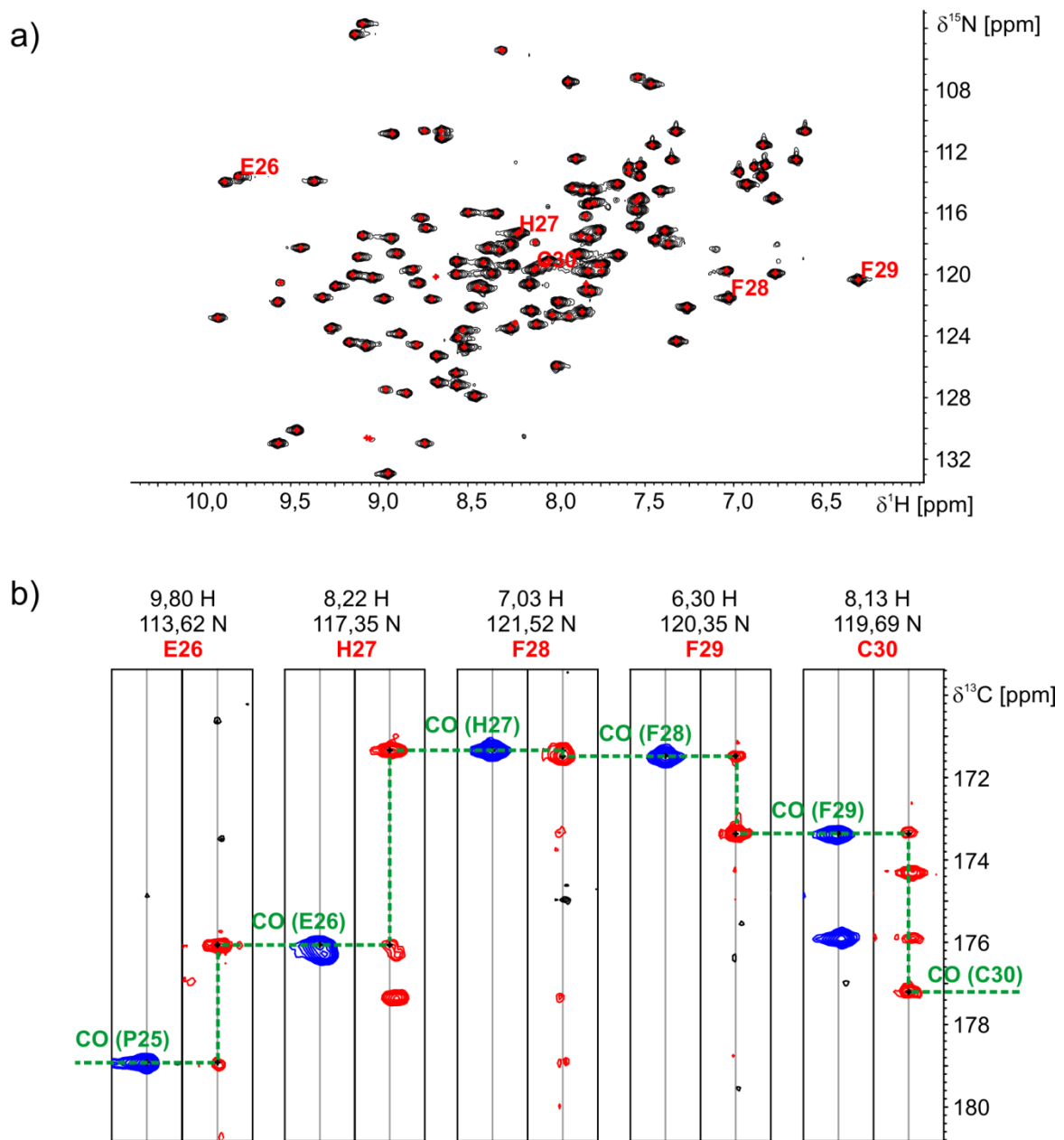


Abbildung 4.2: a) Ausschnitt des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums von ^{15}N - ^{13}C -Paxillin-LIM2/3. Rot hervorgehoben sind die 5 Kreuzsignale der Aminosäuren E26-C30, anhand derer die Zuordnungsstrategie veranschaulicht werden soll. b) Ausschnitte aus dem 3D-HNCO-Spektrum (links, blaue Signale) und dem 3D-HN(CA)CO-Spektrum (rechts, rote Signale). Gezeigt ist jeweils ein Streifen der ^{13}C -Dimension bei den gekennzeichneten ^1H und ^{15}N chemischen Verschiebungen. Bedingungen: $500\ \mu\text{M}$ ^{13}C - ^{15}N -Paxillin-LIM2/3, $150\ \text{mM}$ NaCl, $50\ \text{mM}$ Na_2HPO_4 , $4\ \text{mM}$ NaN_3 , $1\ \text{mM}$ DTT, 5% D_2O , $\text{pH} = 7,5$.

Durch sequenziellen Abgleich konnten die verschiedenen Spinsysteme korreliert und einer Aminosäuresequenz zugeordnet werden, was in Abbildung 4.2b am Beispiel der Sequenz E26-C30 gezeigt ist. Auf diese Weise konnten 97,3% der Rückgratátome (H^N , N, CO, C^α , H^α) zugeordnet werden. Alle zugewiesenen Amidsignale sind in Abbildung 4.2a mit einem roten Kreuz gekennzeichnet (die komplette Resonanzzuordnung ist auf der beigelegten CD-Rom verfügbar). Neben den Prolinen, die tertiäre Amide bilden und daher kein Signal im 1H - ^{15}N -HSQC zeigen, wurden auch für die beiden Asparagine N98 und N126 keine Kreuzsignale gefunden, worauf im weiteren Verlauf der Arbeit noch eingegangen wird.

4.2.2 Renonanzzuordnung der Seitenkettenátome

Durch die Aufnahme weiterer dreidimensionaler Spektren (vgl. Tabelle 3.2) konnte auch ein Großteil der Seitenkettenresonanzen zugeordnet werden (96,6% der Proton-gebundenen Kohlenstoffátome sowie 90,8% der ^{13}C - oder ^{15}N -gebundenen Protonen, inklusive der austauschbaren Protonen von Lysinen, Argininen und Histidinen). Problematisch war dabei vor allem die Zuordnung der aromatischen Resonanzen der 13 Phenylalanine, die stark überlagern und daher nicht immer zweifelsfrei zugeordnet werden konnten. In Abbildung 4.3 sind die jeweiligen 1H - ^{13}C -HSQC-Spektren des aliphatischen und des aromatischen Bereiches gezeigt. Auch hier ist eine große Dispersion der Signale zu erkennen sowie stark hochfeldverschobene aliphatische Resonanzen (z.B: δ^1H (H^γ , I11) = -0,42 ppm), die wiederum für eine globuläre Proteinfaltung typisch sind. Die Resonanz-Zuordnung wurde außerdem durch die Aufnahme von 3D-NOESY-Spektren unterstützt. In erster Linie wurden diese Spektren jedoch zur Bestimmung von internuklearen Abständen aufgenommen, welche dann als Input für die Strukturberechnung verwendet wurden.

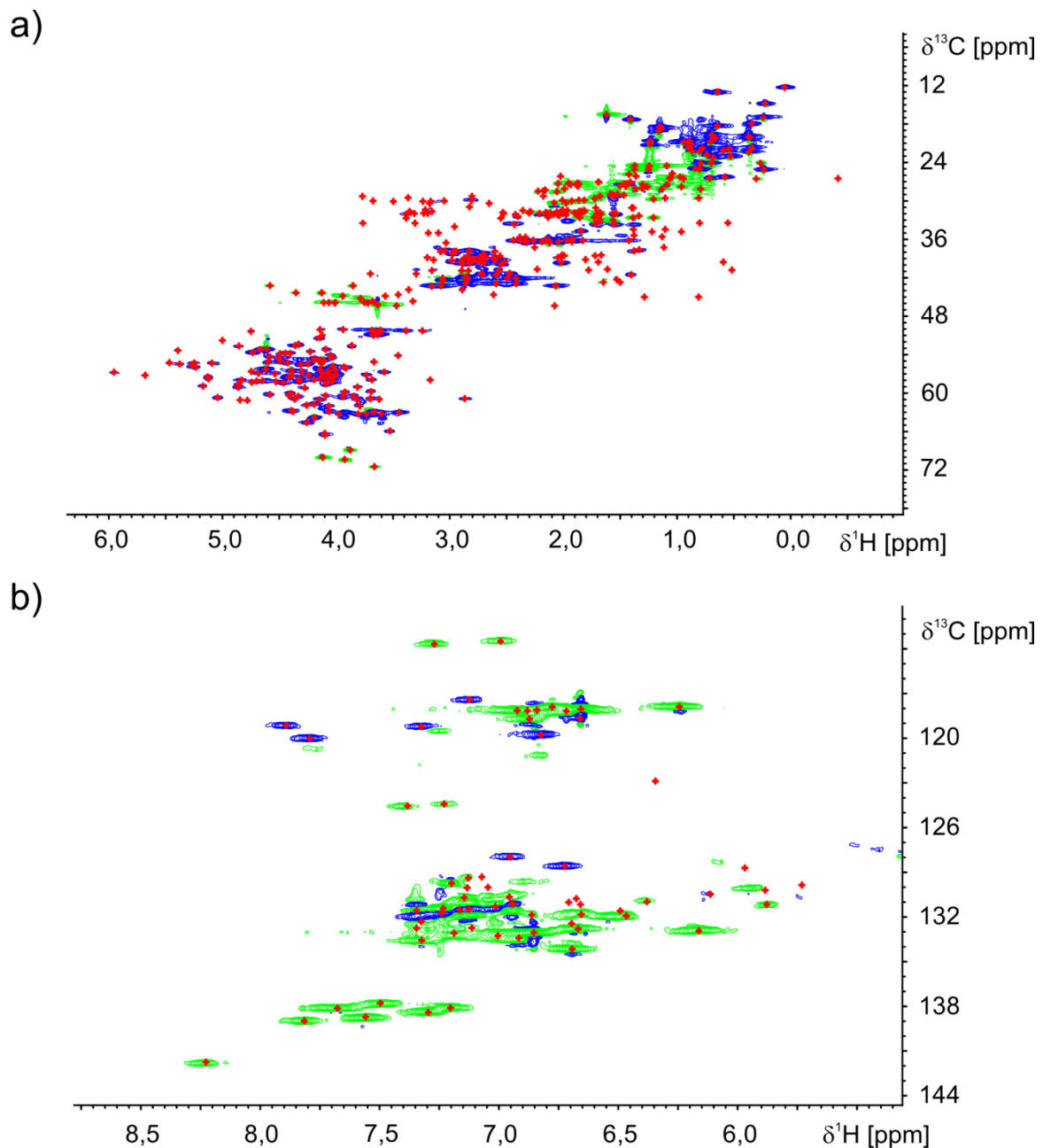


Abbildung 4.3: ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren von ^{15}N - ^{13}C -Paxillin-LIM2/3 optimiert auf den aliphatischen (a) oder aromatischen Bereich (b). Jedes rote Kreuz entspricht einer zugeordneten C-H-Gruppe und die Spektren sind so editiert, dass C-H-Gruppen mit keinem oder zwei direkt benachbarten aliphatischen/aromatischen Kohlenstoffatomen negative Signale ergeben (grün), während Signale von C-H-Gruppen mit einem oder drei direkt benachbarten aliphatischen/aromatischen Kohlenstoffatomen positiv sind (blau).^[187] $500\ \mu\text{M}$ ^{13}C - ^{15}N -Paxillin-LIM2/3, $150\ \text{mM}$ NaCl, $50\ \text{mM}$ Na_2HPO_4 , $4\ \text{mM}$ NaN_3 , $1\ \text{mM}$ DTT, 100% D_2O , $\text{pH} = 7,5$.

4.2.3 Struktur und Dynamik von Paxillin-LIM2/3

Zur Bestimmung der Proton-Proton-Abstände wurden vier NOESY-Spektren aufgenommen: Ein ^{15}N -NOESY-HSQC und ein $^{13}\text{C}_{\text{ali}}$ -NOESY-HSQC, jeweils in 95% $\text{H}_2\text{O}/5\% \text{D}_2\text{O}$ sowie ein $^{13}\text{C}_{\text{ali}}$ -NOESY-HSQC und ein $^{13}\text{C}_{\text{aro}}$ -NOESY-HSQC in 100% D_2O . Die Messung in reinem D_2O hat den Vorteil, dass keine Überlagerung von Resonanzen – vor allem der α -Protonen – mit dem Wasser-Signal auftritt, jedoch können in reinem D_2O keine NOEs zu austauschbaren Protonen wie Amidn detektiert werden.

Die Signale dieser Spektren wurden mithilfe von ATNOS identifiziert und quantifiziert, und die erhaltenen Peaklisten wurden bei der Strukturberechnung mit CYANA verwendet. Zusätzlich wurden mit TALOS-N^[205] φ - und ψ - Rückgrat-Winkel auf der Basis der ermittelten chemischen Verschiebungen berechnet, wobei letztlich 158 Winkel verwendet wurden, die mit ‚strong‘ gekennzeichnet und damit sehr zuverlässig sind.

Die Zinkkoordination wurde in den ersten Zyklen der Strukturberechnung noch nicht berücksichtigt und es konnte nachgewiesen werden, dass die 4 durch Sequenzvergleich vorhergesagten Zinkkoordinierenden Reste (C4, C7, H24, H27 koordinieren Zn I; C30, C33, C51, D54 koordinieren Zn II; C63, C66, H83, C86 koordinieren Zn III; C89, C92, C110, H113 koordinieren Zn IV) mit den gegebenen Strukturinformationen bereits eine Anordnung annehmen, in der sie räumlich benachbart liegen. In den weiteren Zyklen der Strukturberechnung wurde dann die Geometrie der Zinkkoordination konkret definiert, wobei die Abstands- und Winkelparameter aus Tabellen entnommen wurden, die auf hochaufgelösten Kristallstrukturen beruhen (Anhang A1).^[206]

Während Cystein über das S^{Y} -Atom an Zink koordiniert, kann Histidin, die zweithäufigste zinkkoordinierende Aminosäure, eine Metallbindung über beide aromatischen Stickstoffatome ($\text{N}^{\delta 1}$ oder $\text{N}^{\epsilon 2}$) eingehen. Für die Strukturberechnung ist es essenziell, den richtigen Koordinationsmodus zu definieren. Hierbei sind verschiedene Methoden bekannt, um diesen aus den chemischen Verschiebungen der Kerne des aromatischen Systems zu bestimmen. Zum einen ist die chemische Verschiebung der beiden Ringstickstoffe ein eindeutiger Indikator und kann mittels ^1H - ^{15}N -HMBC-Spektren bestimmt werden^[207]. Zum

anderen sind auch die Frequenzen der $C^{\delta 2}$ und $C^{\epsilon 1}$ -Atome sowie die Differenz zwischen diesen von der Zink-Koordination abhängig (Abbildung 4.4).^[208]

Für Paxillin liegen die Differenzen der chemischen Verschiebungen der vier Zink-bindenden Histidine jeweils deutlich über 17 ppm (Tabelle 4.1), was in allen Fällen eine Zink-Koordination über $N^{\delta 1}$ nahelegt.

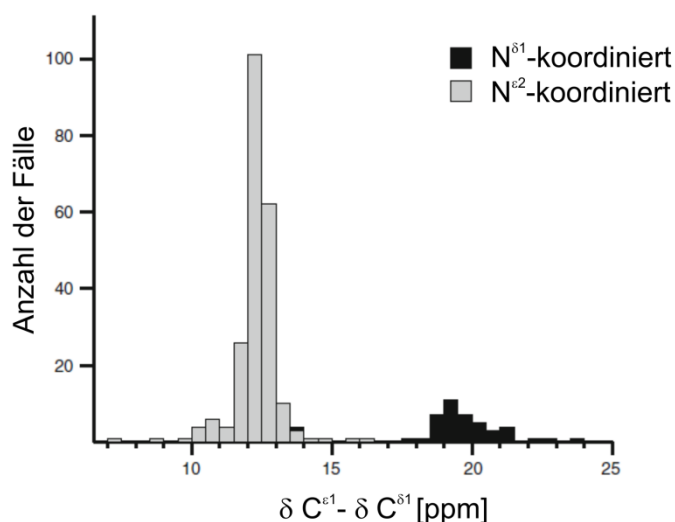


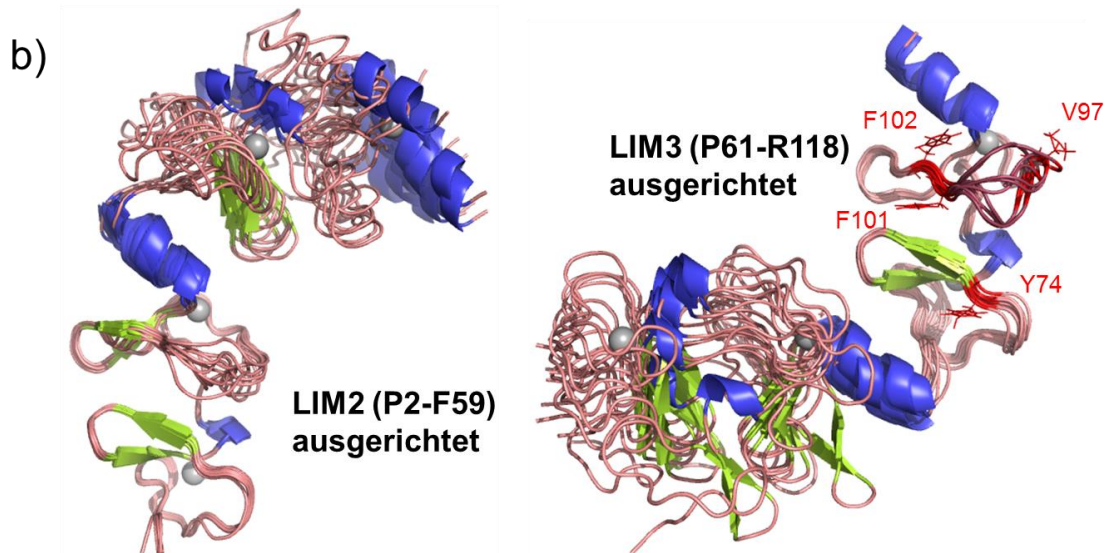
Abbildung 4.4: Statistische Verteilung der Differenz der ^{13}C -chemischen Verschiebung der $C^{\delta 2}$ - und $C^{\epsilon 1}$ -Atome von zinkkoordinierenden Histidinen aus aufgeklärten und in Datenbanken hinterlegten Strukturen (266 Fälle). Abbildung entnommen aus ^[208].

Tabelle 4.1: Analyse der Koordinationsmodi, der vier zinkbindenden Histidine anhand der chemischen Verschiebungen der aromatischen Kohlenstoffatome $C^{\delta 2}$ und $C^{\epsilon 1}$.

Histidin	$\delta C^{\epsilon 1} - \delta C^{\delta 2}$ [ppm]	Zinkkoordination über
24	18,4	$N^{\delta 1}$
27	24,3	$N^{\delta 1}$
83	19,0	$N^{\delta 1}$
113	19,7	$N^{\delta 1}$

Die Strukturberechnung wurde mit dem Cyana-Script ‚AUTO.cya‘ durchgeführt, wobei pro Rechnung 7 Zyklen von NOE-Zuordnung und MD-Simulation unter Bedingung der simulierten Abkühlung (*simulated annealing*) durchlaufen wurden. Dabei wurden jeweils 100 Strukturen berechnet, wovon diejenigen 20 Strukturen mit der geringsten Energie der Cyana-Zielfunktion ($E = 5,75 \pm 0,5$) detailliert untersucht wurden.

a)	Automatisch gepickte NOE-Kontakte:	Manuell gepickte NOE-Kontakte:
	All : 1094 100.0%	All : 132 100.0%
	Intraresidue, $ i-j =0$: 303 27.7%	Intraresidue, $ i-j =0$: 0 0.0%
	Sequential, $ i-j =1$: 339 31.0%	Sequential, $ i-j =1$: 15 14.7%
	Short-range, $ i-j \leq 1$: 642 58.7%	Short-range, $ i-j \leq 1$: 15 14.7%
	Medium-range, $1< i-j <5$: 138 12.6%	Medium-range, $1< i-j <5$: 13 12.7%
	Long-range, $ i-j \geq 5$: 314 28.7%	Long-range, $ i-j \geq 5$: 104 78.8%



RMSD Rückgrat-atome: $0,77 \pm 0,17 \text{ \AA}$
RMSD Heteroatome: $1,20 \pm 0,16 \text{ \AA}$

Ramachandran Statistik:
core: 82,4%
allowed: 16,6%
generous: 1,0%
disallowed: 0,0%

RMSD Rückgrat-atome: $0,78 \pm 0,30 \text{ \AA}$
RMSD Heteroatome: $1,21 \pm 0,24 \text{ \AA}$

Ramachandran Statistik:
core: 75,8%
allowed: 23,3%
generous: 0,8%
disallowed: 0,1%

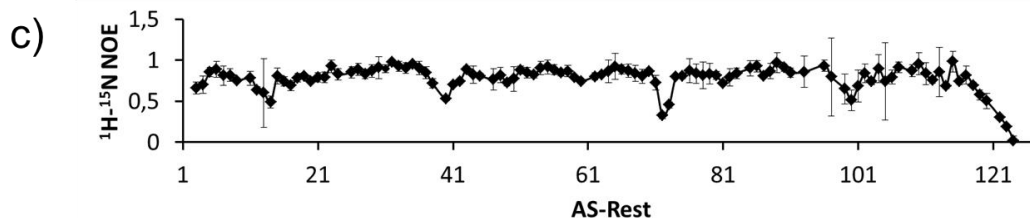


Abbildung 4.5: a) Statistik der NOE-Kontakten, die bei der finalen Strukturberechnung verwendet wurden. b) Ensemble der 10 Strukturen mit der geringsten Energie der Cyana-Zielfunktion, wobei jeweils die Reste der LIM2-Domäne (links) oder der LIM3-Domäne (rechts) optimal überlagert sind. Die Zinkatome der energetisch besten Struktur sind als graue Kugeln dargestellt, β -Faltblätter als grüne Pfeile und α -Helices als blaue Spiralen. In LIM3 ist der flexible Loop (V97-F101) rot hervorgehoben sowie 4 Aminosäuren, auf die im Zuge der CSP-Interaktionsstudien eingegangen wird. c) Heteronuklearer ^1H - ^{15}N -NOE in Abhängigkeit der AS-Position. Werte zwischen 0,8 und 0,9 indizieren rigide Bereiche während eine zunehmende Flexibilität der entsprechenden Reste zu reduzierten ^1H - ^{15}N -NOEs führt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung dreier unabhängiger Messungen an.

Die Eingabe-Dateien einer Strukturberechnung wurden aufbauend auf der Analyse der vorhergehenden Rechnung modifiziert und als Startstruktur wurde die finale Struktur einer vorhergehenden Rechnung verwendet. Auf diese Weise wurde die Struktur sukzessive verfeinert und die Eingabe-Parameter der finalen, fünfzigsten Berechnung sind auf der beigefügten CD-Rom aufgelistet. Das Ergebnis dieser Strukturberechnung ist in Abbildung 4.5b dargestellt, und es ist eine gute Konvergenz der einzelnen Domänen zu erkennen, während die Ausrichtung der beiden Domänen zueinander nicht komplett rigide ist.

Der Winkel zwischen den Hauptachsen der beiden Domänen (ermittelt aus einer Geraden durch die beiden Zinkatome einer Domäne) liegt zwischen 100° und 130° und diese gewinkelte Orientierung wird durch 15 NOE-Kontakte zwischen den beiden Domänen stabilisiert, welche in Tabelle 4.2 aufgelistet sind. Residuale Dipolare Kopplungen könnten weiteren Aufschluss über die Ausrichtung der beiden Domänen zueinander geben. Jedoch wurden RDC-Messungen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da dafür eine partielle Ausrichtung der Proteine vonnöten ist, was wiederum mit erheblichem experimentellem Aufwand verbunden ist.

Tabelle 4.2: NOE-Kontakte zwischen Protonen der LIM2 und der LIM3 Domäne, sowie die berechneten Abstände aus dem Volumen der NOESY-Kreuzsignale.

Proton in LIM2	Proton in LIM3	Abstand [Å]
HE K53	HB2 L81	5,50
HE K53	HG2 T80	4,11
HE K53	H T80	4,84
HE K53	HB T80	4,75
HD2 K53	HA T80	4,35
HD3 K53	HA T80	4,35
HB K53	HD L81	5,44
HG K53	HD L81	5,26
HD K53	H L81	4,40
HD K53	HD L81	3,70
HE F56	HG R68	4,51
HD F56	HG3 R68	5,50
HD F56	HG2 R68	5,50
HE F56	HB R68	5,47
HZ F56	HE K62	4,64

Man erkennt sowohl in LIM2 (G38-F42) als auch in LIM3 (V97-F101) einen Bereich, in dem das Strukturensamble eine starke Divergenz aufweist, und die Flexibilität dieser beiden Loops konnte durch die Messung von heteronuklearen ^1H - ^{15}N -NOEs bestätigt werden (Abbildung 4.5c). Außerdem konnten mit diesen Messungen zwei weitere Bereiche mit einer erhöhten Flexibilität des Proteinerückgrats identifiziert werden (L12-K14 in LIM2 und L71-N73 in LIM3). Ein struktureller Vergleich der individuellen LIM-Domänen aus Paxillin mit in der PDB hinterlegten Strukturen unter Verwendung des Webservers PDBeFold^[209] zeigt eine gute Übereinstimmung mit bereits hinterlegten LIM-Domänen (Abbildung 4.6). Die Sekundärstrukturelemente wurden mit der Software DSSP^[210] klassifiziert, wobei für jede Domäne zwei kurze antiparallele β -Faltblätter identifiziert wurden ($\beta_1+\beta_2$ sowie $\beta_3+\beta_4$ in LIM2 und $\beta_5+\beta_6$ sowie $\beta_7+\beta_8$ in LIM3), wobei die beiden paarenden Stränge in allen Fällen über eine β -Schleife vom Typ I' (Wasserstoffbrücke zwischen Rest i und $i+3$)^[211-212] verbunden sind. Am C-Terminus der beiden Domänen ist jeweils eine kurze α -Helix lokalisiert (α_1 in LIM2 und α_2 in LIM3).

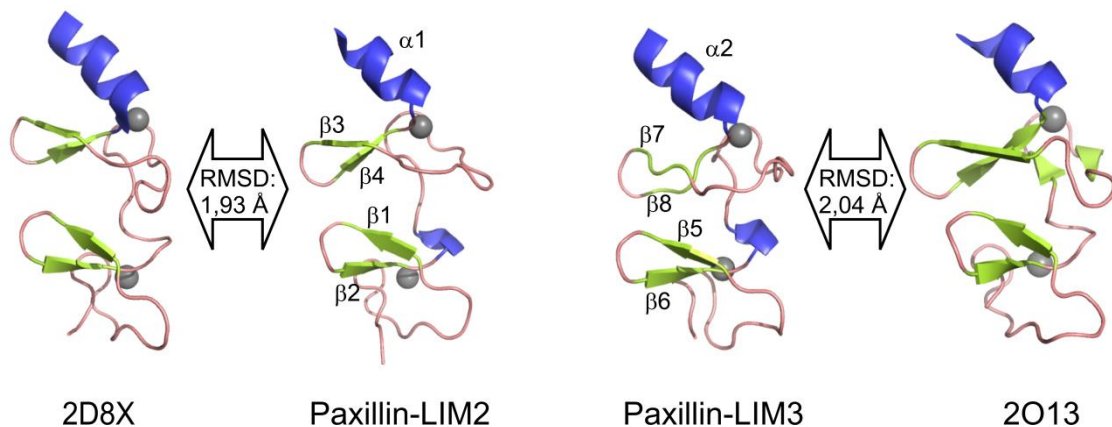


Abbildung 4.6: Vergleich der Strukturen der individuellen LIM-Domänen mit den ähnlichsten in der PDB hinterlegten Strukturen 2D8X (zweite LIM-Domäne des humanen Proteins PINCH^[213]) und 2O13 (C-terminale LIM-Domäne des humanen Proteins MLP/CRP3^[214]).

4.3 Paxillin-Deamidierung

Wie bereits erwähnt, wurden für die beiden Asparagine N98 und N126 keine Rückgrat-Amidsignale im ^1H - ^{15}N -HSQC gefunden. Außerdem wurde im Verlauf

der Messungen über mehrere Wochen eine langsame Veränderung der Signallagen im ^1H - ^{15}N -HSQC festgestellt, wobei die Resonanzen der Aminosäuren des flexiblen Loops (V97-F101) verschwanden und stattdessen jeweils zwei neue Signale an anderen Stellen im Spektrum aufkamen (Abbildung 4.7b). Der Grund hierfür ist eine Deamidierung des Asparagins N98, welche zu Aspartat (N98D) oder iso-Aspartat (N98isoD) verlaufen kann (Abbildung 4.7a). Eine detaillierte Untersuchung dieser Reaktion ergab, dass die beiden Isomere dabei ungefähr in äquivalenten Mengen entstehen und die Halbwertszeit der Reaktion bei 37°C und einem pH-Wert von 8,0 ungefähr zwei Tage beträgt.

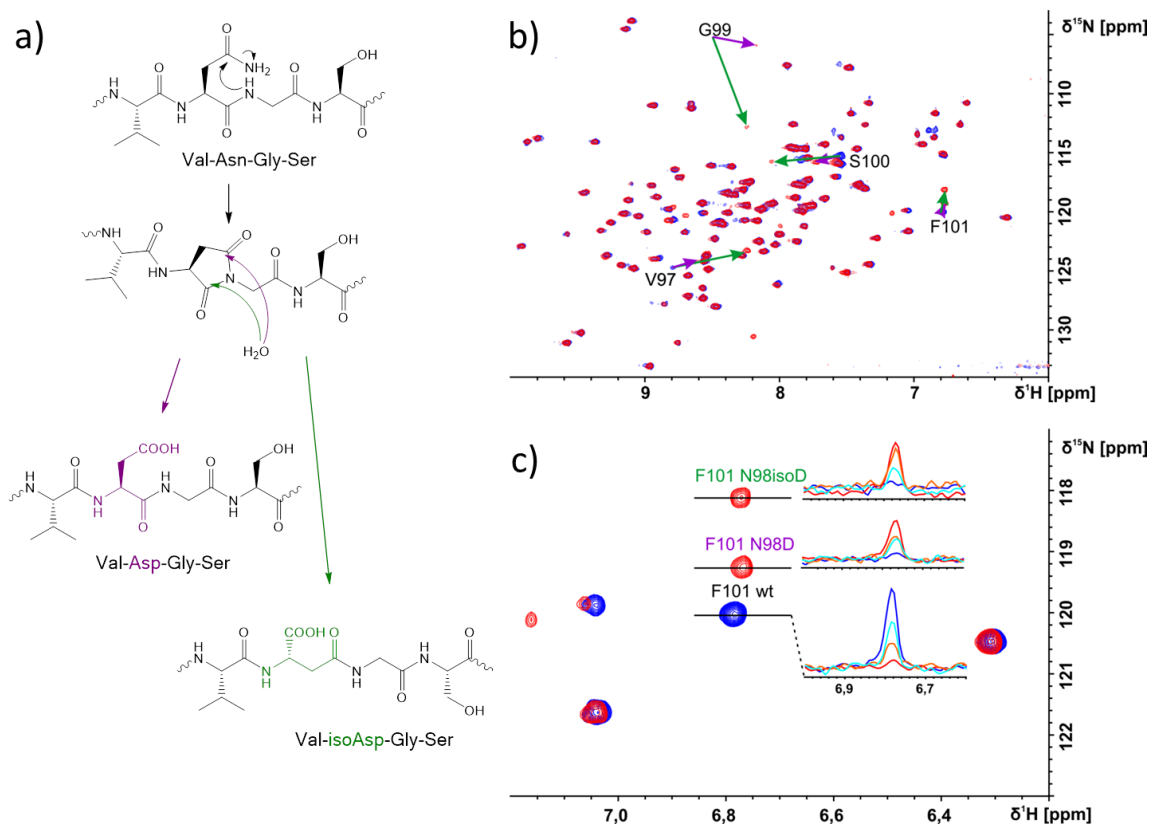


Abbildung 4.7: a) Mechanismus der Deamidierung von N98: Im ersten Schritt findet unter Ammoniak-Abspaltung eine Zyklisierung zum Aspartimid statt, welches dann von Wasser zu Aspartat (violett) oder iso-Aspartat (grün) hydrolysiert werden kann. b) ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -Paxillin-LIM2/3 vor der Deamidierungsreaktion (blau) und danach (rot). Die grünen und violetten Pfeile zeigen die Signaländerungen der vier hervorgehobenen Aminosäuren an. c) Vergrößerter Ausschnitt aus dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum, mit dem zeitlichen Verlauf der Signalintensitäten am Beispiel von F101. Die drei *Insets* sind Querschnitte durch die jeweiligen Signale zu Beginn (blau), nach einem Tag (cyan), nach zwei Tagen (orange) und nach vier Tagen (rot) bei 37°C. 200 μM ^{15}N -Paxillin-LIM2/3, 150 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaN_3 , 1 mM DTT, 5% D_2O , pH = 8,0.

Auch bei Asparagin N126 wurde eine Deamidierung beobachtet. Da sich diese Aminosäure aber im unstrukturierten Bereich des C-terminalen Nef-*tags* befindet, hat die Modifikation keinen Einfluss auf Struktur und Funktionalität von Paxillin und wurde nicht weiter analysiert. Die Deamidierung von Proteinen ist ein bekannter Prozess und tritt oft bei Asparaginen in flexiblen Bereichen auf, insbesondere wenn die darauffolgende Aminosäure ein Glycin ist.^[215-216] In manchen Beispielen konnte ein direkter Einfluss der Deamidierung auf die Funktion von Proteinen nachgewiesen werden. Es wird spekuliert, dass diese spontane Reaktion als molekularer Timer für biologische Ereignisse fungiert und im Zusammenhang mit Protein-*turnover*, Entwicklung und Alterung steht.^[217] Inwieweit die beobachtete Deamidierung von Paxillin einen Einfluss auf dessen Funktion besitzt und ob dieser Prozess eine physiologische Relevanz besitzt, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden.

4.4 Interaktionsstudien mit der zytoplasmatischen Domäne von Integrin β 3

Um eine direkte Interaktion zwischen Paxillin-LIM2/3 und der zytoplasmatischen Domäne von Integrin β 3 (Integrin β 3-cd) nachzuweisen, wurden CSP-Experimente durchgeführt, wobei jeweils ein Protein ^{15}N -markiert vorgelegt wurde und ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren mit zunehmenden Konzentrationen des unmarkierten Bindungspartners aufgenommen wurden (Abbildung 4.8/4.9).

Bei der Titration von ^{15}N -Paxillin-LIM2/3 mit Integrin β 3-cd konnten bei mehreren Signalen signifikante Veränderungen beobachtet werden, während bei der Zugabe von His₆-SUMO (Negativkontrolle) keine Änderungen der Signallagen oder -intensitäten auftraten. Die Reste, welche die größten CSPs erfuhren, sind in Abbildung 4.8a hervorgehoben (Y74, V97, F101, F102) und liegen alle im Bereich des flexiblen Loops der LIM3-Domäne (vgl. Abbildung 4.5b), in welchem auch die Deamidierung beobachtet wurde. Für die homologen Reste in der LIM2-Domäne (V15, F42, H43) konnten ebenfalls CSPs beobachtet werden, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Vermutlich können also beide LIM-Domänen mit

unterschiedlichen Affinitäten an die zytoplasmatische Domäne von Integrin- β 3 binden.

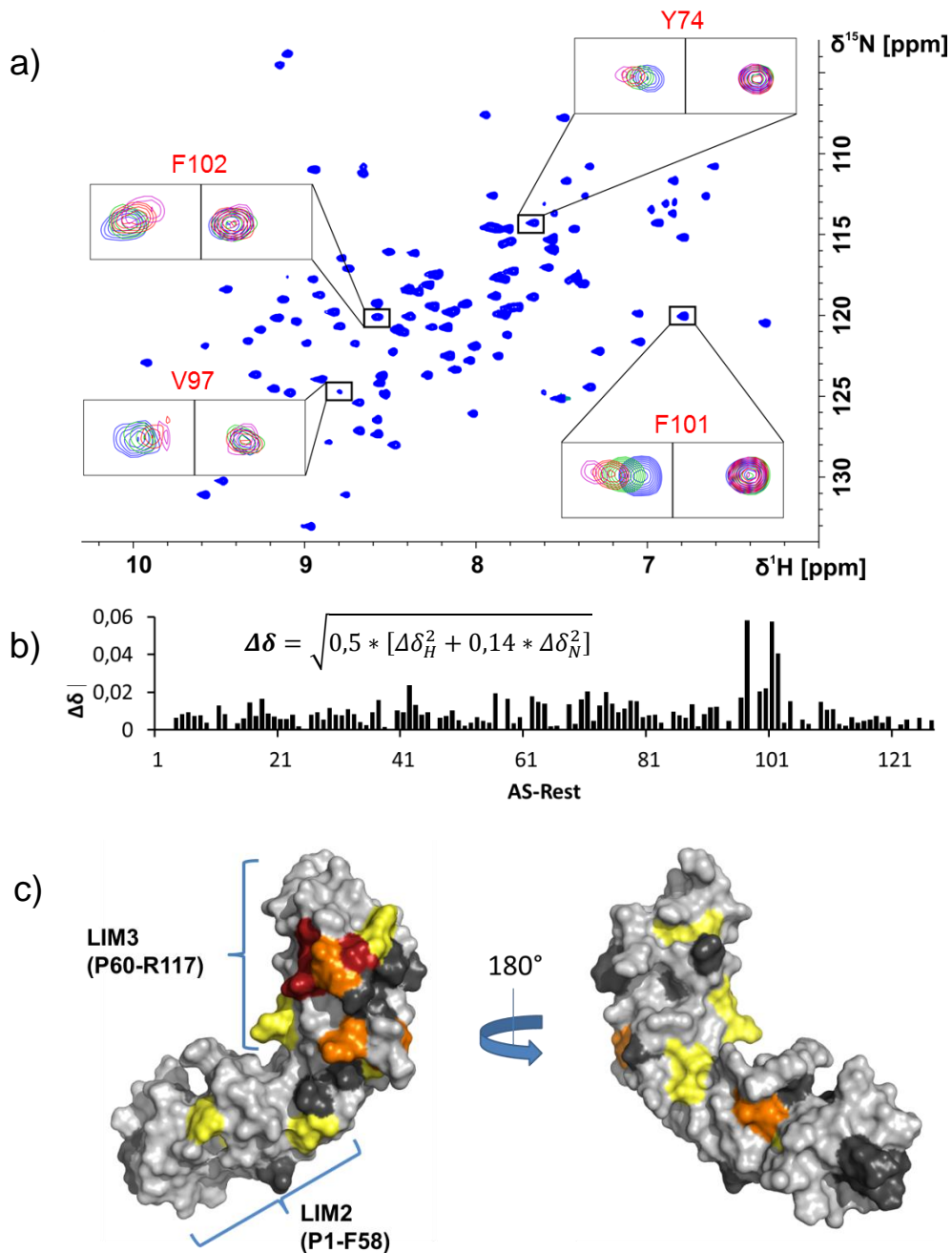


Abbildung 4.8: a) CSP-Interaktionsstudien zur Untersuchung der Paxillin-Integrin Interaktion. In den Vergrößerungen sind die Signale gezeigt welche die größten CSPs erfuhren. 200 μM ^{15}N -Paxillin-LIM2/3 vorgelegt (blau); + 0,5 eq (grün); + 1 eq (rot); + 2 eq (violett) Integrin β 3-cd (linke Vergrößerung) oder His₆-SUMO (Negativkontrolle, rechte Vergrößerung). Puffer-Bedingungen: 150 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaN₃, 1 mM DTT, 5% D₂O, pH = 8,0. b) CSP in Abhängigkeit des Aminosäurerests, berechnet mit der angegebenen Formel.^[201] c) CSP-mapping auf die Struktur von Paxillin LIM2/3. Die Aminosäure-Reste sind dabei folgendermaßen angefärbt: Rot: $\Delta\delta > 0,03\text{ppm}$; orange: $\Delta\delta > 0,015\text{ppm}$; gelb: $\Delta\delta > 0,01\text{ppm}$; hellgrau: $\Delta\delta < 0,01\text{ppm}$; dunkelgrau sind Reste, die nicht zugeordnet werden konnten (hauptsächlich Proline).

Die umgekehrte Titration, bei der ^{15}N -Integrin β 3-cd vorgelegt und mit zunehmenden Konzentrationen von Paxillin-LIM2/3 versetzt wurde, zeigte ein ähnliches Bild und mehrere Signale änderten sowohl ihre Lage, als auch ihre Intensität. Die Resonanzzuordnung von Integrin β 3-cd ist in der Literatur beschrieben^[218] und in der BMRB hinterlegt (BMRB-Eintrag: 15552). Die größten Signaländerungen traten dabei sowohl bei C-terminalen (T45, Y49, G51) als auch bei N-terminalen Resten (I9, T10) auf. Bei der Kontrolltitration mit His₆-SUMO konnten ebenfalls CSPs an den Resten am N-Terminus beobachtet werden, wohingegen die C-terminalen Aminosäuren keine Änderung erfahren. Vermutlich interagiert der sehr hydrophobe, membrannahe Bereich von Integrin- β 3 (Sequenz: KLLITI) unspezifisch mit mehreren Proteinen, und es ist nicht endgültig geklärt, inwieweit dieser Bereich noch in der Membran eingebettet ist und damit für Protein-Protein-Interaktionen überhaupt zugänglich ist.^[154] Die Bindung von Paxillin am C-Terminus von Integrin- β 3 scheint hingegen spezifisch zu sein und weitergehende Studien in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass verkürzte Integrin- β 3-Konstrukte ohne den hydrophoben membrannahen Bereich immer noch an Paxillin-LIM2/3 binden und dort vergleichbare CSPs hervorrufen.^[219]

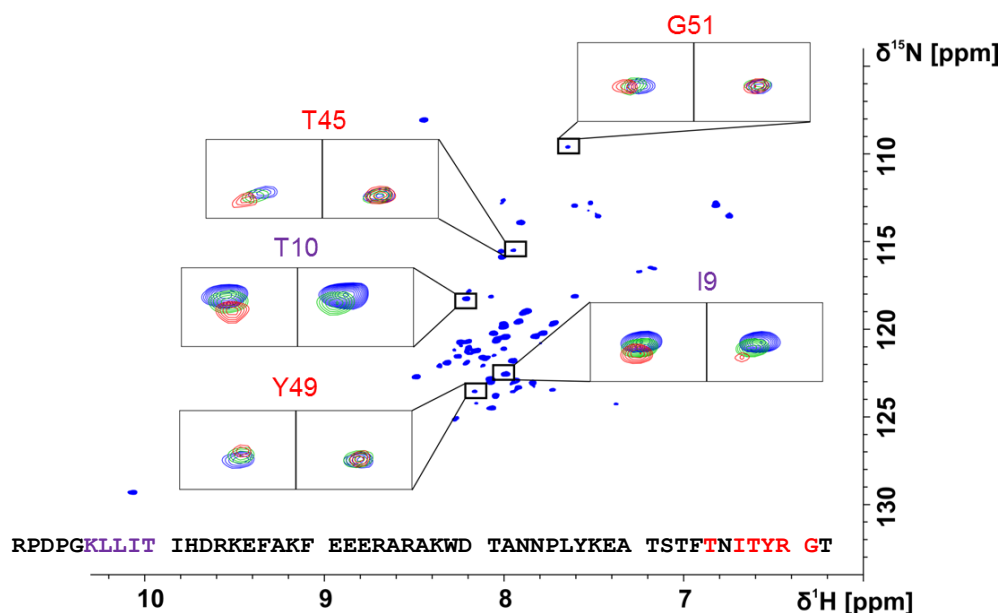


Abbildung 4.9: CSP-Interaktionsstudien zur Untersuchung der Paxillin-Integrin Interaktion. In den Vergrößerungen sind die Signale gezeigt welche die größten CSPs erfuhren. 50 μM ^{15}N -Integrin β 3-cd vorgelegt (blau); + 1 eq (grün); + 3 eq (rot) Paxillin-LIM2/3 (linke Vergrößerung) oder His₆-SUMO (Negativkontrolle, rechte Vergrößerung). Puffer-Bedingungen: 150 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaN₃, 1 mM DTT, 5% D₂O, pH = 6,2. Die betroffenen Reste sind außerdem in der Integrinsequenz hervorgehoben (rot: spezifisch mit Paxillin, violett: unspezifisch).

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte ließen keine Bestimmung der Dissoziationskonstante der Interaktion per *CSP-mapping* zu, da die Überlagerung der unspezifischen und der spezifischen Interaktion zu einer drastischen Verbreiterung der Signale mit zunehmender Integrinkonzentration führten und somit kein Endpunkt der Titration erreicht werden konnte. Die betrachtete Bindung ist aber eher am niedrig-affinen Ende des Spektrums der biologisch relevanten Interaktionen anzusiedeln, mit einer abgeschätzten Dissoziationskonstante K_D im hohen mikromolaren Bereich. In dieser Affinitätsregion liegen auch die charakterisierten Interaktionen von löslichen zytoplasmatischen Integrin-Domänen mit Talin^[220] oder Filamin^[221], wobei gezeigt wurde, dass die Affinität bei membrangebundenen Integrinen, aufgrund von zusätzlichen Interaktionen mit der Membran um ein Vielfaches höher liegen kann.^[222] Zudem ist nicht sicher, ob die untersuchten Konstrukte den Zustand der höchsten Affinität darstellen. Phosphorylierungen der zytoplasmatischen Domänen der Integrine haben nachgewiesener Weise einen Einfluss auf die Ausbildung des Interaktoms an Fokalen Adhäsionen, und auch in Paxillin-LIM2/3 wurden putative Phosphorylierungsstellen identifiziert, die eine Regulation dieser direkten Interaktion ermöglichen könnten.^[165]

Die erhaltenen Ergebnisse bezüglich einer direkten Interaktion zwischen Paxillin und Integrin konnten weiterhin durch zellbiologische und fluoreszenzmikroskopische Experimente im Rahmen der Dissertation von C. Paone in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. R. Hauck (Zellbiologie, Universität Konstanz) bestätigt werden.^[223]

5. Zusammenfassung und Ausblick

Paxillin ist ein essenzielles Multidomänen-Protein, welches in Fokalen Adhäsionen gefunden wird, wo es eine zentrale Rolle bei der Initiierung und Regulation von Prozessen der Zellmigration und der Signalübertragung einnimmt. Mit seiner Vielzahl an Protein-Protein-Interaktionsdomänen stellt Paxillin dabei eine Plattform für den Aufbau und die Maturation von Fokalen Adhäsionen dar und steht in Zusammenhang mit physiologischen Prozessen wie der embryonalen Entwicklung aber auch pathologischen Vorgängen wie Wachstum und Metastasierung von Tumoren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Struktur der LIM2/3-Tandem-Domäne aus Paxillin, die essenziell für die Lokalisation des Proteins an Fokalen Adhäsionen ist, per NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Zunächst wurde dazu mit Hilfe von multidimensionalen heteronuklearen NMR-Experimenten eine Resonanzzuordnung durchgeführt, wobei 97,3% der Rückgrat- und ein Großteil der Seitenketten-Resonanzen bestimmt werden konnten. Außerdem wurden verschiedene heteronuklear dispergierte NOESY-Spektren aufgenommen, woraus Abstandinformationen gewonnen werden konnten, die dann zusammen mit der Resonanzzuordnung zur Strukturberechnung verwendet wurden. Individuell betrachtet konnten die beiden Domänen mit einem RMSD von 0,77 Å (LIM2) und 0,78 Å (LIM3, Rückgrat-atome der 20 energetisch niedrigsten Strukturen) erhalten werden, während der Winkel zwischen den beiden Domänen in den berechneten Strukturen des Ensembles variiert und Werte von 100°-130° einnimmt.

Die in dieser Arbeit aufgeklärte Struktur gibt zum ersten Mal einen Einblick in die Anordnung und Dynamik einer freien LIM-Tandem-Domäne und könnte zum weiteren Verständnis der Funktionsweise dieses oftmals repetitiv vorkommenden Strukturelements beitragen. Die Berechnung wurde mit Cyana im Torsionswinkel-Raum durchgeführt. Für eine detailliertere Analyse und eine weitere Verfeinerung der Struktur könnten zukünftig Rechnungen mit Kraftfeldern auf Basis von kartesischen Koordinaten (AMBER, X-PLOR) und unter Berücksichtigung von explizitem Wasser durchgeführt werden. Außerdem sollte die Aufnahme von

residualen dipolaren Kopplungen dabei helfen, die Struktur an sich und insbesondere die Orientierung der beiden Domänen zueinander zu validieren.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden *chemical shift perturbation* (CSP)-Experimente durchgeführt, und es konnte eine direkte Interaktion zwischen Paxillin und der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 nachgewiesen werden. Die vorhandene Resonanzzuordnung erlaubte außerdem die Identifikation des Bindungsepitops in Paxillin LIM3, wobei Aminosäuren im Bereich eines flexiblen Loops (V97-F101) die intensivsten Änderungen der chemischen Verschiebung erfuhren und daher vermutlich hauptsächlich an der Interaktion beteiligt sind. In Integrin- β 3 konnte sowohl eine unspezifische, hydrophobe Proteinbindestelle im membranahen Teil als auch ein für Paxillin spezifisches Bindungsepitop am C-Terminus (T45-T52) identifiziert werden. Eine exakte Bestimmung der Dissoziationskonstante konnte aufgrund der Überlagerung der unspezifischen und der spezifischen Interaktion, mit den in dieser Studie verwendeten Konstrukten nicht erreicht werden, vermutlich liegt sie jedoch im hohen mikromolaren Bereich. Für eine exakte quantitative Bestimmung der Dissoziationskonstante in zukünftigen Studien sollte zum einen das Konstrukt der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 optimiert werden, indem die hydrophoben Aminosäurereste des C-Terminus deletiert werden. Zum anderen könnten weitere biophysikalische Methoden wie Oberflächen-Plasmonen-Resonanz, Isotherme Titrations-Kalorimetrie oder Thermophorese verwendet werden, um die CSP-basierten Experimente zu ergänzen.

Der Nachweis dieser direkten Interaktion zwischen Paxillin und Integrinen schließt eine lange bestehende Lücke im Verständnis vom Aufbau der Fokalen Adhäsionen und erklärt die Rolle der LIM-Domänen bei der frühen Lokalisation von Paxillin an neu gebildeten Fokalen Komplexen. Damit wurde die Basis für weitere Studien gelegt, die nun auf die exakte Quantifizierung der thermodynamischen Parameter der Interaktion und die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Proteinkomplexes abzielen. Des Weiteren soll zukünftig die Regulation dieser Interaktion durch Phosphorylierungen in Bindungsstudien und auch in zellulärem Kontext untersucht werden, um einem ganzheitlichen Verständnis der Prozesse an Fokalen Adhäsionen einen weiteren Schritt näher zu kommen.

6. Experimenteller Teil

6.1 Protein-Expression und -Reinigung

Die Expression und Reinigung der Proteine wurde von C. Paone und S. Feindler-Boeckh in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Hauck an der Universität Konstanz durchgeführt.^[223] Dabei wurde jeweils ein peT24a Plasmid verwendet auf dem das entsprechende His₆-SUMO-Fusionsprotein codiert ist (Die Sequenzen der jeweiligen Plasmide sind auf der beigelegten CD-ROM hinterlegt). Dieses wurde in E.coli BL21 (DE3) transformiert, wodurch die Überexpression mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden konnte (0,5 mM IPTG bei einer optischen Dichte von etwa 0,5). Die Aufzucht der Bakterien wurde in LB-Medium (unmarkierte Proteine) oder M9-Medium (¹⁵N/¹³C-markierte Proteine) durchgeführt und für die Expression von Paxillin-LIM2/3 wurde zusätzlich 100 μM ZnSO₄ zugesetzt.

LB-Medium:

10 g/L Trypton
5 g/L Hefe-Extrakt
5 g/L NaCl
autoklaviert und abgekühlt
50 mg/L Kanamycin
(100 μM ZnSO₄)

M9-Minimalmedium:

1 g/L NaCl
3 g/L KH₂PO₄
6 g/L Na₂HPO₄
1 g/L ¹⁵NH₄Cl
pH mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt
autoklaviert und abgekühlt
2 mM MgSO₄
100 μM CaCl₂
10 mL/L 100 x BME-Vitamine
20 mL/L 20%ige (¹³C-)Glukose
100 mg/L Celtone (¹³C/¹⁵N)
50 mg/L Kanamycin
(100 μM ZnSO₄)

Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung für 3 x 2 min, wurden die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert (50.000 g, 60 min) und der lösliche Überstand über Nickel-Affinitätschromatografie gereinigt, wobei die His₆-getaggtten Proteine bei einer Imidazolkonzentration von ~200 mM eluiert wurden. Die Probe wurde anschließend dialysiert und durch Zugabe von ULP1 (1 mg pro 20 mg His₆-SUMO-Fusionsprotein) wurde der His₆-SUMO-tag entfernt. Das Abspaltprodukt sowie die ebenfalls His₆-getaggte ULP1 wurden anschließend durch eine erneute Nickel-Affinitätschromatografie vom gewünschten Protein separiert. Die Pufferbedingungen der Reinigung waren wie folgt:

Lysepuffer:

50 mM Na₂HPO₄; pH 8,0; 1 M NaCl; Proteaseinhibitoren (PMSF 10 µM, Aprotinin 10 µg/mL, Pefablock 10 µg/mL, Leupeptin 5 µg/mL).

His-Trap-Puffer A:

50 mM Na₂HPO₄; pH 8,0; 1 M NaCl.

His-Trap-Puffer B:

50 mM Na₂HPO₄; pH 8,0; 0,5 M NaCl; 0,5 M Imidazol.

Dialysepuffer:

25 mM Na₂HPO₄; pH 8,0; 150 mM NaCl.

6.2 NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer mit H/C/N-TCl-*cryo*-Probenkopf aufgenommen. Prozessiert und analysiert wurden die Spektren mit dem Programm Topspin[®] v2.1-3.2 (Bruker). Dreidimensionale Spektren wurden unter Bedingungen des *non-uniform sampling* (NUS)^[224] aufgenommen, um die Auflösung in den indirekten Dimensionen bei gleicher Messzeit zu verbessern. Typischerweise wurden dabei 25% der Datenpunkte aufgenommen (50% bei NOESY-Spektren, um Artefakte auf Grund

der großen Anzahl an Signalen zu vermeiden). Bei der Prozessierung wurden die Daten per rekursiver multidimensionaler Dekomposition (R-MDD, implementiert in Topspin[®] v3.1)^[225] zum kompletten Spektrum rekonstruiert. Die NOESY-Mischzeit betrug jeweils 120 ms. Die Proteine wurden für die NMR-Experimente durch Ultrafiltration (Amicon Ultra-4 Ultracel-3 kDa Zentrifugen-Filtern (Millipore)) umgepuffert und aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration wurde per UV/Vis-Spektroskopie anhand der Extinktion bei 280 nm (A_{280}) gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz bestimmt: $c = A_{280}/(\epsilon_{280} * d)$. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm wurden mit der Software ProtParam (ExpASY Web-Server)^[226] aus der Sequenz der Proteine bestimmt (Paxillin-LIM2/3: $\epsilon_{280} = 22920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Integrin β 3-cd: $\epsilon_{280} = 8480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Tabelle 6.1 gibt eine Übersicht über die aufgenommenen NMR-Spektren. Die finalen Pufferbedingungen der verwendeten Proben waren folgendermaßen:

Probe A: 600 μL ^{13}C - ^{15}N -Paxillin-LIM2/3 (500 μM), 150 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaN_3 , 1 mM DTT, 95% H_2O /5% D_2O , pH = 7,5.

Probe B: 500 μL ^{13}C - ^{15}N -Paxillin-LIM2/3 (500 μM), 150 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaN_3 , 1 mM DTT, 100% D_2O , pH = 7,5

Titration T1: 180 μL ^{15}N -Paxillin-LIM2/3 (200 μM) vorgelegt; titriert mit Integrin β 3-cd (660 μM); jeweils in: 150 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaN_3 , 1 mM DTT, 95% H_2O /5% D_2O , pH = 8,0.

Titration T2: 180 μL ^{15}N -Paxillin-LIM2/3 (200 μM); titriert mit His₆-SUMO (660 μM); jeweils in: 150 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaN_3 , 1 mM DTT, 95% H_2O /5% D_2O , pH = 8,0.

Titration T3: 200 μL ^{15}N -Integrin β 3-cd (50 μM) vorgelegt; titriert mit Paxillin-LIM2/3 (500 μM); jeweils in: 150 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaN_3 , 1 mM DTT, 5% D_2O , pH = 6,2

Titration **T4**: 200 μL ^{15}N -Integrin β 3-cd (50 μM) vorgelegt; titriert mit ^{15}N -His $_6$ -SUMO (500 μM); jeweils in: 150 mM NaCl, 50 mM Na $_2$ HPO $_4$, 4 mM NaN $_3$, 1 mM DTT, 5% D $_2$ O, pH = 6,2

Tabelle 6.1: Liste der durchgeführten NMR-Experimente. Die Originaldatensätze können sowohl auf dem *storecenter* der NMR-facility der Universität Konstanz (/nethdd/FB_Chemie/nmr_data/zita600_M520a/Andi_Prestel/...) als auch unter dem fileserver der AG-Möller (/minerva/andi/Spektren/data/andi/nmr/...) unter den genannten Ordnern gefunden werden.

Probe/ Titration	Experiment	Bruker Pulsprogramm	Ordnername
A	^1H - ^{15}N -HSQC	hsqcetf3gpsi	AP_131017_Paxillin/2
A	NHCO	hncogp3d	AP_131017_Paxillin/8
A	NH(CA)CO	hncacogp3d	AP_131022_Paxillin/5
A	CBCA(CO)NH	cbcaconhgpwg3d	AP_131017_Paxillin/12
A	CBCANH	cbcanhgpwg3d	AP_131030_Paxillin/5
A	HNCA	hncagpwg3d	AP_131022_Paxillin/12
A	HBHA(CO)NH	hbhaconhgpwg3d	AP_131022_Paxillin/15
A	(H)CC(CO)NH	hccconhgpwg3d3	AP_131107_Paxillin/3
A	H(CCCO)NH	hccconhgpwg3d2	AP_131107_Paxillin/4
A	NOESY- ^{15}N -HSQC	noesyhsqcf3gpwg3d	AP_131030_Paxillin/7
A	NOESY- $^{13}\text{C}_{\text{ali.}}$ -HSQC	noesyhsqcetgpsi3d	AP_131107_Paxillin/6
A	^1H - ^{15}N -NOE-HSQC	hsqcnoef3gpsi	AP_131120_Paxillin/2-4
B	^1H - $^{13}\text{C}_{\text{ali.}}$ -HSQC	hsqcctetgpsp	AP_131122_Paxillin/6
B	^1H - $^{13}\text{C}_{\text{aro.}}$ -HSQC	hsqcctetgpsp	AP_131210_Paxillin/13
B	H(C)CH-TOCSY	hcchdigp3d	AP_131122_Paxillin/7
B	(H)CCH-TOCSY	hcchdigp3d2	AP_131122_Paxillin/9
B	H(C)CH-COSY	hcchcogp3d	AP_131127_Paxillin/4
B	NOESY- $^{13}\text{C}_{\text{ali.}}$ -HSQC	noesyhsqcetgpsi3d	AP_131127_Paxillin/3
B	NOESY- $^{13}\text{C}_{\text{aro.}}$ -HSQC	noesyhsqcetgpsi3d	AP_140124_Paxillin/4
T1	^1H - ^{15}N -HSQC	hsqcetf3gpsi	AP_140402_Paxillin
T2	^1H - ^{15}N -HSQC	hsqcetf3gpsi	AP_140403_Paxillin
T3	^1H - ^{15}N -HSQC	hsqcetf3gpsi	AP_140728_Beta3Integrin_1
T4	^1H - ^{15}N -HSQC	hsqcetf3gpsi	AP_140728_Beta3Integrin_2

6.2.1 Bestimmung der Rückgratdynamik aus ^1H - ^{15}N -NOEs

Für die Auswertungen der heteronuklearen ^1H - ^{15}N -NOEs wurde ein Spektrum ohne NOE (unter ^1H -Sättigung) und ein Spektrum in Gegenwart des ^1H - ^{15}N -NOE aufgenommen (Bruker-Pulsprogramm: hsqcnoef3gpsi). Die Signale dieser beiden Sub-Spektren wurden mit **CARA v1.8.4.2** integriert und das Verhältnis ($I_{\text{noNOE}}/I_{\text{NOE}}$) bestimmt. Insgesamt wurden drei solcher Datensätze aufgenommen und ausgewertet. Deren Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Abbildung 4.5c gegen die Aminosäurenummer aufgetragen.

6.2.2 Untersuchung der Deamidierung

Um die Deamidierung zu untersuchen wurde Paxillin-LIM2/3 (200 μM ; 500 μL ; Pufferbedingungen: 150 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 , 4 mM NaN_3 , 1 mM DTT, 95% H_2O /5% D_2O , pH = 8,0) bei 37°C gelagert und in Abständen von einem Tag wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren aufgenommen.

6.3 *Verwendete Computerprogramme*

Die Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm wurden mit der Software **ProtParam** (ExpPASy Web-Server)^[226] aus der Sequenz der Proteine bestimmt.

Die Resonanzzuordnung wurde mit **CARA v1.8.4.2**^[185] durchgeführt, wobei die Signale in den verschiedenen 3D-Spektren zunächst manuell indiziert wurden, um dann mit dem implementierten Programm **Autolink II v0.8.7**^[186] automatisiert zugeordnet zu werden, wobei ~85% der Systeme erhalten wurden. Die restliche Rückgrat-Zuordnung sowie die Zuordnung der Seitenketten wurden manuell durchgeführt.

Die Indizierung und Quantifizierung der NOESY-Kreuzsignale wurde mit dem Programm **ATNOS**^[197] (implementiert im Softwarepaket **UNIO'10 v2.0.2**^[227]) durchgeführt.

Mit **TALOS-N**^[205] wurden ϕ - und ψ - Rückgrat-Winkel auf der Basis der ermittelten chemischen Verschiebungen berechnet.

Die Strukturberechnung wurde mit **Cyana v3.0**^[199] durchgeführt, wobei als Input die Proteinsequenz, Resonanzzuordnung (CARA), NOESY-Peaklisten (ATNOS), Winkel-*restraints* (TALOS-N) sowie in späteren Zyklen Abstands- und Winkel-*restraints* der Zinkkoordination diente. Als Startstruktur wurde zu Beginn eine *random coil* Peptidkette verwendet und bei sukzessiven Runs jeweils die finale Struktur einer vorhergehenden Rechnung. Der Input wurde dabei durch Analyse der Strukturverletzungen der vorhergehenden Rechnung verfeinert, indem fehlerhaft zugeordnete NOEs oder Winkel entfernt und manuell zugeordnete NOE-Kontakte eingefügt wurden.

Die Strukturen wurden mit **PyMOL v1.3** (DeLano Scientific) visualisiert und analysiert.

Literaturverzeichnis Teil II

- [139] R. Horwitz; D. Webb, *Cell migration*, *Curr. Biol.*, **2003**, *13*, R756-R759.
- [140] S. Li; J. L. Guan; S. Chien, *Biochemistry and biomechanics of cell motility*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2005**, *7*, 105-150.
- [141] K. Baumann, *Cell migration: Making contacts while on the move*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2015**, *16*, 3-3.
- [142] R. J. Petrie; A. D. Doyle; K. M. Yamada, *Random versus directionally persistent cell migration*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2009**, *10*, 538-549.
- [143] C. D. Madsen; S. Hooper; M. Tozluoglu; A. Bruckbauer; G. Fletcher; J. T. Epler; P. A. Bates; B. Thompson; E. Sahai, *STRIPAK components determine mode of cancer cell migration and metastasis*, *Nat. Cell Biol.*, **2015**, *17*, 68-80.
- [144] M. Vicente-Manzanares; D. J. Webb; A. R. Horwitz, *Cell migration at a glance*, *J. Cell. Sci.*, **2005**, *118*, 4917-4919.
- [145] T. J. Mitchison; L. P. Cramer, *Actin-Based Cell Motility and Cell Locomotion*, *Cell*, **1996**, *84*, 371-379.
- [146] T. M. E. Scales; M. Parsons, *Spatial and temporal regulation of integrin signalling during cell migration*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2011**, *23*, 562-568.
- [147] D. D. Schlaepfer; C. R. Hauck; D. J. Sieg, *Signaling through focal adhesion kinase*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **1999**, *71*, 435-478.
- [148] H. Shams; M. R. K. Mofrad, *Molecular Mechanisms Underlying the Inside-Out Signaling through Focal Adhesions*, *Biophys. J.*, **2014**, *106*, 574a.
- [149] P. Kanchanawong; G. Shtengel; A. M. Pasapera; E. B. Ramko; M. W. Davidson; H. F. Hess; C. M. Waterman, *Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions*, *Nature*, **2010**, *468*, 580-584.
- [150] R. O. Hynes, *Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines*, *Cell*, **2002**, *110*, 673-687.
- [151] S. J. Shattil; C. Kim; M. H. Ginsberg, *The final steps of integrin activation: the end game*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2010**, *11*, 288-300.
- [152] S. Tadokoro; S. J. Shattil; K. Eto; V. Tai; R. C. Liddington; J. M. de Pereda; M. H. Ginsberg; D. A. Calderwood, *Talin binding to integrin β tails: a final common step in integrin activation*, *Sci*, **2003**, *302*, 103-106.
- [153] K. L. Wegener; A. W. Partridge; J. Han; A. R. Pickford; R. C. Liddington; M. H. Ginsberg; I. D. Campbell, *Structural basis of integrin activation by talin*, *Cell*, **2007**, *128*, 171-182.

- [154] T.-L. Lau; C. Kim; M. H. Ginsberg; T. S. Ulmer, *The structure of the integrin $\alpha 5\beta 3$ transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling*, EMBO, **2009**, *28*, 1351-1361.
- [155] C. E. Turner, *Molecules in focus Paxillin*, Int. J. Biochem. Cell. Biol., **1998**, *30*, 955-959.
- [156] C. E. Turner, *Paxillin and focal adhesion signalling*, Nat. Cell Biol., **2000**, *2*, E231-E236.
- [157] S. M. Bokobza; L. Ye; H. G. Kynaston; W. G. Jiang, *Growth and differentiation factor-9 promotes adhesive and motile capacity of prostate cancer cells by up-regulating FAK and Paxillin via Smad dependent pathway*, Oncol. Rep., **2010**, *24*, 1653-1659.
- [158] D. W. Wu; Y. W. Cheng; J. Wang; C. Y. Chen; H. Lee, *Paxillin predicts survival and relapse in non-small cell lung cancer by microRNA-218 targeting*, Cancer Res., **2010**, *70*, 10392-10401.
- [159] C. E. Turner; J. T. Miller, *Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region*, J. Cell. Sci., **1994**, *107*, 1583-1591.
- [160] S. M. Thomas; P. Soriano; A. Imamoto, *Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing the cytoskeleton*, Nature, **1995**, *376*, 267-271.
- [161] R. B. Birge; J. E. Fajardo; C. Reichman; S. E. Shoelson; Z. Songyang; L. C. Cantley; H. Hanafusa, *Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts*, Mol. Cell Biol., **1993**, *13*, 4648-4656.
- [162] Y. Shen; G. Schneider; J.-F. Cloutier; A. Veillette; M. D. Schaller, *Direct association of protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST with paxillin*, J. Biol. Chem., **1998**, *273*, 6474-6481.
- [163] V. B. Rathore; M. Okada; P. J. Newman; D. K. Newman, *Paxillin family members function as Csk-binding proteins that regulate Lyn activity in human and murine platelets*, Biochem. J., **2007**, *403*, 275-281.
- [164] M. C. Brown; J. A. Perrotta; C. E. Turner, *Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding*, J. Cell Biol., **1996**, *135*, 1109-1123.
- [165] M. C. Brown; J. A. Perrotta; C. E. Turner, *Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin*, MBoC, **1998**, *9*, 1803-1816.
- [166] M. D. Schaller; C. A. Otey; J. D. Hildebrand; J. T. Parsons, *Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains*, J. Cell Biol., **1995**, *130*, 1181-1187.
- [167] L. M. Chen; D. Bailey; C. Fernandez-Valle, *Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells*, J. Neurosci., **2000**, *20*, 3776-3784.

- [168] T. Tanaka; R. Yamaguchi; H. Sabe; K. Sekiguchi; J. M. Healy, *Paxillin association in vitro with integrin cytoplasmic domain peptides*, FEBS Lett., **1996**, 399, 53-58.
- [169] J. L. Kadrmaz; M. C. Beckerle, *The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **2004**, 5, 920-931.
- [170] K. L. Schmeichel; M. C. Beckerle, *Molecular dissection of a LIM domain*, MBoC, **1997**, 8, 219-230.
- [171] G. C. Pérez-Alvarado; C. Miles; J. W. Michelsen; H. A. Louis; D. R. Winge; M. C. Beckerle; M. F. Summers, *Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP*, Nat. Struct. Mol. Biol., **1994**, 1, 388-398.
- [172] R. Konrat; R. Weiskirchen; B. Kräutler; K. Bister, *Solution structure of the carboxyl-terminal LIM domain from quail cysteine-rich protein CRP2*, J. Biol. Chem., **1997**, 272, 12001-12007.
- [173] A. Velyvis; Y. Yang; C. Wu; J. Qin, *Solution structure of the focal adhesion adaptor PINCH LIM1 domain and characterization of its interaction with the integrin-linked kinase ankyrin repeat domain*, J. Biol. Chem., **2001**, 276, 4932-4939.
- [174] J. E. Deane; D. P. Ryan; M. Sunde; M. J. Maher; J. M. Guss; J. E. Visvader; J. M. Matthews, *Tandem LIM domains provide synergistic binding in the LMO4: Ldb1 complex*, EMBO, **2004**, 23, 3589-3598.
- [175] G. Kontaxis; R. Konrat; B. Krautler; R. Weiskirchen; K. Bister, *Structure and intramodular dynamics of the amino-terminal LIM domain from quail cysteine- and glycine-rich protein CRP2*, Biochemistry, **1998**, 37, 7127-7134.
- [176] J. E. Deane; J. P. Mackay; A. H. Kwan; E. Y. Sum; J. E. Visvader; J. M. Matthews, *Structural basis for the recognition of Ldb1 by the N-terminal LIM domains of LMO2 and LMO4*, EMBO J., **2003**, 22, 2224-2233.
- [177] K. Wuthrich; G. Wider; G. Wagner; W. Braun, *Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution proton nuclear magnetic resonance*, J. Mol. Biol., **1982**, 155, 311-319.
- [178] A. Dubs; G. Wagner; K. Wuthrich, *Individual assignments of amide proton resonances in the proton NMR spectrum of the basic pancreatic trypsin inhibitor*, Biochim. Biophys. Acta, **1979**, 577, 177-194.
- [179] A. Bax; S. Grzesiek, *Methodical advances in protein NMR*, Acc. Chem. Res., **1993**, 26, 131-138.
- [180] L. E. Kay; M. Ikura; R. Tschudin; A. Bax, *Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins*, J. Magn. Reson. (1969), **1990**, 89, 496-514.
- [181] S. Grzesiek; A. Bax, *Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR*, J. Am. Chem. Soc., **1992**, 114, 6291-6293.

- [182] A. G. Palmer; J. Cavanagh; P. E. Wright; M. Rance, *Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy*, J. Magn. Reson. (1969), **1991**, 93, 151-170.
- [183] R. T. Clubb; V. Thanabal; G. Wagner, *A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intrasidue ^1HN , ^{15}N , and ^{13}C chemical shifts in ^{15}N - ^{13}C -labelled proteins*, J. Magn. Reson. (1969), **1992**, 97, 213-217.
- [184] S. Grzesiek; A. Bax, *An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins*, J. Magn. Reson. (1969), **1992**, 99, 201-207.
- [185] R. Keller, *Optimizing the Process of Nuclear Magnetic Resonance Spectrum Analysis and Computer Aided Resonance Assignment*, PhD-thesis, ETH Zürich **2004**.
- [186] J. E. Masse; R. Keller, *AutoLink: automated sequential resonance assignment of biopolymers from NMR data by relative-hypothesis-prioritization-based simulated logic*, J. Magn. Reson., **2005**, 174, 133-151.
- [187] G. W. Vuister; A. Bax, *Resolution enhancement and spectral editing of uniformly ^{13}C -enriched proteins by homonuclear broadband ^{13}C decoupling*, J. Magn. Reson. (1969), **1992**, 98, 428-435.
- [188] A. Bax; G. M. Clore; A. M. Gronenborn, *^1H - ^1H correlation via isotropic mixing of ^{13}C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning ^1H and ^{13}C spectra of ^{13}C -enriched proteins*, J. Magn. Reson. (1969), **1990**, 88, 425-431.
- [189] A. Bax; G. M. Clore; P. C. Driscoll; A. M. Gronenborn; M. Ikura; L. E. Kay, *Practical aspects of proton-carbon-carbon-proton three-dimensional correlation spectroscopy of ^{13}C -labeled proteins*, J. Magn. Reson. (1969), **1990**, 87, 620-627.
- [190] D. Marion; P. C. Driscoll; L. E. Kay; P. T. Wingfield; A. Bax; A. M. Gronenborn; G. M. Clore, *Overcoming the overlap problem in the assignment of proton NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear proton-nitrogen-15 Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1.β*, Biochemistry, **1989**, 28, 6150-6156.
- [191] S. Grzesiek; J. Anglister; A. Bax, *Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Enriched Proteins by Isotropic Mixing of ^{13}C Magnetization*, J. Magn. Reson., Ser B, **1993**, 101, 114-119.
- [192] M. Karplus, *Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance*, J. Am. Chem. Soc., **1963**, 85, 2870-2871.
- [193] A. Saupe; G. Englert, *High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules*, Phys. Rev. Lett., **1963**, 11, 462-464.
- [194] A. W. Overhauser, *Polarization of Nuclei in Metals*, PhRv, **1953**, 92, 411-415.
- [195] F. A. L. Anet; A. J. R. Bourn, *Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects*, J. Am. Chem. Soc., **1965**, 87, 5250-5251.

- [196] C. R. Jones; C. P. Butts; J. N. Harvey, *Accuracy in determining interproton distances using Nuclear Overhauser Effect data from a flexible molecule*, J. Org. Chem., **2011**, 7, 145-150.
- [197] T. Herrmann; P. Güntert; K. Wüthrich, *Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS*, J. Biomol. NMR, **2002**, 24, 171-189.
- [198] T. Herrmann; P. Güntert; K. Wüthrich, *Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA*, J. Mol. Biol., **2002**, 319, 209-227.
- [199] P. Güntert, in *Protein NMR Techniques*, Springer, **2004**, pp. 353-378.
- [200] C. D. Schwieters; J. J. Kuszewski; N. Tjandra; G. M. Clore, *The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package*, J. Magn. Reson., **2003**, 160, 65-73.
- [201] M. P. Williamson, *Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., **2013**, 73, 1-16.
- [202] E. Hochuli; W. Bannwarth; H. Dobeli; R. Gentz; D. Stuber, *Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent*, Nat. Biotech., **1988**, 6, 1321-1325.
- [203] T. R. Butt; S. C. Edavettal; J. P. Hall; M. R. Mattern, *SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins*, Protein Expression Purif., **2005**, 43, 1-9.
- [204] M. P. Malakhov; M. R. Mattern; O. A. Malakhova; M. Drinker; S. D. Weeks; T. R. Butt, *SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins*, J. Struct. Funct. Genom., **2004**, 5, 75-86.
- [205] Y. Shen; A. Bax, *Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks*, J. Biomol. NMR, **2013**, 56, 227-241.
- [206] I. L. Alberts; K. Nadassy; S. J. Wodak, *Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures*, Protein Sci., **1998**, 7, 1700-1716.
- [207] J. Pelton; D. Torchia; N. Meadow; S. Roseman, *Tautomeric states of the active-site histidines of phosphorylated and unphosphorylated IIIGlc, a signal-transducing protein from Escherichia coli, using two-dimensional heteronuclear NMR techniques*, Protein Sci., **1993**, 2, 543-558.
- [208] P. Barraud; M. Schubert; F. H.-T. Allain, *A strong ¹³C chemical shift signature provides the coordination mode of histidines in zinc-binding proteins*, J. Biomol. NMR, **2012**, 53, 93-101.
- [209] E. Krissinel; K. Henrick, *Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions*, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., **2004**, 60, 2256-2268.
- [210] W. Kabsch; C. Sander, *Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features*, Biopolymers, **1983**, 22, 2577-2637.

- [211] C. Toniolo; E. Benedetti, *Intramolecularly Hydrogen-Bonded Peptide Conformation*, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **1980**, 9, 1-44.
- [212] C. Venkatachalam, *Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units*, Biopolymers, **1968**, 6, 1425-1436.
- [213] H. F. Qin XR, Yokoyama S, *Solution structure of the second LIM domain of particularly interesting new Cys-His protein (PINCH)*, **2006**.
- [214] M.-G. C. Schallus T, Edlich C, *Solution structure of the C-terminal LIM domain of MLP/CRP3*, **2013**.
- [215] N. E. Robinson; A. B. Robinson, *Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2001**, 98, 4367-4372.
- [216] N. Robinson; Z. Robinson; B. Robinson; A. Robinson; J. Robinson; M. Robinson; A. Robinson, *Structure-dependent nonenzymatic deamidation of glutamyl and asparagyl pentapeptides*, J. Pept. Res., **2004**, 63, 426-436.
- [217] N. E. Robinson; A. B. Robinson, *Molecular clocks*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2001**, 98, 944-949.
- [218] C. L. Oxley; N. J. Anthis; E. D. Lowe; I. Vakonakis; I. D. Campbell; K. L. Wegener, *An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding*, J. Biol. Chem., **2008**, 283, 5420-5426.
- [219] J. V. Ude, *personal communication*, **2015**.
- [220] N. J. Anthis; K. L. Wegener; D. R. Critchley; I. D. Campbell, *Structural diversity in integrin/talin interactions*, Structure, **2010**, 18, 1654-1666.
- [221] J. Liu; M. Das; J. Yang; S. S. Ithychanda; V. P. Yakubenko; E. F. Plow; J. Qin, *Structural mechanism of integrin inactivation by filamin*, Nat. Struct. Mol. Biol., **2015**, 22, 383-389.
- [222] D. T. Moore; P. Nygren; H. Jo; K. Boesze-Battaglia; J. S. Bennett; W. F. DeGrado, *Affinity of talin-1 for the β 3-integrin cytosolic domain is modulated by its phospholipid bilayer environment*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2012**, 109, 793-798.
- [223] C. Paone, *Dissertation*, University of Konstanz **2015**.
- [224] D. Rovnyak; D. P. Frueh; M. Sastry; Z.-Y. J. Sun; A. S. Stern; J. C. Hoch; G. Wagner, *Accelerated acquisition of high resolution triple-resonance spectra using non-uniform sampling and maximum entropy reconstruction*, J. Magn. Reson., **2004**, 170, 15-21.
- [225] V. Jaravine; I. Ibraghimov; V. Y. Orekhov, *Removal of a time barrier for high-resolution multidimensional NMR spectroscopy*, Nat. Methods, **2006**, 3, 605-607.
- [226] E. Gasteiger; C. Hoogland; A. Gattiker; M. R. Wilkins; R. D. Appel; A. Bairoch, *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*, Springer, **2005**.

- [227] P. Serrano; B. Pedrini; B. Mohanty; M. Geralt; T. Herrmann; K. Wüthrich, *The J-UNIO protocol for automated protein structure determination by NMR in solution*, *J. Biomol. NMR*, **2012**, 53, 341-354.

Anhang

A1) Restraints zur Definition der Zinkkoordination

a) znligands.upl (obere Abstandsbeschränkungen):

```
#-----  
#                               ZN Ligands 1  
#-----  
4 CYSZ ZN      7 CYS- CB      3.2  10.00E+00  
4 CYSZ ZN      4 CYSZ CB      3.2  1.00E+00 #Defined in lib  
4 CYSZ ZN      7 CYS- SG      2.4  10.00E+00  
4 CYSZ ZN     24 HIST ND1     2.2  10.00E+00  
4 CYSZ ZN     24 HIST CG      3.1  10.00E+00  
4 CYSZ ZN      4 CYSZ SG      2.4  10.00E+00  
4 CYSZ ZN     27 HIST ND1     2.2  10.00E+00  
4 CYSZ ZN     27 HIST CG      3.1  10.00E+00  
#-----  
#                               ZN Geometry 1  
#-----  
4 CYSZ SG      7 CYS- SG      3.9  10.00E+00  
4 CYSZ SG     24 HIST ND1     3.7  10.00E+00  
7 CYS- SG     24 HIST ND1     3.7  10.00E+00  
4 CYSZ SG     27 HIST ND1     3.7  10.00E+00  
7 CYS- SG     27 HIST ND1     3.7  10.00E+00  
24 HIST ND1   27 HIST ND1     3.5  10.00E+00  
#-----  
#                               ZN Ligands 2  
#-----  
30 CYSZ ZN     33 CYS- CB      3.2  10.00E+00  
30 CYSZ ZN     51 CYS- CB      3.2  10.00E+00  
30 CYSZ ZN     30 CYSZ CB      3.2  1.00E+00 #Defined in lib  
30 CYSZ ZN     33 CYS- SG      2.4  10.00E+00  
30 CYSZ ZN     51 CYS- SG      2.4  10.00E+00  
30 CYSZ ZN     30 CYSZ SG      2.4  10.00E+00  
30 CYSZ ZN     54 ASP OD1     2.25  10.00E+00  
30 CYSZ ZN     54 ASP CG      3.1  10.00E+00  
#-----  
#                               ZN Geometry 2  
#-----  
30 CYSZ SG     33 CYS- SG      3.9  10.00E+00  
30 CYSZ SG     51 CYS- SG      3.9  10.00E+00  
33 CYS- SG     51 CYS- SG      3.9  10.00E+00  
30 CYSZ SG     54 ASP OD1     3.7  10.00E+00  
33 CYS- SG     54 ASP OD1     3.7  10.00E+00  
51 CYS- SG     54 ASP OD1     3.7  10.00E+00  
#-----  
#                               ZN Ligands 3  
#-----  
63 CYSZ ZN     66 CYS- CB      3.2  10.00E+00  
63 CYSZ ZN     86 CYS- CB      3.2  10.00E+00  
63 CYSZ ZN     63 CYSZ CB      3.2  1.00E+00 #Defined in lib  
63 CYSZ ZN     66 CYS- SG      2.4  10.00E+00  
63 CYSZ ZN     86 CYS- SG      2.4  10.00E+00  
63 CYSZ ZN     63 CYSZ SG      2.4  10.00E+00  
63 CYSZ ZN     83 HIST ND1     2.2  10.00E+00  
63 CYSZ ZN     83 HIST CG      2.9  10.00E+00  
#-----
```

```

#
#-----
#                               ZN Geometry 3
#-----
63 CYSZ SG      66 CYS- SG      3.9  10.00E+00
63 CYSZ SG      86 CYS- SG      3.9  10.00E+00
66 CYS- SG      86 CYS- SG      3.9  10.00E+00
63 CYSZ SG      83 HIST ND1     3.7  10.00E+00
66 CYS- SG      83 HIST ND1     3.7  10.00E+00
86 CYS- SG      83 HIST ND1     3.7  10.00E+00
#-----
#
#                               ZN Ligands 4
#-----
89 CYSZ ZN      92 CYS- CB      3.2  10.00E+00
89 CYSZ ZN      110 CYS- CB     3.2  10.00E+00
89 CYSZ ZN      89 CYSZ CB      3.2  1.00E+00 #Defined in lib
89 CYSZ ZN      92 CYS- SG      2.4  10.00E+00
89 CYSZ ZN      110 CYS- SG     2.4  10.00E+00
89 CYSZ ZN      89 CYSZ SG      2.4  10.00E+00
89 CYSZ ZN      113 HIST ND1    2.25 10.00E+00
89 CYSZ ZN      113 HIST CG      3.1  10.00E+00
#-----
#
#                               ZN Geometry 4
#-----
89 CYSZ SG      92 CYS- SG      3.9  10.00E+00
89 CYSZ SG      110 CYS- SG     3.9  10.00E+00
92 CYS- SG      110 CYS- SG     3.9  10.00E+00
89 CYSZ SG      113 HIST ND1    3.7  10.00E+00
92 CYS- SG      113 HIST ND1    3.7  10.00E+00
110 CYS- SG      113 HIST ND1    3.7  10.00E+00
#-----
#

```

b) znligands.lol (untere Abstandsbeschränkungen):

```

#-----
#
#                               ZN Ligands 1
#-----
4 CYSZ ZN      7 CYS- CB      3.0  10.00E+00
4 CYSZ ZN      4 CYSZ CB      3.0  1.00E+00 #Defined in lib
4 CYSZ ZN      7 CYS- SG      2.25 10.00E+00
4 CYSZ ZN      24 HIST ND1     1.95  10.00E+00
4 CYSZ ZN      24 HIST CG      2.9  10.00E+00
4 CYSZ ZN      4 CYSZ SG      2.25 10.00E+00
4 CYSZ ZN      27 HIST ND1     1.95  10.00E+00
4 CYSZ ZN      27 HIST CG      2.9  10.00E+00
#-----
#
#                               ZN Geometry 1
#-----
4 CYSZ SG      7 CYS- SG      3.7  10.00E+00
4 CYSZ SG      24 HIST ND1     3.5  10.00E+00
7 CYS- SG      24 HIST ND1     3.5  10.00E+00
4 CYSZ SG      27 HIST ND1     3.5  10.00E+00
7 CYS- SG      27 HIST ND1     3.5  10.00E+00
24 HIST ND1    27 HIST ND1     3.3  10.00E+00
#-----
#
#                               ZN Ligands 2
#-----
30 CYSZ ZN      33 CYS- CB      3.0  10.00E+00
30 CYSZ ZN      51 CYS- CB      3.0  10.00E+00
30 CYSZ ZN      30 CYSZ CB      3.0  1.00E+00 #Defined in lib
30 CYSZ ZN      33 CYS- SG      2.25 10.00E+00
30 CYSZ ZN      51 CYS- SG      2.25 10.00E+00
30 CYSZ ZN      30 CYSZ SG      2.25 10.00E+00
30 CYSZ ZN      54 ASP OD1     1.95  10.00E+00
#-----
#

```

```

30 CYSZ ZN      54 ASP  CG      2.7  10.00E+00
#-----
#
#                               ZN Geometry 2
#-----
30 CYSZ SG      33 CYS- SG      3.7  10.00E+00
30 CYSZ SG      51 CYS- SG      3.7  10.00E+00
33 CYS- SG      51 CYS- SG      3.7  10.00E+00
30 CYSZ SG      54 ASP  OD1     3.5  10.00E+00
33 CYS- SG      54 ASP  OD1     3.5  10.00E+00
51 CYS- SG      54 ASP  OD1     3.5  10.00E+00
#-----
#-----
#                               ZN Ligands 3
#-----
63 CYSZ ZN      66 CYS- CB      3.0  10.00E+00
63 CYSZ ZN      86 CYS- CB      3.0  10.00E+00
63 CYSZ ZN      63 CYSZ CB      3.0  1.00E+00 #Defined in lib
63 CYSZ ZN      66 CYS- SG      2.25 10.00E+00
63 CYSZ ZN      86 CYS- SG      2.25 10.00E+00
63 CYSZ ZN      63 CYSZ SG      2.25 10.00E+00
63 CYSZ ZN      83 HIST ND1     1.95 10.00E+00
63 CYSZ ZN      83 HIST CG      2.9  10.00E+00
#-----
#                               ZN Geometry 3
#-----
63 CYSZ SG      66 CYS- SG      3.7  10.00E+00
63 CYSZ SG      86 CYS- SG      3.7  10.00E+00
66 CYS- SG      86 CYS- SG      3.7  10.00E+00
63 CYSZ SG      83 HIST ND1     3.5  10.00E+00
66 CYS- SG      83 HIST ND1     3.5  10.00E+00
86 CYS- SG      83 HIST ND1     3.5  10.00E+00
#-----
#-----
#                               ZN Ligands 4
#-----
89 CYSZ ZN      92 CYS- CB      3.0  10.00E+00
89 CYSZ ZN      110 CYS- CB     3.0  10.00E+00
89 CYSZ ZN      89 CYSZ CB      3.0  1.00E+00 #Defined in lib
89 CYSZ ZN      92 CYS- SG      2.25 10.00E+00
89 CYSZ ZN      110 CYS- SG     2.25 10.00E+00
89 CYSZ ZN      89 CYSZ SG      2.25 10.00E+00
89 CYSZ ZN      113 HIST ND1     1.95 10.00E+00
89 CYSZ ZN      113 HIST CG      2.9  10.00E+00
#-----
#                               ZN Geometry 4
#-----
89 CYSZ SG      92 CYS- SG      3.7  10.00E+00
89 CYSZ SG      110 CYS- SG     3.7  10.00E+00
92 CYS- SG      110 CYS- SG     3.7  10.00E+00
89 CYSZ SG      113 HIST ND1     3.5  10.00E+00
92 CYS- SG      113 HIST ND1     3.5  10.00E+00
110 CYS- SG     113 HIST ND1     3.5  10.00E+00
#-----

```

A2) CD-ROM

Die kompletten Daten der finalen Cyana-Berechnung sind auf der beigelegten CD-Rom hinterlegt (Ordner: Cyana_final_run50). Der input bestand dabei aus der kompletten Resonanzzuordnung (pax140326.prot), den Peaklisten der NOESY-Spektren (arod2o.peaks, C13d2o.peaks, C13h2o.peaks, N15h2o.peaks), der

Sequenz-Datei inklusive der 4 Zinkatome (pax_4ZN_2.seq), den Winkel-*restraints* (Pax_TalosN.aco), den manuell gepickten NOEs (manualNOE.upl), den *restraints* für die Zinkkoordination (znligands.upl, znligands.lol) sowie den Cyana-Skripts init.cya und AUTO.cya.

Außerdem befindet sich in diesem Ordner die pdb-Datei des berechneten Strukturensambles der 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie der Cyana-Zielfunktion (final.pdb), die final verwendeten NOE-Kontakte (final.upl) sowie ein Überblick über die verletzten Strukturparameter (final.ovw).

Auf der CD-ROM befindet sich außerdem die finale CARA-Datei der Resonanzzuordnung (Paxillin2.cara), aus Gründen des Speicherplatzes jedoch ohne die NMR-Spektren, die in den oben genannten Verzeichnissen (Tabelle 6.1) gefunden werden können.

Die Sequenzen der verwendeten Plasmide sind sowohl als Textdatei als auch als Moleküldatei für das Programm **CloneManager** auf der CD-ROM hinterlegt.

Dort befindet sich außerdem eine Ausgabe dieser Arbeit in elektronischer Form im PDF-Format.

