

Systematische Strukturvariationen oligoaminmodifizierter Peptide,
deren Synthese und biologische Anwendung

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Maryna Abacilar
aus Sumy (Ukraine)

Marburg/Lahn 2017

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am 13.01.2017

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Geyer

Zweitgutachter: Prof. Dr. L.-O. Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2017

Meiner Familie

«Ох, довгий шлях сей, тяжко йти по йому,

Найтяжчий для того, хто одинокий!

Та не сама я на шляху тяжкому,

Я не сама мандрую в світ широкий.

«Самій не довго збитися з путі,

Та трудно з неї збитись у гурті».

[Леся Українка – „Мій шлях“, 22 травня 1890]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2012 bis Januar 2017 unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Geyer an der Philipps-Universität Marburg.

Danksagung

An der Entstehung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt, denen ich danken möchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. A. Geyer für die Vergabe des Themas, intensive Betreuung und für die vielen Freiheiten bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. L.-O. Essen möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Danken möchte ich auch den analytischen Abteilungen der Philipps-Universität Marburg für die zahlreichen Messungen. Insbesondere möchte ich mich bei der NMR-Abteilung unter der Leitung von Frau Dr. X. Xie für die Aufnahme von NMR-Spektren bedanken. Des Weiteren danke ich der massenspektrometrischen Abteilung unter der Leitung von Herrn Dr. U. Linne für die Anfertigung von hochaufgelösten Massenspektren.

Allen Mitgliedern der AKs Geyer möchte ich für die große Hilfsbereitschaft, tolle Zusammenarbeit und das lustige Zusammensein danken.

Mein besonderer Dank gilt Romina Kirschner und Stefan Hinkes! Euch Beiden kann ich nicht genug für die umfangreichen Korrekturarbeiten, viele Hilfestellungen, wertvolle Ratschläge und aufbauende Worte danken.

Liebe Romina, vom Herzen möchte ich mich bei Dir für unsere intensive Freundschaft bedanken. In guten wie in schlechten Zeiten bist Du für mich wichtige Stütze gewesen!

Jan Reutzel und Lennart Nicke möchte ich für eine gute Arbeitsatmosphäre, die abwechslungsreichen Musikanlagen und jegliche Unterstützung bei EDV-Problemen danken. Ohne euch wäre die Arbeit nicht zu schaffen gewesen und nur halb so viel Spaß gemacht. Danke für die tolle Zeit!

André Wuttke und Matthias Körling möchte ich für die hilfreichen fachlichen Gespräche und die zahlreichen Lösungen bei nahezu allen Trennproblemen danken.

André, deinen Humor und deine positive, optimistische Art werden mir sehr fehlen!

Andreas Schrimpf, Stefan Lenz, Maximilian Jung, Michelle Krüger, Johannes Rein möchte ich für die gemeinsame Zeit danken. Ohne eure gute Laune wäre die Arbeit nur halb so schön gewesen. Danke!

Susanne Schellenberg möchte ich für die Bewältigung der bürokratischen Angelegenheiten ganz besonders danken. Mit deiner angenehmen und fröhlichen Art wurde jeder noch so trüber Tag gerettet.

Frauke Messik, Sebastian Fischer, Elena Skrypka möchte ich für die langjährige Freundschaft und eine anhaltende Unterstützung danken.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Mann und meiner Familie, die mich sowohl während der Promotion, als auch in der gesamten Zeit meines Studiums in vielerlei Hinsicht tatkräftig unterstützt haben.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Veröffentlichungen

M. Abacilar, F. Daus, A. Geyer, *Chemoselective silicification of synthetic peptides and polyamines*, *Beilstein J. Nanotechnol.*, **2015**, 6, 103-110.

M. Abacilar, a F. Daus, C. Haas, S. I. Brückner, E. Brunner and A. Geyer, *Synthesis and NMR analysis of ¹³C and ¹⁵N-labeled long-chain polyamines (LCPAs)*, *RSC Adv.*, **2016**, 6, 93343–93348.

O. Gräb, M. Abacilar, F. Daus, A. Geyer and C. Steinem*, *3D-Membrane Stacks on Supported Membranes Composed of Diatom Lipids Induced by Long-Chain Polyamines*, *Langmuir*, **2016**, 32, 10144–10152.

Inhaltsverzeichnis

1.	Polyamin-basierte Modifikationen der Prion-Peptide.....	14
1.1	Einleitung	14
1.1.1	Metabolismus der biogenen Oligoamine	17
1.1.2	Wechselwirkungen der Polyamine mit DNA/RNA und Proteinen	19
1.1.3	Spermidin und seine Rolle in der Autophagie	21
1.1.4	Polyamine und Neurotransmission.....	22
1.1.5	Prionenerkrankungen	24
1.1.6	Struktur und Funktion des Prion-Proteins.....	25
1.1.7	Pathophysiologie der Prionenerkrankung	28
1.1.8	Prion-Protein-Konformere	29
1.1.9	Pathogenese der Prionerkrankung	31
1.1.10	Natürlich vorkommende Antikörper gegen das Prion-Protein (nAbs-PrP).....	32
1.1.11	Diagnostische und therapeutische Ansätze	33
1.2	Zielsetzung	36
1.3	Ergebnisse und Diskussion	38
1.3.1	Synthese und Charakterisierung modifizierter Prion-Sequenzen.....	38
1.3.2	Affinitätsuntersuchungen der synthetischen Prion-Peptide zu nAbs-PrP ..	62
2.	Bioanorganische Grundlagen der Biomineralisation	67
2.1	Kieselalgen	68
2.2	Polymerisation der Kieselsäure	71
2.3	Organische Komponenten der Diatomeenzellwand	74
2.4	Einfluss der Silaffine und Polyamine auf die Kieselsäurekondensation	80
2.5	Modelle zur Polyamin- und Silaffin-induzierten Kieselsäurefällung	84
2.6	Aufgabenstellung.....	88
2.7	Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze	91
2.7.1	Polyaminhaltige Toxine aus Spinnen und Wespen.....	91
2.7.2	Schutzgruppenstrategien in der Synthese ausgewählter Polyamin- Derivate	94
2.7.3	Herstellung Polyamin-Toxine an der festen Phase.....	97
2.8	Synthese langkettiger Polyamine an der festen Phase	106
2.8.1	Synthese und Anwendung isotoopenmarkierter Polyamine	111
2.8.2	Synthese und Anwendung fluoreszenzmarkierter Polyamine.....	118

2.9	Entwicklung von <i>in-vitro</i> NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung	122
2.10	Synthese von Silaffin-1A ₁ -Derivaten	138
2.10.1	Ergebnisse und Diskussion	139
2.10.2	Synthese und Charakterisierung einfacher Silaffin-1A ₁ -Derivate	139
2.10.3	Synthetisch-strategische Überlegungen zum Aufbau von Polyamin-seitenkettenverlängerten Lysin-Derivaten	144
2.10.4	Aufbau der polyaminverlängerten Lysin-Seitenkette via MITSUNOBU-Reaktion	152
2.10.5	Kombinierte Synthesestrategie zum Aufbau von Silaffin-1A ₁ -Derivaten	158
2.10.6	Neuartiger Ansatz zur Isolierung der Ns-entschützten Verbindungen und ihre Anwendung.	171
3.	Zusammenfassung	178
4.	Ausblick	182
5.	Experimenteller Teil	184
5.1	Allgemeine Anmerkungen	184
5.2	Synthesen an fester Phase	186
5.2.1	Automatisierte Festphasenpeptidsynthese	186
5.2.2	Manuelle Festphasensynthese	186
5.2.3	Kupplung der ersten Aminosäure an das 2-Chlorotritylchlorid-Harz.....	186
5.2.4	Beladung des 2-Chlorotritylchlorid-Harzes mit einem Polyamin.....	187
5.2.5	Beladung des 2-Chlorotritylchlorid-Harzes mit einem sekundären Amin.....	187
5.2.6	Peptidkupplung mit HBTU/HOBt (ohne Voraktivieren)	188
5.2.7	Peptidkupplungen mit HBTU/HOBt (mit Voraktivieren)	188
5.2.8	Kupplung von Fmoc-Lys(NMe ₂)-OH	188
5.2.9	Kupplung von Fmoc [¹⁴ / ¹⁵ N] Gly-OH und [¹³ C] Gly-OH	188
5.2.10	Fmoc-Entschützung an der festen Phase	189
5.2.11	Polyamid-Reduktion am 2-Chlorotritylchlorid-Harz	189
5.2.12	Dde-Schützung primärer Amine an der festen Phase	189
5.2.13	Dde-Entschützung am Harz	189
5.2.14	Einführen der <i>tert</i> -Butylcarbammat (Boc)-Schutzgruppe am CTC-Harz ...	190
5.2.15	Ns-Aktivierung primärer Amine an der festen Phase	190
5.2.16	Ns-Entschützung am Harz	190
5.2.17	MITSUNOBU-Reaktion an der festen Phase.....	190
5.2.18	Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Seitenkettenentschützung ..	190

5.3	Darstellung der Prionensequenzen.....	191
5.4	Synthese isotopenmarkierter Oligoamine an der festen Phase	205
5.5	Herstellung Polyamin-basierter Toxine	214
5.5.1	Polyaminverlängerungen an der festen Phase	215
5.6	Synthesen in Lösungen	229
5.6.1	Herstellung der Grundbausteine.....	229
5.6.2	Synthesen der Lysin-Derivate.....	235
5.7	Synthese der Silaffin-1 A ₁ -Derivate	252
6.	Abkürzungsverzeichnis	270
7.	Literaturverzeichnis	274

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene synthetisch-strategische Ansätze zur Herstellung komplexer Oligoamine und modifizierter Lysin-Derivate entwickelt werden. Unabhängig von dem verfolgten Syntheseweg, handelt es sich bei allen geplanten Zielmolekülen um kationische Verbindungen, die zu den wichtigsten Bestandteilen zahlreicher Proteine und anderer stickstoffhaltigen Biomoleküle zählen. Die Einzigartigkeit der zu synthetisierenden Aminoverbindungen liegt gewiss in ihrer strukturellen Vielfalt, welche auch ihrer biologischen Aktivität sowie ihrer erstaunlichen Präsenz zugrunde liegt. Mit den von der Natur inspirierten kationischen Strukturmotiven lassen sich verschiedene, voneinander unabhängige Themen miteinander verknüpfen. So sollten, beispielsweise zur Untersuchung des Faltungsverhaltens des Prion-Proteins Makromoleküle mit definiertem Oligomerisierungsgrad hergestellt werden. Die kovalente Verknüpfung zweier PrP-Stränge zu einem Dimer sollte dabei über ein Amin erfolgen. Durch eine systematische Veränderung des Ladungsmusters über den Einbau unterschiedlich methylierter Lysin-Bausteine sollten wichtige Rückschlüsse hinsichtlich der Struktur-Affinität-Wirkungsbeziehungen zwischen den synthetischen PrP-Peptiden und natürlich vorkommenden PrP-Autoantikörpern gezogen werden. Basierend auf den Erkenntnissen über die biochemischen Vorgänge der Biomineralisation, sollten in dieser Arbeit außerdem effiziente synthetische Ansätze herausgearbeitet werden, die einen Zugang zu den natürlich vorkommenden organischen Komponenten mit Silica-präzipitierenden Eigenschaften ermöglichen. Mit Hilfe von spezifisch modifizierten Peptiden sollte eine systematische Untersuchung des Einflusses von Silaffin-Modifikationen auf die Silica-präzipitierende Aktivität und die Morphologie des entstehenden Silica-Materials möglich sein. Für Festkörper-NMR-Experimente sollten spezifisch markierte Oligoamine hergestellt werden. Durch die Untersuchung gebildeter Silica-Nanokomposite mit integrierten isotonenmarkierten Polyaminen lässt sich womöglich eine umfangreiche Analyse über quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen erhalten. Durch die Experimente mit den synthetischen Polyaminen erhofft man sich weitere wichtige Details hinsichtlich ihrer strukturdirektierenden Rolle bei der Kieselsäurekondensation zu erlangen. Da die meisten der bislang durchgeführten *in vitro* Experimente zur chemoselektiven Silifizierung stets auf die Analyse des gebildeten SiO₂-Präzipitats gerichtet waren, sollten innerhalb dieser Arbeit Bemühungen unternommen werden, die Dynamik des Silifizierungsvorgangs mittels NMR-Spektroskopie zu untersuchen.

Somit sollten die polyaminmodifizierten Prion-Peptide der Grundlagenforschung von Proteinfehlfaltungserkrankungen dienen, während die synthetischen Oligoamine oder Polyamin-basierte Naturstoffe wichtige Einblicke in den Biomineralisationsprozess gewähren

sollten. Das in Abbildung 1 abgebildete Schema veranschaulicht das der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Konzept.

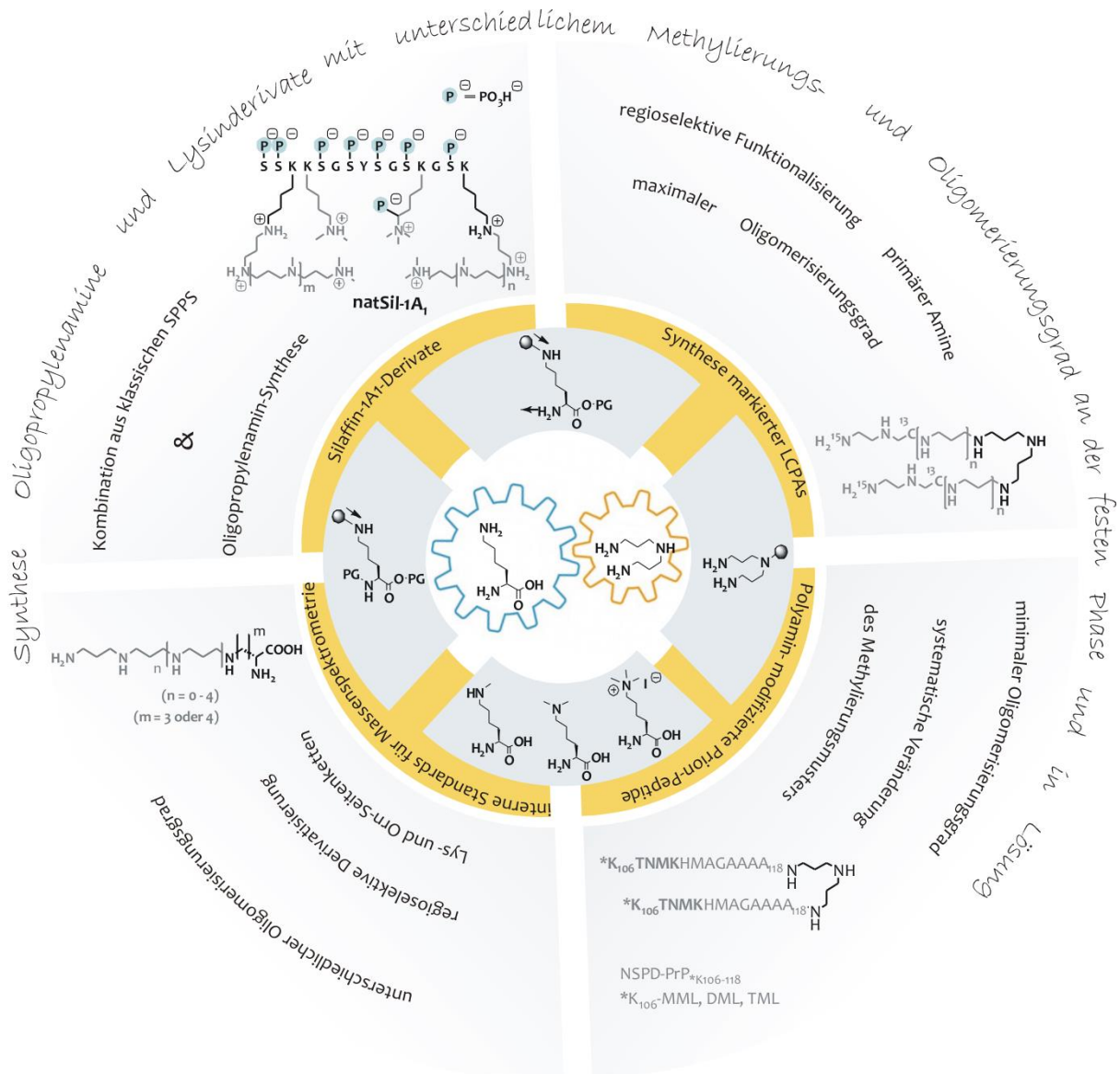


Abbildung 1: Planerisch-konzeptionelles Schema zur Erarbeitung neuer und effizienter Synthesestrategien zur Darstellung von Silaffin-1A₁-Derivaten, Isotopen-markierter Oligoamine, polyaminmodifizierter Prion-Proteine sowie propylenaminverlängerter Lysin- und Ornithin-Bausteine. Von oben links beginnend im Uhrzeigersinn sind synthetische Herausforderungen formuliert, die zu den gewünschten Zielverbindungen führen sollten. In jedem Sektor der Abbildung sind Zielmoleküle gezeigt, wobei Grundbausteine in schwarz und Modifikationen in grau dargestellt sind. Bei allen zu synthetisierenden Zielverbindungen handelt es sich um Polypropylenamine oder/und Lysin-Derivate mit unterschiedlichem Oligomerisierungs- und Methylierungsgrad. Für die Herstellung einzelner Zielverbindungen sind, je nach Komplexität, unterschiedliche Reaktionstypen oder deren Kombination erforderlich. So erfolgt die Synthese unterschiedlich methylierter Lysin-Bausteine ausschließlich in Lösung, die Herstellung der Oligopropylenamine hingegen nur an der festen Phase. Für die Herstellung der Silaffin-1A₁-Derivate ist eine Kombination aus der klassischen SPPS und Oligoaminsynthese notwendig. Das von der Natur inspirierte Designkonzept erfordert einerseits eine besondere strategische Raffinesse, andererseits ermöglicht es aber ein breites Spektrum potentieller Anwendungsfelder für alle synthetisierten Zielmoleküle.

Within the scope of this work, various synthetic-strategic approaches for the production of complex oligoamines and modified lysine derivatives are to be developed. Irrespective of the synthetic pathway pursued, all of the planned target molecules are cationic compounds, which are among the most important components of numerous proteins and other nitrogen-containing biomolecules. The uniqueness of the amino compounds to be synthesized is certainly due to their structural diversity, which is also based on their biological activity and their astounding presence. The nature-inspired cationic structural motifs allow you to link different independent topics. Thus, for example, investigation of the folding behavior of the prion protein, the macromolecules with a defined degree of oligomerization are to be produced. The covalent linkage of two PrP strands to a dimer should take place *via* an amine. By systematically altering the charge pattern by the incorporation of different degrees of lysine-methylation, important conclusions should be drawn regarding the structure-affinity-activity relationship between the synthetic PrP peptides and naturally occurring PrP autoantibodies. On the basis of the findings on the biochemical processes of biomineralization, this work also attempts to elaborate efficient synthetic approaches which allow access to the naturally occurring organic compounds with silica precipitating properties. Based on specifically modified peptides, a systematic study of the influence of silaffin modifications on the silica-precipitating activity and the morphology of the resulting silica material should be possible. Specifically isotope-labeled polyamines are to be prepared for solid-state NMR experiments. The investigation of formed silica nanocomposites with integrated isotope-labeled polyamines allows a comprehensive analysis on quantitative structure-activity relationships to be obtained. By means of the synthetic polyamines, further details with the regard to their structure-directing role on the precipitation behavior of silicic acid should be obtained. Since most of the *in vitro* experiments, carried out so far for chemoselective silification, have always been based on the analysis of the precipitated SiO₂, efforts should be made within this work to elucidate the dynamics of the silification process by means of NMR spectroscopy. Therefore, the polyamine-modified prion peptides serve as the basis for the research of protein deficiency diseases, while the synthetic oligoamines or polyamine-based natural products will provide important insights into the biomineralization process. This overview of this work is shown in Figure 1.

1. Polyamin-basierte Modifikationen der Prion-Peptide

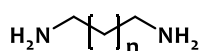
1.1 Einleitung

Auch die denkbar einfachsten Zellen, mit denen Lebewesen ihren Anfang genommen haben, benötigen eine Vielfalt von molekularen Bausteinen. Auch wenn unser Wissen über die Grundbausteine des Lebens und deren funktionelle Eigenschaften zum heutigen Zeitpunkt sehr umfangreich ist, bleibt uns das nichttriviale Zusammenspiel der einzelnen Komponenten oft ein Rätsel. Nur das Verständnis der Wechselwirkung der Grundbausteine auf der molekularen Ebene schafft die Voraussetzung für die Einblicke in die Dynamik intrazellulärer Abläufe. Nur durch Erkenntnisse über die Selbstorganisation, Funktion und gegenseitige Beeinflussung dieser elementaren Bausteine werden wir in der Lage sein, der molekularen Ursachen krankheitsauslösender Prozesse nachzugehen.

Zu den wichtigsten hochmolekularen Klassen der Biomoleküle zählen Proteine, Lipide, Polysaccharide und nicht zuletzt die Nucleinsäuren.^[1] Sie sind ein fester Bestandteil jeder lebenden Zelle, wo sie ein breites Spektrum an wichtigen physiologischen und strukturellen Funktionen ausführen. Nur durch gemeinsames Interagieren können sie ihre hochspezifische biologische und multifunktionelle Wirksamkeit entfalten, die sich sogleich an die jeweiligen Anforderungen anpasst, um das Leben und Überleben zu sichern. Die physiologische Aktivität wird in diesem hoch komplexen Ensemble sehr oft durch die denkbar kleinsten Moleküle vermittelt. Besondere Aufmerksamkeit in diesem Zusammenhang verdienen die ubiquitär vorkommenden Naturstoffe, die sogenannten „biogenen Amine“. Bei dieser Verbindungsklasse handelt es sich um niedermolekulare, stickstoffhaltige, basische Verbindungen, die aufgrund ihrer biotischen Herkunft und ihrer vielfältigen Funktionen in beinahe jedem lebenden Organismus als „biogen“ bezeichnet werden.^[2] Biogene Amine sind Decarboxylierungsprodukte der Aminosäuren und einiger ihrer Folgeprodukte, die aliphatische (Spermin, Spermidin, Putrescin, Cadaverin), aromatische (Dopamin, Tyramin, Phenylethylamin) oder heterocyclische (Histamin, Serotonin) Struktur aufweisen können.^[3,4,5] Unter dem Begriff "Polyamine" wird eine Reihe natürlich vorkommender Aminene zusammengefasst, die zum Teil bereits seit Jahrhunderten bekannt sind.^[6] Obwohl es sich bei diesen Verbindungen keinesfalls um Polymere, sondern lediglich um Oligoamine handelt, hat sich die irreführende Bezeichnung Polyamine bis heute dennoch in der Literatur durchgesetzt. Die aliphatischen Amine werden im Allgemein je nach Anzahl ihrer enthaltenen Aminogruppen den Mono- bzw. den Polyaminen zugeordnet.^[7] Eine Übersicht über die verbreiteten aliphatischen Polyamine findet sich in Abbildung 2.

Polyamin-basierte Modifikationen der Prion-Peptide
Einführung

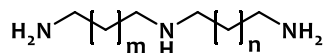
Diamine



$$\begin{aligned} n &= 3 \\ n &= 4 \\ n &= 5 \end{aligned}$$

1,3-Diaminopropan (PA₃)
Putrescin (PA₄)
Cadaverin (PA₅)

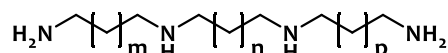
Triamine



$$\begin{aligned} m &= n = 3 \\ m &= 3, n = 4 \\ m &= 3, n = 5 \\ m &= n = 4 \end{aligned}$$

Norspermidin (PA₃₃)
Spermidin (PA₃₄)
Homospermidin (PA₃₅)
sym-Homospermidin (PA₄₄)

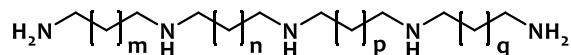
Tetraamine



$$\begin{aligned} m &= n = p = 3 \\ m &= n = 3, p = 4 \\ m &= p = 3, n = 4 \\ m &= p = 4, n = 3 \end{aligned}$$

sym-Norspermidin
(Thermin, PA₃₃₃)
Thermospermin (PA₃₃₄)
Spermin (PA₃₄₃)
Canavalmin (PA₄₃₄)

Pentaamine



$$\begin{aligned} m &= n = p = q = 3 \\ m &= n = p = 3, q = 4 \end{aligned}$$

Caldopentamin (PA₃₃₃₃)
Homocaldopentamin (PA₃₃₃₄)

Abbildung 2: In der Natur weitverbreitete Polyamin (PA)-Skelett-Ketten: die Nummer gibt die Zahl der Methylengruppen zwischen zwei Stickstoffen an.^[7]

Ursprünglich bezeichnete der Begriff „Polyamin“ ein Amin mit mehr als zwei Aminogruppen, z.B. Spermin und Spermidin, im Gegensatz zu den Diaminen wie Putrescin.^[6] Heutzutage allerdings umfasst die Definition der Polyamine neben den unsubstituierten Basen, die am häufigsten vorkommen (Spermin, Spermidin, Putrescin) auch deren Homologe (1,3-Diaminopropan, Cadaverin, *sym*-Norspermidin, Canavalmin, Thermin, Thermospermin und viele andere s.o.). Es würde den Rahmen dieses Kapitels bei weitem sprengen, wolle man alle bis heute bekannten Derivate dieser Stoffklasse mit ihrem Ursprung auflisten. Die physiologisch wichtigsten Vertreter dieser Verbindungsklasse sind der Abbildung 2 zu entnehmen.^[8,9]

Polyamin-basierte Modifikationen der Prion-Peptide Einführung

Tabelle 1: Liste der physiologisch wichtigsten biogenen Amine, die durch enzymatische Decarboxylierung entstehen.

$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{C} - \text{R} \\ \\ \text{HO} - \text{C} = \text{O} \end{array} \xrightarrow{\text{Decarboxylierung}} \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{R} \end{array}$	$\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{R}$	<p>*MO - Mikroorganismen P - Pflanzen T - Tiere</p>	
Aminosäure	biogenes Amin	R - Definition	*Vorkommen
Arg	Agmatin	GuanidinyI-(CH ₂) ₂ -	MO, T
Asp	beta-Alanin	HOOC-	MO, P, T
Leu	Isoamylamin	(CH ₃) ₂ CH-	MO, P
Glu	gamma-Aminobuttersäure	HOOC-CH ₂ -	MO, P, T
Lys	Cadaverin	H ₂ N-(CH ₂) ₃ -	MO
Cys	Cysteamin	HS-	T
Ser	Colamin	HO-	MO, P, T
Orn	Putrescin	H ₂ N-(CH ₂) ₂ -	MO, P, T
Orn	Spermidin über Putrescin	H ₂ N-(CH ₂) ₄ - NH-(CH ₂)-	MO, P, T
Phe	Phenylethylamin	Ph-(CH ₂) ₂ -	MO, P
Thr	Propanolamin	HO-CH ₂ -	MO
Trp	Tryptamin	Indolyl-	MO, P, T
Tyr	Tyramin	<i>p</i> HO-C ₆ H ₄ -	MO, P, T
His	Histamin	4-Imidazolyl-	MO, T
DOPA	Dopamin	3,4-di-OH-C ₆ H ₃ -	T

Durch eine scheinbar geringfügige Veränderung der Aminosäuren durch die Decarboxylierung werden hoch reaktive Substanzen erzeugt, die nicht nur in vielfältiger Weise in den Zellstoffwechsel eingebunden, sondern auch an dem Zellaufbau mitbeteiligt sind. Im Stoffwechsel wirken sie u.a. als Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren, dienen als Pharmaka und stellen Gewebsmediatoren dar.^[10,11] Für die hormonelle Regulation des Stoffwechsels sind vor allem die Folgeprodukte des Tyrosins von Bedeutung, die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin, die als Hormone und Neurotransmitter wirken. Sie lösen zahlreiche biochemische und physiologische Prozesse aus, die in Zusammenhang mit Belastungssituationen des Organismus stehen.^[10] Histamin wird von Mastzellen, basophilen Granulozyten, Thrombozyten und einigen Neuronen gebildet, in Vesikeln gespeichert und bei Stimulation freigesetzt, deshalb ist es ein wirksamer Immunmodulator und Mediator bei Entzündungsreaktionen und der Wundheilung.^[10,12] Es wirkt außerdem als Neurotransmitter in bestimmten Neuronen, die unter anderem an der Regulation des Schlaf-Wachrhythmus beteiligt sind. Histamin ist der bekannteste Mediator bei allergischen Reaktionen.^[12] Serotonin und Dopamin sind an der Regulation der Nahrungsaufnahme

beteiligt. Dopamin fördert die Nahrungsaufnahme, während Serotonin sie hemmt und für die Entstehung der Sättigung mitverantwortlich ist.^[10,13] Die Polyamine Spermin, Spermidin und Putrescin regulieren sowohl Proliferation und Differenzierung von Zellen als auch die Apoptose (programmierter Zelltod).^[7,14] Die für die Synthese erforderlichen Enzyme werden in Abhängigkeit vom Zellzyklus exprimiert.^[15,16] Bei Pflanzen übernehmen diese Amine eine aktive Rolle bei der Zellteilung, der Embryogenese, dem Wurzelschlagen, der Blüteninduzierung, der Blüten- und Fruchtentwicklung,^[7,17,18] dem Pollenkanalwachstum^[7] und vermutlich auch beim Alterungsprozess.^[41,43] Daher sollte es niemanden erstaunen, dass das erste Polyamin aus dem Samen isoliert wurde.^[19] Polyamine sind eine wichtige Stoffquelle für die Synthese von Nucleinsäuren, Phospholipiden und Proteinen.^[20] Sie sind oft mit Zuckern, Steroiden, Phospholipiden, Aminosäuren oder mit Peptiden verknüpft und bilden auch strukturelle Untereinheiten in vielen Alkaloiden.^[21,22] Eine Reihe dieser Naturstoffe zeigt biologische Aktivität als Antibiotika, Zytostatika und Immunsuppressiva. Als Aroma- und Geschmacksstoffe, die in Folge biochemischer oder mikrobiologischer Eiweißveränderungen entstehen, tragen sie maßgeblich zur Qualitätsbeurteilung von Lebensmitteln bei.^[10,12] Die Funktionalität dieser Verbindungsklasse ist so vielfältig wie ihre Varianz in der Struktur (s. Abbildung 3).

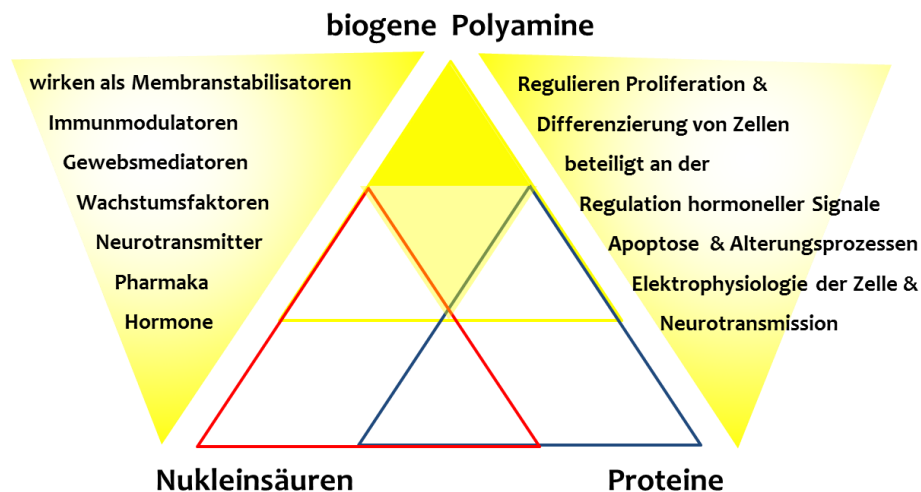


Abbildung 3: Die wichtigsten physiologischen Eigenschaften der biogenen Amine.^[7,14,16,23a-i]

1.1.1 Metabolismus der biogenen Oligoamine

Die Aminosynthese ist in verschiedenen Organen und Geweben in unterschiedlichem Ausmaß möglich. In der Leber, dem Hauptsyntheseort für Aminosäuren, ist die Aminbildung besonders ausgeprägt. Auch Nervensystem, Nebennierenmark, Blutzellen und andere Organe und Gewebe sind an der Synthese beteiligt.^[10,12] Neben der direkten Decarboxylierung der Aminosäuren bestehen weitere Synthesewege durch Transaminierungs- und

Polyamin-basierte Modifikationen der Prion-Peptide

Einführung

Decarboxylierungsreaktionen von Ketosäuren. Biogene Amine können an unterschiedliche Substanzen gebunden und dadurch inaktiviert werden. Durch Freisetzung aus diesen Bindungen erhalten sie wieder ihre physiologische Wirksamkeit.^[10] Ein Blick auf die Biogenese der wichtigsten in unseren Zellen vorkommenden Polyamine zeigt, dass es vier für die Biosynthese wichtige Schlüsselenzyme gibt: Spermin- und Spermidin-Synthasen, die Ornithin-Decarboxylase (ODC) und die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC). Während Spermin- und Spermidin-Synthasen sowie SAMDC als Aminopropyl-Lieferanten dienen, ist ODC für die Decarboxylierung von L-Ornithin verantwortlich (s. Abbildung 4).^[7]

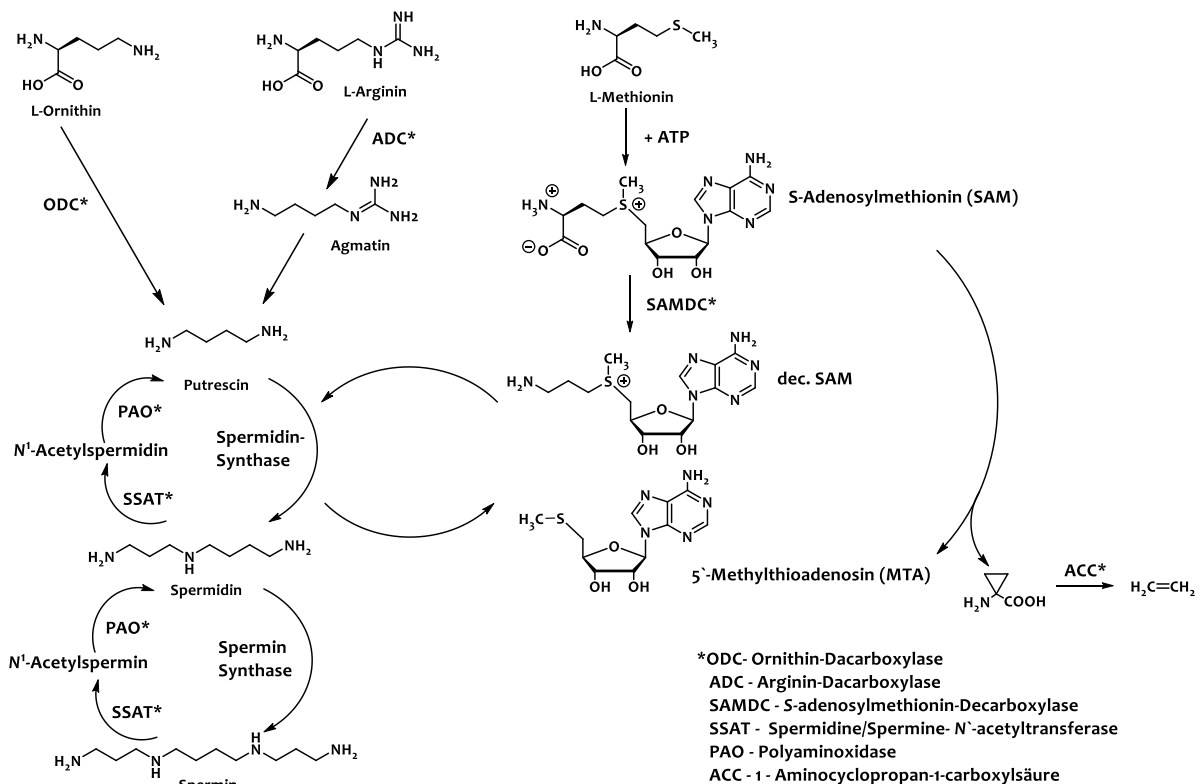


Abbildung 4: Allgemeiner Weg der Biosynthese von Putrescin, Spermidin und Spermin. Bei *Escherichia coli* fehlt die Stufe von Spermidin zu Spermin, bei Hefen und in Säugetierzellen verläuft der Weg von Arginin zu Putrescin über Agmatin.^[15,16]

Der menschliche Organismus verfügt über spezifische Inhibitoren für jedes dieser Enzyme. Diese sind für die Regulation der Polyaminkonzentration verantwortlich. Die Inhibition dieser Enzyme führt zu enormen Verlusten von Polyaminen. Die Hemmung der Polyaminsynthese ist zu einem Ziel der pharmazeutischen Industrie geworden.^[7,24] Die Idee der potentiellen Anwendung von Polyamin-Antagonisten in der Krebstherapie ergibt sich daraus, dass die Polyamine für das optimale Wachstum und die Teilung von verschiedenen Zelltypen notwendig sind.^[25,26] Bei Krankheiten wie Krebs, Psoriasis und Sichelzellanämie ist die Polyaminkonzentration in den biologischen Flüssigkeiten und Geweben sehr hoch. Die Wirkungsweise ist noch nicht vollständig geklärt, aber die Rolle der Polyamine bei

Krebsvermehrung konnte aufgezeigt werden, da eine Hemmung ihrer Biosynthese von einer verminderten Proliferationsrate begleitet wird. Damit zeichnet sich hier ein Hoffnungsschimmer für neue Ansätze in der Krebstherapie ab.^[27,28,29] Die gesteuerte Abnahme der Amin-Konzentration wird also eher zytostatisch als zytotoxisch gedeutet, da die Polyamine oft an wichtigsten regulatorischen Prozessen der Zelle mitbeteiligt sind.^[29] Andererseits enthalten viele Gewebe, vor allem Darmschleimhaut, Blutplasma, Leber, Niere und Nervengewebe, aber auch Lunge, Blutgefäße, Nebenniere, Herz und Milz, wegen der möglichen toxischen Wirkungen der Polyamine aminabbauende Enzyme. Der Abbau kann über verschiedene Wege erfolgen. Davon scheint die Oxidation der wichtigste zu sein. Sie führt zu Carbonsäuren, die ähnlich wie Fettsäuren verstoffwechselt werden. Daneben ist ein Abbau durch *N*- und *O*-Methylierung sowie *N*-Acetylierung und Hydroxylierung möglich. Amine können aber auch unverändert über die Niere ausgeschieden werden.^[10] Durch den Abbau von Spermin durch die Spermin-Oxidase entstehen Spermidin, Wasserstoffperoxid und 3-Aminopropanal. Die zwei letzten Verbindungen wirken zytotoxisch und können zum Zelltod, der sogenannten Apoptose führen. Es gibt also einen direkten Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Konzentrationsspiegel der Polyamine und dem Zelltod. Allerdings scheint ein Abfall des Polyaminspiegels während der Apoptose häufiger zu sein als ein Anstieg. Dies lässt annehmen, dass die Polyamine eine protektive Rolle haben und vor Apoptose schützen. Wie genau sie ihre Schutzfunktion ausüben, ist bisher immer noch ungeklärt (SCHIPPER *et al.* 2000). Bei einem kontrollierten Entzug von Polyaminen kommt es wahrscheinlich zur Stimulation der Mitochondrien-vermittelten Apoptose (NITTA *et al.* 2002; IGARASHI und KASHIWAGI 2010). Faszinierend und rätselhaft zugleich bleiben unzählige, vielseitige, teils sogar gegenteilige Wirkungen der Polyamine in verschiedenen zellulären Prozessen.

1.1.2 Wechselwirkungen der Polyamine mit DNA/RNA und Proteinen

Obwohl der Mechanismus noch nicht ganz geklärt ist, spielen Polyamine vermutlich auf fast jeder Stufe der Ribonukleinsäure- (engl. *ribonucleic acid* RNA), Desoxyribonukleinsäure- (engl. *deoxyribonucleic acid* DNA) und Proteinsynthese eine wichtige Rolle. Man nimmt an, dass sie an der DNA-Replikation, der Membranstabilisierung, der Aktivität von mehreren Enzymen, der Strukturorganisation von Zellen, Organellen und Biopolymeren beteiligt sind.^[7] Bewiesen ist, dass die Einführung von Polyaminanaloga in manchen Zellen nicht nur die DNA-Konformation, sondern auch Replikations- und Transkriptionsvorgänge beeinflusst.^[30] Die freien Polyamine liegen unter physiologischen Bedingungen als Kationen vor und können

entgegengesetzte Ladungen bestimmter Teilchen kompensieren. So lassen sich manche ihrer biologischen Funktionen sowie ihre Wirkung in vielen physiologischen Prozessen erklären, wenn ihre Rolle als positiv geladene Träger berücksichtigt wird. Aufgrund ihrer polykationischen Struktur ist der Hauptteil der Polyamine in der Zelle an die RNA gebunden. Ein weiterer Anteil bildet einen Komplex mit DNA und ist an ATP angelagert, und nur kleine Mengen von Spermin und Spermidin sind frei in der Zelle vorzufinden (WATANABE *et al.* 1991; MIYAMOTO *et al.* 1993; IGARASHI und KASHIWAGI 2010). Röntgenstrukturanalysen von DNA/Polyamin-Komplexen zeigen,^[7] dass diese kleinen kationischen Moleküle elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Phosphatgruppen benachbarter Polynukleotide eingehen. Dadurch können Polyamine zur Ausbildung und Stabilität der Tertiärstruktur von Makromolekülen wie DNA beitragen.^[16,31] Des Weiteren stabilisieren sie die Nukleinsäure gegen thermische und alkalische Denaturierung und enzymatische Zerstörung.^[32] Studien an einfachen aliphatischen Polyaminen legen nahe, dass der Abstand von drei bis vier Kohlenstoffatomen zwischen Ammoniumgruppen fast ideal mit dem Abstand der Basenpaare entlang der kleinen Furche DNA übereinstimmt. Die Bindungsfähigkeit ist durch die Anzahl von Aminogruppen festgelegt.^[7] Die Bindungsstärke ist dabei proportional zu der Zahl positiver Ladungen des an der Wechselwirkung beteiligten Polyamins. Spermidin und Spermin können DNA-Kondensationen und Aggregatbildung einleiten; sie vermögen auch den Übergang von rechtshändigen (B)- zu linkshändigen (Z)-Konformationen oder von (B) zu (A) in manchen DNA-Sequenzen auszulösen.^[32] Seit langem ist bekannt, dass RNA eine hohe Affinität zu den Oligoaminen zeigt.^[33] Man vermutet, dass auch hier die Komplexierung von RNA-Molekülen mit Oligoaminen bestimmte Faltungen in der Sekundärstruktur bewirkt und diese somit stabilisiert. COHEN und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die *t*-RNA in *E. coli* an Spermidin und Putrescin gebunden vorliegt.^[34] Auch an den Ribosomen sind diese Verbindungen zugegen, wo sie hauptsächlich an *r*-RNA gebunden vorliegen.^[35,36] Studien mit Mutanten, denen Polyamine entzogen wurden, zeigen den Einfluss auf die *in vivo*-Biosynthese von Proteinen. Durch die Veränderung der RNA-Struktur werden folglich alle Prozesse beeinflusst, an denen RNA beteiligt ist. Sie steigern die Proteinsynthese auf Ebene der Translation (IGARASHI und KASHIWAGI 2010). Polyamine unterstützen den Übersetzungsvorgang, indem sie die Codon-Anticodon-Erkennung und Wechselwirkung mit Ribosomen beeinflussen. So stimuliert Spermin die Initiator-*t*-RNA dazu, an 55S Ribosomen zu binden, wodurch die Formung des Initiator-Komplexes der Proteinsynthese begünstigt wird (CHRISTIAN *et al.* 2010). Die Lokalisierung eines spezifischen Bindungsortes von Polyaminen an *t*-RNA ist daher von Interesse für ein besseres Verständnis der Wirkungsweise

dieser allgegenwärtigen Moleküle bei Zellwachstum und Carcinogenese.^[7,37] In Abbildung 5 sind ergänzend die vermerkten Beispiele für alle möglichen Interaktionen der biogenen Amine mit den wichtigsten hochmolekularen Verbindungen der Zelle zusammen gefasst.

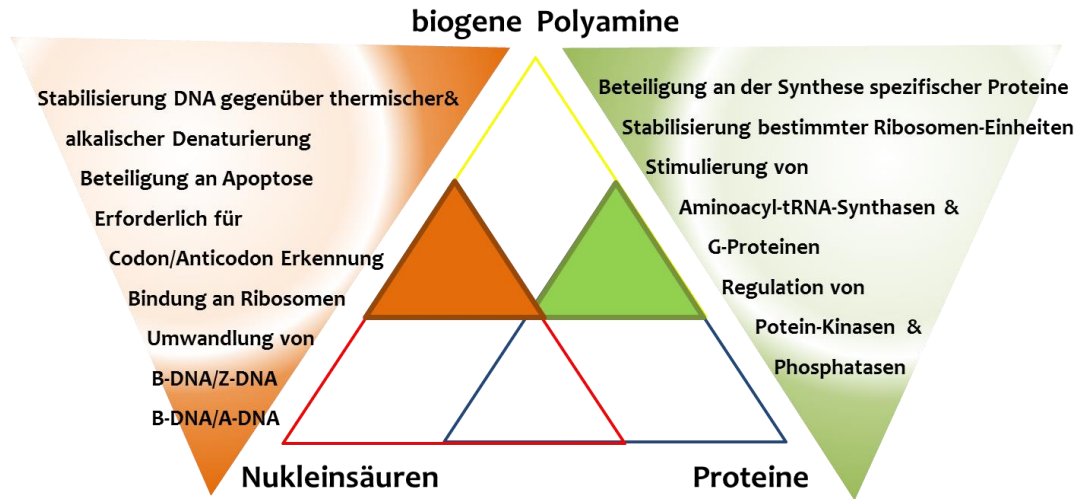


Abbildung 5: Beispiele für Interaktionen der biogenen Amine in biologischen Systemen.^[7,30-37]

1.1.3 Spermidin und seine Rolle in der Autophagie

Unter dem Begriff Autophagie versteht man einen Prozess, bei dem Bestandteile einer Zelle abgebaut werden.^[39] Die Phagozytose selbst, bezeichnet den Abbau von Stoffen außerhalb der Zelle, wie Proteine, Membranen, Zellstrukturen auch körperfremde Partikel. Autophagie (auch: Autophagozytose) ist ein natürlicher, komplex regulierter und genetisch gesteuerter zellulärer Vorgang. Inzwischen haben Wissenschaftler beim Menschen rund 35 Gene mit verschiedenen Varianten identifiziert, die den internen Verdauungsprozess molekular steuern.^[41,38] Die Autophagie ist nicht nur beim Eliminieren defekter oder beschädigter zelleigener Organellen und Proteine beteiligt, sondern, durch die Beseitigung akkumulierter Viren und Bakterien, trägt sie ebenfalls zur Immunantwort bei.^[39] Im Laufe der Evolution entwickelte sich Autophagie zu einer Strategie lebenswichtige Energie zu sparen. Der Recycling-Prozess wird in der Regel durch Nahrungsmangel initiiert. Hierbei werden zelleigene Bestandteile abgebaut und anschließend zum Aufbau anderer dringend benötigten Strukturen mit der freigesetzten Energie weiter verwertet.^[40] Die Fähigkeit zur Autophagie trägt somit zur Gesunderhaltung der Zellen und der Aufrechterhaltung ihrer Funktionsfähigkeit bei. Bereits 2009 wurde von F. MADEO *et al.* herausgefunden, dass die Gegenwart von Spermidin für einen stabilen Ablauf der Autophagie unabdingbar sei. Es stellte sich heraus, dass ein hoher Spermidinspiegel bei Fruchtfliegen die Autophagie induziert.^[41,42] Die Konzentration dieses Polyamins nimmt jedoch bei dem verlangsamten Stoffwechsel und während des Alterns im Laufe des Lebens sowohl bei Fruchtfliegen als auch

beim Menschen kontinuierlich ab.^[43] Ebenso verringert sich die Fähigkeit des Körpers, nicht mehr funktionsfähige Bestandteile abzubauen. Da die Autophagie im Zusammenhang mit altersbedingten Veränderungen steht, sagen die Biowissenschaftler dem Spermidin in der künftigen Behandlung von Demenz eine wichtige Rolle voraus.^[44] Zumal die Autophagozytose eine kritische Rolle in der normalen Zellphysiologie spielt, ist sie bei einer gestörten Funktion an verschiedenen menschlichen Erkrankungen beteiligt, wie Krebs^[30,37] und neurodegenerativen Krankheiten^[41,43,44] sowie an Infektionen^[45] und Alterungsprozessen.^[41,43] Alle Substanzen, die die Autophagozytose beeinflussen, könnten sich bei der Behandlung der Parkinson^[46] und der Huntington-Krankheit^[47] ebenfalls wirksam zeigen, indem sie fehlgefaltete Proteine, die zur Aggregatbildung neigen, beseitigen. Wird die Autophagozytose in den Krebszellen, die sie unter Stress aktivieren, unterdrückt, könnte sich das in der Krebstherapie ebenfalls als förderlich erweisen.

1.1.4 Polyamine und Neurotransmission

Mit der Entwicklung von verbesserten analytischen Methoden und aufgrund der Erkenntnis, dass die Polyamin-Komponenten der Wespen- und Spinnengifte neurotoxische Eigenschaften besitzen, konzentrieren seit Mitte achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts unzählige Forschungsgruppen ihre Arbeit auf die Isolierung, Strukturaufklärung, Synthese und Pharmakologie dieser Naturstoffe. Obwohl Spermin schon 1678 isoliert wurde,^[19] gehören die Polyamin-Toxine hinsichtlich der Aufklärung ihrer chemischen Konstitution und physiologischen Gegebenheiten zu den jüngsten Verbindungsklassen.^[7] Während Spermin selbst zur Untergruppe der biogenen Polyamine zählt, gehören Derivate wie die Spinnen- und Wespentoxine eher zu den Grenzfällen; sie können als Naturstoffe der biogenen Amine betrachtet werden, manche auch als basische Peptide oder selbst als Alkaloide.^[21,22] Ob linear oder makrozyklisch, eins haben diese Verbindungen gemeinsam: sie alle enthalten ein Polyaminrückgrat. Die neurotoxischen Eigenschaften der Polyamine wurden zum ersten Mal Anfang der achtziger Jahre im Zusammenhang mit dem Rohgift der *Joro*-Spinnen entdeckt. Dieses zeigte sich als Antagonist der Glutamat-vermittelten Transmission. Erst später stellte sich heraus, dass es sich bei diesem Gift um ein Gemisch aus mehreren Polyamin-Homologen handelte.^[48,49] Die erste Wirkungshypothese räumt daher der Polyamin-Komponente eine neuartige Eigenschaft als Komplexierungs- und Transportmittel für Metallionen ein. Durch die genaueren Untersuchungen diverser Toxine tierischen und pflanzlichen Ursprungs sowie derer synthetischen Analoga bestätigte sich die Annahme bezüglich der komplexierenden sowie neurotoxischen Eigenschaften dieser polyaminhaltigen Naturstoffe. Anhand der

makrozyklischen Polyamin-Alkaloide lässt sich der Komplexierungsvorgang am besten veranschaulichen. Die bekannten zyklischen Naturstoffe enthalten Ringe mit acht bis zweiundzwanzig Gliedern und beinhalten sowohl Spermin- als auch Spermidin-Fragmente.^[21,22] Gesättigte makrozyklische Polyamine können durch Koordinierung Übergangs- und Schwermetallionen binden.^[7] Sie sind in der Lage, sowohl Protonen und Metallkationen aufzunehmen als auch nach Protonierung bei neutralem pH-Wert mit Anionen Komplexe auszubilden. Diese koordinativen Bindungen zeichnen sich durch eine hohe Selektivität und reversible Stabilität aus, also ganz anders als bei den synthetischen Analoga bspw. Kronenethern, wo weder hohe Selektivität, noch Reversibilität erwartet wird.^[50] Diese makrozyklischen Polyamine sind daher in ihrer neurotoxischen Wirkung sehr spezifisch und daher auch für die medizinische Forschung zunehmend interessant. Auch andere Polyamin-enthaltende Toxine entpuppen sich oft als Neurotransmitter.^[7,21] Die Wirkmechanismen sind dabei so vielfältig wie die Strukturen der Botenstoffe selbst. Sie entfalten ihre neurophysiologischen Eigenschaften, indem sie Ionenkanäle blockieren bzw. dauerhaft öffnen, bestimmte Rezeptoren besetzen oder die Signalübertragung an den Synapsen verhindern. Selbst einfache Amine verfügen über hohe neurologische Aktivität. So beeinflussen Spermin und Spermidin z.B. unterschiedliche Ionenkanäle, den AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure)-, NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat)-, Kainat (Kainsäure)-Rezeptoren (WILLIAMS *et al.* 1997) sowie einige Kaliumkanäle. Intrazelluläres Spermin blockiert die Ionenkanal-Pore des Kir-Kanals (inward rectifying Kalium-Kanal). Diese einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanäle kontrollieren das Ruhepotential und damit die Erregbarkeit in Herzmuskelzellen, Neuronen und vielen anderen Zelltypen. Der Kir-Kanal wird bei einem Membranpotential, das negativer als das Kalium-Gleichgewichtspotential, aktiviert, was zu einem K^+ -Einstrom führt. Sobald das Membranpotential positivere Werte annimmt, wird der Auswärtsstrom über intrazelluläre Mg^{2+} -Ionen unidirektional blockiert. Es gibt jedoch einen weiteren Aspekt der Einwärts-Hemmung, der durch eine langsame Abnahme der Leitfähigkeit bei depolarisiertem Membranpotential zustande kommt, hierfür sind in der Regel kleine Polyamine verantwortlich (LOPATIN *et al.* 1994; WILLIAMS 1997; KURATA *et al.* 2006). Das Tetraamin Spermin ist in der Lage, die Auswärtsströme spannungsabhängig zu blockieren. Somit spielen die biogenen Amine eine wichtige Rolle auch in der Elektrophysiologie der Zellen (KURATA *et al.* 2006). Eine weitere für die Neurotransmission wichtige und interessante Wirkung von freien Polyaminen wie Putrescin, Spermidin und Spermin ist ihre Fähigkeit, spezifisch einen Rezeptor-Ionophor-Komplex an der Polyaminbindungsstelle des NMDA-Rezeptors zu

bilden.^[7] Die *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen haben ergeben, dass Polyamine durch die Bindung an NMDA-Rezeptoren die Wirkung des Neurotransmitters maßgeblich beeinflussen können. NMDA ist ein Subtyp der neurologisch wichtigen Glutamat-Rezeptoren, die den Einfluss von Kationen durch die postsynaptische Zellmembran und damit die Reizübertragung zwischen den Neuronen kontrollieren. Sowohl NMDA- als auch AMPA-, und Kainat-Rezeptoren gehören zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen (DONEVAN, ROGAWSKI 1995; ISA *et al.* 1995; KOH *et al.* 1995). Alle drei Transmembranproteine sind hochaffin für Glutamat und haben unterschiedliche Präferenzen für andere Glutamat-Agonisten, die namensgebenden Substanzen (s. oben). Im Allgemein bestehen sie aus einem membranintegrierten Ionenkanal und einer extrazellulären Bindungsdomäne für den jeweiligen Liganden.^[51] Die Aktivierung der Kanäle erfolgt durch die spezifische Bindung eines Agonisten an ihre extrazelluläre Domäne. Das Kanalprotein muss über eine für diesen Botenstoff spezifische Bindungsstelle verfügen, also als Rezeptor fungieren. Durch die Bindung des Botenstoffs an den Rezeptor wird eine Konformationsänderung ausgelöst, die letztendlich zu Kanalöffnung führt und durch den selektiven oder unselektiven Ioneneinstrom eine Steigerung der Membranleitfähigkeit veranlasst. Die Änderung des Membranpotentials ist für die Weiterleitung des neuronalen Signals verantwortlich. Die große Mehrheit der Synapsen im zentralen Nervensystem nutzt Glutamat als Neurotransmitter zur schnellen neuronalen Reizung.^[51] Glutamat ist somit der wichtigste erregende Neurotransmitter im Wirbeltiergehirn. Neben den akuten Schadensereignissen wie Ischämie, einer Hypoglykämie oder einem zerebralen Trauma spielt der NMDA-Rezeptor auch bei chronischen neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle.^[52,53,54] Wegen der Vielfalt der Aufgaben von Glutamat als Transmitter im zentralen Nervensystem und dessen therapeutischer Bedeutung bei Krankheitszuständen, sind die Forscher an allen chemischen Substanzen, die selektiv mit verschiedenen Untertypen von Glutamat-Rezeptoren in Wechselwirkung treten können, sehr interessiert. Polyamine sind daher sehr wichtig, nicht nur für das Studium der Rezeptoren selbst, sondern auch bei der Aufklärung von Anomalien des zentralen Nervensystems.

1.1.5 Prionenerkrankungen

Zusammen mit Morbus Alzheimer (AD) und Morbus Parkinson (PD) gehören die Prionenerkrankungen zu einer Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems, die durch Ablagerung fehlgefalteter und somit pathogener Proteine im Gehirn verursacht werden (TAYLOR *et al.* 2002). Anders als bei AD und PD sind die

Prionerkrankungen durch lange Inkubationszeiten und einen akuten Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Aufgrund der histologisch typischen Morphologie des Hirngewebes in Form von schwammartiger Vakuolenbildung wird die Prionerkrankung auch *Transmissible Spongiforme Enzephalopathien* (TSE) bezeichnet.^[55] Induziert wird die Krankheit durch die reversible Fehlfaltung des zellulär exprimierten Prion-Proteins (PrP), das letztendlich zu Ausbildung unlöslicher Proteinaggregate führt.

Die Prionkrankheit nimmt aufgrund ihrer Übertragbarkeit eine gesonderte Stelle in der Reihe neurodegenerativer Erkrankungen ein. Der Begriff „Prion“ steht für „*proteinaceous infectious particle*“ (engl. proteinartiges infektiöses Teilchen), die Endung „-on“ soll in Analogie zu „Virion“ die Pathogenität der Partikel verdeutlichen. Prionen sind von anderen Krankheitserregern wie Bakterien, Pilzen oder Viren streng abzugrenzen, denn sie aufgrund der fehlenden genetischen Information nicht zur Vermehrung befähigt sind.^[56] Nach der „Protein-Only“-Hypothese wird die Prionerkrankung, nicht wie zuerst angenommen, durch ein „langsames Virus“, sondern durch ein körpereigenes Protein verursacht (GRIFFITH 1967). Die fehlgefalteten Prionen lösen sowohl bei Menschen als auch bei Tieren (Schaf, Ziege, Rind) verschiedene Krankheiten mit pathologischen Veränderungen des zentralen Nervensystems und schwerwiegenden Folgen für den gesamten Organismus aus. Bei Tieren sind besonders die *bovine spongiforme enzephalopathie* (engl. „bei Rindern auftretende schwammartige Rückbildung von Gehirnsubstanz“ BSE) und die Traberkrankheit der Schafe (auch *scrapie* genannt) ein Begriff.^[55] Zu den wichtigsten Prionenerkrankungen beim Menschen gehören die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), die fatale familiäre Insomnie (FFI) und das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS).^[55] Sie treten zwar selten auf, beispielsweise liegt die Inzidenz von CJD in Deutschland bei ca. 100 Fällen pro Jahr, dafür verlaufen sie fast immer tödlich.^[57] Subtypen der einzelnen Krankheiten unterscheiden sich hauptsächlich durch die Lokalisation der betroffenen Hirnareale und die Symptomatik der Erkrankten. Typische Symptome sind durch die neuronalen Schäden bedingt und manifestieren sich beispielsweise in Demenz, Myoklonie und Akinesie.^[58] Die Tatsache, dass die Prionerkrankungen auf drei unterschiedlichen Wegen entstehen können, nämlich spontan (sporadische CJD), durch Vererbung (familiäre CJD) und durch Ansteckung (iatrogene CJD, vCJD), stellt für Mediziner und Naturwissenschaftler eine besondere Herausforderung dar.

1.1.6 Struktur und Funktion des Prion-Proteins

Bei der Untersuchung des Prion-codierten Genes (*PRNP*) stellte sich heraus, dass es sich dabei um eine hoch konservierte Sequenz handelt (OESCH *et al.* 1985; SCHÄTZL *et al.* 1995;

Wopfner *et al.* 1999), was auf eine bedeutende Funktion des Prion Proteins im Zellmetabolismus hindeuten dürfte (s. Abbildung 6). Endogenes PrP ist ein Glykoprotein, das in Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugern vorkommt und hauptsächlich in Neuronen und Gliazellen, aber auch in Gewebe außerhalb des zentralen Nervensystems zu finden ist.^[59] Da das Prion-Protein konstitutiv exprimiert wird und nicht zwangsläufig zur Entstehung einer Prionerkrankung führt, wurde es als zelluläres Prion-Protein PrP^C (*Prion Protein Cellular*) bezeichnet (OESCH *et al.* 1985). Die "infektiöse" Form wird PrP^{Sc} (Sc für "Scrapie") genannt. Einen entscheidenden Beweis, dass das endogen exprimierte Prion-Protein für eine Infektion mit TSE unabdingbar ist, lieferte 1993 die Arbeitsgruppe um WEISSMANN. Das Ansteckungspotential an einer Prionerkrankung ist nur durch Homologie der PrP-Primärstruktur gegeben. Obwohl die PrP-Primär- und Sekundärstrukturen unterschiedlicher Spezies einander stark ähneln, ist eine effiziente Übertragung einer Prionerkrankung zwischen verschiedenen Säugetierarten limitiert (SCOTT *et al.* 1989; WEISSMANN *et al.* 1994). Dieses Phänomen wird als Spezies-Barriere bezeichnet (PATTISON 1965) und ist auf Unterschiede in der Primärstruktur von PrP^C und heterologem PrP^{Sc} zurückzuführen (PRUSINER *et al.* 1991; KOCISKO *et al.* 1995; FERNANDEZ-BORGES *et al.* 2009).

Bei der Translation der PrP-*mRNA* entsteht zuerst ein primäres Produkt. Dieses beinhaltet eine Hauptsequenz und zwei kurze Signalpeptidsequenzen an *N*- und *C*-Terminus (SP bzw. GPI-Region, die bei der Maturierung des Proteins entfernt werden (s. Abbildung 6).

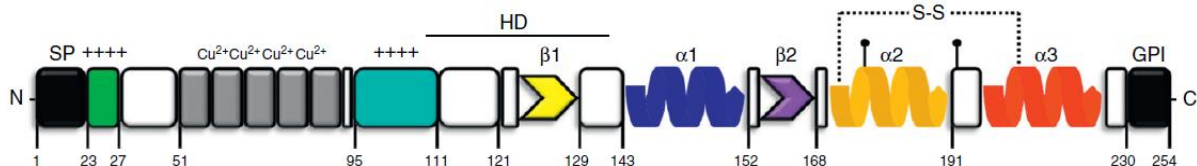


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prion-Proteins. Die Bezeichnung der einzelnen Domänen wird im Text beschrieben. Die Zahlen geben die Nummerierung der Aminosäuren vom *N*- zum *C*-Terminus an. Die Angaben zur Aminosäure-Position beziehen sich auf murines PrP^C.^[60a]

Die ersten 22 *N*-terminalen Aminosäuren (SP-Region) initiieren den Transport zum endoplasmatischen Retikulum und zum Golgi-Apparat. (OESCH *et al.* 1985). Die *C*-terminale Signalsequenz vermittelt die Membraninsertation mittels des Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol, GPI-Ankers (STAHL *et al.* 1990). Weitere posttranslationale Prozesse finden im Golgi-Apparat statt. Sie betreffen zum einen die Modifikation des GPI-Ankers und zum anderen die Glykosylierung hier vorliegender Asparagin-Reste an Codon 180 und 196, wodurch ein charakteristisches heterogenes Glykosylierungsmuster entsteht (TURK *et al.* 1988; STAHL und PRUSINER 1991). Das reife PrP^C nach Abspaltung beider Signalpeptide ist

ca. 208 Aminosäuren lang und 32-35 kDa schwer. Dieses Endprodukt wird anschließend durch den Golgi-Apparat an die äußere Zellmembran transportiert, wo es letztendlich verankert bleibt (BORCHELT *et al.* 1990; TARABOULOS *et al.* 1990; CAUGHEY *et al.* 1991). Dem *N*-terminalen Signalpeptid (SP, 1-23) reihen sich eine polybasische Sequenz (23-27) und eine hochkonservierte *Oktarepeat*-Region (OR 51-90) an. Die letzte besteht aus fünf Wiederholungen der Aminosäuren-Sequenz PHGGGWGQ und einer minimal veränderten Pseudorepeat-Sequenz PQGGGWGQ, welche Kupfer-bindende Eigenschaften besitzen. Eine kationische Sequenz (95-111) und eine hydrophobe Domäne (HD 112-143) bilden den zentralen Abschnitt in der Primärstruktur des PrP^C.^[60a] Die *C*-terminale Hälfte des Prionproteins enthält drei α -Helices sowie zwei kurze β -Faltblattstrukturen. Stabilisiert wird der *C*-Terminus unter anderem durch eine Disulfidbrücke sowie zwei Amid-gebundene Oligosaccharid-Ketten an Asn¹⁸⁰ und Asn¹⁹⁶ (RIEK *et al.* 1996; RUDD *et al.* 1999; STIMSON *et al.* 1999). Während der *N*-terminale Sequenzabschnitt ungeordnet vorliegt (RIEK *et al.* 1996, 1997; DONNE *et al.* 1997), wird der *C*-terminale Teil von Sekundärstrukturen in seiner Konformation fixiert (s. Abbildung 7).^[60a]

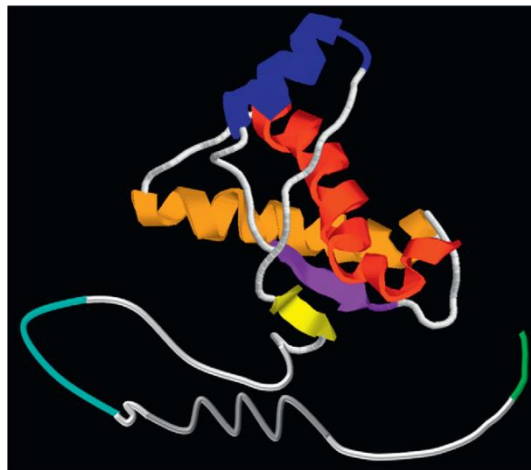


Abbildung 7: Dreidimensionale Struktur von PrP^C,^[60a] basierend auf NMR-Daten mit Farben analog zu Abbildung 6.

Die physiologische Bedeutung des Prionproteins PrP^C ist auch über 20 Jahre nach seiner Entdeckung noch nicht vollständig verstanden. Es gibt jedoch viele Hinweise auf einen neuroprotektiven Effekt. So wurde schon für verkürzte Prionensequenzen gezeigt, dass sie in der Lage sind, zweiwertige Kationen wie Cu²⁺ und Mn²⁺ zu komplexieren und somit als Radikalfänger zu dienen.^[60b] Da PrP^C auch in extra-neuronalem Gewebe wie hämatopoetischen Zellen vorkommt und während der T-Zell-Aktivierung vermehrt in Lymphozyten exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass es bei den komplexen Vorgängen des Immunsystems eine Rolle spielt.^[59] Auch die Beteiligung an Signalkaskaden (SHARONOVA *et al.* 1998), Regulationsmechanismen (TOBLER *et al.* 1996, 1997) oder

Apoptose^[60c] wird vermutet. So scheint PrP^C in der Lage zu sein, in die NMDA-abhängigen Transmissionsvorgänge einzugreifen. Durch eine direkte Interaktion reduziert PrP^C die Aktivität des NMDA-Rezeptors und verhindert damit die Einstellung einer neurotoxischen Calcium-Konzentration im Zytosol (KHOSRAVANI *et al.* 2008). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das membrangebundene PrP^C durch eine Wechselwirkung mit dem fehlgefalteten β -Amyloid für eine Hyperaktivierung des NMDA-Rezeptors sorgt und eine exzitotoxische Schädigung zu Folge hat (YOU *et al.* 2012; STYS *et al.* 2012). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Prionen eine wichtige Rolle bei der Neurogenese spielen (S. LINDQUIST *et al.* 2007). Sogar die Funktion von PrP^C als Rezeptor für β -Amyloid-Oligomere und damit die Verbindung zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie AD wird diskutiert.^[60d]

Heutzutage steht fest, dass die Pathogenität von PrP^{Sc} und die Neuroprotektivität von PrP^C weit komplexere Ursachen haben, als zunächst angenommen wurde (LINDEN *et al.* 2008; NICOLAS *et al.* 2009).

1.1.7 Pathophysiologie der Prionenerkrankung

Als sicher gilt es heute, dass das zelluläre Prion-Protein (PrP^C) durch Änderung seiner nativen Konformation in eine andere Isoform (PrP^{Sc}) für das Ausbrechen von TSE verantwortlich ist. Es sind bisher keine nennenswerten Unterschiede in der Primärstruktur beider Isoformen gefunden worden. Auch keine kovalenten Modifikationen der pathogenen Form des Prion-Proteins konnten nachgewiesen werden, die es nicht auch bei der zellulären PrP zu bezeichnen gibt (STAHL *et al.* 1993). Ein Vergleich von isolierten Proben des Prion-Proteins aus dem nicht infektiösen und hoch infektiösen Material zeigte, dass die biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften beider Formen sich signifikant voneinander unterscheiden, was die Annahme bekräftigte, dass es sich dabei um Konformationsisomere handele. Mittels optischer Spektroskopie gelang der Nachweis struktureller Unterschiede. Während die native Isoform von α -helikalen Sekundärstrukturelementen dominiert wird und nur ein sehr kurzes β -Faltblatt-Motiv aufweist, zeichnet sich das pathogene PrP^{Sc} durch einen viel höheren Anteil an β -Faltblatt-reichen Strukturen aus (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 9 (CAUGHEY und RAYMOND 1999; GASSET *et al.* 1993; PAN *et al.* 1993; RIESNER *et al.* 2003; RIEK *et al.* 1996; KNAUS *et al.* 2001; ANTONYUK *et al.* 2009)).



Abbildung 8: Bändermodell der Maus PrP^C₁₂₁₋₂₃₁-Domäne, basierend auf NMR-Daten, welches dreidimensionale Anordnung der drei Helices (blau) und der zwei antiparallelen Faltblätter (grün) zeigt.^[61]

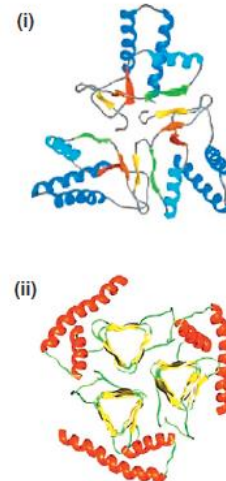


Abbildung 9: Denkbare dreidimensionale Strukturen von β-Faltblatt-reichen PrP^{Sc}-Trimeren, basierend auf Molekulardynamischen Simulationen (i) bzw. Elektronenkristallographischen Daten (ii).^[60a]

Bedingt durch die Konformationsänderung unterscheiden sich die beiden Isomere in ihren Eigenschaften. Während PrP^C in milden Detergenzien löslich und sensitiv gegenüber proteolytischem Abbau ist, zeichnet sich PrP^{Sc} durch seine Unlöslichkeit, weitgehende Protease-Resistenz sowie eine auffällig hohe Stabilität gegenüber Hitze und zahlreichen Chemikalien aus (COHEN und PRUSINER 1998; IRONSIDE *et al.* 1996, 1998; TAYLOR *et al.* 1991). Die schlechte Löslichkeit der pathogenen Isoform PrP^{Sc} ist auf die Ausbildung von Oligomeren und deren ausgeprägte Neigung zur Aggregation zurückzuführen (vgl. Abbildung 9).^[60a] Durch diese Tatsache bedingt, stehen derzeit keine hochauflösenden Strukturen zur Verfügung. Allerdings konnten bereits mehrere 3D-Struktur-Modelle von PrP^{Sc} entworfen werden, die auf den Ergebnissen verschiedener Methoden, wie spektroskopische Analysen, Elektronenmikroskopie, Wasserstoff/Deuterium (H/D)-Austausch, Faser-Röntgenbeugung und Oberflächenreaktivitätsmessungen basieren (TATTUM *et al.* 2006; SMIRNOVAS *et al.* 2011; VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ *et al.* 2012; AMENITSCH *et al.* 2013; GROVEMAN *et al.* 2014; REQUENA und WILLE 2014).

1.1.8 Prion-Protein-Konformere

Bei der Vermehrung von Prionen wird also die Konformationsänderung von der nativen PrP^C- zu ihrer pathogenen PrP^{Sc}-Isoform als zentrales molekulares Ereignis angesehen (PAN *et al.* 1993; COLBY und PRUSINER 2011). Da es sich beim PrP^C um ein hochkonserviertes Protein handelt, ist davon auszugehen, dass alle TSE bei Mensch und Tier auf demselben Mechanismus beruhen. Obwohl der Hergang der hier zugrundeliegenden Konformationsänderung bis heute noch nicht geklärt ist, werden unterschiedliche Modelle zur

Fehlfaltung krankheitsauslösender Proteine diskutiert, wobei die Entwürfe von PRUSINER und LANSBURY am meisten favorisiert werden. Das *seeding-* oder *nucleation-polymerization-*Modell wurde zum ersten Mal Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts in der Gruppe von GAJDUSEK erläutert und dann von LANDSBURY weiterentwickelt (COME *et al.* 1993). Hierbei wird davon ausgegangen, dass die beiden Isoformen des PrP sich in einem thermodynamischen Gleichgewicht befinden. Wobei dieses im Regelfall auf der Seite von PrP^C liegt, sodass nur wenig PrP^{Sc} frei vorliegt. Die PrP^C-Isoform ist stabil, wohingegen PrP^{Sc}-Moleküle erst durch gegenseitige Anlagerung unter Ausbildung eines Keims stabilisiert werden können. Dieser Keim ermöglicht seinerseits rasche Anlagerung weiterer PrP^{Sc}-Monomere und verlagert somit das Gleichgewicht zu dessen Gunsten. Infolgedessen führt ein bereits bestehender Polymerisations-Keim zur Ausbildung eines unlöslichen Amyloids, dessen Fragmentierung weitere infektiöse Keime entstehen lässt. Diese Modellvorstellung liefert wichtige Anhaltspunkte zum möglichen Mechanismus einer Ansteckung der Prionerkrankung, wo das Wirts-PrP^C in der Lage ist, sich an einen Polymerisations-Keim aus infektiösen PrP^{Sc}-Oligomeren anzulagern (MCKINLEY *et al.* 1991; JARRETT, LANSBURY 1992, 1993). Das zweite *heterodimer-refolding-* auch als *template-assistance-*Modell bekannt, wurde 1990 von PRUSINER vorgeschlagen (PRUSINER *et al.* 1990; COHEN *et al.* 1994). Gemäß dieser Modellvorstellung ist PrP^C in der Lage, während einer Interaktion mit pathogenem PrP^{Sc} unter teilweise Entfaltung seine Konformation anzunehmen. Demzufolge kommt es zur Formung eines Heterodimers, was gleichzeitig einen kritischen Schritt in diesem Prozess darstellt (PRUSINER *et al.* 1990; MEIER *et al.* 2003). Das neu entstandene PrP^{Sc} kann wiederum an das heterodimere Zwischenprodukt binden und dieses in einem autokatalytischen Prozess abermals umwandeln. Aufgrund des stark ausgeprägten hydrophoben Charakters neigt PrP^{Sc} dazu, unlösliche Protein-Aggregate auszubilden, die von der Zelle nicht mehr abgebaut werden können und als infektiöses Agens die Erkrankung übertragen. Obwohl das pathogene PrP^{Sc} thermodynamisch stabiler als das PrP^C Konformer ist, bleibt die spontane Konversion mit dem Überwinden einer sehr hohen Energiebarriere verbunden (COHEN *et al.* 1994), was das auffallend seltene, nur im fortgeschrittenen Lebensalter auftretende, Ausbrechen spontaner Formen von Prionerkrankungen erklären würde. Diese Hypothese steht auch in Einklang mit der Untersuchung von Forschergruppe um CAUGHEY, die eine erfolgreiche *in vitro* Konversion durchgeführt haben (CAUGHEY *et al.* 1995). Trotz vieler Bemühungen (LEGNANE *et al.* 2004; CASTILLA *et al.* 2005) mangelt es noch an abschließenden Befunden zur Bestätigung der *Protein-only* Hypothese, denn es fehlt weiterhin ein Nachweis von *in vitro* hergestelltem infektiösem Material aus synthetischem PrP^C. Angesichts dieser Tatsache

wird vermutet, dass noch ein zusätzlicher Faktor, genannt Protein X, für die Bildung von pathogenen Prionen notwendig ist (TELLING *et al.* 1995). Da bislang auch kein experimenteller Beweis für die Existenz eines stabilen PrP^{Sc} erbracht worden ist, bestätigt sich die Annahme, dass die Konformationsänderung eng mit dem Aggregationsprozess stehen muss (SWIETNICKI *et al.* 2000; MORILLAS *et al.* 2001; CAUGHEY und LANSBURY 2003).

1.1.9 Pathogenese der Prionerkrankung

Obwohl die neurodegenerativen Erkrankungen seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung sind, bleiben dennoch viele Fragen bezüglich der Pathophysiologie, Übertragungsmechanismen und vor allem zu der Diagnostik dieser für das Zentralnervensystem schwerwiegenden Erkrankung immer noch offen. Doch in einem Punkt scheinen sich die meisten Wissenschaftler einig zu sein und ernennen die somatischen Mutationen des Prion-Protein Gens (*PRNP*) und/oder eine spontane Konformationsänderung des Prion-Protein (PrP) zu den wahrscheinlichsten Ursachen der Prionerkrankung (COLLINGE 1997).

Die sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK) ist die häufigste Form der CJK. Im Jahr 1999 wurde eine weitere sporadische Prionerkrankung entdeckt, die aufgrund der klinischen Symptome als sporadische fatale Insomnie (SFI) bezeichnet wurde (PARCHI *et al.* 1999; MASTRIANNI *et al.* 1999). Ca. 90% der CJK-Fälle werden spontan hervorgerufen, davon etwa 10% durch Mutationen verursacht und autosomal dominant vererbt (familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK)). Ebenfalls bei dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und der Fatalen Familiären Insomnie (FFI) ist eine Mutation im PrP-Gen der Auslöser. In weniger als 1% CJK-Fälle wird die Erkrankung durch medizinische Eingriffe ungewollt auf den Menschen übertragen ((iCJK Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit) WILL und MATTHEWS 1982; DAVANIPOUR *et al.* 1984). Auch die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK) wird durch Infektion erworben und steht in einem engen Zusammenhang mit dem Rinderwahnsinn (BSE).

Über 20 verschiedene pathogene *PRNP*-Mutationen konnten bislang diagnostiziert werden. Es sind sowohl Punkt- und Deletionsmutationen als auch Insertionen, wobei die meisten den strukturierten C-Terminus betreffen (HSIAO *et al.* 1989; DLOUHY *et al.* 1992; PETERSEN *et al.* 1992; POULTER *et al.* 1992; GABIZON *et al.* 1993). Da diese Region die stabilisierenden Struktur motive von PrP^C beinhaltet, wird über die destabilisierende Wirkung unterschiedlicher Mutationen diskutiert, die mit einer spontanen Veränderung der Konformation einhergeht (OWEN *et al.* 1989). Alternativ werden Mutationen für eine

veränderte, konversionsfördernde Interaktion zwischen PrP^C und PrP^{Sc} oder die Wechselwirkung zu einem noch unbekanntem Kofaktor verantwortlich gemacht (s. Prion-Protein-Konformere). Doch für die häufigste CJD, die allerdings eine sporadische Krankheitsform darstellt und vor allem ältere Menschen betrifft, bleibt die Ursache weiterhin verborgen (AGUZZI *et al.* 2007).

1.1.10 Natürlich vorkommende Antikörper gegen das Prion-Protein (nAbs-PrP)

Im gewissen Sinne lässt sich die Prionenkrankheit, die durch körpereigenes Antigen ausgelöst wird, zur Familie der Autoimmunerkrankungen zuordnen. Bei einer klassischen Autoimmunerkrankung richtet sich das abnorm sensibilisierte Immunsystem gegen körpereigenes Gewebe. Im Falle von AD oder anderer durch Proteinfehlfaltung verursachten Krankheiten versagt das Immunsystem oft infolge einer Auto-Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen. Umso überraschender war daher die Entdeckung natürlich vorkommender Autoantikörper gegen PrP (nAbs-PrP) (WEI *et al.* 2012). Bei der Forschergruppe um DODEL konnten ebenfalls die natürlich vorkommenden Autoantikörper gegen A β (nAbs-A β) nachgewiesen werden (DODEL *et al.* 2002). Obwohl sie eine Vielzahl immunologischer Aufgaben erfüllen, zählen die natürlich vorkommenden Autoantikörper zum angeborenen Immunschutz und werden durch eine eher niedrige Antigen-Bindeaffinität beschrieben (BAUMGARTH 2011; GOLD *et al.* 2012). Allein die Tatsache, dass die nAbs-PrP sich sowohl in Serum als auch in CSF gesunder Spender nachweisen lassen, stellt einen Hinweis für die Existenz eines regulierten Gleichgewichts zwischen dem zellulären PrP^C und seiner pathogenen Isoform dar. Auch die in Zusammenhang mit AD und PD durchgeführten Studien, wo die nAbs-PrP-Konzentrationspiegel sich in Serum von Patienten und Gesunden deutlich voneinander unterscheiden ließ (DU *et al.* 2001; WEKSLER *et al.* 2002), sind Grund für die Annahme, dass die nAbs-PrP an der Aktivierung von zellulären „Clearance“ zum Abbau unlöslicher Aggregate führen (NEFF *et al.* 2008). Diese Erkenntnisse bieten einen guten Ansatz für die Entwicklung potentieller Therapiestrategien gegen Prionerkrankung.

In der Forschergruppe um DODEL gelang es mittels eines weiterentwickelten indirekten ELISA-Verfahrens (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) und anschließender Affinitäts-Chromatographie mit immobilisierten Prionenausschnitten (PrP-106-126) natürliche Autoantikörper (nAbs-PrP) aus SCF, humanem Serum sowie aus dem intravenösen Immunglobulin (IVIG)-Konzentrat erfolgreich zu isolieren.^[62] In Tierversuchen konnten diese nAbs-PrP die Aggregation des Prion-Proteins unterbinden und damit die neuronale Degeneration verlangsamen.^[62] Zusätzlich erhöhten nAbs-PrP die Aufnahme von PrP-106-

126 in Mikrogliazellen, worin man ebenfalls einen neuroprotektiven Effekt vermutet.^[63] Des Weiteren wurde das vermeintliche Epitop der entsprechenden Sequenz identifiziert. Dazu wurden verschiedene Ausschnitte der PrP-106-126-Sequenz nach einer Leserasterverschiebung um jeweils eine Aminosäure synthetisiert. In einem Peptid-*Microarray* wurden die Fragmente auf einer Zellulosemembran immobilisiert und einer Immunfärbung mit nAbs-PrP unterzogen. Das Fragment PrP-106-110 (KTNMK) stellte sich als das kleinstmögliche Peptid heraus, das vom Autoantikörper erkannt wird. Die beiden Lysine an den Positionen 106 und 110 waren dabei essentiell.^[62, 64] Die Vermutung liegt also nahe, dass es sich bei der Sequenz KTNMK um das Epitop des Prion-Proteins handelt. Ob nAbs-PrP ein geeignetes Immuntherapeutikum gegen Prionenerkrankungen darstellen, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.1.11 Diagnostische und therapeutische Ansätze

Trotz zuverlässiger Testsysteme für klinische Diagnostik, wie Positronen-Emission-Tomographie (PET), Magnetresonanztomographie (MRT) des ZNS, oder Lumbalpunktion (LP) lassen sich neurodegenerative Erkrankungen nicht frühzeitig erkennen. Gerade bei den durch Prionen ausgelösten Krankheiten treten klinische Symptome aufgrund langer Inkubationszeit erst dann auf, wenn neuronale Veränderungen bereits vorliegen. Die medikamentöse Behandlung bestehender Schäden in dieser Phase gestaltet sich äußerst schwierig. Viele wissenschaftliche Arbeiten fokussieren sich daher auf die Suche nach einer Verlängerung der Inkubationszeit, entweder durch Inhibierung der Akkumulation von PrP^{Sc} oder Hemmung der Konformationsänderung, die diese Akkumulation auslöst. Weitere therapeutische Ansätze beruhen auf einer Stabilisierung des zellulären PrP durch chemische Chaperone (CORTEZ und SIM 2014).

Durch systematische Untersuchungen der Lokalisationsorte für die Bioakkumulation des PrP^{Sc} wurde eine Reihe von Verbindungen mit Anti-Akkumulations-Eigenschaften entdeckt (VILETTE 2008). Hierzu gehören unter anderem polyene Antibiotika, Anthracyclin-Derivate, Suramin, der Azofarbstoff Kongorot, die verzweigten Polyamine Polyamidoamin, Polypropylenimin und Polyethylenimin, kationische Lipopolyamine, das lysosomotrope Amin Chlorpromazin, Cysteinproteaseinhibitoren, die Tetrapyrrol-Moleküle wie Phthalocyanine und Porphyrine, sowie synthetische PrP-Peptidfragmente (CHABRY *et al.* 1999, GILCH *et al.* 2001; DOH-URA *et al.* 2000; WINKLHOFER und TATZELT 2000; TREVITT und COLLINGE 2006). Diese Substanzen zeigen nachweislich einen therapeutischen Effekt im Tiermodell oder in Zellkultur (PRUSINER und DE ARMOND 2003). Deren Wirksamkeit beruht

einerseits auf der Stimulation der Endozytose und andererseits entfalten sie ihre inhibierenden Eigenschaften bei der zellulären Expression von PrP^C oder seiner Konformationsänderung. Da die Wirksamkeit dieser Verbindungen sich als stammspezifisch erweist, könnte eine mögliche Therapie von Erkrankten eine Kombination von mehreren Wirkstoffen erfordern (SARKAR und RUBINSZTEIN 2008; BERRY *et al.* 2013). Eine der größten Herausforderungen bei der Entwicklung einer auf Inhibitoren basierenden Strategie ist die chemische Modulation wirksamer Präparate hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren; denn nur im Parenchym des Gehirns, wo sich der größte Teil des PrP^{Sc} ansammelt, können Inhibitoren ihrer therapeutische Wirksamkeit entfalten.

Der Direktnachweis des Pathogens bei den verschiedenen Prionerkrankungen gelingt besonders gut in den follikulär dendritischen Zellen (FDC) der lymphatischen Organe, bevor es zu einer neurodegenerativen Ausbreitung kommt. Die Akkumulation von Prionen in sekundären lymphatischen Organen ist für die Aktivierung der humoralen Immunantwort von außerordentlich großer Bedeutung, denn dort kommt es nach einer Infektion mit einem Antigen zu einer spezifischen Immunantwort. Die Rolle des Immunsystems bei TSE (MABBOT und BRUCE 2001) und Immunisierungsstudien im Maus-Modell geben einen weiteren Anhaltspunkt für mögliche Antikörper-basierte Immuntherapien im Bereich der Fehlfaltungserkrankungen (HEPPNER *et al.* 2001; INGRAM *et al.* 2001; DODEL *et al.* 2013). Aktive und passive Immunisierungen wirken sich auf den Krankheitsverlauf im Tiermodell positiv aus. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn diese frühzeitig, noch vor Ausbruch der Erkrankung, verabreicht wurden (DODEL *et al.* 2012). Aktive Immunisierungen sind jedoch mit erheblichen Risiken verbunden, alleine durch den Umstand, dass es sich bei PrP^{Sc} um ein Protein mit hoch infektiösem Potential handelt. Des Weiteren ist die aktive Immunisierung im Falle einer Prionerkrankung durch eine zusätzliche Schwierigkeit gekennzeichnet, nämlich mit der Überwindung der Selbsttoleranz. Da der Erreger nicht als körperfremd erkannt wird, stellt die Induktion einer spezifischen Immunreaktion eine große Herausforderung dar. Eine schwer zu stimulierende Immunantwort ist darüber hinaus auf eine in Gegenwart natürlicher Autoantikörper (nAbs-PrP) verminderte T-Zell-Aktivierung zurückzuführen. Passive Immunisierungen erscheinen daher aufgrund der oben genannten Gründe sinnvoller. Ursprünglich wurde diese als Substitutionstherapie bei der Behandlung von Immundefizienz-Krankheiten und später für eine Vielzahl anderer Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Die Antikörper-basierte Immuntherapie wurde bereits im Bereich der PD- und AD-Forschung in Betracht gezogen (CITRON 2004; BENNER *et al.* 2004). In diesem Zusammenhang sind natürlich vorkommende Autoantikörper gegen A β und α -

Synuclein als potentielle Therapeutika diskutiert worden (NEFF *et al.* 2008). Der Forschergruppe um DODEL ist es gelungen, die natürlich vorkommenden Autoantikörper gegen das Prionprotein nicht nur zu isolieren, sondern auch deren inhibierende Eigenschaften auf die krankheitsauslösende Fibrillenbildung nachzuweisen.^[64]

Zu den weiteren Strategien mit der potentiellen Chance auf eine erfolgreiche Behandlung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen zählt zum einen der Einsatz des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin und zum anderen die Entwicklung der Oligomer-spezifischen Antikörper und darauf basierender Immunotherapie.

Memantin ist als Medikament sowohl in Europa als auch in den USA zugelassen und findet eine breite Anwendung bereits in der Parkinsontherapie sowie bei der Behandlung moderater bis schwerer AD-Demenz. Da die β -Faltblatt-reichen Proteine nachgewiesenermaßen eine Funktionsstörung im glutamatergen Neurotransmitter-System verursachen, könnte das Memantin als mögliches Therapeutikum zur Behandlung diverser neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt werden. Dieses Amantadinderivat gehört als einziger Vertreter zur Klasse nichtkompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonisten. Dank seines spezifischen Bindungsverhaltens hebt Memantin schädliche Glutamat-Wirkungen auf, verhindert eine Überreizung des Ionenkanals und somit das frühzeitige Absterben von Nervenzellen.^[65] Entwicklung eines Oligomer-spezifischen Antikörpers könnte eine mögliche Alternative für die Demenz-Therapie darstellen (KAYED *et al.* 2003).

Sollte es gelingen die löslichen Oligomere noch vom Einsetzen des Aggregationsprozesses durch Antikörper abzuwehren, so lässt sich das Aufkeimen infektiöser Proteine verhindern. Dieser Ansatz ist deshalb vielversprechend, weil er der primären Krankheitsursache entgegenwirkt. Durch Bindung löslicher Oligomere besteht zu keinem Zeitpunkt die Gefahr vor der irreversiblen neuronalen Hirnschädigung. Diese Strategie eröffnet daher eine unschätzbare Perspektive, die das Fortschreiten der Erkrankung im frühen Stadium zu verzögern oder gar zu verhindern vermag.

1.2 Zielsetzung

Die Ausbildung β -Faltblatt-reicher Konformere ist ein charakteristisches Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen. Auch die spongiformen Enzephalopathien des Menschen werden, nach dem heutigen Wissenstand, durch die Agglomeration einer anomal gefalteten Isoform des zellulären Prion-Proteins PrP^C verursacht. Die pathogene, β -Faltblatt-reiche Isoform des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) wird als einziger infektiöser Erreger von TSE angesehen. Trotz intensiver Forschung bleibt der Konversionsmechanismus des PrP^C weitgehend ungeklärt. Da die Konformationsänderung in einem engen Zusammenhang mit dem Aggregationsprozess steht, konnten bislang keine experimentellen Beweise für die Existenz eines stabilen PrP^{Sc} Monomers sowie über die Zusammensetzung PrP^C/PrP^{Sc}-Komplexes erbracht werden. Doch ohne umfangreiche Kenntnisse über den Verlauf der Umwandlung des PrP^C in PrP^{Sc} ist die gezielte Hemmung dieses Prozesses und somit die Entwicklung einer darauf basierenden Therapie äußerst schwierig. Trotz diverser, teilweise vielversprechender Therapieformen gibt es bis heute noch keine wirksame Behandlung für die Erkrankten.

Es zeichnete sich in jüngster Zeit eine Wende bei der Suche nach zielgerichteten Diagnose- und Therapieansätzen im Bereich der Proteinfehlfaltungserkrankungen ab. Mittels verhältnismäßig junger Immuntherapie konnten bereits Erfolge bei Behandlungen besonders aggressiver Krebsarten, zahlreicher Autoimmunerkrankungen und Allergien erzielt werden. Obwohl die Immunisierungsstrategien im Rahmen einer Prion-Infektion sich erst in den frühen Forschungsphasen befinden, verheißen viele Experten diesem Strategieansatz für therapeutische und insbesondere diagnostische Zwecke, eine große Zukunft. In Bezug auf die der Prionerkrankung zugrunde liegenden Konformationsmerkmale, erscheint ein Einsatz von Oligomer-spezifischen Antikörpern, besonders interessant.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand unter anderem darin, ein entsprechendes Peptid-Antigen zu generieren, das einerseits ein für die molekulare Erkennung und somit für eine humorale Antwort, notwendiges Epitop enthält und andererseits homodimere Struktur aufweist. Für die verfolgte Zielsetzung wurde die Herstellung einer Reihe PrP-Dimere mit spezifischen Lysin-Ladungsmustern angestrebt. Die Verknüpfung zweier identischer PrP-Sequenzen (PrP₁₀₆₋₁₁₈) zu einem Dimer sollte dabei über ein symmetrisches Triamin erfolgen. Durch die strukturelle Variation der Lysin-Seitenkette innerhalb der affinitätsvermittelnden Region sollte eine Vielfalt von PrP-Dimeren generiert werden, die wichtige Rückschlüsse hinsichtlich der Struktur-Affinität-Wirkungsbeziehung zwischen den synthetischen PrP-Peptiden und

natürlich vorkommenden PrP-Autoantikörpern (nAbs-PrP) erlauben. Mit Hilfe von immunologischen Testsystemen sollten anschließend die Unterschiede in der Bindungsaffinität untersucht werden.

Durch die Synthese und biologische Untersuchung modifizierter Prion-Proteinsequenzen wird also erhofft, aufschlussreiche Hinweise bezüglich der strukturellen Gegebenheiten des vermeintlichen PrP-Epitops zu gewinnen. Des Weiteren könnte die Synthese löslicher und stabiler PrP-Oligomere einen Zugang zur Gewinnung monoklonaler PrP-Antikörper darstellen und somit einen Raum für die Diagnostik und Therapie von CJD-Erkrankten eröffnen.

1.3 Ergebnisse und Diskussion

1.3.1 Synthese und Charakterisierung modifizierter Prion-Sequenzen

Zur Erforschung pathophysiologischer Prozesse bei Prionerkrankungen werden häufig synthetische Proteinfragmente als Modell herangezogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als solches ein Prion-Sequenzausschnitt PrP₁₀₆₋₁₁₈ verwendet. Dieser liegt in einer stark konservierten Region des Prion-Proteins und ist an der Konformationsänderung mitbeteiligt.^[63] Des Weiteren enthält das ausgesuchte Fragment das vermeintliche Epitop, ein *N*-terminal gelegenes Motiv mit der Aminosäureabfolge KTNMK (PrP₁₀₆₋₁₁₀).^[64] Außerdem ist der gewählte Abschnitt nur acht Aminosäuren kürzer als das in der Literatur^[62] beschriebenes Prion-Peptidmodell PrP₁₀₆₋₁₂₆ mit einer stark ausgeprägten Neigung zur Ausbildung von β -Faltblattstrukturen und damit gekoppelten Toxizität auf kultivierte Neurone. Das neu entworfene, *C*-terminal verkürzte PrP₁₀₆₋₁₁₈-Modell soll infolge dieser Veränderung auch als Homodimer in erster Linie wasserlöslich und NMR-spektroskopisch gut charakterisierbar sein. Damit erfüllt das neu entwickelte PrP-Modell eine wichtige Voraussetzung, von nAbs-PrP erkannt zu werden, und zusätzlich, im Vergleich zu anderen gängigen PrP-Modellen, aufgrund des fehlenden hydrophoben Restes, möglicherweise weniger toxisch zu sein. Als Referenzen sollten außer den dimeren PrP-Sequenzen auch polyaminmodifiziertes PrP-Monomer sowie unmodifiziertes PrP-Standardpeptid mit der einheitlichen Kettenlänge hergestellt werden. Ein Überblick über die synthetisierten PrP-Fragmente ist in Abbildung 10 zu finden.

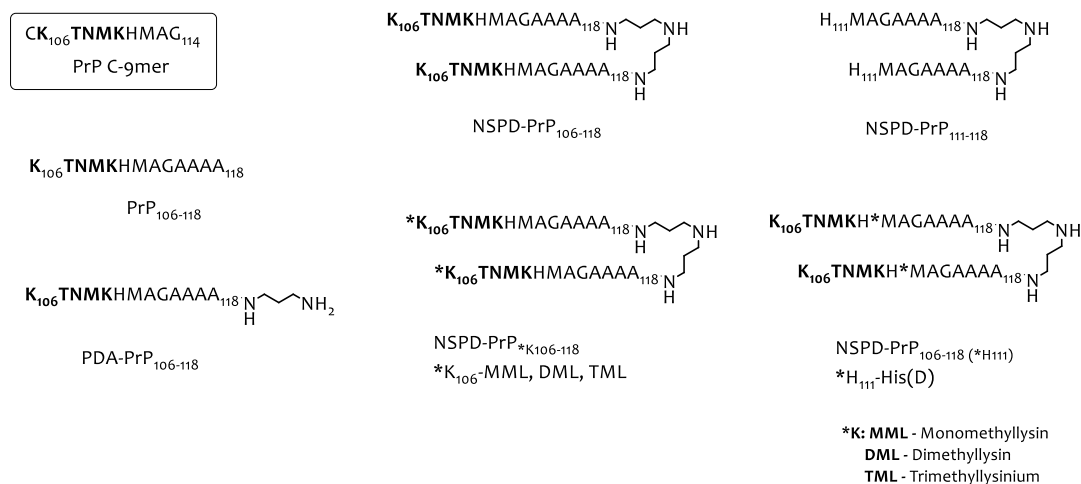


Abbildung 10: Die entworfenen polyaminmodifizierten PrP-Modelle im Vergleich zu dem selbsthergestellten PrP-Standard PrP₁₀₆₋₁₁₈ sowie einem kommerziell erhältlichen PrPC-9mer (umrahmt, links oben), das in der Forschergruppe von Prof. DODEL routinemäßig im Rahmen eines Dot Blots als PrP-Standard verwendet wurde.

Für die Durchführung diverser Experimente, unabhängig davon ob die Untersuchungen qualitativer oder quantitativer Natur sind, ist die Wahl der Referenz von ganz entscheidender

Bedeutung. Ein Peptidstandard für die Durchführung biochemischer oder medizinischer Assays ist vor allem an die spezifischen Anforderungen der jeweiligen Untersuchung angepasst und meist kommerziell erhältlich, hat jedoch auch gewisse Nachteile. Zwar ist er frei und in ausreichenden Mengen für die Fachkreise zugänglich, dennoch sind viele analytische Merkmale des Peptides wie Reinheitsgrad, Salzgehalt sowie Art der Gegenionen von dem verwendeten Herstellungs- und Aufreinigungsverfahren abhängig und variieren demnach nach Anbieter. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere PrP-Standards eingesetzt. Es wurde mit dem bei Firma der BACHEM erworbenen PrPC-9mer sowie einem selbsthergestellten PrP₁₀₆₋₁₁₈-Modell, das unter Standardreaktionsbedingungen hergestellt wurde, gearbeitet (s. Kapitel 5.2.1, zzgl. Abbildung 10). Die Wahl eines Amines für die Verknüpfung monomerer PrP-Sequenzen ist wohl überlegt. Aufgrund ihrer Beteiligung an zahlreichen, für das Überleben von Zellen unabdingbaren Prozessen werden Polyamine mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht (s. Kapitel 1.1). Es konnte nachgewiesen werden, dass Polyamine durch eine direkte Interaktion mit Amyloid- β -Peptiden unter gleichzeitiger Reduzierung von hoch toxischen β -Amyloid-Fibrillen eine Konformationsänderung einleiten, welche an der Pathogenese von MORBUS ALZHEIMER beteiligt sind. So senken Polyamine erwiesenermaßen die Toxizität von Amyloid- β -Peptiden.^[66a,66b] Trotz zahlreicher zum Teil aufmunternder Ergebnisse hinsichtlich des positiven Einflusses der Polyamine in der Pathophysiologie diverser, durch Proteinfehlfaltung ausgelöster Erkrankungen, werden diese kontrovers diskutiert. Da die Pathogenese von Prionenkrankheiten ebenfalls auf der konformationellen Änderung eines löslichen, endogenen in die unlösliche, pathogene Peptid-Isoform beruht, erscheint die Strategie zur Herstellung der über ein Amin verknüpften PrP-Dimere zur Untersuchung potentieller Wechselwirkungen zwischen Polyaminen und PrP besonders attraktiv.

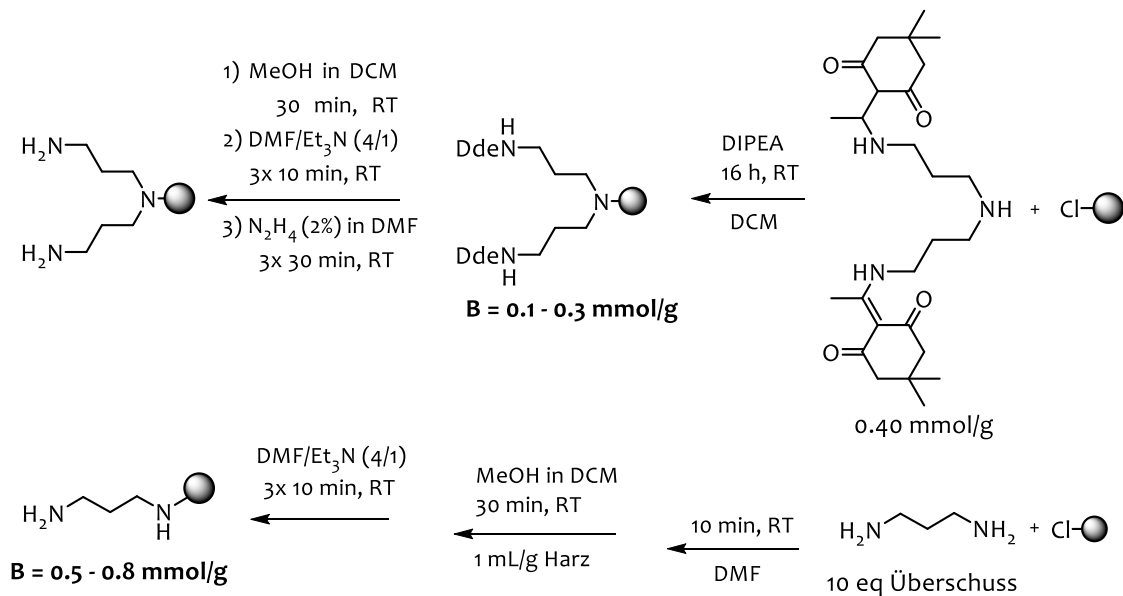
Auch wenn die Immunisierungsstrategien bei der Therapie von Prionerkrankungen immer attraktiver werden, bleibt die Suche nach effizienten Arzneistoffen eine der Hauptrichtungen in der Pharmarforschung, weil die Arzneimittel zweitwichtigste Darreichungsform repräsentiert. Bei der Entwicklung neuer, pharmazeutisch wirksamer Substanzen spielt neben dem Synthesedesign die Pharmakokinetik eine immer wichtigere Rolle. In vieler Hinsicht, aber vor allem bei Metabolisierung von Arzneistoffen ist ein Einsatz polyaminmodifizierter Wirkstoffe von besonderem Interesse.

Mithilfe von Screening-Verfahren und biomedizinischen Assays ist es zwar möglich eine Vielzahl von Wirkstoffen *in vitro* zu testen, viele dieser Verbindungen zeigen jedoch eine geringere Bioverfügbarkeit. Eine gewebespezifische Applikation ist aber notwendig, um

mögliche toxische Effekte und Nebenwirkungen zu verringern oder ganz zu vermeiden. Neben den polykationischen Peptiden CPPs (engl. cell penetrating peptides RYSER *et al.*), die dazu befähigt sind, zelluläre Plasmamembranen zu durchqueren, eignen sich Polyamine als molekulare Transporter. Die letzten haben einen entscheidenden Vorteil gegenüber Peptid-Mimetika, da sie über eine höhere Stabilität gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Peptidasen verfügen und somit eine höhere Beständigkeit *in vivo* aufweisen. Polyamine stellen aufgrund ihrer guten zellulären Aufnahme und Verträglichkeit eine vielversprechende Klasse molekularer Transporter dar. Alle humanen Zellen verfügen über ein Transportsystem für Polyamine wie Spermin, Spermidin, Putrescin. Dieses Transportsystem scheint aber trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten der natürlichen Polyamine keine große Spezifität zu besitzen. Zahlreiche Verbindungen werden ebenfalls mithilfe dieses Transportsystems in Zellen aufgenommen (HAHN *et al.*, SCHEPERS *et al.*).

Polyamine, wie der Name schon sagt, können über mehrere unterschiedliche Aminofunktionen verfügen. Bei ihnen ist eine Unterscheidung von primär/sekundär/tertiär/quartär möglich. Diese können innerhalb eines Moleküls nebeneinander vorliegen oder in einer einzigartigen Kombination auftreten; sie können sowohl symmetrisch als auch ungleichmäßig angeordnet sein und bestimmen damit sämtliche spezifische Eigenschaften des Polyamins. Deshalb stellt eine gezielte Modifizierung dieser multifunktionellen Verbindungsklasse eine besondere synthetische Herausforderung dar. Eine regioselektive Derivatisierung gelingt oft nur unter Verwendung geeigneter Synthese- und Schutzgruppenstrategien. Da die Peptidsynthese routinemäßig an der festen Phase durchgeführt wird, soll der Amin-Linker ebenfalls an die SPPS-Bedingungen angepasst werden. Für den synthetischen Erfolg ist die Wahl der zu verwendenden Schutzgruppen genauso entscheidend wie die Strategie selbst. Norspermidin eignet sich aus Symmetriegründen und dem zwischen zwei benachbarten Aminofunktionen einheitlichen C3-Abstand, für die geplante Verzweigungs-Strategie am besten. Dieses um eine Methylen-Einheit verkürzte Amin leitet sich, wie bereits der Name vermuten lässt, vom Spermidin ab und verfügt über zwei endständige primäre und eine interne sekundäre Aminofunktion (s. Abbildung 2). Für die Herstellung über Norspermidin-Linker kovalent verknüpfter PrP-Dimere musste das Triamin über die einzige, hier vorhandene sekundäre Aminofunktion selektiv an das 2-Chlortritylchlorid-Harz gebunden werden. Die Entscheidung für das Polystyrol-Harz mit bereits erwähntem 2-Chlortritylchlorid-Linker begründet sich anhand dessen Eigenschaften und dem geplanten Syntheseweg. Aufgrund der polyvalenten Reaktivität des Norspermidins, wurde die selektive Schützung seiner, an der Beladung nicht

beteiligten primären Aminofunktionen in Lösung durchgeführt. Diese Strategie ist in Hinsicht auf die selektive Harzbeladung insofern vorteilhaft, weil sie zusätzliche Syntheseschritte unter Verwendung mehrerer orthogonaler Schutzgruppen erspart (s. Kapitel 2.7). Die zweifache chemoselektive Schützung der primären Aminogruppen des Norspermidins wurde mittels Dde-OH erreicht (s. Schema 1).



Schema 1: Allgemeines Schema zur selektiven Beladung der Polyamine an das CTC-Harz am Beispiel des Norspermidins (oben) und 1,3-Diaminopropan (unten).

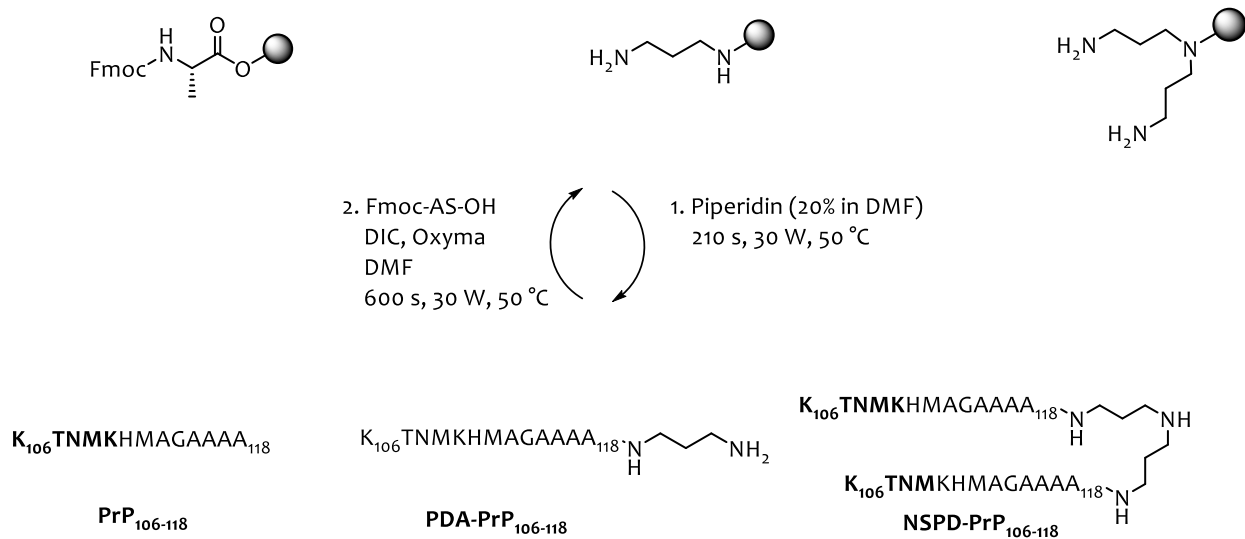
Für die Synthese des polyaminkonjugierten monomeren PrP-Analogons wurde 1,3-Diaminopropan verwendet. Da dieses Diamin, hinsichtlich der gleichwertigen Aminogruppen, monofunktionell wirkt und dazu symmetrisch ist, bedarf es vor Harzbeladung keine strategiegerechte Aufbereitung. Doch die kovalente Anbindung monofunktioneller Amine an das Harz ist mit deutlich ausgeprägten Quervernetzungen verbunden, die ihrerseits zu Einbußen in der Reinheit und Ausbeute führen. Diese Quervernetzungen lassen sich vermeiden, in dem das jeweilige Amin in einem großen Überschuss eingesetzt wird und kurze Reaktionszeiten eingehalten werden.^[67]

Die Synthese der nativen PrP-Sequenz wurde im Gegensatz zu den polyaminmodifizierten PrP-Peptiden mit dem Ankoppeln einer käuflich erworbenen, Fmoc-geschützten Aminosäure (Ala₁₁₈) gestartet (s. Schema 2). Die Prion-Sequenzen wurden mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach der Fmoc-Strategie hergestellt. Als Kupplungsreagenzien wurden Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Hydroxyimino-cyanoessigsäureethylester (Oxyma) eingesetzt. Zur temporären Fmoc-Entschützung wurde Piperidin verwendet. Durch die stufenweise Veränderung der PrP-Peptide, angefangen von dem nativen über C-terminal umgepoltes Peptid bis hin zum Dimer, soll ein Vergleich der

Polyamin-basierte Modifikationen der Prionpeptide
Ergebnisse und Diskussion

synthetischen PrP-Sequenzen nicht nur untereinander, sondern auch mit dem käuflichen PrPC9-mer ermöglicht werden.

In Schema 2 ist der Synthesepfad exemplarisch für die PrP-Peptide der ersten Generation zusammengefasst, die genauen Reaktionsbedingungen sind dem Kapitel 5.2.1 zu entnehmen.



Schema 2: Allgemeines SPPS-Syntheschema für Prion-Sequenzen der ersten Generation.

Es konnte gezeigt werden, dass die geplanten Prionenausschnitte in einem automatisierten Verfahren in hoher Reinheit zu erhalten sind. Die Abspaltung vom Harz wurde unter gleichzeitiger Seitenkettenentschützung mit einer frisch hergestellten, entgasten Abspalllösung aus TFA/H₂O/EDT/TIPS (95.5:2:1.5:1) durchgeführt. Durch die Zugabe von 1,2-Ethandithiol (EDT) und Triisopropylsilan (TIPS) sollte die Oxidation der Methionin-Seitenkette während der Abspaltung vom Harz vermieden werden. Aus dieser Lösung wurde das jeweilige Peptid in kaltem Diethylether gefällt und abzentrifugiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Peptide am HV getrocknet und lyophilisiert. Die Rohpeptide wurden mittels präparativer-HPLC aufgereinigt und im Anschluss dazu analysiert.

Auch in dieser Arbeit ist NMR-Spektroskopie das am häufigsten benutzte analytische Werkzeug zur Strukturaufklärung. Diese spektroskopische Methode ist besonders wertvoll für die Ermittlung der in Lösung vorliegenden Konformationen. Sie schafft durch die Bestimmung der Konstitutions-, Konfigurations- und Konformationsrelevanten Informationen eine solide Grundlage für die Strukturanalyse komplexer Makromoleküle. Des Weiteren gestattet sie eine stichhaltige Aussage über die molekulare Beweglichkeit, die gegebenenfalls mögliche Einblicke in die molekularen Grundlagen dynamischer Prozesse gewährt. Durch routinemäßig aufgenommene Massenspektren wurden die Peptidstrukturen zusätzlich

gesichert. Die ausgewerteten Daten der NMR- und massenspektroskopischen Untersuchungen sind dem experimentellen Teil dieser Arbeit zu entnehmen.

Trotz der hohen Anzahl ähnlicher bzw. identischer Aminosäuren konnten alle NMR-Signale zugeordnet werden. Die Charakterisierung der Prion-Sequenzen erfolgte durch ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie bei 600 MHz, die genauen Bedingungen sind in Kapitel 5 beschrieben. Zur Zuordnung der Spinsysteme einzelner Aminosäuren wurden TOCSY-Experimente durchgeführt. Die Reihenfolge der Aminosäuren innerhalb des Peptid-„backbones“ wurde mittels NOESY bzw. ROESY bestimmt. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Prion-Peptide wurden, trotz ihrer ausgezeichneten Löslichkeit in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, in wässrigen Phosphat-Puffer-Lösungen vermessen und analysiert. Die verwendeten Phosphat-Puffer-Systeme repräsentieren nicht nur physiologische Bedingungen sondern eignen sich bevorzugt dank der charakteristischen Pufferkapazität und Erhaltung eines stabilen pH-Wertes besonders gut für die Strukturuntersuchung diverser biologisch relevanter Verbindungen. Da sich die synthetisierten Peptide in ihrer Primärstruktur nur geringfügig voneinander unterscheiden, wurden die ¹H-NMR-Spektren übereinandergelegt, um Unterschiede besser feststellen zu können. Der Signalsatz des jeweiligen Polyamin-Linkers konnte so leicht für die modifizierten Peptide identifiziert werden (s. Abbildung 11).

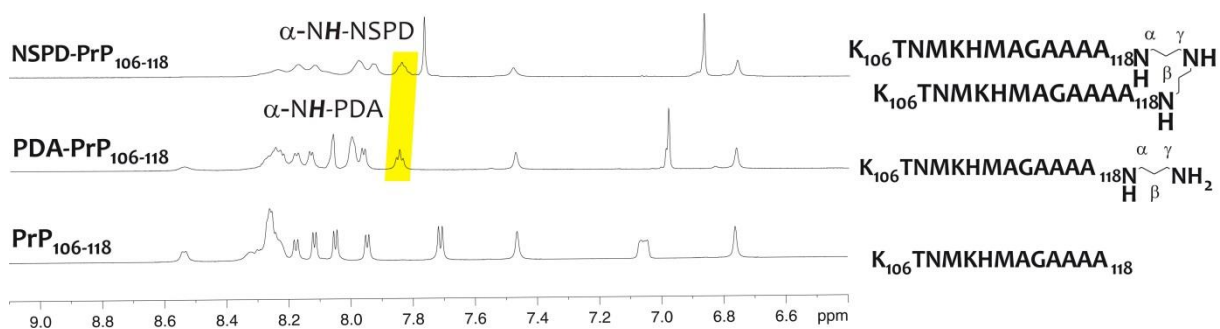


Abbildung 11: NH-Bereich-Ausschnitt aus den ¹H-NMR-Spektren zum Vergleich der Prion-Peptide der ersten Generation untereinander (gemessen bei 600 MHz, in 50 mM KH₂PO₄-Puffer/D₂O 9:1, pH 6). Hervorgehoben in gelb sind Signale, deren Entstehung, Form und chemische Verschiebung auf der Konjugation mit dem entsprechenden Amin basieren.

Im Hinblick auf die geringe Diversität der Aminosäuren ließ eine NMR-spektroskopische Untersuchung der Peptide eine eher geringe Dispersion in den Spektren erwarten. Bemerkenswert ist dennoch die relativ hohe Dispersion der Amidprotonen der nativen PrP₁₀₆₋₁₁₈-Sequenz. Das C-terminal umgepolte Monomer zeigte ähnliche chemische Verschiebungen und eine verhältnismäßig gute Dispersion im amidischen Bereich. Auffallend ist in dieser Reihe die Verbreiterung der Signale. Dieser Effekt wird in erster Linie auf die intermolekulare Dynamik, bedingt durch den chemischen Proteneustausch, zurückgeführt;

denn bei einem konstanten pH-Wert und einheitlicher Temperatur dürfte die Austauschrate, die durch die Anzahl am H-Austausch beteiligten Komponenten bestimmt wird, bei einem dimeren NSPD-PrP₁₀₈₋₁₁₈ doppelt so hoch sein im Vergleich zu den monomeren PrP-Peptiden. Diese Annahme lässt sich überprüfen, indem ein ausgewähltes Peptid bei unterschiedlichen pH-Werten vermessen und analysiert wird (s. Abbildung 12). Zu diesem Zweck wurde das NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈-Dimer bei zwei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Es zeigte sich, dass der pH-Wert einen signifikanteren Einfluss auf die Austauschrate im Vergleich zur Temperaturänderung hat, wobei mehr als 40 K notwendig waren, um die wesentlichen Unterschiede feststellen zu können.

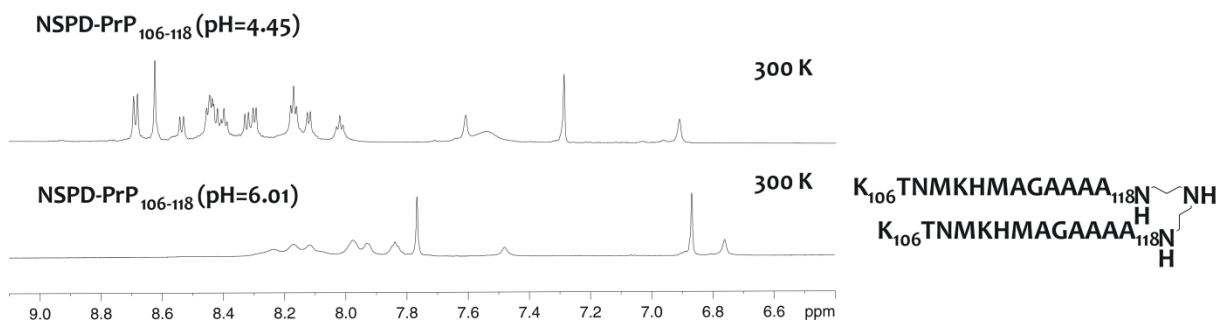


Abbildung 12: Amid-, aminischer Bereich der ¹H-NMR-Spektren des NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈-Dimers gezeigt bei zwei unterschiedlichen pH-Werten. Zur Untersuchung der pH-abhängigen Verbreiterung der amidischen und aminischen Signale wurden die Spektren in 50 mM KH₂PO₄-Puffer/D₂O 9:1, bei 600 MHz, 300 K, bei pH 6.01 (unten) und bei 4.45 unter Zugabe von TFA (oben) vermessen.

Auch der aliphatische Bereich der diskutierten Reihe zeigt verblüffende Ähnlichkeiten. Die kovalente Anbindung des PDA-Linkers bzw. Verzweigung mittels Nospermidins scheinen keine relevanten strukturellen, mittels NMR-Spektroskopie greifbaren Unterschiede herbeizuführen (s. Abbildung 13). Auch hier sind die neu erschienenen, dem 1,3-Propylendiamin bzw. Norspermidin eindeutig zugeordneten Signale gut erkennbar.

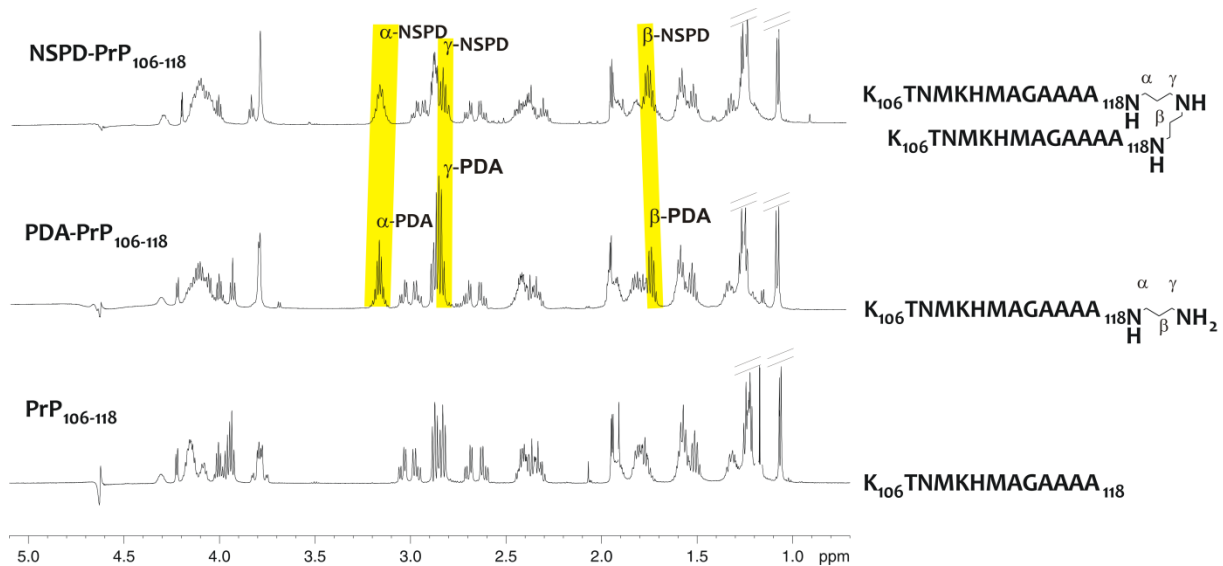


Abbildung 13: Ausschnitte aus dem aliphatischen Bereich der ^1H -NMR-Spektren zum Vergleich der Prion-Peptide der ersten Generation untereinander (gemessen bei 600 MHz, in 50 mM KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1, 300 K, pH 6). Die dem Norspermidin- bzw. 1,3-Propylendiamin zugeordneten Signale sind gelb markiert.

Abbildung 13 veranschaulicht erneut die überraschende Ähnlichkeit der ^1H -NMR-Signale der PrP-Peptide der ersten Generation. Die wenigen Unterschiede, die durch Überlagerung deutlich werden, beruhen einzig und allein auf der Modifikation durch Polyamine. Diese kovalente Veränderung scheint zuerst einmal keinen bedeutsamen Einfluss auf die strukturellen Gegebenheiten der PrP-Ausschnitte zu haben. So zeigt die native PrP₁₀₆₋₁₁₈-Sequenz eine auffällige Ähnlichkeit in der chemischen Verschiebung im Vergleich zu den beiden aminkonjugierten PrP-Peptiden im ^1H -NMR-Spektrum. Die Zuordnung des dimeren PrP-Peptids lässt sich über die Analogie zu den monomeren Prion-Peptiden weitestgehend ableiten. Die beiden Stränge des PrP-Dimers weisen ebenfalls identische chemische Verschiebungen auf. Denkbar ist es aber auch, dass die hier eventuell vorliegenden Differenzen aufgrund zahlreicher identischer bzw. ähnlicher Aminosäuren nicht identifiziert werden konnten. Die weitergehende Übereinstimmung der Signale lässt keinen Raum für Mutmaßungen bezüglich der bevorzugten Konformation kovalent modifizierter PrP-Sequenzen der ersten Generation.

Ähnlich wie bei kleinen Molekülen besteht auch bei längeren Peptiden der nächster Schritt nach der Bestimmung der Rückgrat-Resonanzen in der sequenzspezifischen Zuordnung. Der Aminosäuretyp lässt sich insofern leicht ermitteln, da eine skalare Kopplung nicht über den Carbonyl-Kohlenstoff im Peptid-„backbone“ hinausreicht. So bildet jede Aminosäure ein separates Spinsystem, das in der Regel mit Hilfe homonuklearer, auf einer skalaren Kopplung basierenden COSY- bzw. TOCSY-Experimenten bestimmt werden kann. Bei COSY-Spektren, vor allem bei größeren Peptiden, kommt es jedoch oft aufgrund der hohen

Polyamin-basierte Modifikationen der Prionpeptide
Ergebnisse und Diskussion

Signalanzahl schnell zu Überlagerungen. Daher wird bei Auswertung längerer Peptidsequenzen bevorzugt TOCSY eingesetzt. In Abbildung 14 ist die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen für das dimere PrP-Peptid exemplarisch dargestellt.

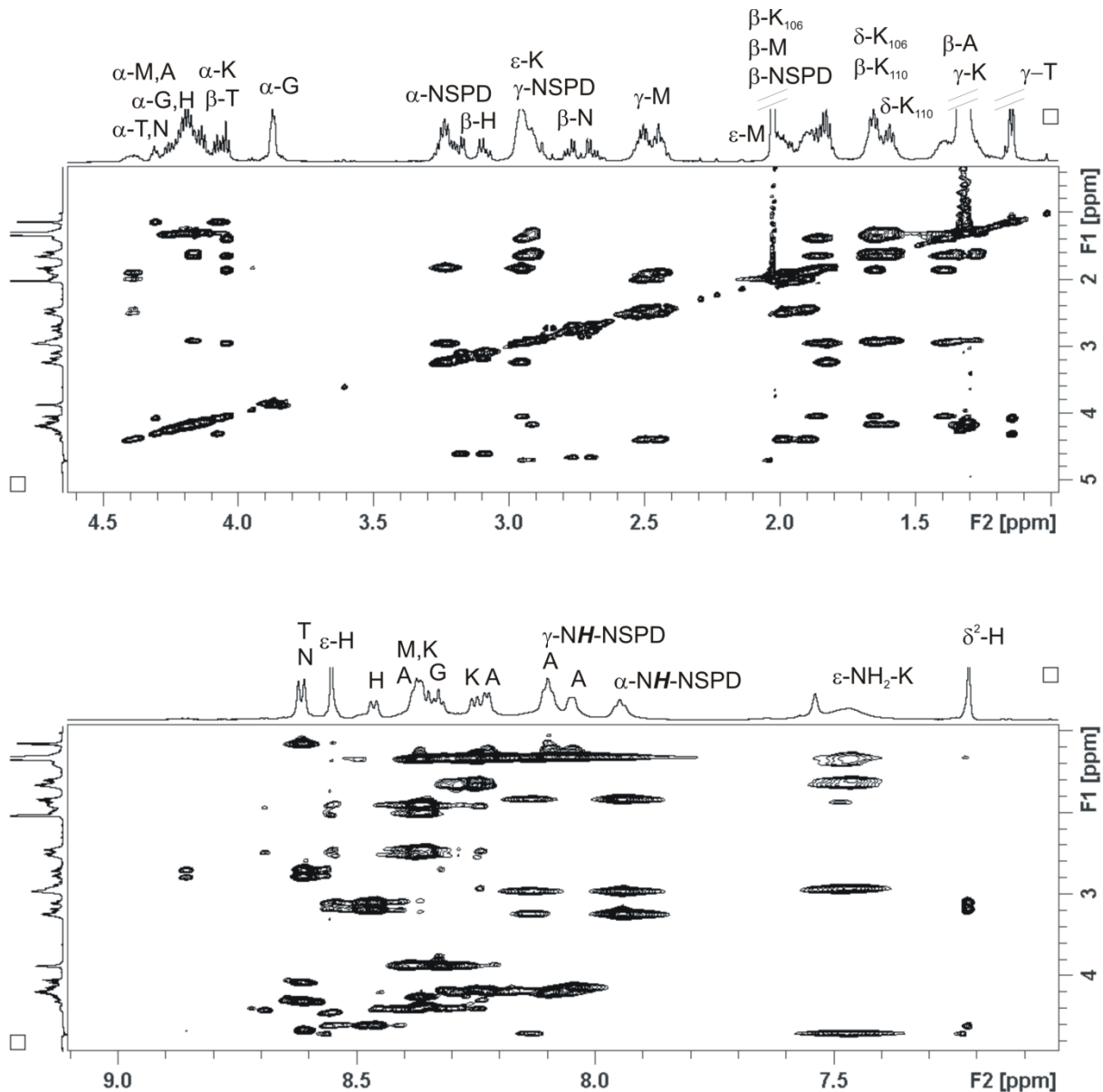


Abbildung 14: Ausschnitte aus einem TOCSY-Spektrum zur sequenzspezifischen Zuordnung des dimeren NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈-Peptids der ersten Generation (gemessen bei 600 MHz, in 50 mM KH₂PO₄-Puffer/D₂O 9:1, 300 K, pH 4.45).

Es erwies sich als äußerst schwierig ein universell geeignetes Experiment für alle synthetisierten Peptide zur Untersuchung der relativen Konfiguration festzulegen. Trotz zahlreicher Vorteile vom *Rotating-Frame Overhauser Effect Spectroscopy* (ROESY-Experiment) gegenüber dem NOESY- (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) Versuch konnten keine aufschlussreichen Spektren mit einer Fülle an NOE-Signalen, für die Strukturaufklärung notwendige Crosspeaks, erhalten werden. Das NOESY-Experiment, das routinemäßig für Vermessung größere Moleküle (ab 2000 g/mol) eingesetzt wird, lieferte

dagegen vor allem bei den dimeren Peptiden vorwiegend aussagekräftige Spektren. Schwer detektierbare NOE-Signale sind bekannte Charakteristika für hoch dynamische Moleküle und können in diesem Fall auf die strukturelle Flexibilität der Peptide übertragen werden. Obwohl es sich aufgrund der strukturellen Flexibilität der Peptide als schwierig erwies, alle für die Sequenzierung notwendigen NOE-Kontakte sichtbar zu machen, konnte die nahezu vollständige Aminosäureabfolge mittels NOESY-Experimenten bestätigt werden (s. Abbildung 15).

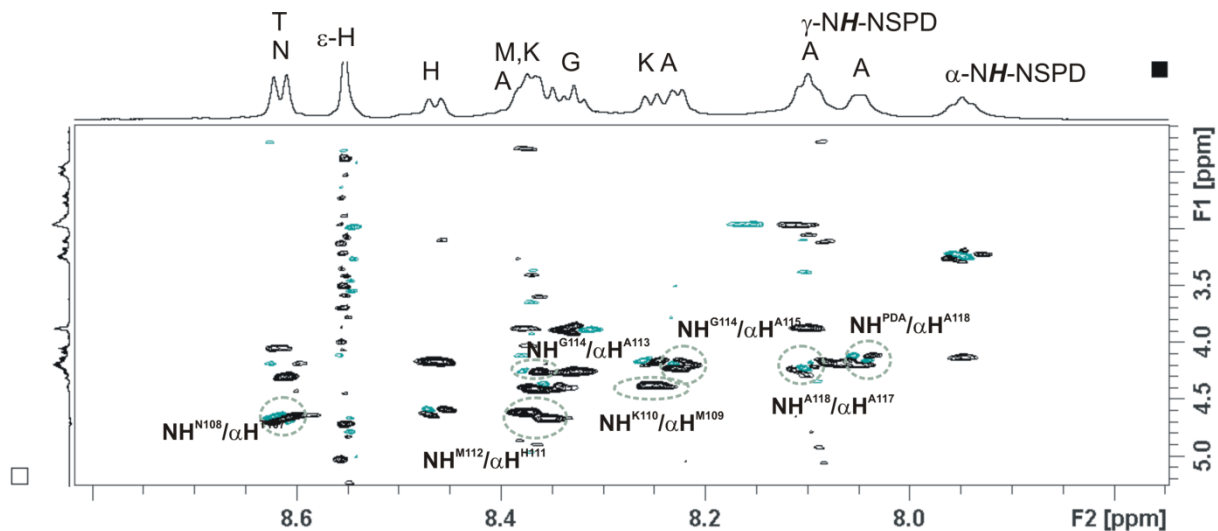


Abbildung 15: Ausschnitt aus einem NOESY-Spektrum (gemessen bei 600 MHz, in 50 mM KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1, 300 K, pH 4.45) zur sequenzspezifischen Zuordnung des dimeren NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈-Peptids der ersten Generation. Das Spektrum weist lediglich (*i, i+1*)-Kontakte auf.

Der Ausschnitt aus einem NOESY-Spektrum (s. Abbildung 15) veranschaulicht exemplarisch die Sequenzierung für das NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈-Dimer. Alle NOESY bzw. ROESY-Spektren des untersuchten synthetischen PrP-Dimers weisen, ähnlich den Untersuchungen monomerer PrP-Peptide der ersten Generation ausschließlich (*i, i+1*)-Kontakte auf, sodass hier von einer eher unstrukturierten, flexiblen Konformation auszugehen ist. Demzufolge konnten hier auch nicht anhand 2D-NMR-Spektroskopie Informationen bezüglich der bevorzugten Konformation erhalten werden.

Durch Analyse der Spinsysteme und der zugehörigen chemischen Verschiebungen, Integrale und Multiplizitäten gelang die Zuordnung der Protonen der gesamten PrP-Reihe der ersten Generation. In Abbildung 16 ist das vollständig ausgewertete ^1H -NMR-Spektrum des dimeren NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈ gezeigt.

Polyamin-basierte Modifikationen der Prionpeptide
Ergebnisse und Diskussion

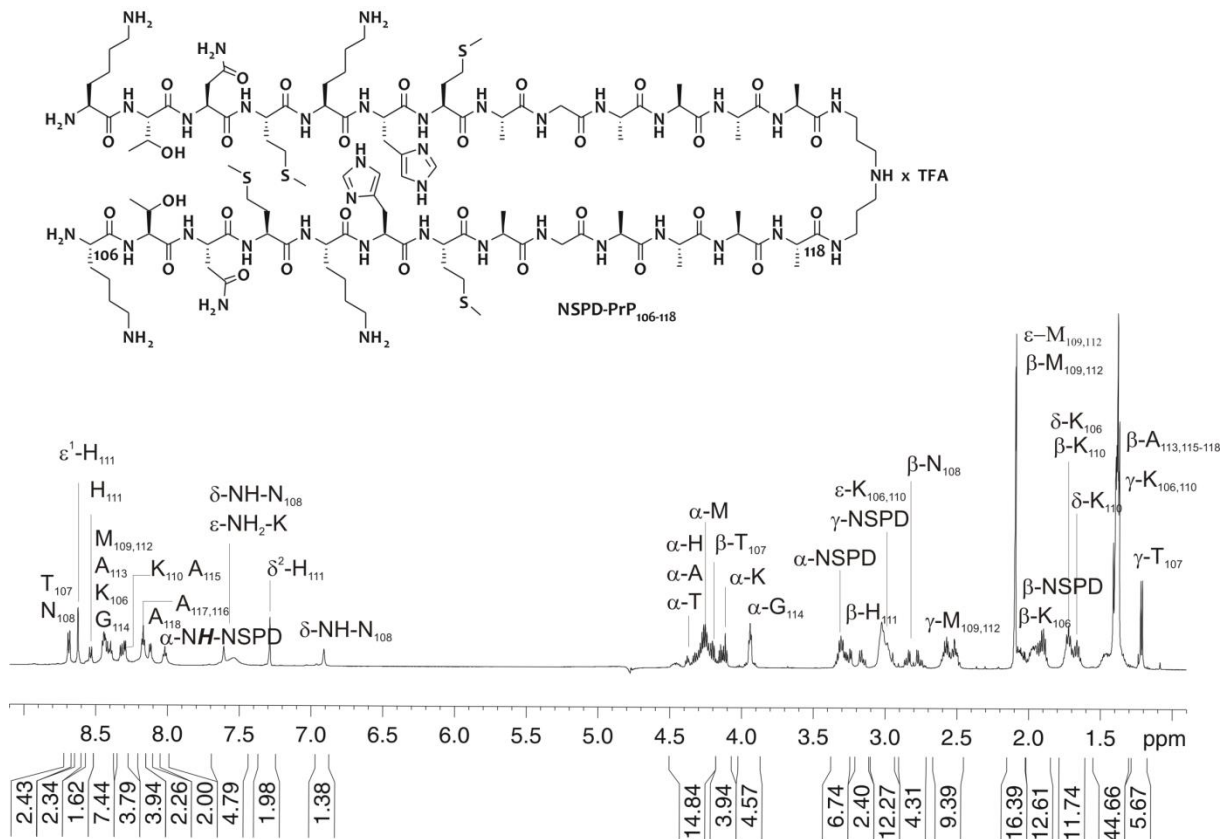


Abbildung 16: ¹H-NMR-Spektrum des dimeren NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈-Peptids mit der vollständigen Zuordnung der Signale (gemessen bei 600 MHz, in 50 mM KH₂PO₄-Puffer/D₂O 9:1, pH-4.45). Aufgrund der Wasserunterdrückung ist die Intensität der Signale zwischen 4 und 5 ppm verringert.

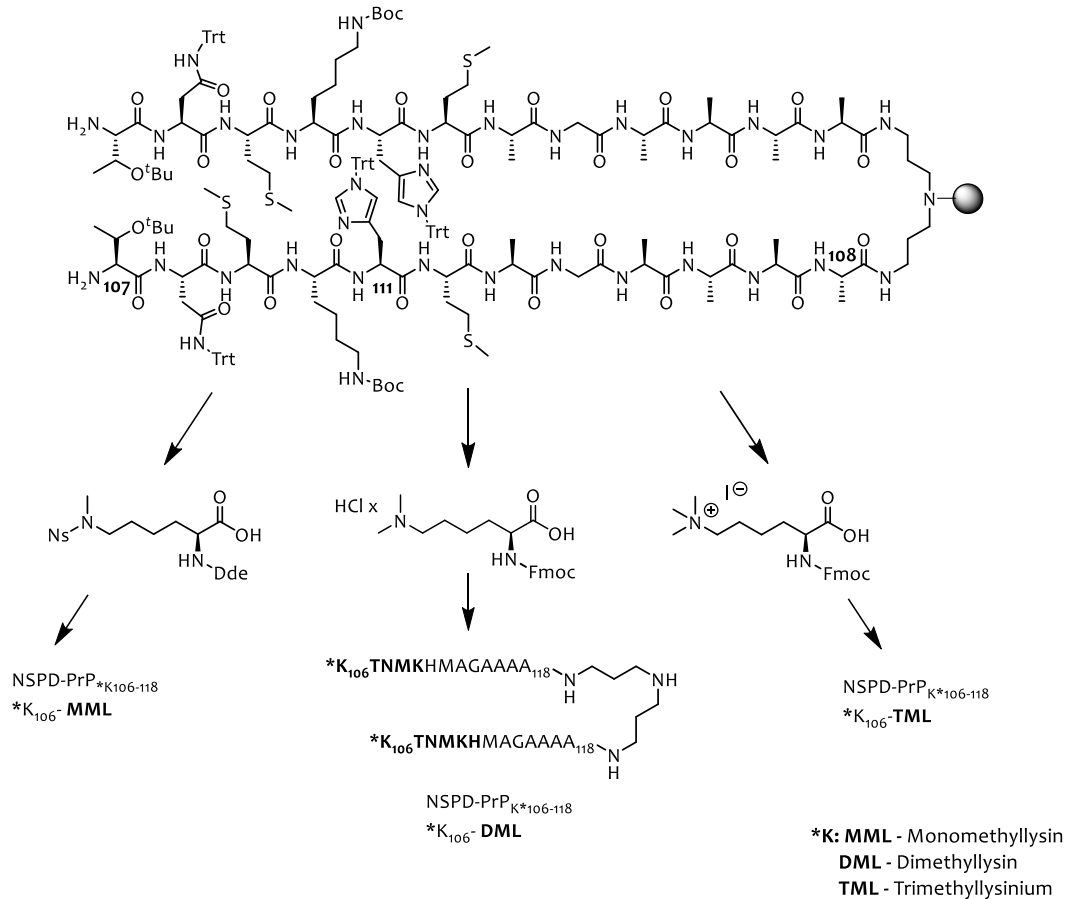
Die zweite Generationsreihe der PrP-Peptide sollte neben der homodimeren Struktur auch eine geringfügige Veränderung der antigenen Determinante erhalten. Die Ermittlung des spezifischen Epitops Peptid-induzierter nAbs-PrP gelang Y. RÖTTGER im Rahmen ihres Dissertationsprojektes, gestützt auf den Vorarbeiten von WEI *et al.*^[64] Dabei stellte sich das *N*-terminal gelegene Motiv mit der Abfolge von Aminosäuren-KTNMK als kleinstmögliches Peptid heraus, das von nAbs-PrP erkannt wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Bindung höherer Affinität hauptsächlich durch die Lysin-Reste vermittelt wird, da eine Substitution oder Deletion dieser Aminosäuren einen ausgeprägten Affinitätsverlust zur Folge hatte. Durch die systematische Veränderung der Seitenkette eines der ausgesuchten Lysine (K₁₀₆) soll zum einen dessen Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften der dimeren PrP-Peptide und zum anderen deren Auswirkung auf die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung untersucht werden. Die denkbar einfachste Lysin-Derivatisierung ist durch Methylierung der primären, an der Seitenkette lokalisierten ϵ -Aminofunktion zu erreichen. Bei den Methylierungen handelt es sich um eine der häufigsten Modifikationen der Lysin-Reste (ZHANG *et al.* 2004). Zugleich gehört Lysin zu den wenigen Aminosäuren, die bevorzugt posttranslational modifiziert werden. Mono-, di- und trimethylierte Lysine gehören

zu den selten vorkommenden, natürlichen Aminosäuren, die in Myosin, Skleroproteinen (z.B. Flagellin) und Chromatin präsent sind. Mit steigendem Methylierungsgrad können einige strukturgebende Eigenschaften wie Basizität, Hydrophobie sowie Affinität des derivatisierten Peptids gegenüber anionischen Molekülen maßgeblich beeinflusst werden. Diese Effekte lassen sich am besten anhand einer Interaktion zwischen kationischen Histonen und der anionischen hochmolekularen DNA veranschaulichen. Durch Methylierung bestimmter Aminosäuren in Histonen sorgt die erhöhte Hydrophobie für eine optimale Packungsdichte der DNA-Proteinkomplexe, was der Transkriptionsmaschinerie den Zugang zu den DNA-Abschnitten erschwert und damit zur Genregulation beiträgt. Im Gegenzug kann durch die Verringerung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem substituierten Lysin und den negativen Ladungen an der DNA die Öffnung der Chromatin-Struktur veranlasst und Transkription begünstigt werden. So wie eine Methylierung den Transkriptionsvorgang blockieren kann, ist durch Demethylierung ein Mechanismus geschaffen worden, die Transkription in den Zellen zu aktivieren. Der Methylierungsstatus von Histonproteinen stellt also eine regulatorische Funktion dar und veränderte Methylierungsmuster spielen bei der Entstehung von karzinogener Erkrankungen eine wichtige Rolle.^[51]

Die zweite Generation synthetischer PrP-Peptide basiert schwerpunktmäßig auf einer Variation des Methylierungsgrades des *N*-terminal gelegenen, für die Erkennung durch nAbs-PrP essentiellen Lysins (K₁₀₆). Es ist denkbar, dass die Methylierung *N*-terminaler Lysin-Seitenketten durch die Veränderung des Ladungsmusters und Unterbinden zuvor vorhandenen Wasserstoffbrückenbindung eine Konformationsänderung auslösen kann. Durch NMR-spektroskopische Untersuchung dimerer Sequenzen der zweiten Generation NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈(*K₁₀₆) soll festgestellt werden, ob und inwieweit die Methylierung strukturelle Veränderungen hervorruft. Des Weiteren soll die Bindungsaffinität zu nAbs-PrP in Abhängigkeit vom Methylierungsgrad untersucht werden.

Um den übermäßigen Verbrauch an synthetisch wertvollen Lysin-Derivaten einzuschränken, wurden die dimeren PrP-Peptide nicht in voller Länge am Peptidsynthesizer hergestellt. Die automatisierte SPPS erfolgte analog zur PrP-Synthese der ersten Generation und endete mit dem *N*-terminal gelegenen Threonin (T₁₀₇). Im Anschluss daran folgte die manuelle Kupplung funktionalisierter Lysin-Bausteine mit unterschiedlichem Methylierungsgrad. Die verwendeten Reaktionsbedingungen sind dem experimentellen Teil dieser Arbeit zu entnehmen. Schema 3 zeigt das Synthese-Schema für alle Lysin-modifizierten PrP-Dimere der zweiten Generation.

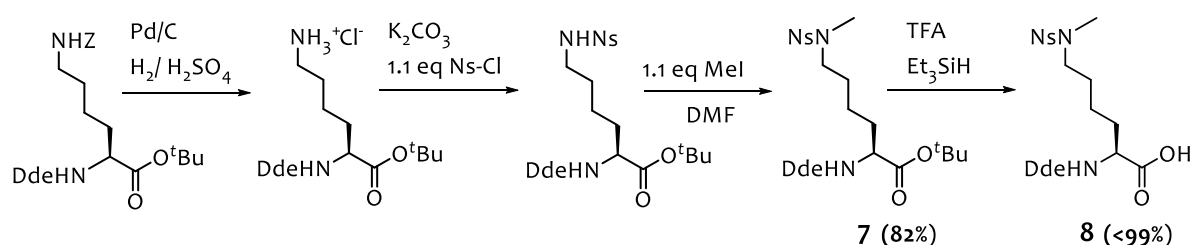
Polyamin-basierte Modifikationen der Prionpeptide
Ergebnisse und Diskussion



Schema 3: Allgemeines SPPS-Syntheschema für Prionensequenzen der zweiten Generation.

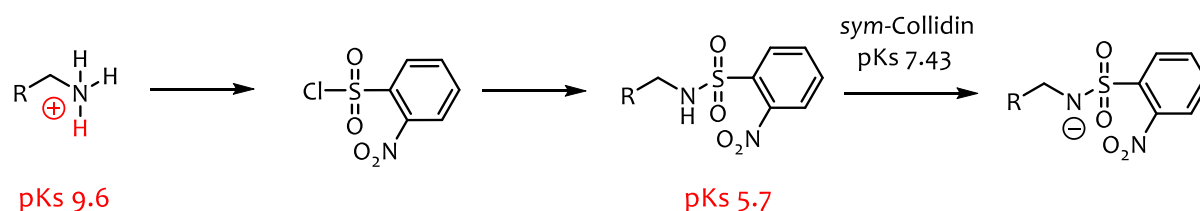
Die Synthese von di- und trimethylierten Lysin-Bausteinen wird in Kapitel 2.10.5 ausführlich diskutiert. An dieser Stelle soll lediglich die Synthesestrategie zur Herstellung des monomethylierten Lysin-Derivats geschildert werden. Eine der größten Schwierigkeiten bei der gezielten Alkylierung von Aminen ist eine charakteristische Überalkylierung, die abhängig von dem verwendeten Reagenz zu Gemischen aus unterschiedlich substituierten Aminen sowie quartären Ammoniumverbindungen führen kann. Zur gezielten Alkylierung bedient man sich des Schutzgruppen-Prinzips. Allerdings lässt sich das Prinzip in Bezug auf die Aminosäuren mit mehreren Funktionalitäten wie Lysin nicht immer einfach anwenden. Die ausgesuchte Schutzgruppenstrategie soll zum einen die Voraussetzungen für die selektive Alkylierung erfüllen und zum anderen mit dem Orthogonalitätsprinzip linearer SPPS kompatibel sein. Daher stellt die Herstellung eines monosubstituierten, für die Festphasensynthese, gemäß der Fmoc-Strategie, geeigneten Lysin-Bausteines eine synthetische Herausforderung dar. In der Literatur wird das Überalkylierungsproblem am Lysin entweder durch eine mehrstufige Synthese unter Anwendung einiger, seltener, nicht effizient abspaltbarer Schutzgruppen,^[68] oder über eine Zyklisierung zum Lactam mit anschließender reduktiven Aminierung gelöst.^[69] Da die Öffnung des hier beschriebenen N-

methylierten Lactams nicht stereoselektiv abläuft, bietet die zweite Strategie keine gute synthetische Alternative zu der mehrstufigen Synthese mit unzähligen Umschüttungsschritten. Daher war die Entwicklung einer effizienten Synthese für die Herstellung eines für SPPS geeigneten, monomethylierten Lysin-Bausteines mehr als erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue vierstufige Synthese von Dde-L-Lys(Me)-OH entwickelt, ausgehend von dem dreifachgeschützten Lysin-Derivat, das als Ausgangsverbindung für die Herstellung anderer, vielfältig derivatisierter Lysin-Bausteine eingesetzt wurde. Darüber hinaus wurde das Monomethyllysin erfolgreich zum Aufbau von modifizierten PrP-Peptiden verwendet. Der Syntheseweg basiert auf relativ wenigen zusätzlichen Umschüttungsschritten, die sich aufgrund der Funktionalität des Lysins nicht vermeiden lässt. In Schema 4 sind die einzelnen Schritte der Synthese zusammengefasst.



Schema 4: Syntheseschema zum Aufbau des monomethylierten Lysins Dde-L-Lys(Me)-OH.

Besonders an dieser Strategie ist die Verwendung einer Schutzgruppe, die gleichzeitig einen aktivierenden Effekt auf die ϵ -Aminofunktion der Lysin-Seitenkette ausübt und damit für die erhöhte Reaktivität sorgt (s. Schema 5). Sekundäre Sulfonsäureamide, die bei einer Umsetzung zwischen primären Aminen und entsprechenden Sulfonsäurechloriden entstehen, lassen sich auch mithilfe schwacher Basen deprotonieren. Die deprotonierten Ns-Sulfonamide reagieren aufgrund der geringen Basizität und gesteigerten Nukleophilie sogar mit wenig reaktiven Elektrophilen und eignen sich speziell für die Monoalkylierung von primären Aminen besonders gut.^[67]



Schema 5: Umsetzung eines primären Amins mit 2-Nitrophenylsulfonylchlorid unter Ausbildung eines im Vergleich zum Ammonium-Salz bzw. Carbonsäureamid-aciden 2-Nitrosulfonsäurebenzamids, das mit einer schwachen Base deprotoniert werden kann. Zum Vergleich liegt der pKs-Wert eines Carbonsäureamids bei etwa 26 (in Schema nicht gezeigt).

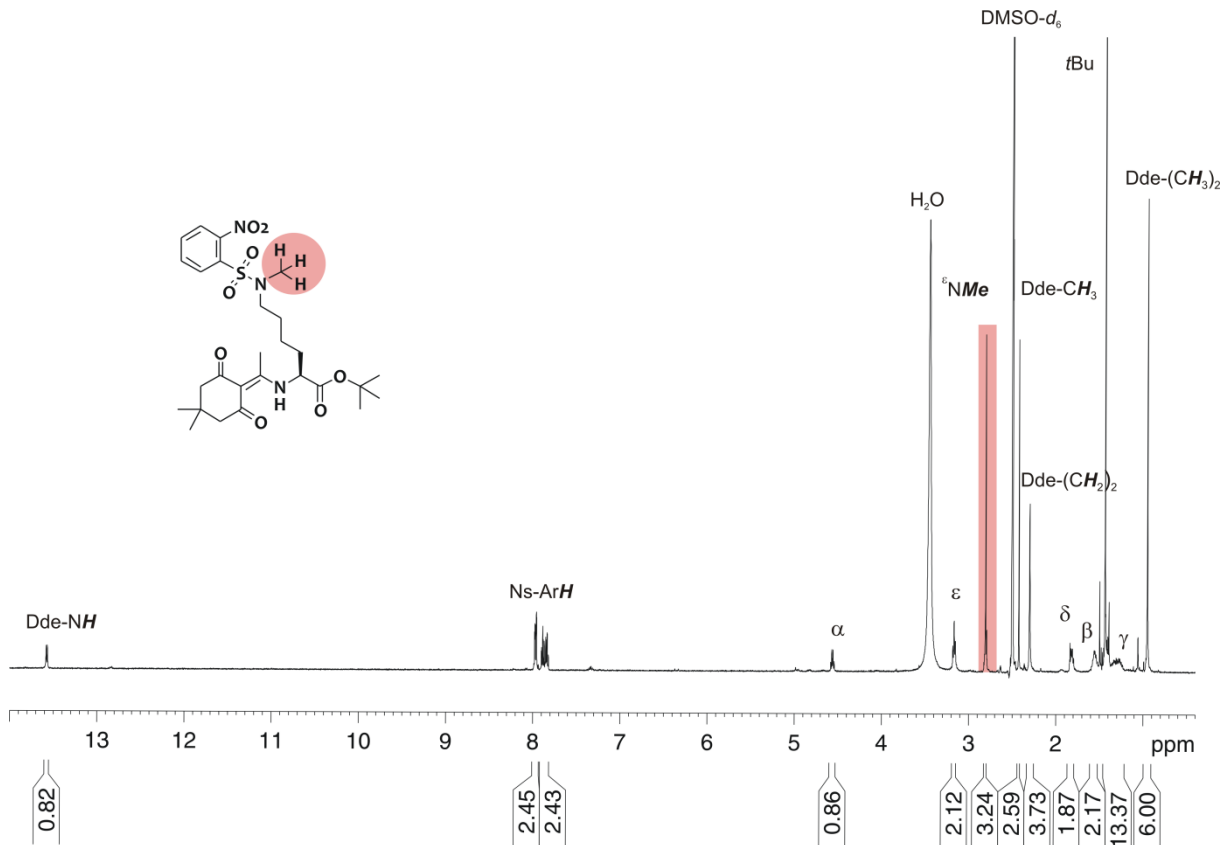


Abbildung 17: ¹H-NMR-Spektrum des geschützten monomethylierten Lysins Dde-L-Lys(Me)-O^tBu (gemessen bei 500 MHz, 300 K in DMSO-*d*₆). Charakteristisch für diese Verbindung ist das Auftauchen eines spezifischen Signals bei 2.8 ppm (rot unterlegt), das eindeutig der Monomethylierung der ε-Aminofunktion zugeordnet werden kann.

Die selektive Entschützung des α-Carboxyterminus gelang durch die Behandlung von **7** mit TFA und Triethylsilan und lieferte quantitativ die freie Säure **8**. Durch den Zusatz von Triethylsilan als *scavenger* konnte die Entschützung bei geringeren TFA-Konzentrationen durchgeführt werden, was die Selektivität deutlich erhöhte. Die so entschützte Säure **8** wurde nach Trocknung sofort für die Derivatisierung der PrP-Peptide der zweiten Generation verwendet werden. Um den Verlust der Dde-Gruppe durch Hydrolyse zu vermeiden, musste der *tert*-Butylester immer kurz vor der Peptidkupplung entfernt und das Produkt sofort umgesetzt werden.

Die Charakterisierung der Lysin-modifizierten Prion-Sequenzen erfolgte analog zur denen der ersten Generation durch ein- und zweidimensionale NMR-spektroskopische Methoden bei 600 MHz, die genauen Bedingungen der durchgeführten Messungen sind in Kapitel 5 aufgeführt. Die Zuordnung der Protonenspinsysteme der einzelnen Aminosäuren erfolgte auch hier mittels TOCSY-Experimenten. Die sequentiellen Informationen konnten teilweise aus den NOESY- bzw. ROESY-Spektren gewonnen werden. Bei der Zuordnung der chemischen Verschiebungen des Proteinerückgrats (inbegriffen die Bestimmung der Integrale und Multiplizitäten) wurden sowohl die ¹H-NMR-Spektren als auch die der heteronuklearen

2D-Verfahren wie HSQC herangezogen. Dies ermöglicht einen Vergleich zwischen den homodimeren, Lysin-modifizierten Prion-Peptiden der zweiten Generation.

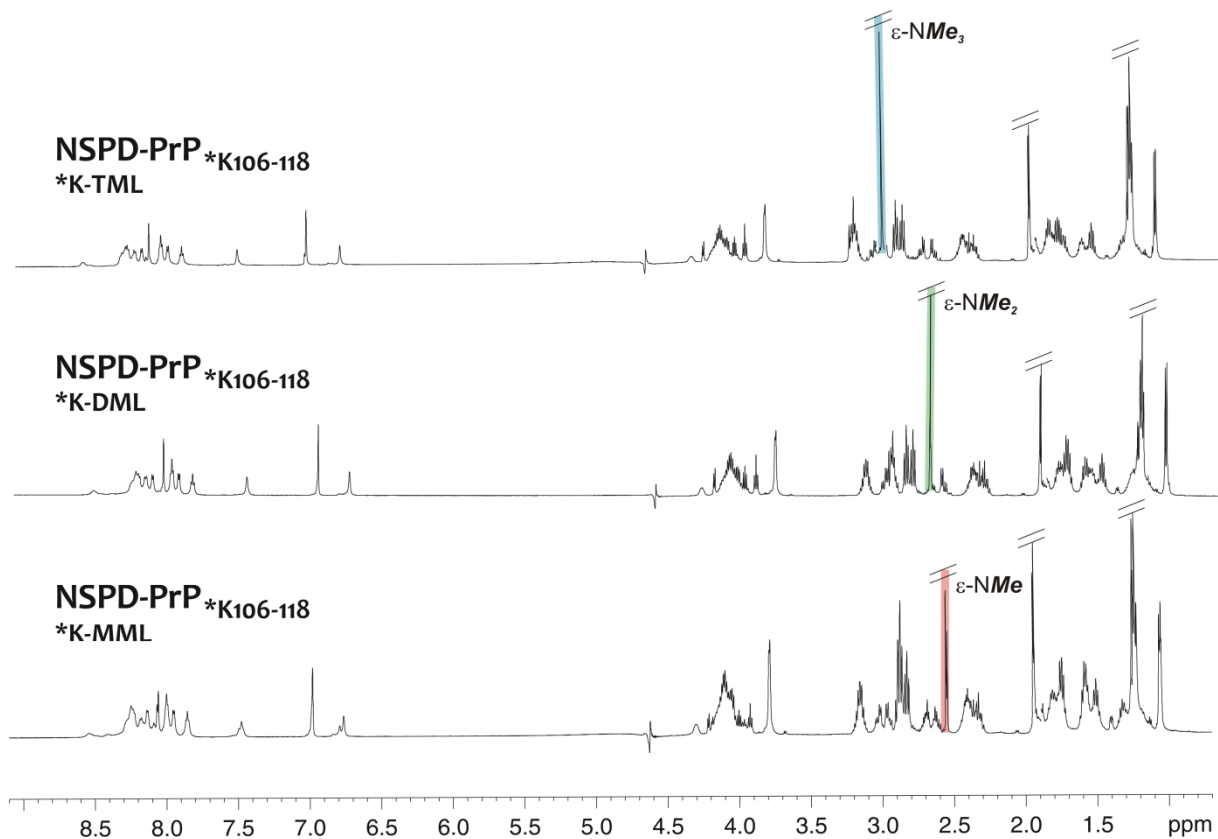


Abbildung 18: ^1H -NMR-Spektren von den homodimeren, Lysin-modifizierten Prion-Peptiden der zweiten Generation (gemessen bei 600 MHz, 300 K, 50 mM KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1, pH 6). Auffallend sind dabei vor allem die voneinander abweichenden chemischen Verschiebungen unterschiedlich methylierter Lysin-Bausteine.

Während die meisten NMR-Signale in allen drei Sequenzen nahezu deckungsgleich sind, lässt sich dennoch eine deutliche Tendenz in der Tieffeld-orientierten Wanderung einiger Resonanzsignale gut erkennen. Insbesondere fallen hierbei im Vergleich zum homodimeren Prion-Peptid der ersten Generation, NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈, die neu entstandenen Signale auf (s. Abbildung 18 und zum Vergleich Abbildung 13). Das Erscheinen dieser Resonanzsignale mit den charakteristischen chemischen Verschiebungen ist auf die unterschiedlichen ϵ -Methylierungsmuster der modifizierten Lysin-Seitenkette zurückzuführen. Nahezu alle Signale des *N*-terminalen Lysins (K_{106}) unterliegen einer erkennbaren Änderung, wobei der Unterschied mit steigendem Abstand zur ϵ -Aminogruppe kleiner wird (s. Abbildung 19). Diese Beobachtung bestätigt lediglich den gewünschten Einbau der hergestellten Lysin-Bausteine und somit eine erfolgreiche Derivatisierung der Prion-Peptide der zweiten Generation. Abgesehen von einer geringfügigen, pH-bedingten Änderung der chemischen Verschiebung des $\epsilon^1\text{-H}_{111}$ -Signals des NSPD-PrP*_{TML106-118}-Peptids konnten keine signifikanten Unterschiede bei den restlichen Resonanzsignalen festgestellt werden.

Polyamin-basierte Modifikationen der Prionpeptide
Ergebnisse und Diskussion

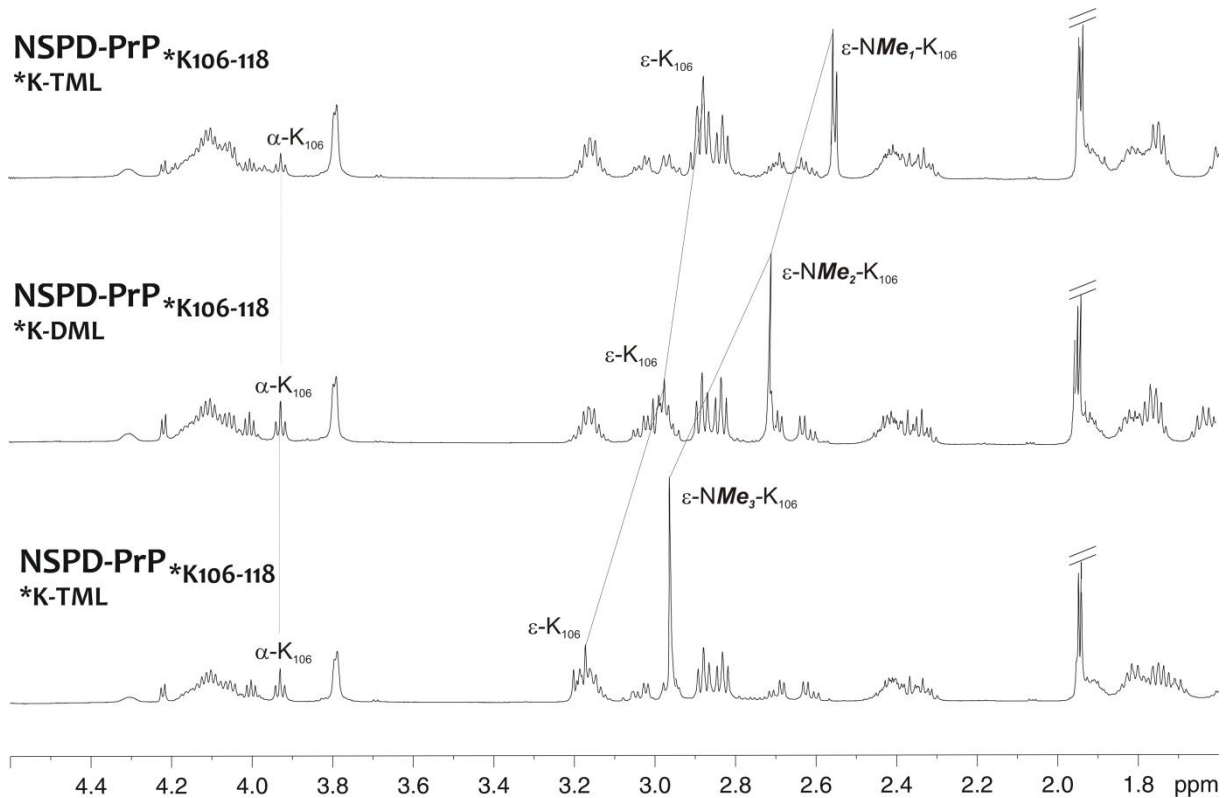


Abbildung 19: Ausschnitt aus den ^1H -NMR-Spektren der Prion-Peptide der zweiten Generation (gemessen bei 600 MHz, 300 K, in 50 mM KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1). Zu sehen ist die starke Änderung der chemischen Verschiebung der ϵ - Lys_{106} -Gruppe sowie die Lage der Methylgruppen-Signale modifizierter Lysine. Die vollständig ausgewerteten Spektren befinden sich im Anhang.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass weder der Methylierungsgrad noch die Modifizierung der Sequenz durch Polyamine einen signifikanten Einfluss auf die bestehende Konformation der Peptide haben. Die Unterscheidung zwischen den identischen Aminosäuren (z.B.: $\text{M}_{109/112}$, $\text{A}_{113/115}$) innerhalb eines Peptides gelang mittels Zuordnung der strukturelevanten Kreuzsignale in den NOESY und ROESY-Spektren. Es handelt sich hierbei immer um $i, i+1$ -Kontakte, sodass auch hier das Vorliegen einer bevorzugten Konformation ausgeschlossen werden kann. Die Auswertung aller aufgenommenen NOESY/ROESY-Spektren der synthetischen Prion-Peptide deutet auf ihre strukturelle Flexibilität hin. Um diese Beobachtung zu bestätigen bzw. zu widerlegen, wurden zusätzlich Temperaturabhängigkeiten der NH-Signale untersucht. Für die synthetisierten Prion-Sequenzen wurden Temperaturreihen im Bereich von 280-300 K in KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O gemessen. Auch für diese spektroskopischen Konformationsuntersuchungen wird einem wasserhaltigen Lösungsmittel der Vorzug gewährt. Aufgrund seiner Polarität eignet sich dieses protische Lösungsmittel besonders gut zum Lösen polarer, ungeschützter Verbindungen. Naturgemäß zeigt Wasser auch in seiner deuterierten Form hervorragende Wasserstoffbrückenakzeptor- und -donoreigenschaften, sodass die mögliche Ausbildung einer durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Sekundärstruktur erkannt werden kann. Aus

Temperaturmessreihen lassen sich die Temperaturkoeffizienten der Amidprotonen bestimmen. Diese ermöglichen wiederum Aussagen über die Solvenzzugänglichkeit der jeweiligen Amidprotonen. Diese Aussagen sind deshalb möglich, weil die schwachen, zum Lösungsmittel gerichteten Wasserstoffbrückenbindungen bei einer Erhöhung der Temperatur aus entropischen Gründen leichter gebrochen werden können als intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen. Die Schwächung einer Wasserstoffbrückenbindung erkennt man an einer Hochfeldverschiebung des entsprechenden Signals. Daher sollten Amidprotonen, die zur Stabilisierung der Sekundärstruktur hauptsächlich intramolekulare H-Brückenbindungen ausbilden, einen sehr kleinen Temperaturgradienten (< 3 ppb/K) zeigen. Abbildung 20 zeigt exemplarisch die Auswertung der Temperaturreihen für das homodimere Peptid NSPD-PrP*_{DML106-118}.

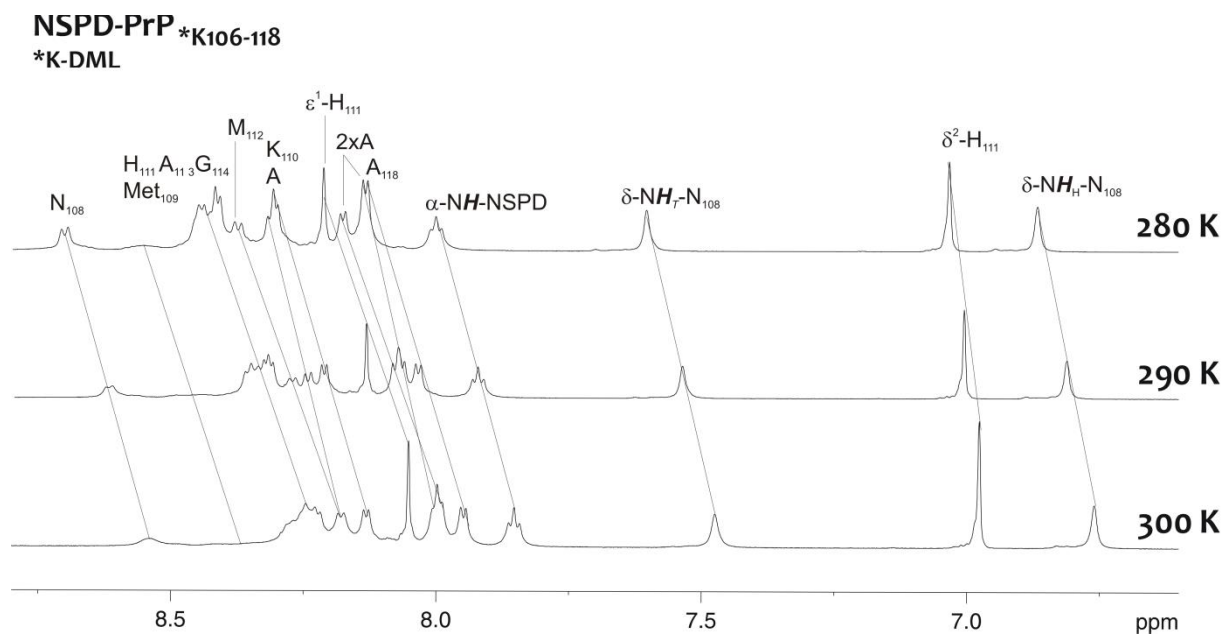


Abbildung 20: Temperaturreihe von NSPD-PrP*_{DML106-118} bei 280, 290 und 300 K (600 MHz, 50 mM KH₂PO₄-Puffer/D₂O 9:1, pH 6.09). Dargestellt ist der zur Bestimmung von Temperaturkoeffizienten relevante amidische Bereich.

Aufgrund von Überlagerungen konnten nicht alle Signale eindeutig zugeordnet werden. Die so ermittelten Temperaturgradienten wurden verglichen und in Tabelle 2 zusammengefasst. Dabei fällt auf, dass die Beträge fast aller ermittelten Werte vergleichsweise hoch sind, was die Vermutung nahelegt, dass es bei den Sequenzen nicht zu Ausbildung einer bevorzugten Konformation kommt (*random coil*). Lediglich das Signal von δ^2 -H₁₁₁ liegt bei ca. - 2.5 ppb/K. Diese Beobachtung kann mit sterischen Einflüssen der breiten aromatischen Seitenkette, die in der Lage ist, die Amidprotonen vom Lösungsmittel räumlich abzuschirmen, erklärt werden. Bei Temperaturkoeffizienten oberhalb von -3 ppb/K kann man von starken Wasserstoffbrückenbindungen ausgehen. Sowohl bei den monomeren als auch bei den verzweigten dimeren Prion-Peptiden sind die gemessenen

Polyamin-basierte Modifikationen der Prionpeptide
Ergebnisse und Diskussion

Temperaturkoeffizienten von diesem Wert weit entfernt (s. Tabelle 2). Auch wenn mittels Temperaturgradienten nur ein bedingter Nachweis der Beteiligung eines Protons an einer Wasserstoffbrücke erbracht werden kann, stehen dennoch diese Erkenntnisse im Einklang mit den ausgewerteten Daten aus den NOESY/ROESY-Spektren der entsprechenden Verbindungen, wobei lediglich *i*, *i*+1-Kontakte festgestellt werden konnten. Demnach ist das Vorliegen einer durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Sekundärstruktur bei keinem der synthetischen Prion-Peptide wahrscheinlich.

Tabelle 2: Temperaturkoeffizienten der Amidprotonen untersuchter Prion-Sequenzen. Die mit x markierten Aminosäuren konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Aufgrund der Überlagerung bei 300 K konnten ebenfalls die Signalsätze von Lys₁₁₀ und Met₁₁₂ nicht unterschieden werden.

Aminosäure	Temperaturgradient [- ppb/K]				
	PrP ₁₀₆₋₁₁₈	PDA-PrP ₁₀₆₋₁₁₈	NSPD-PrP* _{K106-118} *K-MML	NSPD-PrP* _{K106-118} *K-DML	NSPD-PrP* _{K106-118} *K-TML
Asn ₁₀₈	8.0±0.20	8.0±0.14	8.0±0.05	8.0±0.11	8.0±0.02
δNH _H -Asn ₁₀₈	5.0±0.13	5.0±0.08	5.0±0.13	5.5±0.23	5.0±0.14
δNH _T -Asn ₁₀₈	6.5±0.08	6.5±0.12	6.5±0.08	6.5±0.05	6.5±0.08
Met ₁₀₉	10.0±0.02	9.5±0.02	9.5±0.27	9.0±0.09	9.5±0.12
Lys ¹¹⁰ /Met ₁₁₂	7.0±0.04	7.0±0.04	6.5±0.10	7.0±0.03	7.0±0.02
His ₁₁₁	9.0±0.03	9.0±0.21	9.0±0.18	9.0±0.04	9.0±0.08
δ ² -His ₁₁₁	2.0±0.02	2.5±0.03	3.0±0.10	3.0±0.11	2.5±0.09
ε ¹ -His ₁₁₁	7.5±0.18	7.5±0.04	8.0±0.12	8.0±0.08	7.5±0.11
Met ¹¹² /Lys ¹¹⁰	10.0±0.21	10.0±0.33	10.0±0.18	10.0±0.22	10.0±0.11
Ala ₁₁₃	9.0±0.28	9.0±0.05	9.0±0.03	9.0±0.02	9.0±0.04
Gly ₁₁₄	8.5±0.02	9.0±0.03	8.5±0.10	9.0±0.05	8.5±0.02
Ala ₁₁₅	6.0±0.15	7.0±0.12	6.5±0.04	6.5±0.02	6.5±0.04
Ala _x	9.0±0.18	8.0±0.03	8.5±0.02	8.5±0.10	8.5±0.02
Ala _x	9.5±0.04	8.5±0.12	9.0±0.04	9.0±0.03	8.5±0.02
Ala ₁₁₈	8.5±0.02	9.0±0.18	9.5±0.21	9.5±0.04	9.5±0.14
PDA/NSPD	-	7.5±0.11	7.5±0.08	7.5±0.12	7.5±0.22

Die vergleichsweise hohen Temperaturkoeffizienten der Amid-Protonen-Signale sprechen für eine flexible, ungefaltete *random coil*-Struktur. Auch die NMR-spektroskopische Konformationsanalyse bestätigte die Annahme, dass weder eine Dimerisierung mit Norspermidin als Linker noch eine systematische Methylierung der Lysin-Seitenkette einen Einfluss auf die Faltung der Prion-Peptide ausüben. Nicht zuletzt aus diesem Grund soll eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung der Prion-Peptidstruktur in Betracht gezogen werden.

Als realisierbare Strategie steht hier beispielsweise die Einführung cyclischer Aminosäurederivate oder rigidisierter Analoga zur Verfügung. Diese können idealerweise zur Ausbildung einer Sekundärstruktur oder aber zur Stabilisierung einer bereits vorliegenden, biologisch aktiven Konformation führen. Die Ausbildung von β -Schleifen kann durch einen, aus synthetischer Sicht, einfachen Austausch einer (-L-) gegen (-D-) Aminosäure innerhalb der Peptidsequenzen induziert werden. Ausbildung einer Schleifenstruktur soll anhand der Prion-Sequenzen genauer untersucht werden. Demnach sollte die Mutation LH₁₁₁DH in dem homomeren Dimer NSPD₁₀₆₋₁₁₈ zu einem Abknicken der Peptidketten an dieser Position führen.

Die Erforschung der Wirkung von D-Aminosäuren ist eine vergleichsweise junge Disziplin mit vielen noch offenen Fragestellungen. Mit dem Nachweis einiger endogener D-Aminosäuren im Gehirn von Säugern entflammte erneut eine umfassende Untersuchung der Funktionen dieser außergewöhnlichen Aminosäuren in physiologischer und pharmakologischer Hinsicht. Es hat sich herausgestellt, dass D-Aminosäurehaltige Peptide aufgrund einer oft fixierten biologisch aktiven Konformation und erhöhter metabolischen Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau die grundlegenden Anforderungen an ein Peptidomimetikum erfüllen. Ein kleiner Exkurs über die Thematik soll einen Überblick über die Hintergründe des natürlichen enantiomeren Ungleichgewichtes verschaffen und die Zusammenhänge zwischen dem unnatürlichen Stereoisomer und seinen Funktionen verdeutlichen.

Es gibt eine Vielzahl von Verbindungen mikrobiellen Ursprungs, die aus D-Aminosäuren aufgebaut sind. Diese pharmakologisch wichtigen Naturstoffe werden in der Regel von Prokaryoten *per* nichtribosomaler Peptidsynthese hergestellt. Zur einer der größten Quellen von D-Aminosäuren zählen natürliche bakterielle Peptidantibiotika wie Penicillin G, Vancomycin, Mycobacillin, Gramicidin, Seromycin und viele andere. Nicht zuletzt auch deshalb sind die Wirkmechanismen in prokaryotischen Zellen unter Beteiligung einiger D-Aminosäuren am meisten untersucht. Am detailliertesten ist die Mitwirkung einiger D-Aminosäuren an dem Aufbau der bakteriellen Zellwand erforscht worden (VAN HEIJENOORT 2001). Der Einbau von D-Aminosäuren in die Querverbindungen führt nicht nur zu einer erhöhten Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau, sondern verleiht ebenso eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegenüber den antibakteriellen Glykopeptiden (REYNOLDS *et. al* 1998; ARIAS *et al.* 1999). Aber das Vorkommen von D-Aminosäuren ist nicht nur auf Bakterien beschränkt. Auch in Pilzen, Algen, höheren Pflanzen, Amphibien und Säugern konnten D-Aminosäuren nachgewiesen werden, wobei deren Bedeutung und Funktion noch

nicht komplett verstanden sind (BRÜCKNER *et al.* 2007; ROBINSON *et al.* 1976; KREIL *et al.* 1994; HASHIMOTO *et al.* 1992). Gleichzeitig verdichten sich Hinweise, dass D-Aminosäuren sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten bei den zahlreichen physiologischen Vorgängen oft eine bedeutende Rolle spielen (FRIEDMAN 2010; MARTINEZ-RODRIGUEZ *et al.* 2010).

Die *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass D-Aminosäuren durch eine thermodynamisch bevorzugte Racemisierung aus L-Aminosäuren gebildet werden. Die Halbwertszeit der Racemisierung wird von einer Reihe bestimmter Parameter beeinflusst. Hierbei spielen neben der Aminosäureart und Temperatur, der pH-Wert sowie die Anwesenheit eines Lösungsmittels oder Katalysators eine entscheidende Rolle. Unter konstanten Bedingungen lässt sich die Racemisierung gut vorausberechnen, beziehungsweise kann umgekehrt aus dem Grad der Racemisierung auf das Alter der untersuchten Probe geschlossen werden. Ein darauf basierendes, unter dem Namen Aminosäuredatierung bekanntes Verfahren, wird in der forensischen Analytik angewandt. Bei der Zubereitung von Lebensmitteln, die den extremen Temperaturen oder pH-Werten ausgesetzt werden, ist der Racemisierungsprozess oft zu beobachten. Aber auch zum lebenden Organismus als Folge der metabolischen Aktivität gehört dieser Prozess dazu. In einigen Geweben mit äußerst geringem Proteinstoffwechsel beginnt dieser Vorgang direkt nach Abschluss des Gewebeaufbaus. Ein Beispiel hierfür ist das Kollagen im Zahn-Dentin oder Kristallin der Augenlinsen.^[51] Nach heutigem Wissenstand ist die vermehrte *in-vivo*-Racemisierung von Proteinen ein autonom ablaufender Prozess, der oft mit dem Altern, oxidativen Stress^[70a] oder einem langsamen Proteinstoffwechsel in Zusammenhang gebracht wird.^[70b] Die neueren Untersuchungen zeigen außerdem, dass einige D-Aminosäuren, insbesondere D-Serin, nicht nur in relativ großen Mengen in bestimmten Geweben vorkommen, sondern auch wichtige physiologische Zellprozesse mitgestalten. Die größte folgenreiche Entdeckung auf diesem Gebiet gelang ATSUSHI HASHIMOTO und Kollegen durch den Nachweis von freiem D-Serin im Gehirn von Ratten (A. HASHIMOTO *et al.* 1992). Eine durch körpereigene Serinracemase katalysierte stereoselektive posttranslationale Modifikation ist für die vergleichsweise hohen Konzentrationen an freiem D-Serin in eukaryotischen Hirnzellen verantwortlich.^[70c] Heute ist bekannt, dass D-Serin eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung in den Neuronen spielt (COIL und MILLER 2004; WOLOSKER *et al.* 2008). Als Coaktivator der NMDA-Rezeptoren, ist D-Serin an zahlreichen Prozessen des Zentralnervensystems wie Lern- und Gedächtnisvorgängen, aber auch bei der Regulation von Wachstumsprozessen der Neuronen und auch bei Neuropathien und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt (MOTHET *et*

al. 2000; RYU *et al.* 2010). Von der Racemisierung betroffene Peptide führen in vielen Fällen zu pathologischen Veränderungen. Bedingt durch einen Funktionsverlust oder Ansammlung des Proteins in unterschiedlichen Geweben aufgrund der ausgeprägten Stabilität gegenüber dem enzymatischen Abbau, wird Racemisierung mit zahlreichen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht.^[70d]

Neben einem homomeren Prion-Dimer mit einer D-Histidin-Mutation soll ein weiteres Dimer hergestellt werden, das im Hinblick auf die Dot Blot-Untersuchungen als Negativkontrolle verwendet werden soll. Eine generelle Forderung zum Einsatz von Positiv- oder Negativkontrollen bei einer Untersuchung von Antigen-Antikörper-Interaktionen mittels Dot Blot gibt es nicht, dennoch können diese Kontrollen sowohl beim Reproduzieren von Assays als auch beim Interpretieren der Ergebnisse hilfreich sein. So dürfen die PrP-Dimere der dritten Generation aufgrund der fehlenden oder unzureichenden Fähigkeit zur Ausbildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes zu keiner oder nur einer schwach ausgeprägten Antwort in einem immunologischen Verfahren führen. Abbildung 21 zeigt die synthetischen Prion-Peptide der dritten Generation. Das Vorliegen einer großen Zahl ähnlicher bzw. gleicher Aminosäuren innerhalb der verkürzten PrP₁₁₁₋₁₁₈-Sequenz spiegelt sich in einigen wenigen Resonanz-Signalen des ¹H-NMR-Spektrums wider. Die relativ geringe Dispersion der Signale sowohl im aliphatischen als auch im amidischen Bereich deutet auf eine flexible, unstrukturierte Konformation dieses Peptides hin. Gut zu erkennen sind auch hier die Signale des Norspermidin-Linkers, die in Kombination mit Integralverhältnissen dessen dimere Struktur verdeutlichen.

Eine weitere Strategie zur Erzeugung einer stabilen Konformation der dimeren PrP-Peptide war das Herbeiführen einer Mutation. Da angenommen wird, dass D-Aminosäuren in der Lage sind, Schleifenstrukturen auszubilden, erhofft man sich durch den Stereoisomeraustausch eine Fixierung der vorliegenden Konformation. Den Erwartungen entsprechend soll das Herbeiführen einer Mutation LHis₁₁₁DHis relevante strukturelle Veränderungen zur Folge haben. Die konstanten Bedingungen der NMR-spektroskopischen Messung (pH-Wert, Temperatur, Lösungsmittelverhältnis) ermöglichen einen direkten Vergleich. Wie aus dem ¹H-NMR-Spektrum ersichtlich wird, zeichnet sich das mutierte PrP₁₀₆₋₁₁₈(*H₁₁₁) durch einen unauffälligen, mit anderen PrP-Dimeren, vergleichbaren amidischen Bereich aus (s. Abbildung 21). Deutlich ausgeprägt erscheint hier dagegen die Dispersion der Resonanzsignale im aliphatischen Bereich, die auf eine detektierbare Strukturveränderung hindeutet. Der genaue Vergleich der ¹H-NMR-Spektren zwischen dem mutierten PrP₁₀₆₋₁₁₈(*H₁₁₁) und seinem unveränderten Analogon PrP₁₀₆₋₁₁₈ zeigt jedoch, dass diese Unterschiede

Polyamin-basierte Modifikationen der Prionpeptide

Ergebnisse und Diskussion

allein auf die durch Mutation ausgelöste geänderte chemische Umgebung und nicht auf die Ausbildung der bevorzugten Konformation zurückzuführen sind (Abbildung 22).

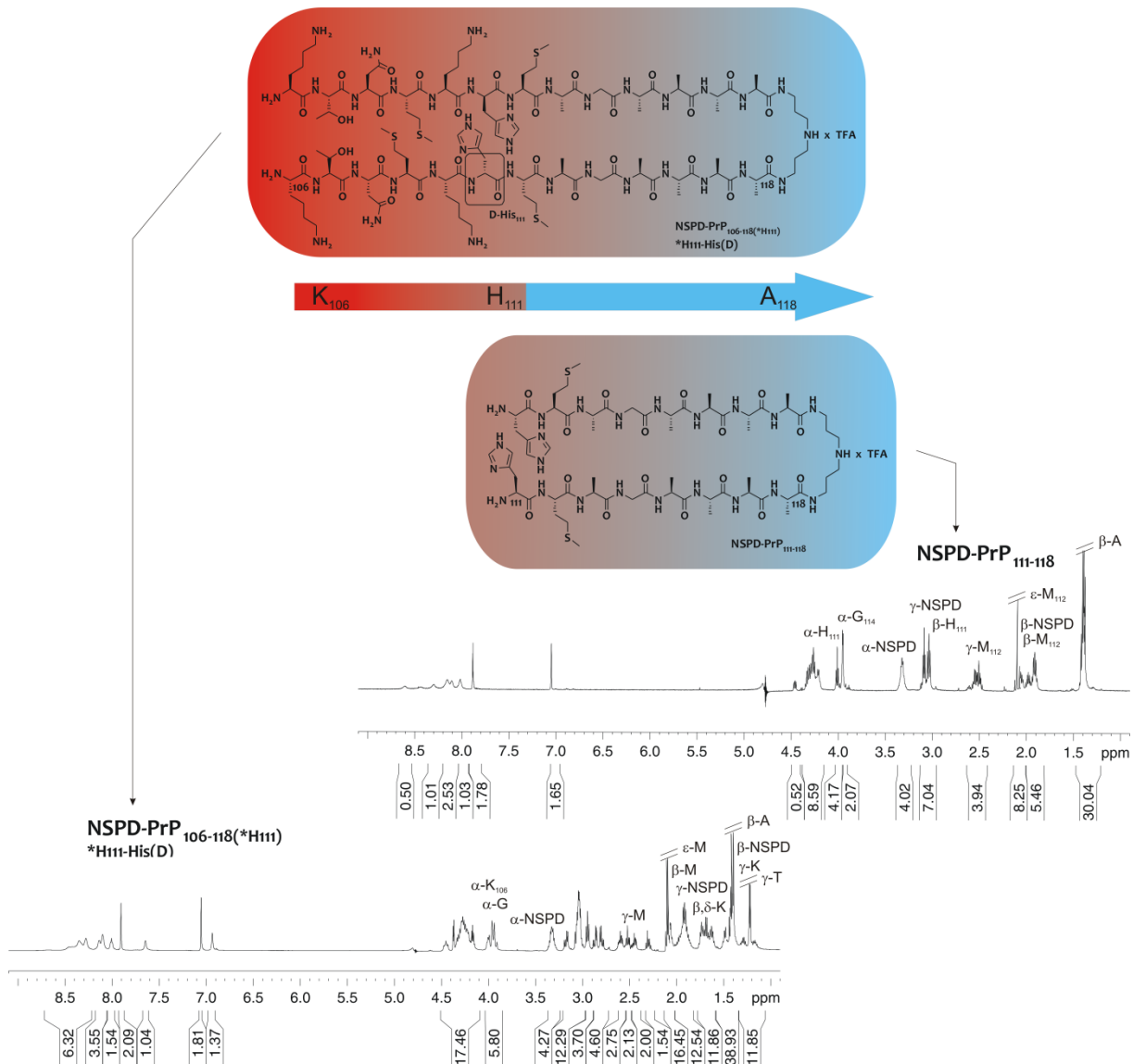


Abbildung 21: Strukturen der homomeren Prion-Dimere der dritten Generation mit entsprechenden ^1H -NMR-Spektren beider Verbindungen (gemessen bei 600 MHz, in 50 mM KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1, pH 6). Bei den Prion-Dimeren der dritten Generation wurden zwei Veränderungen durchgeführt: eines der synthetischen über Norspermedin-Linker verknüpfte Dimer erhielt eine His(L) zu His(D) Mutation an Position 111, das zweite Dimer dagegen wurde um eine für N-terminale, für Erkennung von nAbs-PrP erforderliche Sequenz $\text{PrP}_{106-110}$ verkürzt.

Während die meisten NMR-Signale in den zu vergleichenden Spektren nahezu deckungsgleich sind, fiel unter anderem auf, dass die Signale der in unmittelbarer Nähe zur Mutation liegenden Aminosäuren einer stärkeren Dispersion unterliegen (s. Abbildung 22). Diese lässt sich gut erkennen vor allem an Resonanzsignalen der Seitenketten von K_{110} und M_{112} , wobei diese Tendenz mit steigendem Abstand zur α -Aminogruppe kleiner wird. Die Seitenketten von Lysin bzw. Methionin beinhalten diastereotop Protonen. Da sie nicht chemisch äquivalent sind, weisen sie in der Regel unterschiedliche chemische

Verschiebungen auf, wobei diese Differenzen umso kleiner werden, je größer der Abstand zu dem nahe liegenden Stereozentrum ist. Das Herbeiführen eines Knicks in der dimeren PrP-Sequenz scheint hier diesen Effekt signifikant zu verstärken. Alle NOESY bzw. ROESY-Spektren des untersuchten synthetischen NSPDP₁₀₆₋₁₁₈(*H₁₁₁)-Dimers weisen jedoch, ähnlich den Untersuchungen monomerer und dimerer PrP-Peptide der ersten und zweiten Generation ausschließlich *i*, *i*+1-Kontakte auf, sodass hier von einer konformativen Flexibilität des Moleküls auszugehen ist. Die beobachtete verhältnismäßig hohe Dispersion lässt sich demzufolge auf die relative Konformationsstabilität schließen, die sich offensichtlich allein durch Mutation LHis₁₁₁DHis verursachtes Abknicken einstellt.

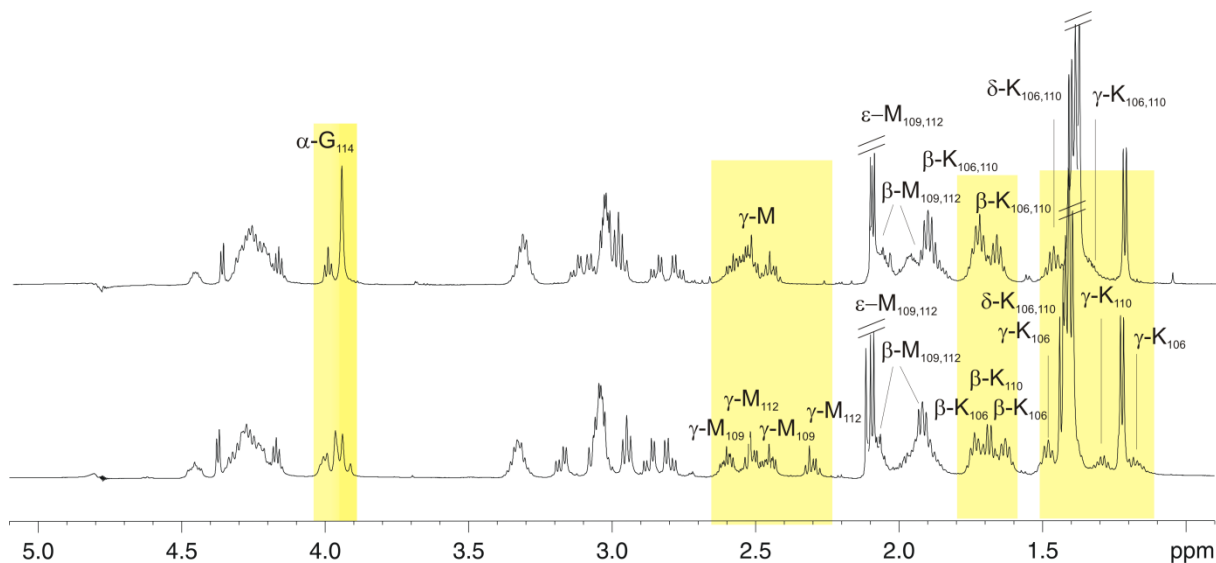


Abbildung 22: ¹H-NMR-Spektrenvergleich der über Norspermidin verbrückten PrP-Dimere (gemessen bei 600 MHz, in 50 mM KH₂PO₄-Puffer/D₂O 9:1, pH 6). In Abbildung unten ist der aliphatische Ausschnitt des an Position 111 mutierten Dimers zu sehen, oben dagegen sein unverändertes Analogon. Deutlich zu erkennen sind verbesserte Dispersionen der Signale von Aminosäuren, die sich in der unmittelbaren Nähe von Mutation PrP₁₁₁ befinden.

Die NMR-spektroskopische Analyse ergab keine Anhaltspunkte für das Bestehen einer stabilen bevorzugten Konformation bei den zu untersuchenden Prion-Peptiden. Infolgedessen wird zunächst davon ausgegangen, dass alle PrP-Sequenzen in einer flexiblen *random coil*-Struktur vorliegen. Es ließ sich aus allen vorangegangenen Untersuchungen keine zeitliche Änderung dieser flexiblen Struktur und derer Löslichkeitseigenschaften feststellen, die auf eine eventuelle Oligomerisierung hindeuten könnten. Die synthetisierten PrP-Monomere weisen keine intermolekulare Aggregationstendenz auf, welche auch durch kovalente Verknüpfung zweier Peptidstränge nicht erhöht ist.

Zur qualitativen Identifikation von Affinitäten der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Prion-Peptide wurde ein Immuno-Dot Blot-Assay verwendet. Dieses Blot-Verfahren stellt allgemein eine schnelle und einfache Technik zur qualitativen Affinitätsbestimmung zwischen

Biomolekülen dar. Des Weiteren ermöglicht dieses biomedizinische Assay ein breites Antigen-Screening mit einem geringen Verbrauch an Antigen und Antikörper.

1.3.2 Affinitätsuntersuchungen der synthetischen Prion-Peptide zu nAbs-PrP

Wie in Kapitel 1.1.10 bereits erwähnt, ist das *N*-terminal gelegene Motiv KTNMK im Prion-Peptid für die Bindung an die nAbs-PrP verantwortlich. Für eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten „Peptide microarrays for antibody epitope mapping“-Experimente und die dabei erzielten Ergebnisse sei auf die Dissertation von Y. RÖTTGER verwiesen.^[64] Aus der Sammlung der neu synthetisierten PrP-Bibliothek gilt es nun, die Prion-Sequenzen zu ermitteln, die eine spezifische Affinität zu dem monoklonalen Anti-Prion-Antikörper (3F4) aufweisen. Des Weiteren soll herausgefunden werden inwieweit die durchgeführten Modifikationen diese Affinität beeinflussen.

Immunoassays haben inzwischen eine breite Anwendung in der klinischen, Umwelt- und Lebensmittelanalytik erlangt, zur Bestimmung beispielsweise von Pflanzen-Schutzmitteln, Hormonen, Pharmaka und Toxinen. Die in diesem Kapitel beschriebenen Assays wurden von A. ALBUS in der Arbeitsgruppe R. DODEL in Marburg durchgeführt. Das detaillierte Protokoll dieser Dot Blot-Tests ist im experimentellen Teil dieser Arbeit zu finden. Beim durchgeführten Dot Blot handelt es sich, ähnlich wie bei ELISA, um ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren. Das Prinzip dieses Immunoassays ist in Abbildung 23 dargestellt.

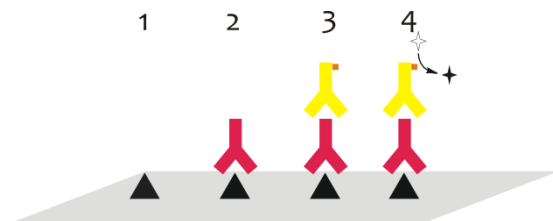


Abbildung 23: Schematische Darstellung eines immunologischen Dot Blot-Verfahrens: 1) Immobilisierung des Antigens auf einer Nitrocellulosemembran, 2) Zugabe des spezifischen Antikörpers und Inkubation, 3) Beifügung eines Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörpers, 4) Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.

Zunächst wird das Antigen auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Im darauffolgenden Schritt werden die verbliebenen freien Bindungsstellen blockiert.

Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper. Nach einem weiteren Waschschrift für die Immunfärbung des Antigen/Antikörper-Komplexes wird das sogenannte *HRP visualization kit* verwendet.

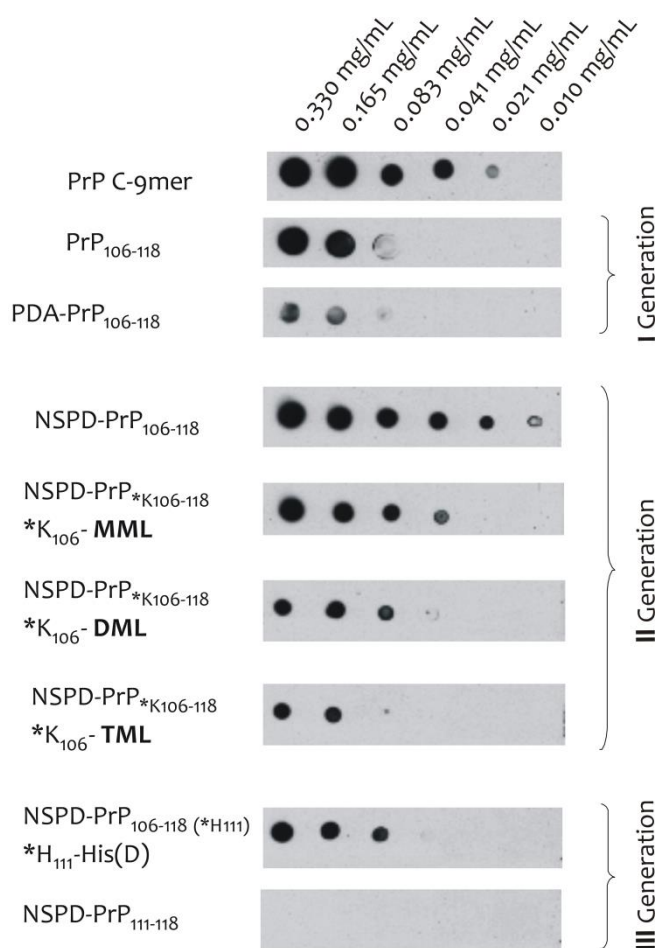
Bei diesem *HRP Polymer-Kit* handelt es sich um ein Enzym-Polymer, in dem mehrere Moleküle Sekundärantikörper (in diesem Fall Pferd-anti-Maus-Antikörper) mit mehreren Molekülen Meerrettich-Peroxidase (*Horse Radish Peroxidase*, HRP) kovalent verknüpft sind. Die Visualisierung erfolgt hier über die Zugabe von Luminol, welches mit Meerrettichperoxidase unter Emission von Licht im blauen Bereich des Lichtspektrums

oxidiert wird. Diese Chemilumineszenz wird schließlich für das Belichten eines Films verwendet. Die Auswertung erfolgte qualitativ anhand des entwickelten Films.

Auch wenn Dot Blot oft nur qualitative Aussagen über die Affinitätseigenschaften der synthetisierten Antigene erlaubt, ist das ein wichtiger Schritt sowohl für die weiteren quantitativen analytischen Verfahren wie ELISA oder SPR als auch für die klinischen Untersuchungen. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der durchgeführten Dot Blots sämtlicher, im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten PrP-Antigene generationsübergreifend zusammengefasst.

Die Intensität der detektierten Blots ist etwa proportional zur spezifischen Affinität des gebildeten Antigen/Primärantikörper-Komplexes. Die dabei nur selten beobachteten Intensitätsschwankungen machen dieses Blot-Verfahren zu einer soliden Grundlage beim Erzielen aussagekräftiger und reproduzierbarer Messergebnisse. Die einigen wenigen Artefakte, die beim Ablesen des Films gelegentlich zu sehen waren, basieren auf der Methode zugrundeliegenden Unregelmäßigkeiten wie etwa Messfehler beim Herstellen der Lösungen verschiedener Konzentration, unbeständige Aktivität des Antikörpers sowie anfällige Enzym/Substrat Wechselwirkung. Trotz alledem konnte in einer Reihe Dot Blot-Tests relativ hohe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse beobachtet werden. Weiterhin konnten in den durchgeführten Dot Blots keinerlei unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Nitrocellulosemembran und den synthetischen Prion-Sequenzen festgestellt werden. Wie aus Abbildung 24 ersichtlich ist, decken die synthetischen Prion-Peptide einen großen Affinitätsbereich ab. Deutlich zu erkennen ist die konzentrationsabhängige Intensitätsveränderung der Blots. Auch die Affinitätsunterschiede zwischen den synthetischen Prion-Sequenzen sowohl innerhalb einer Generation als auch generationsübergreifend werden sichtbar. Eine erste Auffälligkeit zeigt sich im Vergleich zwischen dem käuflichen Standard-Peptid (PrP C-9mer s. Abbildung 10) und dem synthetisierten PrP₁₀₆₋₁₁₈. Diese zwei in der Länge vergleichbaren Peptide haben abgesehen von dem synthetischen Ursprung zwei wesentlichen Unterschieden. So enthält das synthetisierte Prion-Monomer einen unpolaren, C-terminalen Ala-Abschnitt. Der N-Terminus des käuflichen PrP C9-mer ist mit einem zusätzlichen Cystein versehen, so dass es insgesamt polarer ist. Denkbar ist es, dass gerade diese Aminosäure für eine stärkere Haftung an die Membran und somit für deutlich ausgeprägte Affinität verantwortlich ist. Die Gesamtladung des Peptids scheint aber auch eine wichtige Rolle zu spielen. So bleibt das PDA-konjugierte Monomer weit unter den gewünschten Affinitätsausprägungen, vergleicht man dieses mit dem käuflichen PrP C9-mer. Diese Beobachtungen geben Anlass dazu, das synthetische PrP-Monomer bei der Beurteilung

der immunologischen Affinität als Standard anzuwenden. Da es zwischen dem käuflichen und synthetisierten Standard in keinem der Tests zu vergleichbaren Affinitäten gekommen ist, liegt die Vermutung nahe, dass diese Unterschiede zum einem auf den mit Cystein modifizierten *N*-Terminus und zum anderen insgesamt hydrophoben Charakter des *C*-terminalen Endes beruhen. Alle synthetisierten PrP-Peptide liegen bedingt der Aufarbeitung als TFA-Salze vor. Das bedeutet, dass nicht nur beide Termini dieser Peptide, sondern auch die Seitenketten basischer Aminosäuren im verwendeten Puffer protoniert vorliegen. Vergleicht man die beiden PrP-Sequenzen der ersten Generation miteinander, so wird schnell klar, dass, die zusätzliche positive Ladung des *C*-terminal umgepolten Monomers (PDA-PrP₁₀₆₋₁₁₈) einen eher negativen Einfluss auf die Affinität ausübt. Lässt man das Cystein außer Acht (PrP *C*-9mer), so werden unpolare Aminosäurereste am *C*-Terminus (PrP₁₀₆₋₁₁₈) in einem größeren Maße toleriert als die *C*-terminale Umpolung (PDA-PrP₁₀₆₋₁₁₈). Weder die Veränderung der Gesamtladung noch die Verlängerung der Peptsequenz haben zur Steigerung der Affinität beigetragen. Betrachtet man die PrP-Sequenzen der zweiten Generation, so fällt



sofort auf, dass ein einheitlicher Trend in der Färbungsintensität zu erkennen ist. Diese Reihe wurde hauptsächlich zum Zweck einer Prüfung bezüglich der affinitätsvermittelnden Rolle des Lys₁₀₆ zu nAbs-PrP synthetisiert. Wie es aus Vorarbeiten von Y. RÖTTGER^[64] hervorgeht, wird eine Bindung höherer Affinität hauptsächlich über die Lysin-Reste vermittelt. Wie es scheint, korreliert ein zunehmend hydrophober Charakter des Lys₁₀₆ mit einer stetig abnehmenden Affinität. Diese Tendenz zeigt sich anhand einer kontinuierlichen Abnahme der Färbungsintensität in der Auswertungsreihe von dem höchst methylierten, quartären bis hin zum monomethylierten ε-Stickstoff der Lys₁₀₆-Seitenkette (NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈, *K₁₀₆-MML;DML;TML). Diese vorläufige Analyse

Abbildung 24: Das Dot Blot-Profil der synthetischen Prion-Peptide aller drei Generationen. Belichtungszeit 10 s. Durchgeführt von A. ALBUS (Arbeitsgruppe Prof. DODEL).

lässt den Schluss zu, dass die durch den Methylierungsgrad erreichte Steigerung des hydrophoben Charakters zu einer Schwächung der Bindungsaffinität führt. Es ist davon auszugehen, dass diese anziehenden Kräfte vermutlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen, wobei nicht nur die Elektronegativität, sondern vielmehr der sterische Zugang zu dem an der Antikörper-Bindung beteiligten Stickstoff ausschlaggebend ist.

Einen signifikanten Unterschied in der Antikörper-Bindungsaffinität scheint es zwischen monomeren und dimeren Prion-Peptiden zu geben, wobei dieser zwischen dem unmodifizierten NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈-Dimer und dem polyaminkonjugierten PDA-PrP₁₀₆₋₁₁₈ am deutlichsten ausfällt. Auch wenn bei den PrP-Peptiden der zweiten Generation eine Abstufung in der Affinitätsstärke mit zunehmendem Methylierungsgrad deutlich erkennbar ist, weist die Dimerisierungsstrategie durchgehend einen nachweisbar positiven Effekt auf. Der positive Einfluss zeigt sich auch im Vergleich zum käuflichen Monomer. Es sei darauf hingewiesen, dass der absolute Konzentrationsnullpunkt bei den Affinitätsuntersuchungen des dimeren NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈ nicht bestimmt werden konnte. Da keine strukturellen Unterschiede zwischen den monomeren und dimeren Prion-Peptiden mittels NMR-Spektroskopie feststellbar waren, ist die Ermittlung der Affinitätsanstieg zugrunde liegenden Ursache ohne weiterführende konformationelle Analyse schwierig. Fest steht jedoch, dass die über ein Amin kovalent verknüpften PrP-Dimere deutlich bessere Antigene für eine immunologische anti-Prion-Antikörper-Erkennung darstellen, als es bei den monomeren Prion-Peptiden der Fall ist; wobei die hier beobachteten Unterschiede vermutlich auf die Verdopplung der Antikörper-Bindungsstellen zurückzuführen sind. Es ist denkbar, dass der für die intramolekulare Annäherung zwischen zwei PrP-Sequenzen innerhalb eines Dimers erforderliche Abstand mit dem eingesetzten Amin-Linker nicht gegeben ist. Dieser Sachverhalt würde auch die beobachtete strukturelle Flexibilität der PrP-Dimere erklären. Obwohl es nicht zu intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den monomeren Peptid-Ketten kommt, übt das Norspermidin eine insgesamt stabilisierende Wirkung auf die Dimer-Konformation aus. Dieser stabilisierende Effekt spiegelt sich in der gesteigerten Antikörper-Bindungsaffinität wider.

Bei den synthetischen Prion-Dimeren der dritten Generation soll auf folgende Auffälligkeiten hingewiesen werden. So macht eine unerwartet hohe Affinität des mutierten Dimers beispielsweise auf sich aufmerksam. Hier ist ein Histidin-Stereoisomer-Austausch an Position PrP₁₁₁ (LHis₁₁₁DHis) durchgeführt worden. Obwohl die Mutationsstelle an das Epitop grenzt, scheint diese konformationelle Änderung keine übergeordnete Rolle zu spielen. Diese PrP-

Sequenz scheint trotz des herbeigeführten Knicks eine recht gute Bindungsstelle mit einer bemerkenswert hohen Affinität zu repräsentieren. Erwartungsgemäß konnte bei dem verkürzten Dimer PrP₁₁₁₋₁₁₈ ohne Epitop keine Bindungsaffinität für nAbs-PrP festgestellt werden. Die durchgeführten Experimente stützen das Ergebnis von Y. RÖTTGER^[62] hinsichtlich des PrP-Epitopmappings. Das *N*-terminal gelegene Aminosäuremotiv KTNMK ist für die Ausbildung eines PrP-Antigen/Antikörper-Komplexes unabdingbar. Es handelt sich dabei mit großer Wahrscheinlichkeit um ein lineares, kontinuierliches Epitop, wobei die Alkylierung des *N*-terminalen Lysins (K₁₀₆) zur Schwächung der Antigen-Bindungsaffinität führt.

2. Bioanorganische Grundlagen der Biomineralisation

Die Bildung von komplexen anorganischer Mineralien durch lebende Organismen wird als Biomineralisation bezeichnet.^[71a-c] Dieser Vorgang ist ein weitverbreitetes Phänomen und unterliegt einem langen Evolutionsprozess. Biomineralien wie Zähne, Knochen Korallen, oder Muschelschalen, Schneckenhäuser, Perlen sind einige Beispiele dafür und sind im gesamten Tier- und Pflanzenreich von Prokaryoten bis zum Menschen auffindbar. Heute sind über sechzig Biomineralien bekannt, die Gegenstand weiterführender Untersuchungen in der Bionik und ganz besonders in der Werkstoffkunde geworden sind.^[72] Zu den wichtigsten Vertretern zählen Calciumcarbonat (Muschelschalen, Vogeleier, Brachiopoden, Sepia), Siliciumdioxid (Gräser und Schachtelhalmen, Diatomeen) und nicht zuletzt Calciumphosphat (Zahnschmelz, Dentin, Knochen, Brachiopoden).^[73a,b]

Die Material- und Struktureigenschaften der Biominerale werden durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen hierarchisch organisierten organisch-anorganischen Kompositmaterialien bestimmt und sind an die Aufgaben im jeweiligen Organismus angepasst.^[74] Von Reispflanzen ist bekannt, dass sie mit Siliziumdioxid ihre Stängel stabilisieren, die Lichtaufnahme verbessern und die Blätter gegen Wasserverlust durch Verdunstung abdichten. Beim Zahnschmelz handelt es sich um ein besonders beständiges Material, das einerseits perfekt das Innere eines Zahns mit Blut- und Lymphgefäßen, Nerven und Bindegewebe schützt und andererseits den mechanischen und chemischen Einflüssen (Säure-Base-Haushalt) dauerhaft standhält. Ein anderes, nicht weniger repräsentatives Beispiel stellt dafür der tierische Knochen dar. Das Knochengewebe ist einerseits weich und elastisch und gleichzeitig aber von großer Festigkeit. Ein schwammartiges Gerüstwerk feiner Knochenbälkchen (Trabekel), die stets so angeordnet sind, dass sie nur auf Druck oder nur auf Zug belastet werden, zeichnet den Knochen durch höchste Stabilität aus.^[51]

Der organische Anteil, bestehend hauptsächlich aus Makromolekülen (hoch spezialisierten Proteinen, Polyaminen, Enzymen), kontrolliert die chemische Zusammensetzung des anorganischen Anteils nach einem genetisch vorgegebenen Bauplan und sorgt für die einzigartige individuelle Morphologie. Ein herausragendes Beispiel für die Bildung und Formgestaltung von Biomineralien sind die äußerst aufwendig und kunstvoll aufgebauten, nano-strukturierten Silica-Schalen von Kieselalgen. Diatomeen, Radiolarien und Schwämme beherrschen die Biosilifizierung, indem sie ihre Exoskelette aus amorphem, hydratisiertem Siliziumdioxid (SiO_2) herstellen.^[75a-d] Bemerkenswert in dieser Hinsicht sind auch Radiolarien, Silicoflagellaten und Schwämme, die zusammen mit anderen marinen

Organismen in der Lage sind, durch den Aufbau ihrer Kieselsäureskelette beachtliche Mengen an Silicium biogen umzusetzen (jährlich etwa 6 - 7 Gigatonnen).^[76a,b] Da Biosilica in Diatomeen zudem unter physiologischen Bedingungen entsteht, während die industriellen Syntheseverfahren zur Silica-Darstellung zumeist extreme Bedingungen bezüglich des pH-Wertes, Temperatur oder des Drucks erfordern, stoßen die molekularen Vorgänge der Biosilifizierung auf ein großes Interesse. Ein Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen ist deshalb nicht nur für die industrielle Kostensenkung sowie Energieminimierung bedeutend, sondern ist von großem Interesse für die zahlreichen wissenschaftlichen Fachrichtungen wie Biochemie, Biologie, Geologie, anorganische Chemie sowie Molekularbiologie. Für die Werkstoffkunde stellt der Biosilifizierungsprozess eine Inspiration bei der nanotechnologischen Entwicklung neuartiger Materialien dar.^[74]

2.1 Kieselalgen

Die Kieselalgen oder Diatomeen (Bacillariophyta) bilden ein Taxon von Photosynthese betreibenden mikroskopischen Lebewesen und werden in die Gruppe der Stramenopilen (Stramenopila) eingeordnet.^[77] Trotz ihrer geringen Größe kommt den Bacillariophyta eine herausragende ökologische Bedeutung zu. Der durch ihre Photosyntheseaktivität freigesetzte Sauerstoff macht etwa 20% der weltweiten Sauerstoffproduktion aus. Die Zahl der beschriebenen Arten beträgt etwa 30.000. Legt man vorsichtige Schätzungen über die Zahl der noch unbekanntenen Arten zugrunde, dürfte sich diese Zahl um mehrere 100.000 erhöhen. Aufgrund ihrer weltweiten Verbreitung in Gewässern jeglicher Art werden Diatomeen sowohl als Bioindikatoren als auch als „Werkzeuge“ zur erdgeschichtlichen Klimarekonstruktion genutzt.^[78] Ihren deutschen Trivialnamen verdanken die Kieselalgen ihrer Zellenhülle (Frustel), die überwiegend aus Siliziumdioxid aufgebaut ist. Die filigran gestalteten Zellwände beeindrucken mit ihrer artspezifischen Mannigfaltigkeit und bilden bis in den Nanometerbereich hochgeordnete Strukturen. Die strukturelle Vielfalt wird in Abbildung 25 präsentiert, in der rasterelektronische Aufnahmen (SEM) von verschiedenen Diatomeen gezeigt sind. Die Klassifizierung von Diatomeen erfolgt nach der Morphologie der Schalen und erfasst zwei Klassen: die radiärsymmetrischen *Centrales* (z.B. *Thalassiosira pseudonana*, *Coscinodiscus sp.*, *Aulacodiscus sp.* oder *Amphitetras sp.*) und die lang gestreckten bilateral-symmetrischen *Pennales* (z.B. *Cylindrotheca fusiformis*, *Didymosphenia sp.* oder *Podocystis sp.*).^[79]

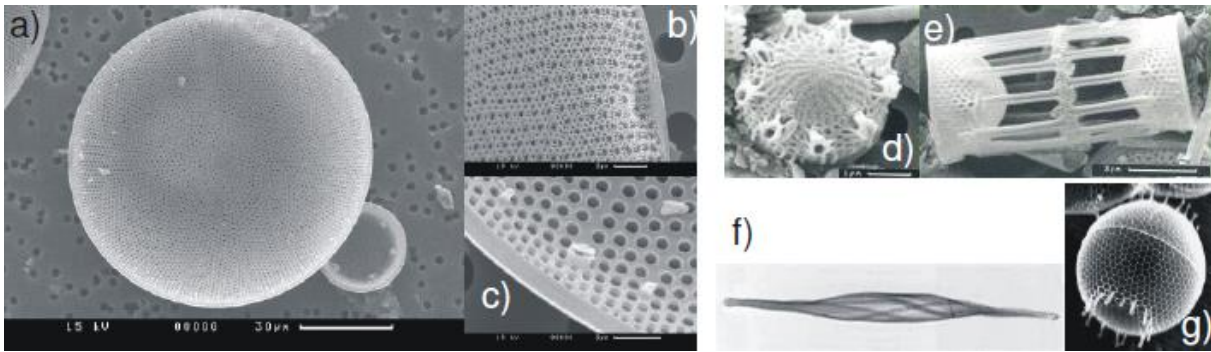


Abbildung 25: Morphologien verschiedener Diatomeenzellwände. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellwände von *Coscinodiscus granii* (a-c) *Skeletonema costatum* (d, e) *Cylindrotheca fusiformis* (f) und *Stephanopyxis turris* (g).^[80a-b]

Das Exoskelett der Diatomeen, auch Frustula genannt, wird oft als Glashaus oder Glasbox bezeichnet. Die Frustel ist schachtelförmig und besteht aus zwei schalenförmigen Hälften unterschiedlicher Größe (Epitheka und Hypotheka), die ähnlich wie zwei Teile einer Petrischale ineinander greifen. Beide zusammen bilden den lebenden Zellkörper, oder Protoplast aus. Jede Frustel-Hälfte (Theka) ist von einer Valva und mehreren Gürtelbändern umgeben, sodass der Protoplast im Inneren vollständig geschützt bleibt.^[81] Kontakt zu näherer Umgebung wird durch die in der Zellwand integrierten Poren gesichert. Als diploide Organismen vermehren sich Diatomeen hauptsächlich durch die Zellteilung (Mitose). Jede der beiden neu entstandenen Zellen übernimmt eine Theka der Mutterzelle und bildet den anderen Teil neu. Jeder vererbte Schalenteil ist stets die kleinere Hypotheka. Jede der neu entwickelten Valven bildet bei der Tochterzelle jeweils die Hypovalva aus, die das charakteristische Ornament jeder Diatomeenspezies trägt. Die Tochterzellen sind deshalb auch immer kleiner als die Mutterzellen und als natürliche Folge hiervon nimmt die durchschnittliche Zellgröße der Diatomeenpopulation schrittweise ab. Bevor eine Minimalgröße erreicht ist, finden jedoch Sexualvorgänge statt. Durch die geschlechtliche Fortpflanzung wird eine neue Kieselalge mit einer zweiteiligen Schale gebildet.^[82] Die Ausbildung der charakteristischen Muster der neuen Zellwände erfolgt dabei in den spezialisierten membrangebundenen Vesikeln, die als *silica deposition vesicel* (SDV) bezeichnet werden.^[83] Hier findet die Biosilifizierung der neuen Valven durch die Aufnahme und den Transport von Kieselsäure $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ statt.^[84] Erste Hinweise für einen Einfluss genetischer Faktoren bei der Zellwandmorphogenese wurden demnach aus Beobachtungen des Fortpflanzungszyklus erhalten. Die charakteristische Musterung der Silica-Strukturen wird dabei Spezies-spezifisch aufgebaut und präzise in jedem Zellzyklus reproduziert. Der Aufbau eines Frustulums aus den einzelnen Komponenten folgt bei allen Diatomeen einem festen Bauplan und ist in Abbildung 26 dargestellt.^[85]

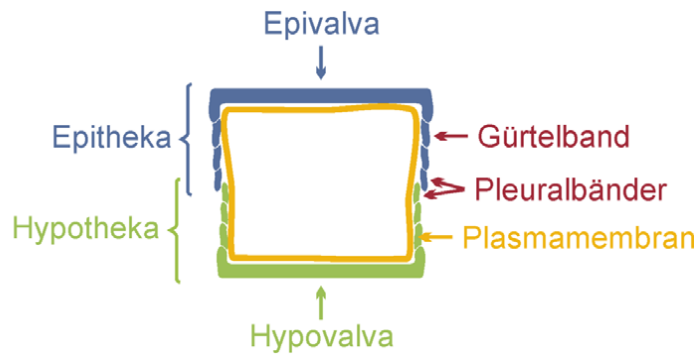


Abbildung 26: Schematischer Aufbau einer Diatomeenzellwand im Querschnitt. Das Diatomeengehäuse ist in blau (Epitheka) und grün (Hypotheka) gezeigt. Die Gürtelbänder, die sich im überlappenden Bereich befinden, werden als Pleuralbänder bezeichnet.^[86]

Im Anschluss an die Akkumulation von Kieselsäure findet die Zellwandbiogenese in den SDVs statt. Dieser genetisch kontrollierte Silifizierungsprozess führt durch die Polykondensation von Monokieselsäure zur Ausbildung von komplex strukturierten Exoskeletten mit ihrer artspezifischen, vielfältigen Morphologie.

Während das Siliziumdioxid auf molekularer Ebene amorph und ungeordnet vorliegt (s. Abbildung 27), zeichnet sich bereits im Nanometerbereich eine Strukturierung ab. Die Primärpartikel wie Fibrillen, Blättchen oder Sphärolithe werden beobachtet. Diese Strukturierung setzt sich bis in den Mikrometerbereich fort, wo die Frusteln entsprechend eine Makrostrukturierung aufweisen. Hier zeigen die Gehäuse von gesteinsbildenden Organismen ihre hochgeordnete artspezifische Architektur.^[87]

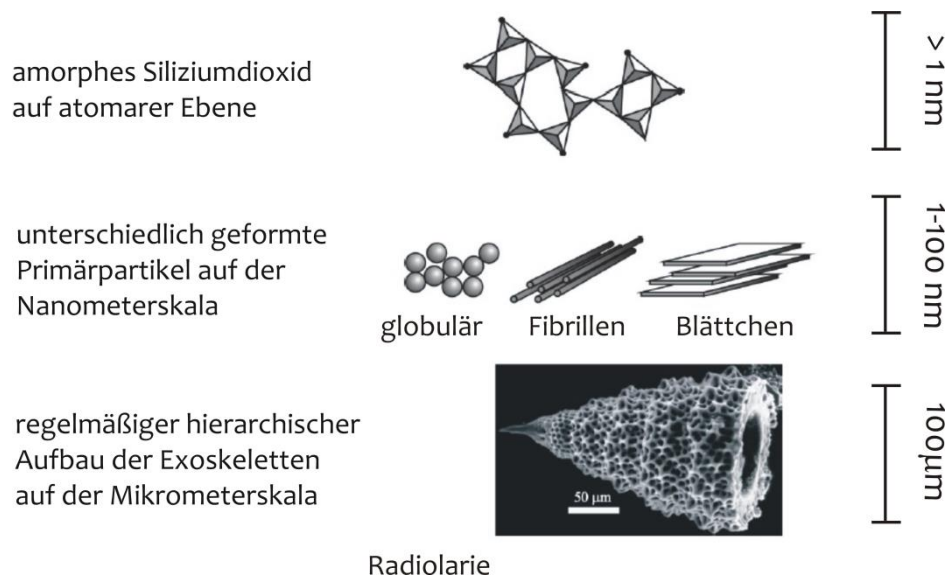


Abbildung 27: Strukturen der Diatomeen- und Radiolarenshalen auf verschiedenen Längenskalen.^[87]

Die biologisch induzierte Biomineralisation weckt heute noch die Faszination vieler Wissenschaftler. Die bisherigen Forschungserkenntnisse bestätigen eindrucksvoll das ganze Ausmaß an Komplexität der im Silifizierungsprozess ablaufenden Vorgänge mit einer Vielfalt

von einwirkenden Faktoren und ihrer gegenseitigen Beeinflussung. Obwohl die biochemischen Grundlagen dieser Vorgänge seit Jahrzehnten intensiv erforscht werden, scheint die Faszination an lebenden Organismen, die die gewöhnliche Kieselsäure innerhalb von wenigen Minuten in hoch filigrane Krusten mit komplexer Nanostruktur verwandeln können, zugenommen zu haben. Aus wissenschaftlicher Sicht, bleiben trotz einer Fülle von fundierten Erkenntnissen, noch viele Fragen offen. Das Verständnis für die Prinzipien der Silifizierungsprozesse wird zusätzlich durch die Tatsache erschwert, dass die hochgeordneten und komplexen Strukturen ausschließlich im Mikrometerbereich beobachtet werden, während im Ångström-Bereich das amorphe Siliciumdioxid vorliegt. Einen entscheidenden Einfluss auf die Mineralisation scheinen jedoch organische Moleküle zu haben. In der Gruppe der organischen Makromoleküle, die in direktem Zusammenhang mit dem Prozess der Silica-Biomineralisation stehen, spielen Polyamine und polyaminmodifizierte Peptide eine gesonderte Rolle. Diese Verbindungen können als Template oder Katalysatoren agieren. Sie sind in der Lage, den pH-Wert in so weiter Spanne zu halten, dass es zu einer ortsspezifischen Verkieselung kommt. Bevor auf die bei der Silica-Bildung beteiligten organischen Komponenten eingegangen wird, sollen zunächst einige Aspekte der Kieselsäurepolymerisation erläutert werden.

2.2 Polymerisation der Kieselsäure

Der Sammelbegriff „Silica“ umfasst alle Oxidmodifikationen des Siliciums. Das Siliciumdioxid gilt als strukturelle Grundeinheit und ist ein wichtiger Bestandteil zahlreicher Substanzen. Darüber hinaus ist es in einem breiten Spektrum kommerziell anwendbar. Fast unbemerkt spielt synthetisches SiO_2 im Alltag eine große Rolle. Dieses wird einer ganzen Reihe von Produkten zugesetzt, z.B. Farben und Lacken, Kunst- und Klebstoffen; es ist wichtig für die modernen Fertigungsprozesse der Halbleiter- und Mikrosystemtechnik, wird aber auch als Pigment in Inkjetpapier-Beschichtungen verwendet. Als inerte, oxidations- und temperaturbeständige Substanz ist es in pharmazeutischen Artikeln genauso oft vertreten wie in kosmetischen Produkten. Aber auch in Nahrungsergänzungsmitteln und in Lebensmittelprozessen (z.B. Bierklärung) wird es eingesetzt.^[88] Siliciumdioxid liegt in einer Vielzahl molekularer Formen vor, die beispielsweise Monomere, Dimere, Oligomere, cyclische Formen und Polymere umfassen. Darüber hinaus kann das allgegenwärtige Siliciumdioxid amorph, kristallin, hydratisiert und solvatisiert vorliegen und es kann in einer Vielzahl von partikulären und Aggregations-Zuständen existieren.^[89] Im Gegensatz zum amorphen SiO_2 haben die kristallinen Formen nur eine sehr geringe Toleranz gegenüber

Verunreinigungen. Sie unterscheiden sich nur in ihrer Struktur (Mogánit, Cristobalit, Coesit, α -, β -Quarz u. v. a). Amorphes Silica kann durch molekulare Ausfällung großtechnisch erzeugt werden. Dagegen lässt sich das pyrogene Siliciumdioxid in einem aufwendigeren technischen Verfahren herstellen. Pyrogenes Siliciumdioxid besteht, ähnlich wie das gefällte SiO_2 , vollständig aus amorphen Siliciumdioxid-Partikeln und unterscheidet sich aber in definierten Teilchengrößen und Eigenschaften.^[90]

Das Reaktionsverhalten sowie die chemischen Eigenschaften zahlreicher Kieselsäurespezies sind weitreichend erforscht, auch wenn sie ein komplexes Thema darstellen und noch nicht vollständig verstanden sind.^[91,92] Die Löslichkeit von Siliciumdioxid in Wasser ist stark von der Modifikation beziehungsweise dem Ordnungsgrad des Siliciumdioxids abhängig. So existiert Monokieselsäure $\text{Si}(\text{OH})_4$ nur in verdünnten wässrigen Lösungen ($C < 1 \text{ mM}$) bei Raumtemperatur und einem neutralen bis leicht basischen pH-Wert.^[91] Bei höherer Konzentration findet eine rasche Polymerisationsreaktion statt. Während die Polymerisation im Basischen sehr schnell voran schreitet, lassen sich in einem pH-Bereich von 2 bis 7 die einzelnen Schritte voneinander unterscheiden. Der erste, reaktionsbestimmende Kondensationsschritt läuft unter Ausbildung einer Siloxanbindung (Si-O-Si) infolge eines nukleophilen Angriffs einer Silanolgruppe an das Siliziumatom eines zweiten Moleküls und einer intermolekularen Wasserabspaltung ab (s. Abbildung 28).^[93] Bei höheren Konzentrationen schließt sich dem einleitenden, langsamen Reaktionsschritt zwischen zwei neutralen Spezies eine Reihe von Polykondensationsreaktionen an, in deren Verlauf aus Dimeren Oligomere gebildet werden. Mit zunehmendem Substitutionsgrad der Kieselsäure erhöht sich der elektrophile Charakter des Siliziumatoms, was zur Anlagerung weiterer Kieselsäuremoleküle führt. Der Polymerisationsprozess von Monokieselsäure hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Veränderung des pH-Wertes, was wiederum einen katalytischen Effekt auf den Reaktionsverlauf ausübt. Während der pH-Wert von Monokieselsäure bei 9.7 liegt, beträgt er im Falle höher polymerisierter Spezies etwa 6.7 - 6.4. Das bedeutet, dass die Silanolgruppen eines Oligomers in einem größeren Maß dissoziiert vorliegen. Die Polymerisation wird beschleunigt, da der nukleophile Angriff der negativ geladenen Silanolat-Anionen an die nicht-ionisierten Silanolspezies erleichtert wird. Die Oligomerisierung läuft solange, bis eine maximale Zahl an Siloxanbindungen ausgebildet ist und die Anzahl an Silanolgruppen ein Minimum erreicht hat, wobei es immer wieder zu Depolymerisation kommen kann, weil die Ausbildung von Siloxanbindungen eine reversible Reaktion darstellt. Während eines Polymerisationsprozesses neigen entstehende Oligomere nach dem Erreichen einer bestimmten Länge zu Ringschlussreaktionen. Infolgedessen werden

Partikel gebildet, die wiederum aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte mit Monomeren interagieren und weiter an Größe gewinnen können. Auf diese Weise entstehen verzweigte, dreidimensional vernetzte Kieselsäurespezies. Man spricht in diesem Fall auch von kolloidaler, amorpher Polykieselsäure, oder allgemein vom kolloidalen Silica.^[92]

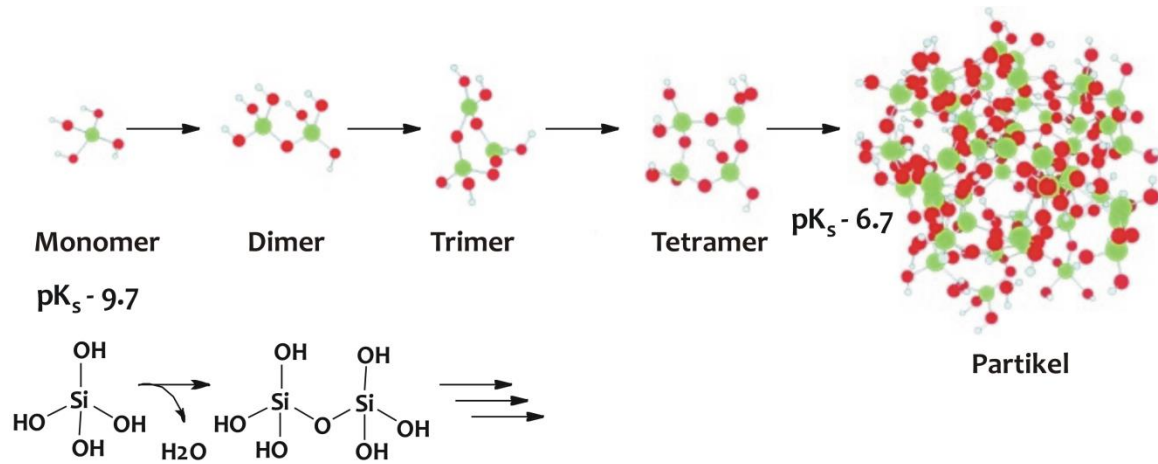


Abbildung 28: Kondensation von Kieselsäure und Bildung vom kolloidalen Silica. Der erste Kondensationsschritt stellt die Bildung eines Dimers dar, das sich als nächstes zum Trimer und anderen niedermolekularen oligomeren Einheiten zusammenlagert. Weiteres Wachstum führt zu dreidimensionalen, polymeren Partikeln, die als Kieselzol bezeichnet werden.^[94]

Wie sich das kolloidale Silica weiter entwickelt wird hauptsächlich durch den pH-Wert bestimmt (s. Abbildung 29). Im sauren und neutralen Medium sind die Oberflächen der Silica-Partikel weitestgehend ungeladen, sodass nur geringe elektrostatische Abstoßungen auftreten. Als typisches Kolloid unterliegt das Silica-Sol den Gesetzen der statistischen Physik. Durch Brownsche-Bewegung kommt es gelegentlich zu Partikelkollisionen, wodurch weitere Si-O-Si-Bindungen entstehen. So können die Partikel ungehindert weiter interagieren, sich zu verzweigten Ketten anlagern oder dreidimensionale Netzwerke ausbilden (frisches Kiesel-Gel).^[94] Im weiteren Verlauf des Polymerisationsprozesses verdichten sich die ausgebildeten Flechtwerke, die Zwischenräume werden immer kleiner. Dieser Prozess wird auch als Alterung bezeichnet. Makroskopisch kann dieser Vorgang an der Versteifung des gebildeten Silica-Gels wahrgenommen werden. Im alkalischen Bereich dagegen sind die Oberflächen der Aggregate negativ geladen. Diese stoßen sich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen gegenseitig ab, weshalb sie als isolierte Solpartikel wachsen. Durch Auflösen von kleineren Solpartikeln und anschließende Anlagerung an die vorliegenden Kerne, entsteht letztendlich ein nahezu monodisperses Sol, dessen Stabilität mit steigendem pH-Wert wächst, wobei Anstieg der Größe mit Abnahme ihre Löslichkeit einhergeht. Dieser Prozess wird als OSTWALD-Reifung bezeichnet und führt schließlich zur Formung eines stabilen Sols. In Anwesenheit von Salzen oder Flockungsmitteln lässt sich die Ausbildung

eines Niederschlags beobachten.^[94] Die Präzipitate weisen im Vergleich zum Silica-Gel eine andere Dichte sowie einen abweichenden Brechungsindex auf und lassen sich durch Zentrifugieren von der umgebenden Flüssigkeit abtrennen.

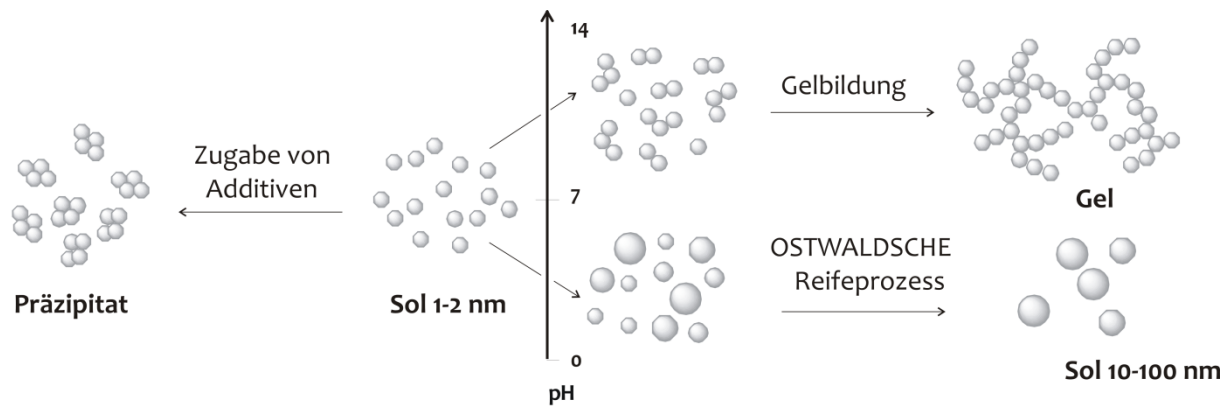


Abbildung 29: Aggregationsverhalten des SiO_2 ausgehend vom kolloidalen Silica. Je nach Reaktionsbedingungen können unterschiedliche SiO_2 -Partikel gebildet werden: Silica-Gel ($\text{pH} > 7$) oder Kieselsol mit Partikelgrößen von 10-100 nm ($\text{pH} < 7$). Durch Zugabe von Additiven wird Präzipitat erzeugt.

Es ist seit langem bekannt, dass die Partikelgrößen, Form sowie Porenstrukturen durch die Anwesenheit von Additiven beeinflusst werden können.^[95] Der Kondensationsprozess wird durch die Gegenwart von positiv geladenen Molekülen oder Ionen beschleunigt. Dieser katalytische Effekt ergibt sich allein durch die Neutralisation der negativen Oberflächenladung der Silica-Partikel. Als Folge hiervon werden zahlreiche Andockungsstellen für die Ausbildung dreidimensionaler Netzwerke eines amorphen Silica-Konstruktes geschaffen, das sich durch Eigenschaften eines Präzipitats auszeichnet. Darüber hinaus kommt es durch Einsatz von polymeren Additiven zu einer globalen Vernetzung der Silica-Partikel, bei dem Matrix-abhängige Strukturen gebildet werden. Für die Herstellung von mesoporösen Materialien mit definierter Porengröße und -geometrie werden neben einer SiO_2 -Quelle organische Verbindungen, die sogenannten strukturdirigierenden Agenzien (SDA) benötigt. Als solche SDA kommen großtechnisch sowohl Tenside als auch amphiphile Blockcopolymere zum Einsatz. Sie sind in der Lage, den Aggregationsprozess zu katalysieren oder als Template für die sich bildenden Silica-Strukturen zu fungieren.^[96]

2.3 Organische Komponenten der Diatomeenzellwand

Die bislang bedeutendsten Einblicke in die Biomineralisation von Kieselsäure wurden durch Isolierung und Charakterisierung von organischen Zellwandkomponenten der Kieselalgen erhalten. Es ist seit langem bekannt, dass Glycin- und hydroxidhaltige Aminosäuren reiche Proteine am Aufbau der Exoskelette beteiligt sind.^[97,98] Aus den Zellwänden verschiedener Kieselalgen wurde eine Reihe ungewöhnlicher Aminosäuren entdeckt, darunter 3,4-

Dihydroxyprolin, ϵ -*N*-Trimethyl- δ -hydroxylysin und seine phosphorylierte Variante.^[99,100] Neben Polysacchariden konnten bis heute fünf Proteinfamilien identifiziert werden: Frustuline,^[101,102] Pleuraline,^[103,104,105] Silaffine,^[106,80b] die p150-Familie,^[107,108] Silacidine^[109,110] und Silicateine.^[75c,111,112] Die isolierten, artspezifischen, langkettigen Polyamine (LCPAs) runden diese beeindruckende Vielfalt ab.^[113,114,115]

Pleuraline

Bei den Pleuralinen, handelt es sich um hochmolekulare Glycoproteine.^[71a,103] Das charakteristische Merkmal dieser Proteinfamilie ist eine etwa 90 Aminosäuren lange Domäne, die reich an Prolin, Serin, Cystein und Asparaginsäure (PSCD-Domäne) ist, was für den niedrigen isoelektrischen Punkt (> 4) sorgt. Diese sauren Proteine verdanken ihren Namen ihrem Vorkommen in der Diatomeenzellwand. Infolge biochemischer Untersuchungen (Immungoldmarkierung) konnten Pleuraline im Laufe ihrer Zellzyklus-abhängigen Entwicklung an den Pleuralbändern lokalisiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Pleuraline an der Bildung der überlappenden Gürtelbänder beteiligt sind. Außerdem scheinen diese Proteine eine entscheidende Rolle bei der Hypotheca-Epitheca Differenzierung zu spielen sowie an der reversiblen Vereinigung der beiden Theca beteiligt zu sein. Pleuraline sind somit wichtige Funktionsproteine, die an der Regulation der Zellwandbiogenese aktiv teilnehmen. Sie sind nicht an der SiO₂-Bildung beteiligt, weil sie erst nach der Ausbildung von Schalen auf deren Oberfläche abgelagert werden.^[104,105]

Frustuline

Die zweite Gruppe, die sogenannten Frustuline, konnten nur unter äußerst drastischen Reaktionsbedingungen aus den Kieselalgeschalen gewonnen werden.^[71a,98] Für ihre Isolierung wurden die Exoskelette mit wasserfreiem Fluorwasserstoff behandelt, was auf die feste Anbindung dieser Proteine an die Silicatschale hindeutet. Durch weitere Untersuchungen der strukturgebenden Eigenschaften dieser Familie konnte sichergestellt werden, dass es sich dabei um glykosylierte Proteine handelt, die mittels HF-labiler glycosidischer Bindungen an der Schale verankert sind. Des Weiteren besitzt diese Protein-Gruppe eine hohe Affinität gegenüber Ca²⁺-Kationen. Ursache hierfür liegt an der Codierung ihrer Domäne. Diese etwa 50 Aminosäuren lange Domäne ist reich an Cystein und sauren Aminosäuren (ACR: *acidic and cystein-rich domain*); sie enthält mehrere Wiederholungseinheiten in einem charakteristischen Muster, die als besonders affine Ca²⁺-Bindungsstellen agieren.^[101,102] Sie kleiden die gesamte Zellwand der Alge und führen somit hauptsächlich eine schützende Funktion aus. Es wird angenommen, dass sie als eine Art Schutzmantel gegen Zersetzung im

leicht basischen Seewasser (pH 8 - 8.5) dienen. Die Frustuline sind ebenso wie Pleuraline nicht an der SiO₂-Bildung beteiligt, da sie erst nach Ausbildung der Diatomeenzellwand zur Entfaltung kommen.

p150-Familie

Zu dieser kleinen Familie gehören bislang zwei Proteine mit den Molekularmassen von 150 kDa (p150) und 130 kDa (p130). Diese beiden Proteine konnten aus *T. pseudonana* isoliert werden, nachdem die Zellen der Kieselalge über längere Zeit höheren Cu²⁺-Konzentration ausgesetzt wurden.^[107,108] Beide Proteine wurden durch die Stressbedingungen vermehrt in der Region der Gürtelbänder exprimiert. In der Domäne des p150-Proteins konnte eine 22 Aminosäuren lange Sequenz identifiziert werden, die den Transport in das endoplasmatische Retikulum codiert. Darüber hinaus konnten mehrere potentielle Bindungsstellen für *N*-Glykosylierung aufgezeigt und eine Chitin-Bindungsstelle ermittelt werden. Untersuchungen dieser Proteinfamilie zeigten, dass sie ausschließlich auf die Gürtelbandregion spezialisiert sind, wobei es noch unklar ist, inwiefern sie an der Biogenese der Gürtelbänder beteiligt sind.

Silacidine

Auch Silacidine, die erst 2008 von SUMPER und seinen Mitarbeitern isoliert werden konnten, sind, ähnlich wie Frustuline und Pleuraline, saurer Natur.^[109,110] Silacidine sind reich an phosphorylierten Serin-Resten, Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure. Sie selbst bewirken keine Silica-Präzipitation, scheinen jedoch eine regulierende und dirigierende Funktion auszuüben.^[110] Durch ihre polyanionische Natur wirken sie wie ein multivalentes Anion und sind in der Lage, die *in vitro*-Eigenschaft von langkettigen Polyaminen bei der Kieselsäurefällung zu verändern. Anstelle von Phosphatanionen, bewirken diese organischen Polyamin-Gegenspieler eine Phasenseparation, wobei die Zusammenhänge in Bezug auf Silica-Menge sowie die Silica-Struktur viel komplexer als mit anorganischen Phosphat-Anionen zu sein scheinen.

Silicateine

Neben den bereits oben erwähnten Frustulinen, Pleuralinen und Silacidinen konnte noch eine weitere Proteinfamilie aus biologischen Silicaten gesichert werden, nämlich eine Gruppe der Silicateine. Sie wurden aus Kieselsäureskelettnadeln des marinen Schwammes *Tethya aurantia* isoliert.^[111,112] Jede dieser Nadel enthält ein axiales Protein-Filament. Diese Proteinfasern sind aus regelmäßig wiederholenden Einheiten aufgebaut, bestehend aus drei Proteinen mit annähernd gleichem Molekulargewicht. Man unterscheidet zwischen Silicatein

α , β und γ , die sich strukturell sehr ähnlich sind. Durch die Sequenzierung des α -Silicatein, das etwa 70% der Proteinfasern ausmacht, konnte eine verblüffende Ähnlichkeit zu den Proteasen festgestellt werden.^[111,112] Aus diesem Grund wird den Silicateinen außer der struktursteuernden auch zusätzlich eine biokatalytische Rolle zugesprochen. Die genannten Parallelen in Bezug auf die gemeinsame evolutionäre Herkunft lassen vermuten, dass die Silicateine in der Lage sind, die Hydrolyse von Kieselsäureestern zu katalysieren, da Proteasen Peptid- und Esterbindungen spalten können.^[116,117]

Silaffine

Zu den wenigen ausführlich charakterisierten Protein-Familien aus der Diatomeenzellwand gehören Silaffine.^[80b] Neben der Silaffin-1 Gruppe (natSil-1A₁, natSil-1A₂ und natSil-1B) aus der Kieselalge *Cylindrotheca fusiformis*,^[80b] wurden weitere Silaffine entdeckt: natSil-2 (*Cylindrotheca fusiformis*)^[118] sowie tpSil3 (*Thalassiosira pseudonana*).^[119,120] Bei allen Peptiden dieser Klasse handelt es sich um Moleküle mit relativ niedrigem Molekulargewicht (von 4 bis 17 kDa), was die Vermutung nahe legt, dass ihr Einfluss auf die Biomineralisation nicht durch Proteinfaltung bestimmt wird.^[71a,98] Es ist unwahrscheinlich, dass sie unter Ausbildung von Tertiär- oder Quartärstrukturen in den Biosilifizierungsprozess eingreifen. Auch die Tatsache, dass diese Peptidklasse eine einzigartige Vielfalt an posttranslationalen Modifikationen trägt, stützt diese These.^[80b] Im Gegensatz zu den beschriebenen Peptid-Klassen (Frustuline, Pleuraline, Silacidine) sind Silaffine unmittelbar an der Silica-Bildung in Kieselalgen beteiligt. Bei Silaffinen handelt es sich um mehr oder weniger homologe Peptide, wobei die Homologie innerhalb einer Gruppe stärker ausgeprägt ist als es bei zwischenfamiliären Vertretern der Fall ist. Alle diese Peptide weisen Glycin-, Serin- und Lysin-reiche Domäne sowie verschiedene posttranslationale Modifikationen auf. Hierzu zählen Phosphorylierungen, *N*-Alkylierungen, Polyamin-Seitenkettenverlängerungen, die Hydroxylierung von Lysin- und Prolinsubstituenten. Die Glykosylierung und Sulfatierung treten hingegen nur in wenigen Silaffinen auf.^[100] Die einzigartige Modifikations- und Funktionsvielfalt ist am Beispiel des Silaffins-1A₁ in Abbildung 30 gezeigt.

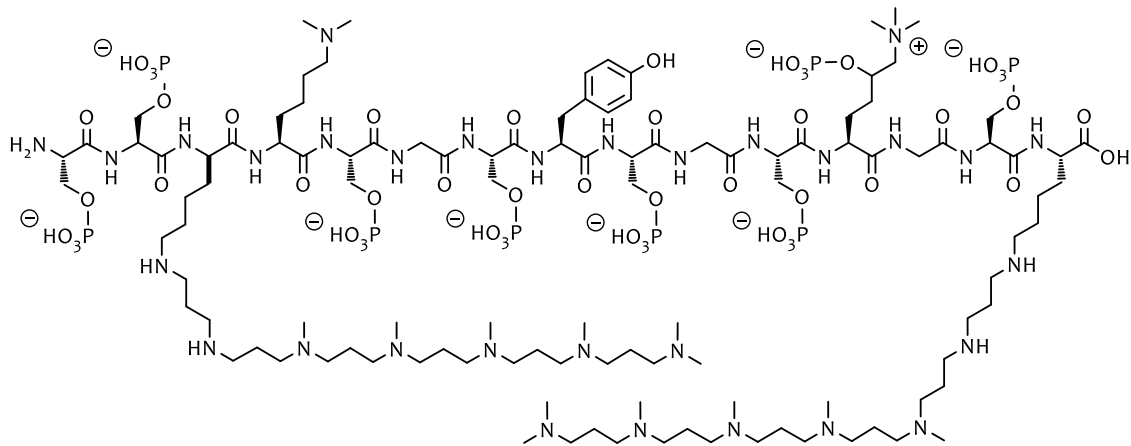


Abbildung 30: Struktur des Silaffin-1A₁ aus *C. fusiformis*. In der vorliegenden Silaffin-Sequenz betreffen die posttranslationalen Modifikationen hauptsächlich Lysin- und Serin-Seitenketten.

Während es sich beim Serin vorwiegend um Phosphorylierungen handelt, liegt das Lysin im Silaffin-1A₁ in unterschiedlichen Modifikationsformen vor. So kommt bei diesem Derivat sowohl am ϵ -Stickstoffatom dimethyliertes als auch ein Oligopropylaminseitenkettenverlängertes Lysin-Derivat vor. Darüber hinaus tritt beim Silaffin-1A₁ auch zweifachmodifiziertes δ -Hydroxy-*N*^ε-trimethyl-lysin auf.

Obwohl die primäre Struktur des nativen Silaffin-2 nicht vollständig aufgeklärt wurde, konnten hier dennoch posttranslationale Veränderungen nachgewiesen werden. So wurden dort außer Serin-Seitenketten noch zusätzliche phosphorylierte Threonin- und Hydroxyprolin-Reste identifiziert. Neben Phosphorylierungen treten hier sowohl Glykosylierungen als auch Sulfatierungen auf.^[118] Durch die Sequenzierung des kompletten Genoms von *Thalassiosira pseudonana* wurde eine Reihe neue Silaffinpeptide Sil-1L, Sil-1H, Sil-2L, Sil-2H, Sil-3 und Sil-4 entdeckt, die durch insgesamt drei Silaffin-Gene codiert sind.^[119,121] Bei Sil-1/2H und Sil-3 konnten zusätzlich noch Glykosylierungen mit komplexen Gemischen aus Sacchariden detektiert werden.^[121] Abgesehen von einigen artspezifischen, strukturellen Modifikationen, zeichnen sich alle Silaffine durch eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten aus. Diese Peptid-Familie wird zeitgleich durch die zahlreichen basischen Polyaminseitenketten sowie von anionischen Modifikationen, wie Phosphorylierungen geprägt. Da die Polyaminseitenketten als Basen und die Phosphatgruppen als Säuren agieren können, handelt es sich bei allen Silaffinen um Ampholyte. Durch die posttranslationale *N*-Alkylierung tragen terminale oder interne quartäre Ammoniumfunktion der Lysine permanente positive Ladungen. Die sekundären Aminofunktionen, die innerhalb eines, um mehrere Aminopropyl-Einheiten verlängerten Seitenketten-Restes, lokalisiert sind, zeichnen sich dagegen je nach pH-Wert der Umgebung durch temporäre, positive Ladungen aus (s. Abbildung 30). Die Phosphorylierungen, die in jedem Silaffin zahlreich vertreten sind, sorgen ihrerseits für den

anionischen Charakter. Eine Fülle aus posttranslationalen Modifikationen, die eine einzigartige Amphiphilie zur Folge hat, macht die Silaffine zu besonderen organischen Makromolekülen, die für die Biosilifizierungsvorgänge von hoher Relevanz sind. Die Fähigkeit der Silaffine, Kieselsäure mit individueller Morphologie auszufällen, wird nicht allein auf die strukturellen Parameter wie Kettenlänge oder Methylierungsgrad, Anzahl und Art der vorliegenden Aminogruppen, sondern vielmehr auf das komplexe Zusammenspiel der beteiligten Funktionalitäten zurückgeführt. Eine gesonderte Stellung bei der Zellwandbiogenese scheint das natSil-1A einzunehmen. Ähnlich wie die langkettigen Polyamine ist dieses dazu befähigt die Silica-Nanokugeln aus kieselsäurehaltigen Lösungen *in vitro* auszufällen.^[75b]

Polyamine

Neben den Silaffinen mit ihren Polyaminseitenketten wurden auch freie Polyamine aus verschiedenen Diatomeen isoliert, wobei die Polyamin-Struktur, Menge sowie ihr Zusammensetzung für jede Diatomeenart hochspezifisch ist.^[113] In allen bis jetzt untersuchten Gattungen konnten Polyamine nachgewiesen werden.^[113,115] Auch in Abwesenheit von Silaffinen zeigen die langkettigen Polyamine (engl. long-chain polyamines LCPAs) *in vitro* Silica-präzipitierende Eigenschaften, daher wird ihnen nicht nur ein katalytischer, sondern auch ein strukturdirigierender Effekt zugeschrieben.^[122] Auch die LCPAs auch aus verwandten Kieselalgen-Gattungen weisen beachtliche strukturelle Unterschiede auf. Trotz struktureller Unterschiede lassen sich einige gemeinsame Merkmale festlegen (s. Abbildung 31).

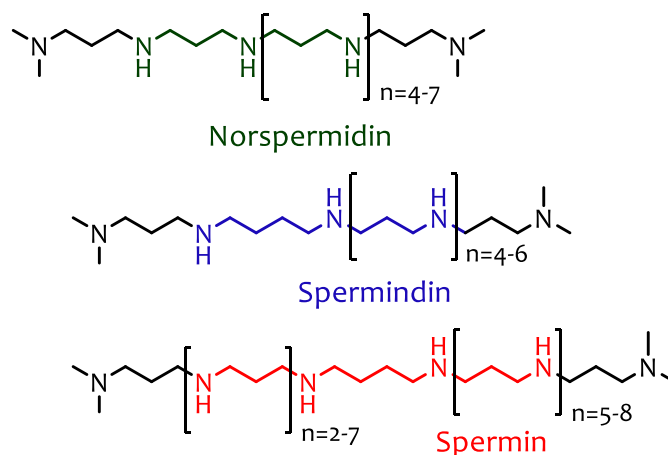


Abbildung 31: Gezeigt sind Strukturen von langkettigen Polyaminen, die aus unterschiedlichen Diatomeenspezies isoliert wurden. Als Basis besitzen alle charakterisierten Amine eine 1,3-Diaminopropan- oder 1,4-Diaminobutan-Einheit, die als wichtige Grundmotive in allen bekannten biogenen Aminen vorkommen.^[75a]

Alle bis heute charakterisierten LCPAs aus marinen Kieselalgen beinhalten Struktur motive der bedeutenden biogenen Polyamine wie Putrescin (1,4-Butandiamin), Spermidin (*N*-(3-Aminopropyl)butan-1,4-diamin), Spermin (*N,N'*-Bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin) oder Norspermidin (*Bis*(3-aminopropyl)amin vgl. Abbildung 1. Die eigenschaftsformenden strukturellen Merkmale erstrecken sich von dem Polymerisationsgrad über den intermolekularen Aminabstand bis hin zum Methylierungsgrad. Im Gegensatz zu synthetischen Molekülen, die eine definierte chemische Struktur aufweisen und idealerweise in Form eines homogenen Gemisches vorliegen, zeichnen sich die isolierten Polyamine hingegen durch eine Mikroheterogenität aus. Die LCPAs, ähnlich wie Silaffine, greifen in den Kieselsäurekondensationsprozess ausschließlich als komplexe Gemische gleichartiger, jedoch nicht identischer Verbindungen ein. Ihre Diversität und Zusammensetzung ist für den Art-spezifischen Aufbau der Diatomeen-Frustel verantwortlich. Welche Rolle den Polyaminen und Silaffinen bei der Kieselsäurefällung zukommt, soll im folgenden Abschnitt erläutert werden.

2.4 Einfluss der Silaffine und Polyamine auf die Kieselsäurekondensation

Den ausgewählten organischen Komponenten aus der Diatomeen-Zellwand wird nicht nur direkter Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Silica-Partikel sondern ein wichtiger strukturdirektierender Effekt zugeteilt.^[73a,123-127] Es wird davon ausgegangen, dass die organischen Verbindungen durch Selbstaggregation oder durch ihre Sekundärstruktur als Template bzw. als SDA agieren können.

Nach der Entdeckung der *in vitro* präzipitierenden Eigenschaften von Silaffinen und langkettigen Polyaminen konzentrierte sich die Forschung im Bereich der kontrollierten Kieselsäurefällung auf die Suche nach den optimalen Reaktionsbedingungen sowie Einflussparametern, die aufschlussreiche Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen Quantität, Kinetik und Struktur erbringen sollten. In diesem Zusammenhang wurde herausgefunden, dass die Reaktionen mit den Polyaminen ausschließlich in Anwesenheit multivalenter Anionen wie Phosphat stattfinden. LCPAs sind amphiphile Substanzen und weisen bei bereits leicht sauren pH-Werten polykationische Struktur auf. In wässriger Umgebung bilden die langkettigen Polyamine Aggregate mit positiv geladenen Oberflächen aus, die sogenannten Mikroemulsionen. Es wird angenommen, dass die repulsiven Wechselwirkungen die gebildeten Polyamin-Aggregate an einer weitreichenden Akkumulation hindern. Durch den Ausbau von Wasserstoffbrückenbindungen oder über elektrostatische Wechselwirkungen sorgen Phosphat-Anionen für die Verbrückung der

Moleküle unter Ausbildung von mikroskopischen Tröpfchen. Dieser, als Phasenseparation bezeichnete Mechanismus, wurde von SUMPER postuliert und veranschaulicht am besten den strukturdirigierenden Effekt von Polyaminen.^[122,124,125] Mikroskopische Phasenseparation, die zu Polyamin-Polyanion-reichen Mikroemulsionen führt, ist die Grundvoraussetzung für die polyamininduzierte Kieselsäurefällung. Die Polyamintröpfchen mit positiver Oberflächenladung dienen dabei als Template für die Abscheidung der Kieselsäure, wobei die Phosphatkonzentration nicht nur die Größe des Mikrotröpfchens, sondern auch die Größe der gebildeten kugelförmigen Silica-Partikel bestimmt. So konnten bei niedrigen Phosphatkonzentrationen kleinere und bei hohen größere Silica-Partikel (zwischen 30 nm bis 700 nm) detektiert werden. Bei Verwendung von Pyrophosphat bildeten sich sogar Silica-Partikel bis zu einer Größe von 1000 nm Durchmesser. Die Größenverteilung der kugelförmigen Silica-Partikel ist dabei nahezu monodispers.^[126] Neben den Phosphationen haben Sulfat, Citrat oder sogar DNA einen Einfluss auf die Kieselsäurekondensation.^[111] In Abwesenheit von Phosphat-Ionen werden kieselsäurehaltige Lösungen durch langkettige Polyamine in stabilisierte Kieselsole überführt. Zur Ausfällung vom Siliziumdioxid kommt es hierbei erst nach Zugabe von Phosphatanionen. Im Gegensatz zu den sphärischen Partikeln werden hier Platten mit Nanoporen gebildet (Abbildung 32).^[127]

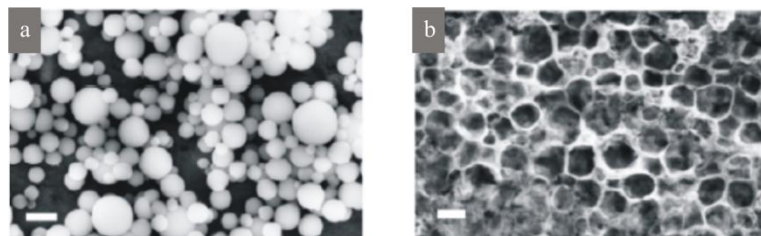


Abbildung 32: SEM-Aufnahmen der gefällten Kieselsäure mit unterschiedlichen Morphologien. Durch Zugabe von Monokieselsäure zu einer Polyamin/Phosphat-Mischung werden sphärische Silica-Partikel gebildet (a). Wird Phosphatpuffer direkt zu dem Polyamin-stabilisierten Sol zugefügt, so formt sich ein Präzipitat mit der wabenähnlichen Struktur (b). Maßstabsbalken: 1 μm .^[127]

Ein weiterer, wichtiger, in der Literatur diskutierter Einflussfaktor in Hinblick auf die Morphologie, ist der Polymerisationsgrad von Polyaminen. Die aus den Exoskeletten mariner Einzeller isolierten Polyamine, deren Kettenlängen und Zusammensetzung für jede Diatomee artspezifisch sind, zeigen ebenfalls eine Wirkung auf die Kieselsäurekondensation, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Polyamine und der Größe der aggregierten Silica-Partikel besteht.^[113] Hierfür wurden die linearen Polyamine aus der Kieselalge *Nitzschia angularis* untersucht. Die extrahierten Oligoamine wurden in zwei Fraktionen unterteilt: in eine hochmolekulare ($M = 1000$ bis 1250 g/mol) und eine niedermolekulare Fraktion ($M = 600$ bis 750 g/mol). Anschließend wurden die

Polyamin-Fractionen zu einer Phosphat-gepufferten kieselensäurehaltigen Lösung (pH 5) gegeben.

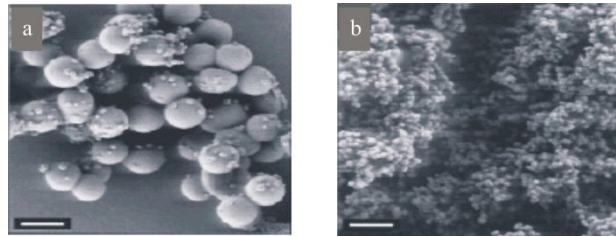


Abbildung 33: SEM-Aufnahmen der gefällten Kieselsäure mit Polyaminen aus der Kieselalge *Nitzschia angularis* (pH 5). Teilabbildung a) zeigt SiO₂-Partikel, die durch Zugabe höhermolekularer Polyamine erzeugt worden sind, b) präsentiert SiO₂-Morphologie unter Einfluss niedermolekularer Oligoamine. Maßstabsbalken: 1 µm.^[113]

Die Kieselsäure wurde als kugelförmige Silica-Partikel ausgefällt. Während die niedermolekulare Polyamin-Fraktion zu Bildung kleinerer Partikel führt (100 bis 200 nm), kann durch den Einfluss höhermolekularer Polyamine ein deutlich höherer Durchmesser ausgefallter Silica-Partikel erreicht werden (800 bis 1000 nm). Daneben entstehen aber auch einige kleinere Silica-Kugeln die an der Oberfläche der größeren Partikel angelagert sind (Abbildung 33).

Neben der Anionenkonzentration und Polyamin-Kettenlänge wurde auch die pH-Abhängigkeit erforscht. Über pH-Änderungen in einem Bereich von 5 bis 8 kann die Größe der SiO₂-Partikel ebenfalls variiert werden, wobei die Anwesenheit von Phosphatanion weiter vorausgesetzt wird.^[113,129] Für diese Untersuchungen wurde ein natürliches Polyamin-Gemisch aus der Kieselalge *Nitzschia angularis* verwendet. Abbildung 34 präsentiert unterschiedliche Morphologien ausgefallter Kieselsäure in Abhängigkeit vom untersuchten pH-Wert.

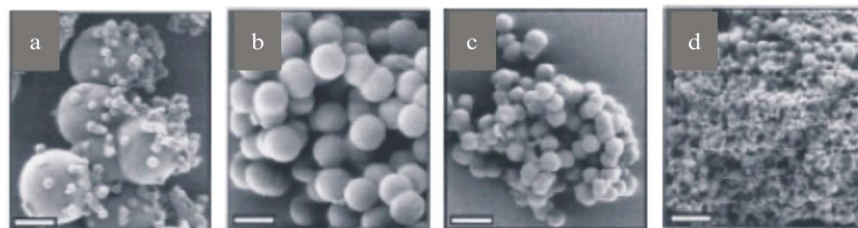


Abbildung 34: SEM-Aufnahmen der gefällten SiO₂-Partikel mit Polyaminen aus der Diatomee *Nitzschia angularis* bei unterschiedlichen pH-Werten a) pH 5,4; b) pH 6,3; c) pH 7,2; d) pH 8,3. Maßstabsbalken: 500 nm.^[113]

Eine Kontrolle über die SiO₂-Morphologie kann also über mehrere Parameter erfolgen. Nachgewiesenermaßen ist die Gegenwart von Phosphat-Anionen eine der Grundvoraussetzungen für die Fällung von Kieselsäure, aber sowohl der pH-Wert als auch die strukturellen Eigenschaften der Polyamine bzw. deren Zusammensetzung dürften bei dem Kondensationsprozess eine nicht weniger bedeutende Rolle spielen.

Wie es bereits erwähnt wurde, stellt das natürliche Silaffin-1A, bestehend aus zwei Peptiden Silaffin-1A₁ und Silaffin-1A₂, ein einzigartiges Silaffin-Gemisch dar, das dazu befähigt ist die Kieselsäure ohne eine externe Phosphatanionen-Quelle innerhalb nur weniger Minuten auszufällen.^[106,128] Diese beeindruckende Präzipitationsaktivität hat das Silaffin-1A seiner hochgeladenen zwitterionischen Struktur zu verdanken, da dieses in seiner nativen Form phosphoryliert vorliegt.

Erste Hinweise auf den Mechanismus der Kieselsäurekondensation unter dem Einfluss von Silaffin-1A konnten durch ³¹P-NMR-Experimente gewonnen werden. Dabei wurde herausgefunden, dass das native Silaffin während der Kieselsäureabscheidung in Lösung nicht monomer sondern in größeren Aggregaten vorliegt.^[106] Dieser Selbstanlagerungsprozess (*self assembly*), hervorgerufen durch die intramolekularen Wechselwirkungen zwischen kationischen Lysin-Seitenketten und den anionischen Phosphoserin-Resten, führt zu einer lokalen Anreicherung basischer Substituenten und ist neben der früher erkannten katalytischen Rolle der Amine ein wichtiger Einflussfaktor.^[129,130] Der strukturdirigierende Charakter des Silaffin-1A bei der Silifizierung lässt sich gut mit dem von SUMPER postulierten Phasenseparation-Mechanismus erklären (vgl. Kapitel 2.5). Die strukturgebende Eigenschaft bei den nativen Silaffinen wird mit der zwitterionischen Struktur erklärt, während bei den isolierten Polyaminen diese durch ihre Amphiphilie begründet wird.

In einer phasenseparierten Suspension fungieren amphiphile Silaffin-Peptide als Template für die sich bildenden Silica-Strukturen, wobei die Präzipitationsaktivität des nativen Silaffin-1A von allen posttranslationalen Modifikationen abhängig zu sein scheint.^[80b] So wird bei einem dephosphorylierten Silaffin-1A keine SiO₂-Präzipitationsaktivität *in vitro* beobachtet. Doch in Gegenwart einer externen Phosphat-Quelle wurde die entsprechende Aktivität wieder hergestellt. Das synthetische Peptid R5, welches keine posttranslationalen Modifikationen beinhaltet und der Primärstruktur des Silaffin-1A₁ entspricht, ist ebenfalls nicht in der Lage, unter leicht sauren Bedingungen Kieselsäure auszufällen. Im Basischen hingegen wird die Kieselsäurekondensation durch das R5-Peptid induziert. Eine deutliche Steigerung der Fällungsaktivität lässt sich im neutralen bis leicht basischen pH-Bereich beobachten.^[80b] Aus diesem Grund wird in dem Silaffin-1A den Seitenkettenverlängerungen vom Lysin eine besondere Rolle zugeschrieben. Auch die Tatsache, dass die Polymerisation unter physiologischen Bedingungen in den eher sauren (pH 5) Zellkompartimenten, den sogenannten *silica deposition vesicles* (SDV) stattfindet, bekräftigt die oben genannte Schlussfolgerung.^[83,131,132]

2.5 Modelle zur Polyamin- und Silaffin-induzierten Kieselsäurefällung

Basierend auf den vorgestellten Erkenntnissen wurden viele Modelle entwickelt, die die Bildung von filigran strukturierten Kieselsäureschalen sowie das komplexe Zusammenspiel der beteiligten Komponenten zu erklären versuchen. In diesem Abschnitt sollen einige dieser Modelle vorgestellt werden.

Phasenseparationsmodell nach SUMPER

Ein, dem strukturdirigierenden Effekt der Oligoamine zugrunde liegender Mechanismus, wird von SUMPER als Phasenseparation bezeichnet.^[122] Auf der Basis der bestehenden Prinzipien wurde im Jahr 2002 von SUMPER ein Modell für die Biomineralisation von Kieselsäure in Diatomeen entwickelt. Das Modell fußt auf Beobachtungen unterschiedlicher Phasen des Zellwachstums der Diatomee *Coscinodiscus walesii* und erklärt sehr anschaulich die beobachteten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Formung des Exoskelettes dieser Kieselalge (s. Abbildung 35). Darüber hinaus lässt sich anhand dieses Modells die Entstehung auch anderer Zellwandmorphologien aus der Gattung *Coscinodiscus* erklären. Allerdings beruht das SUMPERsche Modell ausschließlich auf den physikochemischen Eigenschaften der Polyamine und ist daher vor allem nur für einige Kieselalgen mit geordneter, wabenähnlicher Struktur, wie z.B. der Gattung *Coscinodiscus*, relevant.^[75,126] An dieser Stelle ist es wichtig anzumerken, dass sich ausschließlich die linearen Polyamine aus den Kieselschalen der angemerkten Gattung isolieren ließen.

In dem Phasenseparationsmodell nach SUMPER wird postuliert, dass die amphiphilen Polyamine in der Lage sind, innerhalb der SDV einen Phasenseparationsprozess einzugehen.

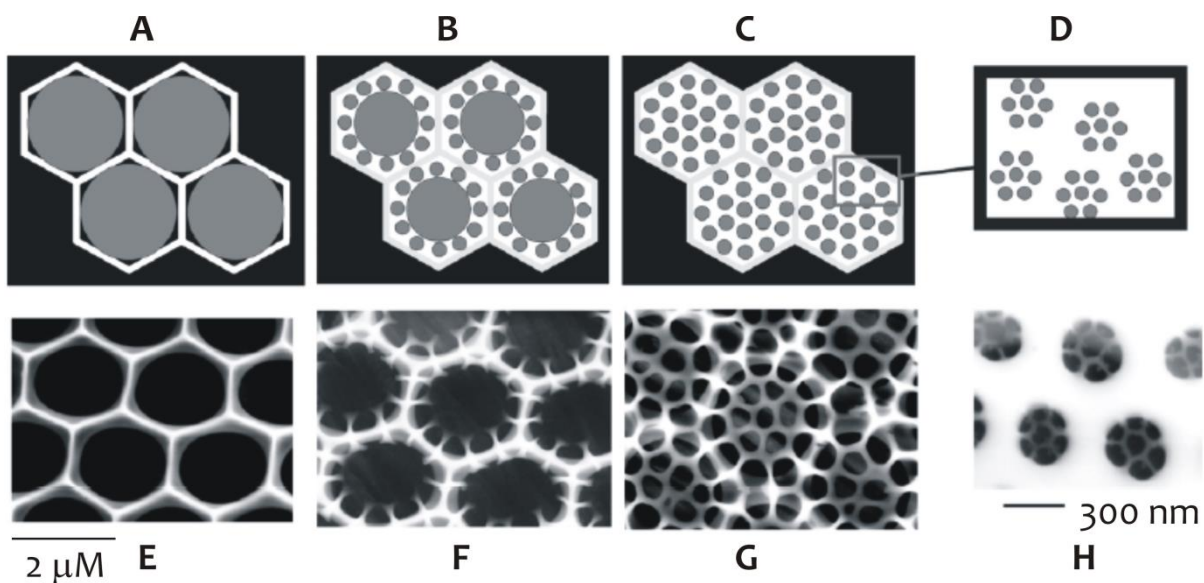


Abbildung 35: Phasenseparationsmodell nach SUMPER in Bildern (A-D) mit entsprechenden SEM-Aufnahmen (E-H), die unterschiedliche Stufen bei der Bildung des Exoskelettes von *Coscinodiscus walesii* wiedergeben.^[122]

Einleitend bildet sich einer Art Emulsion aus Mikrotröpfchen. Diese lagern sich in eine hexagonal-angeordnete Monoschicht in dem noch flachen SDV zusammen. Die hydrophile Kieselsäure befindet sich dabei in den mit Wasser gefüllten Zwischenräumen. An der Grenzflächen zwischen den Polyamintröpfchen und der wässrigen Phase erfolgt die Kieselsäurekondensation, infolgedessen eine honigwabenartige Struktur entsteht (A/E in Abbildung 35). Ein Teil der Polyamine wird dabei in das Silicat eingebaut, wodurch die Polyaminkonzentration augenblicklich gesenkt wird, was wiederum zu einer Verkleinerung der Tröpfchen führt. Beim Erreichen einer kritischen Größe kommt es zu einer Dispersion der organischen Mikrotropfen in Nanotröpfchen (B/F), an deren neuentstandenen Grenzflächen wieder Silicat abgeschieden wird. Durch die Wiederholung der beschriebenen Vorgänge kommt es letztendlich zur Ausbildung hierarchisch strukturierter Silicazellwände (CD/GH). Allerdings lässt sich anhand dieses Modells, wie es vom Autor angemerkt wird, nur ein Teil des Valvenwachstums erklären. Die Annahme, dass SiO_2 -Präzipitation in einem statischen Raum erfolgt, widerspricht den Beobachtungen eines schnellen und kontrollierten, Schalenausbildung begleitenden, Wachstums von SDV. Darüber hinaus lässt dieses Modell die Rolle von polyvalenten Anionen (wie z.B. Phosphat, Sulfat) außer Acht, die für eine schnelle Silicatabscheidung in Gegenwart von Polyaminen nachweislich unabdingbar sind. Die Anionen werden vermutlich in der wässrigen Phase vorhanden sein, jedoch wird ihr Einfluss auf den gesamten Präzipitationsprozess in diesem Modell komplett vernachlässigt. Eine Erweiterung des von SUMPER entwickelten Modells, hauptsächlich in Hinblick der bedeutenden Rolle von sauren Silaffinen, wird von KRÖGER eingebracht.^[133] Um genauere Einblicke in den Biomineralisationsprozess gewinnen zu können, müssen weitere, detailliertere Untersuchungen erfolgen, die das Verhalten von Polyaminen und Silaffinen, einzeln und in Kombination, mit und ohne Zusatz von Salzen, ausführlich beschreiben.

Mechanismus nach VRIELING

Bei dem mechanistischen Vorschlag von VRIELING *et al.* findet als erstes eine schnelle Fällung der Kieselsäure in Gegenwart von Silaffinen und Polyaminen statt.^[134] Dabei werden die organischen Komponenten vollständig in das Silica-Sol eingebaut. Die weiteren anwesenden, artspezifischen, langkettigen Peptide treten mit den einzelnen Polyamin-Silaffin-Silica-Solpartikeln in Wechselwirkung und bilden eine sogenannte Mesophase aus. Infolgedessen werden die einzelnen Partikel räumlich dichter zusammengeführt, wobei eine charakteristische Strukturierung beginnt, die hauptsächlich durch artspezifische Makromoleküle bestimmt wird. Die in der Mesophase entstandenen Aggregate führen durch weitere Verfestigung und Wachstum schließlich zur Ausbildung einer arttypischen

Schalengeometrie. Eine schematische Darstellung dieses Modells ist in Abbildung 36 gezeigt.^[151] Die langkettigen Polypeptide, die unmittelbar an der morphologischen Gestaltung teilnehmen, werden hierbei nicht näher erläutert. Nur so viel, dass diese vermutlich während der Ausbildung einer Valven-Schutzschicht nach Beendigung des Zellwachstums entfernt werden. In dem vorgeschlagenen Mechanismus wird der strukturdirigierende Einfluss der aus den Diatomeen isolierten Polyamine und Silaffine allein auf ihre Funktion bei der schnellen Fällung der Kieselsäure im Anfangsstadium reduziert. Ein möglicher struktureller Einfluss dieser Verbindungen wird aufgrund ihrer Kettenlänge ausgeschlossen. Begründet wird diese Annahme mit Ultrakleinwinkel-Röntgenstreuungsuntersuchungen von Silica-Strukturen, die beim Ausfällen von Kieselsäure mit polymerem, hochmolekularem Polyethylenimin gemessen wurden. Der von VRIELING *et al.* vorgelegte Vorschlag steht im starken Kontrast zu Untersuchungen von KRÖGER und SUMPER, wo sowohl den Polyaminen, als auch den Silaffinen strukturdirigierende Eigenschaften zugeschrieben werden.^[75a,81b,106,113,118] Für eine Etablierung dieses mechanistischen Modells ist zunächst ein Nachweis und die Charakterisierung der langkettigen Polypeptide sowie weitführende Untersuchungen hinsichtlich ihrer strukturgebenden Eigenschaften notwendig.

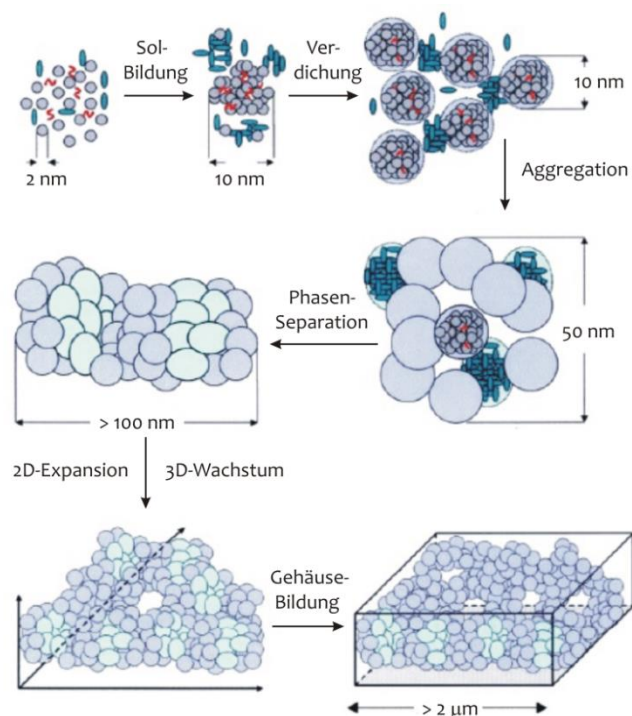


Abbildung 36: Der von VRIELING *et al.* vorgeschlagene Mechanismus für die Biomineralisation von SiO₂. Die am Präzipitationsprozess beteiligten Verbindungen (kleine Peptide und Polyamine (rote geschlängelte Strukturen), langkettige Peptide (grüne Ellipsen) und Solpartikel (graue Kugeln)) werden zunächst an einem Ort lokalisiert. Aufgrund der elektrostatischen WW kommt es zu einer schnellen Aggregation mit der vollständigen Einkapselung der Silaffine und Polyamine. Unmittelbar darauf folgt die Kondensation dieser Silicat-Polyamin-Silaffin-Aggregate zu größeren Silica-Partikeln mit Durchmessern von 50 nm. Währenddessen kommt es zur Interaktionen zwischen den Silica-Partikeln und langkettigen Peptiden. Durch Verfestigung und das weitere Wachstum in die zwei- und dreidimensionalen Richtung kommt es letztendlich zur Bildung der Diatomeenschale.^[134]

Die Silaffin-Matrix-Hypothese

Als nächstes Modell soll hier die Silaffin-Matrix-Hypothese vorgestellt werden, zu deren Entwicklung über lange Zeit hinweg viele Forscher beigetragen haben. Im weitesten Sinne stellt diese Hypothese eine Erweiterung des Phasenseparationsmodells nach SUMPER dar, die die strukturdirigierende Rolle der Silaffine zu erklären versucht. Darüber hinaus berücksichtigt diese These die Bedeutung von zytosolischen Faktoren, einschließlich des Zytoskeletts beim Aufbau der Diatomeenzellwände. Während andere mechanistische Vorschläge die Biosilifizierungsvorgänge mehr oder weniger auf einen Schwerpunkt beschränkt umschreiben, versucht die Silaffin-Matrix-Hypothese die Ereignisse der Zellwandmorphogenese in einem komplexen Zusammenhang darzulegen.

Der mechanistische Vorschlag von PATWARDHAN *et al.* den Biomineralisationsprozess zu erklären, beruht auf der Idee, dass die organischen Moleküle als Template fungieren können.^[163] Dabei spielt die Fähigkeit der Polymere, Aggregate auszubilden, eine entscheidende Rolle.^[135] Es ist seit langem bekannt, dass die Siliziumdioxidabscheidung in der unmittelbaren Nähe der SDV-Membran, dem Silicalemma, stattfindet.^[136] Dem SDV-Kompartiment wird dabei hauptsächlich eine formgebende Wirkung zugewiesen.^[137] ROBINSON und SULLIVAN konnten zeigen, dass die Prozesse der Zellwandmorphogenese außerhalb und innerhalb des SDVs nicht unabhängig voneinander ablaufen.^[138] Auch wenn die Informationskette hinsichtlich der Rolle der am Biomineralisationsprozess beteiligten Zellorganellen nicht vollständig ist, scheinen sie die Nanostrukturierung der Aggregationskeime auch außerhalb des SDVs zu beeinflussen. In dem von KRÖGER erweiterten Vorschlag wird davon ausgegangen, dass es zur Ausbildung einer phasenseparierten organischen Matrix kommt, bevor eine Interaktion mit der Kieselsäure stattfindet. Die im Zytoskelett integrierten Transmembranproteine interagieren mit den vorliegenden Silaffinen und bilden so eine stabilisierte organische Matrix, deren nanostrukturierte Ausrichtung maßgeblich von den Silaffinen bestimmt wird. Zudem wird vermutet, dass es innerhalb des SDV zu einer Wechselwirkung zwischen Silaffinen und Polyaminen (*self assembly*) kommt.^[133,137] Für die Kieselsäureabscheidung dient die organische Matrix als Templat. Der Präzipitationsprozess wird durch die Zusammensetzung und das Konzentrationsgefälle der organischen Komponente derart beeinflusst, wobei die Oligoamine einen katalytischen und die Silaffine hingegen den hemmenden Effekt ausüben, sodass auf diesem Weg eine fein strukturierte, artspezifische Silica-Morphologie entsteht (s. Abbildung 37).

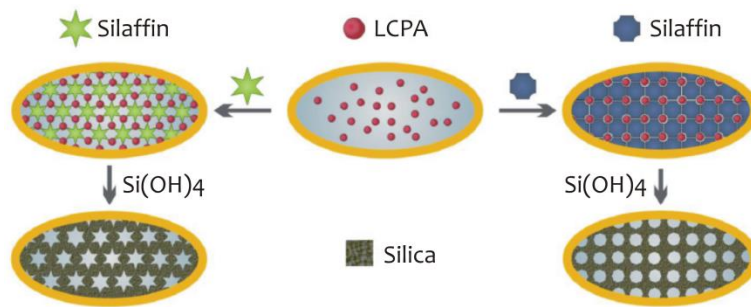


Abbildung 37: Mechanismus der SiO_2 -Präzipitation nach der Silaffin-Matrix-Hypothese. Durch die Interaktion von Silaffinen mit LCPAs im SDV wird eine Phasenseparation induziert. Die dabei entstehende organische Matrix zusammen mit dem Zytoskelett (gelbes Oval) dient als Templat für eine Silaffin-dirigierende Kieselsäureabscheidung.^[137]

Hinsichtlich der molekularen Abläufe bei der Bildung der Diatomeenschalen auf der Nanoskala werden in der Literatur zahlreiche mechanistische Modelle diskutiert, die die Ausbildung artspezifischer Strukturen erklären sollen. Die meist zitierten Thesen wurden in diesem Kapitel vorgestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im SDV ablaufenden Silifizierungsprozesse stets im Vordergrund stehen. Während das Mikro/Makromorphogenese-Modell nach GORDON und DRUM^[122,134,139,140] (hier nicht beschrieben) auf einer diffusionslimitierten Aggregation von Silica-Partikeln basiert, gehen VRIELING *et al.* von einer durch Silaffine und LCPAs dirigierte Aggregation von Silica-Nanopartikeln aus.^[134] Die strukturgebenden Eigenschaften werden hierbei den großen langkettigen Polypeptiden zugeschrieben, die nach der Silica-Bildung aus der Struktur entfernt werden. SUMPER *et al.* hingegen schlägt ein anderes Modell vor, das auf einer phasenseparierten Selbstorganisation von LCPAs beruht.^[122] Darauf aufbauend vermutet KRÖGER, dass es infolge beschriebener Phasenseparationsprozesse unter Beteiligung von Silaffinen und LCPAs zur Ausbildung einer Silaffin-Matrix kommt, die dann letztendlich für die Gestaltung der Exoskelette verantwortlich ist.^[133,137,138,141]

Die vorgestellten Modelle bieten nicht nur eine gute Grundlage für die Beschreibung molekularer Prozesse bei der Strukturierung von SiO_2 , sie offenbaren sogleich das ganze Ausmaß der Komplexität der hier zugrunderliegenden Zusammenhänge. Deshalb sind weitere systematische Untersuchungen der strukturellen Merkmale der bedeutenden organischen Komponenten in Hinblick auf die Fällungsaktivität von besonderem Interesse.

2.6 Aufgabenstellung

Die biochemischen Grundlagen der Biomineralisation von Siliciumdioxid sind bis heute nicht vollständig verstanden. Einen entscheidenden Einfluss auf diesen Prozess scheinen organische Komponenten aus der Diatomeenzellwand auszuüben. In der Gruppe isolierter organischer Makromoleküle, die in einem direkten Zusammenhang mit dem Biomineralisationsprozess

von Kieselsäure stehen, spielen Silaffine und Polyamine eine besondere Rolle. Sie sind unmittelbar an der Silica-Bildung in Kieselalgen beteiligt. Die Isolierung und Charakterisierung dieser spezifischen Biomoleküle wird als Durchbruch in der Biosilifizierungs-Forschung gefeiert, wobei die zugrundeliegenden Zusammenhänge bislang nicht vollständig verstanden sind. Es existieren bereits einige Modelle, die den in den Diatomeen vorherrschenden nano- bis mikrostrukturierten hierarchischen Aufbau unter Einfluss mehrere Parameter zu erklären versuchen, doch sie alle basieren auf idealisierten Grundlagen mit zahlreichen Vereinfachungen und sind daher nicht allgemein anwendbar. Eine besonders attraktive Möglichkeit, die zum direkten Verständnis der molekularen Grundlagen der Biosilifizierung beiträgt, besteht in der Kieselsäurekondensation in Gegenwart von organischen, aus der Natur isolierten SDA. Jedoch ist die Isolierung der Silaffine und Polyamine aus Kieselalgen sehr aufwändig, weshalb diese nur in geringen Mengen zugänglich sind. Außerdem zeichnen sich die biologischen Extrakte über eine komplexe Zusammensetzung und Mikroheterogenität aus. Daher gestalten sich die systematischen Untersuchungen zum Biomineralisationsprozess von Siliciumdioxid anhand dieser Verbindungen besonders schwierig.

Die aus der Natur extrahierten langkettigen Polyamine sowie Silaffin-Peptide liegen also oft als heterogene Gemische vor und sind aufgrund ihrer Polarität nur schwer in die einzelnen Bestandteile trennbar. Wenn solche Gemische zur Untersuchung bestimmter Parameter verwendet werden, können die experimentellen Ergebnisse nur eingeschränkt auf die zu untersuchenden Einflussgrößen hin ausgewertet und gedeutet werden. Die synthetischen Naturstoffe hingegen können in reiner Form und in Bezug auf den zu untersuchenden Parameter maßgeschneidert hergestellt werden, was den strukturdirigierenden Einfluss in Abhängigkeit von den minimalen strukturellen Veränderungen ermöglicht.

Angesichts der angesprochenen Problematik sollten im Rahmen dieser Arbeit neue effiziente synthetische Ansätze zur Herstellung von Isotopen- und fluoreszenzmarkierten Oligoaminen sowie Silaffin-1A₁-Analoga mit möglichst vielen, in dem Naturstoff vertretenen, Modifikationen entwickelt werden.

LCPCAs stellen den größten organischen Bestandteil der Diatomeenzellwand dar und sind daher wichtigste Bausteine im Biosilifizierungsprozess. Um die Rolle dieser Schlüssel-moleküle bei der Ausfällung von Kieselsäure besser verstehen zu können, sollten für die Festkörper-NMR-Untersuchungen spezifisch markierte Oligoamine hergestellt werden. Durch die Untersuchung gebildeter Silica-Nanokomposite mit integrierten isoto-penmarkierten

Polyaminen wird erhofft eine umfangreiche Analyse über quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten. Anhand synthetischer Polyamine erhofft man sich weitere Details hinsichtlich deren Einfluss auf das Präzipitationsverhalten solcher strukturgebender Eigenschaften, wie intramolekularer Aminabstand oder Kettenlänge bestimmen zu können.

Die Einzigartigkeit des natürlichen Silaffins liegt unbestreitbar in der Vielfalt seiner posttranslationalen Modifikationen (PTMs), die auch seiner physiologischen Aktivität zugrunde liegen. Da aber die Schlüsselrolle bei der Kieselsäurekondensation der Lysin-Seitenketten zugesprochen wird, liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Herstellung von verschiedenen Silaffin-Varianten mit unterschiedlichen Oligoamin-Lysin-Seitenkettenverlängerungen. In Hinblick auf die Synthese von Silaffin-Peptiden soll allerdings, aufgrund ihrer funktionellen Komplexität, zwischen den zu untersuchenden Effekten und dem synthetischen Aufwand gut abgewogen werden. Die Entwicklung neuer Methoden und Strategien an der festen Phase zur Herstellung Polyamin-basierter Seitenkettenmodifikationen steht daher in dieser Arbeit im Vordergrund. Die moderne synthetische Strategie zum Aufbau von Oligoaminen mittels SPPS eröffnet nicht nur den Zugang zu verschiedenen Aminosäuremodifikationen, die auf PTMs basieren, sondern erlaubt auch die Darstellung von verschiedenen Silaffin-Derivaten. Mit Hilfe spezifisch modifizierter Peptide soll eine systematische Untersuchung des Einflusses von Silaffin-Modifikationen auf die Silica-präzipitierende Aktivität und Morphologie des entstehenden Silica-Materials ermöglicht werden. Mit den hergestellten Silaffin-1A-Derivaten sollten anschließend verschiedene Konzepte verfolgt werden, um tiefere Einblicke in die Bildung komplexer Siliziumdioxidstrukturen zu erhalten.

Da die meisten, bislang durchgeführten *in vitro* Experimente zur chemoselektiven Silifizierung stets auf die Analyse des gebildeten SiO₂-Präzipitats gerichtet waren, sollten innerhalb dieser Arbeit Bemühungen unternommen werden, die Dynamik des Silifizierungsvorgangs mittels NMR-Spektroskopie ermöglichen. Hierzu soll aufbauend auf Vorarbeiten von FUJITA *et al.* das entsprechende ¹H-NMR-Experiment derart ausgearbeitet und an die *in vitro* Bedingungen der Kieselsäurekondensation angepasst werden, dass die Fällungsaktivität der fraglichen Verbindung direkt bestimmt werden kann. Darüber hinaus wird angestrebt, die Durchführung einer NMR-kontrollierten Konkurrenzreaktion so zu optimieren, dass ein besserer Präzipitat-Bildner in Gegenwart eines schlechteren einfach zu verifizieren ist. Mit den vorgenommenen Entwicklungen wird erhofft der Entschlüsselung eines, auch noch aus heutiger Sicht, faszinierenden Biomineralisationsprozesses von Silica einen Schritt näher zu kommen.

2.7 Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

2.7.1 Polyaminhaltige Toxine aus Spinnen und Wespen

Seit Jahrtausenden nutzt der Mensch die Wirkung unzähliger Naturstoffe als Medizin, Kosmetika oder Rauschmittel. In Hinblick auf die medizinisch wirksamen Bestandteile stellt die Naturstoffchemie ein faszinierendes Gebiet dar, und die Chemie der Giftstoffe umso mehr. Dank ihrer Vielfalt sichern die Giftstoffe beim Einsatz für die Jagd, oder viel häufiger zur Selbstverteidigung ihren Produzenten nicht nur einen evolutionären Vorteil, sondern oft das Überleben. Neben den Gefahren, die von Giften ausgehen können, stellen sie gleichzeitig eine reiche Quelle für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dar. Deshalb sind die Toxine für die Medizin von unschätzbarem Wert.

Die Wirkmechanismen der Toxine sind sehr vielfältig. Einige hemmen die Proteinsynthese oder blockieren Ionenkanäle. Andere sind dazu befähigt, eine spezifische Bindung mit Rezeptoren der Zelle einzugehen und entfalten dadurch ihre toxischen Eigenschaften. Medikamente funktionieren oft auf die gleiche Weise, weshalb die Toxine ideale Arzneistoffvorlagen sind. Einige von ihnen werden bereits bei den medikamentösen Therapien erfolgreich eingesetzt, andere sind auf dem Weg dorthin. So stammt beispielsweise das Schmerzmittel mit dem Wirkstoff Ziconotid aus dem Gift der Kegelschnecke *Conus magus* und ist seit 2006 als Medikament Prialt® der Firma *Elan Pharmaceuticals* erhältlich.^[142a,142b] Dieses bei Behandlung schwerer chronischer Schmerzen eingesetzte Medikament wirkt 1000 Mal stärker als Morphium, bringt jedoch keinerlei Toleranzentwicklung mit sich. Bis aus einem interessanten Wirkstoff allerdings ein Medikament wird, dauerte es bislang oft Jahrzehnte, denn die Gewinnung von Tiergiften ist nach wie vor sehr mühsam. Aus diesem Grund konzentrieren die Wissenschaftler ihre Arbeit zunehmend auf die Synthese und Pharmakologie der synthetischen Toxin-Analoga.

Erstaunlich ist nicht nur die Wirkungsvielfalt von Tiergiften, sondern ebenso ihre Vielfalt in der chemischen Struktur. Neben den weit verbreiteten Peptiden und Proteinen finden sich biogene Amine, Heterocyclen, Alkaloide, Terpene und Steroidglykoside als wirksame Bestandteile. Die Polyamin-Toxine von Spinnen und Wespen hinsichtlich der Aufklärung ihrer chemischen Konstitution gehören zu den intensiv erforschten Verbindungsklassen. Die meist verbreiteten Vertreter aus dieser Stoffklasse sind vermutlich die Polyaminamide.^[143a] Um den allgemeinen Aufbau der Polyamin-Toxine zu verdeutlichen, wurde Argiotoxin⁶⁵⁹ gewählt, welches aus mehreren Arten der Gattung *Argiope* isoliert wurde (s. Abbildung 38).^[7]

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende
Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

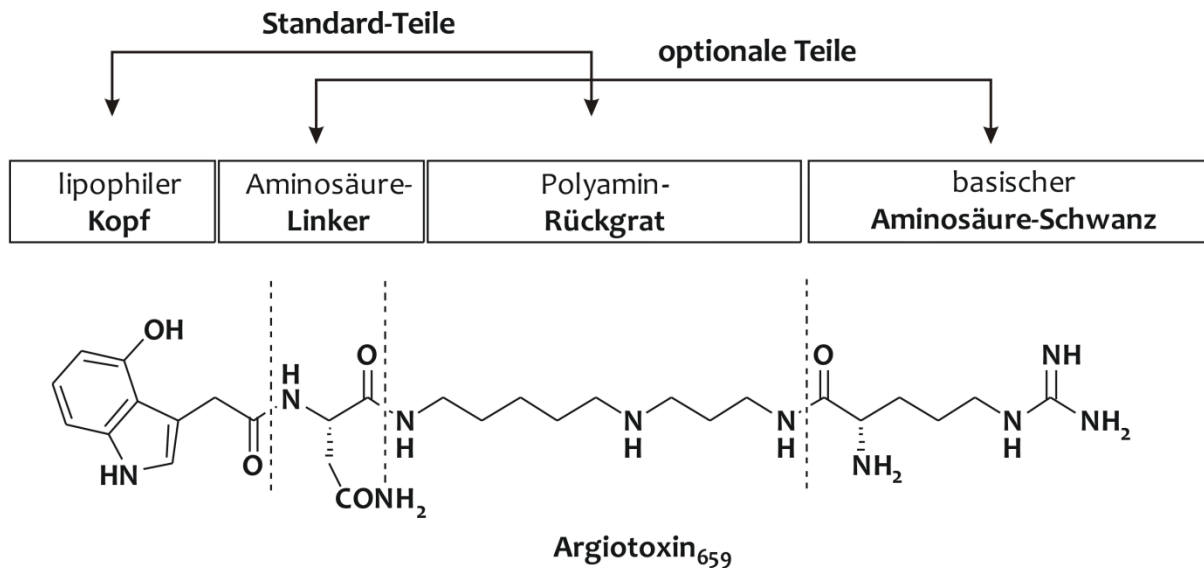


Abbildung 38: Generelles Strukturmotiv der Spinnen- und Wespen Polyaminamid-Toxine, am Beispiel von Argiotoxin₆₅₉.^[7]

Argiotoxin₆₅₉, ebenso wie die zahlreichen anderen niedermolekularen Vertreter der Polyamin-enthaltenden Neurotoxine, ist zusammengesetzt aus einem konstanten aromatischen Teil, einer oder mehreren variablen Aminosäuren und einem Polyamin-Kernstück. Somit weisen die Polyamin-Toxine ein hohes Maß an struktureller Ähnlichkeit vor, wobei die konstante Präsenz des Polyamin-Rückgrats auf seine besonders wichtige Rolle hindeutet. Das Interesse an diesen Acylpolyaminen ergibt sich aus ihrer Fähigkeit als potente Antagonisten der Glutamat-Ionenkanal-Rezeptoren von Säugern zu agieren (s. Kapitel 1.1.4). Zusammen mit exogenen Aminen sind die Polyamidamide in der Lage, als Modulatoren für die Liganden-kontrollierten Transmembranproteine (AMPA-, NMDA- Kainat-Rezeptoren) zu fungieren, indem sie starke spannungsabhängige kanalblockierende Eigenschaften aufwiesen. Die Charakterisierung von Polyamin-Interaktionen mit Transmitter-Rezeptoren kann wichtige Aufschlüsse für Therapie oder Prävention von Neurotoxizität, Epilepsie und neurodegenerative Erkrankungen geben.^[52,53,54] Es wird generell zwischen vier verschiedenen Klassen von Spinnen- und Wespen-Toxinen, bezogen auf Polyamin-verwandte niedermolekulare Strukturen, unterschieden (s. Tabelle 3).

Einige bekannte Vertreter dieser Substanzklasse werden aus dem Gift einer immer größer werdenden Zahl von Spinnen und Wespen isoliert. Besonders aus Arten der Genera *Argiope*, *Araneus* (Familie der *Araneidae*, Radnetzspinnen), *Nephila* (Familie der *Nephiliade*, Seidenspinnen) und aus den tropischen Gattungen *Agelenopsis* und *Hololena*. Die Wespe *Philanthus triangulum* (Familie der *Crabronidae*, Grabwespen) ist eine Quelle für Philanthotoxine. Diese Gifte sind in der Regel komplexe Mischungen von Aminosäuren, großen proteinogenen Toxinen (< 300 Da) und kleineren Polyamin-Derivaten.^[7]

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

Tabelle 3: Die vier unterschiedlichen Polyamin-basierten Klassen der Spinnen- und Wespen-Toxine.

Klassifizierung	Beispiele
Argiotoxin-Derivate	Argiotoxin ₆₃₆ , Argiopinin ₃
Joro Spinnen-Toxin	JSTX, JSTX-3, Biotinyl-JSTX-3
α -Agatoxine	α -Agatoxin, Agel ₄₈₉ , Agel ₅₀₅
Philanthotoxine	PhTX, PTX433, PhTX343

Wie bereits erwähnt, enthält jedes Acylamin-Toxin eine feste Polyamin-Einheit, die über eine Amidbindung an einem aromatischen Rest gebunden ist; diese besteht hauptsächlich aus 2,4-Dihydroxyphenylacetyl, *N*-buturyl-tyrosin oder Indol-3-acetyl-Elementen. Bei den Polyaminamid-Toxinen handelt es sich aufgrund ihrer spezifischen Bindungsaffinität gegenüber Transmitter-Rezeptoren um hoch toxische Substanzen. Diese sind im Gegensatz zu einigen freien Polyaminen (Spermin, Spermidin) schon im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich in der Lage, den Einstrom von Kationen durch den Ionenkanal des NMDA-Rezeptors spannungsabhängig zu inhibieren. Diese kanalblockierenden Eigenschaften werden oftmals mit einer Bindungsstelle für Polyamine in Zusammenhang gebracht, die sich nahe der externen Mündung des Ionenkanals befinden soll. Aromatische Strukturelemente binden an die hydrophobe Tasche, während die positiv geladene Polyamin-Einheit mit nukleophilen Carbonyl- und Hydroxylfunktionen innerhalb des Ionenkanals in Wechselwirkung tritt.^[143b] In Abbildung 39 sind die bekanntesten Vertreter der Polyamin-Toxine dargestellt. Nach dem heutigen Wissensstand wird davon ausgegangen, dass Polyamine in der Lage sind, sowohl stimulierende als auch inhibierende Wirkungen auf die Transmitter-Rezeptoren auszuüben, wobei unterschiedliche Modulierungsmechanismen diskutiert werden.^[143c] Für die Untersuchung von Polyamin-Bindungsstellen werden häufig synthetische Naturstoff-Derivate verwendet. Durch die stetig wachsenden Hinweise hinsichtlich der vielfältigen pharmakologischen Aktivität der polyaminhaltigen Naturstoffe wächst das Interesse der Wissenschaftler an der Entwicklung effizienter Synthesestrategien für die entsprechenden Wirkstoffe, die als potentielle Vorlage für die Entwicklung neuer Medikamente in Frage kommen.

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

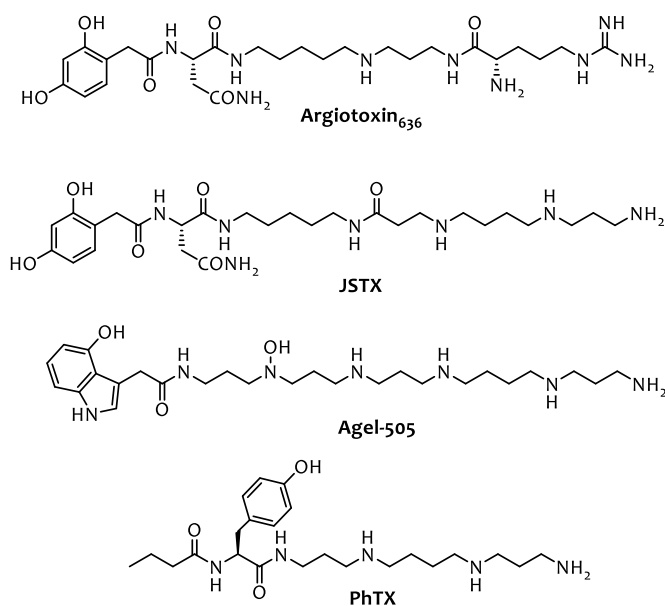


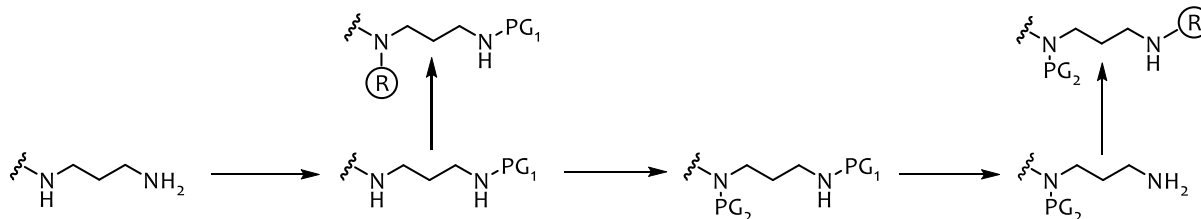
Abbildung 39: Beispiele für Polyamin-verwandte Spinnen- und Wespen-Toxine.

Für eine Vielzahl der Polyamin-Derivate aus Spinnen- und Wespengiften sind diverse Synthesen in der Literatur beschrieben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Chemie von der Festphasenpeptidsynthese profitiert, insbesondere hinsichtlich der Anwendung unterschiedlicher Schutzgruppen. Probleme bereitet eher die Herstellung Polyamin-basierter Untereinheiten. Die Synthese eines zweckmäßig geschützten Polyamin-Rückgrats kann sich in vielerlei Hinsicht als mühevoll erweisen.

2.7.2 Schutzgruppenstrategien in der Synthese ausgewählter Polyamin-Derivate

Da es sich bei Polyaminen oft um polyvalente Moleküle handelt, erfordert ihre Derivatisierung gut überlegte Synthese- und Schutzgruppenstrategien. Eine selektive Schützung gewählter Funktionen, die einer gezielten Reaktion in der Regel vorausgeht, stellt häufig eine synthetische Herausforderung dar. Es gibt nur wenige Möglichkeiten zu einer direkten Derivatisierung bestimmter Funktionalitäten innerhalb eines Polyamins. Für die selektive Modifizierung eines primären Amins in Gegenwart von einer einzigen sekundären Aminofunktion ist es notwendig, diese beiden Funktionalitäten zuerst orthogonal zu schützen, um anschließend das gewünschte Amin für die bevorstehende Modifikation selektiv freizusetzen (Schema 6). Je nachdem, wie viele und wie unterschiedlich die vorliegenden Aminofunktionen sind, kann die Schutzgruppenstrategie und somit der Synthesepfad beliebig kompliziert ausfallen.^[144a,144b]

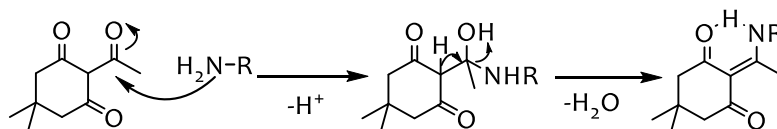
Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze



Schema 6: Schematische Darstellung einer selektiven Schützung (PG- protecting group) mit anschließender Derivatisierung zweier unterschiedlicher Aminofunktionen.

Bei der Polyamin-Synthese werden zahlreiche Amin-Schutzgruppen eingesetzt, die auch in der Festphasenpeptidsynthese ihre Anwendung finden. Hierzu zählen solche Schutzgruppen wie die Butyloxycarbonylgruppe (Boc), die Allyloxycarbonylgruppe (Aloc), die Triphenylmethylgruppe (Trityl), Phthaloyl-Gruppe (Pht), die *p*-Nosyl-Gruppe (Ns) und mit Einschränkungen die 9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl Gruppe (Fmoc).^[145a] Aber nur wenige von ihnen schaffen es, die besonders hohen Anforderungen an der selektiven Polyamin-Chemie zu erfüllen.

Die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Aminen bei der Einführung einer bestimmten Schutzgruppe kann über die Stöchiometrie in einem gewissen Maß gesteuert werden.^[145b-e] Ihre Selektivität ergibt sich zum einen aus sterischen Eigenschaften der Schutzgruppe und zum anderen durch die kinetisch bevorzugte Reaktion der primären im Vergleich zur sekundären Aminofunktion. Eine andere Art der Selektivität wird bei der Schützung primärer Amine mit Dde-oder TFA-Schutzgruppen beobachtet (Schema 7).



Schema 7: Die Schützung eines primären Amine mit 2-Acetyldimedon (Dde-OH). Das geschützte Amin wird durch eine Wasserstoff-Bindung in einem sechsgliedrigen Ring stabilisiert.

In diesem Fall werden die einfach geschützten primären Amine durch Wasserstoffbindungen derart stabilisiert, dass es zügig zu einer selektiven temporären Inaktivierung primärer Amine kommt.

Bei den zahlreichen Alkylierungsverfahren unter Verwendung von spezifischen Schutzgruppen werden häufig Z-, Pht- oder Tosyl-Gruppen eingesetzt.^[146a-d] Auch die Benzyl-Gruppe kann aufgrund des sperrigen Phenylrestes als eine Schutzgruppe für primäre Amine fungieren. Das generierte sekundäre Amin wird dabei gewöhnlich anschließend mit einem Elektrophil in Gegenwart schwacher Basen in einer einfachen S_N2-Reaktion umgesetzt. Nach dem Entschützen wird das sekundäre Amin selektiv erhalten. Die Abspaltung der säurelabilen

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

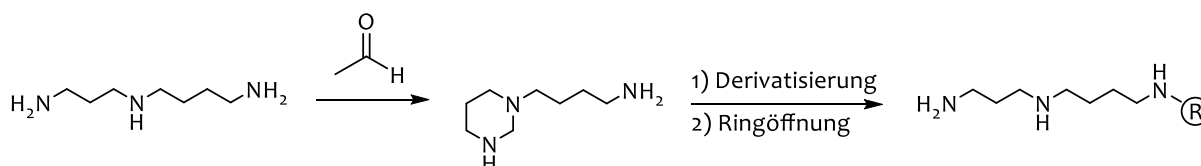
Z-Gruppe benötigt relativ harsche Bedingungen, so dass sie nur selten mit den üblicherweise in der SPPS verwendeten Harzen kompatibel ist.

Die Pht- und vor allem die Nosyl-Schutzgruppe spielen dagegen bei der Herstellung diverser Polyamine und Polyamin-Derivate eine Schlüsselrolle.^[145a,147a-c] Nach einer relativ milden Entschützung mit Hydrazin bzw. Thiolen werden die freigesetzten Amine selektiv erhalten. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über einige wichtige Schutzgruppen sowie die geeigneten Bedingungen ihrer Abspaltung.

Tabelle 4: Führende Schutzgruppen, die bei Polyaminsynthese häufig angewendet werden.

Schutzgruppe	Entschützungsbedingungen
Z, Boc, Trt, MMTr, DMTr	Sauer (TFA pur, HCl in EtOAc, H ₂ SO ₄ in Dioxan)
Tfa, Fmoc	Basisch (20–50% Piperidin in DMF)
Aloc	übergangsmetallkatalysierte Spaltung Pd ⁰ , Ni ⁰
o-Nosyl, p-Nosyl, d-Nosyl	Thiole
Dde, Pht	Hydrazin(N ₂ H ₄ *H ₂ O)
Teoc	Flusssäure (HF)

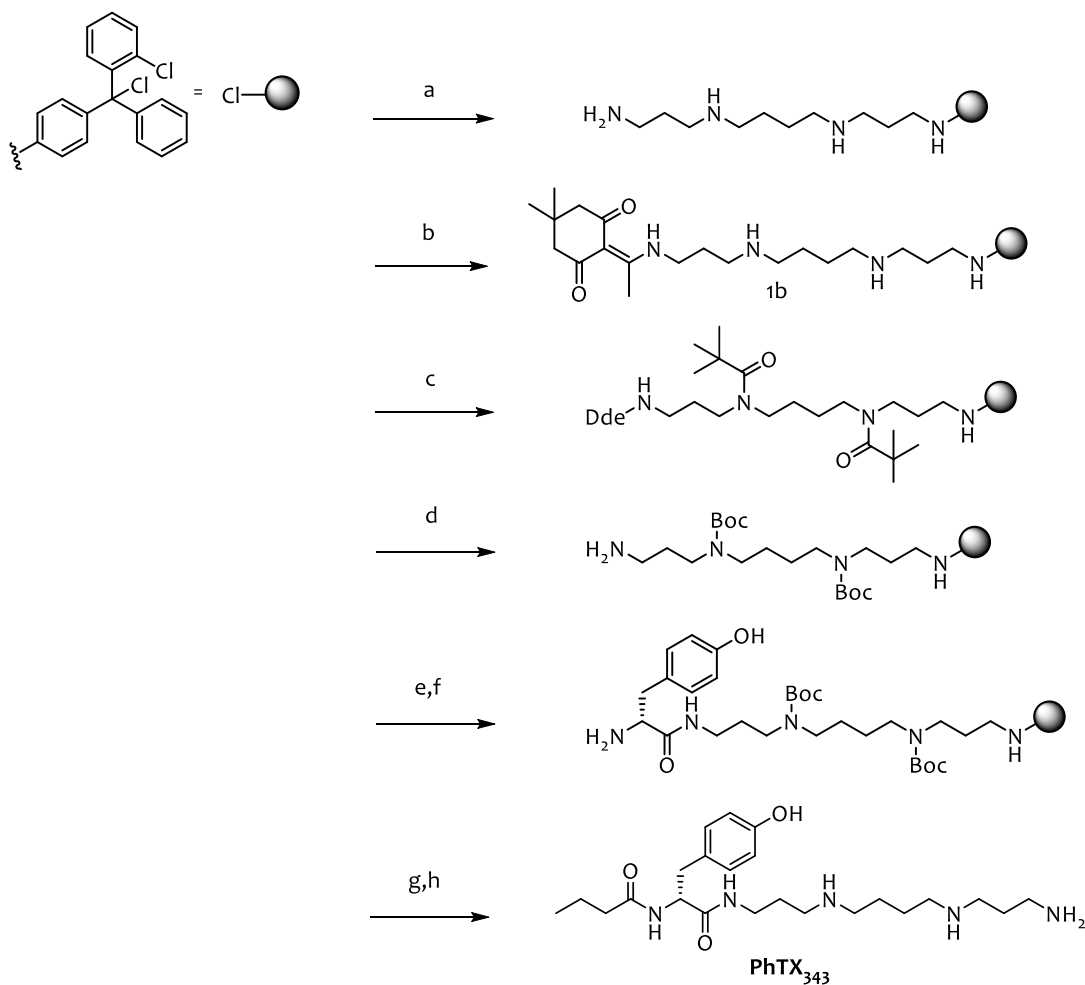
Auch ungewöhnliche Schutzgruppen finden in der Polyamin-Chemie ihre Anwendung. Die reversible Reaktion einer 1,3-Diaminopropyl-Einheit mit Formaldehyd im Beisein von anderen Diamin-Fragmenten führt zur selektiven Bildung eines Aminals. Diese Reaktion ist ein wertvolles Werkzeug zur Funktionserweiterung solcher unsymmetrischer Polyamine wie Spermidin. Da es sich beim Ringschluss um eine reversible Reaktion handelt, wird diese als pseudo-selektiver Schutz angesehen.^[148a,b]



Schema 8: Schematische Darstellung einer selektiven Differenzierung zwischen der 1,3-Diaminopropyl-Gruppe und einer längeren Amino-Butyl-Struktureinheit. Die 1,3-Diaminopropyl-Gruppe bildet ein Aminal unter Erhöhung des Alkylierungsgrades beider an dem Ringschluss beteiligter Amine.^[148a,b]

2.7.3 Herstellung Polyamin-Toxine an der festen Phase

Eines der ersten Beispiele für die Synthese niedermolekularer Polyamin-basierter Toxine an der festen Phase ist in der Arbeit von BYCROFT *et al.* 1996, veröffentlicht (s. Schema 9).^[148c] Hier wurde die Darstellung des synthetischen Philanthotoxin-PhTX₃₄₃ beschrieben. Als Startpunkt wurde das Beladen des unmodifizierten Spermins an das 2-Chlortritylchlorid-Harz gewählt. Die Verwendung von Dde- und Boc-Gruppen ermöglichen selektiv differenzierte Schützung zwischen primären und sekundären Aminen. Da keine Spuren des *Bis*-Dde-Spermin im Rohprodukt (1b) nachgewiesen werden konnten, wurde davon ausgegangen, dass der Trityl-Linker ebenfalls als eine selektive Schutzgruppe für primäre Amine darstellt.

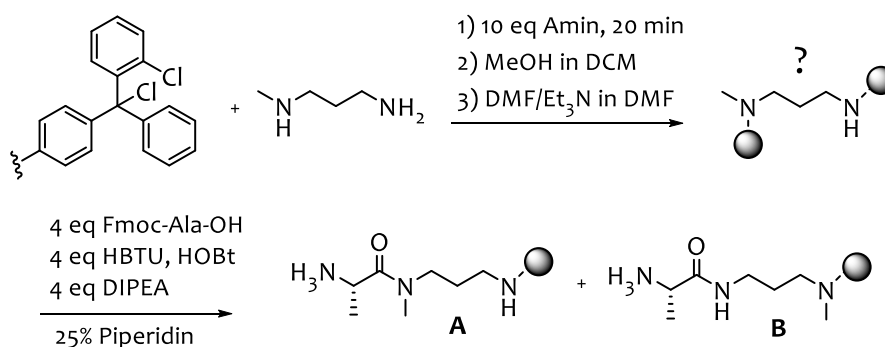


Schema 9: Synthese vom PhTX₃₄₃ unter Verwendung von Dde- und Boc-Schutzgruppen. Reaktionsbedingungen: a) Spermin, CH₂Cl₂, b) 2-Acetyldimeton, DMF; c) Boc₂O, DIPEA, d) 2% N₂H₄ in DMF, e) Fmoc-L-Tyr (O^tBu)-OH, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF, f) 20% Piperidin in DMF, g) Buttersäure, HBTU, HOBT, DIPEA in DMF, h) TFA, /¹Pr₃SiH/H₂O.^[148c]

Dieses Beispiel zeigt eindeutig, dass die primären Amine zumindest bei der Beladung auf das 2-Chlortritylchlorid-Harz eine viel höhere Reaktivität im Vergleich zu sekundären Aminofunktionen aufweisen. Einer der Hauptgründe für diesen auffallenden Unterschied in der Reaktionsfreudigkeit ist vermutlich die Sterik. Um feststellen zu können, inwieweit die

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

sterischen Effekte die Reaktivität unterschiedlicher, nebeneinander vorliegender Funktionalitäten beeinflussen, soll die Harzbeladung mit polyfunktionellen Aminen genauer untersucht werden. Sollte es gelingen, die Reaktivität und somit die Selektivität in gewissem Maße zu steuern, so kann es möglich sein, in Bezug auf die Schutzgruppenauswahl weniger aufwendige Synthesemethoden vorzuschlagen. Die Reaktivitätsreihe der Amine wurde anhand zahlreicher Reaktionen in Lösung ausführlich untersucht, allerdings gibt es nur wenige aufschlussreiche Beispiele über eine selektive Anbindung oder gar Derivatisierung multifunktionaler Amine an der festen Phase. Um detaillierte Einblicke in diese Problematik zu bekommen, wurde eine Reihe experimenteller Versuche durchgeführt. Als erstes wurde anhand eines bifunktionellen Diamins in einer Konkurrenzreaktion dessen Regioselektivität bestimmt. Hierfür wurde das *N*-Methyl-1,3-Diaminopropan auf das 2-Chlortritylchlorid-Harz unter Standardreaktionsbedingungen (s. Abschnitt 5.2.4) beladen. Um die Struktur des gebundenen Amins zu fixieren, wurde das beladene Amin anschließend mit einem Überschuss an Fmoc-Ala-OH unter Standardkupplungsbedingungen umgesetzt.



Schema 10: Versuch zur Bestimmung der Regioselektivität des *N*-Methyl-1,3-Diaminopropan.

Nach dem Abspalten der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe und finalen Abspaltung vom Harz wurde das gebildete Produkt *via* ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert.

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

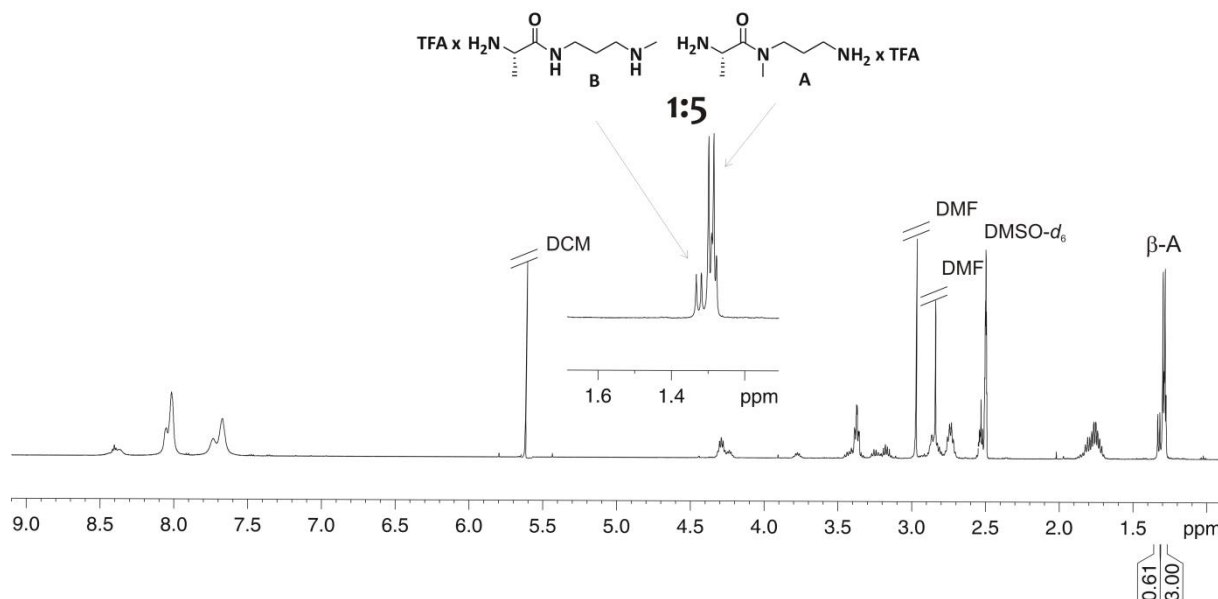


Abbildung 40: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) zur Bestimmung des Stoffmengenverhältnisses des im Rahmen einer regioselektiven Beladung von *N*-Methyl-1,3-Diaminopropan an das Harz isolierten Gemisches. Für die Berechnung des Stoffmengenverhältnisses wurden Integrale der β-Ala-Signale der Verbindungen A und B verwendet.

Dabei stellte sich heraus, dass es sich um ein Gemisch handelt. Für die Berechnung des Stoffmengenverhältnisses, empfiehlt sich ein Vergleich der Integrale (s. Abbildung 40), wobei die β-Ala-Signale hierfür am besten geeignet waren. Wie aus Abbildung 40 ersichtlich wird, handelt es sich bei der Aminbeladung an das CTC-Harz um eine bevorzugte Schützung der primären Aminofunktion durch den Trityl-Linker. Zwar ist das Verhältnis der entstandenen Produkte nicht optimal, möchte man darauf aufbauend eine Synthesestrategie entwickeln, dennoch lässt sich anhand dieses Beispiels eine deutliche Tendenz der Regioselektivität erkennen. Für die weiteren Reaktivitätsuntersuchungen der polyvalenten Amine wurde das *Bis*(3-aminopropyl)amin gewählt. Es handelt sich dabei um ein Triamin, das über zwei terminale primäre und eine interne sekundäre Aminofunktion verfügt. Im Unterschied zum erst untersuchten *N*-Methyl-1,3-Diaminopropan, ist die sekundäre Aminofunktion im *Bis*(3-aminopropyl)amin durch zwei gleich große, sperrige Alkylreste abgeschirmt, was die ohnehin weniger reaktive Funktion noch zusätzlich an einer Bindung hindern dürfte. Des Weiteren enthält das noch zu untersuchende Triamin zwei primäre Aminofunktionen, welche die Regioselektivität schon allein aufgrund des vorteilhaften Verhältnisses zu ihren Gunsten beeinflussen können. Beim nächsten Experiment wurde das *Bis*(3-aminopropyl)amin, auch als Norspermidin bekannt, unter Standardreaktionsbedingungen an das 2-Chlortritylchlorid-Harz (CTC-Harz) gebunden. Um die regioselektive Anbindung dieses Triamins festzuhalten, wurde dieses im darauf folgenden Schritt mit einem Überschuss an Dde-OH behandelt.

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

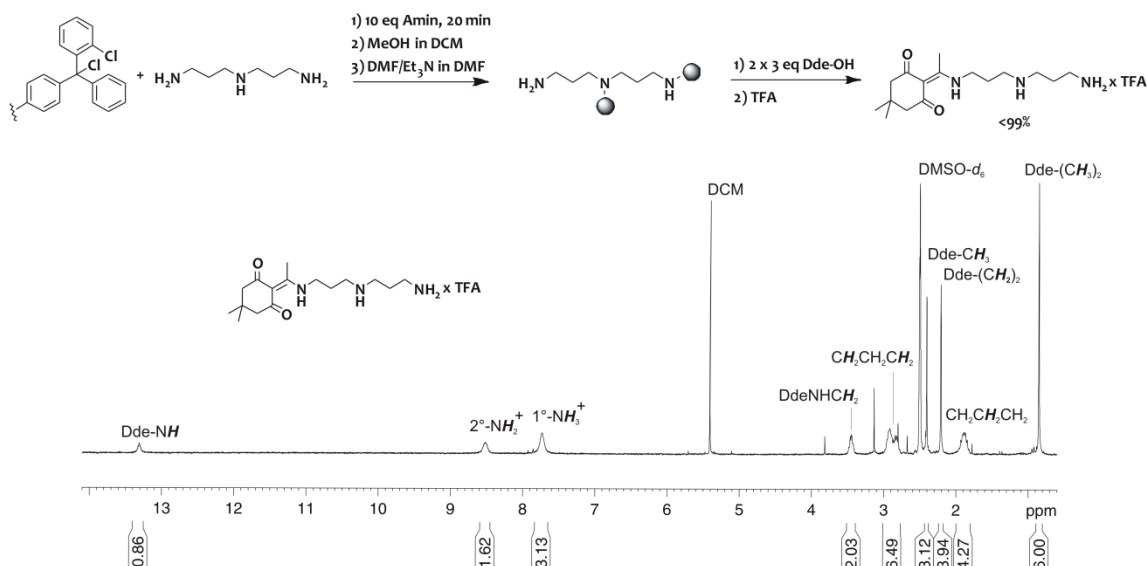


Abbildung 41: Regioselektive Beladung des Bis(3-aminopropyl)amins an das 2-Chlotriptylchlorid-Harz mit entsprechendem ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-d₆, 300 K) des einfach Dde-geschützten Norspermidins, das als einziges Produkt isoliert wurde.

Da diese Schutzgruppe ausschließlich zur selektiven Maskierung primärer Amine dient, darf nach einer erfolgreichen regioselektiven Harzbeladung über ein primäres Amin im Rohprodukt kein Bis-Dde-Norspermidin nachzuweisen sein. Ergebnisse dieses Experimentes sind der Abbildung 41 zu entnehmen. Der Triptyl-Linker scheint also zumindest bei sterisch anspruchsvolleren bifunktionellen Aminen selektiv an das primäre Amin zu binden und übt gleichzeitig eine schützende Funktion aus. Dieser regioselektive Effekt steht im Einklang mit bisher publizierten Beobachtungen.^[148c,d,e]

Mit weiteren Konkurrenzexperimenten soll festgestellt werden, in welchem Ausmaß die sekundären Amine in Gegenwart von primären Aminofunktionen acyliert werden. Hierfür wurde die bereits beschriebene Reaktion der selektiven Beladung des Norspermidin auf das CTC-Harz (s. Abbildung 41) fortgesetzt. Für die anschließende Acylierungsreaktion wurde die Kupplung von Fmoc-Ala-OH und Standardkuppelungsbedingungen gewählt. Es hat sich herausgestellt, dass das sekundäre Amin bei der durchgeführten Acylierung ein schwaches Nukleophil darstellt. Hauptsächlich wird hierbei das terminale primäre Amin acyliert. Auch wenn das Rohprodukt als Gemisch isoliert wurde, drückt das beobachtete Produktverhältnis (C/D-1:10) eine relativ hohe Regioselektivität aus (s. Abbildung 42).

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

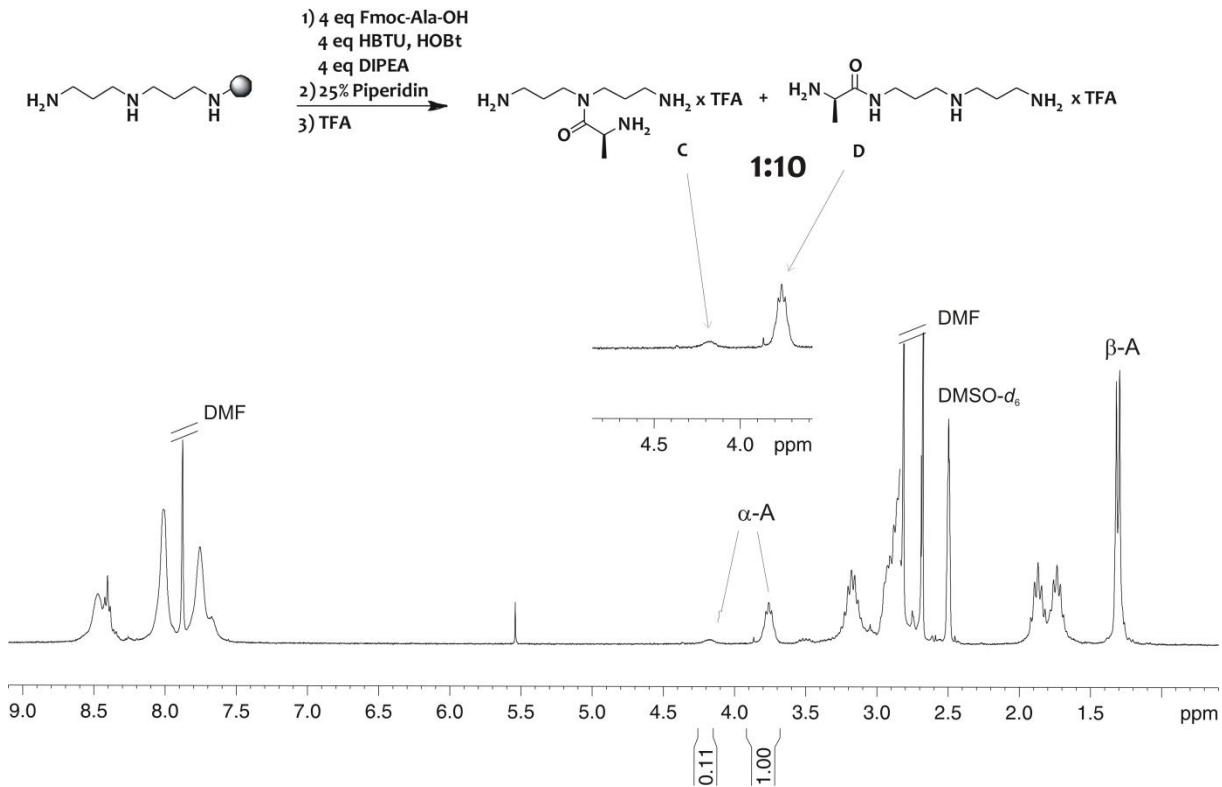


Abbildung 42: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) zur Bestimmung des Stoffmengenverhältnisses des im Rahmen einer regioselektiven Acylierung von Bis(3-aminopropyl)amin mit Fmoc-Ala-OH isolierten Gemisches. Für die Berechnung des Stoffmengenverhältnisses wurden Integrale der α -Ala-Signale von Verbindungen C und D ausgewählt.

Für die beobachtete Regioselektivität an der festen Phase scheinen in erster Linie sterische Effekte eine entscheidende Rolle zu spielen.

Bezogen auf Amine lässt sich in Lösung ein Zusammenhang zwischen den die Reaktivität beeinflussenden Größen wie Basizität und Nucleophilie feststellen. Obwohl es sich bei der

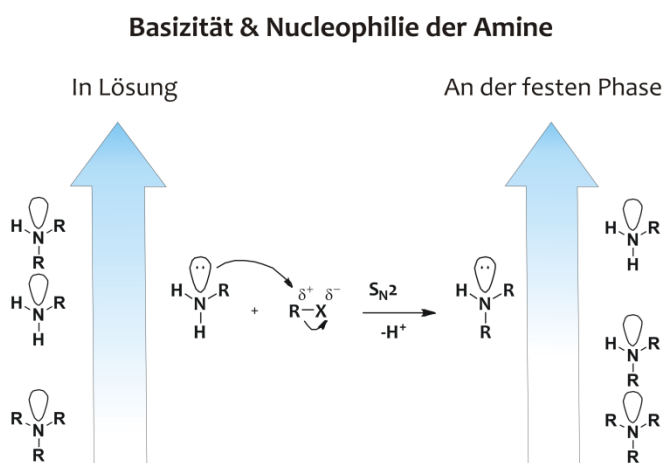


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Reaktivitätsreihen der einfachen Amine bei einer nucleophilen Substitution ($\text{S}_\text{N}2$) in Lösung und an der festen Phase.

Basizität um eine thermodynamische und bei Nucleophilie hingegen um eine kinetische Größe handelt, korrelieren diese doch recht häufig miteinander. Der Zusammenhang zwischen Basizität und Nucleophilie wird deutlich, wenn man bedenkt, dass sowohl bei der nucleophilen Substitution als auch in einer Säure-Base-Reaktion das Reagenz (in unserem Fall ein Amin) als Elektronendonator fungiert. Das heißt,

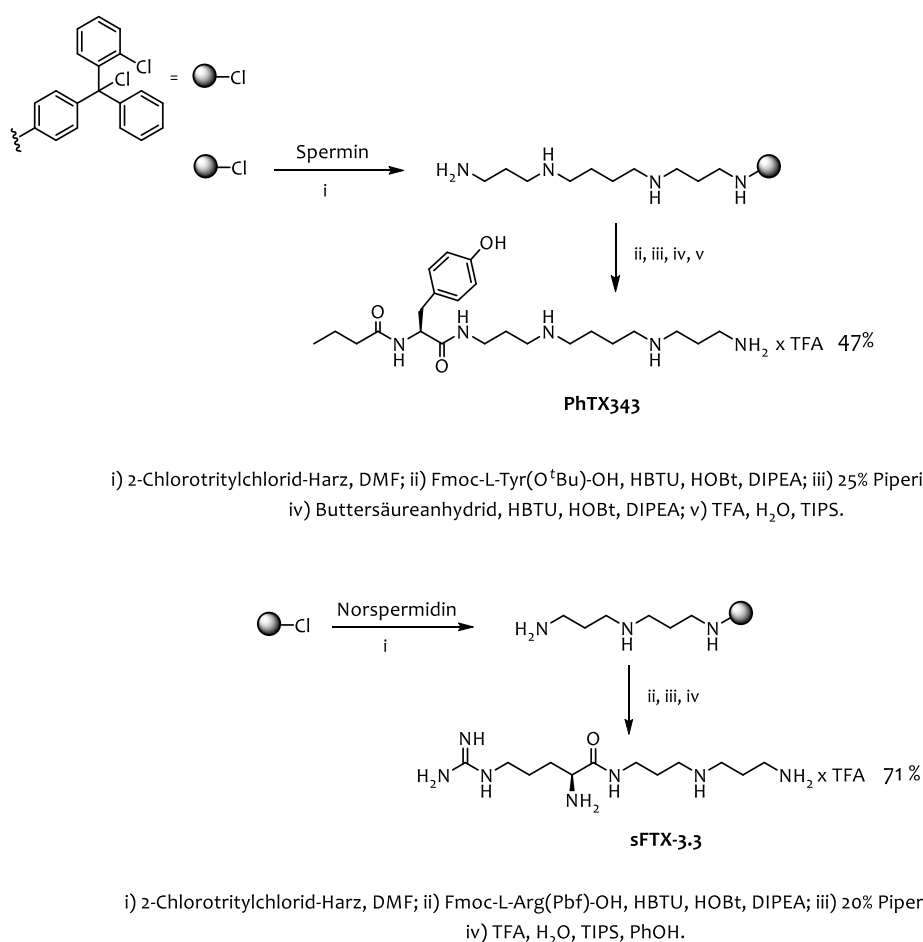
je basischer die Substanz ist, desto größer auch der nukleophile Charakter. So stehen Basizität und Nukleophilie in einem direkten Verhältnis zueinander. Doch bleibt dieses Verhältnis auch in Lösung nicht immer ganz eindeutig.

Die beiden Größen lassen sich generell durch den induktiven Effekt der elektronenliefernden Alkylgruppen positiv beeinflussen. So sind die Amine basischer als Ammoniak, weil die Alkylsubstituenten die Elektronendichte am Stickstoffatom erhöhen. Bei mehreren Alkylgruppen ist der Einfluss vor allem auf die Nukleophilie entsprechend komplizierter. Diese Tendenz wird bei tertiären Aminen durch einen sterischen Effekt teilweise wieder aufgehoben. Einen weiteren Einfluss auf Basizität und Nukleophilie können zudem Polarisierbarkeit und nicht zuletzt das Lösungsmittel ausüben. Man kann nachweisen, dass hoch polarisierbare Nukleophile häufig reaktiver sind als Nukleophile gleicher Basizität. In aprotischen Lösungsmitteln korreliert die Nukleophilie einer Substanz gut mit ihrer Basizität.^[149] Trotz dieser komplexen Zusammenhänge zeigt sich bei einer nukleophilen Substitution ein erkennbarer Trend in der Reaktivität der Amine: handelt es sich um kleine Alkylreste so wird die Reaktivitätsreihe von sekundären Aminen angeführt, gefolgt von primären Aminen, die je nach Reaktionsbedingungen mit sekundären Aminen konkurrieren können. Dem schließen sich die tertiären Amine an, die sehr selten als Nukleophile, dafür aber umso öfter als Basen fungieren.^[149] An der festen Phase scheint die Nukleophilie maßgeblich von der Sterik beeinflusst zu sein. Die raumgreifenden Substituenten des ohnehin im Zwei-Phasen-System schwer zugänglichen sekundären Stickstoffatoms schirmen dieses zusätzlich ab und unterbinden so einen nukleophilen Angriff. Zwar wird durch die Anwesenheit mehrerer Alkylgruppen die Basizität des Stickstoffatoms erhöht, für die Nukleophilie spielt jedoch dieser Effekt nur eine untergeordnete Rolle, im Gegensatz zur Sterik, die hier einen entscheidenden Einfluss zu haben scheint (s. Abbildung 41 und Abbildung 42). Die gewonnenen Erkenntnisse sowie die aus der Literatur bekannten Effekte bezüglich der Basizität und Nukleophilie der Amine^[149] sind in Abbildung 43 veranschaulicht.

Die oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen Reaktivität und Nukleophilie dürften um einiges komplexer aussehen, wenn Reaktionen an einem polyfunktionellen Oligoamin durchgeführt werden. Durch die oben aufgeführten Beispiele konnte sowohl anhand eines Diamins (*N*-Methyl-1,3-Diaminopropan, s. Abbildung 40) ähnlich wie bei einem Triamin (Norspermidin, s. Abbildung 42), eine relativ hohe Selektivität nicht nur bei der Acylierung sondern auch bei der differenzierten Schützung dieser Polyamine durch das CTC-Harz zugunsten der primären Aminofunktion festgestellt werden. Darauf basierend geben die

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

gewonnenen experimentellen Erkenntnisse Anlass zur Realisierung einer verkürzten Synthese-Strategie für die Herstellung einiger einfacher Polyamin-Konjugate an der festen Phase. Dieser Synthesepfad sieht außer der regioselektiven Anknüpfung eines Polyamines an das Harz keine Verwendung an weiteren selektivitätslenkenden Gruppen vor. Das bedeutet, dass jede potentielle reaktive Stelle in einem Polyamin alle Reaktionsschritte bis zu hin zu der finalen Harzabspaltung durchläuft, ohne vorher mit einer temporären Schutzgruppe versehen worden zu sein. Diese Synthesestrategie wurde für zwei, proteinogene, Polyamin-basierte Gifte aus der Familie der Philanthotoxine angewandt: PhTX₃₄₃, einem wirksamen Analogon des Wespen-Toxins PhTX₄₃₃ und sFTX-3.3, dem Vorläufer eines effektiven Calciumkanalblocker-Toxins FTX-3.3. Das entsprechende Syntheschema zur Herstellung dieser beiden Verbindungen ist zusammen gefasst in Schema 11. Nachdem das Rohprodukt vom Harz abgespalten und in absolutem Ether gefällt wurde, folgte nach anschließendem Trocknen *in vacuo* eine Aufreinigung mittels HPLC.



Schema 11: Vereinfachte Syntheschemata zur Herstellung Polyamin-basierter Gifte aus der Familie der Philanthotoxine: PhTX₃₄₃ und sFTX-3.3 ohne Verwendung der entsprechenden Schutzgruppenstrategie.

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

Wie man anhand dieser beiden Beispiele unschwer erkennen kann, lässt sich diese strategische Vereinfachung zu einem rationalen synthetischen Ansatz, zumindest für die ausgesuchten niedermolekularen Polyaminkonjugate, entwickeln. Durch die strategisch bedingte Reduzierung der Reaktionsschritte konnten keine schwerwiegenden Einbußen in der Produktausbeute festgestellt werden. Vergleicht man die beiden Strategien miteinander, so scheinen sie auf den Reinheitsgrad bezogen, erwartungsgemäß nicht gleich effizient zu sein. In der Literatur fällt die Rohproduktreinheit des Zielmoleküls (PhTX343) mit mehr als 90% ziemlich hoch aus.^[77c] Im Vergleich dazu bietet die verkürzte Strategie für das selbe Molekül zufriedenstellende 60% Rohproduktreinheit, die nach einer abschließenden HPLC-Aufreinigung überdurchschnittliche 47% Ausbeute ergibt. Für das zweite Toxin-Molekül fällt dieser Unterschied noch kleiner aus, was zu einem auf den beschriebenen Syntheseweg und zum anderen auf die strukturellen Unterschiede zwischen dem Norspermidin (C3C3N3) und Spermin (C3C4C3N4) zurückzuführen ist. Zwar verlaufen bei dem neuen Syntheseweg die Kupplungsreaktionen nicht quantitativ, dennoch sind dabei entstehende Verluste in Relation zum synthetischen Aufwand vertretbar. Von der erstaunlich hohen, beobachteten Regioselektivität der Polyamine lässt sich in der Herstellung von polyaminhaltigen Naturstoffen ganz besonders bei Synthesen an der festen Phase profitieren. Die Spektren der beiden hergestellten Philanthotoxine sind in Abbildung 44 bzw. 45 zu sehen.

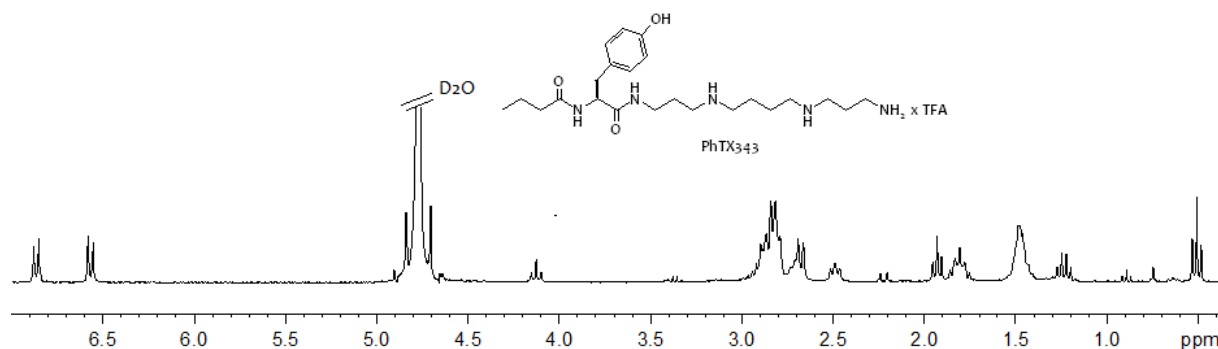


Abbildung 44: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz, D_2O , 300 K, pH 5.8) des Philanthotoxins PhTX_{343} , eines wirksamen Analogon des Wespen-Toxins PhTX_{433} .

Regioselektivität multifunktionaler Polyamine und darauf basierende Entwicklung neuartiger Syntheseansätze

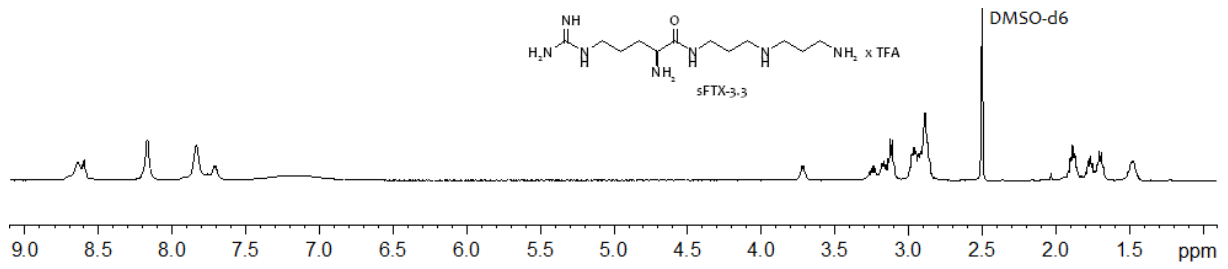
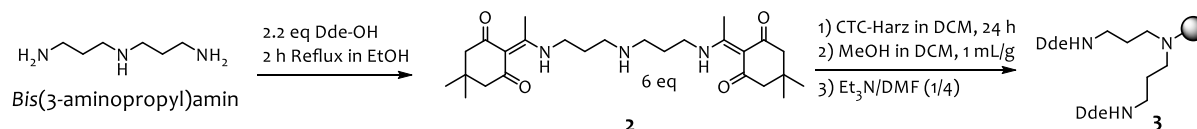


Abbildung 45: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) von sFTX-3.3 aus der Familie der Philanthotoxine, eines Vorläufers von FTX-3.3, das ebenfalls einen effektiven Calciumkanalblocker darstellt.

2.8 Synthese langkettiger Polyamine an der festen Phase

Im vorangegangenen Kapitel wurde der synthetische Nutzen der selektiven Derivatisierung von Polyaminen thematisiert. Im folgenden Kapitel sollen die Anwendbarkeit und Grenzen der ausgeprägten Polyamin-Regioselektivität für die Synthesestrategien an der festen Phase erweitert werden. Eine der wichtigsten Erkenntnisse aus den oben aufgeführten Beispielen ist die selektive Maskierung der primären Aminofunktion durch den Trityl-Linker. Neben der Dde-OH-Gruppe scheint auch das 2-Chlorotritylchlorid-Harz eine effiziente Schutzgruppe für die primären Aminofunktionen zu sein.^[150a-c] Für die selektive Anbindung der sekundären Aminofunktion eines Polyamins (bspw. im Norspermidin oder Spermin) an das CTC-Harz, sollen die primären Amine, aufgrund ihrer überlegenen Reaktivität, temporär inaktiviert werden. Bei Polyaminen gelingt dies am besten durch die Schützung der terminalen, primären Aminofunktionen mittels Dde-OH in Lösung.^[150a] Ein, auf diese Weise geschützter, Linker (**2**) kann selektiv über die einzige reaktive Stelle im *Bis*(3-aminopropyl)amin an das Harz gebunden werden.



Schema 12: Regioselektive Schützung der terminalen primären Aminofunktionen im *Bis*(3-aminopropyl)amin durch Dde-OH mit anschließender ortsgerechter Verknüpfung des auf dieser Weise hergestellten Spermin-Linkers an das CTC-Harz.

Der Erfolg der Beladungsreaktion wurde anhand einer Abspaltprobe durchgeführt. Hierzu wurde eine definierte Einwaage des bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Harzes entnommen und mit 100 μ L Trifluoressigsäure versetzt. Nach etwa 1 min wurde diese purpurrote Suspension mit 0.6 mL DMSO-*d*₆ aufgefüllt und in ein NMR-Röhrchen überführt. Nach dem Absetzen der Harz-Kügelchen wurden routinemäßig NMR-Spektren aufgenommen. Diese schnelle und einfache Methode ermöglicht nicht nur eine durchgehende Analyse der stufenweise erfolgenden Derivatisierung, sondern bietet auch eine gute Alternative für die Bestimmung des Beladungsgrades am Harz. Die genaue Beschreibung der Beladungsbestimmung *via* Abspaltprobe ist dem Kapitel 5 zu entnehmen. Das orthogonal-geschützte Polyamin **3** wurde durch Behandlung mit 2% igem Hydrazin in DMF von der Dde-Gruppe befreit und lieferte das Harz **4** mit zwei freien funktionellen Gruppen (s. Schema 13). In Abbildung 46 ist das ¹H-NMR-Spektrum einer Abspaltprobe des Triamins **3a**, aufgenommen zur Bestimmung des Beladungsgrades, gezeigt. Zu beachten ist allerdings, dass das vom Harz abgespaltene, zu analysierende *Bis*-Dde-(3-aminopropyl)amin hier als TFA-Salz vorliegt. Die hemmenden Effekte einer sterischen Hinderung bei dieser Interaktion

zwischen dem sekundären Amin und dem Trityl-Linker äußern sich vor allem im niedrigen Beladungsgrad ($B = 0.22 \text{ mmol/g}$), das nach einer langen Reaktionszeit (24 h, s. Schema 12) erreicht wurde.

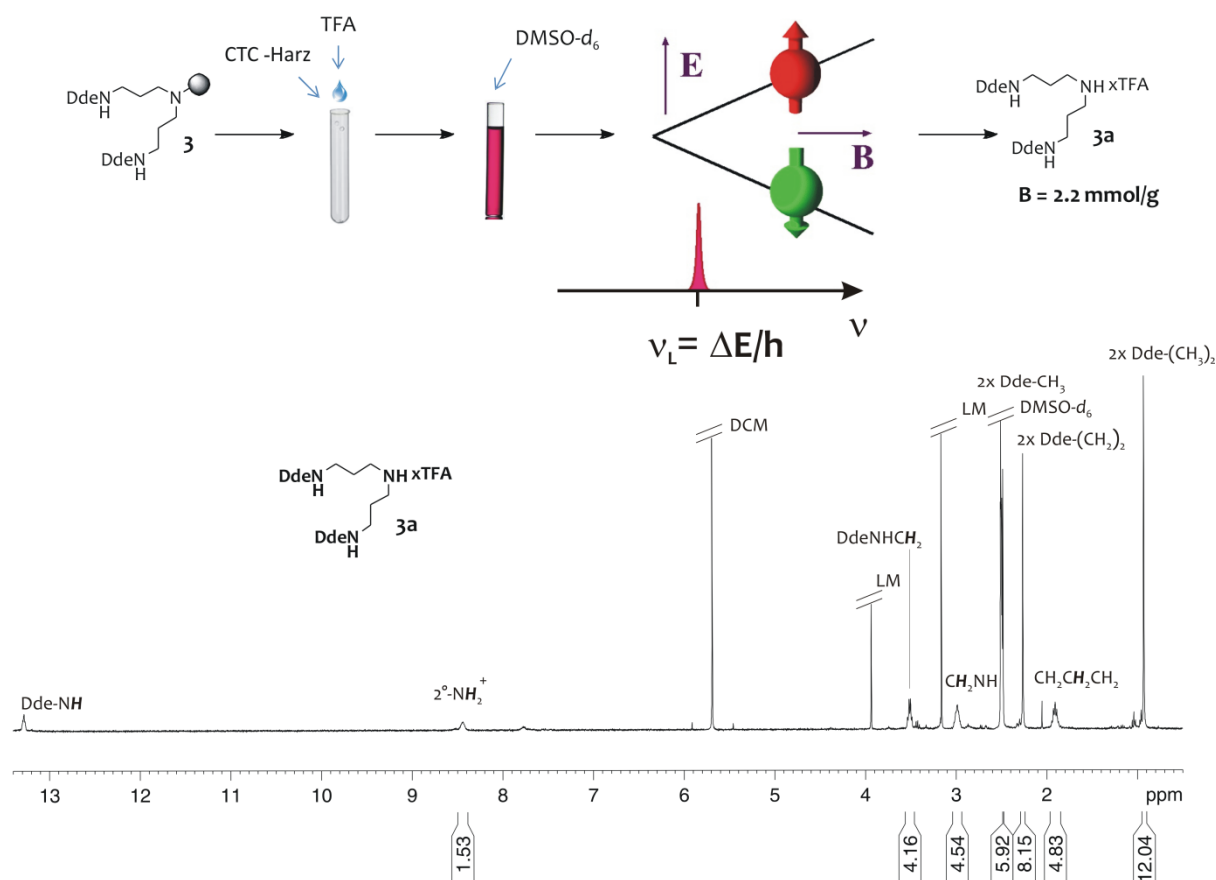
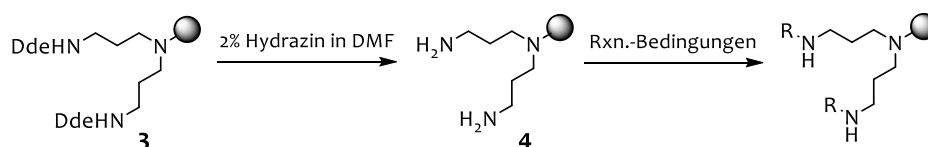


Abbildung 46: Schematische Darstellung zur Vorbereitung einer Abspaltprobe mit entsprechendem ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) zur Verbindung 3a, aufgenommen zur Bestimmung der Harzbeladung.

Die selektive Derivatisierung von primären Aminogruppen am Harz kann auf zwei möglichen Wegen erreicht werden. Ausgehend von einem Triamin, z.B. *Bis*(3-aminopropyl)amin, entweder durch die ortsspezifische Anknüpfung seiner ungeschützten Form an den Trityl-Linker (s. Abbildung 41) oder aber durch die selektive Anbindung über das sekundäre Amin der teilweise geschützten Form dieses Triamins (s. Schema 12 und Schema 13).

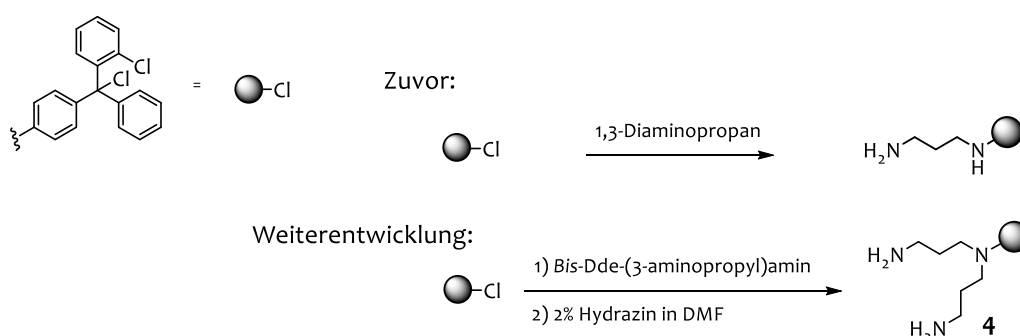


Schema 13: Selektive Entschützung mit anschließender Derivatisierung von primären Aminogruppen am Harz am Beispiel des Triamins.

Einer der größten Vorteile der zweiten Strategie besteht unter anderem darin, dass sie eine synchrone Derivatisierung zweier gleichartiger, gleichermaßen reaktiver funktionellen Gruppen ermöglicht. Diese Synthesestrategie wurde bereits für die Darstellung der

homodimeren Prion-Sequenzen erfolgreich angewandt (s. Kapitel 1.3) und kann für die Herstellung langkettiger Polyamine (*long-chain polyamines*, LCPAs) ebenfalls in Betracht gezogen werden. Mit dieser Strategie lässt sich die von R. WIENECKE bereits beschriebene Methode der polymerunterstützten Aminsynthese *via* Amidreduktion erweitern.^[151] Der Schwerpunkt dieser synthetischen Ausweitung besteht nicht nur in der Effizienz der Kettenverlängerung der synthetischen LCPAs, sondern viel mehr im Herausarbeiten der Vorteile bei Fluoreszenz- bzw. Isotopenmarkierungen. Fluoreszenzmarkierte Peptide oder andere Biomoleküle sind wichtige diagnostische Werkzeuge in der Biochemie und finden vielfältige Anwendungen in der Proteinchemie, Histologie und Immunologie.^[152] Fluoreszenz- und wie Isotopenmarkierungen sind für die *in-vitro*-Untersuchungen des Polyamin-Einflusses in unzähligen Lebewesen unentbehrlich. So konnten mittels Isotopenmarkierungen die Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Polyaminen mit Nukleinsäuren, Proteinen, Phospholipiden der Zellmembran bestätigt und somit deren aktive Beteiligung beim Übersetzungsvorgang, der Proteinsynthese, in der Strukturorganisation von Zellen, Organellen und Biopolymeren nachgewiesen werden. Des Weiteren wird den langkettigen Polyaminen bei der Bildung der hierarchisch strukturierten Silicazellwände von Diatomeen eine entscheidende Rolle zugesprochen. In Hinsicht auf das Verständnis der Kieselsäurefällung in Diatomeen können markierte Polyamine präzise Hinweise auf den Lokalisierungsort und Wirkmechanismen der Polyamine liefern. Das alles motiviert zur Entwicklung von weiteren synthetischen Strategien zur Herstellung markierter Polyamine.

Bei der neu entwickelten Methode startet die Polyaminsynthese nicht mit der Anknüpfung des 1,3-Diaminopropan an das CTC-Harz, wie es bereits bei der von R. WIENECKE etablierten Synthese der Fall war, sondern mit dem Norspermidin beladenen Harz **4**.

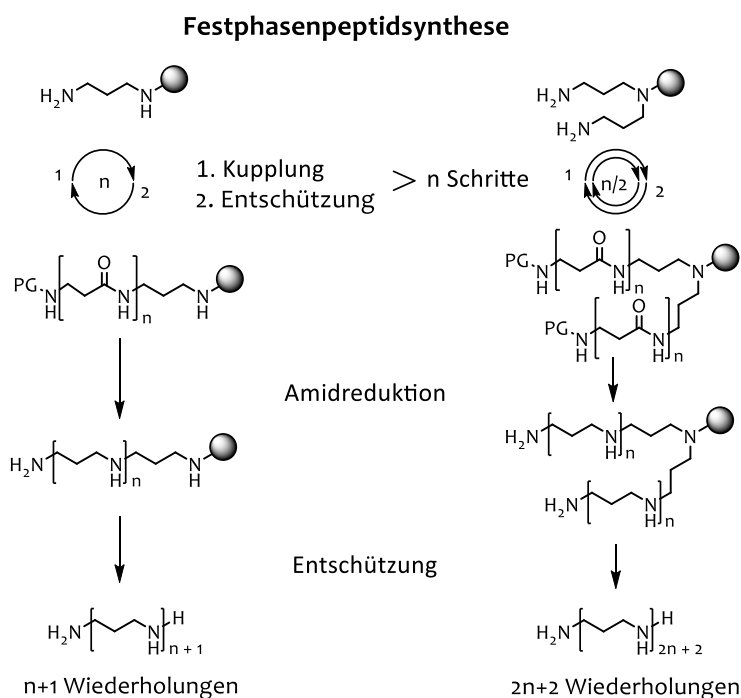


Schema 14: Syntheserouten langkettiger Polyamine an der festen Phase, die den Unterschied zwischen der alten etablierten und neuen Synthesestrategie veranschaulichen.

Um den Norspermidin-Linker auf seine Eignung für die Polyaminsynthese zu prüfen, wurden die Kupplungsbedingungen ebenso wie die Reduktions- und Aufarbeitungsschritte nach der

Vorschrift von R. WIENECKE, basierend auf Vorarbeiten von KÖNIG *et al.*, HALL *et al.* und HOUGHTEN *et al.* durchgeführt.^[151,153,154a-f] Aufgrund der Symmetrieeigenschaften des Norspermidin-Linkers bietet die neue Methode die Möglichkeit zum Aufbau von symmetrischen LCPAs, wobei der intramolekulare Amin-Abstand mit einer Auswahl an unterschiedlichen Aminosäuren-Bausteinen beliebig variiert werden kann. Zur weiteren Verbesserung gehört die Etablierung der stufenweisen Analytik, die sich gerade bei der Herstellung isotonenmarkierter LCPAs bezahlbar macht. Die Kombination der manuellen Synthese mit einer permanent bestehenden Möglichkeit zu NMR-spektroskopischen Untersuchung einer Abspaltprobe in dem jeweiligen Reaktionschritt bietet den großen Vorteil, nicht nur für die bessere Kontrolle während der Synthese, sondern vielmehr in der Optimierung der einzelnen Syntheseschritte. Die bis heute durchgeführten Tests hinsichtlich der Vollständigkeit einer Peptidkupplungen bzw. Entschützungen, wie TNBS- Chloranil-Kaiser-Test sind eher qualitativer Natur und sind aufgrund der subjektiven Wahrnehmung einer reaktionsbedingten Färbung von Harz-Kügelchen sehr fehleranfällig. Im Gegensatz dazu, kann anhand einer NMR-Abspaltprobe aussagekräftige Analytik hinsichtlich der Vollständigkeit der Kupplung und der Reihenfolge von eingebauten Bausteinen bis zum vorletzten Schritt betrieben werden. Durch die permanent bestehende Möglichkeit zur eindeutigen Quantifizierung des Umsatzes in dem jeweiligen Reaktionsschritt bietet diese Analytik-Variante eine mehrstufige Qualitätskontrolle in einem komplexen Syntheseprozess. Schema 15 demonstriert abermals die Effizienz der neuen, auf Norspermidin-basierenden Synthesestrategie gegenüber der Polyamin-Synthese, die mit 1,3-Diaminopropan eingeleitet wird. Die entwickelte experimentelle Methodik kann sowohl manuell als auch automatisiert erfolgen. Des Weiteren erfüllt diese Methode die speziellen Anforderungen an die Synthese von LCPAs, die zunehmende Polarität einer wachsenden Polymer-Kette voraussetzt. Dieses synthetische Verfahren ermöglicht einen analytisch vertretbaren Einbau von bis zu 16 Kupplungsbausteinen, wobei alle Acylierungen nach einem von R. WIENECKE optimierten Standardsyntheseprotokoll zur Festphasenpeptidsynthese mit dem Einsatz von HBTU/HOBt als Kupplungsreagenzien und DIPEA als Base erfolgten.^[151] Bei der Reduktion von Oligoamiden wurde wahrscheinlich eine der gängigsten Methoden zur Darstellung von sekundären Aminen angewandt, die Reduktion mit Boranen.^[155a-b] Für den Reduktionsschritt wurde ein großer Überschuss des Reduktionsagens (15-20 Äquivalente pro Amid) eingesetzt, um eine komplette Reduktion in einer relativ kurzen Zeit gewährleisten zu können. Die Boranreduktion wurde bei 65 °C in Anlehnung an die Vorarbeiten von Hall *et al.* und Houghten *et al.* ausgeführt.^[154a-f] Durch den exzessiven Einsatz an Reduktionsmittel haben

diese Reaktionsbedingungen eine Ausbildung schwer zerstörbarer Bor-Amin-Addukte zur Folge. Das Vorliegen von Bor-Amin-Komplexen konnte anhand der NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, da das erwartete, (in DMSO- d_6) charakteristische Verhältnis zwischen den primären und den sekundären Aminen nicht beobachtet werden konnte, sondern je nach Anzahl der vorhandenen Bor-Amin-Addukten variierte.^[156] Die Bor-Amin-Komplexe besetzen dabei die Stelle eines Protons an einem der Amine, was sich im Verhältnis der Integrale widerspiegelt. Zudem ließ sich deren Anwesenheit durch das Auftreten von $(M^+ + 24(B_2H_2))$ -Peaks im MS-Spektrum nachweisen. Zusätzlich ergeben die anwesenden Boratome ein charakteristisches Isotopenmuster im MS-Spektrum. Als eine milde Aufarbeitungsmethode zur Zerstörung von widerstandsfähigen Bor-Amin-Addukten erwies sich eine längere und wiederholte Behandlung (s. Kapitel 5) des reduzierten Oligoamids mit Piperidin.^[151] Somit konnte die Anwendbarkeit der literaturbekannten Synthese- und Aufarbeitungsmethoden zur Darstellung von LCPAs auf die neue effiziente Norspermidin-basierende Synthesestrategie mit Erfolg übertragen werden.



Schema 15: Allgemeine Synthesestrategie zur Herstellung langkettiger Polyamine basierend auf der Festphasen-Peptidsynthese. Nach der aminspezifischen CTC-Harzbeladung erfolgt der Ausbau der Polyamid-Kettenlänge durch wiederholtes Acylieren eines gewünschten Oligoamid-Bausteines (hier am Beispiel des Fmoc- β -Ala, für einen einheitlichen 1,3-Aminabstand, gezeigt) mit anschließender Boran-Reduktion ($BH_3 \cdot xTHF$) und der finalen sauren Abspaltung vom Harz, die letztendlich Polyamine gewünschter Kettenlänge als TFA-Salze liefert (*RSC Adv.*, 2016, 6, 93343-93348).

Das der Synthese isotopenmarkierter Polyamine zugrunde liegende Konzept (s. Schema 15) beruht auf der Festphasenpeptidsynthese. Der Aufbau eines sequenzspezifischen Oligoamids erfolgt durch mehrere hintereinander folgende, abwechselnde Kupplungs- und

Entschützungsstapen. Das über das sekundäre Amin an das CTC-Harz verknüpfte, axial symmetrische Norspermidin ermöglicht es, in einem Kupplungsstapen die beiden Termini zeitgleich zu verlängern. In n Kupplungsstapen wird also eine Verlängerung des Polyamids von $2n$ Aminosäure-Bausteinen erreicht. Das erhaltene Polyamid zeichnet sich weiterhin durch seine Achsensymmetrie aus und kann anhand einer Abspaltprobe sowohl qualitativ als auch quantitativ mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Nach anschließender Reduktion und basischer Aufarbeitung lassen sich die Oligoamide mit der gewünschten Kettenlänge in entsprechende Oligoamine überführen. Die finale Abspaltung vom Harz liefert polykationische Oligoamin-TFA-Salze.

2.8.1 Synthese und Anwendung isotonenmarkierter Polyamine

Für die Markierung von Polyaminen eignet sich der Einsatz von ^{13}C oder ^{15}N -stabilen Isotopen besonders gut. Die Isotopen-Markierung erfolgte durch den Einbau von unterschiedlich markiertem, käuflich erworbenem Glycin. Die isotonenmarkierten AS-Bausteine mussten zuerst im Sinne einer Fmoc-Strategie für Festphasenpeptidsynthese *N*-terminal geschützt werden. Die Fmoc-Schützungen der Aminosäuren wurden nach Standardvorschriften durchgeführt.^[151] Für eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten orthogonalen Schützungen von Glycin-Bausteinen sowie weitere Ergebnisse bei der Herstellung isotonenmarkierter Polyamine sei auf die Bachelorarbeit von C. HAAS verwiesen.^[157] Für den Aufbau des Oligoamid-Rückgrates wurde neben Glycin auch β -Alanin verwendet. Durch die Variation dieser beiden AS-Bausteine wird die strukturelle Vielfalt der markierten Oligoamine beabsichtigt. Während β -Alanin einen intramolekularen 1,3-Aminabstand herbeiführt, wird durch Glycin eine kürzere 1,2-Distanz zwischen den zwei benachbarten Stickstofffunktionalitäten erreicht. Durch den symmetrischen Einbau unterschiedlich markierter Glycin-Bausteine ist es möglich, spezifische, zweifach oder mehrfach isotonenmarkierte Zielmoleküle zu synthetisieren. Für eine bessere Übersicht wurden alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellte isotonenmarkierte Polyamine in Abbildung 47 zusammengefasst.

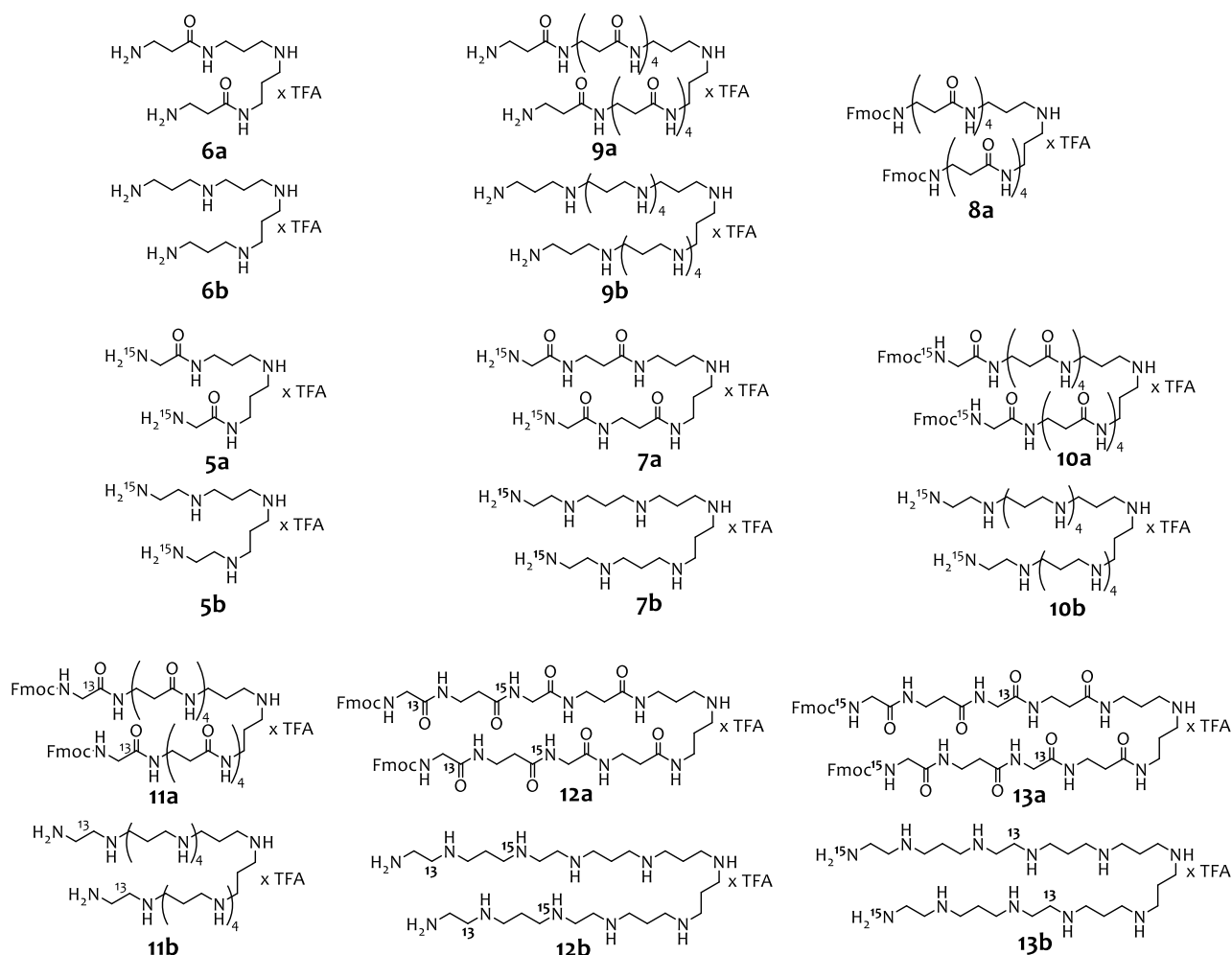
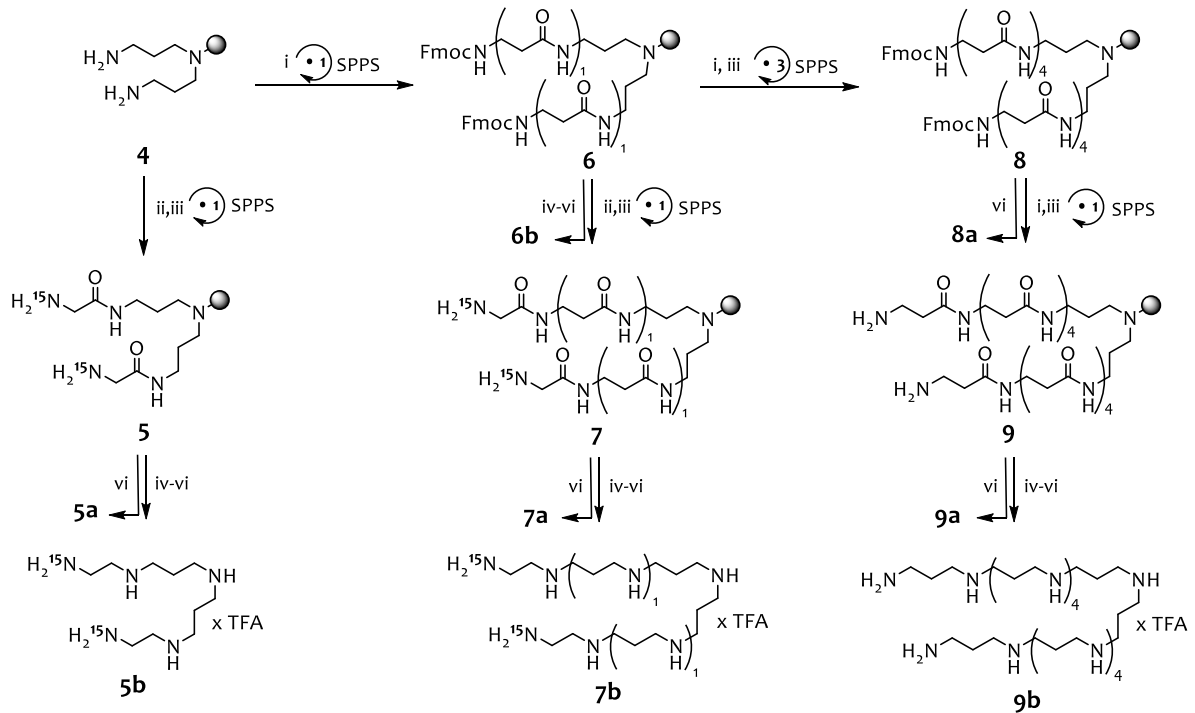


Abbildung 47: Übersicht über die synthetisierten Polyamine mit den entsprechenden Vorläufer-Oligoamiden.

Die Synthese des Pentaamins (**6b**) sowie des Polyamins (**13b**) ist in Schema 16 dargestellt, wobei Harz **6** eine Schlüsselrolle übernimmt und als Ausgangspunkt für viele weitere Polyamine fungiert. Die gezeigten Isotopenmarkierungen konnten durch Kupplung eines ^{15}N -angereicherten Glycins eingeführt werden. Wichtige Oligoamid-Zwischenstufen, die *via* Testspaltung charakterisiert wurden, sind mit dem Buchstaben "a", homologe Harze mit der entsprechenden Zahl kenntlich gemacht. Nach der Boranreduktion und der sauren finalen Abspaltung vom Harz konnten die langkettigen Polyamine mit den spezifischen Isotopenmarkierungen als polykationische TFA-Salze isoliert werden. Alle Polyamin-Zielverbindungen wurden mit dem Buchstaben "b" versehen.

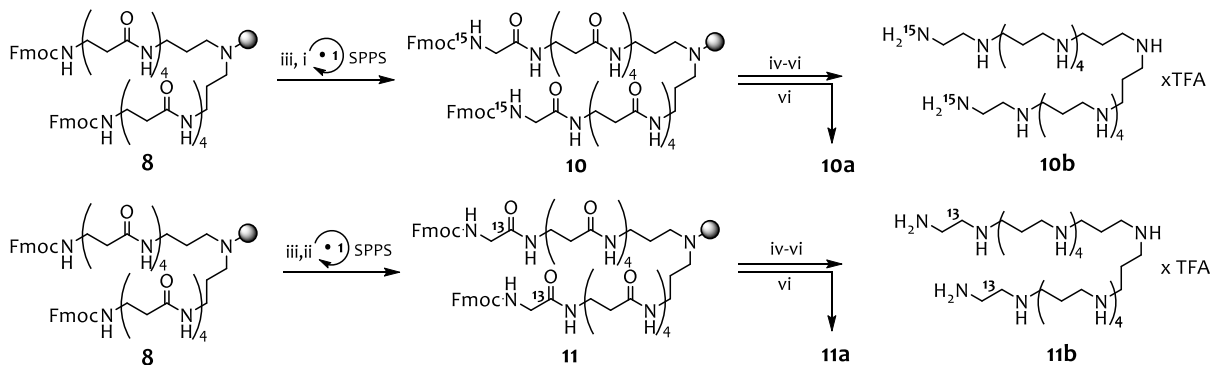
Synthese langkettiger Polyamine an der festen Phase



i) Fmoc- β -Ala-OH, HOBt, HBTU, DIPEA, DMF, RT, 1 h; ii) Fmoc- ^{15}N -Gly-OH, HOBt, HBTU, DIPEA, DMF, RT, 1 h; iii) 25% Piperidin in DMF, RT, 30 min; iv) 1.0 M $\text{BH}_3 \cdot \text{xTHF}$, 60 °C, 5-7 d; v) 25% Piperidin in DMF, 60 °C, 2-4 d; 2% Hydrazin in DMF, RT, 3 x 10 min; vi) 95% TFA in H_2O .

Schema 16: Synthese des ^{15}N -markierten LCPA 5b und 7b und des Harzes 6, welches als Ursprung für die weiteren LCPAs dient (9b, 12b, 13b).

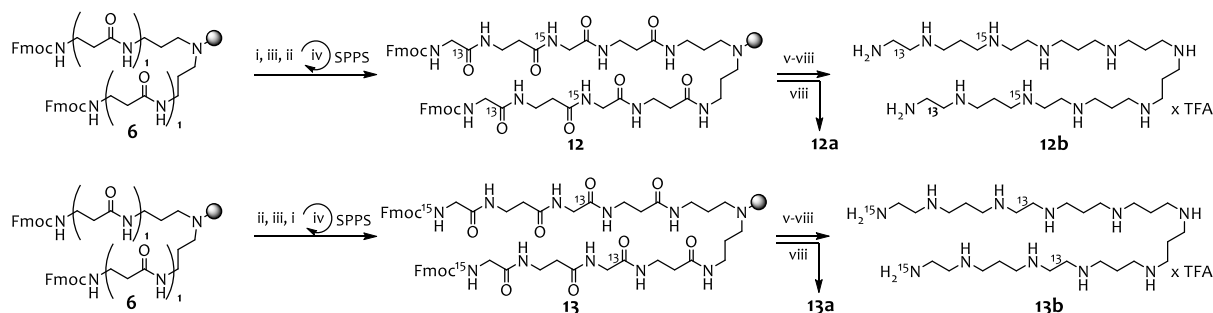
Schema 17 zeigt die Synthese der gleich langen LCPAs **10b** und **11b**. Der intramolekulare Aminabstand bleibt bei den beiden Polyaminen ebenfalls identisch. Diese enthalten neben dem natürlich vorkommenden 1,3-Aminabstand auch eine 1,2-Distanz, die durch den Glycin-Einbau unvermeidlich entsteht. Die Isotopenmarkierung bei der Verbindung **11b** wurde analog zu allen anderen Markierungen, durch das Anbringen der Aminoethansäure, im gegebenen Fall einer, die ^{13}C angereichert vorliegt, erzielt.



i) Fmoc- ^{15}N -Gly-OH, HOBt, HBTU, DIPEA, DMF, RT, 1 h; ii) Fmoc- ^{13}C -Gly-OH, HOBt, HBTU, DIPEA, DMF, RT, 1 h; iii) 25% Piperidin in DMF, RT, 30 min; iv) 1.0 M $\text{BH}_3 \cdot \text{xTHF}$, 60 °C, 5-7 d; v) 25% Piperidin in DMF, 60 °C, 2-4 d; 2% Hydrazin in DMF, RT, 3 x 10 min; vi) 95% TFA in H_2O .

Schema 17: Die Synthese der Polyamine 10a und 10b. Die Markierungen wurden terminal durch die Kupplung eines ^{15}N - oder ^{13}C -angereicherten Glycins eingeführt.

In Schema 18 ist die Synthese der doppelt markierten LCPAs **12b** und **13b** mit einem alternierenden Amin-Abstand gezeigt. Diese Polyamine enthalten jeweils zwei ^{13}C , ^{15}N -Label an jener Position, wo der einheitliche 1,3-Abstand durch das angereicherte Glycin unterbrochen wird.



i) Fmoc- ^{15}N -Gly-OH, HOBT, HBTU, DIPEA, DMF, RT, 1 h; ii) Fmoc- ^{13}C -Gly-OH, HOBT, HBTU, DIPEA, DMF, RT, 1 h; iii) Fmoc- β -Ala-OH, HOBT, HBTU, DIPEA, DMF, RT, 1 h; iv) 25% Piperidin in DMF, RT, 30 min; v) 1.0 M $\text{BH}_3 \cdot \text{xTHF}$, 60 °C, 5-7 d; vi) 25% Piperidin in DMF, 60 °C, 2-4 d; vii) 2% Hydrazin in DMF, RT, 3x 10 min; viii) 95% TFA in H_2O .

Schema 18: Synthese der zweifach-markierten LCPAs **12b** und **13b**.

Das ^1H -NMR-Spektrum von Polyamin **7b**, einem der mittellangen, repräsentativen Vertreter der homologen Reihe ist in Abbildung 48 zu sehen. Zusätzlich ist in der unteren Abbildung noch das ^1H -NMR-Spektrum von Polyamin **6b** gegenüber gestellt, als Beispiel für ein nichtmarkiertes Polyamin.

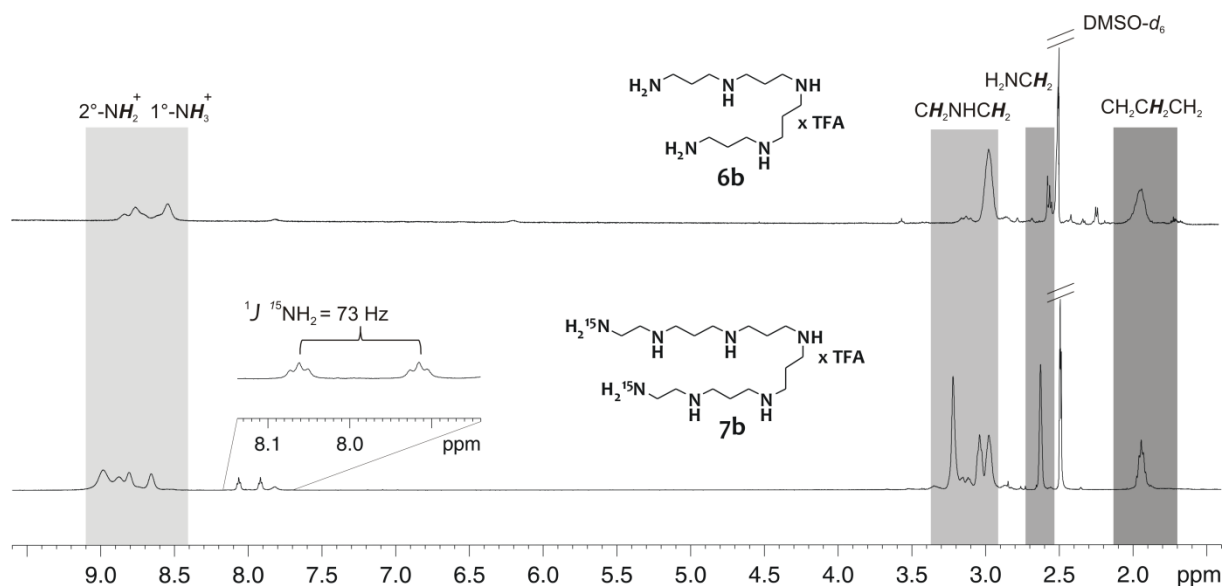


Abbildung 48: ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, DMSO-d_6 , 300 K) eines ^{15}N -markierten Polyamins **7b** (unten) und des unmarkierten Pentaamins **6b** (oben). Die Protonen sind zugeordnet nach der chemischen Struktur, die in der Mitte des jeweiligen ^1H -NMR-Spektrums abgebildet ist. Für das ^{15}N -angereicherte Polyamin ist die charakteristische 1J -Kopplung hervorgehoben.

Aufgrund der Symmetrie der langkettigen Polyamine vereinfacht sich der Signalsatz auf wenige Resonanzfrequenzen. Durch den leicht abweichenden Polymerisationsgrad der Amine sind die Integrale der Multiplikts für die β -Methylenprotonen im Bereich von 1.85 bis

2.10 ppm sowie die Multipletts für die α -Methylengruppen im Bereich bei 2.90 ppm um eine entsprechende Anzahl von Protonen erhöht. Im charakteristischen NH-Bereich treten in den beiden Spektren mehrere Resonanzfrequenzen auf. Eine Zuordnung zwischen den sekundären und primären Aminofunktionen konnte demzufolge nicht getroffen werden. Allerdings konnte im Falle des angereicherten Polyamins 7b, in dem für die primären Amine charakteristischen NH-Bereich (7.8 - 8.1 ppm), eine für die ^{15}N -Markierung typische Aufspaltung des Ammonium-Signals (dt) detektiert werden. Der bei dieser Aufspaltung ermittelte Wert von 73 Hz ist spezifisch für eine direkte heteronukleare $^1J_{\text{N-H}}$ Kupplung und gilt als Marker für den synthetischen Erfolg.

In diesem Kapitel wurde eine Reihe erfolgreich synthetisierter, strukturell-divergenter Polyamine gezeigt, jedoch bleibt damit das Potential der strukturellen Vielfalt bei weitem nicht ausgeschöpft. Die strukturelle Modifikation des Polyaminrückgrates durch Variation des intramolekularen Aminabstandes oder Einführen von Markierungen ist so gut wie unbegrenzt. Die einzige Anforderung an die einzuführende Aminosäure ist ihre chemische Beständigkeit gegenüber dem eingesetzten Reduktionsmittel. Durch die Verwendung von α - bis ω -Aminosäuren kann diese effiziente Synthesestrategie erweitert werden. Bei den angereicherten Bausteinen sind die Variationsmöglichkeiten allerdings finanziell limitiert. So übersteigen die Kosten für das ^{13}C -markierte β -Alanin fast um das zehnfache die des angereicherten Glycins (SIGMA-ALDRICH). Neben dem Polymerisationsgrad und dem intramolekularen Aminabstand kann auch das Methylierungsmuster wesentlich zu der strukturellen Divergenz von synthetischen LCPAs beitragen. Diese Methode unterstreicht einmal mehr den synthetischen Nutzen dieses Baukastenprinzips bei der Polyaminsynthese.^[151]

Wie es bereits erwähnt wurde, haben langkettige Oligoamine ein großes Forschungsinteresse in Zusammenhang mit der Biomineralisation von Kieselsäure gefunden. LCPAs stellen den größten organischen Bestandteil der Diatomeenzellwand dar und sind daher wichtigste Bausteine im Biosilifizierungsprozess. Die *in vitro*-Experimente zeigen, dass die Polyamine bei der Ausfällung von Kieselsäure in erster Linie eine katalytische Rolle übernehmen. Da aber über die molekularen Wechselwirkungen zwischen der Kieselsäure und LCPAs bei der Bildung eines Präzipitats nur wenig bekannt ist, kristallisierte sich ein strategischer und methodischer Ansatz heraus: der katalytischen Aktivität dieser Schlüssel-moleküle mithilfe Isotopen-Marker nachzugehen. Mittels Festkörper- NMR-Untersuchungen von vollständig ^{13}C , ^{15}N und ^{29}Si -markiertem Biosilica der Kieselalge konnte bereits gezeigt werden, dass LCPAs an der organisch-anorganischen Grenzfläche lokalisiert sind, also in einem engen

Kontakt mit dem Silica. Festkörper-NMR-Spektroskopie ist in der Lage, die Wechselwirkungen an der LCPA-Silica-Grenzschicht (*Interface*) mit Hilfe solcher empfindlicher Experimente wie Dreh Echo Doppelresonanz (REDOR13-16) zu untersuchen. Derartige Experimente sind so weit ausgereift, dass sie eine Reihe struktureller Informationen hinsichtlich des Aufbaus von der anorganisch-organischen Grenzschicht liefern können. Jedoch werden diese spektroskopische Experimente aufwendiger und die Deutung der Ergebnisse aufgrund der Überlagerung der Signale komplizierter, wenn Untersuchungen mit vollständig isotonenmarkierten Proben durchgeführt werden. Die spezifisch isotonenmarkierten Proben sind daher wünschenswert.

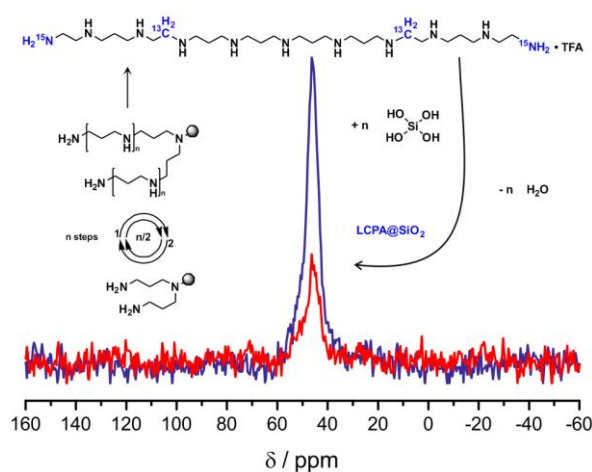


Abbildung 49: Visualisiert NMR-Analyse von bioinspirierten Silica-Nanokomposite, eine der möglichen Anwendungsgebiete der synthetischen, spezifisch ^{13}C , ^{15}N -markierten, langkettigen Polyaminen (LCPAs); hier am Beispiel eines im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Oligoamins 13b gezeigt (*RSC Adv.*, 2016, 6, 93343-93348).

In dem vorangegangenen Abschnitt wurde die Herstellung von ^{13}C , ^{15}N -punktuellmarkierten LCPAs gezeigt. Einige dieser Verbindungen wurden für Festkörper-NMR-Untersuchungen verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* hergestellten Silica-Nanokomposite aus synthetischen LCPAs und ^{29}Si -markierter Kieselsäure eine bemerkenswerte Dephasierung zeigen, wenn durch den Rotor-Synchroner π Impulse angelegt werden, die der Larmorfrequenz von ^{29}Si entsprechen. Das Vorbereiten von Silica-Gelproben sowie Durchführung aller Festkörper-NMR-Untersuchungen wurden im Arbeitskreis von Prof. BRUNNER durch S. BRÜCKNER durchgeführt. Die Silica-Gele wurden aus vollständig ^{29}Si -markierter Kieselsäure in Gegenwart eines bestimmten Polyamins hergestellt. Nach anschließender Trocknung wurden die so gewonnenen Silica-Nanokomposite NMR-spektroskopisch untersucht. Abbildung 50 zeigt die ^{13}C , ^{29}Si - CP-MAS-NMR-Spektren, die bei der Untersuchung eines getrockneten Silica-Gels, das durch Zugabe des Polyamins **13b** (s. Abbildung 47) gewonnen werden konnte. Das dabei detektierte ^{13}C -Hauptsignal kann eindeutig den vorliegenden Isotonenmarkierungen zugewiesen werden. Die Zuordnung der

Si-Signale im ^{29}Si CP -MAS-NMR-Spektrum ist in ebenfalls in der unteren Abbildung gezeigt.

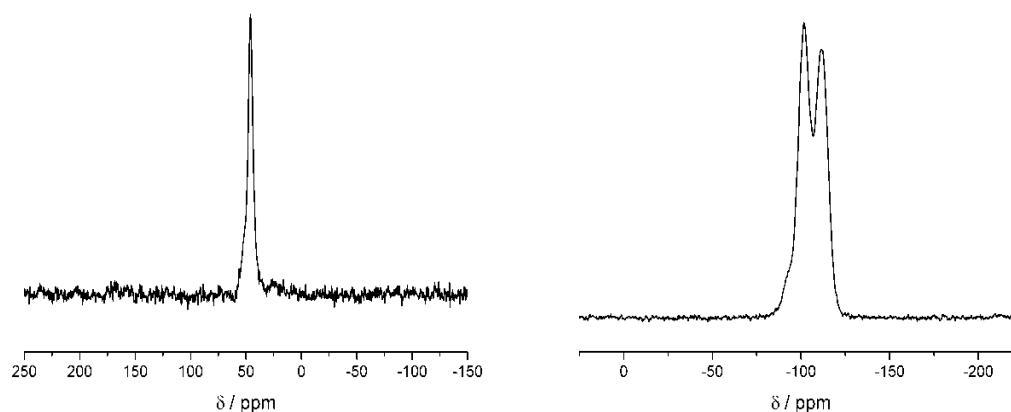
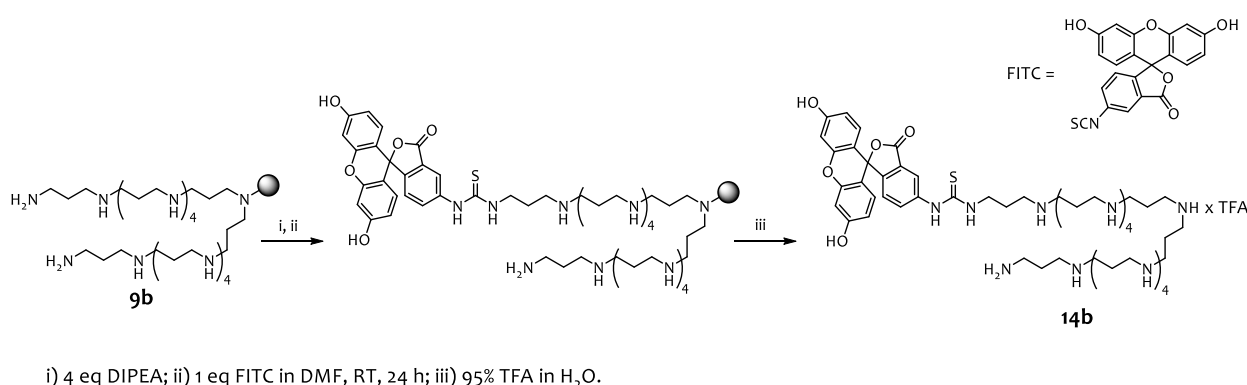


Abbildung 50: Links: ^1H - ^{13}C -CP Hahn-Echo-Spektrum des getrockneten Kiesel-Gels mit Polyamin 13b; gemessen nach 2 ms Echozeit mit 2048 Scans; exponentielle Linienverbreiterung wurde auf 50 Hz eingestellt. Rechts: ^1H - ^{29}Si -CP Hahn Echo-Spektrum des getrockneten Silica-Gels mit 13b nach 10 ms Echozeit. Durch Auftreten von Q3 und Q4-Gruppen wurde die Aggregation von $(\text{SiO})_4$ nachgewiesen. Das Experiment wurde mit 6144 Scans durchgeführt, wobei die exponentielle Linienverbreiterung auf 50 Hz geeicht wurde.

Anhand der beschriebenen Beispiele konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Synthese und Markierungsstrategie neue Perspektiven für die Anwendung der fortgeschrittenen Festkörper-NMR-Techniken eröffnen, die es erlauben die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen LCPAs und Kieselsäure in Details zu studieren. Da die natürlichen LCPAs mikroheterogene Gemische mit unterschiedlichen Kettenlängen und variablen Methylierungsgrad darstellen, sind die von ihnen geprägten Biomineralisationseigenschaften ebenfalls unterscheidbar. Die synthetischen Polyamine hingegen zeichnen sich durch eine gewisse Homogenität und eine charakteristische definierte Struktur aus, die je nach Bedarf verändert werden kann. Deshalb ist das Anwenden von synthetischen LCPAs für das Studieren molekularer Abläufe bei dem Biosilifizierungsprozess besonders vorteilhaft. Anhand synthetischer Polyamine lässt sich nicht nur Fällungsaktivität in Abhängigkeit von exakt definierter Struktur bestimmen. In Hinblick auf die strukturdirektierenden Eigenschaften der LCPAs erhofft man sich die Zusammenhänge zwischen ihrer chemischen Struktur und morphologischen Merkmalen des gebildeten Silica-Präzipitats besser verstehen zu können. Darüber hinaus ermöglichen punktuell isotopenmarkierte Oligoamine durch die Untersuchung gebildeter Silica-Nanokomposite eine umfangreiche Analyse quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

2.8.2 Synthese und Anwendung fluoreszenzmarkierter Polyamine

Für die Herstellung von Fluoreszenzsonden wurde die auf dem Norspermidin-Linker basierte Synthesestrategie angewandt (s. Abschnitt 2.8.1). Zum Aufbau eines Polypeptides erstrebter Kettenlänge erfolgte hierbei anfangs die klassische SPPS unter Verwendung vom β -Alanin als Grundbaustein und HBTU/HOBt als Kupplungsreagenzien. Die anschließende Reduktion mit Boranen lieferte das gewünschte Oligoamin mit einem 1,3-intamolekularen Aminabstand, das nach einer speziellen Aufarbeitung zur Zerstörung stabilen Boran-Amin-Aminoboran-Komplexes,^[154c,158] N-terminal mit einem Fluoreszenzlabel versehen wurde.^[159] Synthese fluoreszenzmarkierter LCPAs ist im unteren Schema umfassend dargestellt.



Schema 19: Syntheschema zu Darstellung des FITC-markierten Polyamins 14b ausgehend von dem reduzierten Polyamin-Harz 9b.

Vor der finalen sauren Abspaltung wurde das Harz mit dem hergestellten Oligoamin unter Schutzgas-Atmosphäre und bei Raumtemperatur für 30 Minuten in DMF vorgequollen. Nach der Zugabe von DIPEA wurde dieses mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) versetzt. Nach 24 h erfolgte die Freisetzung vom FITC-derivatisierten Polyamin mit 95%iger wässriger Trifluoressigsäure.^[160]

Als Fluoreszenzlabel wurde Fluorescein ausgewählt, weil dieser bereits eine breite Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie unter anderem bei Untersuchungen biogener Amine erlangt hat.^[161] Weiterhin ist Fluorescein ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung mit blauem Licht (Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 496 nm) grünes Licht mit den Wellenlängen von 520 bis 530 nm emittiert. Das Fluoreszenzmaximum ist daher nicht besonders scharf und den dazugehörigen Absorptionsbanden entsprechend breit. Die Fluorescein-Gruppe kommt in zwei verschiedenen Strukturen vor.^[161] Die stabilere ist dabei die offene Carbonsäure-Form, die im festen Zustand als rote Kristalle vorliegt. Nebenher existiert noch die Spiro-Lacton-Form, die eine instabile, gelbe Verbindung bildet (s. Schema 19). Neben der guten Sensitivität besitzt die Fluorescein-Gruppe auch einer Reihe

Nachteile, die ihre Nützlichkeit in der Fluoreszenzmarkierung ein wenig einschränkt. Zu den wichtigen Defiziten dieses Labels gehört ein schnelles Photobleichen durch die Lichteinstrahlung sowie eine starke pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität. Die Verminderung der Fluoreszenz lässt sich durch eine möglichst dunkle strahlungsfreie Aufbewahrung der FITC-derivatisierten Verbindungen weitestgehend minimieren, während die pH-abhängigen Intensitätsverluste bei den markierten Oligoaminen kaum ins Gewicht fallen, denn eine Abnahme der Fluoreszenz-Intensität erst ab dem pKs von 6.4 auftritt. Deshalb eignet sich die Fluorescein-Gruppe für die Markierung der Polyamine besonders gut. Von den fluoreszenz-gelabelten Oligoaminen erhofft man sich wichtige Hinweise zu einem besseren Verständnis der Rolle dieser Verbindungsklasse, hinsichtlich ihrer Beteiligung an den mechanistischen Abläufen bei der Kieselsäurefällung in Diatomeen, zu erhalten.

Wie aus den Arbeiten von R. WIENEKE^[67] und A. BERNECKE^[86] hervorgeht, lässt sich Morphologie von Silica-Partikeln nur bis einem gewissen Grad durch Modifikation der Polyamin-Strukturen oder Veränderung der Reaktionsbedingung beeinflussen. Aus diesem Grund wurden in der Forschungsgruppe von Prof. STEINEM zahlreiche Bemühungen unternommen, die eine Ausbildung von Templaten für die Silica-Präzipitation unter Verwendung amphiphiler lipidähnlicher Moleküle ermöglichen. In der Literatur werden diesbezüglich ebenfalls verschiedene biomimetische Ansätze zur Ausbildung von supramolekularen Anordnungen vorgestellt, in denen die Polyamine elektrostatisch an die Oberflächen koordinieren^[162,163] oder kovalent an Strukturen-bildende Moleküle gebunden werden.^[164] Darüber hinaus werden weitere Silica-präzipitierende Moleküle beschrieben, die in der Lage sind, definierte Template in Lösung auszubilden.^[165]

Auch die Tatsache, dass die Silica-Polymerisation in den spezialisierten membrangebundenen Vesikeln (SDV) stattfindet, lässt unvermeidlich auf ihre strukturgebende Funktion schließen.^[83] Daher erscheint die Verfolgung eines biomimetischen Ansatzes mit Ausbildung von amphiphilen lamellaren Systemen hinsichtlich ihrer Matrix-gebenden Rolle zur Untersuchung von Silica-präzipitierenden Eigenschaften innerhalb eines supramolekularen artifiziellen Membransystems besonders vielversprechend. Durch den Einsatz von synthetischen Amin-Verbindungen mit hydrophoben Membranankern, den sogenannten Aminolipiden konnte A. BERNECKE im Rahmen ihrer Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. STEINEM. Ausbildung von selbstorganisierenden Templatsystemen für die Silica-Präzipitationen etablieren. Es wurden Vesikel und planare Lipidschichten erfolgreich aufgebaut, an deren Oberflächen innerhalb kürzester Zeit nach der Zugabe monomerer Kieselsäure die Silica-Bildung sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden

konnte. Die Verwendung von Aminolipidvesikel als Reaktionstemplate erlaubte neben der Bildung sphärischer Silica-Partikel eine Untersuchung des Einflusses der *N*-Methylierung zahlreicher von R. WIENEKE hergestellten Oligoamine auf den Präzipitationsprozess. Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen deuteten auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Oberflächenladung und entstehender Silica-Menge. Die Tatsache, dass die Silica-Präzipitation in Abwesenheit von Phosphationen stattfand, weist darauf hin, dass eine Phasenseparation mit einer einhergehenden Akkumulation positiver Ladungen an den Grenzflächen für die biomimetische Bildung von Silica entscheidend ist. Dieser biomimetische Ansatz wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. STEINEM durch O. GRÄB weiter verfolgt. Bei Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen SiO₂-präzipitierenden organischen Komponenten und Lipidmembranen konnte durch Zugabe des synthetischen Polyamins **9b** die Entstehung dreidimensionaler, miteinander vernetzter Membranstapeln beobachtet werden, die sich anscheinend unabhängig von der Lipid-Zusammensetzung ausbildeten. Der Nachweis einer Wechselwirkung zwischen der ausgebildeten Membranstapeln und darunterliegenden Lipidmembran konnte mithilfe *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) nachgewiesen werden, wobei FITC-gelabeltes Polyamin **14b** verwendet wurde (s. Abbildung 51). Interessant war dabei die Feststellung, dass die Stapelbildung ausschließlich durch langkettige Polyamine (ab der Kettenlänge C3N7) induziert wird und nicht durch natürlich vorkommende Spermin bzw. Spermidin oder synthetisch hergestellte, kurze Amine (C3N4 und C3N5). Die Adsorption der Polyamine an Lipidmembranen, wo sie sich in kontinuierlichen flachen Doppel- und Monoschichten organisieren, konnte mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie sowie Fluoreszenzmikroskopie verfolgt und verifiziert werden. Die beobachtete Stapelbildung könnte auf eine stabilisierende Wirkung der LCPAs auf das schnelle und kontrollierte Expandieren von SDVs hindeuten, die mit dem Valvenwachstum und zunehmender SiO₂-Ablagerung einhergeht. Abbildung 51 zeigt Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, die im Rahmen einer Untersuchung der Interaktion zwischen den Silica-präzipitierenden Polyaminen **9b** und **14b** (Abbildung 51B) und SLBs (*supported lipid bilayers*). Die Aufnahmen zeigen, dass die Zugabe von **14b** innerhalb weniger Minuten zur Bildung von mikrometergroßen Domänen mit einer helleren Fluoreszenzintensität führt. Um zu untersuchendes Polyamin auf der Membranoberfläche zu lokalisieren, wurde dieses mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert. Abbildung 51C zeigt eine Korrelation zwischen einer für **14b** (s. Abbildung 51B) charakteristischen grünen und der roten Fluoreszenzintensität, die durch eine Dotierung der Lipid-Doppelschicht mit TexasRed-DHPE sichtbar wird. Eine klare Kollokalisierung zwischen

den Membrandomänen, die sich nach LCPA-Zugabe ausbildete, kann anhand der erhöhten grünen Fluoreszenz des akkumulierten **14b** beobachtet werden.

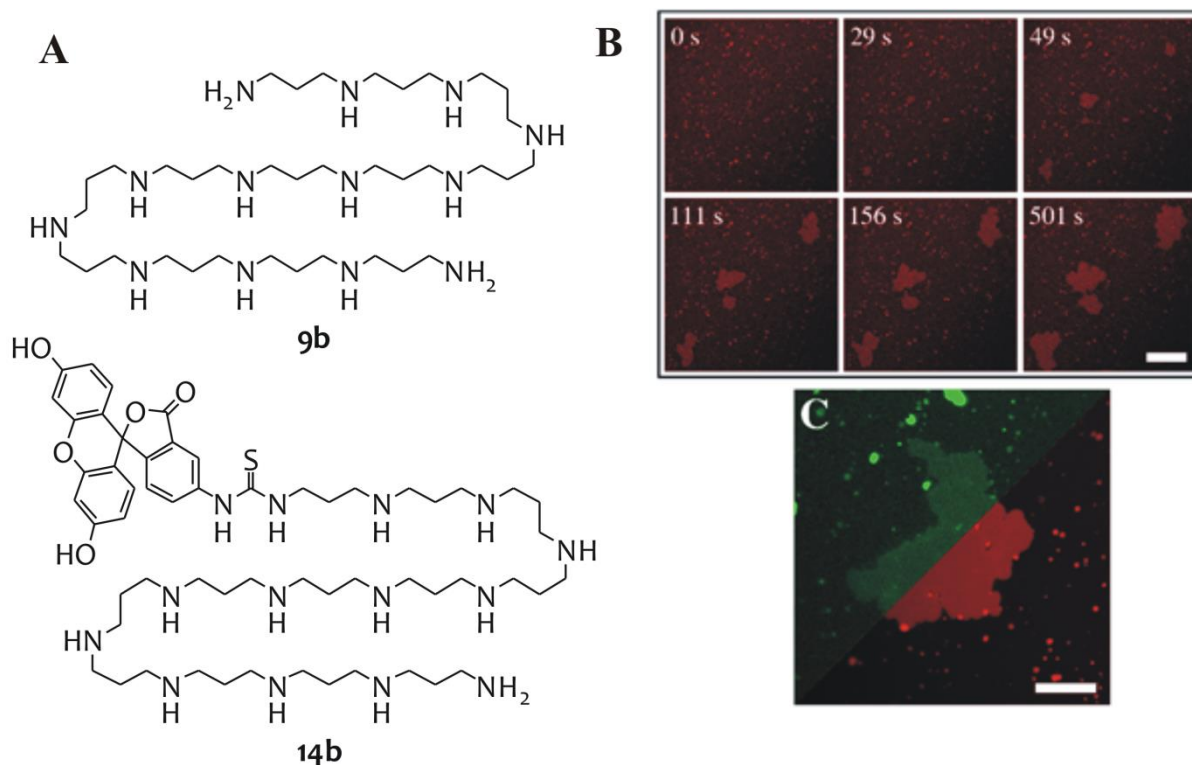


Abbildung 51: **A:** TexasRed-DHPE-Fluoreszenzbilder, die in einer Zeitreihe das Wachstum von hellen fluoreszierenden Domänen nach der Zugabe von **9b** wiedergeben. Die Domänen wachsen nach einer exponentiellen Zerfallsfunktion ausgehend vom zentralen Punkt. Maßstabsbalken: 20 μm . **B:** Chemische Strukturen von **9b** und **14b**. **C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von **14b** (grün) und TexasRed-DHPE-dotierten Membran (rot). Nach der Zugabe des LCPA wird eine Kolokalisation zwischen den Membrandomänen beobachtet. Maßstabsbalken: 10 μm (Langmuir, 2016, 32, 10144–10152).

2.9 Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

Die zu den Mikroalgen zählenden Diatomeen traten vor etwa 40 Millionen Jahren ihren Aufstieg zu einem der wichtigsten Produzenten von Biomasse an. Die in Millionen Jahren von der Evolution geschaffenen Strukturen der Diatomeenschalen beeindrucken heute noch mit ihrer Einzigartigkeit und einer verblüffenden Vielfalt. Eine ausgewogene Kombination aus Anpassungsfähigkeit und einem effizienten Umgang mit vorhandenen Ressourcen sicherte ihnen vermutlich den evolutionären Erfolg. Diese einzelligen marinen Organismen sind für den größten Teil der Produktion von Sauerstoff und pflanzlicher Biomasse im Meer verantwortlich. Sie nutzen die Energie aus dem Sonnenlicht, um das im Ozeanwasser gelöste Kohlenstoffdioxid in organisches Material umzuwandeln. So kommt den Diatomeen beim Binden des Treibhausgases eine Schlüsselrolle zu, denn mehr als die Hälfte des Kohlenstoffs, der heutzutage auf diesem Wege in Meeressedimenten eingelagert wird, geht auf ihr Konto.^[166] Ein beispielloses Zusammenspiel von Kohlenstoff und Silizium, dem für Diatomeen unverzichtbaren Baustoff, ermöglichte es den Kieselalgen, im Laufe der Evolution vielfältige filigrane Feinstrukturen mit hierarchischem Aufbau zu entwickeln.^[136] Trotz der filigranen Gitterkonstruktionen zeichnen sich die Silicateskelette der Kieselalgen durch außergewöhnlich hohe mechanische Belastbarkeit aus und sind daher Vorbilder für die zahlreichen Entwicklungen in der Bionik geworden ("Evolutionary Light Structure Engineering" ELiSE). In den Zeiten, wo mit Minimum an Materialeinsatz ein Maximum an Stabilität erreicht werden soll, sind die Radiolarien und Kieselalgen sowohl für die Wissenschaft als auch für die Industrie von ganz besonderem Interesse.

Seit Jahrzehnten beschäftigen die einzigartigen Eigenschaften des Diatomeenschalenmaterials unzählige Wissenschaftler weltweit. Der im Lauf der Evolution perfektionierte Biosilifizierungsprozess hat einen enormen Reichtum an Schalenarchitekturen hervorgebracht, der wahrscheinlich auf einigen wenigen Grundprinzipien der Natur basiert. Die Entschlüsselung dieser Grundprinzipien kann als Ursprung für eine Reihe neuer Erkenntnisse über das einzigartige Zusammenspiel von Design und Funktionalität darstellen. In Hinblick auf die besonderen Biosilifizierung-Techniken der Kieselalgen, die es ihnen eine gezielte, jedoch partielle Bildung von Biosilikat ermöglichen, entstand eine Idee zum Aufstellen eines Experimentes zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung. Dem voraus stellt allerdings die Entdeckung einiger, an der Silica-Bildung beteiligter organischer Komponenten der Diatomeenzellwand eine notwendige Grundlage für die Entwicklung solches *in-vitro*- Experimentes. Wie bereits erwähnt, nimmt einer Reihe der

spezialisierten Verbindungen wie Silaffine oder LCPAs, im Gegensatz zur anderen Naturstoffklassen, unmittelbar und selektiv am Biosilifizierungsprozess teil. Diese Bevorzugung von speziellen organischen Substanzen wird als chemoselektive Kieselsäurefällung bezeichnet. Bisher durchgeführte *in-vitro* Experimente zur chemoselektiven Silifizierung richteten ihr Interesse ausschließlich auf die Analyse des gebildeten SiO₂-Präzipitates.^[167,168] Dies war der primäre Grund für die Entwicklung eines ¹H-NMR-Experimentes, welches es ermöglicht, die löslichen, an dem Biosilifizierungsvorgang beteiligten organischen Komponenten, während der chemoselektiven Kieselsäurefällung zu quantifizieren. Für die durchgeführten NMR-Messungen wurden insgesamt fünf Verbindungen: drei verschiedene Polyamine, ein Toxin **18** (sFTX-3.3 s. Abschnitt 2.7.1) und ein Silaffin-1A₁-PDA **19** eingesetzt, die unterschiedlich stark ausgeprägte Fällungsaktivität aufweisen (s. Abbildung 52). Bei der untersuchten Silaffin-Modifikation handelt es sich um ein sogenanntes R5-Peptid. Diesem fehlen die posttranslationalen Modifikationen des Silaffin-1A₁, aber es zeigt weiterhin die Fähigkeit Kieselsäure bei pH-Werten ≥ 7 und unter Umgebungsbedingungen (Raumtemperatur und -Normaldruck) zu präzipitieren.^[80b] Des Weiteren wurde dieses Silaffin-1A₁-Analogon mit 1, 3-Propyldiamin C-terminal modifiziert, sodass dieses insgesamt eine zusätzliche positive Ladung trägt. Auf die Synthese dieser Silaffin-1A₁-Modifikation wird im Abschnitt 2.10 eingegangen.

Die NMR-Methode bietet einige Vorteile. So kann neuen Fragestellungen wie z.B. „wird das Amin bei der Präzipitatbildung immer vollständig verbraucht?“ Oder „was geschieht mit dem schlechteren Präzipitator?“ nachgegangen werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass man aufgrund der NMR-Sensibilität im Vergleich zu anderen Methoden deutlich geringere Substanzmengen einsetzen muss. Ebenfalls überzeugend ist die Tatsache, dass sich der Fällungsprozess dynamisch beobachten lässt. So kann man den Verbrauch des Moleküls während der Fällung, als auch die Hydrolyse von TMOS anhand der Signalintensitäten quantifizieren. Zusätzlich lässt sich durch die Veränderung der chemischen Verschiebung bzw. der Halbwertsbreite eines ausgewählten Signals, die Viskosität der Lösung (Gel oder Präzipitat) oder die Änderung des pH-Wertes überwachen. Im direkten Vergleich zu einem auf Präzipitanalyse basierenden Experiment zeigt sich durch die Zeitersparnis ein weiterer Vorteil. Dennoch stellt die NMR-Methode keinen Ersatz für die Präzipitat Quantifizierungsmethode dar. Durch die Vielzahl der zuvor beschriebenen Parameter, die mittels NMR-Methode kontrolliert werden können und durch die Möglichkeit das erhaltene Präzipitat im

Rahmen eines Konkurrenzexperimentes im Hinblick auf den besseren Präzipitator zu untersuchen, erweist sich diese Methode jedoch als interessante Ergänzung.

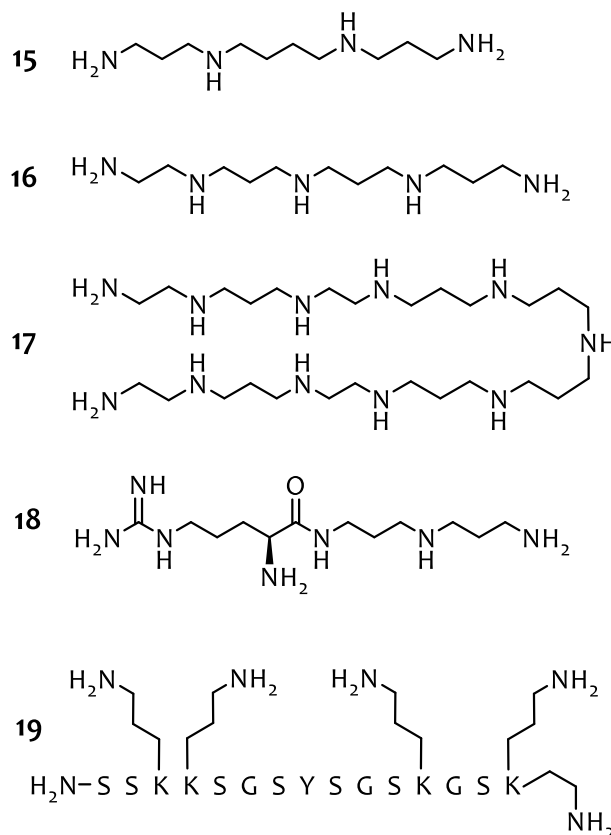


Abbildung 52: Verbindungen, die bei Untersuchungen der chemoselektiven Silifizierung verwendet wurden. Bei Verbindung 15 handelt es sich um das käuflich erworbene Tetraamin-Spermin. Oligoamine 16 und 17 wurden nach der in Abschnitt 2.8.1 beschriebenen Methode hergestellt. Toxin sFTX-3.3 ist ein Kondensationsprodukt aus Arginin und Bis(3-aminopropyl)amin s. Kapitel 2.7.1). Bei der Verbindung 19 handelt es sich um ein C-terminal modifiziertes R5-Peptid, auf dessen Synthese in Kapitel 4 detailliert eingegangen wird.

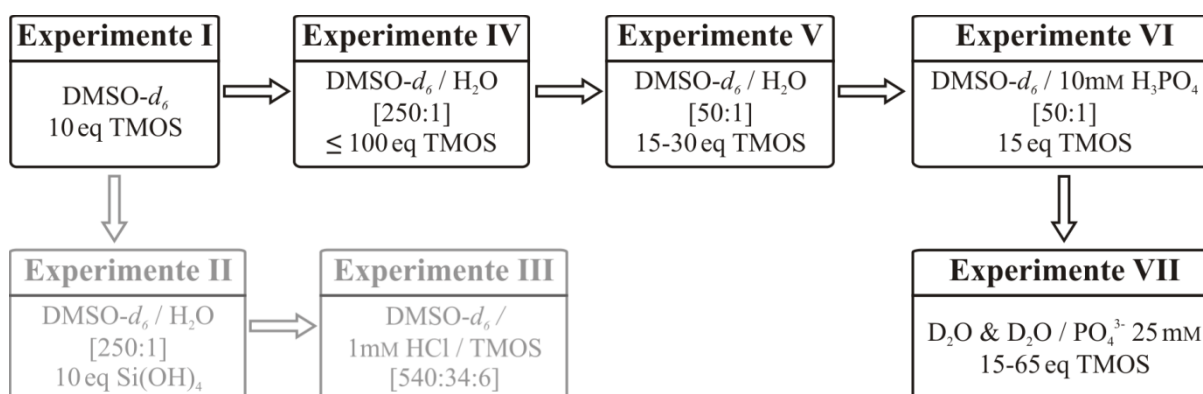
Optimierungen zu dem von FUJITA vorgeschlagenen Fällungsexperiment

Da bereits von FUJITA^[169] *et al.* *in-vitro* Fällungsexperimente mittels ¹H-NMR überwacht und quantifiziert wurden, waren die in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Bedingungen der Ausgangspunkt für die Entwicklung eines *in-vitro* Experimentes zur chemoselektiven Silifizierung. Der Entwicklungsprozess der finalen Experimente ausgehend von der Arbeit von FUJITA^[169] *et al.* ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

Alle hier beschriebenen Experimente wurden an einem 300 MHz NMR-Spektrometer der Firma Bruker (Bruker AV-300) bei 300 K durchgeführt. Für die Optimierung der experimentellen Bedingungen wurde das kommerziell erhältliche Polyamin-Spermin sowie dessen TFA-Salz verwendet. Die in der Arbeit von FUJITA *et al.* beschriebenen experimentellen Bedingungen gehen von einem Lösungsmittelgemisch von DMSO-*d*₆/CDCl₃ (1:9) und 170 eq TMOS als Orthokieselsäure Quelle aus.^[169]

Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

Schema 20 zeigt, wie sich die experimentellen Bedingungen von den Experimenten I bis hin zu den finalen Experimenten VII entwickelt haben. Im Folgenden werden kurz das Vorgehen und die Ergebnisse der Experimentalblöcke vorgestellt.



Schema 20: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Entwicklung des zielführenden *in-vitro* Experiments zur chemoselektiven Silifizierung (schwarzer Entwicklungsverlauf). Der transparente Entwicklungsverlauf verwendet vollständig vorhydrolysiertes TMOS (Si(OH)₄) wurde aber aufgrund der schwierigen experimentellen Handhabbarkeit nicht weiter verfolgt.

Experimente I

Eine konstant niedrige Konzentration an Orthokieselsäure, ähnlich den nativen Bedingungen ist für die chemoselektive Silifizierung vorteilhaft. Um eine konstante Freisetzung von Orthokieselsäure aus TMOS zu gewährleisten, wurde anfangs ein organisches Lösungsmittel, welches die TMOS Hydrolyse verlangsamt, ausgewählt. Aufgrund der besseren Löslichkeit der Polyamine und Silaffin-1A₁-Derivate wurde DMSO-*d*₆ und nicht CDCl₃ verwendet. Um den nativen Bedingungen ähnlicher zu werden als FUJITA *et al.*^[169] wurde ein deutlich geringerer Überschuss von 10 eq TMOS eingesetzt. Bei diesen Fällungsexperimenten konnte keine Präzipitat- oder Gelbildung (Selbstaggregation von Orthokieselsäure) beobachtet werden. Es wurde ermittelt, dass 0.01 mmol der organischen Substanz (Polyamin bzw. Peptid) für jedes NMR-Fällungsexperiment ausreichen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von TMOS unter diesen Bedingungen zu stark verlangsamt wird und auch nach mehreren Tagen unvollständig ist.

Inspiziert durch die Arbeit von FUJITA *et al.*^[169] wurde nun das Lösungsmittel verändert und für die nächsten Experimente eine Mischung aus DMSO-*d*₆/H₂O [250:1] verwendet. Zusätzlich wurde jedes Experiment mit 20 µL einer 1%igen TSP Lösung versetzt, welche als interner Standard fungiert, da sie nicht an der Präzipitatbildung beteiligt ist.

Experimente II & III

Bei den Experimenten II bzw. III wurde zusätzlich nicht nur mit Wasser, sondern auch mit vorhydrolysiertem TMOS (Si(OH)₄) gearbeitet, um zu überprüfen, ob sich der direkte Einsatz

Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

von Si(OH)_4 positiv auf die Präzipitatbildung auswirkt. Bei den verwendeten Polyamin- und Silaffin-TFA-Salzen konnte unter diesen Bedingungen keine Präzipitat- oder Gelbildung festgestellt werden. Nur bei Spermin tritt nach ca. einer Stunde eine Gelbildung ein. Aufgrund der schwierigen experimentellen Handhabbarkeit von Si(OH)_4 , welches bereits bei der langsamen Vorhydrolyse über mehrere Tage zur Selbstaggregation neigt und der Tatsache, dass keine Präzipitatbildung eintrat, wurde diese Vorgehensweise nicht weiter verfolgt.

Zusätzlich wurde die saure Hydrolyse von TMOS zur Orthokieselsäure unter den experimentalen Bedingungen III analysiert. Im Detail wurde ein definiertes Volumen TMOS mit 1 mM HCl und $\text{DMSO-}d_6$ im Verhältnis 6/34/540 (v/v/v) versetzt und die Reaktion über längere Zeit NMR-spektroskopisch verfolgt. Die Hydrolyse verlief langsam und war nach 19 Stunden annähernd vollständig. Unter Abspaltung von vier Äquivalenten Methanol führt TMOS-Hydrolyse zur Ausbildung von Orthokieselsäure. Die Abspaltung erfolgt nicht konzertiert, sondern schrittweise wodurch drei Hydrolyse-Intermediate $\text{Si(OMe)}_3(\text{OH})$, $\text{Si(OMe)}_2(\text{OH})_2$ und Si(OMe)(OH)_3 auftreten, die so stabil sind, dass sie NMR-spektroskopisch quantifiziert werden können, wie in Abbildung 53 gezeigt ist. Die Intensität der Hydrolyse-Intermediate nimmt im selben Verhältnis ab, wie das Methanol Signal zunimmt.

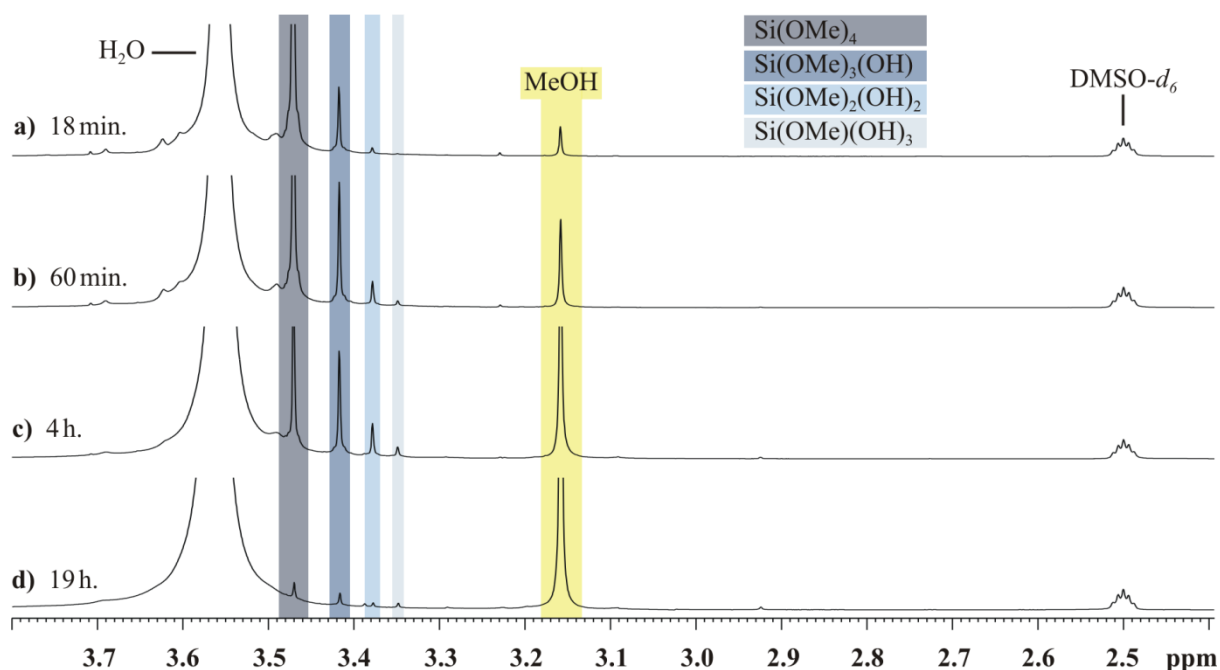


Abbildung 53: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6/\text{H}_2\text{O}$ [540:34], 300 K) der TMOS-Hydrolyse in $\text{DMSO-}d_6$. Die Spektren a - d zeigen den zeitlichen Verlauf der Hydrolyse. Farblich hervorgehoben sind vier TMOS-Derivate, die während des Hydrolyseprozesses quantifiziert werden konnten.

Experimente IV

Wie bereits beschrieben, wurden die experimentellen Bedingungen geändert, indem man DMSO-*d*₆/H₂O [250:1] als Lösungsmittel und 1%ige Natriumtrimethylsilylpropionat-(TSP)-Lösung (in DMSO) als internen Standard verwendete. Zusätzlich wurde die eingesetzte TMOS-Menge auf 100 eq erhöht, damit diese für eine Präzipitatbildung ausreicht. Bei den verwendeten Polyamin- und Silaffin-TFA-Salzen konnte unter diesen Bedingungen keine Präzipitat- oder Gelbildung festgestellt werden. Dies liegt daran, dass aufgrund der sehr langsamen Hydrolyse von TMOS, die auch nach fünf Tagen noch unvollständig ist, zu wenig Orthokieselsäure für eine Präzipitatbildung im System vorliegt. Da die Anwesenheit von Wasser einen limitierenden Faktor in der TMOS-Hydrolyse darstellt, wurden nachträglich 5 Vol.% Wasser zu den Fällungsexperimenten hinzugefügt. Hierdurch wurde die Hydrolysegeschwindigkeit erhöht, dennoch verlief sie immer noch zu langsam. Bei den Polyamin- und Silaffin-TFA-Salzen konnte auch unter diesen Bedingungen keine Präzipitat- oder Gelbildung beobachtet werden. Spermin zeigte sowohl separat als auch in Konkurrenzexperimenten unter diesen, neuen Bedingungen eine Gelbildung. Aufgrund der großen TMOS Menge handelt es sich hierbei ausschließlich um die Selbstaggregation von Orthokieselsäure (Gelbildung), die sogenannte Hintergrundreaktion, welche die Konkurrenzreaktion zur Präzipitatbildung darstellt. Zur Gelbildung kommt es besonders dann, wenn die Konzentration an Si(OH)₄ bei pH 7 mehr als $c = 1.0 \text{ M}$ beträgt.^[91]

Experimente V

Aufgrund der Erkenntnisse aus den Experimenten IV wurde der Wasseranteil in der Stammlösung auf DMSO-*d*₆/H₂O [50:1] erhöht. Um die Hintergrundreaktion zu unterdrücken wurde die TMOS Menge auf 15-30 eq reduziert, wodurch die resultierende Konzentration an Orthokieselsäure deutlich weniger als $c = 1.0 \text{ M}$ betrug. Bei den Experimenten mit Spermin konnte unter diesen Bedingungen keine Präzipitat- sondern ausschließlich Gelbildung beobachtet werden. Eine vollständige Hydrolyse von TMOS wurde in diesem Lösungsmittel etwa nach 24 h beobachtet.

Experimente VI

Da aus früheren Arbeiten bekannt war, dass für die Ausbildung eines Präzipitates die Anwesenheit multivalenter Anionen (z.B. Phosphationen) essenziell ist,^[124,125] sollten die experimentellen Bedingungen der Versuchsreihe V entsprechend angepasst werden. Zu diesem Zweck wurde eine neue Stammlösung, bestehend aus DMSO-*d*₆/10 mM H₃PO₄ im Verhältnis [50:1], angesetzt. Die TMOS-Menge wurde mit 15 eq weiterhin möglichst gering gehalten. Die Hydrolyse verlief langsam und wurde in Gegenwart von Spermin beschleunigt.

Bei verwendeten Polyamin- und Silaffin-TFA-Salzen konnte unter diesen Bedingungen keine Präzipitat- oder Gelbildung festgestellt werden. Das Amin-Spermin zeigte sowohl separat als auch in Konkurrenzexperimenten mit Silaffin-1A₁-Derivaten eine Präzipitatabildung, die als Erstes eintrat, bevor sie im weiteren Reaktionsverlauf von Hintergrundreaktion überlagert wurde.

Zu den Experimenten die auf DMSO-*d*₆ als Lösungsmittel basieren, lässt sich zusammenfassend sagen, dass auch dieses organische Lösungsmittel nicht besonders gut für die Durchführung der Fällungs-Experimente geeignet ist. Zwar ließ sich TMOS-Hydrolyse durch die gezielte Erhöhung des Wasseranteils beschleunigen, konnte jedoch nicht immer reproduziert werden. Die TMOS-Hydrolyse, die hierbei als entscheidender Faktor berücksichtigt werden muss, blieb also bei allen, in DMSO-*d*₆ durchgeführten Experimenten eine Variable, die einen unmittelbaren Einfluß auf den Verlauf sowie Reproduzierbarkeit der Fällungsexperimente hatte. Außerdem förderte die langsame TMOS-Hydrolyse eine unerwünschte, begleitende Gelbildung, die ebenfalls die Ergebnisse der Fällungsexperimente im gewissen Maße verfälschte. Ein weiterer wichtiger Nachteil von DMSO-*d*₆ bestand darin, dass die für eine erfolgreiche chemoselektive Silifizierung notwendige Einstellung des pH-Wertes unter diesen Bedingungen nicht möglich war.

Experimente VII

Aufgrund der oben diskutierten Nachteile von DMSO-*d*₆ wurden die experimentellen Bedingungen so geändert, dass D₂O zum Hauptbestandteil des für Fällungsreaktionen eingesetzten Lösungsmittels verwendet wurde. Diese Veränderung hat im Vergleich zu den bereits durchgeführten NMR-Experimenten in DMSO-*d*₆ einen entscheidenden Vorteil: die TMOS-Hydrolyse kann hierdurch drastisch beschleunigt werden. Darüber hinaus kann der pH-Wert der Lösung einfacher eingestellt und kontrolliert werden. Zusätzlich sorgt der Einsatz von D₂O für Verhältnisse, die den natürlichen Bedingungen der Kieselsäurefällung wesentlich mehr ähneln als die in DMSO-*d*₆.

Die TMOS-Menge wurde konstant bei 15 eq und Stoffmenge bei 0.01 mmol gehalten. Die Hydrolyse verlief schnell und war meist nach einer Stunde vollständig. Sowohl das verwendete Spermin- als auch Silaffin-TFA-Salz zeigten unter diesen Bedingungen keine Präzipitat- dafür aber eine Gelbildung. Dies liegt vermutlich an dem sauren pH-Wert (pH 4-6), der durch die TFA-Salze hervorgerufen wird. Unter diesen Voraussetzungen ist Spermin nicht in der Lage, SiO₂ zu präzipitieren, wodurch eine Gelbildung begünstigt wird. Durch weitere Fällungsexperimente wurde festgestellt, dass das freie Spermin sowie Spermin-TFA-

Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

Salz in reinem D₂O ab pH 8 SiO₂ ohne Gelbildung präzipitieren. Zusätzlich wurde reine Hydrolyse von TMOS in D₂O bei pH 6 analysiert. Sie verläuft deutlich schneller als die Hydrolyse in DMOS-*d*₆/H₂O und ist nach 3.5 h vollständig. Dennoch kann man ebenfalls die einzelnen Zwischenstufen der Hydrolyse beobachten, wie in Abbildung 54 gezeigt ist.

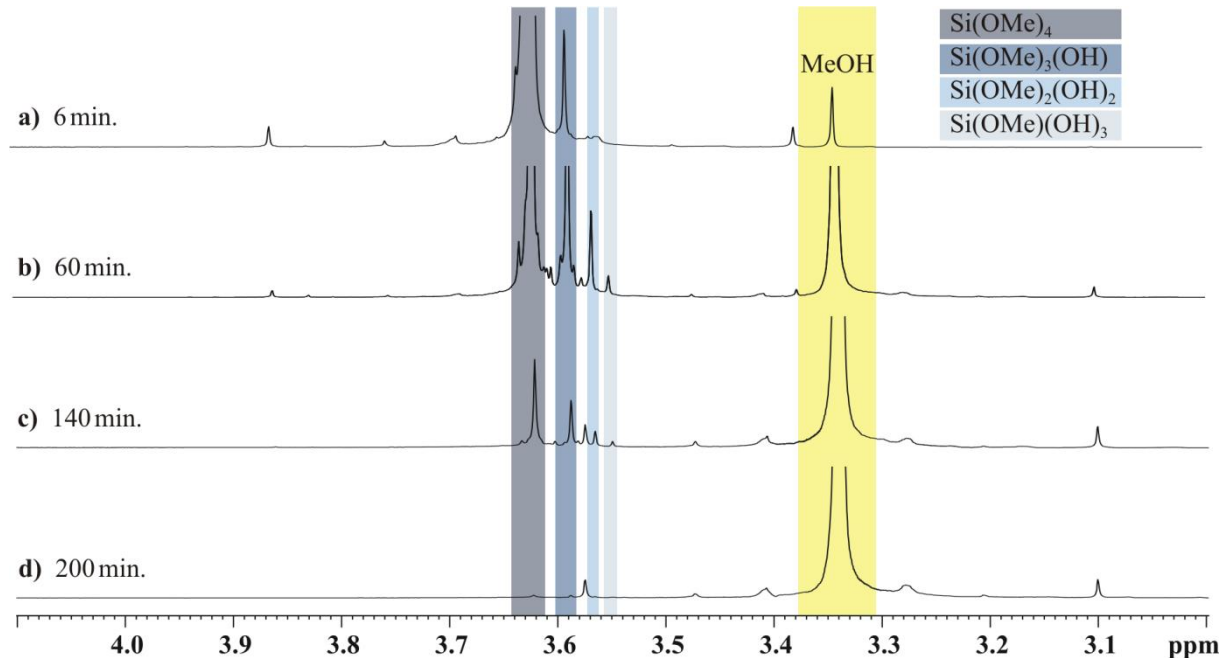


Abbildung 54: ¹H-NMR-Spektren der TMOS-Hydrolyse in D₂O (300 MHz, D₂O, pH 6, 300 K). Die Spektren a – d zeigen den zeitlichen Verlauf der Hydrolyse. Farblich hervorgehoben sind vier TMOS-Derivate, die während der Hydrolyse quantifiziert werden konnten.

Um den nativen Bedingungen der chemoselektiven Biosilifizierung noch mehr getreu zu werden, wurden weitere Experimente in einem 25 mM D₂O/Phosphat-Puffer (KH₂PO₄/K₂HPO₄) bei pH 7 durchgeführt. Durch diese Veränderung wird nicht nur die Einstellung des pH-Wertes erleichtert, sondern eine konstante Quelle für die Präzipitatbildung erforderlichen Phosphationen geschaffen. Unter diesen Bedingungen verläuft die Hydrolyse am schnellsten, sodass nach weniger als fünf Minuten TMOS vollständig hydrolysiert vorliegt. Durch Fällungsexperimente mit kommerziellem Spermin bei einem pH ≥ 10 wurde festgestellt, dass es keinen Unterschied ausmacht, ob die komplette, für die Reaktion vorgesehene TMOS-Menge auf einmal oder schrittweise (< 10 eq) zugegeben wird. Die gebildete Orthokieselsäure wird solange zu Präzipitatbildung verwendet, bis die organische Komponente vollständig ausgefällt ist.

Um verschiedene Parameter während der Messung zu quantifizieren, kamen bei den finalen experimentellen Bedingungen zwei interne Standards zum Einsatz. Als erster interner Standard diente auch hier 2%ige TSP-Lösung (in D₂O). Natriumtrimethylsilylpropionat (TSP) wurde bei allen, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-spektroskopischen

Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

Untersuchungen zur chemoselektiven Fällung verwendet. Die Wahl ist nicht zufällig auf TSP als Referenzverbindung gefallen. Dieser Standard überzeugt mit einer Reihe gewichtiger Vorteile: TSP ist NMR-aktiv und besitzt eine niedrige Frequenz der chemischen Verschiebung, ist löslich sowohl in organischen Lösungsmitteln, als auch in Wasser und ist zudem inert gegenüber anderen zu untersuchenden Komponenten und bei ausgesuchten Reaktionsbedingungen. Darüber hinaus lässt sich TSP als Marker für die mikroskopische Viskosität einsetzen. Da die mikroskopische Viskosität mit der makroskopischen Viskosität korreliert, lässt sich anhand einer Linienverbreiterung des TSP-Signals, die typisch für eine Gelbildung ist, Rückschlüsse auf die Zähflüssigkeit der Probe ziehen. Wie aus Abbildung 55 ersichtlich wird, zeigt sich die Gelbildung durch einen signifikanten Anstieg der Halbwertsbreite und lässt sich dadurch quantifizieren.

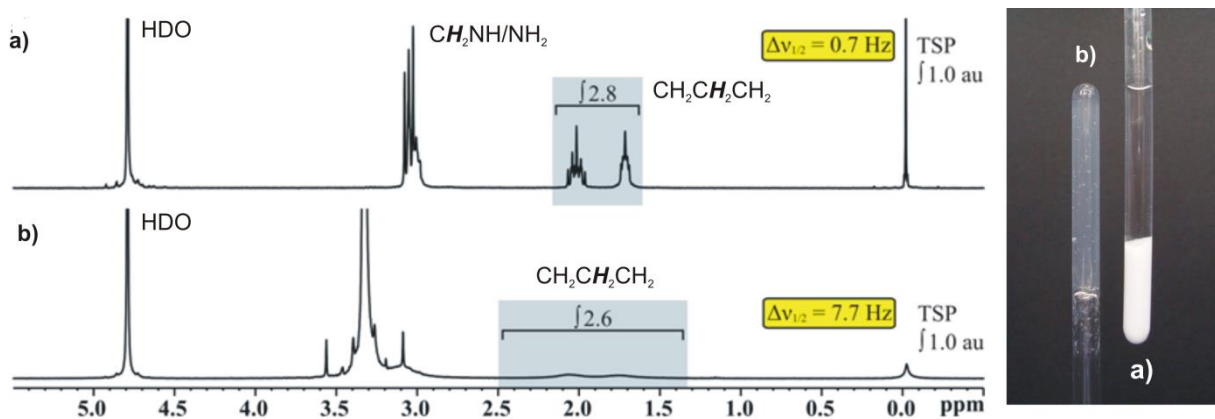


Abbildung 55: Anhand zweier Ausschnitte aus den ¹H-NMR-Spektren (300 MHz, D₂O, 300 K, pH 7-8) von Spermin (15) wird Gelbildung demonstriert. Durch den Anstieg der Halbwertsbreite des TSP-Singulett in der ausgegelten Probe (b) im Vergleich zur flüssigen Probe (a) lässt sich die Gelbildung gut erkennen. Die gemessenen Werte der Halbwertsbreite ergeben einen signifikanten Anstieg um den Faktor 11.

Bei der Suche nach einem alternativen Präzipitatbildner wurde Ausschau nach einer weiteren Referenzverbindung gehalten. Als zweiter Standard wurde zunächst Phenylalanin einbezogen, bevor dieser durch das besser geeignete Histidin ersetzt wurde.

Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

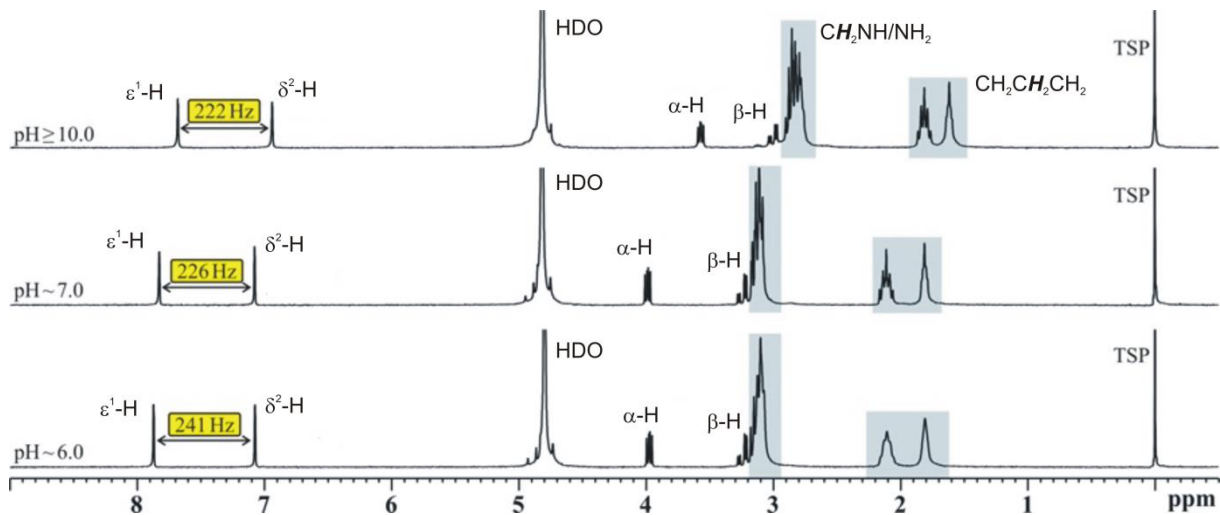
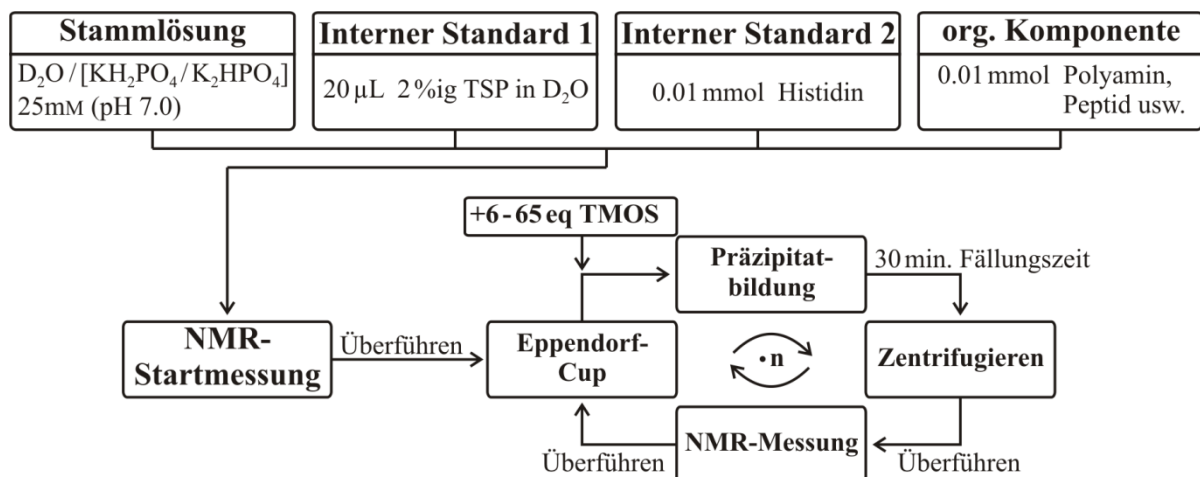


Abbildung 56: Beobachtete Signalaufspaltung der Imidazol-Signale in unterschiedlichen pH-Bereichen. Gezeigt sind ^1H -NMR-Spektren des Spermins (15), dem Histidin als pH-Marker zugesetzt wurde. Bei tieferen pH-Werten steigt die Aufspaltung, bei höheren- nimmt sie hingegen ab.

Histidin genießt im Vergleich zum Tyrosin einen entscheidenden Vorteil in dem es sich nicht nur als Negativkontrolle bei den zu untersuchenden Fällungsexperimenten, sondern auch als pH-Marker einsetzen lässt. Anhand des Signalabstandes der Imidazol-Singulets lassen sich die bedeutenden Veränderungen im pH-Bereich während der chemoselektiven Kieselsäurefällung detektieren.^[170] Mit der zunehmenden Aufspreizung der Histidin-Signale geht eine Senkung des pH-Wertes einher (s. Abbildung 56). Bei den finalen Bedingungen wurden also nicht nur zwei für die Messungen relevante interne Standards eingesetzt, die Überwachung mehrerer Parameter erlauben, sondern auch die wesentlich reduzierten TMOS-Mengen (5-65 eq), wobei die Stoffmenge der zu untersuchenden Substanz mit ca. 0.01 mmol gleich geblieben ist. Fällungsexperimente wurden mit fünf verschiedenen Substanzen (s. Abbildung 52) nach dem in Schema 21 gezeigten Fällungsprotokoll wie folgt beschrieben durchgeführt.



Schema 21: Schematische Darstellung des Fällungsprotokolls. Gezeigt ist mit dem Verlauf der Pfeile wie ein chemoselektives Fällungsexperiment abläuft bis die gesamte organische Komponente präzipitiert ist.

Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

Zu Beginn wurden möglichst exakt 0.01 mmol des internen Standards Histidin eingewogen, bevor die gewünschten Mengen der zu untersuchenden Polyamine bzw. Silaffin-1A₁-Derivate hinzugefügt werden. Die Substanzen wurden anschließend in 1 mL 25 mM D₂O/Phosphat-Puffer gelöst und mit 20 µL 2%iger TSP Lösung in D₂O versetzt. Danach wurde der pH-Wert der resultierenden Lösung mit 1 mM TFA-Lösung bzw. K₂HPO₄ auf den gewünschten Wert (pH ≈ 7) eingestellt. Von dieser Lösung wurde eine NMR-Startmessung aufgenommen. Über die genau eingewogene Stoffmenge von Histidin werden mittels des ¹H-NMR-Spektrums die entsprechenden Stoffmengen der Polyamine bzw. Silaffin-1A₁-Derivate bestimmt. Anschließend wurde die Lösung vollständig in ein „Eppendorf-Cup“ überführt und dort mit 5 - 65 eq TMOS versetzt. Nach Beginn der Präzipitatbildung blieb die Lösung für 30 Minuten stehen, bevor das erhaltene Präzipitat durch Zentrifugieren entfernt wurde. Der erhaltene Überstand wurde erneut NMR-spektroskopisch analysiert. Der Fällungsprozess im „Eppendorf-Cup“ wurde anschließend solange wiederholt bis das Polyamin bzw. Silaffin-1A₁-Derivat vollständig präzipitiert ist. Während des Fällungsprozesses konnte der pH-Wert kontrolliert und wie zuvor beschrieben gegebenenfalls wieder eingestellt werden.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass das Polyamin-Spermin nicht in der Lage ist, bei einem pH von ≤ 7.5 ohne gleichzeitige Gelbildung, Silikat zu präzipitieren.^[171] Es konnten bestenfalls 50% des Spermin inkorporiert werden, während die restlichen die Gelbildung vollzogen. Diese Gelbildung wird auch durch die Halbwertsbreite des TSP Singulets bestätigt, welche sich um den Faktor 7 erhöht (s. Abbildung 56). Bei einem pH ≥ 9.0 präzipitierte auch Spermin Silikat, ohne dass die Gelbildung einsetzt. Drei typische Ergebnisse der Fällungsexperimente mit Spermin bei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 57 dargestellt.

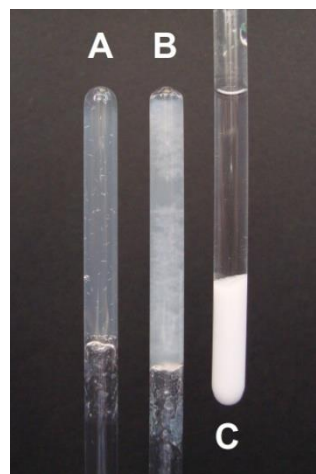


Abbildung 57: Präzipitation von Orthokieselsäure mit dem kommerziell erhältlichen Spermin 15 im NMR-Röhrchen bei pH 6.5 (A), 7.0 (B) und 10.0 (C). **A** zeigt lediglich eine Gelbildung mit Trübung, **B** präsentiert eine Präzipitat- und Gelbildung, während **C** die Bildung eines Präzipitats vorweist (Beilstein J. Nanotechnol., 2015, 6, 103-110).

Mit den in Abbildung 52 gezeigten Verbindungen (**15** & **16-19**) wurden Fällungsexperimente unter den finalen Bedingungen durchgeführt. Alle fünf Verbindungen sind in der Lage, Orthokieselsäure ohne eine begleitende Gelbildung zu präzipitieren. Hierbei wurde festgestellt, dass nur Spermin (**15**) nicht dazu befähigt ist, das Silikat bei pH-Werten unter 7.5 ohne Gelbildung auszufällen, alle anderen Verbindungen hingegen schon. Polyamin (**17**) fällt Silikat auch noch bei dem niedrigsten untersuchten pH-Wert von 5.5 quantitativ aus. Sowohl das Polyamin (**16**) als auch (**17**) wurden durch den Einsatz von 50 eq TMOS bei leicht sauren pH-Werten vollständig präzipitiert und in das Präzipitat eingebaut. Somit ergibt sich für beide ein Si/N Verhältnis von 50:1. Peptid (**19**) ist ebenfalls in der Lage, Orthokieselsäure bei einem pH von 6.8 sehr effektiv auszufällen, anhand des großen Si/N-Verhältnisses von 142:1 wird deutlich, dass es, im Vergleich zu den untersuchten LCPAs, in geringerem Maße in das Präzipitat eingebaut wird. Für eine vollständige Fällung aus der Lösung waren drei Zugaben von je 40 eq TMOS notwendig. Toxin (**18**) fällt Orthokieselsäure beim pH 7, zwei Zugaben von je 40 eq TMOS waren notwendig um eine vollständige Fällung mit einem Si/N-Verhältnis von 98:1 zu erhalten. Die Ergebnisse der untersuchten Fällungen mit den ausgesuchten Verbindungen (s. Abbildung 52) sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Das Präzipitationsverhalten von verschiedenen Molekülen wird bereits durch kleine Änderungen des pH-Wertes stark beeinflusst, weshalb die Einzel-Fällungsexperimente nur schwer miteinander vergleichbar sind. Darum wurden Konkurrenz-Fällungsexperimente entwickelt, die es ermöglichen, verschiedene Substanzen während der chemoselektiven Silifizierung miteinander zu vergleichen. Dabei wurden die oben beschriebenen experimentellen Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet. Kommerziell erhältliches Spermin (**15**) diente als Anhaltspunkt und Maßstab zur Bewertung der Präzipitationsfähigkeit anderer zu untersuchenden organischen Komponenten und ermöglichte darüber hinaus einen fairen Vergleich zwischen verschiedenen Fällungsexperimenten mit Eigenbeteiligung. Die Methode kann beliebig viele Verbindungen in Konkurrenz zueinander analysieren, solange sie im NMR-Spektrum anhand eines Signals unterschieden werden können. Die Konkurrenz-Fällungsexperimente zur Analyse der chemoselektiven Silifizierung wurden mit dem Peptid (**19**), Toxin (**18**) sowie dem kommerziell erhältlichen Spermin (**15**) als Referenz durchgeführt.

Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

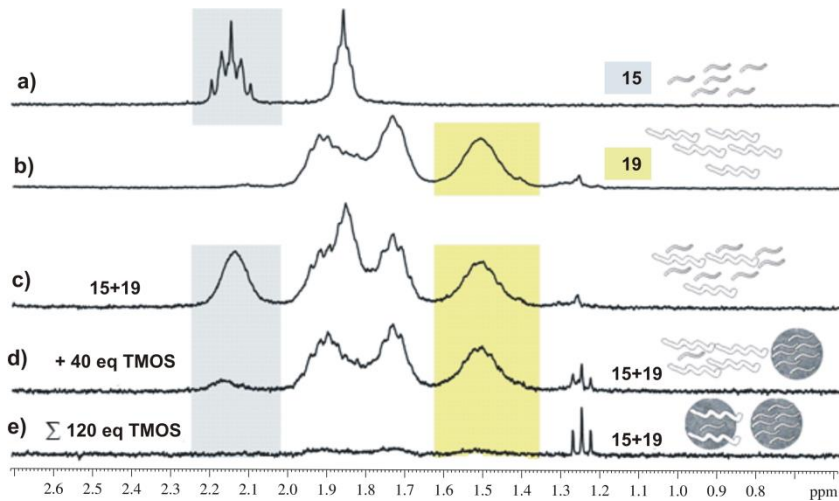


Abbildung 58: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, 25 mm D_2O / $(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4)$, pH 7, 300 K) von Spermin (15)-a), Peptid (19)-b), Mischung der beiden Verbindungen im Verhältnis 1:1 vor der TMOS-Zugabe-c). Die Spektren d) und e) dokumentieren die schrittweise Zugabe von TMOS und präsentieren die ablaufende chemoselektive Kieselsäurefällung. Die charakteristischen Methylgruppen für jede Verbindung sind farblich hervorgehoben. Triplett bei 1.09 ppm entspricht dem EtOH des im TMOS verbleibenden TEOS (Beilstein *J. Nanotechnol.*, 2015, 6, 103-110).

Das Teilspektrum a) zeigt Polyamin (15) und Teilspektrum b) Peptid (19) jeweils unabhängig voneinander vermessen. Spektrum c) zeigt die NMR-Startmessung der äquimolaren Mischung der beiden Substanzen, welche der Summen der beiden Einzelspektren a) und b) entspricht. Die charakteristischen Methylgruppen, die je einer Verbindung zugeordnet werden können, sind farblich hervorgehoben. Die chemoselektive Präzipitatbildung ist in Teilspektrum d) nach der ersten Zugabe von 40 eq TMOS dokumentiert. Die Methylgruppe des Polyamins (15) verliert an Intensität, was dessen Einbau in das Präzipitat demonstriert, während R5-Peptid (19) in Lösung verbleibt. Teilspektrum e) zeigt die vollständige Fällung beider Substanzen nach erneuter TMOS-Zugabe.

Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

Tabelle 5: Ergebnisse der Kieselsäurefällungen.

Verbindung	Si/N	Zufalls-Fehler*	TMOS-Äquivalente/ % präzipitierter Verbindung	$\Delta\nu_{1/2}$ -[Hz]	$\Delta\delta$ H ^δ -H ^ε (pH)
15	33:1	±0,3	16-39% (Gelbildung)	1.1-7	241 (6.0)
15	33:1	±0,3	16-41% (Gelbildung)	1.2-7	235 (6.8)
15	4:1	±0,45	16-0%	1.0-1.4	223 (11)
16	50:1	±0,25	50-0%	1.1-1.1	234 (6.8)
17	50:1	±0,25	50-0%	1.1-2.2	249 (5.5)
18	98:1	±0,55	40-32%; 40-0%	0.9-1.2	230 (7.0)
19	142:1	±0,34	40-81%; 40-34%; 40-0%	0.9-1.3	235 (6.8)
15+18 (1:1)	24:1	±0,85	7-39%(15), 74%(18); 7-28%(15), 66%(18); 14-15%(15), 35%(18); 30-0%(15), 0%(18)		224 (7.0)
15+19 (1:1)	80:1	±0,55	40-30%(15), 96%(19); 80-0%(15), 0%(19)		231 (7.0)
15+19 (1:2)	72:1	±0,35	28-72%(15), >98%(19); 28-0%(15), 77%(19)		248 (6.0)

*Der Zufallsfehler ist hauptsächlich auf die dem Signal-zu - Rausch-Verhältnis geschuldeten Ungenauigkeiten beim Ablesen der Integrale zurückzuführen. Der experimentelle Fehler wächst parallel zur TMOS-Zugabe aufgrund des abnehmenden Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. In der letzten Spalte sind die anfänglichen Aufspaltungen der Imidazol-Signale dokumentiert, die mit den beobachteten pH-Werten korrelieren (*Beilstein J. Nanotechnol.*, 2015, 6, 103-110).

Das Experiment mit der Mischung aus Spermin (**15**) und Toxin (**18**) wurde im Verhältnis 1:1, bei pH 7 und einer Konzentrationen von je 5 µmol/mL durchgeführt. Durch anfängliche Zugabe von 7.0eq TMOS wurde das Gemisch NMR-spektroskopisch titriert. Nach der ersten TMOS-Zugabe sind nur noch 39% Spermin (**15**) und 74% Toxin (**18**) in Lösung verblieben. Durch die weiteren Zugaben von insgesamt 58 eq TMOS konnten beide Verbindungen vollständig präzipitiert werden. In Abbildung 59 ist das durchgeführte chemoselektive Fällungsexperiment von Spermin (**15**) und Toxin (**18**) dargestellt.

Entwicklung von *in-vitro* NMR-Experimenten zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung

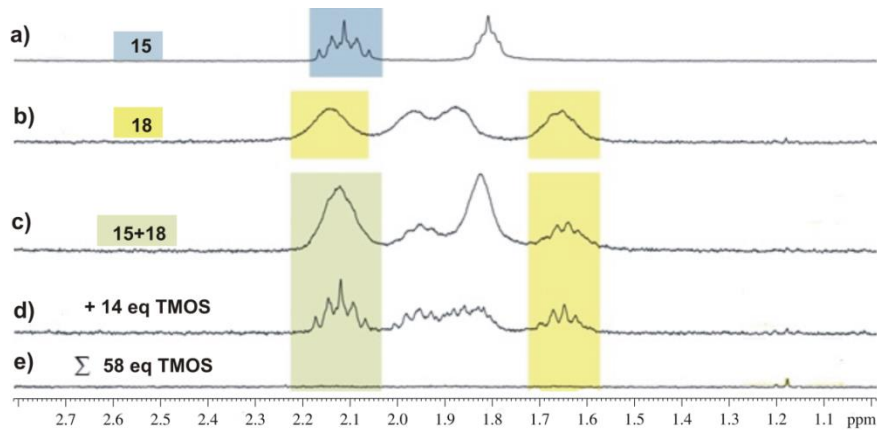


Abbildung 59: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, 25 mm $\text{D}_2\text{O}/(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4)$, pH 7, 300 K) von Polyamin (15) und Toxin (18) im Verhältnis [1:1]. Spektrum a) zeigt Spermin (15), Spektrum b)-Toxin (18) und Spektrum c) präsentiert die äquimolare Mischung der beiden Verbindungen bei pH 7 vor der TMOS-Zugabe. Die Spektren d) und e) dokumentieren die schrittweise Zugabe von TMOS und zeigen ablaufende chemoselektive Kieselsäurefällung. Die charakteristischen Methylen- und Methylgruppen für die jeweilige Verbindung sind farblich hervorgehoben.

Verglichen mit dem erst beschriebenen Konkurrenz-Fällungsexperiment scheint das Toxin (18) in Anwesenheit von Spermin (15) bessere Fällungseigenschaften als das R5-Peptid (19) zu besitzen und stellt somit auch einen besseren Präzipitator dar. Allerdings, ist die Chemoselektivität dieser Mischung weniger ausgeprägt als die von dem Spermin (15)/Peptid (19)-Gemisch. Sowohl das Spermin (15) als auch das untersuchte Toxin (18) werden vermutlich aufgrund der vorliegenden strukturellen Ähnlichkeit vergleichbar effizient immobilisiert. Während das kurze Amin (15) nicht in der Lage ist, bei pH-Werten unter 7.5 die Kieselsäure ohne begleitende Gelbildung auszufällen, lässt es sich in Kombination mit dem Peptid (19) bereits bei pH-7.0 vollständig in das Präzipitat inkorporieren s. Abbildung 60.

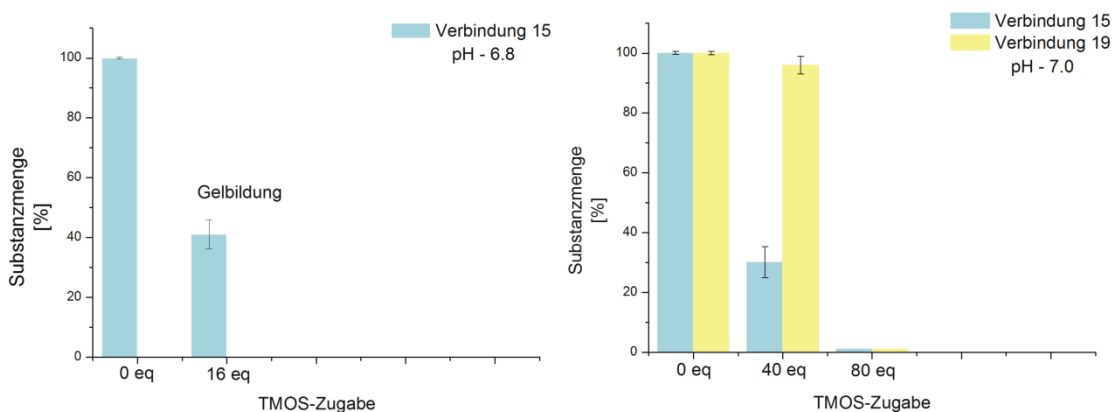


Abbildung 60: Kieselsäurefällung mit Spermin allein 15 (links) und in Gegenwart des Peptids 19 (rechts). Für einen besseren Vergleich entsprechen die Startbedingungen 100% der in Lösung vorliegenden Präzipitatbildner (Y-Achse) vor TMOS-Zugabe (X-Achse). Das linke Bild zeigt Spermin (15), das bei einem pH-Wert von 6.8 nicht in der Lage ist, ohne begleitende Gelbildung die Orthokieselsäure auszufällen. In Anwesenheit des R5-Peptids (19) in einem Verhältnis 1:1 (10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ jeweils) wird das Spermin (15) jedoch zusammen mit dem Konkurrenzmolekül bei pH 7.0 vollständig in das Präzipitat eingebaut.

Bevor aber die verlässlichen Aussagen hinsichtlich der positiven Kooperativität getroffen werden können, erfordert das beobachtete Verhalten des Spermins (**15**) in Gegenwart von R5-Peptid (**19**) weitführende Untersuchungen im Rahmen des hier entwickelten Fällungsexperimentes. Mit dem positiven Nachweis einer Kooperativität zwischen zwei Stoffklassen, den synthetischen LCPAs und Silaffin-Peptidanaloga, kann nicht nur die *self assembly*-Hypothese gestützt werden, sondern hiermit lassen sich womöglich wichtige Einblicke in die bis heute verborgenen Mechanismen der Kieselsäureabscheidung in Diatomeen gewinnen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte NMR-Methode eine solide Grundlage zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung *in vitro* darstellt. Die optimierten Fällungsbedingungen, die den nativen in gewissem Maße ähneln, ermöglichen es schnell und unkompliziert die Dynamik eines chemoselektiven Silifizierungsprozesses mittels ¹H-NMR-Routinemessung zu verfolgen. Dabei liefert diese Methode eine Fülle an Informationen, die neben rein qualitativen auch quantitative Aussagen bezüglich der zu untersuchenden Präzipitatbildner ermöglichen. Durch Integrieren interner Standards lassen sich zudem zahlreiche, für die Silifizierung relevante Parameter wie der pH-Wert oder Viskosität der Lösung während des Experimentes überwachen. Das erörterte Konkurrenz-Experiment, in dem mehrere Verbindungen in Hinblick auf die Präzipitatbildenden Eigenschaften gegeneinander antreten, eröffnet neue Möglichkeiten weiteren wichtigen Forschungsfragen wie zum Beispiel die der gegenseitigen Beeinflussung mit Fokus auf die positive Kooperativität nachzugehen. Die aufgezählten Vorteile machen die hier vorgestellte NMR-Methode zu einer vielversprechenden Ergänzung der Präzipitat-Quantifizierungsmethode, einem bereits etablierten analytischen Verfahren zur Untersuchung des Biosilifizierungsprozesses.

2.10 Synthese von Silaffin-1A₁-Derivaten

Die Silaffine verdanken ihren Namen ihrer außergewöhnlichen Affinität zu Siliziumoxid (*affinity for silica*) und nehmen in der Gruppe der organischen Makromoleküle, die in einem direkten Zusammenhang mit dem Prozess der Silica-Biomineralisation stehen, eine gesonderte Rolle ein. Zur Silaffin-Familie zählen stark homologe Peptide, die reich an Serin-, Lysin- und Glycin-Resten sind und durch ein einziges Vorläuferprotein, *sil1-p*, codiert werden. Diese Polypeptide mit Molekularmassen von 4 bis 17 kDa, die typischerweise in einer komplex posttranslational modifizierten Form vorkommen, sind unmittelbar an der Silica-Bildung in Kieselalgen beteiligt. In Abbildung 61 ist die Struktur des nativen Silaffin-1A₁ dargestellt.

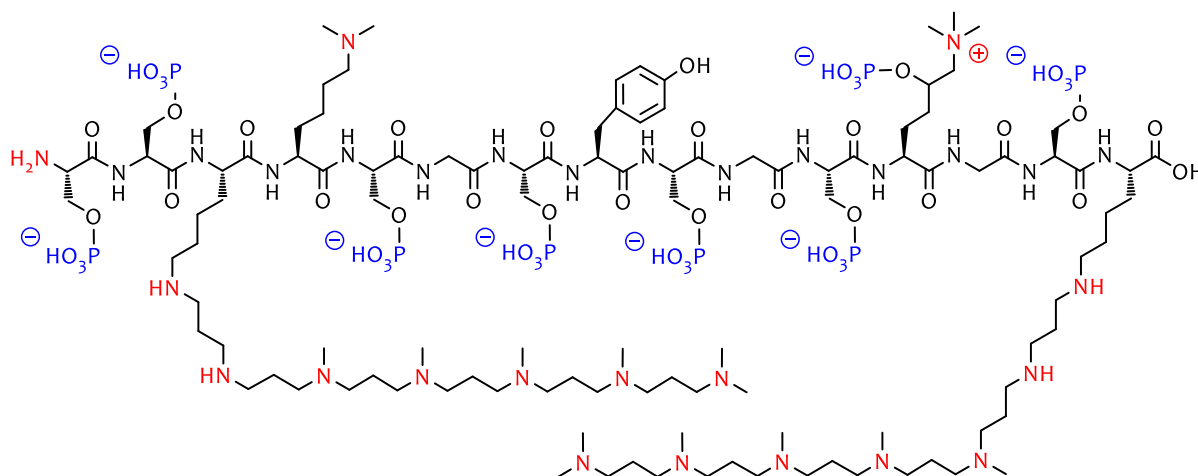


Abbildung 61: Struktur des nativen Silaffin-1A₁ aus der Diatomeen *C. fusiformis*. Farblich hervorgehoben sind die posttranslationalen Modifikationen, in blau die Phosphorylierungen und in rot die Alkylierungen der Lysin-Reste.

Wie bereits erwähnt (s. Abschnitt 2.3), besteht das native Silaffin-1A₁ aus fünfzehn Aminosäuren und weist eine Vielzahl an Serin- und Lysin-Resten auf. Es enthält drei posttranslationale Lysin-Seitenkettenmodifikationen: ϵ -*N,N*-Dimethyllysin in Position 4, phosphoryliertes ϵ -*N,N,N*-Trimethyl- δ -hydroxylysin in Position 12 und polyaminmodifizierte Lysine in Position 3 und 15. Die Polyamine sind kovalent an die Lysine gebunden und besitzen eine Länge von 6 bis 11 Aminopropylen-Wiederholungseinheiten bei dem fast jedes Amin alkyliert vorliegt. Zusätzlich ist im Silaffin jeder Serin-Rest phosphoryliert.^[80b] Die zahlreichen und vielfältigen posttranslationalen Modifikationen verleihen dem Silaffin-1A₁ eine zwitterionische Struktur, die als alleinige Ursache für die einzigartige Fähigkeit dieses Peptids *in vitro* Kieselsäurepartikel im Nanometerbereich zu präzipitieren, gilt. Der genaue Mechanismus der SiO₂ Abscheidung ist zwar noch nicht vollständig geklärt, aber zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass das native Silaffin-1A in Lösung mit seiner hoch-geladenen zwitterionischen Struktur für eine Phasentrennung sorgt, einem für Silica-Bildung essentiellen

Vorgang. Dabei wird die Ausbildung eines organischen Templates mit einem strukturierten Ladungsmuster von einem Selbstanlagerungsprozess (*self assembly*) begleitet. Dieser Prozess wird durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den kationischen Ladungen der langen Polyaminseitenketten und den anionischen Phosphoserin-Resten verursacht. Dies führt dazu, dass das native Silaffin-1A₁ in Lösung nicht monomer, sondern in größeren Aggregaten vorliegt, mit bis zu 700 Molekülen pro Aggregat.^[106] Es wird angenommen, dass die hohe Anzahl positiver Ladungen in den langen Lysin-Seitenketten Repulsionen verursacht, welche eine Zusammenlagerung zu größeren Aggregaten verhindern.^[106,122,124] Multivalente Anionen wie Phosphat verbrücken hingegen die Moleküle und führen durch den Phasenseparationsprozess zur Bildung eines einzigartigen mehrdimensionalen organischen Templates, um das herum die SiO₂-Abscheidung stattfindet.^[106] Alle Erkenntnisse, die bislang hinsichtlich der Präzipitat-bildenden Eigenschaften von Silaffin gewonnen wurden, verdeutlichen, dass die unterschiedlichen Ladungen und Funktionalitäten innerhalb der Silaffin-Sequenz perfekt aufeinander abgestimmt sind, um die Silica-Bildung in einer definierten Form zu erreichen.^[172] Neben einer Vielzahl an unterschiedlichsten Aminofunktionen wird die Präzipitations-induzierende Funktion dieses Naturstoffes durch die anionischen Phosphoserin-Reste vervollständigt.

Natives Silaffin-1A ist in der Lage, bei einem pH-Wert von 5.5 *in vitro* sphärische Siliciumdioxidpartikel aus einer Orthokieselsäure-Lösung zu präzipitieren.^[124] Eine Dephosphorylierung führt zum Verlust der Selbstaggregationsfähigkeit und damit der Fähigkeit Siliciumdioxid abzuscheiden. Ferner wird in Gegenwart einer externen Phosphatanionen-Quelle eine SiO₂-Abscheidung beobachtet.^[124,128] Das native Silaffin-1A ist in Phosphatpuffersystemen auch bei pH 4.2 in der Lage, SiO₂ abzuscheiden. Im Gegensatz dazu zeigt das nicht seitenkettenmodifizierte Silaffin-1A₁ (Peptid R5) nur bei neutralen bis leicht basischen pH-Werten eine Fällungsaktivität.^[80b, 124] Somit gehören diese Polypeptide (natSil-1A₁, natSil-1A₂ und natSil-1B) zu den einzigartigen Vertretern der Silaffin-Familie, die sowohl in Gegenwart multivalenter Ionen als auch in ihrer Abwesenheit SiO₂-Präzipitationsaktivität aufweisen.

2.10.1 Ergebnisse und Diskussion

2.10.2 Synthese und Charakterisierung einfacher Silaffin-1A₁-Derivate

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit, wurden in den letzten Jahren verschiedene totalsynthetische Ansätze zu komplexen LCPAs und Silaffinen entwickelt. Die Herstellung des nativen Silaffines-1A₁ ist trotz vieler Bemühungen bislang aufgrund der Komplexität

dieses Naturstoffes noch nicht gelungen.^[172] Die Präzipitations-induzierenden Eigenschaften der LCPAs sowie ihre Einflüsse auf die Morphologie des Präzipitates konnten im Laufe der vergangenen Jahre bereits eingehend erforscht werden.^[86,151,167,168] Die Rolle der Silaffine hingegen wurde bis heute nicht vollständig verstanden. Aus diesem Grund wächst naturgemäß das Forschungsinteresse an synthetischen Silaffin-1A₁-Analoga, die einerseits eine Funktionsanalyse natürlich vorkommender posttranslationaler Modifikationen ermöglichen und andererseits wichtige Erkenntnisse über das aufwendige Zusammenspiel elektrostatischer Wechselwirkungen liefern.

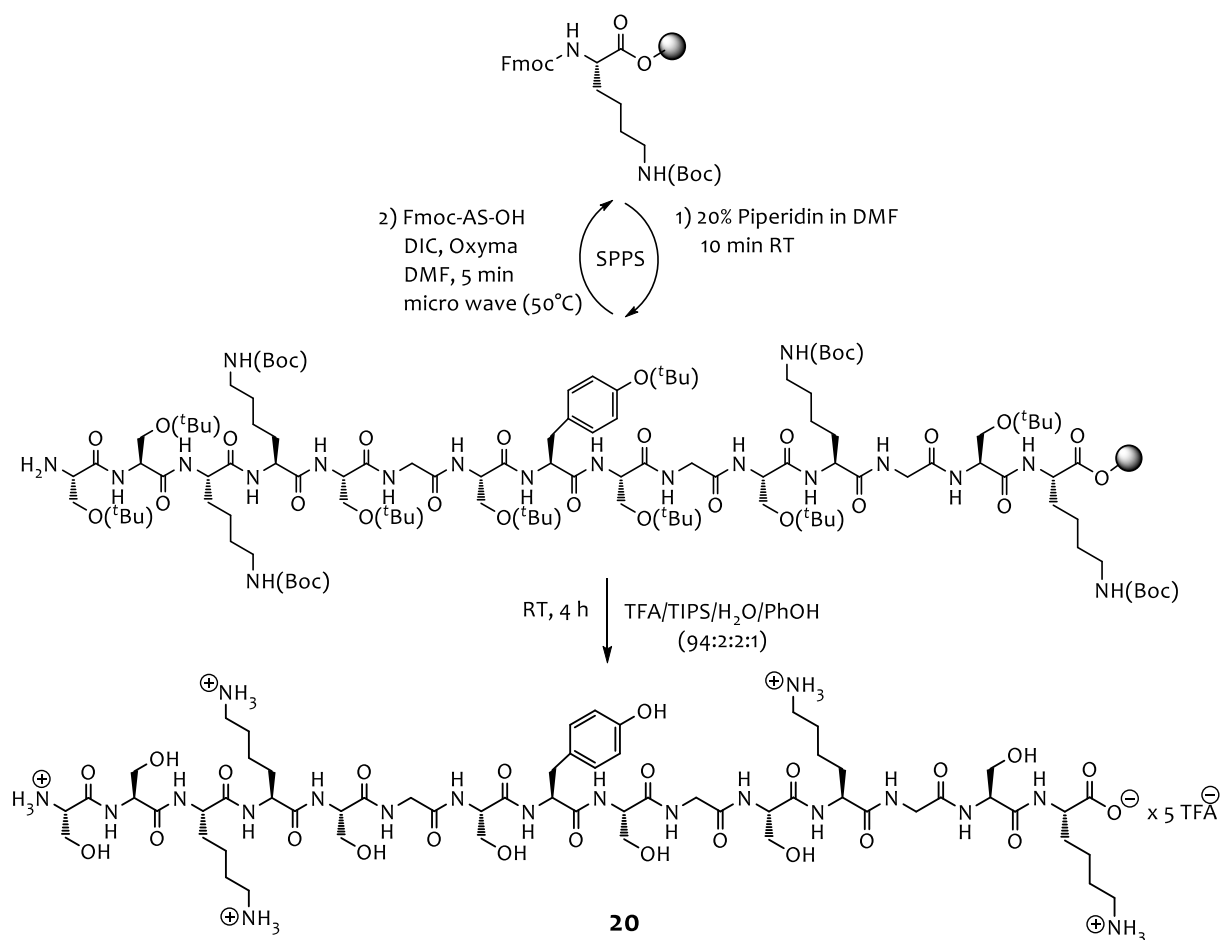
Wie es sich gezeigt hat, spielen die Lysin-Seitenketten des Silaffins bei der Kieselsäurekondensation eine entscheidende Bedeutung.^[173] Angesichts dieser Erkenntnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetische Strategien erarbeitet, die einen Zugang zu den synthetischen Silaffin-Varianten mit verschiedenen Lysinseitenketten-Modifikationen ermöglichen. Mit den synthetischen Silaffin-Derivaten sollte anschließend eine funktionelle Analyse hinsichtlich ihrer Silica-präzipitierenden Eigenschaften erfolgen. Dabei sollte festgestellt werden inwiefern die synthetischen Silaffin-Derivate sich als effiziente Silica-präzipitierende Agenzien verwenden lassen. Die im Rahmen dieser Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sollen zum besseren Verständnis des Biosilifizierungsprozesses beitragen und bei der Entwicklung neuartiger biotechnologischer Anwendungen helfen.

Für eine systematische Untersuchung des Einflusses von Silaffin-Modifikationen auf die Silica-präzipitierende Aktivität und Morphologie der entstehenden Silikate wird eine entsprechende Referenzverbindung als Ausgangspunkt ausgewählt. Als solche eignet sich die Aminosäuresequenz des unmodifizierten Silaffin-R5 am besten. Mithilfe dieser Sequenz können wesentliche Merkmale, die für Silica-präzipitierende Eigenschaften des nativen Silaffins maßgeblich sind, untersucht werden. Dank der einzigartigen Fähigkeiten dieses Peptids Kieselsäure auszufällen, lässt sich der Einfluss von stufenweise eingeführten Modifikationen auf die während der induzierten Silicatfällungen entstehenden Silica-Materialien messen. Für die ¹H-NMR *in vitro*-Untersuchungen der Silaffin-induzierten SiO₂-Fällungsreihe lassen sich mit R5-Peptid auch Startbedingungen definieren.

Aus den oben genannten Gründen sollte als erstes Derivat **16** das seitenkettenunmodifizierte Silaffin-1A₁ (Peptid R5) hergestellt werden. Als zweite Silaffin-Modifikation wurde eine leicht abgewandelte Form des R5-Peptids **15** geplant, bei welcher der C-Terminus mit 1,3-Propylendiamin derivatisiert werden sollte, sodass diese eine weitere primäre Aminofunktion und somit, in ihrer protonierten Form, auch eine zusätzliche positive Ladung erhält. Diese

optionale Modifikation diene in erster Linie der Prüfung auf die Eignung des 1,3-PropylenDiamins als Linker (PDA) für die automatisierte SPPS in Hinblick auf die Stabilität des am Harz gebundenen Amins gegenüber den Mikrowellenbedingungen. Die automatisierte SPPS, die in der Arbeitsgruppe routinemäßig am Mikrowellen-Peptid-Synthesizer (LIBERTY BLUE) durchgeführt wird, sollte dahingehend optimiert werden, dass einfache Silaffin-1A₁-Derivate zukünftig schnell, kostengünstig und vor allem zeitsparend und effizient hergestellt werden können.

Für die SPPS wurde auch hier das Polystyrol-2-Chlortritylchlorid-Harz (CTC) verwendet, welches eine theoretisch maximal erreichbare Beladung von 1.63 mmol/g. Für die Herstellung des polyaminkonjugierten Silaffin-Derivates **19** wurde das bereits beschriebene 1,3-Diaminopropan-Harz (PDA-Harz) verwendet (s. Abschnitt 1.3, Schema 1). Die Synthese der unmodifizierten R5-Silaffin-Sequenz **20** wurde im Gegensatz zu dem polyaminmodifizierten R5-PDA-Silaffin **19** mit dem Ankoppeln der C-terminalen, käuflich erworbenen, zweifach geschützten Aminosäure (Fmoc-(L)LysBoc-OH) auf CTC-Harz gestartet. Die Beladung der hierbei verwendeten Harze erfolgte manuell unter Standardbedingungen (s. allgemeine Arbeitsvorschriften, Kapitel 5). Um die gewünschten Peptidsynthesen in hoher Reinheit realisieren zu können, wurde eine Beladungsrate von 0.3 mmol/g bis 0.4 mmol/g angestrebt. Durch das Einhalten niedriger Beladungsraten und optimierte Beladungsbedingungen wurden die hauptsächlich durch PDA verursachten Quervernetzungen am CTC-Harz weitestgehend unterdrückt, was sich positiv auf die Ausbeuten auswirken sollte. Der Beladungsgrad wurde nach dem im Abschnitt 2.8 vorgestellten Verfahren ermittelt. Alle Festphasenpeptidsynthesen wurden basierend auf der Standard-Fmoc-Synthesestrategie am LIBERTY BLUE Mikrowellen-Peptid-Synthesizer automatisiert durchgeführt. Für die Aktivierung des Carboxyterminus wurden durchwegs DIC/Oxyma und DIPEA als Base verwendet. Die Fmoc-Abspaltungen wurden mit 25%igem Piperidin in DMF durchgeführt. In Schema 22 ist der Synthesepfad exemplarisch für das seitenkettenunmodifizierte Silaffin-1A₁-Peptid R5 **20** dargestellt, die genauen Reaktionsbedingungen sind dem Kapitel 5 zu entnehmen. Bei der Herstellung des Silaffin-Derivates **19** wurde zwar vom PDA-Harz ausgegangen (s. Schema 1), die weiteren Syntheseschritte erfolgten jedoch nach den in Schema 22 gezeigten Reaktionsbedingungen.



Schema 22: Synthesepfad für das seitenkettenunmodifizierte Silaffin-1A₁-Peptid **20** ausgehend vom L-Lysin-2-chlorotritylchlorid Harz.

Die Abspaltung der Silaffin-1A₁-Derivate **19** und **20** vom polymeren Träger erfolgte unter gleichzeitiger Seitenkettenentschützung durch die Behandlung des Harzes mit einer Abspaltlösung der folgenden Zusammensetzung: TFA/TIPS/H₂O/PhOH (94:2:2:1). Die genauen Abspaltbedingungen sind in Kapitel 5 zu finden. Die Peptide wurden aus den aufkonzentrierten Lösungen in kaltem absolutiertem Diethylether ausgefällt, gewaschen, getrocknet und lyophilisiert. Zur Reinigung wurden Peptide nach den in Kapitel 5 beschriebenen HPLC-Protokollen behandelt.

Die Charakterisierung der synthetisierten Silaffin-1A₁-Derivate erfolgte durch Kombination der 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie in einem Phosphat-Puffersystem (10 mM D₂O/KH₂PO₄/K₂HPO₄ [1:9]) sowie mittels MALDI-MS-Spektrometrie. Das TOCSY-Experiment erwies sich bei der Charakterisierung dieser Peptidsequenzen als besonders hilfreich. Die hergestellten Silaffin-1A₁-Derivate unterscheiden sich nur durch ein minimal verändertes C-terminales Ende und weisen somit nur geringe Unterschiede in den NMR-

Spektren auf, weshalb die strukturelle Charakterisierung von einem Derivat auf das andere übertragen werden kann.

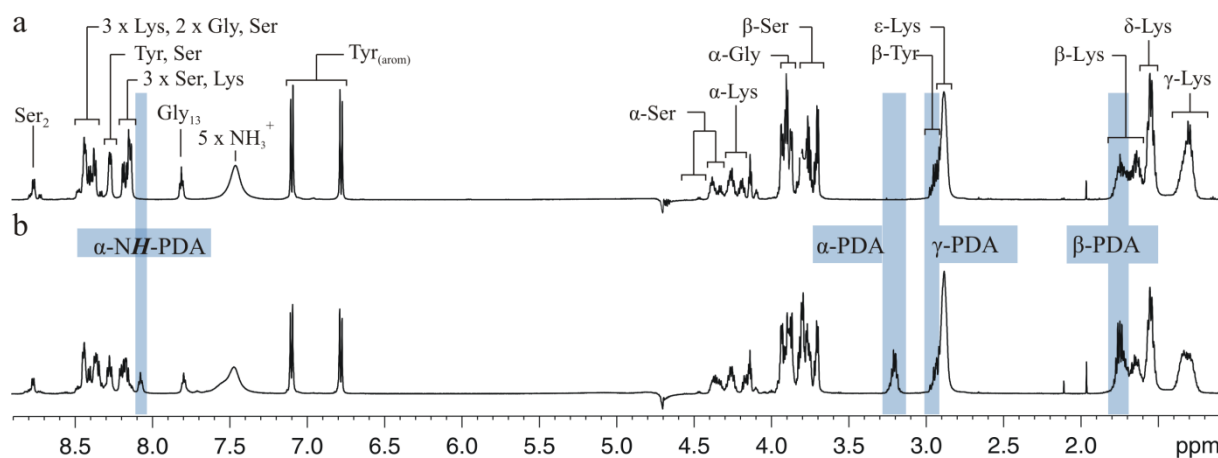


Abbildung 62: ¹H-NMR-Spektrenvergleich (600 MHz, D₂O/PO₄³⁻, pH≈4, 300 K). Silaffin-1A₁ (Peptid R5) **20** ist in Spektrum a) und Silaffin-1A₁ PDA (**19**) in Spektrum b) dargestellt. Farblich hervorgehoben sind die Signalsätze, die die Peptide voneinander unterscheiden.

Die relativ hohe Dispersion der Signale, trotz der geringeren Diversität der eingebauten Aminosäuren, lässt sich in diesem Fall nicht etwa auf eine vorliegende Vorzugskonformation, zurückführen, sondern vielmehr auf eine Unterdrückung des chemischen Austausches aufgrund des niedrigen pH-Wertes. Sowohl im amidischen als auch im aliphatischen Bereich überlagern sich die Signalsätze der zahlreichen identischen Aminosäuren der zu analysierenden Sequenz. Auffällig sind bei den beiden Silaffin-R5-Derivaten **19** und **20** die relativ starken Tieffeldverschiebungen der NH-Ser₂-Signale sowie die Hochfeldverschiebungen der NH-Gly₁₃-Signale. Diese Verschiebungen lassen sich hauptsächlich durch die Nähe dieser Protonen zum Amino- bzw. Carboxy-Terminus erklären, wobei bei der Hochfeldverschiebung des NH-Gly₁₃ auch die chemische Umgebung des Gly₁₃ eine Rolle spielen dürfte. Beim Vergleich der beiden Spektren fällt (in Spektrum **b**) ein zusätzlicher Signalsatz auf, der eindeutig dem eingebauten PDA-Linker zugeordnet werden kann, was zeigt, dass Derivatisierung geglückt ist. Der Erfolg der Synthese wird ebenfalls durch entsprechende TOCSY, HSQC und NOESY- sowie MALDI-MS-Spektren bestätigt. Die vollständige NMR-Charakterisierung der Peptide **19** und **20** sind dem Kapitel 5 zu entnehmen.

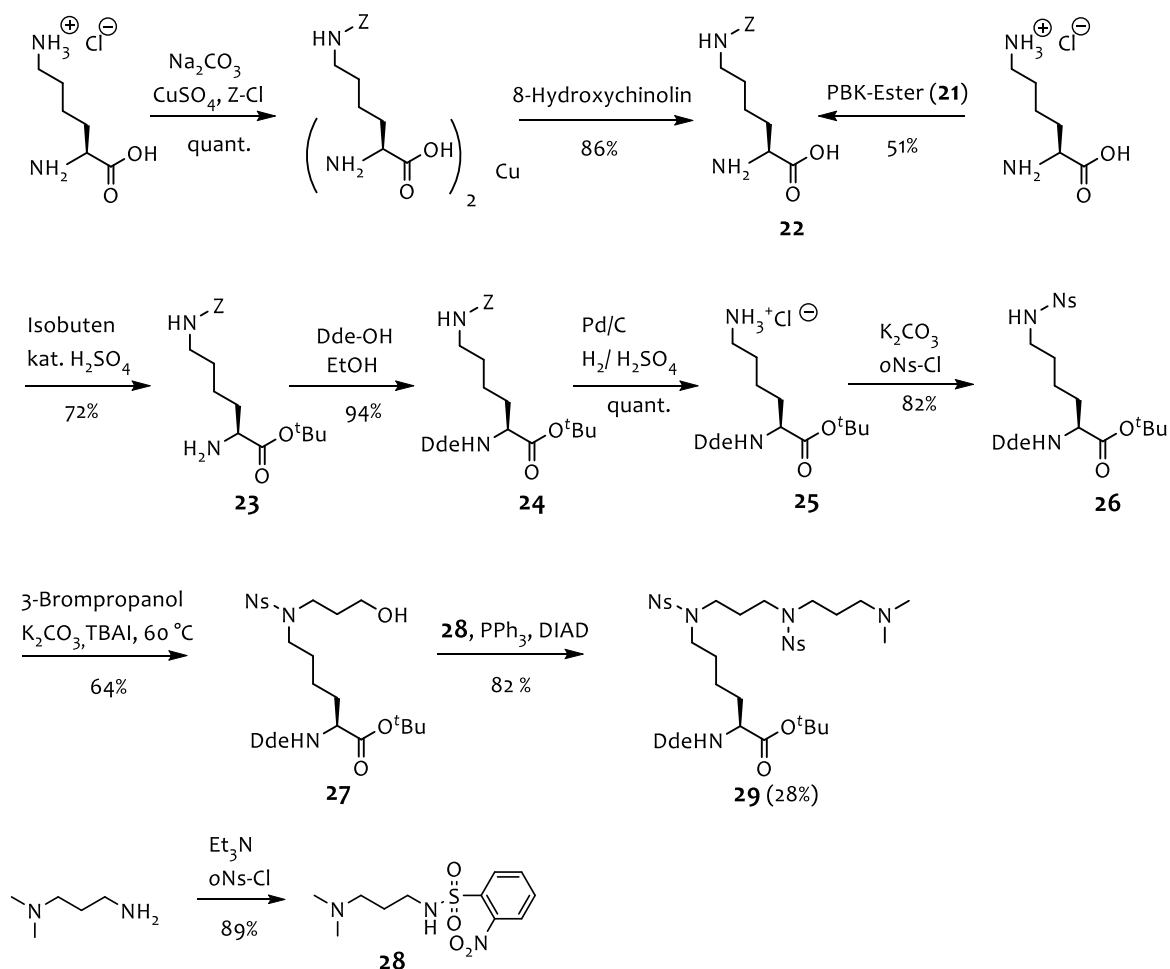
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die geplante Synthese der Silaffin-1A₁-Derivate **19** und **20** am Mikrowellen-Peptid-Synthesizer (LIBERTY BLUE) erfolgreich umgesetzt werden konnte. Da sich auch das PDA-Harz gegenüber den Mikrowellenbedingungen stabil gezeigt hat, lassen sich zukünftig auch seitenkettenunmodifizierte, Amin-derivatisierte Silaffin-1A₁-

R5-Analoga über eine geringfügig optimierte Standard-Synthesemethode am Peptid-Synthesizer ohne großen synthetischen Aufwand herstellen.

2.10.3 Synthetisch-strategische Überlegungen zum Aufbau von Polyamin-seitenkettenverlängerten Lysin-Derivaten

Abgesehen von zahlreichen Serin-Phosphorylierungen weist der Naturstoff Silaffin-1A₁ eine Vielfalt an posttranslationalen Lysin-Modifikationen auf. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Herstellung von Silaffin-Derivaten mit möglichst langen Polyamin-Lysinseitenketten liegt, sollen in diesem Abschnitt neue synthetisch-strategische Überlegungen zu effizienten Herstellungsmethoden vorgestellt werden, die den Zugang zu Polyamin-seitenkettenverlängerten Lysin-Bausteinen ermöglichen. Basierend auf Vorarbeiten von R. WIENECKE^[151] erscheint die Kettenverlängerung über eine FUKUYAMA-MITSUNOBU-Reaktion ausgehend von ungeschütztem Lysin (s. Schema 23) zunächst sinnvoll. Die FUKUYAMA-Alkylierung ist ein spezieller Fall einer S_N2-Reaktion mit aktivierten Aminen. Durch ihre hohe Nukleophilie und geringe Basizität reagieren deprotonierte Ns-Sulfonamide sogar mit wenig reaktiven Elektrophilen.^[146a-b,174] Unter den von R. WIENECKE optimierten Reaktionsbedingungen^[151] lässt sich ausgehend vom orthogonal geschützten Lysin **24** ein für die SPPS geeigneter, um zwei Aminopropylen-Einheiten verlängerter Baustein **29** in fünf Stufen synthetisieren (Schema 23). Für die Seitenkettenverlängerung des Alkohols **27** wurde dabei *N,N*-Dimethylpropandiamin am primären Stickstoffatom nosyliert. Die Ns-Schätzung des Diamins gelang mit *o*Ns-Cl und Et₃N als Base unter milden Bedingungen und lieferte das aktivierte Sulfonsäureamid **28** in 89% Ausbeute. Die Seitenkettenverlängerung des Lysins **27** wurde unter FUKUYAMA-MITSUNOBU-Konditionen durchgeführt. Die Alkylierung des Alkohols **27** mit Sulfonamid **28** in Gegenwart von PPh₃ und DIAD lieferte das orthogonal geschützte seitenkettenverlängerte Lysin **29** in 82% Ausbeute. Auch wenn somit gezeigt werden konnte, dass diese Strategie zur Herstellung seitenkettenverlängerter Lysin-Bausteine genutzt werden kann, ist der synthetische Aufwand hierfür enorm. Zwar liefert jede einzelne Stufe dieser Synthese recht gute Ausbeuten, dennoch schlägt sich der lange Herstellungsweg bis zu dem für SPPS-geeigneten Lysin-Baustein in der Gesamtausbeute nieder. Zudem dürfte sich die vorgestellte Methode mit jeder zusätzlich einzuführenden Aminopropylen-Einheit um einige weitere Schritte erweitern. Dieser strategische Ansatz zum Ausbau der Lysin-Seitenkette erscheint daher nicht zielführend, weshalb eine neue Synthesestrategie entwickelt werden sollte. Bei fast allen, in Lösung hergestellten, orthogonal-geschützten Lysin-Derivaten (s. Schema 23) handelt es sich um wertvolle Grundbausteine, die sich bei der Entwicklung einer neuen Synthesestrategie als nützlich erweisen.

Synthese von Silaffin-1A₁-Derivaten



Schema 23: Herstellung des orthogonal geschützten um zwei Aminopropylen-Einheiten verlängerten Lysin-Derivates 29.

Das neu entwickelte Konzept für die Herstellung von Silaffin-1A₁-Analoga beruht auf den strukturellen Gegebenheiten des Naturstoffes. Bei der klassischen SPPS wird die entsprechende Sequenz vom C- zum N-Terminus schrittweise aufgebaut. Im Fall des Silaffin-1A₁ lässt die C-terminale Lage des Lys₁ die Entwicklung einer neuen Synthesestrategie zu, bei welcher der Ausbau der Lysin-Polyaminseitenkette direkt am Harz erfolgt.

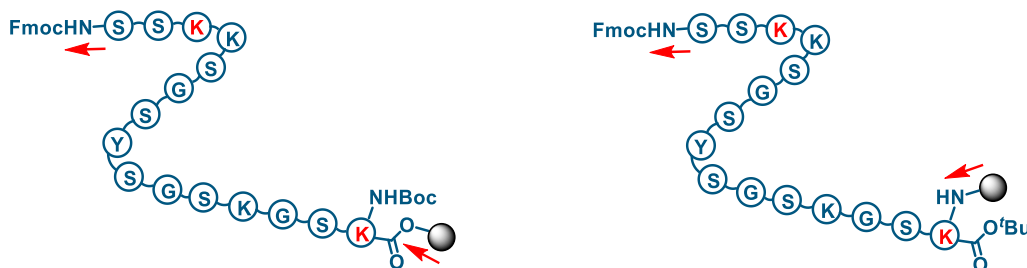
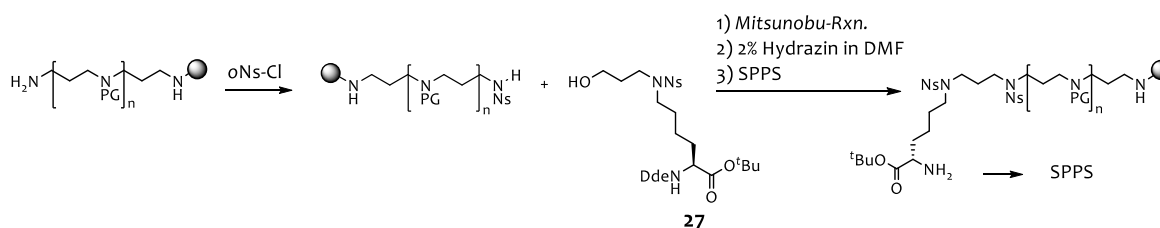


Abbildung 63: Schematischer Vergleich der klassischen Festphasensynthese (links) mit der neu entwickelten Strategie zur Herstellung Lysin-seitenkettenverlängerten Silaffin-1A₁-Derivate (rechts). Die polyaminverlängerten Lysine in Silaffin-1A₁ sind in Rot gekennzeichnet.

Zu wichtigsten, für die Strategieentwicklung entscheidenden strukturellen Merkmalen der polyaminverlängerten Lysine im Silaffin zählen die ϵ -Aminogruppe und die daran

anknüpfende Aminofunktion der Polyaminseitenkette, welche als sekundäre Aminofunktionalitäten vorliegen (s. Abbildung 61). Für die Schützung dieser Aminofunktionen bieten sich Ns-Gruppen an, die eine selektive Verlängerung nach FUKUYAMA-Bedingungen zulassen. Die neue Synthesestrategie sieht also eine Alkylierung des in Lösung hergestellten, orthogonal geschützten Lysin-Alkohols mit dem am Harz synthetisierten Polyamin unter FUKUYAMA-MITSUNOBU-Bedingungen vor (s. Schema 24).



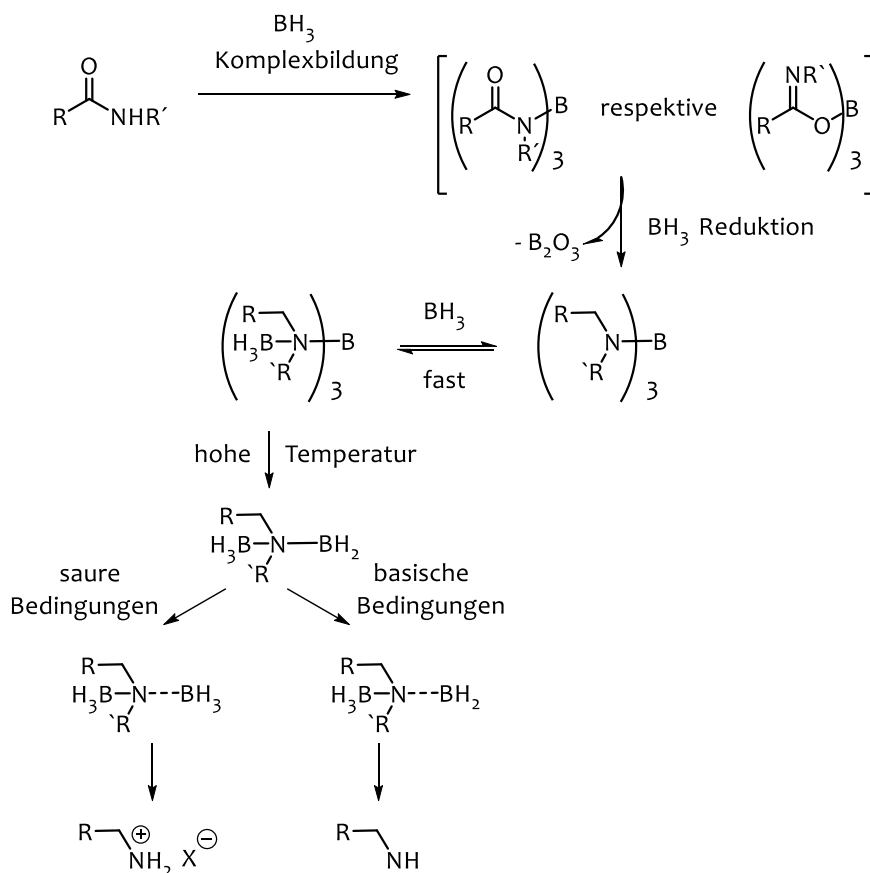
Schema 24: Synthetisch-strategische Überlegungen für den Aufbau von polyaminverlängerten Lysin-Bausteinen am Harz, die einen Ausgangspunkt für die Herstellung von Silaffi-1A₁-Derivaten darstellen.

Alle weiteren Aminogruppen der Polyaminkette liegen *N*-methyliert vor (s. Abbildung 60). Die *N*-Methylierungen der verbleibenden Aminofunktionalitäten können beispielsweise mittels reduktiver Aminierung eingeführt werden.^[156]

Da die Synthese des orthogonal geschützten Bausteines **27** bereits etabliert ist (s. Schema 23), wird nachfolgend auf die Polyamin-Elongation am Harz eingegangen. Für die Verlängerung der Polyaminkette am Harz wurden zunächst verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen. Im Zuge der Entwicklung konvergenter Synthesestrategien für neuropharmakologisch interessante Naturstoffe wie Bienen-, Wespen- oder Spinnengifte auf der Basis einfacher Polyamine (Spermin, Spermidin) wurde bereits eine Reihe interessanter Ansätze erarbeitet.^[144b,175,176] Dabei handelt es sich sowohl um Synthesen an der festen Phase, als auch um kombinierte Herstellungsmethoden, wobei ein Arsenal an unterschiedlichsten Reaktionen zum Einsatz kommt. Es wurde bereits über SPPS-Ansätze mit verschiedenen Variationen der am Harz gebundenen Nukleophilie (Amine) und Elektrophile berichtet. Dabei erstreckt sich das für die Polyaminrückgrat-Verlängerung eingesetzte Reaktionsspektrum von einfachen Alkylierungen der primären Amine mit Alkylhalogeniden^[146a,146b,177,178,179] über FUKUYAMA-Alkylierungen^[180,181,182,183] oder reduktive Aminierungen^[176,184,185,186,187] bis hin zur Reduktion der Polyamide.^[188,189,190] Konzentriert man sich gezielt auf die S_N2-Alkylierungen am Harz, wird die Auswahl an der zur Verfügung stehenden Reaktionen deutlich übersichtlicher.

Bei der Herstellung von langkettigen Polyaminen bleibt auch heute die Polyamidreduktion mit Natriumborhydrid die Methode der Wahl. Aufgrund der langen Reaktionszeiten und

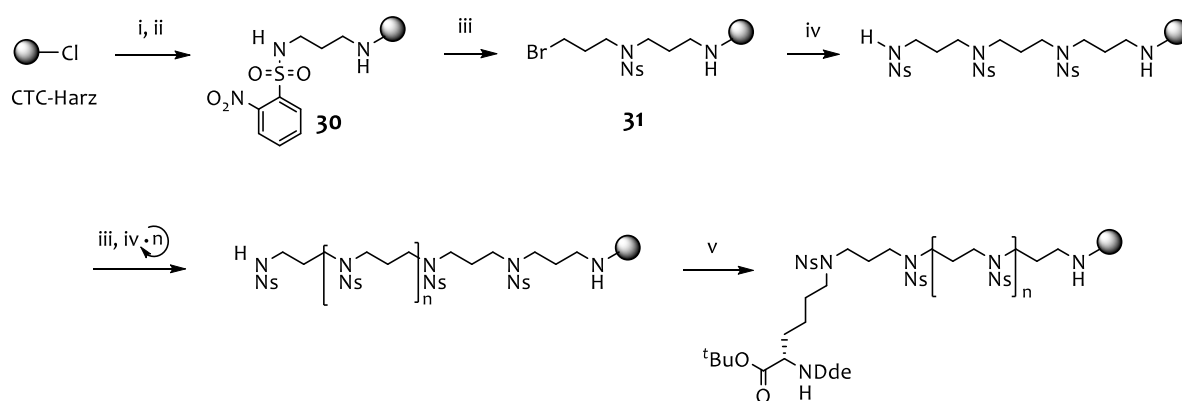
problematischer Aufarbeitung der Produkte (s. Schema 25) wurde für die angestrebte Polyaminverlängerung die FUKUYAMA-Bedingungen (s. Schema 26) gegenüber der konventionellen Herstellungsmethode vorgezogen.



Schema 25: Mechanismus der Boran-Reduktion und Aufarbeitung von sekundären Amiden in Anlehnung an Beschreibungen von HALL *et al.*^[154a-c]

Die Boranreduktion gehört heutzutage zu einer der etablierten und effizientesten Methoden zur Herstellung von linearen, sekundären Aminen. Die von HALL *et al.* und HOUGHTEN *et al.* beschriebenen Reduktionen ermöglichen auch die Herstellung komplexer Amine an der festen Phase^[154a-f] und sind inzwischen ein fester Bestandteil in der Naturstoffsynthese geworden. Allerdings scheint die Aufarbeitung der am Harz durchgeführten Reduktion hinsichtlich der Zerstörung der hierbei entstehenden Bor-Amin-Addukten besonders kritisch zu sein. Es sind daher zahlreiche Aufarbeitungsmethoden zur Isolierung der freien Reduktionsprodukte in der Literatur zu finden. Es wird über oxidative Spaltung der Aminoborane mit einer gepufferten Iod-Lösung,^[154a,c] Liganden-Austausch mittels Ethylenglycol oder 1,2-Ethylendiamin bei erhöhten Temperaturen,^[154c] Behandlung mit starken Säuren wie TFA^[191] oder basische Aufarbeitung unter Verwendung von Piperidin,^[192] die eine schnelle Spaltung der Bor-Amin-Komplexe fördern sollen, berichtet. Manche dieser Methoden wurden bereits bei der Herstellung isotope-markierter Oligoamine getestet. Es hat sich dennoch herausgestellt, dass

keine der erprobten literaturbekannten Aufarbeitungsmethoden inklusive der von R. WIENECKE^[151] optimierten basischen Bedingungen unter Einsatz von Piperidin und Hydrazin zu einer vollständigen Zerstörung der Bor-Amin-Komplexe geführt haben. Auch nach einer mehrstündigen Aufarbeitung bei höheren Temperaturen mit Piperidin entsprach das untersuchte Protonen-Verhältnis zwischen primären und sekundären Aminen im ¹H-NMR-Spektrum nicht dem Verhältnis der Integrale (vgl. Abschnitt 2.8), was die Anwesenheit von Bor-Amin-Komplexen belegt. An dieser Stelle erschien es daher sinnvoll, einen Strategiewechsel vorzunehmen. Die Alkylierung unter FUKUYAMA-MITSUNOBU Bedingungen wird in der Literatur als sehr empfindlich hinsichtlich der sterischen Beschaffenheit des Alkohols, der Acidität des Nukleophils (Säure) und der äußeren Einflüsse, wie Lösungsmittel, Temperatur, etc. beschrieben.^[147c,b] Zusammen mit der Variation an verschiedenen Kombinationen der möglichen Azokomponenten und Phosphenen sowie der Harzauswahl kann die MITSUNOBU-Reaktion so schnell zu einem mehrdimensionalen Problem bei der Reaktionsdurchführung werden. Für die Polyaminverlängerung am Harz wurde deshalb zunächst der FUKUYAMA-Alkylierung der Vorzug gewährt.

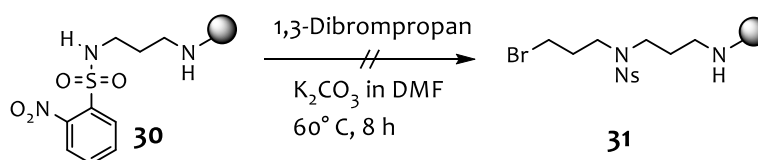


- i) 1,3-Propanediamin in DMF; ii) *o*Ns-Cl, *sym*-Collidin; iii) 1,3-Diprompropan, K₂CO₃ in DMF; iv) *N,N'*-(Propan-1,3-diyl)bis(2-nitrobenzenesulfonamid), K₂CO₃; v) **27**, PPh₃, DIAD, DIPEA.

Schema 26: Geplanter Syntheseweg zur Verlängerung der Lysin-Seitenkette. Gezeigt ist die Elongation des Polyamin-„backbones“ am CTC-Harz unter FUKUYAMA-Bedingungen mit anschließender MITSUNOBU-Anknüpfung des so hergestellten Amin-Linkers an den orthogonal geschützten Lysin-Alkohol **27**.

Die Aktivierung des am Harz gebundenen 1,3-Diaminopropans wurde nach der Vorschrift von KESSLER *et al.* vorgenommen.^[323] Die Nosylierung der primären Aminogruppe erfolgte unter Verwendung von *o*Ns-Cl, NMP als Lösungsmittel und *sym*-Collidin als Base quantitativ. Sowohl DCM als auch DMF zeigten sich bei dieser Reaktion, im Vergleich zum NMP, als weniger geeignet, da unter Anwendung dieser Lösungsmittel auch nach relativ langen Reaktionszeiten (ca. 3 h) nur partielle Aktivierung der primären Aminofunktionalität beobachtet werden konnte. Das Ns-aktivierte PDA-Harz **30** konnte so schnell und effizient

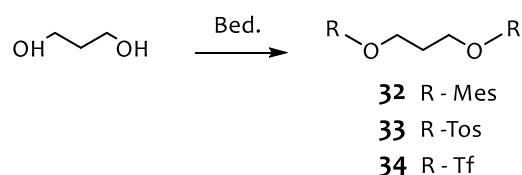
generiert werden. Die Prüfung auf Vollständigkeit erfolgte mittels der Abspaltprobe (s. Abschnitt 2.8) und anschließender NMR-Analyse. Die ersten Experimente zur Verlängerung der Polyaminseitenkette *via* Alkylierung am CTC-Harz wurden unter FUKUYAMA-Standard-Reaktionsbedingungen durchgeführt.^[183-193] Diese Alkylierung wird in der Regel bei erhöhten Temperaturen (55-65°C) in DMF als Lösungsmittel und unter Verwendung von K₂CO₃ als Base ausgeführt. Aus den vorherigen Experimenten zur BH₃-Reduktion der Polypeptide an der festen Phase (Kapitel 2.8) war bekannt, dass das CTC-Harz auch über längere Zeit (mehrere Tage) den höheren Temperaturen standhält. Dennoch führte die Umsetzung des Nosyl-aktivierten CTC-Harzes **30** unter den beschriebenen FUKUYAMA-Reaktionsbedingungen nicht zur gewünschten Kettenverlängerung (s. Schema 27).



Schema 27: Fehlgeschlagene Kettenverlängerung zu Verbindung 31.

Das Ausbleiben der Reaktion ist vermutlich entweder auf die geringe Reaktivität des Bromids, oder aber auf eine unzureichende Basenstärke zurückzuführen. Obwohl sich die Sulfonamide durch eine hohe Nukleophilie und eine geringe Basizität auszeichnen,^[147a,181,193] ist das Carbonat-Salz aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in DMF wahrscheinlich nicht in der Lage, das Sulfonamid **30** zu deprotonieren. Die Reaktionen, die in Zweiphasensystemen ablaufen, weisen im Vergleich zu Reaktionen in einem homogenen Reaktionsmedium oft längere Reaktionszeiten auf.^[194] Bei Reaktionen an der Festphase zwischen fluiden und festen Reaktionspartnern hängt die Umsetzung nicht nur von der Zeit, sondern auch von Löslichkeitseigenschaften der beteiligten Komponente ab. Dabei sind die Quelleigenschaften des verwendeten Harzes in dem für die Reaktionsdurchführung ausgesuchten Lösungsmittel mindestens so wichtig wie die Berücksichtigung anderer Parameter der Zweiphasen-Reaktion (Löslichkeit der beteiligten Komponenten, Temperatur, Zeit, etc.). In Lösungsmitteln mit schlechten Quelleigenschaften können die Reagenzien nicht in das Harz diffundieren und die polymergebundenen Substrate erreichen, so dass unvollständige Umsetzungen resultieren. Da DMF als Lösungsmittel gute Quell-Charakteristika für Polystyrol-Harze aufweist und standardmäßig auch bei Alkylierungen dieser Art verwendet wird, wurde zunächst die Ursache für den ausgebliebenen Umsatz in den schlechten Löslichkeitseigenschaften der anorganischen Base in diesem Lösungsmittel vermutet. Jedoch brachte weder Zugabe eines Transferkatalysators (Tetrabutylammonium-iodid TBAI) noch Einsatz verschiedener

organischer Basen eine signifikante Umsatzverbesserung. Ein mäßiger Umsatz (~36%) konnte lediglich unter Verwendung von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) erzielt werden, wobei in diesem Fall der beobachtete Erfolg eher auf die längeren Reaktionszeiten zurückgeführt wurde. Nach diesem unbefriedigenden Reaktionsfortschritt sollten als nächstes weitere Elektrophile mit besseren Abgangsgruppen getestet werden. Dazu wurden zunächst, unter Berücksichtigung des intramolekularen 1,3-Aminabstandes der gewünschten Polyaminverlängerung, eine Reihe reaktiver Elektrophile ausgehend vom 1,3-Propandiol hergestellt. Hierzu wurde zunächst der entsprechende Diol mit dem jeweiligen (Methan- bzw. *p*-Toluol-) Sulfonsäurechlorid umgesetzt; bei der Synthese des Ditriflates wurde Trifluormethansulfonsäureanhydrid verwendet (s. Schema 28).



Bed.: Methansulfonylchlorid, *para*-Toluolsulfonsäurechlorid, Trifluormethansulfonsäureanhydrid.

Schema 28: Synthese der aktivierten Diole 32, 33, 34 für die geplante Polyaminverlängerung am Harz.

Auch durch Einsatz dieser Elektrophile ist es nicht gelungen, die Alkylierung an der festen Phase erfolgreich durchzuführen. Die Ergebnisse aller Umsetzungen mit den Variationen an Reaktionsbedingungen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

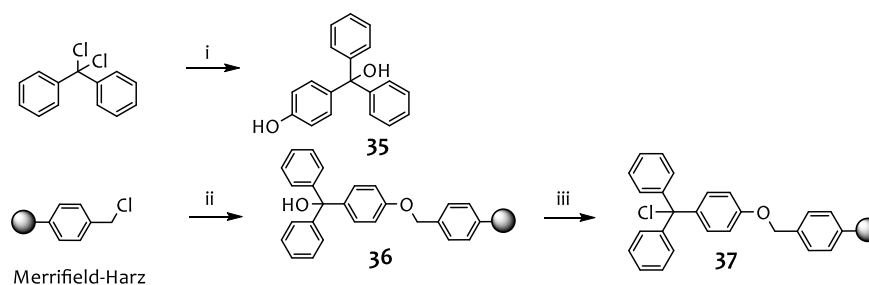
Tabelle 6: Übersicht über eingesetzte Edukte und Reaktionsbedingungen bei den Alkylierungsversuchen am Harz 30.

Edukte/Harz 30	1,3-Dibrompropan	Edukt 32	Edukt 33	Edukt 34
Base/K ₂ CO ₃	60°C, 12h,*	60°C, 8 h,*	60°C, 24 h, ~ 28%	60°C, 8 h,*
DIPEA	60°C, 8h,*	RT, 8 h,*	60°C, 8 h,*	60°C, 8 h,*
DBU	60°C, 48h, ~ 36%	RT, 48 h,*	60°C, 8 h, ~ 11%	60°C, 8 h,*
<i>sym</i> -Collidin	60°C, 24h,*	60°C, 8 h,*	60°C, 8 h,*	---
LDA	RT, 3h,*	60°C, 3 h,*	---	---

*-kein Umsatz

Die angegebenen Umsätze wurden mittels Abspaltprobe *via* ¹H-NMR-Experiment bestimmt. Eine Alkylierung konnte lediglich unter Verwendung des Bitosylates **33** beobachtet werden, allerdings waren die entsprechenden Umsätze sehr gering. Warum im Falle des Bimesylats **32** und des reaktiven Bitriflates **34** eine Reaktion vollständig ausblieb, konnte nicht geklärt werden. Jedenfalls zeigen diese Versuche, dass bei der Umsetzung des Sulfonamids **30** mit dem Bitosylat **33** nicht der Einsatz des anorganischen Kaliumcarbonat-Salzes (K₂CO₃) das Problem war. Bei den ausgeführten Alkylierungsversuchen am CTC-Harz scheint vielmehr der Zeitfaktor eine limitierende Rolle zu spielen. In der Literatur wird beschrieben, dass für

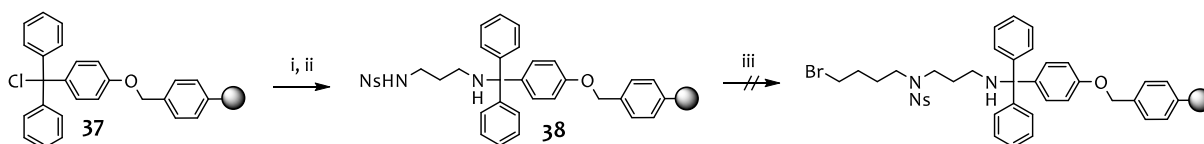
Totalsynthesen von Wespen- und Spinnengiften oft ein modifiziertes MERRIFIELD-Harz zum Einsatz kommt.^[193,195,196] Dieses Alkoxytritylchlorid-Harz **37** bietet wesentliche Vorteile gegenüber dem handelsüblichen 2-Chlortritylchlorid-Harz. Die Reaktivität dieses Harzes wird durch einen flexiblen Arm, die Alkoxygruppe, gesteigert, da die eingebaute Phenol-Einheit die reaktive Stelle von dem sperrigen Polystyrol-Rückgrat räumlich trennt. Da dieses Harz sowohl mit der Fmoc- als auch mit der Nosyl-Strategie kompatibel ist, erschien es sinnvoll die Alkylierungsreaktionen unter FUKUYAMA-Reaktionsbedingungen an diesem Harz auszutesten. Hierfür musste allerdings zuerst das käuflich erworbene MERRIFIELD-Harz nach Vorschriften von FUKUYAMA *et al.* zum Alkoxytritylchlorid-Harz **37** derivatisiert werden.^[195]



Bed.: Merrifield-Harz von Novabiochemie (2% DVB; 100-200 mesh; Beladungsdichte-0.6-1.0 mmol/g);
 i) Phenol, AlCl₃, reflux. 5 h in CS₂; ii) 10 eq **35**, 50 eq K₂CO₃, DMF, 60°C; iii) 2 eq SOCl₂, 2 h in DCM.

Schema 29: Herstellung des Alkoxytritylchlorid-Harzes ausgehen vom MERRIFIELD-Harz.

Zunächst wurde Dichlorodiphenylmethan unter den FRIEDEL-CRAFTS-Bedingungen mit Phenol umgesetzt. Bei dem käuflich erworbenen MERRIFIELD-Harz ist der polymere Träger mit einem Spacer versehen, welcher als eine flexible Brücke zwischen dem polymeren Grundkörper und dem Substrat dient. Die Umsetzung des Merrifield-Harzes mit Tritylalkohol **35** erfolgte unter milden Bedingungen in Dimethylformamid mit Kaliumcarbonat als Base bei 60°C. Das auf diese Weise erhaltene modifizierte MERRIFIELD-Harz wurde anschließend durch die Behandlung mit Thionylchlorid (SOCl₂) aktiviert und im darauf folgenden Schritt mit 1,3-Diaminopropan beladen. Die Beladungsbestimmung erfolgte auch in diesem Fall *via* Abspaltprobe mit anschließender ¹H-NMR-Analyse. Die selektive Aktivierung der primären Aminogruppe erfolgte mit *o*Ns-Cl und *sym*-Collidin als Base in *N*-Methyl-2-pyrrolidon. Unglücklicherweise schlug die anschließende Polyaminverlängerung *via* Alkylierung mit 1,4-Dibrombutan unter FUKUYAMA-Bedingungen^[196] auch in diesem Fall fehl (s. Schema 30).



i) 12 eq 1,3-Diaminopropan, 12 eq DIPEA; ii) 4 eq oNs-Cl, 8 eq sym-Collidin; iii) 10 eq K₂CO₃, 20 eq 1,4-Dibromutan, 16 h in DMF.

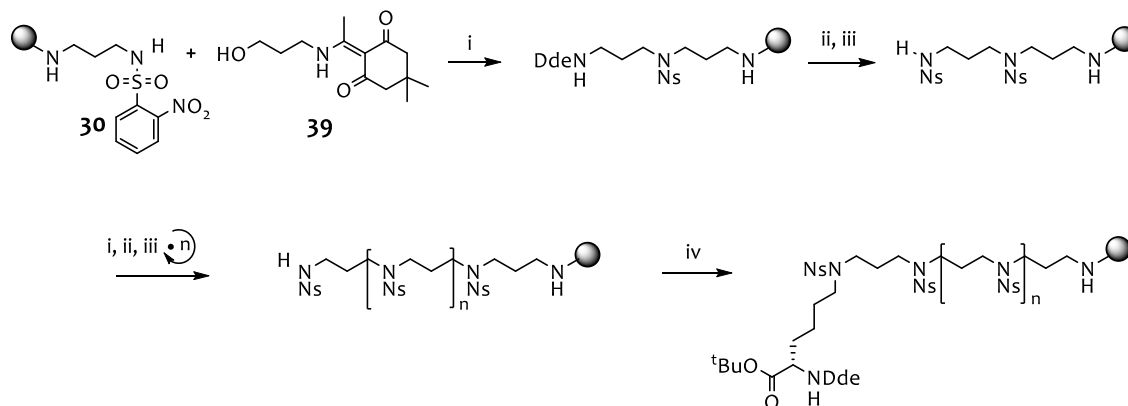
Schema 30: Herstellung des Ns-aktivierten PDA-Alkoxytrityl-Harzes **38** und fehlgeschlagene Aminverlängerung.

Bedingt durch das häufige Ausbleiben der Alkylierung-Reaktion war an dieser Stelle eine Strategieänderung notwendig, wobei kein radikaler Kurswechsel vorgenommen wurde, sondern vielmehr eine Anpassung an die in Lösung durchgeführten Polyaminverlängerung *via* FUKUYAMA-MITSUNOBU-Reaktion (vgl. Schema 22). Die erste Anwendung der FUKUYAMA-MITSUNOBU-Alkylierung an der Festphase wurde 1997 von NGUYEN *et al.* veröffentlicht und findet seitdem zahlreiche Anwendungen in der Synthese von Monoalkylierungen von primären Aminen unter milden Bedingungen.^[144b,193] Im Jahr 2000 wurde erstmals von der Synthese eines Polyamins an der festen Phase berichtet, das durch die FUKUYAMA-MITSUNOBU-Strategie aufgebaut wurde.^[197] STRØMGAARD *et al.* untersuchten daraufhin die FUKUYAMA-MITSUNOBU-Strategie systematisch hinsichtlich Reaktionszeit, Überschussverhältnisse, Reagenzkonzentration, Anzahl der Reaktionszyklen und Reihenfolge der Zugabe von Reagenzien bei der Polyaminsynthese an der Festphase.^[183] Weitere Verbesserungen der Reaktionsbedingungen wurden von OLSEN *et al.* vorgenommen, die den Einfluss des Lösungsmittels und des MITSUNOBU-Redoxpaares (Azokomponente/Phosphin) untersuchten.^[199,201] Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Polyaminverlängerung des Harzes **28** vorgenommen.

2.10.4 Aufbau der polyaminverlängerten Lysin-Seitenkette *via* MITSUNOBU-Reaktion

Für den Einsatz von 3-Amino-1-propanol als Grundbaustein für die Polyaminverlängerung am Harz war nicht nur der intramolekulare 1,3-Aminoabstand ausschlaggebend, sondern vielmehr seine Funktionalitäten, die zu den zentralen Auswahlkriterien geworden sind. Während die Alkoholfunktion eine selektive Anknüpfung an das Sulfonamid-aktivierte Harz **30** unter FUKUYAMA-MITSUNOBU-Bedingungen zulässt, liegt das primäre Amin während der Reaktion Dde-geschützt und nach der Reaktion entsprechend entschützt und frei für die Aktivierung mit Ns-Cl vor. Nach der Anknüpfung wird das primäre Amin entsprechend entschützt und steht damit für die Aktivierung mit Ns-Cl und die anschließende MITSUNOBU-Alkylierung zur Verfügung. Die Polyaminverlängerung stellt somit, ausgehend vom Harz **30**, einen Zyklus aus sich wiederholenden Reaktionen dar: MITSUNOBU-Alkylierung, Dde-Entschützung, Ns-Aktivierung und erneute MITSUNOBU-Reaktion, die diese Reihe vorläufig

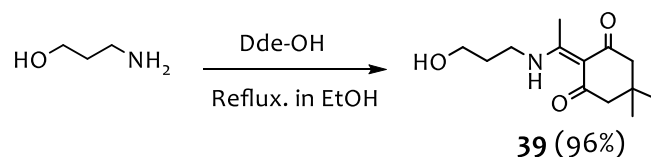
vollendet. Schematischer Verlauf dieser Strategie ist dem Schema 31 zu entnehmen. Für den Aufbau des polyaminverlängerten Lysins sieht diese Synthesestrategie eine abschließende Alkylierung des verlängerten Ns-aktivierten Harzes mit dem Lysin-Alkohol **27** unter FUKUYAMA-MITSUNOBU-Bedingungen vor (vgl. Schema 23).



i) PPh₃, DIAD, DIPEA in THF_{abs.}; ii) 2% Hydrazin in DMF; iii) oNs-Cl, *sym*-Collidin; iv) **27**, PPh₃, DIAD, DIPEA in THF_{abs.}

Schema 31: Zu prüfender Syntheseweg zur Verlängerung der Lysin-Seitenkette. Gezeigt ist die Elongation des Polyamin-„backbones“ am CTC-Harz mittels Dde-geschützten Aminopropanols **39** nach FUKUYAMA-MITSUNOBU-Bedingungen mit anschließender Anknüpfung des so hergestellten Amin-Linkers an den orthogonal geschützten Lysin-Baustein **27**.

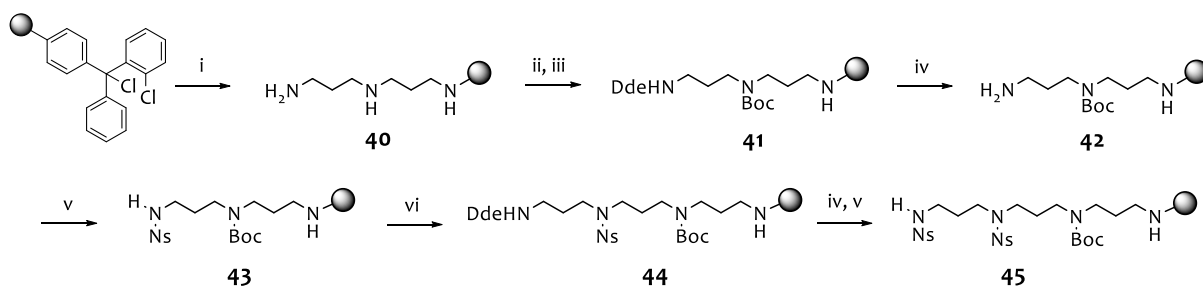
Für die Aminofunktion des für Polyamin-Elongation vorgesehenen Grundbausteins (3-Amino-1-Propanol) wurde Dde-OH gewählt, da diese selektiv nur mit primären Aminen reagiert und sich genauso selektiv mit Hydrazin abspalten lässt.^[150b,c] Die Dde-Schätzung des Aminopropanols erfolgte durch Umsetzung mit Dde-OH zum orthogonal geschützten Baustein **39** in 96% Ausbeute.



Schema 32: Herstellung eines orthogonal geschützten, für die Polyamin-Elongation am Harz vorgesehenen Grundbausteins **39**.

Jetzt galt es die überarbeitete Synthesestrategie zur Polyaminverlängerung am Harz auf den Prüfstand zu stellen. Um die Alkylierungsschritte möglichst gering zu halten sollte die Synthese nicht von dem PDA-Harz (vgl. Schema 1), sondern von einem mit Norspermidin beladenen CTC-Harz **40** ausgehen (s. Schema 33). Dieses um eine Aminopropylen-Einheit längerte Amin (im Vergleich zum 1,3-Diaminopropan) lässt, trotz seiner verschiedenen Aminofunktionalitäten, eine selektive Anbindung über das primäre Amin an das Harz zu (s. Abschnitt 2.7.3). Nach der kovalenten Anknüpfung einer der beiden primären Aminofunktionen des Norspermidins an das CTC-Harz, folgte anschließend Dde-Schätzung der terminalen freien Aminofunktion. Da 2-Acetyldimedon (Dde-OH) eine selektive

Schutzgruppe für primäre Amine darstellt, konnte in diesem Fall bei der Schützung des Harzes mit einem Überschuss (4 Äquivalente pro Amin) an Reagenz gearbeitet werden, was die Reaktionszeit wesentlich verkürzte.^[150b,c] Durch die zweifache Behandlung des Harzes mit frisch zubereiteter Dde-OH-Lösung gelang so eine nahezu vollständige Schützung des terminalen Amins. Im nächsten Schritt wurde die sekundäre Aminogruppe mit Hilfe von Di-*tert*-butyldicarbonat orthogonal geschützt. Dies wurde in Anwesenheit von DIPEA in DMF durchgeführt. Zur Steigerung des Reaktionsumsatzes wurde die Reaktionszeit auf 2x 60 min erhöht.^[148c,154b] Unter den optimierten Konditionen wurden nahezu quantitative Umsetzungen (<98%) erzielt. Das orthogonal-geschützte Polyamin **41** wurde durch Behandlung mit 2%igem Hydrazin in DMF von der Dde-Schutzgruppe befreit und lieferte das Harz **42**. Die darauf folgende Nosylierung der terminalen primären Aminogruppe erfolgte entsprechend der Vorschrift von KESSLER *et al.*^[198] Entscheidend war hierbei die Verwendung von NMP als Lösungsmittel. Als Base wurde in diesem Fall *sym*-Collidin eingesetzt.^[151] Das an der primären Aminofunktion aktivierte Harz **43** konnte so durch eine vierstufige Reaktion generiert werden.

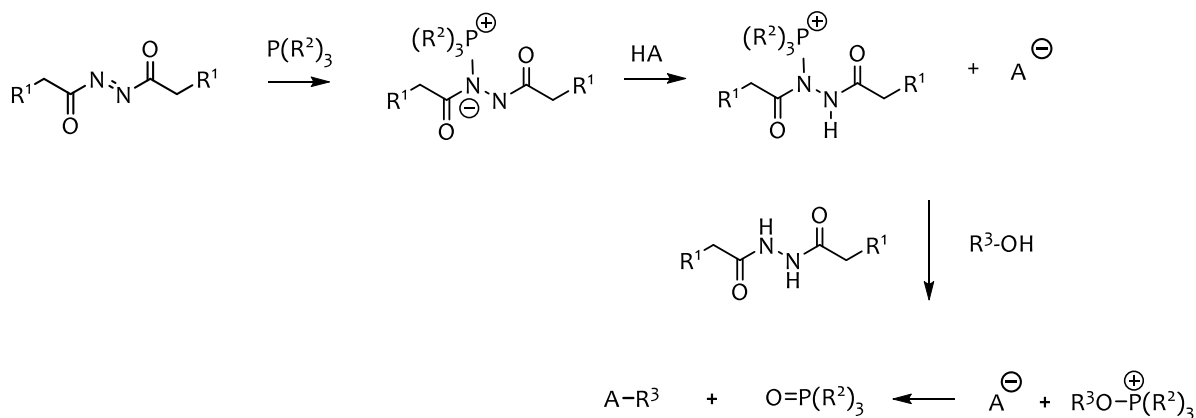


i) Norspermidin in DMF, 10 min; ii) Dde-OH, 2x 30 min in DMF; iii) Boc₂O, DIPEA, 2x 1 h in DMF; iv) 2% Hydrazin in DMF, 3x 30 min; v) Ns-Cl, *sym*-Collidin in NMP, 3x 30 min; vi) PPh₃, DIAD, *N*-(3-hydroxypropyl)-2-nitrobenzenesulfonamid **39**, DIPEA in THF_{abs.}, 3x 6 h.

Schema 33: Herstellung eines orthogonal-geschützten Norspermidins am CTC-Harz und dessen Verlängerung *via* MITSUNOBU-Alkylierung.

Wie bereits beschrieben wurde, zeichnen sich die Nitrosulfonsäurebenzamide durch eine erhöhte Acidität aus. *N*-Alkylierungen an solchen Substraten laufen daher oft bereits unter recht milden Bedingungen ab. Eine dieser Reaktionen ist die FUKUYAMA-MITSUNOBU-Alkylierung, bei der sich der orthogonal geschützte Aminopropanol **39** in Gegenwart einer Azokomponente und eines Phosphins mit leicht saurem Nukleophil (in diesem Fall Sulfonamid **43**) zu einem Amin **44** derivatisieren lässt. Der Mechanismus der MITSUNOBU-Reaktion ist in Schema 34 dargestellt.^[199] Die wesentlichen Komponenten sind ein Phosphin und eine Azokomponente, die im ersten Schritt zu dem *N*-Phosphonium-Addukt (Betain) reagieren. Das Betain ist in der Lage, die anwesende Säure (hier: Ns-Amid) zu deprotonieren, wobei ein Phosphonium-Intermediat gebildet wird. In Anwesenheit eines Alkohols geht

dieses im dritten Schritt in ein Oxaphosphonium-Intermediat über. Eine darauffolgende S_N2-Reaktion mit der deprotonierten Säure stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und liefert außer dem Produkt ein Triphenylphosphinoxid sowie Hydrazindicarboxylat.



Schema 34: Mechanismus der MITSUNOBU-Reaktion.^[144a]

Das Übertragen der etablierten Reaktionsbedingungen auf die zu untersuchende Synthesestrategie gelingt nicht immer und ist in der Regel mit zahlreichen Optimierungsversuchen verbunden. Im vorliegenden Fall konnten die Bedingungen der literaturbekannten FUKUYAMA-MITSUNOBU-Reaktion^[144b,146d,147b,c] jedoch ohne weitere Optimierungen auf die Polyaminverlängerung am 2-Chlorotriptylchlorid-Harz übertragen werden. Mit Hilfe der zur Vollständigkeitskontrolle entwickelten „Abspaltmethode“ (s. Kapitel 2.7.3) konnten alle Elongationsschritte, nicht nur verfolgt, sondern auch zum ersten Mal als Abspaltprobe NMR-spektroskopisch quantifiziert werden. In Abbildung 64 ist das ¹H-NMR-Spektrum des um eine Aminopropylen-Einheit verlängerten Norspermidin **44** dem seines Vorläufermoleküls, dem orthogonal geschützten Triamin-Baustein **43**, gegenübergestellt.

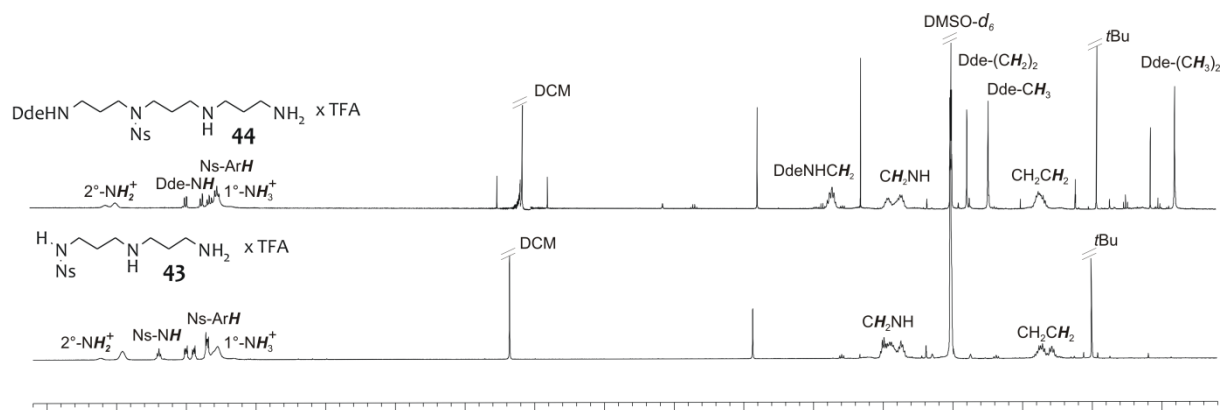
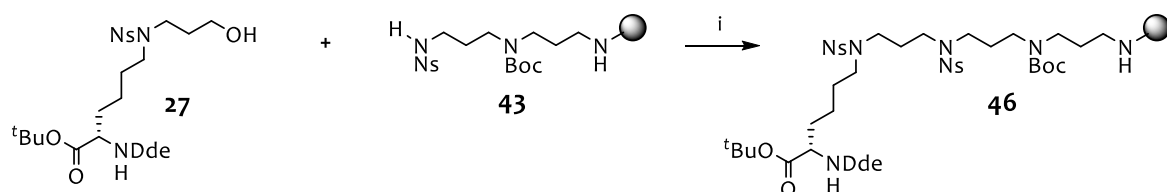


Abbildung 64: ¹H-NMR-Spektren (500 MHz, DMSO-d₆, 300 K) des Aminopropyl-verlängerten Norspermidins **44** sowie seines Vorläufermoleküls **43**. Die gezeigten Spektren wurden zur Vollständigkeitskontrolle aufgenommen und belegen einen quantitativen Umsatz der MITSUNOBU-FUKUYAMA Reaktion unter ausgesuchten Reaktionsbedingungen.

Wenn der Alkylierungsschritt dreifach mit einem deutlichen Überschuss an Reagenzien (je 4 eq Alkohol, PPh₃, sowie DIPEA) und über mehrere Stunden (je 6 h) unter inerten Bedingungen durchgeführt wurde, konnte ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Die oben gezeigten Spektren wurden zur Vollständigkeitskontrolle aufgenommen und erbringen einen eindeutigen Nachweis der erfolgreichen Alkylierung an der festen Phase. Nach dieser gelungenen Testreaktion mit dem Aminopropanol-Baustein sollte als nächstes Lysin-Alkohol **27** auf demselben Weg derivatisiert werden (s. Schema 35).



i) 3x (je 6h) 3 eq PPh₃, 3 eq DIAD, 6 eq DIPEA in THF_{abs}.

Schema 35: Verlängerung der Lysin-Seitenkette *via* FUKUYAMA-MITSUNOBU-Reaktion am CTC-Harz.

Ausgehend vom orthogonal geschützten Norspermidin **43** lässt sich die Seitenkette des Lysin-Bausteins **27** in einem einzigen Reaktionsschritt um zwei Aminopropylen-Einheiten erweitern. Abbildung 65 zeigt das ¹H-NMR Spektrum des am CTC-Harz synthetisierten seitenkettenverlängerten Lysin-Derivates **46**.

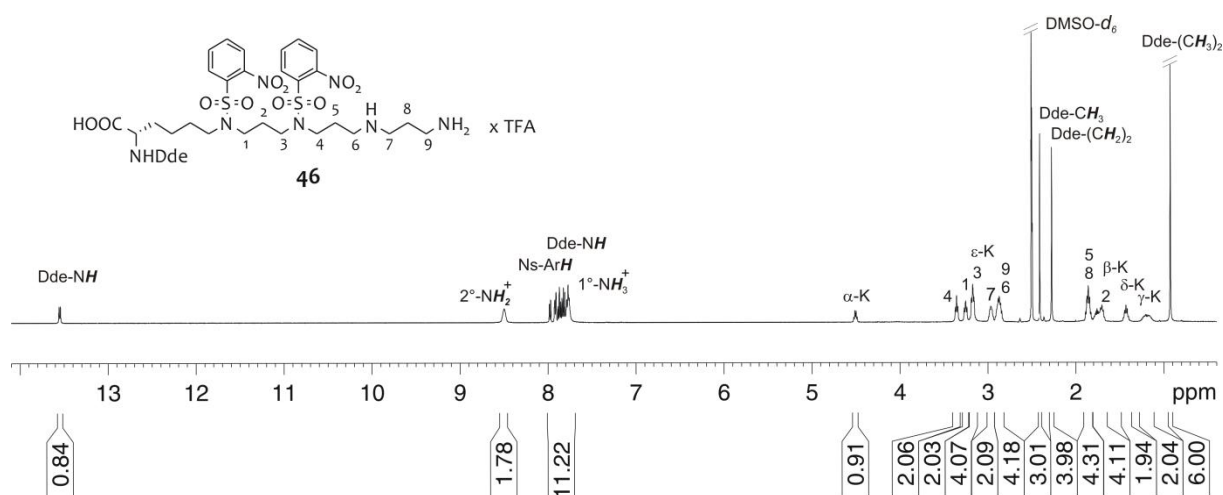
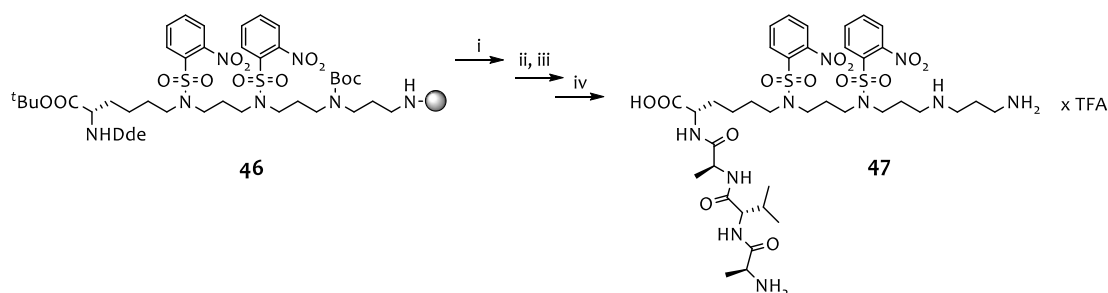


Abbildung 65: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des Polyamin-Lysin-seitenkettenverlängerten Derivates, welches unter FUKUYAMA-MITSUNOBU-Bedingungen am CTC-Harz hergestellt wurde.

Aufgrund des großen synthetischen Aufwandes bei der Herstellung von Lysin-Alkohol **27** wurden in diesem Fall 3 statt 4 Äquivalente des Eduktes verwendet. Auch bei diesem Reaktionsverlauf konnte ein vollständiger Umsatz festgestellt werden, was nicht nur die Effizienz, sondern auch die synthetische Anwendungsbreite dieser Alkylierungsmethode demonstriert. Zu den wesentlichen Nachteilen dieser Strategie zählen zum einen, ein großer

Überschuss der beteiligten Reaktanden und zum anderen überdurchschnittlich lange Reaktionszeiten. Allerdings bietet die Tatsache, dass das an der festen Phase hergestellte Produkt keine weiteren Aufreinigungsschritte benötigt, im Vergleich zur Synthese in Lösung, einen entscheidenden Vorteil (vgl. Schema 23). Nach der gelungenen, exemplarischen Ausführung der Teilschritte zum Aufbau der Polyaminseitenkette des C-terminal gelegenen Lysins (s. Struktur des Silaffin-1A₁ in Abbildung 61) soll die entworfene Synthesestrategie (s. Abschnitt 2.10.3) auf ihre Eignung zum weiterführenden Aufbau des Polypeptid-„backbones“ geprüft werden. Zu diesem Zweck sollte ausgehend von dem Polyaminseitenkettenverlängerten Lysin-Derivat **46** ein Tripeptid hergestellt werden, dessen Synthese in Schema 36 skizziert ist.



i) 2% Hydrazin in DMF, 2x 30 min; ii) SPPS: Fmoc-As-OH, HBTU, HOBt, DIPEA; iii) 25% Piperidin in DMF; iv) 95% TFA in H₂O.

Schema 36: Darstellung des Tripeptides **47** zur Tauglichkeitsprüfung der im Rahmen dieser Arbeit konzipierten Synthesestrategie zur Herstellung der Silaffin-1A₁-Derivate.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte synthetische Ansatz zu Herstellung Silaffin-1A₁-Derivate lässt sich mit der klassischen Fmoc-SPPS-Strategie sehr gut kombinieren. Als Kupplungsreagenzien wurden durchweg HBTU und HOBt und als Base DIPEA verwendet. Die Fmoc-Abspaltungen wurden mit 25%igem Piperidin in absolutem DMF durchgeführt. Die selektive Abspaltung der α -Dde-Gruppe wurde durch eine dreimalige Behandlung des Harzes **46** mit 2%igem Hydrazin in DMF erreicht, um so das Tripeptid **47** in einer Ausbeute von 89% zu generieren.

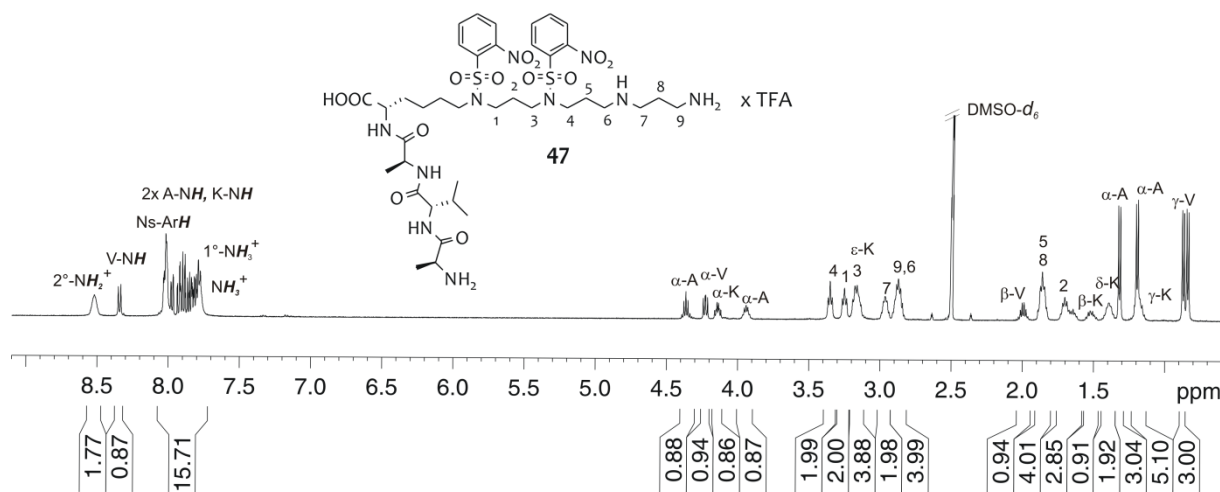


Abbildung 66: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des Tripeptids 47.

2.10.5 Kombinierte Synthesestrategie zum Aufbau von Silaffin-1A₁-Derivaten

Wie bereits erläutert, eröffnet die strukturelle Beschaffenheit des Silaffin-1A₁ eine neue synthetische Perspektive bei der Herstellung seitenkettenmodifizierter Derivate dieses komplexen Naturstoffes. Die Polyaminseitenkette eines, für diesen neuen strategischen Ansatz, günstig gelegenen C-terminalen Lysins soll in voller Länge *via* FUKUYAMA-MITSUNOBU-Reaktion am CTC-Harz aufgebaut werden. Im Anschluss daran soll nach einer vorangegangenen N-terminalen Dde-Entschützung, eine klassische Variante der SPPS unter Verwendung der Fmoc-Strategie erfolgen. Diese neue Variante der SPPS erfordert eine ausgefeilte Schutzgruppenstrategie, auf die im folgenden Abschnitt detailliert eingegangen wird. Abbildung 67 zeigt schematisch den synthetischen Entwurf zum Aufbau von Silaffin-1A₁-Derivaten.

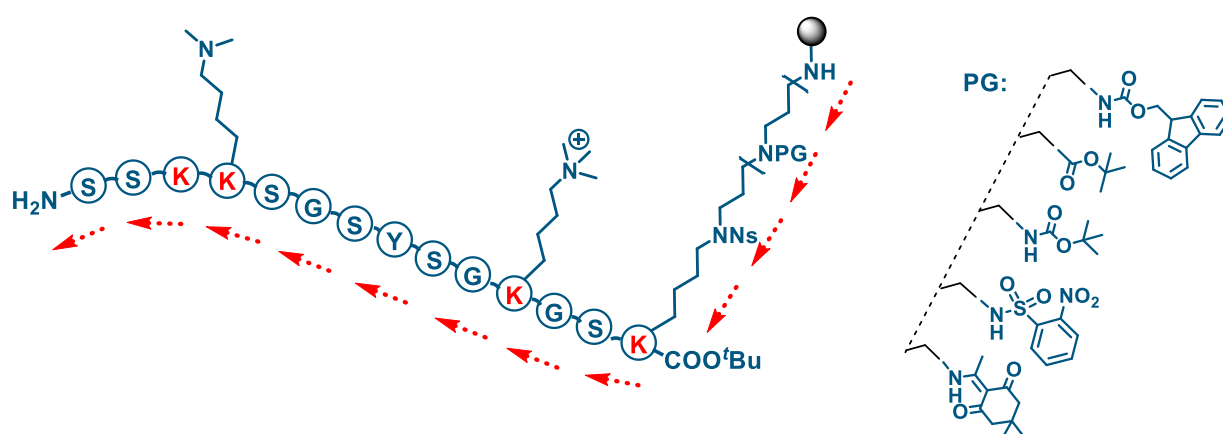
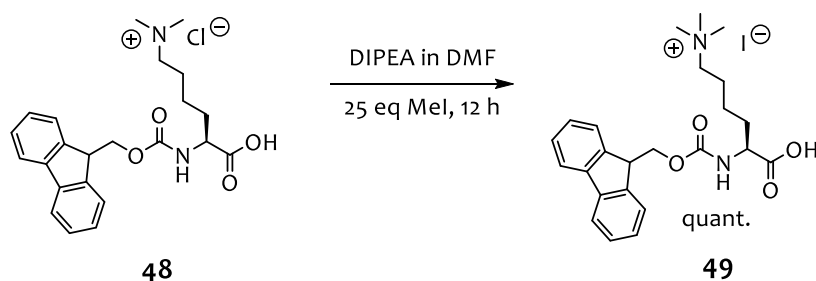


Abbildung 67: Schematische Darstellung der entwickelten Synthesestrategie zur Herstellung verschiedener Lysinseitenkettenmodifizierter Silaffin-1A₁-Derivate. Die hierbei verwendeten zahlreichen Schutzgruppen (PG) sind in der Abbildung rechts zu sehen.

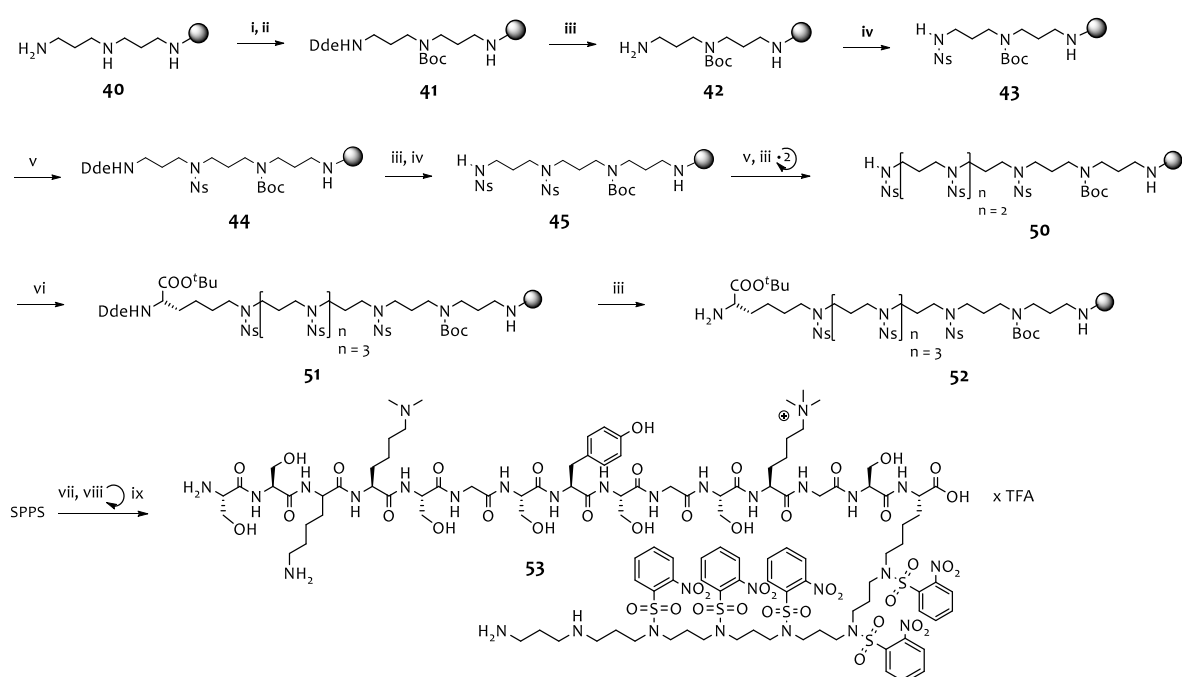
Zunächst sollte der Silaffin-1A₁-Vorläufer **53** (s. Schema 38) hergestellt werden, welcher keine *N*-terminale Oligopropylenaminverlängerung besitzt. Die Polyaminseitenkette des *C*-terminalen Lysins (K₁₅) von Derivat **53** weist hingegen die volle Länge (6 Aminopropylen-Einheiten) auf. Statt des phosphorylierten ϵ -*N,N,N*-Trimethyl- δ -hydroxylysins in Position 12 sollte das ϵ -*N,N,N*-Trimethyllysinium eingebaut werden. Aufgrund der verwendeten Synthesestrategie weist die Oligopropylenaminverlängerung der Lysin-Seitenkette (K₁₅) kein tertiäres Amin auf. Bevor das Generalschema zur Darstellung des ersten Silaffin-1A₁-Vorläufers detailliert erörtert wird, soll zunächst die Synthese einzelner Bausteine kurz vorgestellt werden. Zur Darstellung des ϵ -*N,N*-Dimethyllysins sei an dieser Stelle auf die Arbeit von R. WIENEKE^[67] verwiesen. Bei der Herstellung des ϵ -trimethylierten Lysin-Derivats wurde sich seiner dimethylierten Vorstufe bedient. Ausgehend vom Fmoc-Lys(Me₂)-OH HCl-Salz **48** konnte das ϵ -*N,N,N*-Trimethyllysinium **49** in einer einstufigen Reaktion generiert werden. Hierzu wurde das Edukt zunächst unter Zugabe einer äquimolaren Menge DIPEA in die salzfreie Form überführt um diese anschließend, in Anlehnung an einer Vorschrift von YAN-MEI LI *et al.* mit einem großen Überschuss an Methyljodid (25 eq) umzusetzen.^[200] Nach dem Quenchen der Reaktionslösung mit Methanol und mehrfachen Coevaporieren mit DCM, konnte auf diese Weise das ϵ -*N,N,N*-Trimethyllysins als Iodid-Salz **49** generiert werden.



Schema 37: Synthese des ϵ -*N,N,N*-Trimethyllysiniams **49** ausgehend von dem dimethylierten Vorläufer-Molekül **48**.

Die Darstellung der Silaffin-1A₁-Derivate mit unterschiedlichen Lysin-Seitenketten erfolgte unter Verwendung von Standard-Peptidsyntheseprotokollen. Es ist wichtig anzumerken, dass alle an der festen Phase durchgeführten Experimente, die hier beschrieben werden, manuell mit Hilfe einer Fritte durchgeführt wurden. Die manuelle Synthese hat den Vorteil, dass die jeweiligen Reaktionsschritte kontrolliert werden können.

Synthese von Silaffin-1A₁-Derivaten



i) Dde-OH, 2x 30 min in DMF; ii) Boc₂O, DIPEA, 2x 1 h in DMF; iii) 2% Hydrazin in DMF, 3x 30 min; iv) oNs-Cl, sym-Collidin in NMP, 3x 30 min; v) *N*-(3-hydroxypropyl)-2-nitrobenzenesulfonamid **39**, PPh₃, DIAD, DIPEA in THF_{abs.}, 3x 6h; vi) **27**, PPh₃ DIAD, DIPEA in THF_{abs.}; vii) Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBt, DIPEA; viii) 25% Piperidin in DMF; ix) TFA/TIPS/H₂O/PhOH (94:2:2:1).

Schema 38: Syntheseweg zur Gewinnung des Lysin-seitenkettenmodifizierten Silaffin-1A₁-Derivates **53**.

So lässt sich zum Beispiel die MITSUNOBU-Alkylierung, eine Schlüsselreaktion beim Aufbau des Oligopropylenamin-Linkers, mit nur wenigen Handgriffen *via* Abspaltprobe NMR-spektroskopisch verfolgen und gegebenenfalls optimieren. In Schema 38 sind die durchgeführten Reaktionen wiedergegeben. Ausgehend vom Norspermidin-beladenen 2-Chlortritylchlorid-Harz wurde zunächst die Polyaminseitenkette des Lysins (K₁₅) ausgebaut, woraufhin die klassische SPPS des Silaffin-,backbones“ unter Verwendung der Fmoc-Strategie erfolgte. Als Kupplungsreagenzien wurden hierbei durchweg HBTU und HOBt eingesetzt, wie es PERICH *et al.* berichteten.^[201] Hierbei wurden drei Äquivalente DIPEA der Reaktionslösung zugesetzt und die Aminosäuren nach Voraktivierung zum *N*-terminal entschützten Harz gegeben. Zur Steigerung der Kupplungseffizienz wurden die Acylierungen zweimal unter Anwendung der sogenannten „double coupling“-Strategie durchgeführt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 25%igem Piperidin in DMF konnte der nächste Aminosäure-Baustein angebracht werden. Bei den Kupplungen mit dem dimethylierten Lysin-Derivat **49** war eine pH-Wert-Kontrolle der Reaktionslösung notwendig. Die dabei oft beobachtete partielle autokatalytische Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe ist auf den basischen Charakter des tertiären Amins der Lysin-Seitenkette zurückzuführen. Diese Nebenreaktion lässt sich erfolgreich vermeiden, indem der pH-Wert der Reaktionslösung herabgesetzt wird.^[67] Durch eine erhöhte Zugabemenge von HOBt zu dem voraktivierten Harz konnte die Acylierung des dimethylierten Lysins erfolgreich durchgeführt werden.

Iterative Kupplungen und Entschützungen lieferten schließlich das Silaffin-1A₁-Derivat **53**. Die Strukturen sämtlicher Zwischenstufen wurden mittels Massenspektrometrie sowie NMR-Analyse gesichert.

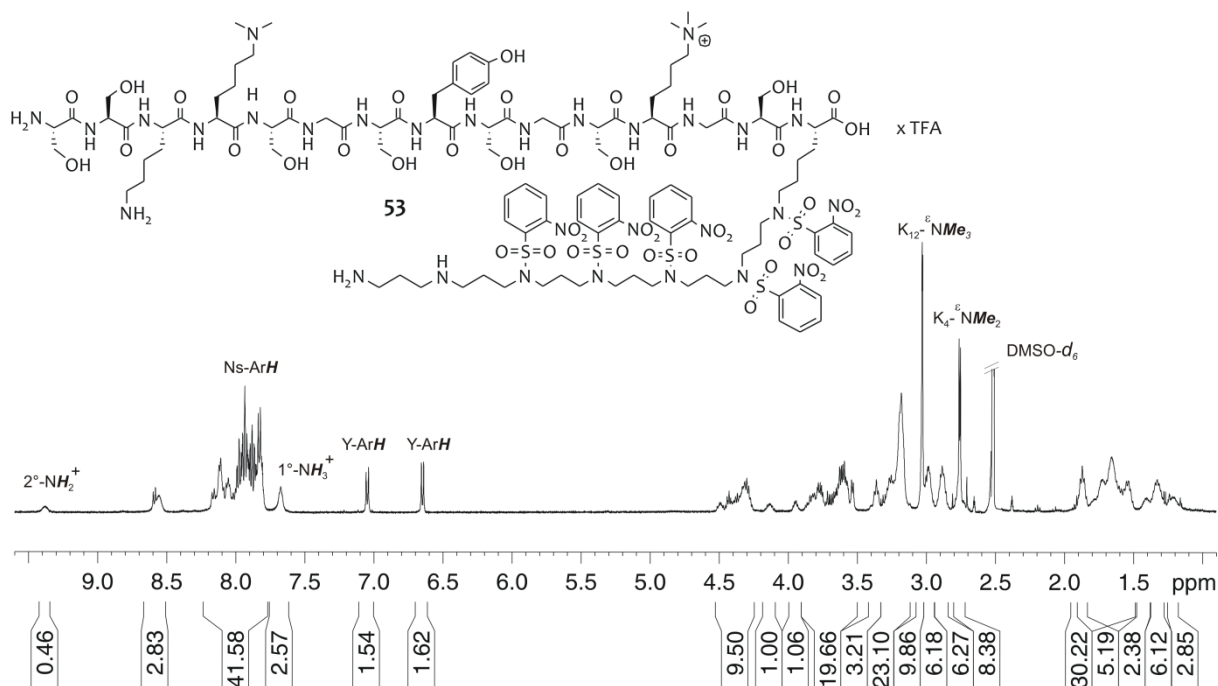
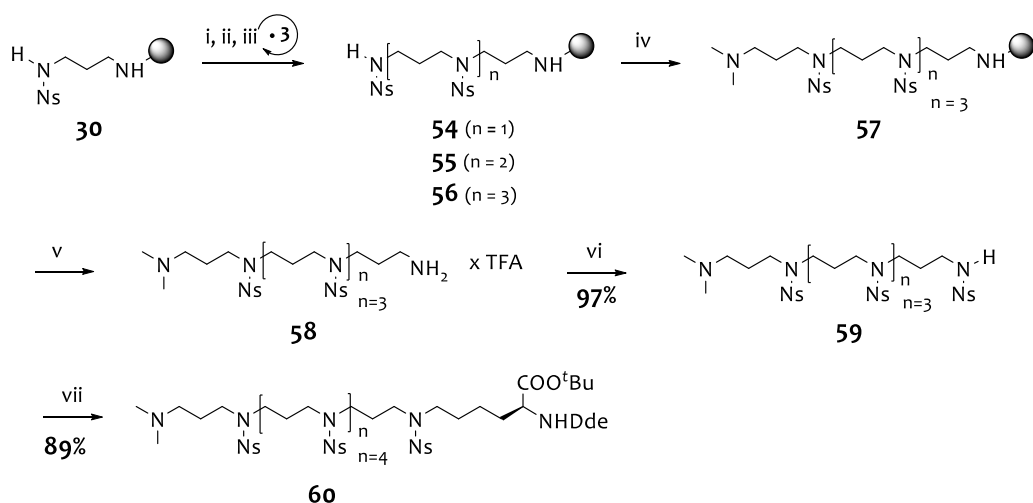


Abbildung 68: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des Silaffin-1A₁-Derivates **53**. Im Spektrum sind nur ausgewählte sequenzspezifische Signale zugeordnet.

Um der nativen Struktur des Naturstoffes Silaffin-1A₁ einen weiteren Schritt näher zu kommen, sollte anschließend eine effiziente Syntheseroute zur Darstellung des *N*-terminal gelegenen Lysins (K₃) erarbeitet werden. Bei den konzeptionellen Überlegungen zur Synthese dieses Oligopropylenamin-seitenkettenverlängerten Lysins wurde auf die beiden, bereits im Rahmen dieser Arbeit etablierten synthetischen Ansätze zurückgegriffen. Der Aufbau der Polyaminkette sollte hierbei nach einer schrittweisen Verlängerung *via* FUKUYAMA-MITSUNOBU-Alkylierung mit dem funktionalisierten Baustein *N*-(3-hydroxypropyl)-2-nitrobenzenesulfonamid (**39**) an einem festen Trägermaterial erfolgen. Nach dem Erreichen der gewünschten Kettenlänge kann das so hergestellte Oligoamin vom Harz abgespalten und terminal, der Strategie entsprechend, selektiv aktiviert werden. Im darauffolgenden Schritt kann die Anknüpfung dieses Polyamins an das funktionalisierte Lysin-Bausteingerüst **27** unter ähnlichen Konditionen in Lösung erfolgen. Bei einer schrittweise erfolgten Alkylierung in Lösung bereitet die Aufreinigung, der hergestellten Moleküle, bedingt durch zunehmende Polarität, große Schwierigkeiten.

Synthese von Silaffin-1A₁-Derivaten



i) PPh₃, DIAD, **39**, DIPEA in THF abs. 3x 4 h; ii) 2% Hydrazin in DMF, 3x 30 min; iii) oNs-Cl, sym-Collidin in NMP, 3x 30 min; iv) PPh₃, DIAD, 3-(Dimethylamino)propan-1-ol, 3x 4 h; v) 95% TFA in Wasser, 30 min, RT; vi) 10% K₂CO₃, oNs-Cl in Acetonitril/Dioxan, 12 h; vii) PPh₃, DIAD, **27**, DIPEA in DCM_{abs.}, je 3x 4 h.

Schema 39: Synthese des orthogonal geschützten oligopropylaminverlängerten Lysin-Bausteins **60**.

Mit dem neuen synthetischen Ansatz, bei dem nur wenige Reaktionen in Lösung durchgeführt werden müssen, soll die Problematik der schwierigen Aufarbeitung weitestgehend vermieden werden. Allerdings wurde bei dieser Syntheseroute mit dem Ns-aktivierten-Harz **30** und nicht mit dem Norspermidin-Linker **43** gestartet, denn alle verwendeten Schutzgruppen müssen mit der angestrebten Strategie kompatibel sein und folglich einer sauren Abspaltung vom Trägermaterial standhalten. Schema 39 zeigt den vollständigen Syntheseweg bis zum orthogonal geschützten, seitenkettenverlängerten Lysin-Baustein **60**. Alle Alkylierungen an der festen Phase verliefen erwartungsgemäß problemlos und lieferten durchgehend einen nahezu vollständigen Umsatz. Der Reaktionsfortschritt bzw. die Reinheitsbestimmung jeder einzelnen Reaktionsstufe erfolgten *via* Abspaltprobe durch HPLC-Analysen und NMR-Spektroskopie. Des Weiteren konnten die Strukturen sämtlicher Zwischenprodukte massenspektrometrisch gesichert werden. In Abbildung 69 sind exemplarisch die ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **55** und **57** gezeigt, deren Synthesen am CTC-Harz bemerkenswert effizient verlaufen sind.

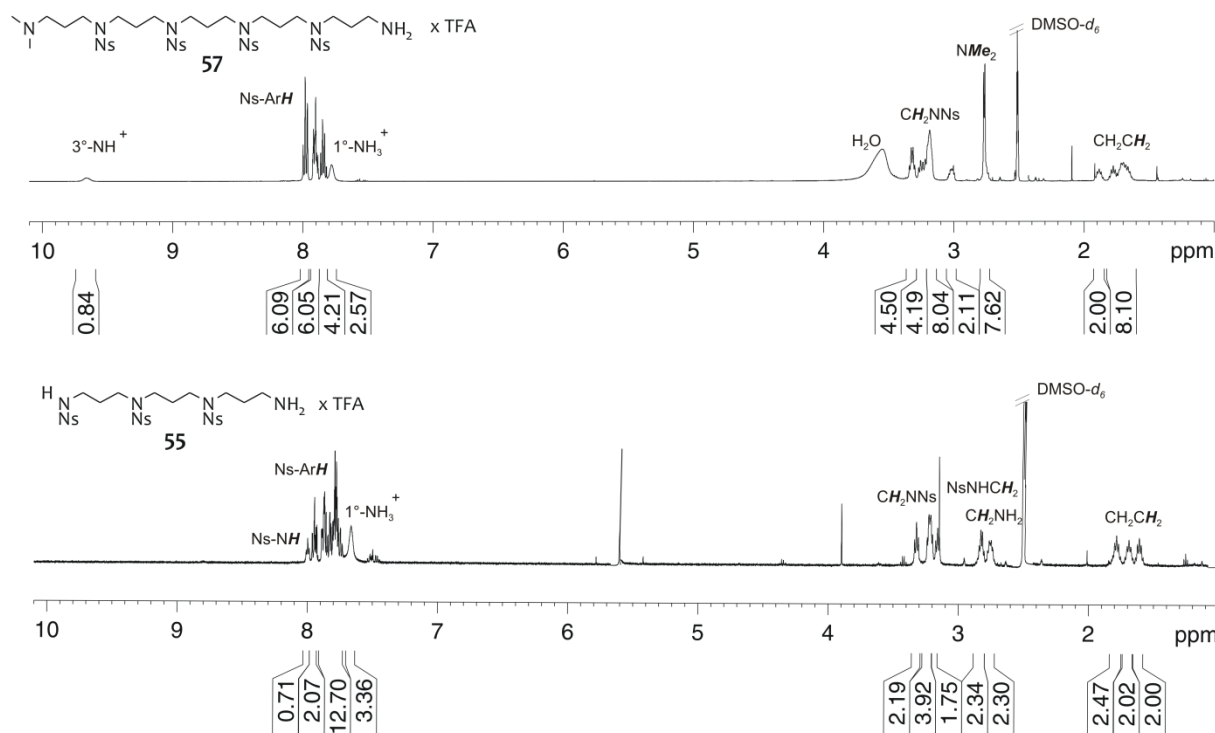
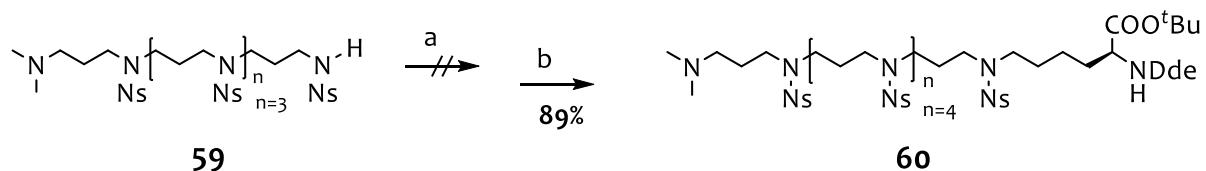


Abbildung 69: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) der Ns-geschützten Polyamine **55** und **57**. Die gezeigten Spektren erlauben direkte Rückschlüsse auf die Struktur und Reinheit der am Harz hergestellten Moleküle.

Als Lösungsmittel wurde absolutes THF eingesetzt, welches als polar-aprotische Lösungsmittel standardmäßig für MITSUNOBU-Reaktionen verwendet wird.^[183] Durch den Einsatz des traditionellen Redoxpaares DIAD/ PPh_3 und DIPEA als Base konnten die Alkylierungsprodukte mit sehr guten Umsatzraten erzielt werden. Das Einführen der endständigen tertiären Aminofunktion mittels 3-(Dimethylamino)propan-1-ol ermöglichte einerseits den Einbau eines der wichtigen Strukturfragmente natürlich vorkommender Lysin-Modifikationen und andererseits eine selektive Ns-Aktivierung des nach der sauren Harz-Abspaltung freien Terminus. Das Anbringen einer Ns-Schutzgruppe in Lösung verlief analog zur entsprechenden Umsetzung an der festen Phase. Allerdings wurde hierbei ein Acetonitril/Wasser-Gemisch als Lösungsmittel verwendet. Der unpolare Charakter des Amins **58** hat man sich bei seiner Aufreinigung zunutze gemacht. So ließ sich das geschützte, aktivierte Nitrosulfonsäurebenzamid **59** nach dem Aufkonzentrieren der Reaktionslösung in kaltem Ether mühelos ausfällen. Das Produkt wurde mehrfach mit kaltem Wasser und anschließend zur schnelleren Trocknung mit DCM gewaschen, es bedurfte keine weitere Aufreinigung. Durch die beschriebenen Maßnahmen konnte Verbindung **59** erfolgreich isoliert werden. Die anschließende FUKUYAMA-MITSUNOBU-Reaktion von **59** mit dem Lysin-Alkohol **27** erforderte eine Optimierung hinsichtlich des Lösungsmittels.



- a) 1.3 eq PPh₃, 1.3 eq DIAD, 1.5 eq **27**, 12h 0°C in THF_{abs};
 b) 1.3 eq PPh₃, 1.3 eq DIAD, 1.5 eq **27**, 12h 0°C; in DCM_{abs}.

Schema 40: Optimierungsversuch bei der Darstellung des seitenkettenmodifizierten Lysins **60**.

Das universell eingesetzte THF erwies sich in diesem Fall als ungeeignet, da sich das unpolare Edukt **59** nur unzureichend darin löst. Auch nach 12 Stunden Reaktionszeit konnte *via* HPLC kein signifikanter Fortschritt der Reaktion festgestellt werden. Mit dem Wechsel des Lösungsmittels zu einem weniger polaren Dichlormethan konnte die Alkylierung erfolgreich durchgeführt und das Produkt **60** in guter Ausbeute isoliert werden. Der synthetische Ansatz zu den Lysin-modifizierten Silaffinen beruht auf der Fmoc-Strategie, abgesehen von der Einführung der Aminosäure **60**.

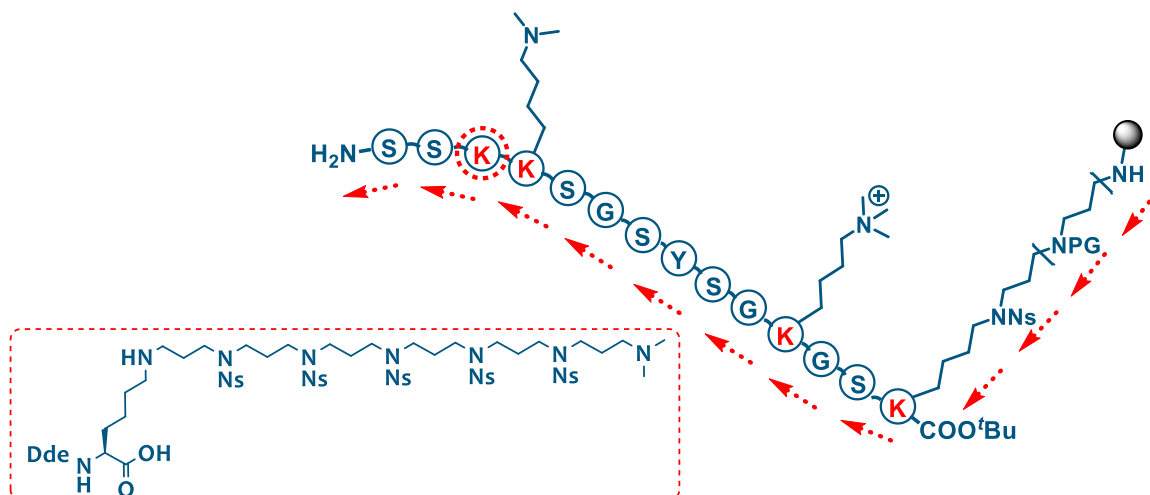
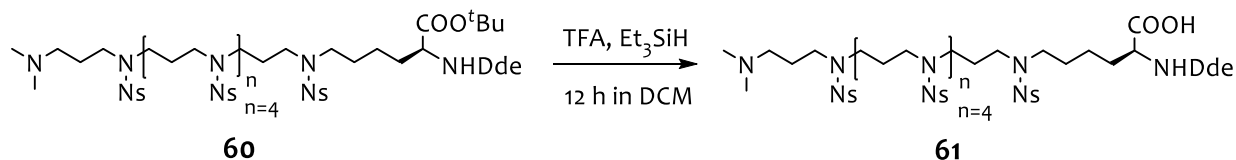


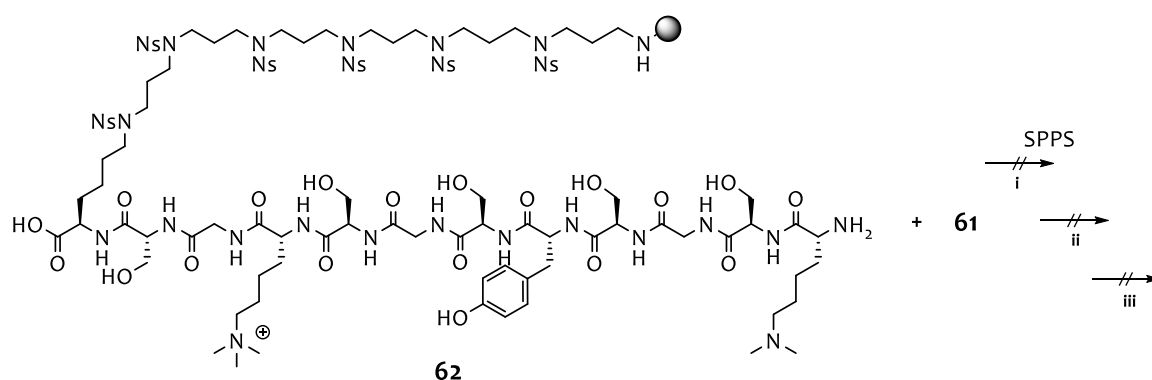
Abbildung 70: Schematische Darstellung der Synthesestrategie zur Darstellung der Silaffin-1A₁-Derivate mit einer doppelten Oligopropylamin-Lysin-Seitenkettenverlängerung.

Die selektive Freisetzung des α -Carboxyterminus gelang durch die Behandlung von **60** mit TFA und Triethylsilan und lieferte quantitativ die freie Säure **61**. Durch den Zusatz von Triethylsilan als *scavenger* kann die C-terminale Entschützung bei geringeren TFA-Konzentrationen vorgenommen werden, was die Selektivität erhöht.



Schema 41: C-terminale Entschützung des seitenkettenverlängerten Lysin-Bausteins **60** für die Festphasensynthese.

Alle SPPS-Versuche, die Aminosäure **61** an das Harz **62** zu koppeln, scheiterten (Schema 42). Eine ausbleibende Acylierung bzw. schlechte Kupplungsausbeuten bei Verwendung der sterisch anspruchsvollen Aminosäuren, lassen sich manchmal durch den Einsatz uroniumbasierter Kupplungsagenzien, einem dreifachen Überschuss an DIPEA oder durch die Verwendung alternativer Lösungsmittel verbessern.^[202] PERICH *et al.* untersuchten diesbezüglich die Effizienz verschiedener Kupplungsmethoden für den Einbau komplexer Aminosäuren anhand der multiplen Peptidsynthese, wobei sich die Kombinationen der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt/DIPEA, sowie HATU/HOAt/DIPEA als überlegen herausgestellt haben. Weder eine Aktivierung des Carboxyterminus der Aminosäure **61** mit HBTU und HOBt noch mit reaktiveren Kupplungsreagenzien wie HATU/HOAt führte zu einer Peptidkupplung mit dem Polypeptid **62**.



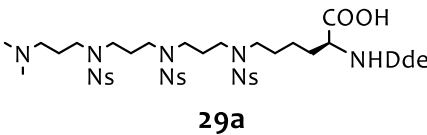
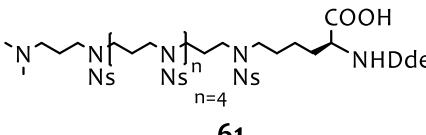
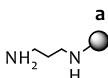
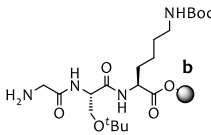
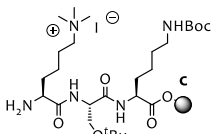
- i) 1.5 eq HBTU, HOBt, 4 eq DIPEA, 6 h, RT, DMF;
- ii) 1.5 eq HATU, HOAt, 6 eq DIPEA, 6 h, RT, Toluol/DMSO_{abs.} (3:1);
- iii) 3 eq HATU, HOAt, 5 eq DIPEA, 3 h, 50°C, Toluol/DMSO_{abs.} (3:1).

Schema 42: SPPS Versuche zum Anbringen des Lysin-Bausteines **61** an das Polypeptid-Harz **62**.

Weder ein Überschuss an DIPEA noch eine Aktivierung bei höheren Temperaturen führte zu einer signifikanten Veränderung im Reaktionsverlauf. Aus der Überlegung heraus, dass die misslungene Kupplung womöglich auf den „*pi sticking-Effekt*“ des Ns-reichen Linkers zurückzuführen ist, wurde die Kupplung auch im unpolaren Lösungsmittel wie Toluol durchgeführt. Aber auch in diesem Fall, konnte kein Umsatz per ¹H-NMR-Spektroskopie *via* Abspaltprobe nachgewiesen werden. Da die Anzahl der weiteren Kupplungsversuche aufgrund des hohen Verbrauches an synthetisch wertvollen Edukten limitiert war, sollten,

basierend auf den bereits realisierten Experimenten, zunächst alternative Optimierungsversuche durchgeführt werden. Mit Hilfe einer Testreihe im Kleinmaßstab sollten Hinweise hinsichtlich möglicher Einflussparameter wie die Sterik der eingesetzten Edukte oder die Reaktivität verwendeter Kupplungsreagenzien gesammelt werden. Hierzu wurde eine möglichst kleine Menge (Abspaltproben-Maßstab) des Harzes mit den jeweiligen Edukten unter den angegebenen Reaktionsbedingungen umgesetzt. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind in Tabelle 7 zusammen gefasst.

Tabelle 7: Optimierungsexperimente zur Kupplung der seitenkettenverlängerten Lysin-Derivate.

Edukte/ Harz	 29a	 61		
Kupplungs- bedingungen*	HBTU/HOBt DIPEA	HATU/HOAt DIPEA	HBTU/HOBt DIPEA	HBTU/HOBt DIPEA
 a	< 40%	< 80%	< 40%	< 90%
 b	< 50%	> 80 %	< 40%	< 80%
 c	--	< 40%	--	< 20%

*Reaktionsbedingungen: 1.5 eq HBTU, HOBt, 29 oder 60, 4eq DIPEA, RT in DMF je 4 h.

Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse lässt sich eine deutliche Tendenz erkennen. HATU/HOAt scheint unter ausgesuchten Reaktionsbedingungen im Vergleich zu HBTU/HOBt durchweg ein reaktiveres Kupplungsreagenz-Paar zu sein. So verdoppelt der Einsatz von HATU/HOAt fast immer den Kupplungsumsatz. Für eine erfolgreiche Acylierung ist neben den Kupplungsreagenzien die Beschaffenheit der Harze und die der zu kuppelnden Aminosäuren maßgebend. Die beiden Edukte **29a** und **61** lassen sich unter ähnlichen Konditionen sowohl an das Harz **a** als auch das Harz **b** kuppeln, wobei sich aus den Unterschieden in den Ausbeuten durchaus auf die Komplexität des jeweiligen

Aminosäurebausteines sowie die des Harzes schließen lässt. Das Harz **c**, das in der untersuchten Reihe das sterisch anspruchsvollste Trägermaterial darstellt, kann mit HATU/HOAt in DMF mit beiden Bausteinen acyliert werden. Die Tatsache, dass die Acylierung an jedem der getesteten Harze stattfindet, zeigt, dass sich die ausgewählten Reaktionsbedingungen grundsätzlich für eine Aktivierung der synthetisierten Lysin-Bausteine eignen sollten. Hierauf aufbauend lässt sich zur Steigerung der Umsätze möglicherweise noch der eine oder andere Parameter optimieren. Um die beobachtete Tendenz zu untermauern, sollte ein definiertes Fragment aus dem Sil-3, einem der Silaffine aus der Diatomee *Thalassiosira pseudonana*, hergestellt werden.

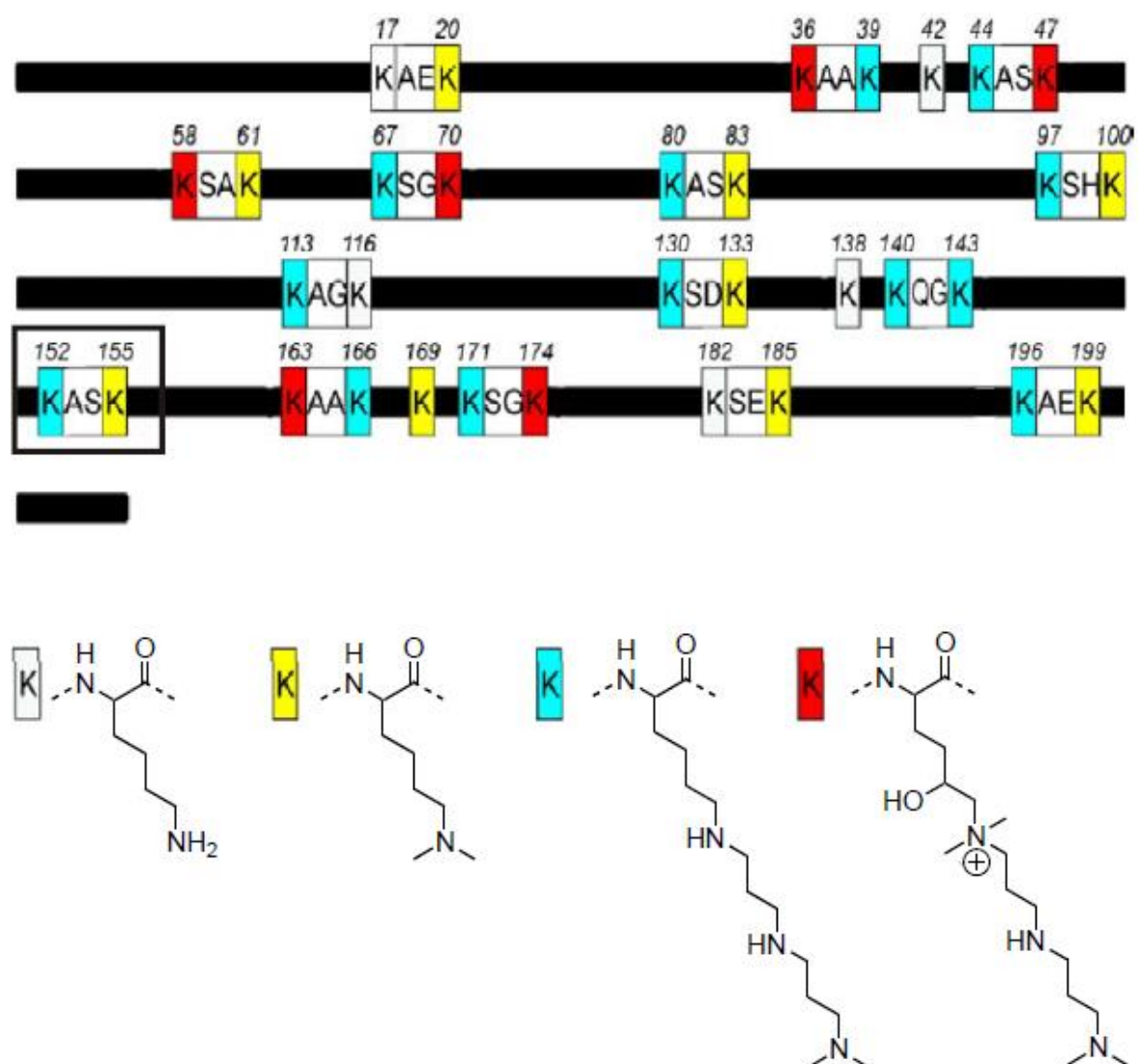
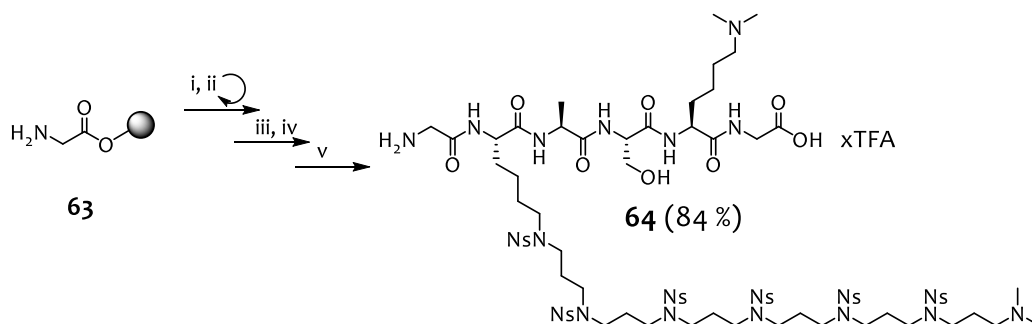


Abbildung 71: Verteilung der Lysin-Modifikationen in Sil-3.^[203] Die schwarze Linie stellt die Polypeptidkette dar. Die Positionen aller Lysin-Reste sind farbig unterlegt. Die Strukturen der codierten Lysin-Modifikationen sind unten gezeichnet. Die Peptidsegmente 152-155 sind mit einem schwarzen Kasten umrandet.

Im Sil-3 konnten drei Lysin-Modifikationen ermittelt werden (Abbildung 70). Ein Typ von Lysinen ist durch die formale Anknüpfung von zwei Aminopropylen-Einheiten am ϵ -Stickstoff verändert und ein weiterer Typ ist an der ϵ -Aminofunktionalität dimethyliert. Die dritte Art von Modifikation stellt ein Hydroxyl-Lysin-Rest mit quartärer Ammoniumfunktion dar. Sil-3 enthält insgesamt 33 Lysin-Reste, von denen 30 in einer definierten Tetrapeptidsequenz eingebaut sind. In der Sequenz K-(A/S/Q)-X-K stellt X meistens Glycin oder Alanin dar und die Sequenz wird flankiert von den modifizierten Lysinen an den beiden Termini. Diese Sequenz aus vier Aminosäuren (Mini-Silaffin) stellt im Naturstoff eine Art Code für die Einführung der jeweiligen posttranslationalen Modifikationen dar.^[203]

Die Synthese ausgewählter Fragmente aus Sil-3 kann Hinweise auf die Auswirkung der posttranslationalen Modifikation in einer festgelegten Aminosäuresequenz bei der Kieselsäurefällung geben.^[168] Das Peptidfragment 152-155 aus *Thalassiosira pseudonanas* Sil-3 wurde für die Einführung der Lysin-Modifikation ausgesucht, wobei anstatt des Lysins **29a** das um sechs Aminopropylen-Einheiten verlängerte Lysin-Derivat **61** eingebaut werden sollte. Der synthetische Ansatz zu den Mini-Silaffinen beruht auf der Fmoc-Strategie, abgesehen von der Einführung der Aminosäure **61**. An das mit Glycin vorbeladene 2-Chlorotritylchlorid-Harz wurde im ersten Schritt das Fmoc-geschützte Dimethyl-Lysin gekuppelt (s. Schema 43). Das Mini-Silaffin wurde am Ende mit einem Glycin-Rest versehen, so dass ein Hexapeptid **64** generiert wurde.



- i) 4 eq Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBt, DIPEA; ii) 25% Piperidin in DMF;
 iii) 1.5 eq **61**, HATU, HOAt; 4 eq DIPEA; iv) 2% Hydrazin in DMF; v) 95% TFA in H₂O.

Schema 43: Festphasensynthese des Mini-Silaffins **64** (das Peptidfragment: 151-156 aus dem Sil-3-Peptid (*Thalassiosira pseudonanas*)) mit posttranslationalen Lysin-Modifikationen.

Als Kupplungsreagenzien wurden auch hier HBTU und HOBt verwendet. Lediglich bei der Acylierung mit dem Lysin-Baustein **61** kamen HATU und HOAt zum Einsatz. Die Fmoc-Abspaltungen wurden mit 25%igem Piperidin in DMF durchgeführt. Nach der Entschützung der vierten Aminosäure wurde das Lysin-Derivat **61** an den N-Terminus vom Harz **63** gekuppelt. Hierzu wurde Lysin **61** mit HATU/HOAt/DIPEA in einem separaten

Reaktionsgefäß voraktiviert (15 min) und anschließend zum Harz gegeben. Die selektive Abspaltung der α -Dde-Gruppe wurde durch dreimalige Behandlung des Harzes mit 2%igem Hydrazin in DMF erreicht, um so das Hexapeptid **64** zu generieren.

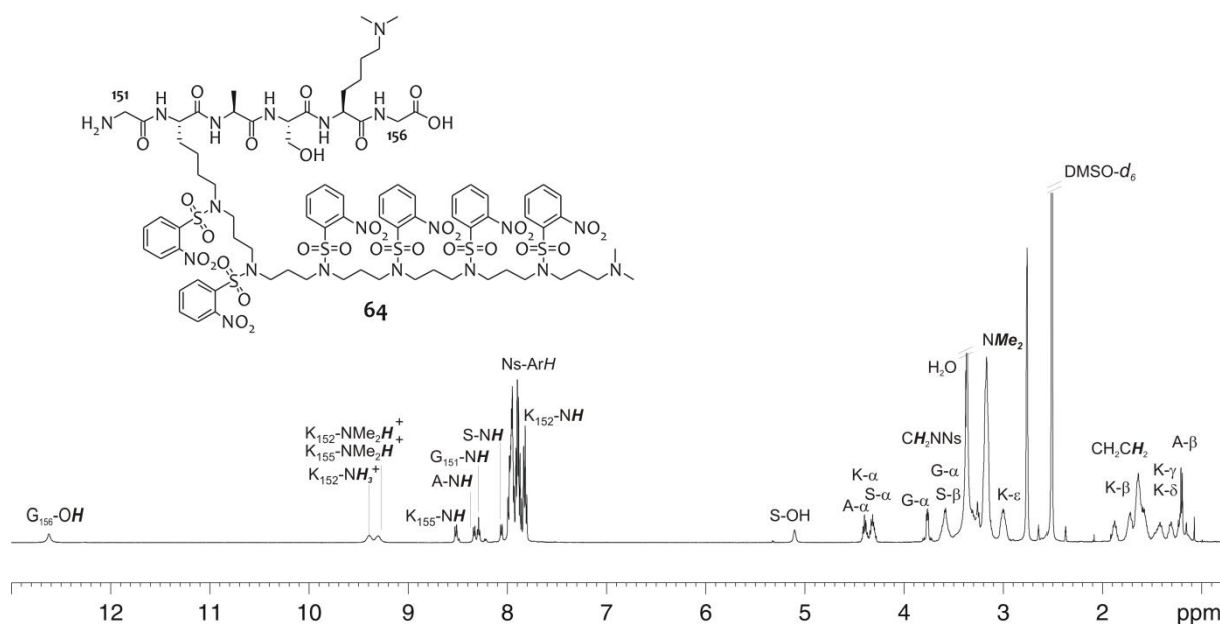
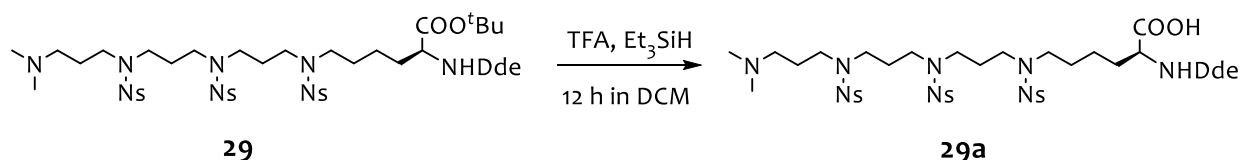


Abbildung 72: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des Peptidfragmentes aus Sil-3 (151-156). Die synthetisierte Sequenz enthält an Position 152 ein um sechs Aminopropylen-Einheiten verlängertes Lysin-Derivat **61**.

Als letztes wurde Fmoc-Glycin an das wachsende Peptid gekuppelt. Nachdem die gewünschte Peptidsequenz (Sil-3: 152-156) fertiggestellt war, erfolgte die saure Abspaltung des Peptides von der festen Phase. In Abbildung 71 ist das ¹H-NMR-Spektrum der *via* HPLC aufgereinigten Verbindung **64** zu sehen.

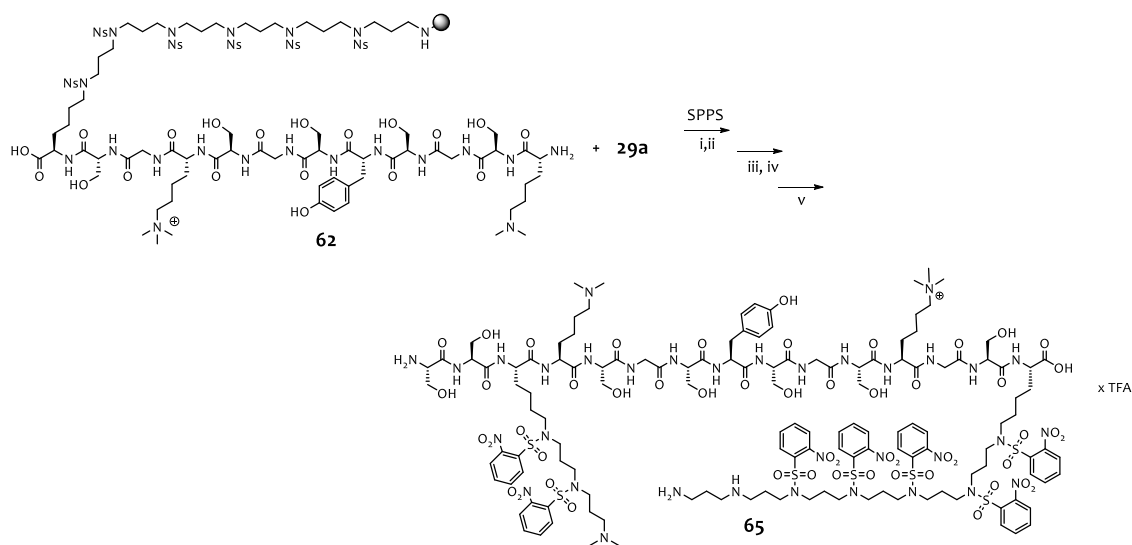
Trotz der zahlreichen Bemühungen, ist es nicht gelungen das Harz **62** mit dem Lysin-Baustein **61** erfolgreich zu acylieren. Weder der Einsatz reaktiverer, von den Standardbedingungen abweichender, Kupplungsreagenzien wie HATU/HOAt, Oxyma/HOBt,^[204] noch die Verwendung alternativer Lösungsmittel (Acetonitril, Toluol/DMSO)^[202] führten zu einem detektierbaren Umsatz. Aus diesem Grund wurden Überlegungen zur Darstellung eines alternativen Silaffin-1A₁-Derivates angestrebt, welches in Position 3 einen um zwei Aminopropylen-Einheiten verlängerten Lysin-Baustein enthält. Die selektive Entschützung des α -Carboxyterminus von **29** gelang durch die Behandlung mit TFA und Zugabe von Triethylsilan, sodass die freie Säure **29a** isoliert werden konnte.

Synthese von Silaffin-1A₁-Derivaten



Schema 44: Selektive Entschützung des α -Carboxyterminus von **29** zum modifizierten Lysin-Baustein **29a** für SPPS.

Die Acylierung des Silaffin-Harzes **62** mit dem Lysin-Baustein **29a** verlief analog zu den in Tabelle 7 aufgeführten Reaktionsbedingungen.



- i) 2 eq HATU, HOAt, 6 eq DIPEA, 2x 6 h, RT, DMF; ii) 2% Hydrazin in DMF, 3x 30 min;
 iii) 4 eq HBTU, HOBT, Fmoc-AS-OH, 6 eq DIPEA, 2x 30 min, DMF, RT; iv) 25% Piperidin in DMF;
 v) TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5).

Schema 45: Synthese des modifizierten Silaffin-1A₁-Derivates **65** ausgehend vom Peptid-Harz **62**.

Hierzu wurde der Baustein **29a** mit HATU/HOAt/DIPEA in einem separaten Reaktionsgefäß in DMF voraktiviert und anschließend zum Harz **62** gegeben. Die selektive Abspaltung der α -Dde-Gruppe mit 2%igem Hydrazin in DMF erfolgte nach 12 h Kupplungszeit („double coupling“ je 6 h). Alle darauffolgenden Kupplungen wurden hingegen nach dem Standard-Kupplungsprotokoll mit HBTU/HOBt durchgeführt. Nach einer abschließenden basischen Abspaltung der terminalen Fmoc-Gruppe folgte die saure Freisetzung des teilweise geschützten, Lysin-modifizierten Silaffin-1A₁-Derivates **65** von dem polymeren Trägermaterial. In der untenstehenden Abbildung 73 ist das ¹H-NMR-Spektrum des Lysin-seitenkettenmodifizierten Silaffin-1A₁-Derivates **65** zu sehen.

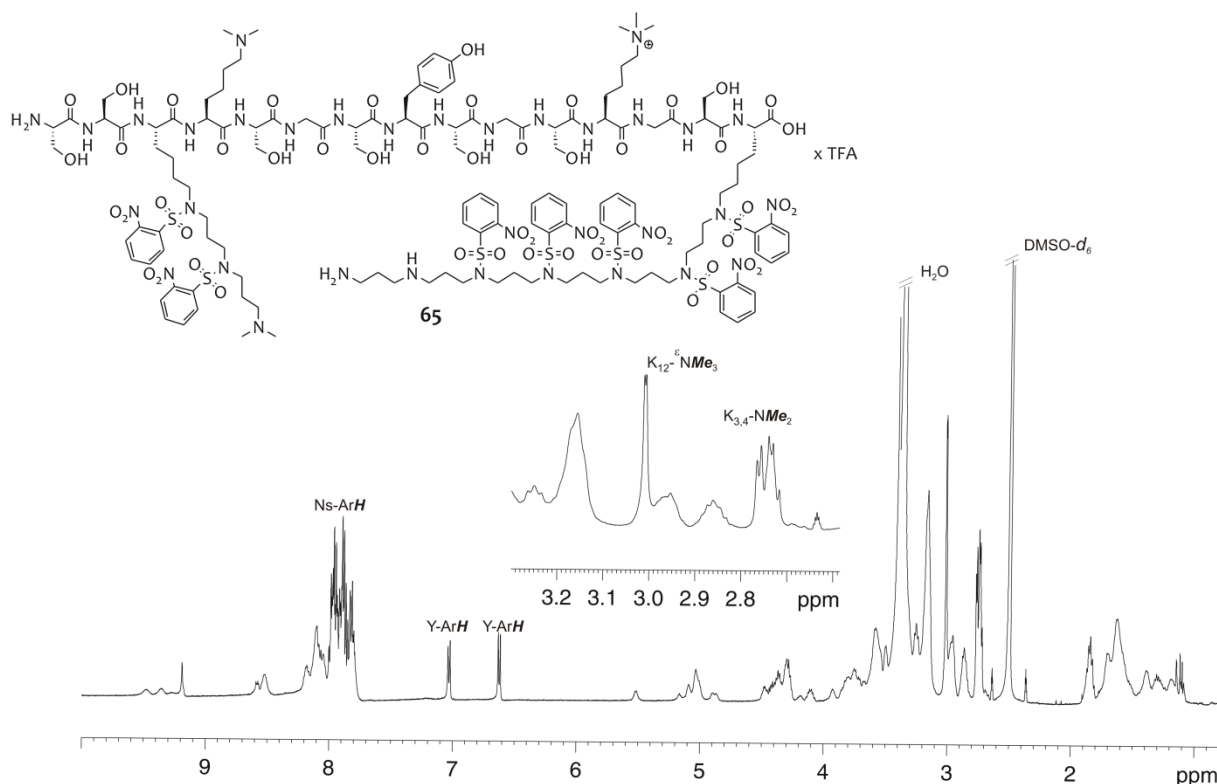


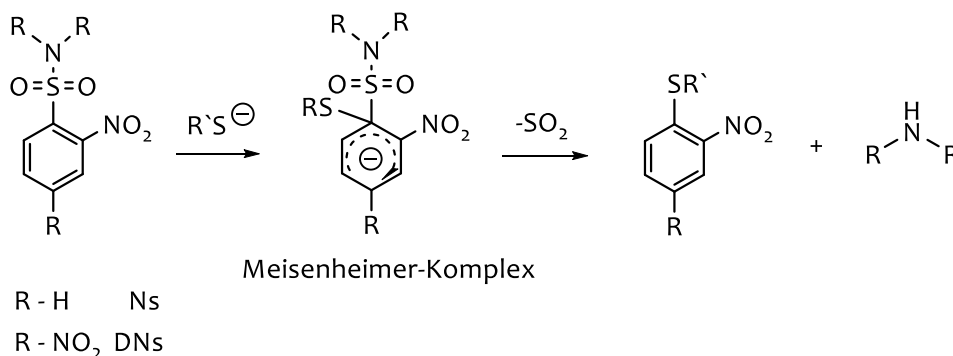
Abbildung 73: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des Silaffin-1A₁-Derivates **65**. Im Spektrum sind nur ausgewählte sequenzspezifische Signale zugeordnet.

Neben den Silaffin-1A₁-charakteristischen Signalen, die die Lysin-Modifikationen deutlich erkennen lassen, zeigt Abbildung 73 Signale von noch verbliebenen Ns-Schutzgruppen. Die lediglich partielle Entschützung durch die sauren Bedingungen bei der Harzabspaltung war durchaus beabsichtigt, um so mäßig polare modifizierte Silaffin-Peptide zu erhalten, die sich über HPLC aufreinigen lassen. Das teilweise geschützte Peptid **65** lässt sich mühelos mittels HPLC von Fehlkupplungssequenzen abtrennen. Auf dieser Stufe ist nicht nur die Aufreinigung, sondern auch die massenspektroskopische Untersuchung im Vergleich zu den komplett entschützten Silaffin-Peptiden weniger anspruchsvoll. Im folgenden Abschnitt wird eine neue Strategie zur Ns-Entschützung vorgestellt, die der herkömmlichen Synthese hinsichtlich der Aufreinigung, überlegen ist.

2.10.6 Neuartiger Ansatz zur Isolierung der Ns-entschützten Verbindungen und ihre Anwendung.

Die Spaltung der Ns-Gruppe erfolgt in der Regel durch Thio- oder Aminolyse. Durch den starken -M-Effekt lässt sich die Ns/DNs-Gruppe durch die Behandlung mit einem Thiophenol in Gegenwart einer Base abspalten (Schema 46). In Anwesenheit eines Schwefel-Nukleophils findet ein Angriff auf die *ipso*-Position der Ns-Gruppe statt, der zur Bildung eines

MEISENHEIMER-Komplexes führt. Unter Abspaltung von SO₂ wird das sekundäre Amin generiert.



Schema 46: Mechanismus der Thiolyse zur Spaltung DN_s-/Ns-Schutzgruppe.

Die N_s-Spaltung von mehrfach geschützten Verbindungen in Lösung ist mit einer Reihe von Komplikationen verbunden. Da sowohl das Thiol als auch die begleitende Base in Überschuss eingesetzt werden, bedarf das freie Produkt eine Aufreinigung nicht nur von dem entstehenden Thioether, sondern auch von zugesetzten Edukten. Allein durch das Ausfällen im kalten Ether lässt sich das gewünschte Produkt weder von Edukten, noch von den während der Entschützung entstehenden Nebenprodukten abtrennen. Hinzu kommt, dass es durch die mehrfachen, hintereinander folgenden Waschgänge zu erheblichen Produktverlusten kommt. So konnten nur 18% des Peptids **66** nach der Entschützung von **53** in Lösung mit 2-Mercaptoethanol/DBU isoliert werden (s. Abbildung 74).

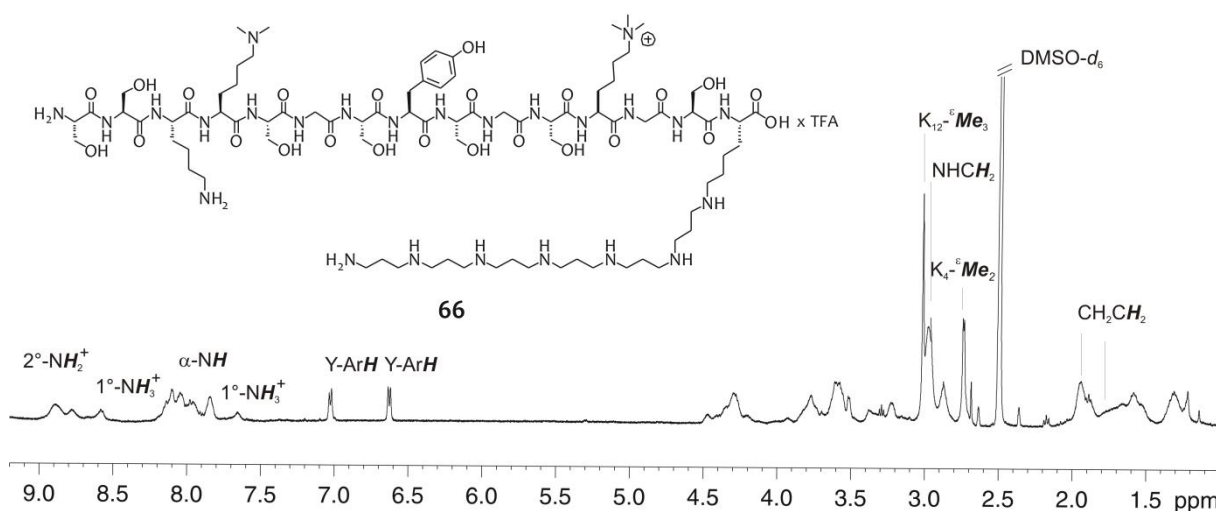


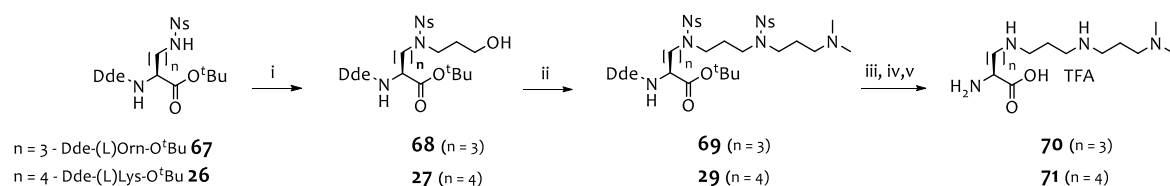
Abbildung 74: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des komplett entschützten Silaffin-1A₁-Derivates **66**.

Eine semi-präparative Trennung der vollständig entschützten Silaffin-1A₁-Derivate von den Edukten mittels HPLC war nicht erfolgreich. Unter Verwendung weniger als 5 Äquivalente Thiols pro N_s-Gruppe konnte kein quantitativer Reaktionsumsatz zur vollständig entschützten Verbindung erzielt werden. In dem Massenspektrum waren teilweise geschützte

Verbindungen zu erkennen. Zudem gestaltete sich eine HPLC-Kontrolle während der Spaltung aufgrund des Vorliegens mehrerer Ns-Gruppen äußerst schwierig. Aus diesem Grund wurde nach einem alternativen Weg zu der Ns-Entschützung in Lösung gesucht.

Für eine bestehende Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. A. SHEVCHENKO (TU Dresden) sollte eine Reihe Ornithin- und Lysin-basierter Oligoamine hergestellt werden, die als interne Standards für die massenspektrometrische Inhaltsanalyse der Diatomeen-Zellwand eingesetzt werden sollten. Individuell gestaltete LCPAs sind häufig anzutreffende Strukturfragmente, deren Grundmotive in den zahlreichen, natürlich vorkommenden Modifikationen von Lysin- bzw. Ornithin-Aminosäuren in Naturstoffen vertreten sind. Um den hohen Anforderungen zu genügen, müssen die entsprechenden Referenzverbindungen ein hohes Maß an Reinheit aufweisen. Auch bei diesem Ansatz ist eine effiziente Strategie zur Ns-Spaltung von entscheidender Bedeutung.

Die um zwei Aminopropylen-Einheiten seitenkettenverlängerten Lysin- und Ornithin-Aminosäuren lassen sich in Lösung gemäß dem Schema 23 herstellen.



i) 3-Brom-1-propanol, K₂CO₃, TBAI, 60°C, DMF, 12 h; ii) PPh₃, DIAD, N-(3-(dimethylamino)propyl)-2-nitrobenzenesulfonamid, THF_{abs.}, 3 d; iii) 2% Hydrazin in DMF; iv) TFA, Et₃SiH; v) CTC-Harz, DIPEA, 12 h; 2-Mercaptoethanol, DBU, 3x 30 min.

Schema 47: Synthese orthogonal geschützter, seitenkettenmodifizierter Lysin- bzw. Ornithin-Aminosäuren.

Die Synthese der orthogonal geschützten Aminosäuren-Bausteine in Lösung ausgehend von dem aktivierten Nitrosulfonsäurebenzamid (**26** bzw. **67**) ist in Schema 47 dargestellt. Um die quantitative Charakterisierung der am Biosilifizierungsprozess beteiligten Biomoleküle zu ermöglichen, müssen die synthetisierten Bausteine in die komplett ungeschützten Aminosäuren überführbar sein.

Nach einer stufenweisen Entschützung ist es zum ersten Mal gelungen das in Lösung hergestellte ω,ω -Dimethyl-dipropyleneamin-lysin bzw. -ornithin rein zu isolieren. Ein strategischer Umweg über das wiederholte Harzbeladen (s. Schema 47) hat sich bei der Darstellung derartig polarer Moleküle letztendlich ausgezahlt. In Abbildung 75 ist das ¹H-NMR-Spektrum des vollständig entschützten Lysin-Derivates **70** abgebildet.

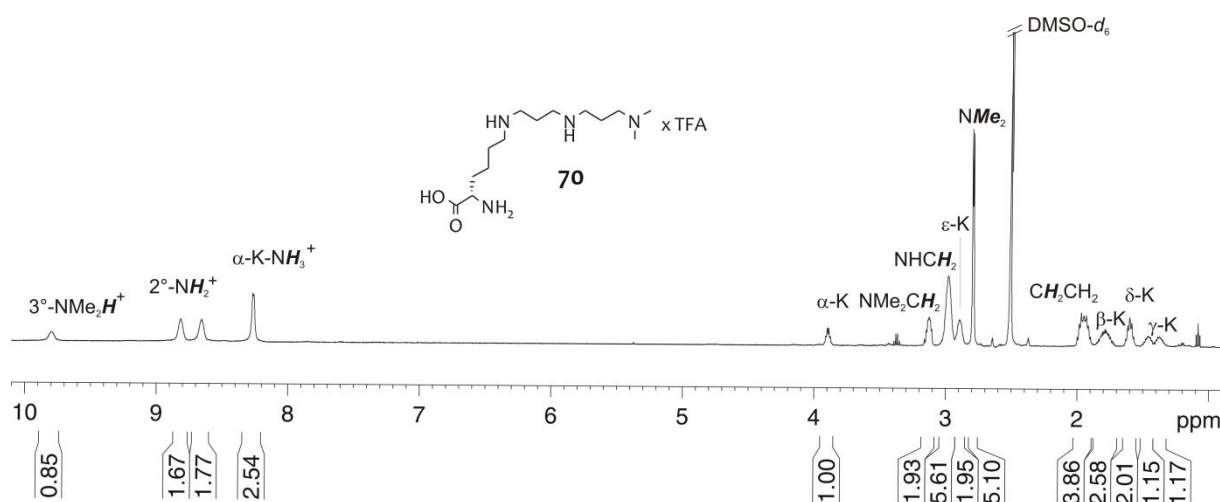
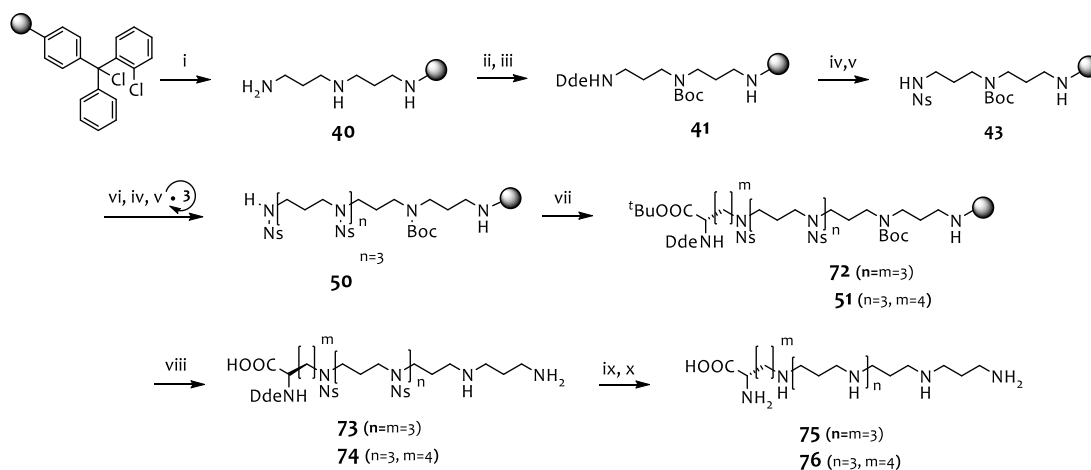


Abbildung 75: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des komplett entschützten ω,ω-Dimethyl-dipropyleneamin-lysins **70**.

Die bemerkenswert hohe Dispersion der Signale erleichtert die analytische Charakterisierung der synthetisierten Polyamine. Auffallend ist ebenfalls eine stark ausgeprägte Diversität der hier vorliegenden Ammonium-Signale. Diese ungleichen Amin-Funktionalitäten lassen sich in einem polaren Lösungsmittel wie DMSO gut voneinander unterscheiden.

Die um sechs Aminopropyl-Einheiten modifizierte Aminosäure ließen sich mittels einer kombinierten Synthesestrategie darstellen (s. Schema 48).



- i) 5 eq Norspermidin in DMF, 10 min; ii) Dde-OH, DIPEA, 2x 30 min in DMF, iii) Boc₂O, DIPEA, 2x 30 min in DMF;
 iv) 2% Hydrazin in DMF 2x 30 min; v) oNs-Cl, *sym*-Collidin in NMP, 3x 30 min; vi) PPh₃, DIAD,
 3-(Dimethylamino)propan-1-ol, 3x 4 h; vii) **27**, PPh₃, DIAD, 3x 4 h; viii) 95% TFA in Wasser, 30 min, RT;
 ix) CTC-Harz, **73** bzw. **74**, DIPEA; 12 h; x) 2-Mercaptoethanol, DBU, 3x 30 min; xi) TFA/H₂O/Et₃SiH.

Schema 48: Herstellung oligopropylenaminmodifizierter Lysin und Ornithin-Bausteine.

Auch bei der Darstellung des orthogonal geschützten, oligopropylenaminverlängerten Lysins **60** kam die kombinierte Strategie mit den abwechselnden Syntheseschritten in Lösung und an einem polymeren Trägermaterial zum Einsatz (s. Schema 39). Hierzu wurden die hergestellten modifizierten Bausteine zunächst unter sauren Bedingungen sowohl von dem

Trägermaterial als auch von den säurelabilen Schutzgruppen wie Butyloxycarbonyl- bzw. *tert*-Butylester-Schutzgruppen befreit. Die frei gewordenen funktionellen Stellen wurden für das erneute Anknüpfen an das Harz verwendet. Im Anschluss dazu erfolgte Ns-Spaltung durch Thiolyse mittels 2-Mercaptoethanol und DBU als Base. Einer der auf diesem Weg entschützten Bausteine ist in der unteren Abbildung zu sehen. Auffallend sind hierbei die charakteristischen Ammonium-Signale, welche sich in einem polaren Lösungsmittel wie DMSO voneinander unterscheiden lassen.

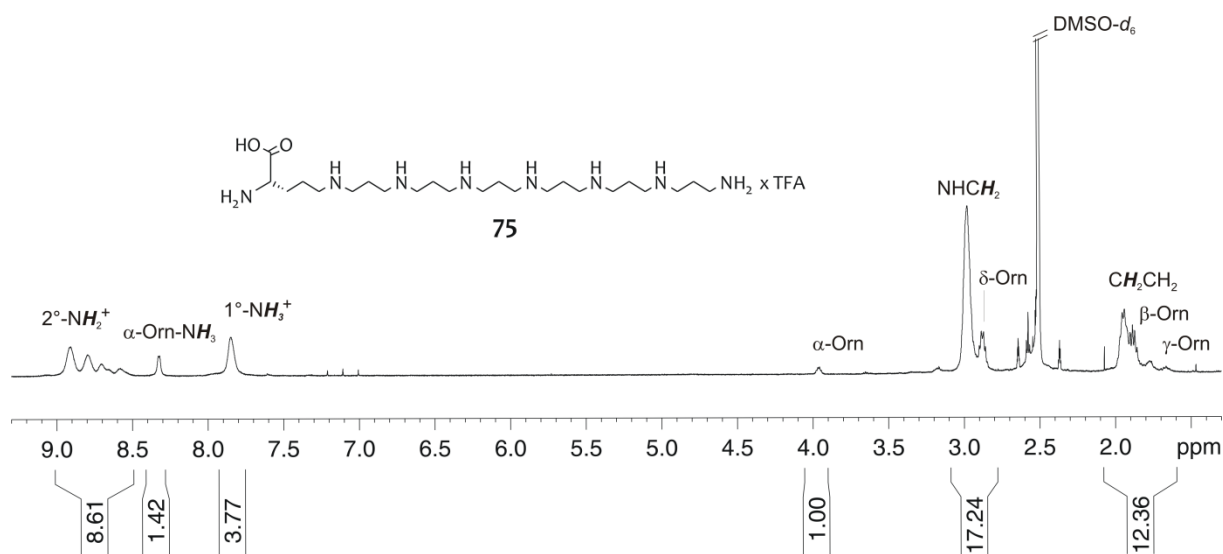
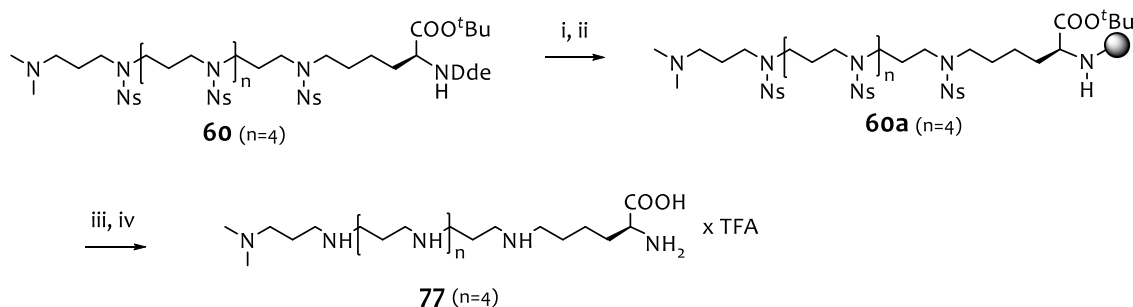


Abbildung 76: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des vollständig entschützten Ornithin-Derivates 75.

Für die in Lösung hergestellten Bausteine **29**, **69** und **60** musste eine der terminalen Schutzgruppen zunächst in Lösung entfernt werden um die darauffolgende Beladung an das Trägermaterial zu ermöglichen. Hierbei wurde die basische Entschützung der Dde-Gruppe der sauren Spaltung des *tert*-Butylesters vorgezogen. Der Fortschritt der Entschützung konnte mittels HPLC verfolgt werden. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung unter vermindertem Druck aufkonzentriert und die *N*-terminal entschützte Aminosäure in kaltem Ether gefällt. Nach dem mehrfachen Behandeln des Produktes mit DCM wurde dieses unter DIPEA-Zugabe über mehrere Stunden auf das Harz beladen. Nach etwa 12 h Reaktionszeit wurde das Harz von der Reaktionslösung befreit und die freien noch vorhandenen Reaktivstellen des Trägermaterials durch „capping“ mit Methanol eliminiert. Die Thiolyse an dem mit der Aminosäure beladenen Harz erfolgte anschließend im Basischen unter Verwendung von 2-Mercaptoethanol und DBU. Durch die wiederholten Waschschrte konnten sowohl die Edukte als auch die während der Reaktion gebildeten Nebenprodukte mühelos entfernt werden. Auf diesem Weg ließen sich alle SPPS-Vorteile nicht nur bei der Herstellung vielfältig modifizierter Bausteine, sondern auch zur Gewinnung komplett

entschützter, stark polarer Aminosäuren in reiner Form ausschöpfen. Die beschriebene Entschützungsstrategie ist exemplarisch für Verbindung 77 gezeigt.



i) 2% Hydrazin in DCM, 12 h; ii) CTC-Harz, DIPEA, **60a**; 12 h; iii) 2-Mercaptoethanol, DBU, 3x 30 min; iv) TFA/H₂O/Et₃SiH.

Schema 49: Synthetisch-strategischer Ansatz zu einer synchronen Spaltung mehrerer Ns-Schutzgruppen. Gezeigt ist der Syntheseweg zum vollständig entschützten Lysin-Derivat 77.

In der untenstehenden Abbildung ist das ¹H-NMR-Spektrum des dimethyl-oligopropylenaminverlängerten Lysins dargestellt. Dieser synthetisch wertvolle Baustein lässt sich in seiner entschützten Form nicht nur als interner Standard für die massenspektrometrischen Untersuchungen, sondern auch bei der NMR-begleitenden Analyse der Kieselsäurefällung einsetzen.

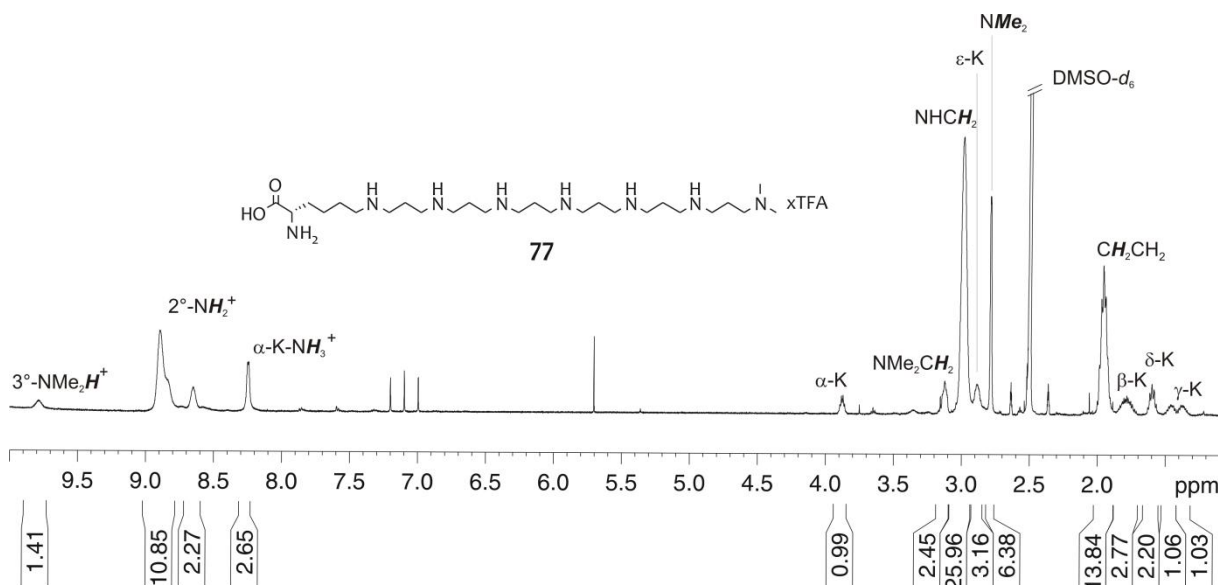


Abbildung 77: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des vollständig entschützten Lysin-Derivates 77.

Für eine weitergehende Untersuchungen der Zellwandmorphogenese von Diatomeen wurden im Rahmen dieser Arbeit, basierend auf den Erkenntnissen bezüglich der strukturellen Eigenschaften der Hauptdirigenten des Biosilifizierungsprozesses, synthetische Oligoamin-basierte Aminosäurebausteine sowie Silaffin-1A₁-Derivate hergestellt. Dank einer originellen Synthesestrategie und einem innovativen Entschützungsansatz bietet sich eine einzigartige Möglichkeit die synthetischen, hochkomplexen Naturstoffderivate hinsichtlich ihrer

polykationischen Natur und der damit verknüpften Fähigkeit zur Selbstaggregation (*self assembly*) zu untersuchen.

Mit der oben beschriebenen Entschützungsstrategie ließen sich ebenfalls aus den Nsgeschützten Vorstufen **64** und **65** das Mini-Silaffin **78** sowie das Silaffin-1A₁-Derivat **79** isolieren. In den unteren Abbildungen sind ¹H-NMR-Spektren dieser Verbindungen zu sehen.

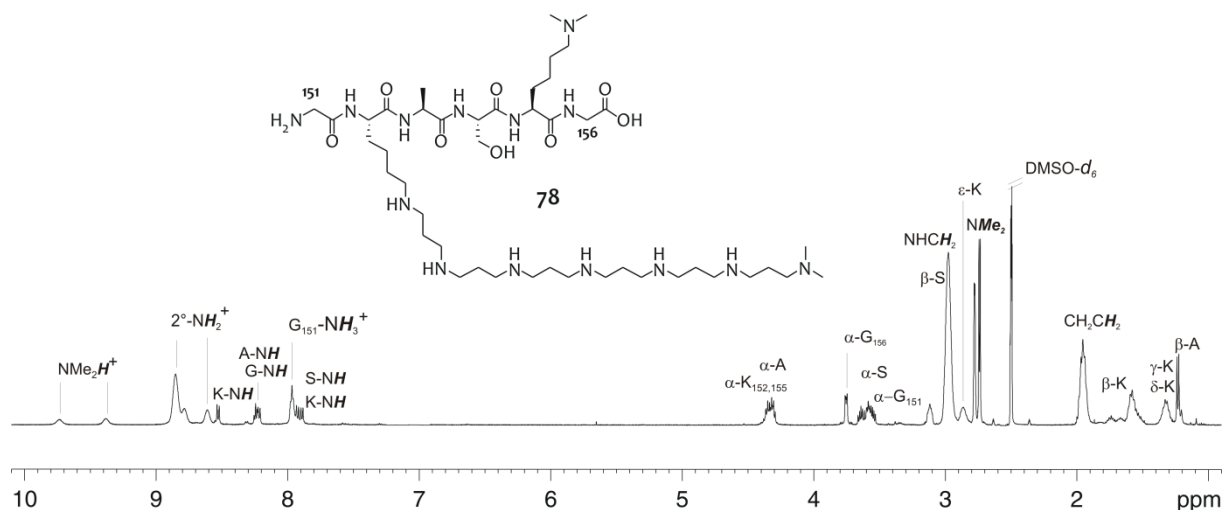


Abbildung 78: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des vollständig entschützten modifizierten Peptidfragmentes **78** in Anlehnung an die Fragmentstruktur (152-155) des Sil-3 aus *Thalassiosira pseudonanas*.

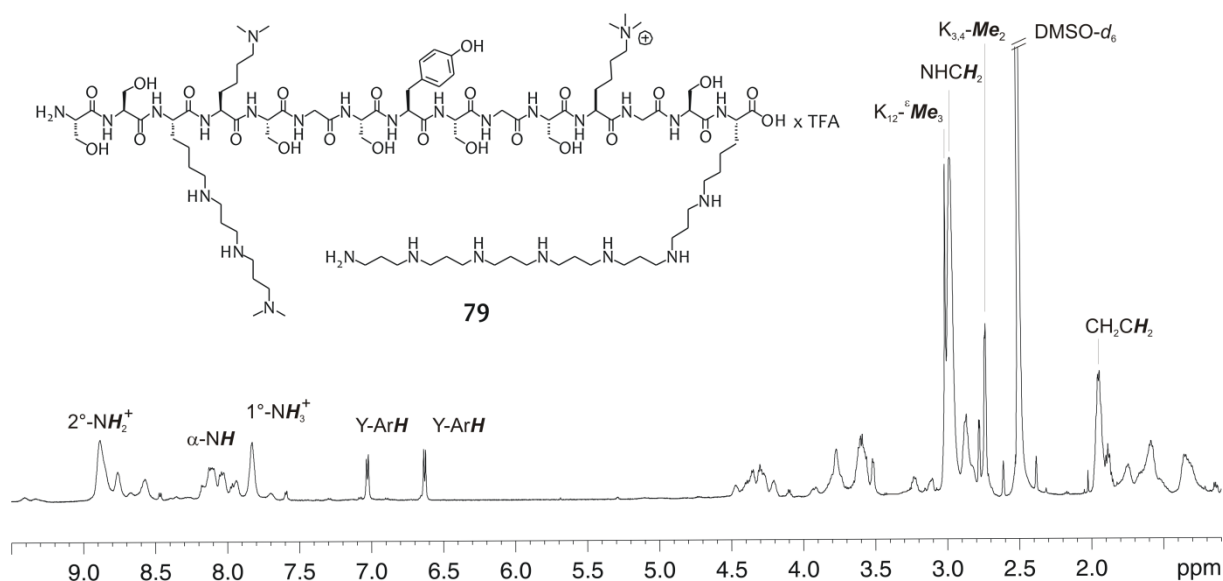


Abbildung 79: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) des entschützten Silaffin-1A₁-Derivates **79**. Im Spektrum sind nur ausgewählte sequenzspezifische Signale zugeordnet.

Um den Einfluss von Silaffinen bei der Bildung von Biomineralien verstehen zu können, soll die Rolle der einzelnen Modifikationen, sowohl allein als auch in Kombination bestimmt werden. Mit spezifisch modifizierten Silaffin-ähnlichen Peptiden wird eine systematische Untersuchung des Einflusses von Silaffin-Modifikationen auf die Silica-präzipitierende Aktivität und die Morphologie des entstehenden Silica-Materials ermöglicht.

3. Zusammenfassung

Das unten abgebildete Schema veranschaulicht das der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Konzept. In einem Baukastensystem mit wenigen, ausgesuchten Grundbausteinen gibt die Kombination aus freien reaktiven Stellen die Syntheserichtung an.

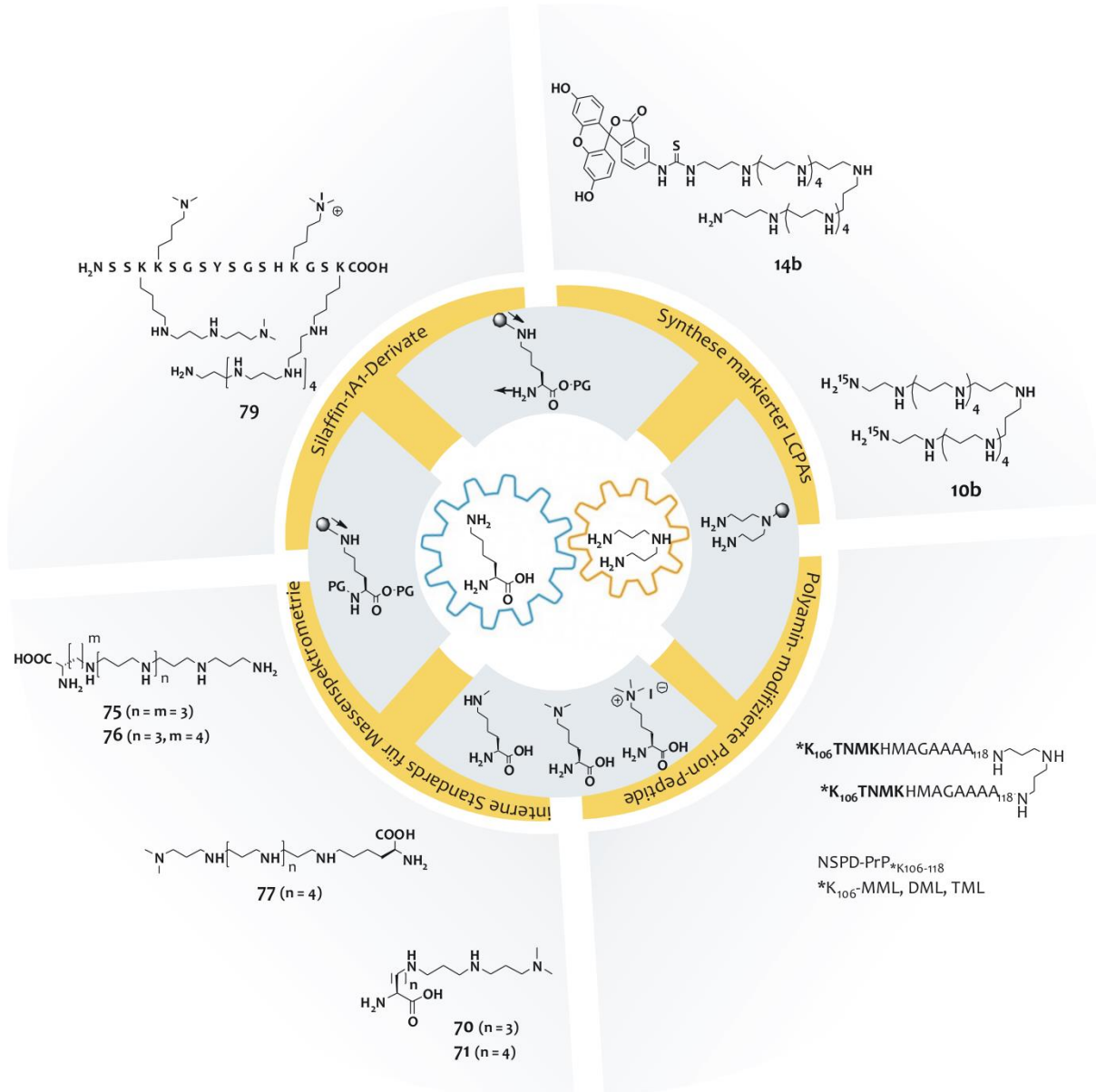


Abbildung 80: Generalschema der, im Rahmen dieser Arbeit, verfolgten Synthesestrategien. Durch die regioselektive Derivatisierung des *Bis*-(3-aminopropyl)-amins lassen sich symmetrische LCPAs herstellen. Durch die systematische Veränderung des Methylierungsgrades des ϵ -Stickstoffes wurden die verbreitetsten posttranslationalen Modifikationen des Lysins generiert. Kombiniert man diese beiden Ansätze, so eröffnet sich der Zugang zu den modifizierten, homodimeren Prion-Peptiden. Wird die MITSUNOBU-Reaktion mit der klassischen SPPS kombiniert, so lassen sich verschiedene Silaffin-1A₁-Derivate herstellen. Bedient man sich ausschließlich der FUKUYAMA-MITSUNOBU-Reaktion zur Verlängerung der Lysin-Seitenkette, entstehen oligoaminverlängerte Lysin- und Ornithin-Bausteine, die unter anderem in der Massenspektrometrie als interne Standards ihre Anwendung finden.

Wenn es darum geht, einen Baustein selektiv zu modifizieren, wird die regioselektive Derivatisierung zu der treibenden Kraft und ermöglicht darüber hinaus die Verfolgung

mehrerer, verschiedener, aufeinander aufbauender oder unabhängiger Synthesestrategien mit unterschiedlichsten Fragestellungen, Zielmolekülen und ihren vielfältigen Einsatzbereichen.

Basierend auf den Erkenntnissen zu den biochemischen Vorgängen der Biomineralisation, wurden in dieser Arbeit zum einen die Synthesen entwickelt, die den Zugang zu den natürlich vorkommenden organischen Komponenten mit Silica-präzipitierenden Eigenschaften ermöglichen und zum anderen ein Konzept zur Untersuchung der chemoselektiven Kieselsäurefällung *via* ^1H -NMR-Spektroskopie, vorgestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte NMR-Methode mit den optimierten Fällungsbedingungen bietet eine einzigartige Möglichkeit die Dynamik eines chemoselektiven Silifizierungsprozesses zwischen verschiedenen Präzipitatbildnern mittels ^1H -NMR-Routinemessung zu verfolgen. Das entwickelte Experiment stellt somit eine informative Ergänzung der Präzipitat-Quantifizierungsmethode, einem bereits etablierten analytischen Verfahren bei der Untersuchung des Biosilifizierungsprozesses, dar.

In Zusammenhang mit der Biomineralisation von Kieselsäure haben langkettige Polyamine ein großes Forschungsinteresse erlangt. LCPAs bilden den größten organischen Bestandteil der Diatomeenzellwand aus und sind daher für den Biosilifizierungsprozess von großer Bedeutung. Wie die *in vitro*-Experimente zeigen, übernehmen die Polyamine beim Ausfällen der Kieselsäure in erster Linie die katalytische Rolle. Um weitere Erkenntnisse der Beteiligung der LCPAs an diesem Vorgang zu gewinnen, wurden $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Isotopen markierte Oligoamine synthetisiert. Der vorgestellte synthetische Ansatz erlaubt, ausgehend von dem *Bis*-(3-aminopropyl)-amin, eine effiziente, automatisierte Herstellung individuell gestalteter, Isotopen- sowie Fluoreszenzmarkierter LCPAs. Mit den synthetisierten Markern lassen sich verschiedene biomimetische Verfahren zur Bildung komplexer SiO_2 -Strukturen nachvollziehen.

Durch die Insertion von Fluoreszenz-Markern in planaren Lipidmembranen können wichtige Rückschlüsse, nicht nur hinsichtlich der katalytischen Rolle der LCPAs auf den Biosilifizierungsprozess, sondern auch bezüglich der strukturgebenden Eigenschaften der Lipidmembran-Matrix gezogen werden. Durch den Einbau diverser Isotopen-Markern erhofft man sich in Hinblick auf die strukturdirigierenden Eigenschaften der LCPAs noch verborgene Zusammenhänge zwischen ihrer chemischen Struktur und den morphologischen Merkmalen mittels Festkörper-NMR aufzuklären. Darüber hinaus erlauben die punktuell markierten Oligoamine durch die Untersuchung gebildeter Silica-Nanokomposite eine umfangreiche Analyse quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

In der Gruppe der organischen Makromoleküle, die in einem direkten Zusammenhang mit dem Prozess der Silica-Biomineralisation stehen, nehmen Silaffine eine gesonderte Rolle ein. Diese Peptide sind, dank ihrer ausgefallenen posttranslational modifizierten Form, unmittelbar an der Silica-Bildung in Kieselalgen beteiligt. Schwerpunkt dieser Arbeit bestand unter anderem darin, einen effizienten synthetisch-strategischen Ansatz zu erarbeiten, der einen Zugang zu den Silaffin-Peptiden mit verschiedenen posttranslationalen Aminosäuremodifikationen (PTMs) ermöglicht. Durch das Übertragen der FUKUYAMA-MITSUNOBU Reaktionsbedingungen auf die feste Phase, konnten wesentliche Vorteile der Synthese der oligopropylenaminverlängerten Lysin-Seitenkette an einem festen Trägermaterial, im Vergleich zu der in Lösung, gezeigt werden. Mittels einer Kombination aus der klassischen SPPS und MITSUNOBU-Festphasensynthese gelang die Darstellung von Silaffin-Derivaten, die an spezifischen Aminosäureseitenketten di- bzw. trimethyliert und durch kovalente Anbindung von Oligopropylenaminen modifiziert sind. Damit wurden die wichtigen Schritte zur Totalsynthese natürlicher Silaffin-Peptide unternommen. Mit Hilfe spezifisch modifizierter Silaffin-Peptide kann eine systematische Untersuchung des Einflusses von Silaffin-Modifikationen auf die Silica-präzipitierende Aktivität und die Morphologie des entstehenden Silica-Materials erfolgen.

Die etablierte FUKUYAMA-MITSUNOBU-Strategie an der festen Phase wurde im Weiteren genutzt, um die Oligopropylenamin-seitenkettenverlängerten Lysin- und Ornithin-Bausteine herzustellen, die in der Massenspektrometrie als interne Standards zum Einsatz kamen.

Prionerkrankung ist bislang nicht therapierbare, in der Regel tödlich verlaufende Krankheit, die einen infektiösen Charakter besitzt. Dabei wird die Fehlfaltung eines physiologisch vorkommenden, zellulär exprimierten Prion Proteins PrP^C, welches Aggregate bildet und sich im Gehirn in Form von Prionplaques ablagert, als Hauptursache dieser Erkrankung angesehen. Um die toxische Wirkung des Peptides, die vermutlich mit der Aggregatbildung einhergeht, besser verstehen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit einige Prion-Peptid-Modelle entwickelt. Für die Erforschung der Prion-Peptid-Aggregation und die gezielte Affinitätsuntersuchung humaner, Prion-spezifischer Antikörper (nAbs-PrP) wurden entsprechende Peptid-Antigene generiert, die einerseits ein für die molekulare Erkennung notwendiges Epitop enthalten und andererseits eine homodimere Struktur aufweisen. Durch die regioselektive Derivatisierung eines Triamins gelang die kovalente Verzweigung monomerer PrP-Peptidstränge zu einem symmetrischen Makromolekül mit klar definiertem Oligomerisierungsgrad. Mittels systematischer Veränderung des Methylierungsgrades eines in

der Epitop-Region gelegenen Lysins konnte die Affinität der synthetischen Prionproteinfragmente zu Prion-spezifischen Antikörpern gezielt untersucht werden.

4. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten nicht nur erfolgreiche Synthesen und neue strategische Ansätze zur Herstellung von, für den Biosilifizierungsprozess relevante Verbindungsklassen, vorgestellt, sondern auch ein wichtiger Beitrag zur einer kontrollierten Kieselsäureabscheidung mit mehreren Präzipitatbildnern geleistet werden. Trotz erfolgsversprechender Ansätze und erzielten Erkenntnissen sind weitere Untersuchungen an den synthetischen Molekülen mit Silica-präzipitierenden Eigenschaften notwendig, um tiefere Einblicke in die Abläufe des Biosilifizierungsprozesses gewinnen zu können.

Die kontrollierten, *in vitro* Kieselsäurefällungen mit modifizierten Silaffin-Peptiden könnten maßgeblich zu einem besseren Verständnis für die geordnete Kieselsäurepräzipitation beitragen. Mit einem positiven Nachweis einer Kooperativität zwischen zwei Stoffklassen, den synthetischen LCPAs und Silaffin-Peptidanaloga, ließe sich zum einen die *self assembly*-Hypothese stützen, und zum anderen könnten wichtige, tiefgreifende Erkenntnisse über das aufwendige Zusammenspiel elektrostatischer Wechselwirkungen gewonnen werden.

Für die Herstellung neuer, maßgeschneiderter Polyamine und Silaffine wird die SPPS-Synthesestrategie ergänzt und mit weiteren Methoden erweitert werden müssen. Eine Einführung von ortsspezifischen, quartären Ammoniumgruppen zählt sicherlich zu den künftigen Herausforderungen und würde die strukturelle Vielfalt der Naturstoff-inspirierten Verbindungen bereichern. Die Erhöhung des hydrophoben Charakters kommt aber nicht nur der strukturellen Divergenz zugute, sondern würde ebenso die für die Synthesen notwendigen Schutzgruppenstrategien oder den Aufreinigungsaufwand in vielerlei Hinsicht vereinfachen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FUKUYAMA-MITSUNOBU-Reaktion an der festen Phase zu einer, mit der Amidreduktion gleichwertigen Methode bei der Herstellung sekundärer Polyamine, genutzt. Um das breite, synthetische Anwendungsspektrum dieser Methode herauszuarbeiten, muss diese jedoch weiterhin optimiert werden. Mit dem Einbringen der Flexibilität in die vorgestellte Schutzgruppenstrategie, könnten entscheidende Schritte auf dem Weg zur Totalsynthese des Silaffins-1A₁ gelingen.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Verbindungen, erlauben eine systematische Untersuchung des Einflusses von posttranslationalen Modifikationen auf die Silica-präzipitierende Aktivität und Morphologie des entstehenden Silica-Materials. Nur durch ein vollkommenes Verständnis komplexer Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion lässt sich der Prozess der Biomineralisation von Silica in Kieselalgen entschlüsseln.

In Hinblick auf die Prion-Peptid-Modelle würde sich eine Verkürzung des intramolekularen Aminabstandes des zur Verzweigung eingesetzten Amins auszahlen. Mit diesem Eingriff lassen sich womöglich stabile Intermediate mit einer definierten Konformation generieren, die einen Einblick in die Initiierung des Aggregationsprozesses gewähren. Die Aminosäureabfolge des Epitops bietet einen Raum für weitere Modifikationen und somit weiterreichende Struktur-Affinitäts-Untersuchungen.

Die Analyse der Antigen-Antikörper Interaktionen mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR-Spektroskopie) würde die Untersuchungen an den bereits hergestellten Prion-Peptiden abrunden. Auch sollten sie die Möglichkeit zur Herstellung monoklonaler Antikörper, basierend auf den polyklonalen nAbs-PrP, eröffnen, was letztendlich eine Anwendung in der Diagnostik der Prionerkrankung ermöglichen würde.

5. Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Anmerkungen

Lösungsmittel und Reagenzien:

Die in den Synthesen und Experimenten verwendeten Lösungsmittel wurden entsprechend der Standardverfahren gereinigt oder absolutiert. Absolutierte Lösungsmittel, wie Diethylether wurden über Molsieb aufbewahrt und getrocknet. Für die Festphasen-Peptidsynthese wurde DMF „peptide grade“ von IRIS-BIOTECH käuflich erworben und direkt eingesetzt. Alle kommerziell erhältlichen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

Flashchromatographie

Als stationäre Phase diente Kiesgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 nm) der Firma MACHEREY-NAGEL. Eluiert wurde bei Raumtemperatur und einem geringen, manuell erzeugten Überdruck.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden Aluminium-DC-Fertigfolien (Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0.2 mm) der Firma MERCK verwendet. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption/Floureszenzauslöschung unter einer UV-Lampe ($\lambda = 254$ nm) oder durch Verwendung verschiedener Färbereagenzien. Die entsprechenden Farbreaktionen der verschiedenen Färbereagenzien wurden durch Eintauchen in die jeweilige Lösung und anschließendes Erwärmen mit dem Hiebluftfön hervorgerufen.

Ninhydrin-Lösung: 1.00 g Ninhydrin in 100 mL Ethanol.

Mostain-Lösung: 10.0 g Ammoniummolybdat und 0.20 g Cer(IV)-sulfat in 200 mL 10%iger H_2SO_4 .

High Performance Liquid Chromatography

HPLC-Messungen wurden an einer *Dionex Ultimate 3000*-Anlage von *Thermo Scientific* mit der Software *Chromeleon* durchgeführt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden HPLC Messungen bei RT durchgeführt. Als Eluenten wurde entionisiertes Wasser (mit 0.1%iger TFA versetzt) [A] sowie Acetonitril HPLC-Grade [B] (ACROS-ORGANICS) eingesetzt. Zu analytischen Messungen wurden eine HPG-3200 BX-Pumpe, ein Diodenarray-Detektor UVD 340 U, ein Autosampler WPS-3000 SL und ein Säulenofen TCC-3000 SD eingesetzt. Analytische Messungen wurden mit der *reverse-phase*-Säule INERTSIL ODS-4 (ACE 3, C_{18} , 300 Å, 3.0×150 mm) und semi-präparative Trennungen mit der *reverse-phase*-Säule

ACE 5 (C - 18, 5 μm , 300 \AA , 7.75 x 150 mm) durchgeführt. Zur Aufreinigung der Rohpeptide dienten eine LPG-3400-SD-Pumpe, ein MWD-3000-Detektor sowie ein AFC-3000-Fraktionskollektor und ein Solvent Degaser Series 300. Die Elution erfolgte je nach Trennproblem an einer *reverse-phase*-Säule INERTSIL ODS-4 (ACE, C₁₈, 5 μm , 7.75 \times 150 mm) oder an einer *reverse-phase*-Säule NUCLEODUR GRAVITY (MN, C₁₈, 5 μm , 21 \times 125 mm).

Kernresonanzspektroskopie

NMR-Messungen wurden an folgenden Geräten durchgeführt:

Bruker AV 300 für ¹H (300.13 MHz) - Routinemessungen & Fällungsexperimente

Bruker Avance AV 600 für ¹H (600.13 MHz), ¹³C (150.90 MHz) und 2D-Spektren.

Die NMR-Spektren wurden am *Bruker* AV 300 in Selbstmessung aufgenommen, Messungen am *Bruker* Avance AV 600 erfolgten durch Mitarbeiter der NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg. Falls nicht anders angegeben, betrug die Messtemperatur 300 K. Die chemischen Verschiebungen δ sind in *parts per million* (ppm) relativ zum verwendeten Lösungsmittel bzw. internen Standard angegeben und wurden aus der Mitte der Kopplungsmuster abgelesen. Folgende Verbindungen wurden als interner Standard zur Kalibration der chemischen Verschiebung verwendet:

DMSO-*d*₆ ¹H: $\delta = 2.50$ ppm

TSP ¹H: $\delta = 0.00$ ppm

Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (*Hz*) angegeben. Als Lösungsmittel wurden routinemäßig deuteriertes DMSO-*d*₆ (¹H: $\delta = 2.50$ ppm) und D₂O (¹H: $\delta = 4.79$ ppm) verwendet. Die Angabe der Signalmultiplizitäten ist phänomenologisch, d.h. bezieht sich auf das Erscheinungsbild des jeweiligen Signals im Spektrum und nicht auf die zu erwartende Multiplizität. Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hz angegeben. Für die Zuordnung von Signalen wurden außer den eindimensionalen ¹H-NMR- auch die zweidimensionalen TOCSY-, HSQC, NOESY- und ROESY-Spektren aufgenommen. Diastereotope Protonenpaare, deren Signale eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden mit den Indices ^H für hochfeldverschoben bzw. ^T für tieffeldverschoben gekennzeichnet. Die Bearbeitung und Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm *Topspin 3.2* von *Bruker*.

Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurden von Mitarbeitern der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität zu Marburg an den folgenden Spektrometern: *Finnigan LTQ-FT*- *Finnigan LTQ FT (ESI+)*, *Finnigan MAT 95* sowie *Bruker Biflex III* aufgenommen. Als Ionisierungsmethode diente häufig die Elektrospray-Ionisation (ESI). Angegeben wurde jeweils das berechnete und gemessene Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Verbindung.

5.2 Synthesen an fester Phase

Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.2.1 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die automatisierte Synthese der Prionensequenzen erfolgte an einem *Liberty Blue* Mikrowellen-Peptid-Synthesizer der Firma CEM GmbH. Die Synthese erfolgte nach der Fmoc-Strategie mit beladenem CTC-Harz und einer Ansatzgröße von 0.10 mmol bei 30 Watt und 50 ± 2 °C. Als Lösungsmittel diente DMF „peptide grade“, als Kupplungsreagenzien wurden Diisopropylcarbodiimid (DIC) sowie (Hydroxyimino)cyclohexanocarbonyl-ethyl-ester (Oxyma) zur Aktivierung verwendet. Zur Fmoc-Entschützung verwendete der Synthesizer Piperidin (3.0 mL, 20% in DMF) und benötigte inklusive Waschen 210 Sekunden. Zur Kupplung wurden die entsprechende Aminosäure (2.5 mL, 0.2 M, 5.00 eq), DIC (1.0 mL, 0.5 M, 5.00 eq) und Oxyma (0.5 mL, 1 M, 5.00 eq) zum Harz gegeben. Pro Kupplungsschritt benötigte der Synthesizer 600 Sekunden. Nach finaler Entschützung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe durch den Synthesizer wurde das Harz mehrmals mit DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

5.2.2 Manuelle Festphasensynthese

5.2.3 Kupplung der ersten Aminosäure an das 2-Chlorotriylchlorid-Harz

2-Chlorotriylchlorid-Harz (theoretische Beladung 1.63 mmol/g) wurde in DCM (10 mL/g Harz) suspendiert und mit 1.20 eq Fmoc-AS-OH versetzt. Nach Zugabe von 5.20 eq DIPEA wurde die Mischung 2 h durchmischt, indem ein schwacher Stickstoff-Strom durch die Lösung geleitet wurde. Nach Absaugen der Lösung wurde das Harz dreimal mit DCM gewaschen. Es wurde erneut in DCM/MeOH/DIPEA (80/15/5) suspendiert und 20 min durchmischt. Anschließend wurde das Harz mit dieser Lösung zweimal nachgewaschen und

danach sukzessive mit dreimal DMF, dreimal MeOH und dreimal DCM. Nach dem Trocknen des Harzes *in vacuo* wurde der Beladungsgrad photometrisch bestimmt.

5.2.4 Beladung des 2-Chlorotriylchlorid-Harzes mit einem Polyamin

10.0 bis 15.0 eq (je nach gewünschtem Beladungsgrad) des jeweiligen Polyamins wurden in DMF (5 mL/g Harz) vorgelegt. Zu dieser Lösung wurde das 2-Chlorotriylchlorid-Harz gegeben (theoretische Beladung 1.63 mmol/g). Nach beendeter Zugabe wurde 10 bis 20 min in einem schwachen Stickstoff-Strom weiter durchmischt. Anschließend wurde das Harz mit MeOH (3 mL/g Harz) versetzt und für weitere 30 min durchmischt. Nach Absaugen der Reaktionslösung wurde das Harz jeweils dreimal mit MeOH, DMF/Et₃N (4:1), MeOH und dreimal DCM gewaschen. Nach 12 h Trocknung am HV wurde die Beladung *via* Abspaltprobe bestimmt.

5.2.5 Beladung des 2-Chlorotriylchlorid-Harzes mit einem sekundären Amin

0.5 g ($B_{\max.} = 1.63 \text{ mmol/g}$, 1.00 eq) des 2-Chlorotriylchlorid-Harzes wurden in einer Umkehrfritte vorgelegt und ca. 10 min in DCM quellen gelassen. Das entsprechende Amin (bspw. *Bis*-Dde-Norspermidin (**2**)) wurde in DCM gelöst und im Überschuss (6.00 eq) zum Harz gegeben. Nach Zugabe von DIPEA (4.00 eq) wurde das Reaktionsgemisch 16 h im Stickstoffgegenstrom gemischt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt und das Harz mehrfach mit DCM gewaschen. Nach Zugabe von 5.0 mL MeOH und 3.0 mL DCM wurde der Ansatz weitere 30 min. im Stickstoffgegenstrom durchmischt und anschließend je dreimal mit MeOH, einer Lösung aus DMF/Et₃N (4:1), DMF und DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Es wurde *Bis*-Dde-Norspermidin-beladenes Harz (**3**) erhalten.

Bestimmung der Harzbeladung

Zur Bestimmung der Harzbeladung wurden die ¹H-NMR-Spektren der Abspaltprobe sowie die der Referenzverbindung spektroskopisch analysiert und ausgewertet. In das erste NMR-Röhrchen, welches als Referenz diente, wurde genau definierte Menge des auf das Harz zu beladenen Amines mit exakten Volumina an TFA (100 µL) und DMSO-*d*₆ (500 µL) versetzt. Die Abspaltprobe des jeweiligen Harzes wurde in einem zweiten NMR-Röhrchen vorbereitet. Hierfür wurde eine definierte Menge des beladenen Harzes (ca. 7.5 – 15.0 mg) möglichst exakt eingewogen und ebenfalls mit 100.0 µL TFA und 500 µL DMSO-*d*₆ versetzt. Bei der Auswertung der beiden ¹H-NMR Spektren wurde das DMSO-*d*₆ Signal jeweils möglichst gleichmäßig integriert und auf 1.000 kalibriert. Anschließend wurden die charakteristischen Resonanzsignale des Amins integriert und miteinander verglichen. Mit Hilfe der exakten

Einwaagen und den Integralverhältnissen aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren lässt sich die Harz-Beladung wie folgt errechnen:

$$\text{Beladung B} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g Harz}} \right] = \left(\frac{\left(\frac{m_{\text{Referenz}}}{I_{\text{Referenz}}} \cdot I_{\text{Probe}} \right)}{(M_{\text{Probe}} \cdot m_{\text{Probe}})} \right) \cdot 1000$$

(B =Beladung; m_{Referenz} =Masse an Referenzsubstanz; m_{Probe} =Masse an Harz; I_{Referenz} =Integralintensität der Referenz; I_{Probe} =Integralintensität der von Harz abgespaltenen Verbindung; M_{Probe} =Molmasse der Referenzverbindung)

5.2.6 Peptidkupplung mit HBTU/HOBt (ohne Voraktivieren)

Das Harz wurde 30 min in DMF gequollen. 2.00 eq Fmoc-AS-OH, 2.00 eq HBTU und 2.00 eq HOBt wurde zu dem N -terminal funktionalisiertem Harz gegeben und anschließend mit 3.00 eq DIPEA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h durchmischt. Nach Waschen des Harzes mit dreimal DMF, dreimal MeOH und dreimal DCM wurde für 15 min im HV getrocknet. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde mittels einer Abspaltprobe geprüft.

5.2.7 Peptidkupplungen mit HBTU/HOBt (mit Voraktivieren)

Das Harz wurde 30 min in DMF gequollen. 2.00 eq Fmoc-AS-OH, 2.00 eq HBTU, 2.00 eq HOBt und 4.00 eq DIPEA wurden in DMF gelöst und 10 min voraktiviert. Diese Reaktionslösung wurde anschließend zu dem N -terminal funktionalisierten Harz gegeben und für 2 h durchmischt. Das Harz wurde von der Reaktionslösung befreit und jeweils dreimal mit DMF, MeOH und DCM gewaschen.

5.2.8 Kupplung von Fmoc-Lys(NMe₂)-OH

Nachdem das Harz 30 min in DMF gequollen wurde, wurden 2.00 eq HOBt in DMF zugegeben. 2.00 eq Fmoc-Lys(NMe₂)-OH, 2.00 eq HBTU, 2.00 eq HOBt und 4.00 eq DIPEA in DMF wurden 5 min voraktiviert und zu dem Harz gegeben. Nach 2 h wurde abgesaugt und dreimal mit DMF, dreimal mit MeOH und dreimal mit DCM gewaschen. Die darauffolgende Kupplung wurde analog durchgeführt.

5.2.9 Kupplung von Fmoc [$^{14}/^{15}\text{N}$] Gly-OH und [^{13}C] Gly-OH

Das N -terminal entschütztes Harz wurde in DMF suspendiert und ca. 30 min vorgequollen. Für die Kupplung des Fmoc [$^{14}/^{15}\text{N}$] Gly-OH wurde die Methode des „double coupling“ angewendet, wobei 2.00 eq Fmoc [$^{14}/^{15}\text{N}$] Gly-OH, 2.00 eq HBTU und 2.00 eq HOBt wurden gemeinsam in DMF gelöst und zusammen mit 4.00 eq DIPEA zum Harz hinzugefügt. Die

Kupplungszeit betrug eine Stunde bei RT im schwachen Stickstoffstrom. Anschließend wurde die Lösung abgezogen und das Harz für eine weitere Stunde mit frisch angesetzter Kupplungslösung aus 2.00 eq Fmoc [¹⁴/¹⁵N] Gly-OH, 2.00 eq HBTU, 2.00 eq HOBt und 4.00 eq DIPEA in DMF behandelt. Im Anschluss wurde die Lösung abgezogen und das Harz je dreimal mit DMF, MeOH und DCM gewaschen, bevor es am Hochvakuum getrocknet wurde. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde mittels NMR-Abspaltprobe kontrolliert.

5.2.10 Fmoc-Entschützung an der festen Phase

Das zuvor mit DMF gewaschene Harz wurde zweimal mit 25%iger Piperidin-Lösung in DMF behandelt (1 x 10 min, 1 x 20 min). Anschließend wurde dreimal mit DMF, dreimal mit MeOH und dreimal mit DCM gewaschen.

5.2.11 Polyamid-Reduktion am 2-Chlorotriylchlorid-Harz

In einem ausgeheiztem Stickstoffkolben wurde das Harz unter Argongegenstrom eingefüllt. Im Gegenstrom wurde 1 M BH₃·THF (25 eq pro Amid) zugegeben und 15 min bei RT stehengelassen. Nachdem die sichtbare Gasentwicklung abgeklungen ist, wurde die Reaktionsmischung auf 65 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 2-7 d (je nach Peptidlänge) gelinde erwärmt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung vom Harz dekantiert und das Harz zweimal mit THF und zweimal mit MeOH gewaschen. Zur Aufarbeitung wurde dreimal mit Piperidin (25 mL/g Harz) auf 65 °C erhitzt (2x 2 h, 1x 12 h). Das Harz wurde dreimal mit DMF, dreimal mit MeOH und dreimal mit DCM gewaschen. Zur vollständigen Entfernung von Aminoborankomplexen wurde das Harz 30 min mit 2%iger Hydrazin-Lösung in DMF (10 mL/g Harz) behandelt. Nach erneutem Waschen mit dreimal DMF, dreimal MeOH und dreimal DCM wurde am HV für 12 h getrocknet.

5.2.12 Dde-Schützung primärer Amine an der festen Phase

Zu dem in NMP gequollenen Harz wurde eine Lösung aus Dde-OH (4.00 eq pro primäres Amin) in NMP gegeben. Es wurde für 3 h durchmischt und anschließend abgesaugt und mit einer frischen Lösung von Dde-OH in NMP versetzt. Nach 12 h wurde die Reaktionslösung entfernt und mehrfach mit NMP, MeOH und DCM gewaschen.

5.2.13 Dde-Entschützung am Harz

Das gewaschene Harz wurde dreimal mit 2%iger Hydrazin-Lösung in DMF (3 x 30 min) behandelt. Es wurde anschließend dreimal mit DMF, dreimal mit MeOH und dreimal mit DCM nachgewaschen.

5.2.14 Einführen der *tert*-Butylcarbamat (*Boc*)-Schutzgruppe am CTC-Harz

Zur Boc-Schützung freier Aminogruppen wurde das Harz in DMF für ca. 30 min gequollen und anschließend mit einer Lösung aus Di-*tert*-butyldicarbonat (2.00 eq pro freies Amin) in DMF versetzt. Nach Zugabe von DIPEA (2.00 eq pro freies Amin) wurde für 1 h durchmischt. Nach Absaugen der Reaktionslösung wurden erneut Boc-Anhydrid und DIPEA zugegeben und für weitere Stunde durchmischt. Es wurde dreimal mit DMF, dreimal mit MeOH und dreimal mit DCM gewaschen.

5.2.15 Ns-Aktivierung primärer Amine an der festen Phase

Eine Lösung aus *o*Ns-Cl (4.00 eq pro Amin) und *sym*-Collidin (10.0 eq pro Amin) in NMP wurden zum gequollenen Harz gegeben und 30 min durchmischt. Die Lösung wurde verworfen und das Harz mit einer frischen Lösung aus *o*Ns-Cl und *sym*-Collidin in NMP für 30 min behandelt. Nach Waschen mit fünfmal NMP und fünfmal DCM wurde das Harz am HV getrocknet.

5.2.16 Ns-Entschützung am Harz

Zu dem gequollenen Harz wurde dreimal eine Lösung aus 2-Mercaptoethanol (10.0 eq pro Ns) und DBU (5.00 eq pro Ns) in DMF gegeben und durchmischt (3x 30 min). Nach beendeter Entschützung wurde das Harz je dreimal mit DMF, MeOH und DCM gewaschen.

5.2.17 MITSUNOBU-Reaktion an der festen Phase

Das Ns-aktivierte Harz wurde 30 min in abs. THF gequollen. Anschließend wurden nacheinander PPh₃ (2.00 bis 4.00 eq in abs. THF) und DIAD (2.00 bis 4.00 eq in absolutem THF) zugegeben und für 15 min durchmischt. Nach Zugabe des Alkohols (2.00 bis 4.00 eq in absolutem THF) wurde mit DIPEA (8.00 bis 10.0 eq) versetzt und 8 h mit einem schwachen Argon-Strom durchmischt. Die Endkonzentration betrug 200 mM. Die Reaktion wurde zwei weitere Male wiederholt. Das Harz wurde filtriert und mehrfach mit THF und DCM gewaschen.

5.2.18 Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Seitenkettenentschützung

Polyaminabspaltung vom 2-Chlorotriethylchlorid-Harz

Zu dem Harz wurde eine Lösung aus TFA/H₂O (95/5 v/v) gegeben und 1-2 h bei RT durchmischt. Die Lösung wurde abgesaugt und das Harz zweimal mit der Abspalllösung nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel

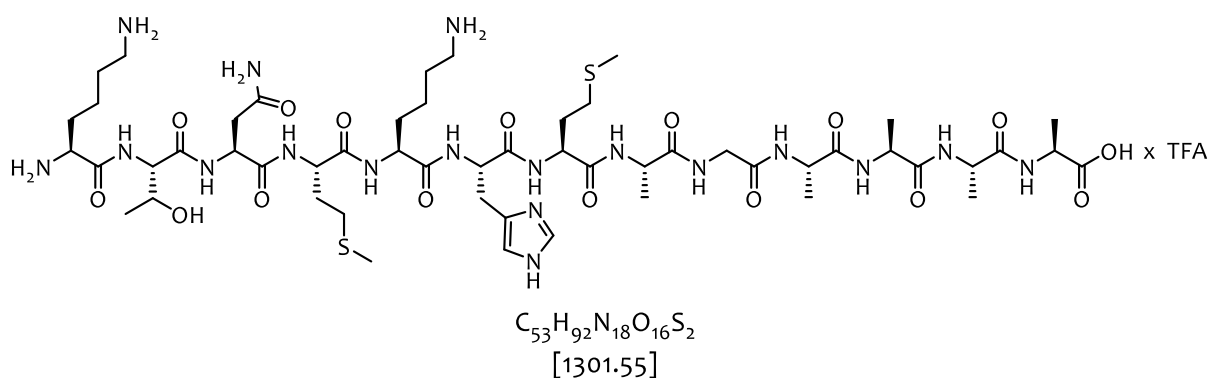
befreit und die Amine durch Zugabe von Et₂O ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Et₂O gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

Peptidabspaltung vom 2-Chlorotriylchlorid-Harz

Zu dem Harz wurde eine Lösung aus TFA/H₂O/TIPS (95/2.5/2.5 v/v/v) gegeben und analog wie oben gehandelt.

5.3 Darstellung der Prionensequenzen

PrP₁₀₆₋₁₁₈



Die Synthese von der monomeren Prion-Sequenz PrP₁₀₆₋₁₁₈ erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.2.1. Es wurden 270 mg (B = 0.37 mmol/g, 0.10 mmol, 1.00 eq) Fmoc-L-Ala-beladenes CTC-Harz eingesetzt. Das Rohpeptid wurde nach der Vorschrift 5.2.18 abgespalten und gefällt. Nach chromatographischer Aufreinigung wurden 13.0 mg des Peptids (0.0074 mmol, 7.4%) als farbloses TFA-Salz erhalten.

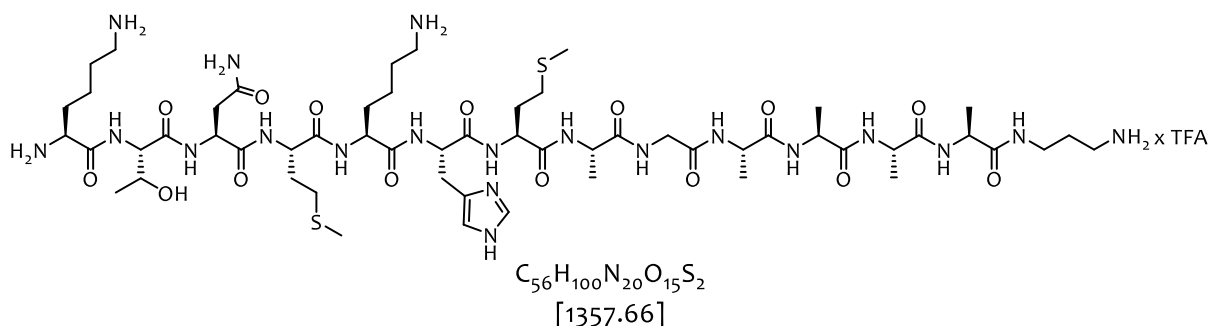
HPLC: $t_R = 10.44$ min (5%→30%, 20 min), Reinheit: 95%.

Tabelle 8: ^1H - und ^{13}C - NMR von PrP₁₀₆₋₁₁₈ (600 MHz, 300 K, 50 mM KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1, pH 6.01). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Bestimmte Signale konnten aufgrund der Wasserunterdrückung nicht zugeordnet werden.

Aminosäure	NH/COR	αCH	βCH	andere
Lys ¹⁰⁶	-	3.94 <i>m</i> ; 53.1	1.77 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 1.32 <i>m</i> ; 21.2 δCH_2 1.57 <i>m</i> ; 26.5 ϵCH_2 2.87 <i>t</i> (7.9); 39.2 ϵNH_3^+ -
Thr ¹⁰⁷	-	4.22 <i>d</i> (5.6) 59.2	4.00 <i>m</i> ; 67.0	γCH_3 1.07 <i>d</i> (6.6); 18.7
Asn ¹⁰⁸	8.54 <i>bs</i>	4.58 <i>m</i>	2.66 <i>m</i> ; 36.1	δNH_H 6.76 <i>s</i> δNH_T 7.47 <i>s</i>
Met ¹⁰⁹	8.27 <i>m</i>	4.31 <i>m</i> ; 52.6	1.81 <i>m</i> , 1.91 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 2.35 <i>m</i> , 2.42 <i>m</i> ; 29.2 δCH_3 1.95 <i>s</i> ; 14.2
Lys ¹¹⁰	8.18 <i>m</i>	4.09 <i>m</i> ; 53.8	1.58 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 1.23 <i>m</i> ; 22.0 δCH_2 1.51 <i>m</i> ; 26.4 ϵCH_2 2.83 <i>t</i> (8.0); 39.2 ϵNH_3^+ -
His ¹¹¹	8.28 <i>m</i>	4.49 <i>bs</i> ;-	3.00 <i>m</i> ; 26.9	$\delta^2\text{CH}$ 7.01 <i>s</i> ; 117.2 $\epsilon^1\text{CH}$ 8.13 <i>s</i> ; 134.5
Met ¹¹²	8.19 <i>m</i>	4.31 <i>m</i> ; 52.6	1.81 <i>m</i> , 1.91 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 2.32 <i>m</i> , 2.40 <i>m</i> ; 29.2 δCH_3 1.94 <i>s</i> ; 14.2
Ala ¹¹³	8.24 <i>m</i>	4.15 <i>m</i> ; 49.7	1.25 <i>m</i> ; 16.7	
Gly ¹¹⁴	8.25 <i>m</i>	3.79 <i>m</i> ; 42.4		
Ala ¹¹⁵	7.94 <i>d</i> (6.1)	4.17 <i>m</i> ; 49.7	1.23 <i>m</i> ; 16.7	
Ala ¹¹⁶	8.11 <i>d</i> (6.1)	4.15 <i>m</i> ; 49.7	1.24 <i>m</i> ; 16.7	
Ala ¹¹⁷	8.05 <i>d</i> (6.5)	4.15 <i>m</i> ; 49.7	1.23 <i>m</i> ; 16.7	
Ala ¹¹⁸	7.71 <i>d</i> (7.1)	3.97 <i>m</i> ; 51.0	1.17 <i>d</i> (7.5); 17.5	

HR-MS (ESI): $\text{C}_{53}\text{H}_{92}\text{N}_{18}\text{NaO}_{16}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1323.6272, gef.: 1323.6303.

PDA-PrP₁₀₆₋₁₁₈



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.2.1. Es wurden 62.5 mg (B = 0.8 mmol/g, 0.1 mmol, 1.00 eq) eines mit 1,3-Diaminopropan beladenen CTC-Harzes

eingesetzt. Das Rohpeptid wurde nach der Vorschrift aus dem Abschnitt 5.2.18 abgespalten und gefällt. Nach chromatographischer Aufreinigung wurden 21.7 mg (0.0113 mmol, 11.3%) des PDA-modifizierten PrP-Peptids als farbloses TFA-Salz erhalten.

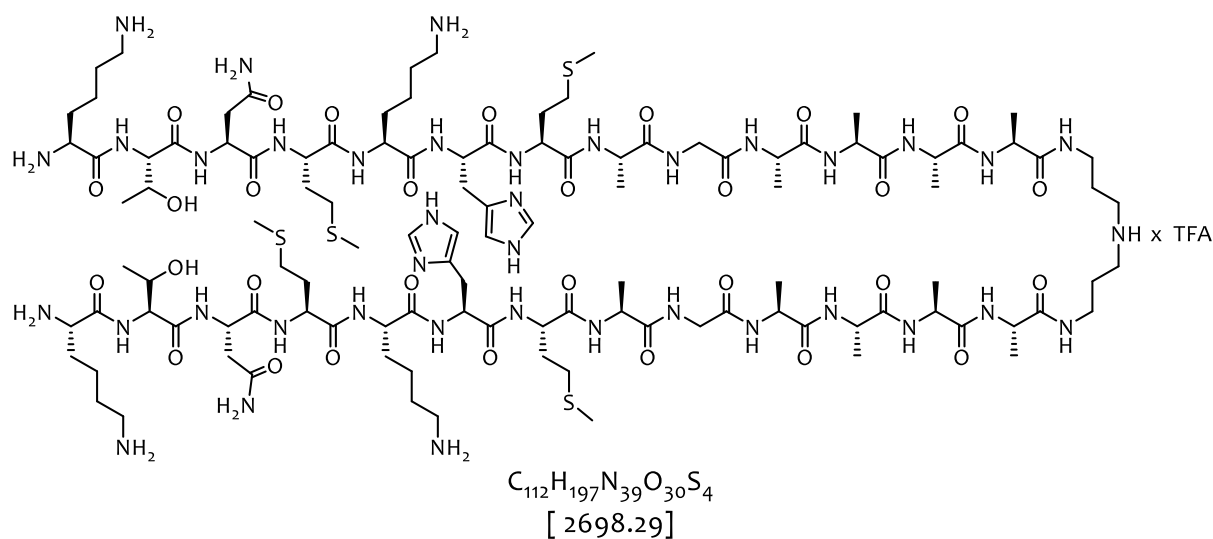
HPLC: $t_R = 10.38$ min (5%→30%, 20 min), Reinheit: 98%.

Tabelle 9: ^1H - und ^{13}C -NMR von PDA-PrP₁₀₆₋₁₁₈ (600 MHz, 300 K, 50 mM KH_2PO_4 -Puffer/D₂O 9:1, pH 6.01). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Die mit-gekennzeichneten Signale konnten aufgrund der Wasserunterdrückung nicht zugeordnet werden.

Aminosäure	NH/COR	αCH	βCH	andere
Lys ¹⁰⁶	-	3.93 <i>t</i> (6.9); 53.2	1.77 <i>m</i> ; 30.6	γCH_2 1.32 <i>m</i> ; 21.2 δCH_2 1.58 <i>m</i> ; 26.7 ϵCH_2 2.88 <i>m</i> ; 39.3 ϵNH_3^+ -
Thr ¹⁰⁷	-	4.22 <i>d</i> (5.6) 59.3	4.00 <i>m</i> ; 67.1	γCH_3 1.07 <i>d</i> (6.6); 18.9
Asn ¹⁰⁸	8.54 <i>bs</i>	4.58 <i>m</i>	2.66 <i>m</i> ; 36.1	δNH_H 6.76 <i>s</i> δNH_T 7.47 <i>s</i>
Met ¹⁰⁹	8.27 <i>m</i>	4.31 <i>m</i> ; 52.9	1.81 <i>m</i> , 1.91 <i>m</i> ; 30.1	γCH_2 2.36 <i>m</i> , 2.42 <i>m</i> ; 29.2 δCH_3 1.94 <i>s</i> ; 14.2
Lys ¹¹⁰	8.18 <i>m</i>	4.09 <i>m</i> ; 54.1	1.58 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 1.23 <i>m</i> ; 22.0 δCH_2 1.52 <i>m</i> ; 26.3 ϵCH_2 2.83 <i>m</i> ; 39.3 ϵNH_3^+ -
His ¹¹¹	8.25 <i>m</i>	4.49 <i>bs</i> ; -	2.99, 3.00; 27.1	$\delta^2\text{CH}$ 6.99 <i>s</i> ; 117.1 $\epsilon^1\text{CH}$ 8.06 <i>s</i> ; 134.7
Met ¹¹²	8.19 <i>m</i>	4.31 <i>bs</i> ; 52.6	1.81 <i>m</i> , 1.91 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 2.32 <i>m</i> , 2.40 <i>m</i> ; 29.2 δCH_3 1.94 <i>s</i> ; 14.2
Ala ¹¹³	8.23 <i>m</i>	4.16 <i>m</i> ; 50.0	1.26 <i>m</i> ; 16.4	
Gly ¹¹⁴	8.25 <i>m</i>	3.79 <i>m</i> ; 42.5		
Ala ¹¹⁵	8.00 <i>m</i>	4.12 <i>m</i> ; 50.0	1.26 <i>m</i> ; 16.4	
Ala ^x	8.13 <i>d</i> (5.4)	4.12 <i>m</i> ; 50.0	1.24 <i>m</i> ; 16.4	
Ala ^x	8.00 <i>m</i>	4.12 <i>m</i> ; 50.0	1.24 <i>m</i> ; 16.4	
Ala ¹¹⁸	7.96 <i>d</i> (5.9)	4.06 <i>m</i> ; 50.0	1.24 <i>m</i> ; 16.4	
PDA	7.85 <i>s</i>	3.16 <i>m</i> ; 36.1	1.73 <i>m</i> ; 26.6	γCH_2 2.85 <i>t</i> (8.1); 37.2

HR-MS (ESI): $\text{C}_{56}\text{H}_{101}\text{N}_{20}\text{O}_{15}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1357.7191, gef.: 1357.7250.

NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈



Die Synthese erfolgte ausgehend von dem 0.10 mmol (1.00 eq) mit *Bis*-(3-aminopropyl)amin beladenem CTC-Harz **4** (Beladung = 0.42 mmol/g) nach der allgemeinen Vorschrift, die in Abschnitt 5.2.1 detailliert beschrieben wurde. Das Rohpeptid wurde nach der Vorschrift 5.2.18 abgespalten und gefällt. Nach chromatographischer Aufreinigung wurden 15.3 mg (0.006 mmol, 12.8%) des über Norspermidin verbrückten Dimers als farbloses TFA-Salz erhalten.

HPLC: $t_R = 13.08$ min (5%→30%, 20 min), Reinheit: $\geq 98\%$.

Experimenteller Teil

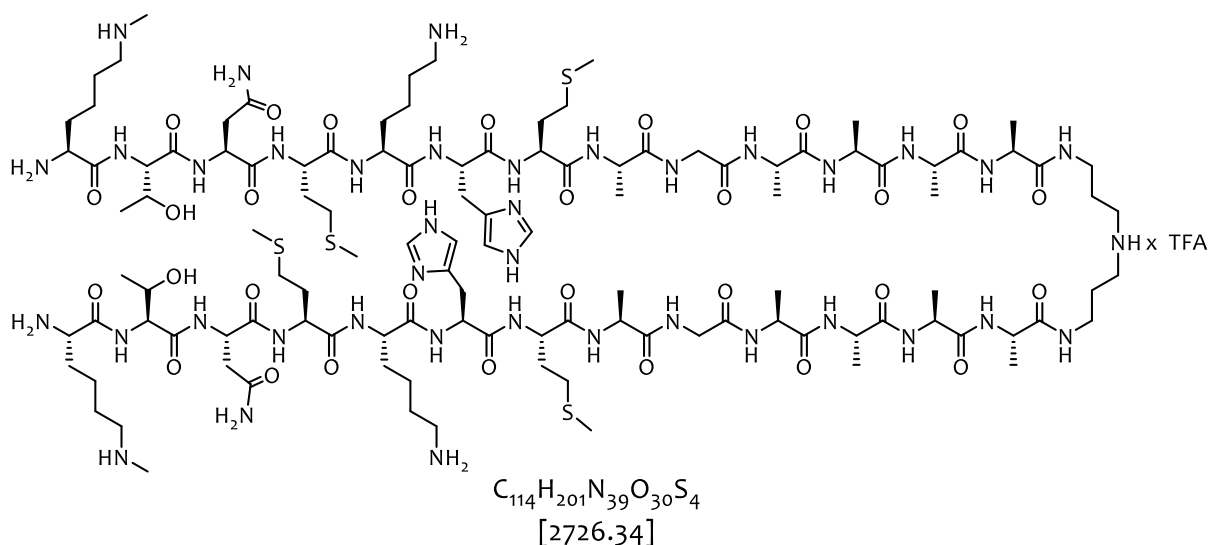
Tabelle 10: ^1H - und ^{13}C -NMR von NSPD-PRP₁₀₆₋₁₁₈ (600 MHz, 300 K, 50 mm KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1, pH 6.11). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Die mit - gekennzeichneten Signale konnten aufgrund der Wasserunterdrückung nicht zugeordnet werden.

Aminosäure	NH/COR	αCH	βCH	andere
Lys ¹⁰⁶	-	3.93 <i>t</i> (6.9); 53.1	1.83 <i>m</i> ; 30.2	γCH_2 1.39 <i>m</i> ; 21.0 δCH_2 1.65 <i>m</i> ; 26.3 ϵCH_2 2.93 <i>m</i> ; 39.3 ϵNH_2^+ -
Thr ¹⁰⁷	-	4.22 <i>d</i> (5.6) 59.2	4.00 <i>m</i> ; 67.2	γCH_3 1.07 <i>d</i> , (6.7); 18.8
Asn ¹⁰⁸	8.52 <i>bs</i>	-	2.45 <i>m</i> ; 36.1 2.49 <i>m</i> ; 36.1	δNH_H 6.85 <i>s</i> δNH_T 7.54 <i>s</i>
Met ¹⁰⁹	8.32 <i>bs</i>	4.39 <i>bs</i> ; 52.5	1.89 <i>m</i> , 1.99 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 2.45 <i>m</i> , 2.50 <i>m</i> 29.1 δCH_3 2.03 <i>s</i> ; 14.1
Lys ¹¹⁰	8.18 <i>bs</i>	4.17 <i>m</i> ; 53.1	1.65 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 1.29 <i>m</i> ; 21.9 1.35 <i>m</i> ; 22.1 δCH_2 1.59 <i>m</i> ; 26.7 ϵCH_2 2.95 <i>m</i> ; 39.3 ϵNH_3^+ -
His ¹¹¹	8.24 <i>m</i>	-	3.10, 3.18 <i>m</i> ; 26.2	$\delta^2\text{CH}$ 7.21 <i>s</i> ; 117.1 $\epsilon^1\text{CH}$ 8.55 <i>s</i> ; 133.7
Met ¹¹²	8.18 <i>m</i>	4.39 <i>bs</i> ; 52.6	1.89 <i>m</i> , 2.00 <i>m</i> ; 30.2	γCH_2 2.44 <i>m</i> , 2.49 <i>m</i> ; 29.1 δCH_3 2.03 <i>s</i> ; 14.1
Ala ¹¹³	8.23 <i>m</i>	4.16 <i>m</i> ; 50.1	1.32 <i>m</i> ; 16.3	
Gly ¹¹⁴	8.25 <i>bs</i>	3.79 <i>m</i> ; 42.4		
Ala ¹¹⁵	8.00 <i>bs</i>	4.12 <i>m</i> ; 49.8	1.32 <i>m</i> ; 16.3	
Ala ^x	8.13 <i>m</i>	4.12 <i>m</i> ; 49.8	1.32 <i>m</i> ; 16.3	
Ala ^x	8.00 <i>bs</i>	4.12 <i>m</i> ; 49.8	1.32 <i>m</i> ; 16.3	
Ala ¹¹⁸	7.95 <i>m</i>	4.05 <i>m</i> ; 49.8	1.32 <i>m</i> ; 16.3	
NSPD	7.86 <i>s</i>	3.24 <i>m</i> ; 36.1	1.83 <i>m</i> ; 25.5	γCH_2 2.95 <i>m</i> ; 45.1

HR-MS (ESI): für $\text{C}_{112}\text{H}_{197}\text{N}_{39}\text{O}_{30}\text{S}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2697.4049, gef.: 2697.4052.

NSPD-PrP_K*106-118

***K-MML**



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift 5.2.1. An das am Synthesizer hergestellte NSPD-PrP₁₀₇₋₁₁₈-Harz (0.05 mmol, 0.50 eq) wurde das monomethylierte Lysin anschließend manuell gekuppelt (s. Abschnitt 5.2.6). Das so erhaltene Rohpeptid wurde mehrfach mit DMF gewaschen. Zur Abspaltung der *N*-terminalen Dde-Schutzgruppen wurde das Harz mit 3.0 mL einer 2%igen Hydrazin-Lösung in DMF versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h im Stickstoffgegenstrom durchmischt, wobei die Hydrazin-Lösung nach je 30 min erneuert wurde. Im Anschluss wurde das Harz mehrfach mit DMF gewaschen. Zur Abspaltung der Nosyl-Schutzgruppen wurde das Harz dreimal mit jeweils einer frisch hergestellten Lösung aus 150 µL (1.00 mmol, 10.0 eq) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und 35 µL (0.50 mmol, 5.00 eq) 2-Mercaptoethanol in 2.0 mL DMF versetzt und jeweils 30 min im Stickstoffgegenstrom durchmischt. Im Anschluss wurde das Harz je dreimal mit DMF, MeOH und DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Das Rohpeptid wurde nach der Vorschrift 5.2.18 abgespalten und gefällt. Nach chromatographischer Aufreinigung wurden 16.9 mg (0.005 mmol, 9.0%) des modifizierten Peptids als farbloses TFA-Salz erhalten.

HPLC: $t_R = 13.11$ min (5%→30%, 20 min), Reinheit: $\geq 99\%$.

Experimenteller Teil

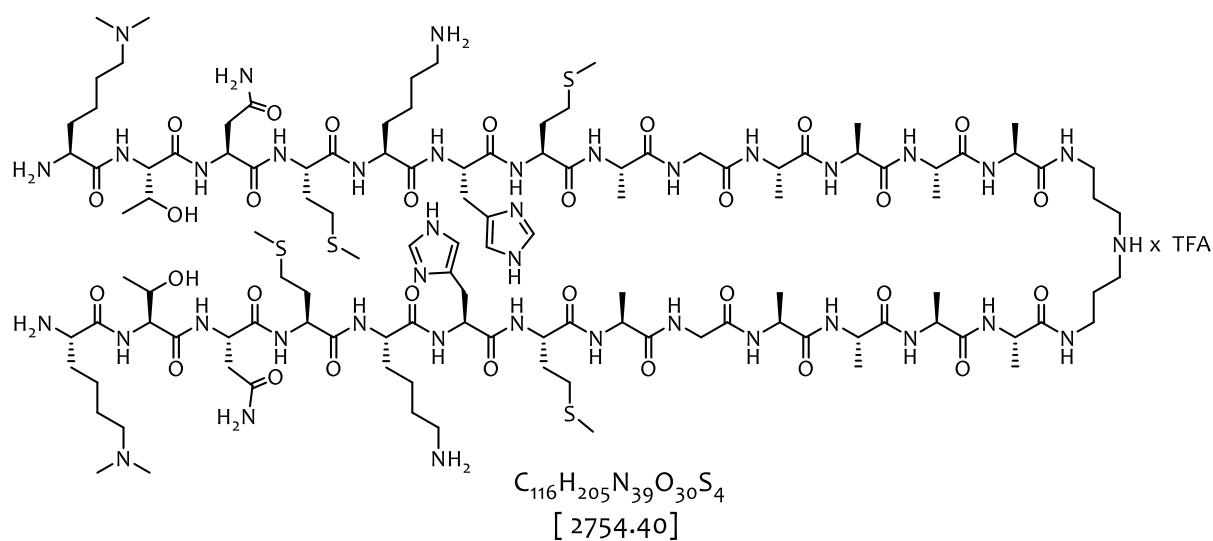
Tabelle 11: ^1H - und ^{13}C -NMR (600 MHz, 300 K, 50 mm KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1, pH 6.11) von NSPD-PrP_{K*106-118}(*K-MML). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Die mit - gekennzeichneten Signale konnten aufgrund der Wasserunterdrückung nicht zugeordnet werden.

Aminosäure	NH/COR	αCH	βCH	andere
Lys ¹⁰⁶	-	4.0, <i>t</i> (7.0); 53.0	1.86 <i>m</i> ; 30.7	γCH_2 1.40 <i>m</i> ; 21.3 δCH_2 1.67 <i>m</i> ; 25.6 ϵCH_2 2.98 <i>m</i> ; 39.3 NCH ₃ 2.63 <i>s</i> , 2.64 <i>s</i> ; 32.8 ϵNH_2^+ -
Thr ¹⁰⁷	-	4.22 <i>d</i> (5.6); 59.4	4.09 <i>m</i> ; 67.2 4.15 <i>m</i> ; 66.9	γCH_3 1.15 <i>m</i> ; 18.9
Asn ¹⁰⁸	8.54 <i>bs</i>	4.58 <i>m</i> ; -	2.71 <i>m</i> ; 35.9 2.78 <i>m</i> ; 36.1	δNH_H 6.86 <i>s</i> δNH_T 7.56 <i>s</i>
Met ¹⁰⁹	8.28 <i>m</i>	4.39 <i>bs</i> ; 52.7	1.90 <i>m</i> , 2.00 <i>m</i> ; 30.1	γCH_2 2.42 <i>m</i> , 2.49 <i>m</i> ; 29.2 δCH_3 2.03 <i>s</i> ; 14.2
Lys ¹¹⁰	8.18 <i>m</i>	4.17 <i>m</i> ; 53.9	1.86 <i>m</i> ; 30.7	γCH_2 1.27 <i>m</i> , 1.34 <i>m</i> ; 22.1 δCH_2 1.52 <i>m</i> ; 26.3 ϵCH_2 2.91 <i>m</i> ; 39.3 ϵNH_3^+ -
His ¹¹¹	8.24 <i>m</i>	4.57 <i>bs</i> ; 53.1	3.05, 3.11 <i>m</i> ; 27.2	$\delta^2\text{CH}$ 7.01 <i>s</i> ; 117.1 $\epsilon^1\text{CH}$ 8.15 <i>s</i> ; 134.7
Met ¹¹²	8.18 <i>m</i>	4.31 <i>bs</i> ; 52.7	1.90 <i>m</i> , 2.00 <i>m</i> ; 30.1	γCH_2 2.42 <i>m</i> , 2.49 <i>m</i> ; 29.2 ϵCH_3 2.03 <i>s</i> ; 14.2
Ala ¹¹³	8.23 <i>m</i>	4.19 <i>m</i> ; 50.1	1.32 <i>m</i> ; 16.5	
Gly ¹¹⁴	8.25 <i>m</i>	3.89 <i>m</i> ; 42.5		
Ala ¹¹⁵	8.00 <i>m</i>	4.12 <i>m</i> ; 49.8	1.32 <i>m</i> ; 16.5	
Ala ^x	8.13 <i>d</i> (5.4)	4.12 <i>m</i> ; 49.8	1.32 <i>m</i> ; 16.5	
Ala ^x	8.00 <i>m</i>	4.12 <i>m</i> ; 49.8	1.32 <i>m</i> ; 16.5	
Ala ¹¹⁸	7.95 <i>d</i> (5.9)	4.05 <i>m</i> ; 49.8	1.32 <i>m</i> ; 16.5	
NSPD	7.86 <i>s</i>	3.16 <i>m</i> ; 36.2	1.84 <i>m</i> ; 25.0	γCH_2 2.9 <i>m</i> ; 45.1

HR-MS (ESI): $\text{C}_{114}\text{H}_{201}\text{N}_{39}\text{O}_{30}\text{S}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2725.4363, gef.: 2725.4372.

NSPD-PrPK*106-118

***K-DML**



Die Synthese, Abspaltung und Fällung erfolgten nach den allgemeinen Vorschriften 5.2.1, 5.2.6 und 5.2.18 aus Fmoc-L-Lys(Me₂)-OH und NSPD-PrP₁₀₇₋₁₁₈-Harz (0.05 mmol, 0.50 eq). Nach chromatographischer Aufreinigung wurden 11.2 mg (0.0030 mmol, 5.9%) des Peptids als farbloses TFA-Salz erhalten.

HPLC: $t_R = 13.09$ min (5%→30%, 20 min), Reinheit: $\geq 99\%$.

Experimenteller Teil

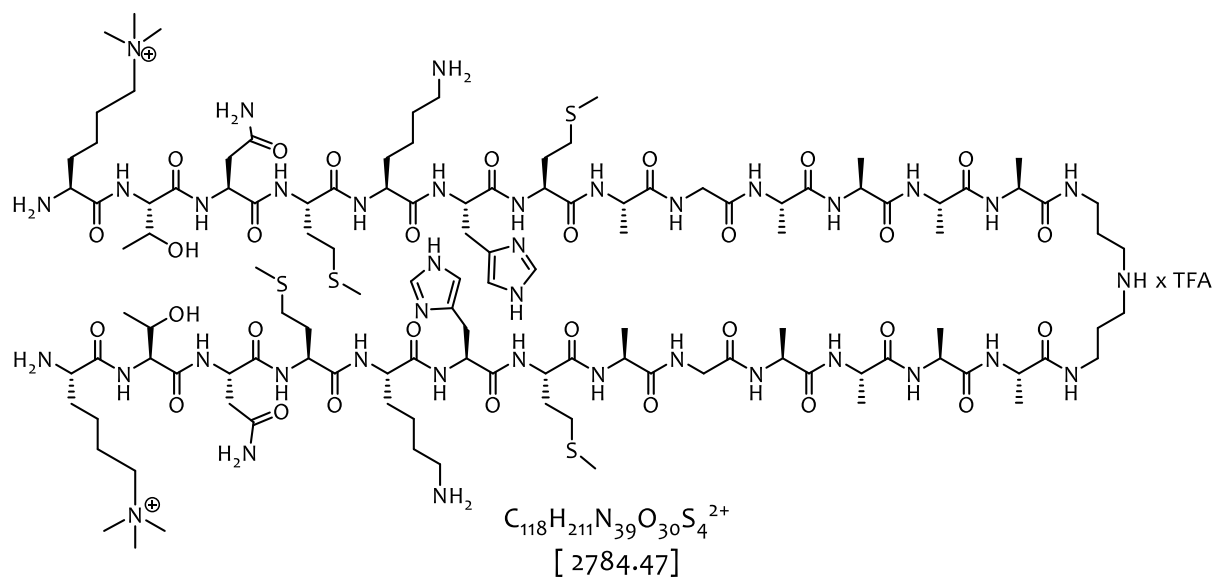
Tabelle 12: ^1H - und ^{13}C -NMR (600 MHz, 300 K, 50 mm KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1 pH 6.09) von NSPD-PrP $^{\text{K}^*106-118}$ (*K-DML). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Die mit - gekennzeichneten Signale konnten aufgrund der Wasserunterdrückung nicht zugeordnet werden.

Aminosäure	NH/COR	αCH	βCH	andere
Lys ¹⁰⁶	-	3.93 <i>t</i> (6.9); 53.0	1.78 <i>m</i> ; 30.8	γCH_2 1.30 <i>m</i> ; 21.3 δCH_2 1.63 <i>m</i> ; 25.7 ϵCH_2 2.97 <i>m</i> ; 39.3 NCH ₃ 2.71 <i>s</i> ϵNH^+ -
Thr ¹⁰⁷	-	4.22 <i>d</i> (5.6); 59.4	4.00 <i>m</i> ; 66.8	γCH_3 1.07 <i>d</i> (6.6); 18.9
Asn ¹⁰⁸	8.54 <i>bs</i>	4.58 <i>m</i> ; -	2.66 <i>m</i> ; 35.9	δNH_H 6.76 <i>s</i> δNH_T 7.47 <i>s</i>
Met ¹⁰⁹	8.27 <i>m</i>	4.31 <i>bs</i> ; 52.6	1.81 <i>m</i> , 1.91 <i>m</i> ; 30.4	γCH_2 2.36 <i>m</i> , 2.42 <i>m</i> ; 29.3 δCH_3 2.03 <i>s</i> ; 14.0
Lys ¹¹⁰	8.18 <i>m</i>	4.09 <i>m</i> ; 53.9	1.58 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 1.23 <i>m</i> ; 22.1 δCH_2 1.52 <i>m</i> ; 26.3 ϵCH_2 2.83 <i>m</i> ; 39.5 ϵNH_3^+ -
His ¹¹¹	8.25 <i>m</i>	4.49 <i>bs</i> ; 53.1	2.99 <i>m</i> ; 27.2	$\delta^2\text{CH}$ 6.99 <i>s</i> ; 117.4 $\epsilon^1\text{CH}$ 8.06 <i>s</i> ; 134.8
Met ¹¹²	8.18 <i>m</i>	4.31 <i>bs</i> ; 52.6	1.81 <i>m</i> , 1.91 <i>m</i> ; 30.4	γCH_2 2.32 <i>m</i> , 2.40 <i>m</i> ; 29.3 δCH_3 2.03 <i>s</i> ; 14.0
Ala ¹¹³	8.23 <i>m</i>	4.16 <i>m</i> ; 50.1	1.26 <i>m</i> ; 16.6	
Gly ¹¹⁴	8.25 <i>m</i>	3.79 <i>m</i> ; 42.6		
Ala ¹¹⁵	8.00 <i>m</i>	4.12 <i>m</i> ; 49.9	1.26 <i>m</i> ; 16.6	
Ala ^x	8.13 <i>d</i> (5.4)	4.12 <i>m</i> ; 49.9	1.25 <i>m</i> ; 16.6	
Ala ^x	8.00 <i>m</i>	4.12 <i>m</i> ; 49.9	1.24 <i>m</i> ; 16.6	
Ala ¹¹⁸	7.95 <i>d</i> (5.8)	4.06 <i>m</i> ; 49.9	1.24 <i>m</i> ; 16.6	
NSPD	7.85 <i>t</i> (6.3)	3.16 <i>m</i> ; 36.6	1.75 <i>m</i> ; 23.8	γCH_2 2.88 <i>t</i> (8.1);45.3

HR-MS (ESI): $\text{C}_{116}\text{H}_{207}\text{N}_{39}\text{O}_{30}\text{S}_4$ [(M+2H)/2]⁺, ber.: 1377.2371, gef.: 1377.2433.

NSPD-PrP_{K*106-118}

K*-TML



Die Synthese, Abspaltung und Fällung erfolgten nach den allgemeinen Vorschriften 5.2.1, 5.2.6 und 5.2.18 aus Fmoc-L-Lys(Me₃)-OH, welches manuell an das am Synthesizer hergestellte NSPD-PrP₁₀₇₋₁₁₈-Harz (0.05 mmol, 0.50 eq) gekuppelt wurde. Nach chromatographischer Aufreinigung wurden 10.5 mg (0.003 mmol, 5.5%) des NSPD-PrP_{K*106-118}(*K-TML) Peptids als farbloses TFA-Salz erhalten.

HPLC: $t_R = 13.10$ min (5%→30%, 20 min), Reinheit: $\geq 99\%$.

Experimenteller Teil

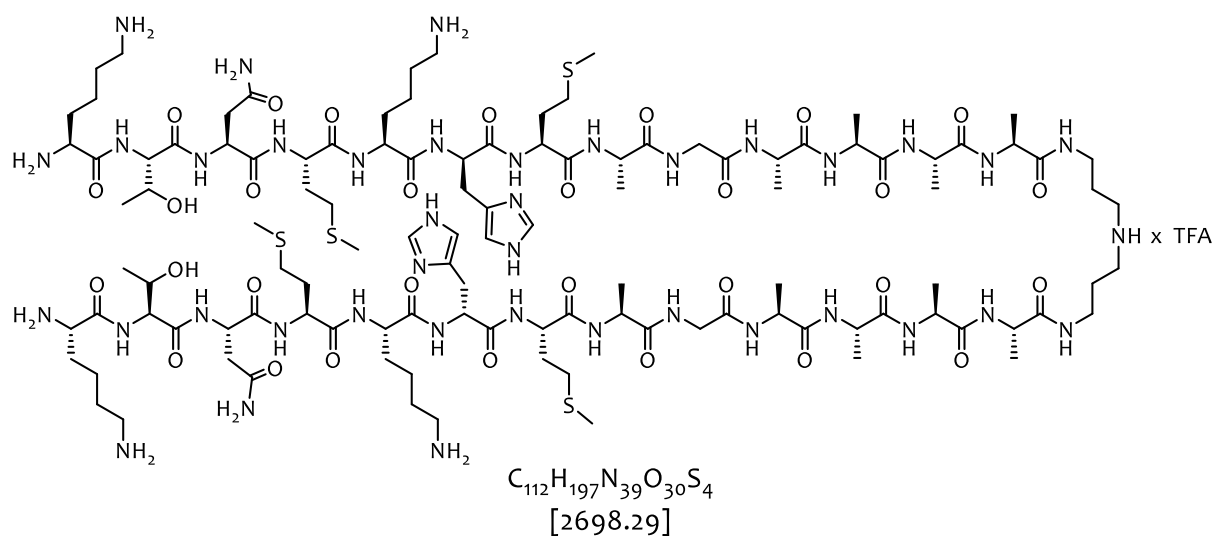
Tabelle 13: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 300 K, 50 mm KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1 pH 6.09) von NSPD- $\text{PrP}_{\text{K}^{*106-118}}$ (*K-TML). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Die mit - gekennzeichneten Signale konnten aufgrund der Wasserunterdrückung nicht zugeordnet werden.

Aminosäure	NH/COR	αCH	βCH	andere
Lys ¹⁰⁶	-	3.93 <i>t</i> (6.9); 52.9	1.77 <i>m</i> ; 30.6	γCH_2 1.30 <i>m</i> ; 20.9 δCH_2 1.75 <i>m</i> ; 25.5 ϵCH_2 3.17 <i>m</i> ; 65.6 NCH ₃ 2.96 <i>s</i> ; 52.7
Thr ¹⁰⁷	-	4.22 <i>d</i> (5.6); 59.2	4.00 <i>m</i> ; 67.1	γCH_3 1.07 <i>d</i> (6.6); 18.7
Asn ¹⁰⁸	8.54 <i>bs</i>	4.58 <i>m</i> ; -	2.66 <i>m</i> ; 36.0	δNH_H 6.76 <i>s</i> δNH_T 7.47 <i>s</i>
Met ¹⁰⁹	8.27 <i>m</i>	4.31 <i>bs</i> ; 52.6	1.81 <i>m</i> , 1.91 <i>m</i> ; 30.1	γCH_2 2.36 <i>m</i> , 2.42 <i>m</i> ; 29.1 δCH_3 1.94 <i>s</i> ; 13.9
Lys ¹¹⁰	8.18 <i>m</i>	4.09 <i>m</i> ; 53.8	1.58 <i>m</i> ; 30.1	γCH_2 1.23 <i>m</i> ; 21.9 δCH_2 1.52 <i>m</i> ; 26.1 ϵCH_2 2.88 <i>m</i> ; 2.96 <i>m</i> ; 39.1 ϵNH_3^+ -
His ¹¹¹	8.25 <i>m</i>	4.49 <i>bs</i> ; 53.0	2.99 <i>m</i> ; 27.2	$\delta^2\text{CH}$ 7.00 <i>s</i> ; 116.9 $\epsilon^1\text{CH}$ 8.09 <i>s</i> ; 134.5
Met ¹¹²	8.18 <i>m</i>	4.31 <i>bs</i> ; 52.6	1.81 <i>m</i> , 1.91 <i>m</i> ; 30.1	γCH_2 2.32 <i>m</i> , 2.40 <i>m</i> ; 29.1 δCH_3 1.94 <i>s</i> ; 13.9
Ala ¹¹³	8.23 <i>m</i>	4.16 <i>m</i> ; 49.9	1.26 <i>m</i> ; 16.3	
Gly ¹¹⁴	8.25 <i>m</i>	3.79 <i>m</i> ; 42.3		
Ala ¹¹⁵	8.00 <i>m</i>	4.12 <i>m</i> ; 49.8	1.26 <i>m</i> ; 16.3	
Ala ^x	8.13 <i>d</i> (5.4)	4.12 <i>m</i> ; 49.8	1.25 <i>m</i> ; 16.3	
Ala ^x	8.00 <i>m</i>	4.12 <i>m</i> ; 49.8	1.24 <i>m</i> ; 16.3	
Ala ¹¹⁸	7.95 <i>d</i> (5.8)	4.06 <i>m</i> ; 49.8	1.24 <i>m</i> ; 16.3	
NSPD	7.86 <i>s</i>	3.16 <i>m</i> ; 36.1	1.75 <i>m</i> ; 21.8	γCH_2 2.88 <i>t</i> (8.1); 45.2

HR-MS (ESI): $\text{C}_{118}\text{H}_{211}\text{N}_{39}\text{O}_{30}\text{S}_4^{2+}$ [M/2]⁺, ber.: 1391.2550, gef.: 1391.2586.

NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈(*H111)

*H₁₁₁-H(D)



Die Synthese erfolgte ausgehend von dem mit *Bis*-(3-aminopropyl)amin beladenen CTC-Harz (**4**) B = 0.42 mmol/g, 0.10 mmol, 1.00 eq) nach der allgemeinen Vorschrift, die in Abschnitt 5.2.1 detailliert beschrieben wurde. Das Rohpeptid wurde nach der Vorschrift 5.3.16 abgespalten und gefällt. Nach chromatographischer Aufreinigung wurden 15.3 mg (0.0056 mmol, 12.8%) des über Norspermidin verbrückten Dimers als farbloses TFA-Salz erhalten.

HPLC: $t_R = 13.06$ min (5%→30%, 20 min), Reinheit: $\geq 98\%$.

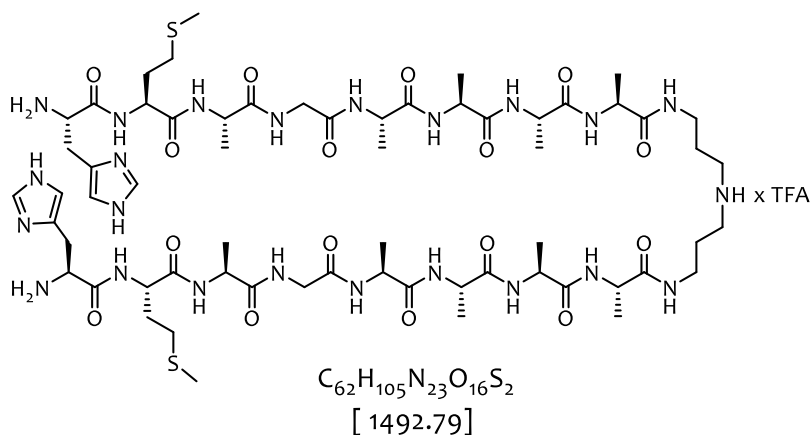
Experimenteller Teil

Tabelle 14: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 300 K, 50 mm KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1 pH 6.09) von NSPD-PrP₁₀₆₋₁₁₈(*H₁₁₁) H₁₁₁-H(d). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Die mit - gekennzeichneten Signale konnten aufgrund der Wasserunterdrückung nicht zugeordnet werden.

Aminosäure	NH/COR	αCH	βCH	Andere
Lys ¹⁰⁶	-	3.93 <i>t</i> (6.9); 53.3	1.82 <i>m</i> ; 31.3	γCH_2 1.40 <i>m</i> ; 21.3 δCH_2 1.55 <i>m</i> ; 1.65 <i>m</i> ; 26.4 ϵCH_2 3.25 <i>m</i> ; 36.2 ϵNH_2^+ -
Thr ¹⁰⁷	-	4.22 <i>d</i> (5.6) 59.3	4.10 <i>m</i> ; 67.2	γCH_3 1.14 <i>d</i> , (7.2); 18.9
Asn ¹⁰⁸	8.52 <i>bs</i>	-	2.73 <i>m</i> ; 2.78 <i>m</i> ; 36.1	δNH_H 6.85 <i>s</i> δNH_T 7.54 <i>s</i>
Met ¹⁰⁹	8.32 <i>bs</i>	4.39 <i>bs</i> ; 52.5	1.89 <i>m</i> , 1.99 <i>m</i> ; 30.2	γCH_2 2.44 <i>m</i> , 2.51 <i>m</i> ; 29.2 δCH_3 2.02 <i>s</i> ; 14.1
Lys ¹¹⁰	8.18 <i>bs</i>	4.18 <i>m</i> ; 53.9	1.60 <i>m</i> ; 30.3	γCH_2 1.11 <i>m</i> ; 21.9 1.23 <i>m</i> ; 22.1 δCH_2 1.59 <i>m</i> ; 25.6 ϵCH_2 2.87 <i>m</i> ; 2.97 <i>m</i> ; 39.3 ϵNH_3^+
His ¹¹¹	8.24 <i>m</i>	-	2.99 <i>dd</i> (29.4, 7.3) 3.11 <i>dd</i> (59.8, 7.3) 28.1	$\delta^2\text{CH}$ 7.21 <i>s</i> ; 117.1 $\epsilon^1\text{CH}$ 8.55 <i>s</i> ; 135.7
Met ¹¹²	8.18 <i>m</i>	4.39 <i>bs</i> ; 52.6	1.89 <i>m</i> , 2.00 <i>m</i> ; 30.2	γCH_2 2.23 <i>m</i> , 2.37 <i>m</i> ; 29.3 δCH_3 2.02 <i>s</i> ; 14.1
Ala ¹¹³	8.23 <i>m</i>	4.15 <i>m</i> ; 50.1	1.33 <i>m</i> ; 16.4	
Gly ¹¹⁴	8.25 <i>bs</i>	3.87 <i>m</i> ; 42.5		
Ala ¹¹⁵	8.00 <i>bs</i>	4.19 <i>m</i> ; 50.0	1.33 <i>m</i> ; 16.4	
Ala ^x	8.13 <i>m</i>	4.19 <i>m</i> ; 50.0	1.33 <i>m</i> ; 16.4	
Ala ^x	8.00 <i>bs</i>	4.21 <i>m</i> ; 50.1	1.33 <i>m</i> ; 16.4	
Ala ¹¹⁸	7.95 <i>m</i>	4.21 <i>m</i> ; 50.1	1.33 <i>m</i> ; 16.4	
NSPD	7.86 <i>s</i>	3.24 <i>m</i> ; 36.2	1.83 <i>m</i> ; 25.5	γCH_2 2.95 <i>m</i> ; 45.2

HR-MS (ESI): $C_{112}H_{197}N_{39}O_{30}S_4^{2+}$ $[M/2]^+$, ber.: 1349.1986, gef.: 1349.1992.

NSPD-PrP₁₁₁₋₁₁₈



Die Synthese erfolgte ausgehend von dem mit *Bis*-(3-aminopropyl)amin beladenen CTC-Harz ((4) B = 0.42 mmol/g, 0.10 mmol, 1.00 eq) nach der allgemeinen Vorschrift, die in Abschnitt 5.2.1 detailliert beschrieben wurde. Das Rohpeptid wurde nach der Vorschrift in Abschnitt 5.2.18 abgespalten und gefällt. Nach chromatographischer Aufreinigung wurden 15.3 mg (0.0056 mmol, 12.8%) des über ein Amin verbrückten Dimers als farbloses TFA-Salz erhalten.

HPLC: $t_R = 10.40$ min (5%→30%, 20 min), Reinheit: $\geq 99\%$.

Tabelle 15: 1H -NMR (600 MHz, 300 K, DMSO- d_6) von NSPD-PrP₁₁₁₋₁₁₈. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Die mit - gekennzeichneten Signale konnten nicht zugeordnet werden.

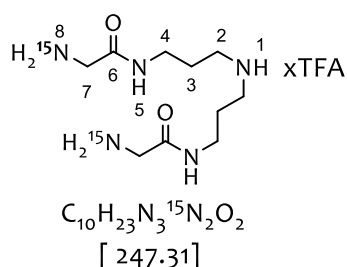
Aminosäure	NH/COR	α CH	β CH	andere
His ¹¹¹	8.29 <i>bs</i>	4.17 <i>m</i> ; 51.4	3.19 <i>m</i> ; 26.5	δ^2 CH 7.45 <i>s</i> ; 118.5 ϵ^1 CH 9.02 <i>s</i> ; 134.7 NH ₃ ⁺ 8.29 <i>bs</i>
Met ¹¹²	8.65 <i>d</i> (7.2)	4.42 <i>m</i> ; 52.8	1.83 <i>m</i> , 1.98 <i>m</i> ; 31.9	γ CH ₂ 2.49 <i>m</i> ; 29.4 δ CH ₃ 2.05 <i>s</i> ;
Ala ¹¹³	8.45 <i>d</i> (7.2)	4.15 <i>m</i> ; 48.9	1.33 <i>m</i> ; 18.2	
Gly ¹¹⁴	7.86 <i>t</i> (5.4)	3.74 <i>m</i> ; 42.7		
Ala ¹¹⁵	8.09 <i>d</i> (7.2)	4.19 <i>m</i> ; 48.9	1.33 <i>m</i> ; 18.2	
Ala ^x	8.02 <i>d</i> (7.2)	4.19 <i>m</i> ; 48.9	1.33 <i>m</i> ; 18.2	
Ala ^x	7.86 <i>d</i> (7.2)	4.21 <i>m</i> ; 48.9	1.33 <i>m</i> ; 18.2	
Ala ¹¹⁸	7.82 <i>d</i> (7.4)	4.21 <i>m</i> ; 48.9	1.33 <i>m</i> ; 18.2	
NSPD	7.89 <i>t</i> (5.0)	3.15 <i>m</i> ; 35.8	1.73 <i>m</i> ; 26.3	γ CH ₂ 2.87 <i>m</i> ; 45.1 NH ₂ ⁺ 8.29

HR-MS (ESI): $C_{62}H_{105}N_{23}O_{16}S_2 [M+Na]^+$, ber.: 1514.7449, gef.: 1514.7451.

5.4 Synthese isotopenmarkierter Oligoamine an der festen Phase

Die Synthese erfolgte ausgehend von dem mit *Bis*-(3-aminopropyl)amin beladenen CTC-Harz (**4**) B = 0.42 mmol/g, 0.10 mmol, 1.00 eq) nach der allgemeinen Vorschrift, die in Abschnitt 5.2.1 beschrieben wurde. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde *via* Abspaltprobe geprüft. Die entsprechenden Polyamid-Vorläufermoleküle wurden an dem festen Trägermaterial einer Reduktion mit BH_3 unterzogen (s. Abschnitt 5.2.11) und anschließend abgespalten und gefällt. Die Oligoamine wurden als farblose TFA-Salze erhalten.

N,N'-(azanediylbis-(propan-3,1-diyl)-)bis(2-(amino- ^{15}N)acetamid) **5a**

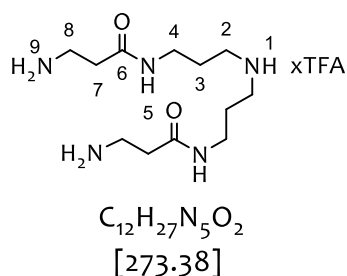


1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$, 300 K) δ = 8.26 (bs, 3H, 1-, 5-NH), 8.06 - 7.82 (d, 2H, $^1J_{N;H} = 74.2$ Hz, 8-NH), 3.54 – 3.51 (m, 4H, 7- CH_2), 3.22 - 3.18 (m, 4H, 4- CH_2), 2.89 (m, 4H, 2- CH_2), 1.74 (m, 4H, 3- CH_2) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$, 300 K) δ = 70.7, 46.2, 43.6, 37.4, 26.8 ppm.

HR-MS (ESI): $C_{10}H_{23}N_3^{15}N_2O_2H^+$ [M+H] $^+$, ber.: 248.3129, gef.: 248.3127.

N,N'-(azanediyl-bis(propan-3,1-diyl))bis-(3-aminopropanamid) **6a**

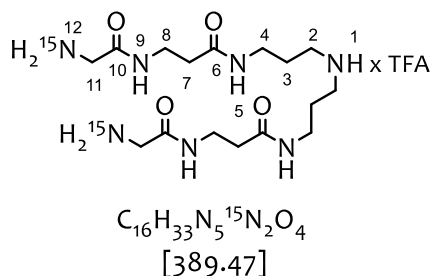


1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$, 300 K) δ = 8.26 (bs, 3H, 1-, 5-NH), 8.03 - 7.82 (bs, 2H, 9-NH), 3.48 – 3.55 (m, 4H, 4- CH_2), 3.22 - 3.18 (m, 4H, 4- CH_2), 2.71-2.66 (m, 2H, 7- CH_2), 2.92-2.87 (m, 4H, 2- CH_2), 1.74-1.68 (m, 4H, 3- CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 70.7, 46.2, 43.6, 35.8, 37.4, 26.8$ ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 274.2243, gef.: 274.2238.

***N,N'*-(azanediylbis(propan-3,1-diyl))bis(3-(2-(amino- ^{15}N)acetamido)propanamid) 7a**

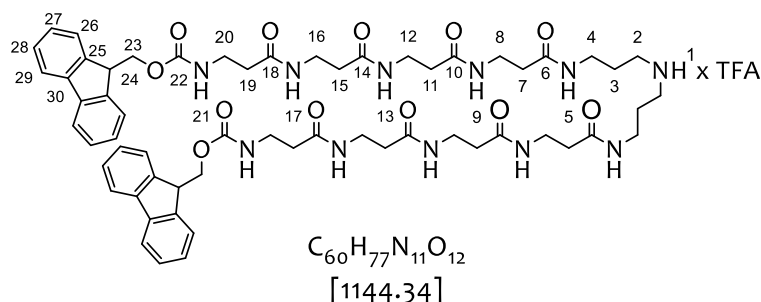


$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 8.27\text{-}8.34$ (bs, 5H, 1-, 5-, 9-NH), 8.06 - 7.82 (d, 2H, $^1J_{\text{N,H}} = 74.4$ Hz, 12-NH), 3.51 – 3.47 (m, 4H, 11- CH_2), 3.68-3.61(m, 4H, 8- CH_2), 3.42 - 3.31 (m, 4H, 4- CH_2), 2.78-2.66 (m, 4H, 7- CH_2), 2.69-2.53 (m, 4H, 2- CH_2), 1.74 (m, 4H, 3- CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 70.7, 46.2, 43.6, 37.4, 39.8, 26.8$ ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}_5^{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{H}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 387.2594, gef.: 387.2586.

***Bis*((9H-fluoren-9-yl)methyl) (3,7,11,15,25,29,33,37-octaoxo-4,8,12,16,20,24,28,32,36-nonaazanonatriacontan-1,39-diyl)dicarbamat 8a**

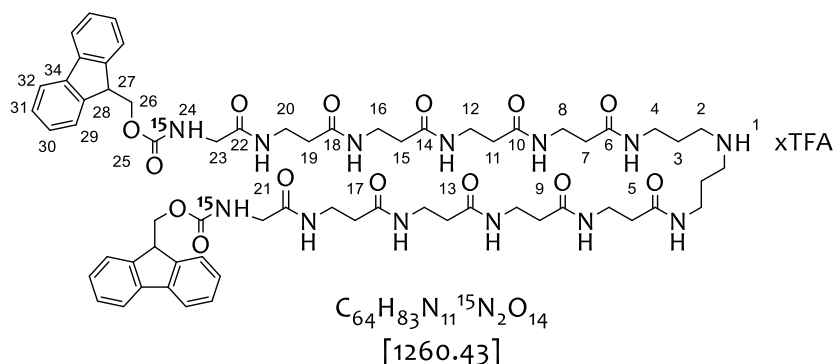


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 8.28$ (bs, 2H, 1-NH), 8.03 (t, 2H, $^3J_{\text{H;H}} = 5.6$ Hz, 5-NH), 7.97 (m, 8H, 9-, 13-, 17-, 21-NH), 7.84 (d, 4H, $^3J_{\text{H;H}} = 7.6$ Hz, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.65 (d, 4H, $^3J_{\text{H;H}} = 7.5$ Hz, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.38 (t, 4H, $^3J_{\text{H;H}} = 7.4$ Hz, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.29 (t, 4H, $^3J_{\text{H;H}} = 7.4$ Hz, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.27 (d, 4H, $^3J_{\text{H;H}} = 7.0$ Hz, 23- CH_2), 4.19 (t, 2H, $^3J_{\text{H;H}} = 6.5$ Hz, 24- CH), 3.30 - 3.16 (m, 16H, 8-, 12-, 16-, 20- CH_2), 3.11 (dt, 4H, $^3J_{\text{H;H}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H;H}} = 6.2$ Hz, 4- CH_2), 2.91 - 2.82 (m, 4H, 2- CH_2), 2.29 - 2.17 (m, 16H, 7-, 11-, 15-, 19- CH_2), 1.70 (qi, 4H, $^3J_{\text{H;H}} = 7.1$ Hz, 3- CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 171.6, 170.98, 170.96, 170.8, 156.5, 144.3, 141.2, 127.9, 127.4, 125.5, 120.4, 65.7, 47.2, 45.2, 36.0, 35.8, 26.5$ ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{60}\text{H}_{77}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{H}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1144.5826, gef.: 1144.5823.

Bis((9H-fluoren-9-yl)methyl) (2,6,10,14,18,28,32,36,40,44-decaoxo-3,7,11,15,19,23,27,31,35,39,43-undecazapentatetracontan-1,45-diyl)- ^{15}N -dicarbamat 10a



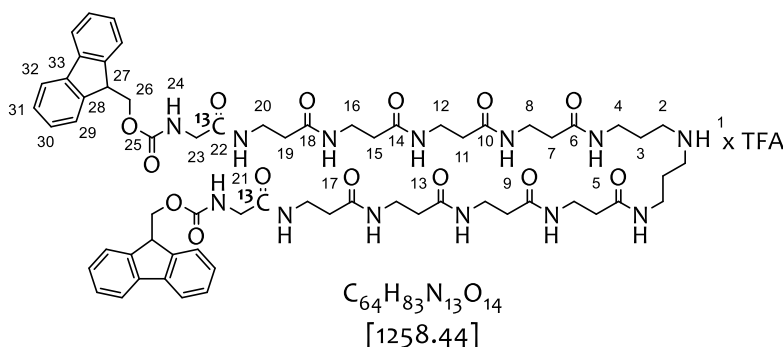
HPLC: $t_R = 4.48$ min (25% \rightarrow 90%, 5 min), Reinheit: $\geq 92\%$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 8.28$ (bs, 2H, 1-NH), 8.02 (t, 2H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 5.2$ Hz, 5-NH), 7.97 - 7.79 (m, 12H, 9-, 13-, 17-, 21-NH, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.72 - 7.63 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.62 - 7.46 (m, 2H, 24- ^{15}NH), 7.44 - 7.35 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.35 - 7.29 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.31 - 4.24 (m, 4H, 26- CH_2), 4.24 - 4.17 (m, 2H, 27-CH), 3.61 - 3.53 (m, 4H, 23- CH_2), 3.33 - 3.17 (m, 16H, 8-, 12-, 16-, 20- CH_2), 3.11 (dt, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.3$ Hz, 4- CH_2), 2.93 - 2.80 (m, 4H, 2- CH_2), 2.30 - 2.13 (m, 16H, 7-, 11-, 15-, 19- CH_2), 1.70 (qi, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 7.1$ Hz, 3- CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 127.8, 127.3, 125.3, 120.3, 65.4, 46.6, 44.9, 43.5, 35.4, 26.3$ ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{64}\text{H}_{83}\text{N}_{11}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{H}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1261.6228, gef.: 1261.6332.

Bis((9H-fluoren-9-yl)methyl) (2,6,10,14,18,28,32,36,40,44-decaoxo-3,7,11,15,19,23,27,31,35,39,43-undecaazapentatetracontan-1,45-diyl)dicarbamat 11a



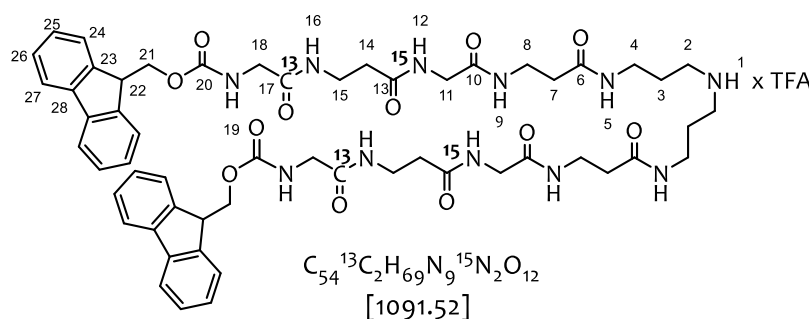
HPLC: $t_R = 4.48$ min (25%→90%, 5 min), Reinheit: $\geq 94\%$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 8.29$ (bs, 2H, 1-NH), 8.04 (t, 2H, $^3J_{H;H} = 5.2$ Hz, 5-NH), 7.99 - 7.88 (m, 8H, 9-, 13-, 17-, 21-NH), 7.86 (d, 4H, $^3J_{H;H} = 7.5$ Hz, $CH_{arom.}$), 7.70 (d, 4H, $^3J_{H;H} = 7.4$ Hz, $CH_{arom.}$), 7.56 - 7.44 (m, 2H, 24-NH), 7.39 (t, 4H, $^3J_{H;H} = 7.4$ Hz, $CH_{arom.}$), 7.31 (t, 4H, $^3J_{H;H} = 7.4$ Hz, $CH_{arom.}$), 4.28 (d, 4H, $^3J_{H;H} = 7.0$ Hz, 26- CH_2), 4.21 (t, 2H, $^3J_{H;H} = 6.9$ Hz, 27- CH), 3.65 - 3.49 (m, 4H, 23- CH_2), 3.33 - 3.18 (m, 16H, 8-, 12-, 16-, 20- CH_2), 3.15 - 3.05 (m, 4H, 4- CH_2), 2.92 - 2.81 (m, 4H, 2- CH_2), 2.31 - 2.13 (m, 16H, 7-, 11-15-, 19- CH_2), 1.76 - 1.64 (m, 4H, 3- CH_2) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 127.6$, 127.2, 125.2, 120.1, 65.7, 46.7, 44.8, 43.5, 35.3, 26.2 ppm.

HR-MS (ESI): $C_{62}^{13}C_2H_{83}N_{13}O_{14}H^+$ [M+H] $^+$, ber.: 1260.6322, gef.: 1260.6301.

Bis((9H-fluoren-9-yl)methyl) (2,6,9,13,23,27,30,34-octaoxo-3,7,10,14,18,22,26,29,33-nonaazapentatriacontan-1,35-diyl)dicarbamat 12a



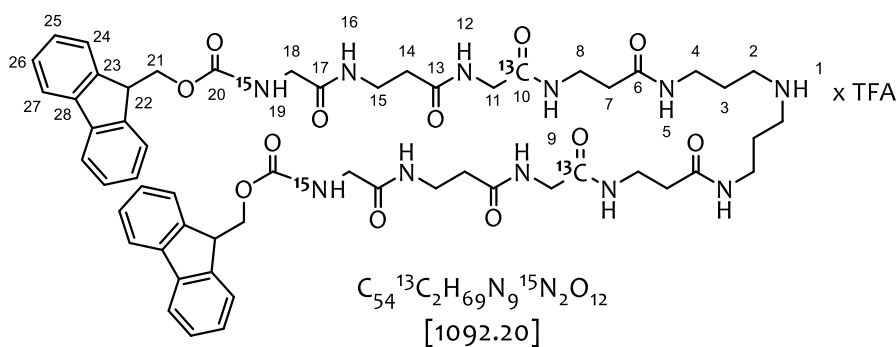
1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 8.25$ (bs, 2H, 1-NH), 8.21 (bs, 2H, 19-NH), 8.09 (d, 2H, $^1J_{H;H} = 102.0$ Hz, 12- ^{15}NH), 8.01 - 7.95 (m, 2H, 5-NH), 7.84 - 7.75 (m, 8H, 9-, 16-NH, $CH_{arom.}$), 7.67 - 7.60 (m, 4H, $CH_{arom.}$), 7.36 - 7.29 (m, 4H, $CH_{arom.}$), 4.29 (d, 4H,

$^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.8 \text{ Hz}$, 21- CH_2), 4.20 (t, 2H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.2 \text{ Hz}$, 22- CH), 3.64 (s, 4H, 11- CH_2), 3.58 (s, 4H, 18- CH_2), 3.29 (bs, 8H, 8-, 15- CH_2), 3.12 - 2.99 (m, 4H, 4- CH_2), 2.86 (bs, 4H, 2- CH_2), 2.30 (t, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 14- CH_2), 2.26 (t, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 7- CH_2), 1.70 (qi, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 3- CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 169.6, 127.8, 127.4, 125.5, 120.4, 66.1, 47.1, 45.1, 43.9, 42.4, 35.9, 36.7, 26.5 \text{ ppm}$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{54}^{13}\text{C}_2\text{H}_{69}\text{N}_9^{15}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{H}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1092.525, gef.: 1092.521.

Bis((9H-fluoren-9-yl)methyl) (2,6,9,13,23,27,30,34-octaoxo-3,7,10,14,18,22,26,29,33-nonaazapentatriacontan-1,35-diyl-9,27- $^{13}\text{C}_2$) - ^{15}N -dicarbamat 13a

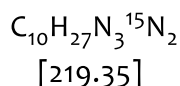
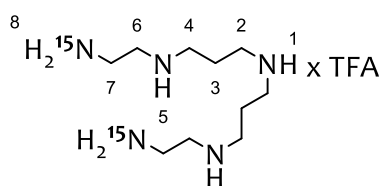


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 8.31$ (bs, 2H, 19- ^{15}NH), 8.23 (bs, 2H, 1- NH), 8.10 (bs, 2H, 12- NH), 8.00 (t, 2H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 5.8 \text{ Hz}$, 5- NH), 7.84 (bs, 2H, 16- NH), 7.82 - 7.80 (m, 2H, 9- NH), 7.76 (d, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 7.6 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.62 (d, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 7.6 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.32 (t, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 7.4 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.24 (t, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 7.5 \text{ Hz}$, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 4.28 (d, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 7.0 \text{ Hz}$, 21- CH_2), 4.21 (t, 2H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 22- CH), 3.63 (s, 4H, 11- CH_2), 3.58 (s, 4H, 18- CH_2), 3.40 - 3.29 (m, 8H, 8-, 15- CH_2), 3.18 - 3.07 (m, 4H, 4- CH_2), 2.83 (bs, 4H, 2- CH_2), 2.30 (t, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 14- CH_2), 2.25 (t, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.9 \text{ Hz}$, 7- CH_2), 1.69 (qi, 4H, $^3J_{\text{H};\text{H}} = 6.8 \text{ Hz}$, 3- CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 170.6, 128.7, 128.1, 126.3, 121.0, 66.8, 47.9, 45.8, 44.7, 43.2, 36.6, 36.4, 26.9 \text{ ppm}$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{54}^{13}\text{C}_2\text{H}_{69}\text{N}_9^{15}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{Na}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1114.503, gef.: 1114.507.

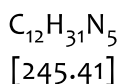
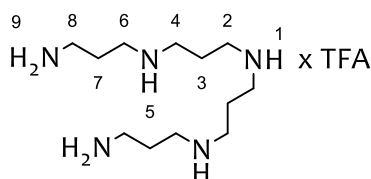
***N*¹-(2-(amino-¹⁵N)ethyl)-*N*³-(3-((2-(amino-¹⁵N)ethyl)amino)propyl)propan-1,3-diamin 5b**



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 9.13 - 8.65 (m, 6H, 1-. 5-NH₂⁺, 8-¹⁵NH₃⁺), 8.12 - 7.92 (dt, ¹J_{H-¹⁵N} -73 Hz, 2H, 8-¹⁵NH₂), 3.28 - 3.09 (m, 4H, 7-CH₂), 3.09 - 2.92 (m, 8H, 4-CH₂, 2-CH₂), 2.67 - 2.61 (m, 4H, 6-CH₂), 2.01 - 1.89 (m, 4H, 3-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 44.1, 42.6, 32.7, 22.7 ppm.

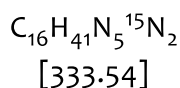
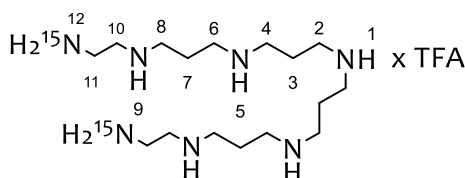
***N*¹-(3-aminopropyl)-*N*³-(3-((3-aminopropyl)amino)propyl)propan-1,3-diamin 6b**



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 9.13 - 8.65 (bs, 6H, 1-. 5-NH₂⁺, 9-¹⁵NH₃⁺), 8.58 - 8.44 (bs, 6H, 9-NH₂), 3.11 - 3.06 (m, 4H, 8-CH₂), 3.01 - 2.67 (m, 12H, 6-CH₂, 4-CH₂, 2-CH₂), 2.01 - 1.74 (m, 8H, 3-CH₂, 7-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 44.1, 42.6, 32.7, 27.3, 22.7 ppm.

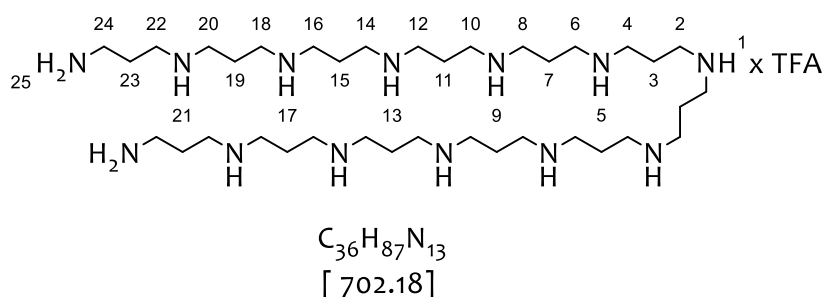
***N*¹-(2-(amino-¹⁵N)ethyl)-*N*³-(3-((3-((2-(amino-¹⁵N)ethyl)amino)propyl)amino)propyl)amino)propyl)propan-1,3-diamin 7b**



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 9.13 - 8.65 (m, 14H, 1-NH₂⁺ 5-NH₂⁺, 9-¹⁵NH₂⁺, 12-¹⁵NH₃⁺), 8.14 - 7.92 (dt, ¹J_{H-¹⁵N} -74 Hz, 2H, 12-¹⁵NH₃⁺), 3.29 - 3.07 (m, 4H, 11-CH₂), 3.07 - 2.86 (m, 16H, 10-CH₂, 8-CH₂, 6-CH₂, 4-CH₂), 2.67 - 2.61 (m, 4H, 2-CH₂), 2.01 - 1.89 (m, 8H, 3-CH₂, 7-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 44.0, 42.5, 32.8, 22.3 ppm.

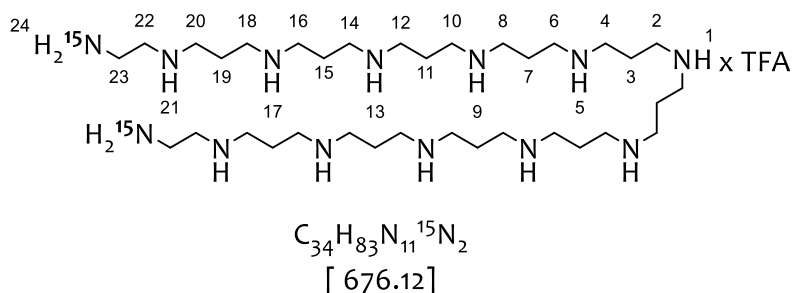
***N*¹-(31-amino-4,8,12,16,20,24,28-heptaazahentriacontyl)-*N*³-((3-((3-aminopropyl)amino)propyl)amino)propyl)propan-1,3-diamin 9b**



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 9.12 - 8.62 (m, 15H, 1-, 5-, 9-, 13-, 17-, 21-NH₂⁺, 25-NH₃⁺), 3.27 - 3.04 (m, 8H, 22-, 24-CH₂), 3.04 - 2.80 (m, 36H, 4-, 6-, 8-, 10-, 12-, 14-, 16-, 18-, 20-CH₂), 2.14 - 1.84 (m, 20H, 7-, 11-, 15-, 19-, 23-CH₂), 1.84 - 1.53 (m, 4H, 2-CH₂), 1.53 - 1.39 (m, 4H, 3-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 52.1, 44.7, 29.6, 23.1, 20.3 ppm.

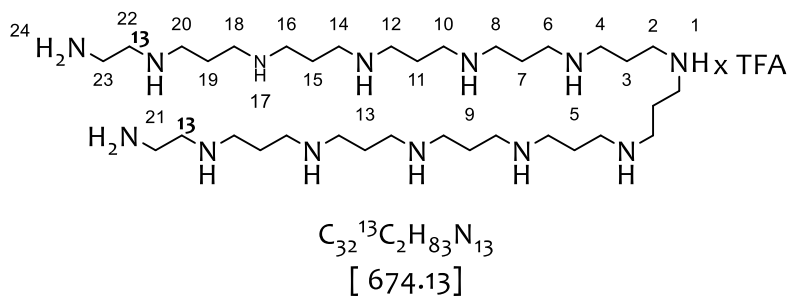
***N*¹-(1-(amino-¹⁵N)-3,7,11,15,19-pentaazadocosan-22-yl)-*N*³-(1-(amino-¹⁵N)-3,7,11,15-tetraazaocadecan-18-yl)propan-1,3-diamin 10b**



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 9.11 - 8.45 (m, 15H, 1-, 5-, 9-, 13-, 17-, 21-NH₂⁺, 24-¹⁵NH₃⁺), 3.39 - 3.04 (m, 12H, 4-, 22-, 23-CH₂), 3.04 - 2.85 (m, 32H, 6-, 8-, 10-, 12-, 14-, 16-, 18-, 20-CH₂), 2.11 - 1.87 (m, 16H, 7-, 11-, 15-, 19-CH₂), 1.83 - 1.58 (m, 4H, 2-CH₂), 1.54 - 1.39 (m, 4H, 3-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 52.6, 50.1, 44.8, 29.6, 23.3, 21.0 ppm.

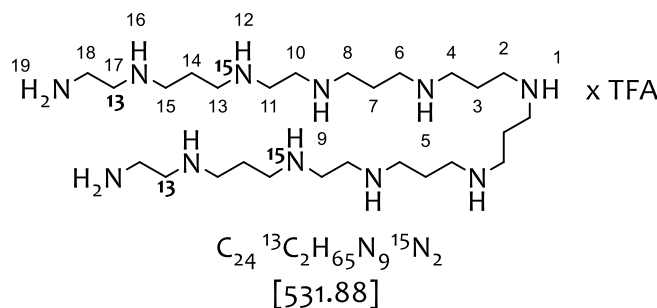
***N*¹-(1-amino-3,7,11,15,19-pentaazadocosan-22-yl)-*N*³-(1-amino-3,7,11,15-tetraazaoctadecan-18-yl)propan-1,3-diamin 11a**



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 9.14 - 8.44 (m, 13H, 1-, 5-, 9-, 13-, 17-, 21-NH₂⁺, 24-NH₃⁺), 3.30 - 3.05 (m, 12H, 4-CH₂, 22-¹³CH₂, 23-CH₂), 3.05 - 2.80 (m, 32H, 6-, 8-, 10-, 12-, 14-, 16-, 18-, 20-CH₂), 2.15 - 1.85 (m, 16H, 7-, 11-, 15-, 19-CH₂), 1.76 - 1.59 (m, 4H, 2-CH₂), 1.51 - 1.38 (m, 4H, 3-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 51.8, 44.2, 42.7, 29.1, 22.5, 19.9 ppm.

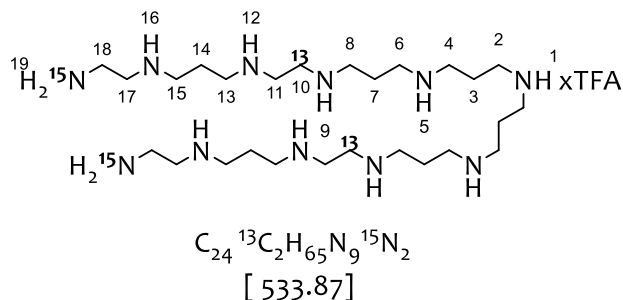
***N*¹-(1-amino-3,7,10,14,18-pentaazahenicosan-21-yl)-*N*³-(2-((3-((2-aminoethyl)amino)propyl)amino)ethyl)propan-1,3-diamin 12b**



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 9.09 - 8.52 (m, 13H, 1-, 5-, 9-, 16-NH₂⁺, 12-¹⁵NH₂⁺, 19-NH₃⁺), 3.52 - 3.36 (m, 16H, 10-, 11-, 17-, 18-CH₂), 3.29 - 3.09 (m, 4H, 4-CH₂), 3.03 - 2.79 (m, 16H, 6-, 8-, 13-, 15-CH₂), 2.61 - 2.34 (m, 8H, 7-, 14-CH₂), 2.24 - 1.89 (m, 4H, 2-CH₂), 1.79 - 1.59 (m, 4H, 3-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 52.2, 42.4, 34.7, 29.5, 22.7, 20.1 ppm.

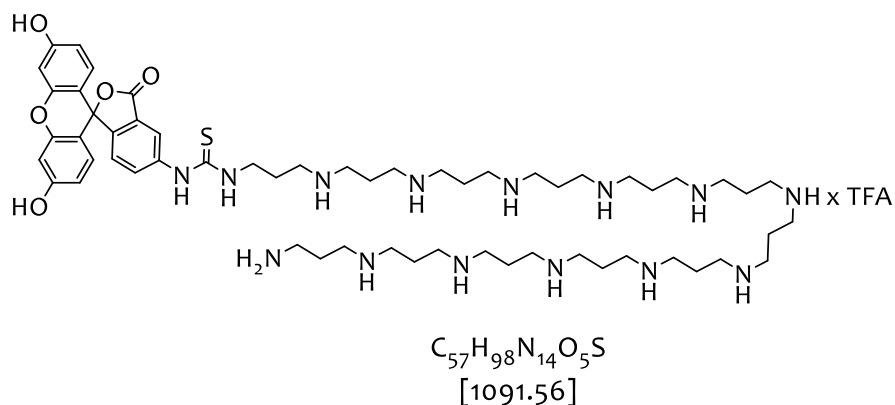
***N*¹-(1-amino-3,7,10,14,18-pentaazahenicosan-21-yl)-*N*³-(2-((3-((2-aminoethyl)amino)propyl)amino)ethyl)propan-1,3-diamin 13b**



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 9.13 - 8.42 (m, 13H, 1-, 5-, 9-, 12-, 16-NH₂⁺, 19-NH₃⁺), 3.53 - 3.36 (m, 16H, 10-, 11-, 17-, 18-CH₂), 3.34 - 3.12 (m, 4H, 4-CH₂), 3.02 - 2.76 (m, 16H, 6-, 8-, 13-, 15-CH₂), 2.58 - 2.31 (m, 8H, 7-, 14-CH₂), 2.22 - 1.89 (m, 4H, 2-CH₂), 1.82 - 1.64 (m, 4H, 3-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 52.1, 42.9, 34.8, 29.2, 22.9, 20.5 ppm.

1-(47-amino-4,8,12,16,20,24,28,32,36,40,44-undecaazaheptatetracontyl)-3-(3',6'-dihydroxy-3-oxo-3*H*-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)thioharnstoff (FITC-markiertes Polyamin) 14b

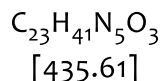
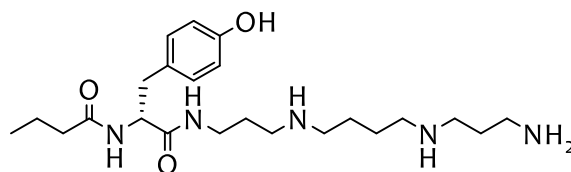


¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 10.27 - 10.09 (bs, 2H, OH), 9.22 - 8.43 (m, 14H, NH₂⁺, NH₃⁺), 7.97 - 7.91 (m, 1H, CH_{arom.}), 7.90 - 7.81 (m, 1H, CH_{arom.}), 7.77 - 7.71 (m, 1H, CH_{arom.}), 7.24 - 7.15 (m, 1H, CH_{arom.}), 6.72 - 6.65 (m, 1H, CH_{arom.}), 6.60 - 6.48 (m, 2H, CH_{arom.}), 3.69 - 3.23 (m, 32H, NHCH₂), 3.23 - 2.71 (m, 12H, NHCH₂), 2.16 - 1.76 (m, 12H, NH₂CH₂, CH₂CH₂), 1.73 - 1.59 (m, 8H, CH₂CH₂), 1.52 - 1.39 (m, 8H, CH₂CH₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 133.5, 128.7, 123.3, 121.0, 112.5, 102.2, 59.6, 51.8, 48.8, 43.8, 29.0, 22.3, 19.8 ppm.

5.5 Herstellung Polyamin-basierter Toxine

PhTX₃₄₃

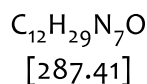
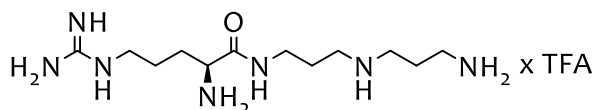


¹H-NMR (500 MHz, 50 mm KH₂PO₄-Puffer/D₂O 9:1 pH 6.09, 300 K,) δ = 0.42 (t, 3H, ³J_{H;H} = 7.5 Hz, CH₃-Butyryl), 1.18 (m, 2H, CH₃CH₂CH₂- Butyryl), 1.36-1.42 (m, 6H, CONHCH₂CH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1.72 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 1.83 (t, 2H, ³J_{H;H} = 7.5 Hz, CH₃CH₂CH₂- Butyryl), 2.41 (2H, t, ³J_{H;H} = 7.5 Hz, CONHCH₂CH₂CH₂), 2.56 (m, 2H, β-CH₂), 2.62-2.70 (4H, m, NHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 2.70-2.76 (4H, NHCH₂CH₂CH₂NH), 2.82 (m, 2H, CONHCH₂), 4.02 (t, 1H, ³J_{H;H} = 8.0 Hz, α-CH), 6.48 (d, 2H, ³J_{H;H} = 8.1 Hz, H_{arom.}), 6.76 (d, 2H, 2H, ³J_{H;H} = 8.0 Hz, H_{arom.}), 7.74 (d, 1H, ³J_{H;H} = 7.2 Hz, CHCONH), 7.89 (s, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 13.5 (CH₃), 19.4 (CH₂CH₂CH₂), 25.4 (NHCH₂CH₂), 29.2 (CH₂CH₂CH₂), 31.8 (CH₂CH₂CH₂), 37.4 (C-β) 37.7 (NHCH₂), 39.4 (CH₂NH₂), 46.8 (NHCH₂), 48.2 (NHCH₂), 58.7 (C-α), 116.2 (C_{arom.}), 129.8 (C_{arom.}), 129.6 (C_{q.}), 155.7 (C_{q.}), 171.4 (CO), 173.9 (CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₂₃H₄₁N₅O₃H⁺ [M+H⁺], ber.: 436.3288, gef.: 436.3282.

sFTX-3.3



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.41-1.54 (m, 2H, γ-CH₂), 1.64-1.82 (m, 4H, β-CH₂, CONHCH₂CH₂CH₂NH), 1.83-1.94 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.79-3.01 (6H, m, CH₂NHCH₂CH₂CH₂), 3.06-3.32 (m, 4H, CONHCH₂, δ-CH₂), 3.72 (s, 1H, α-CH), 6.92-7.47 (bs, 3H, Guanidinium), 7.71 (s, 1H, CONH), 7.84 (s, 3H, NH₃⁺), 8.17 (s, 3H, α-NH₃⁺), 8.61 (bs, 3H, NH₂⁺, δCH₂NH) ppm.

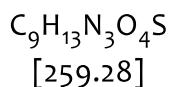
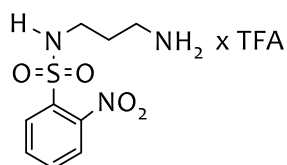
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 23.7 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 24.2 (C- γ), 25.7 (CONHCH₂CH₂), 28.2 (C- β), 35.9 (C- δ), 36.1 (CH₂CH₂CH₂NH₂), 39.3 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 40.0 (CONHCH₂), 51.9 (C- α).

HR-MS (ESI): C₁₂H₂₉N₇OH⁺ [M+H⁺], ber.: 288.2511, gef.: 288.2509.

5.5.1 Polyaminverlängerungen an der festen Phase

Der Ausbau der Oligoamine wurde ausgehend von den mit 1,3-Propylendiamin- bzw. Norspermidin beladenen Harze nach den allgemeinen Vorschriften (Unterkapitel 5.2.2) *via* FUKUYAMA-MITSUNOBU Reaktionen erreicht. Zu beachten ist, dass es sich bei den meisten Ns-geschützten Oligoaminen um Vorläufermoleküle handelt, deren Struktur mittels einer Abspaltprobe (Abschnitt 2.8) gesichert wurde. Zum Nachteil dieser Vorgehensweise zur Charakterisierung der synthetisch wichtigen Zwischenstufen gehört häufig der Verlust säurelabiler Schutzgruppen. Als Folge einer TFA-Behandlung lässt sich z.B. *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe vollständig oder teilweise abspalten, verbleibt jedoch in der zu analysierenden Probe und lässt sich zusammen mit dem entschützten bzw. teils geschütztem Zielmolekül detektieren. Der Einfachheit halber wurde diese in der Auswertung nicht aufgelistet.

N-(3-aminopropyl)-2-nitrobenzensulfonamid 30



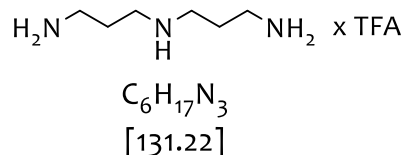
HPLC: t_R = 3.69 min (10%→90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: \geq 99%.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.64-1.79 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.71-2.89 (m, 2H, H₂CH₂NH₂), 2.92-3.05 (2H, m, NNsCH₂CH₂), 7.63 (bs, 3H, NH₃⁺), 7.75-7.82 (m, 2H, CH_{arom}), 7.83 - 7.90 (m, 1H, CH_{arom}), 7.95-8.02 (m, 1H, CH_{arom}), 8.07 (t, ³J_{NHNs;NHNsCH2} = 6.0 Hz, 1H, NsNH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 25.8 (CH₂CH₂CH₂), 35.9 (CH₂CH₂NH₂), 48.3 (NNsCH₂), 124.6, 130.2, 132.6, 135.1 (C_{arom}.) ppm.

HR-MS (ESI): $C_9H_{13}N_3O_4SH^+$ $[M+H]^+$, ber.: 260.0705, gef.: 260.0699.

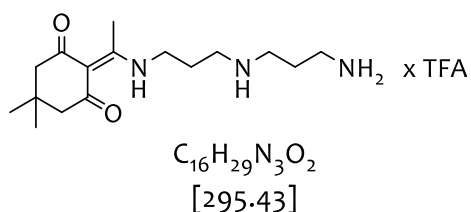
Bis(3-aminopropyl)amin 40



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 1.84-1.91 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.82-2.91 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.92-3.01 (4H, m, NHCH_2CH_2), 7.81 (bs, 6H, NH_3^+), 8.62 (bs, 4H, NH_2^+) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 24.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 36.4 (CH_2NH_2), 44.4 (NHCH_2) ppm.

2-(1-(((3-aminopropyl)amino)propyl)amino)ethyliden)-5,5-dimethylcyclohexan-1,3-dion 41

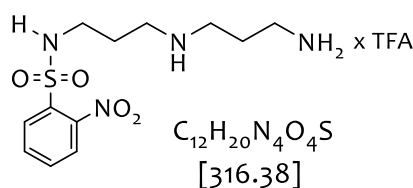


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 0.95 (s, 6H, Dde- CH_3), 1.90-1.95 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.28 (bs, 4H, Dde- CH_2), 2.49 (s, 3H, Dde= CH_3), 2.86-2.93 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.93-2.98 (2H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.98-3.04 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.50-3.56 (pq, $^3J_{\text{DdeNHCH}_2; \text{DdeNH}} = 5.7$ Hz, 2H, Dde NHCH_2), 7.78 (bs, 6H, NH_3^+), 8.51 (bs, 4H, NH_2^+), 13.29 (t, $^3J_{\text{DdeNH}; \text{DdeNHCH}_2} = 5.7$ Hz, 1H, Dde NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 17.6 (Dde= CH_3), 23.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 25.1 Dde NHCH_2CH_2), 27.6 (Dde- CH_3), 36.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 39.5 (Dde NHCH_2), 43.8 ($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2$), 44.2 ($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2$), 52.3 (Dde- CH_2), 199.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{16}H_{29}N_3O_2H^+$ $[M+H]^+$, ber.: 296.2338, gef.: 296.2342.

***N*-(3-aminopropyl)-*N*-(3-((2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)pivalamid 43**

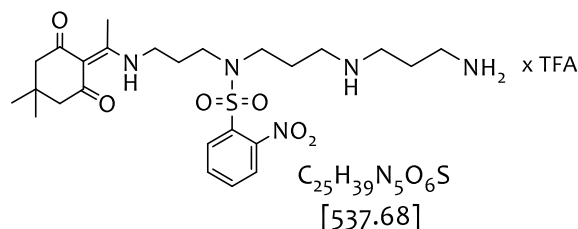


¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.74-1.81 (m, 2H, NNsCH₂CH₂), 1.81-1.90 (m, 2H, CH₂CH₂NH₂), 2.79-2.88 (m, 2H, CH₂NH₂), 2.88-2.95 (m, 4H, CH₂NHCH₂), 2.95-2.99 (m, 2H, NNsCH₂), 7.68-7.75 (m, 3H, NH₃⁺), 7.75-7.81 (m, 2H, CH_{arom}), 7.82-7.89 (m, 1H, CH_{arom}), 7.95-8.00 (m, 1H, CH_{arom}), 8.07 (t, 1H, ³*J* N_sNHCH₂; N_sNH = 5.7 Hz, N_sNH), 8.42 (bs, 2H, NH₂⁺) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 23.9 (CH₂CH₂NH₂), 26.4 (NNsCH₂CH₂), 36.5 (CH₂NH₂), 40.1 (NHNsCH₂), 44.6 (CH₂NHCH₂), 124.8, 130.0, 132.5, 134.2 (C_{arom}.) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₂H₂₀N₄O₄SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 317.1283, gef.: 317.1279.

***N*-(3-((3-aminopropyl)amino)propyl)-*N*-(3-((1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl)amino)propyl)-2-nitrobenzensulfonamid 44**



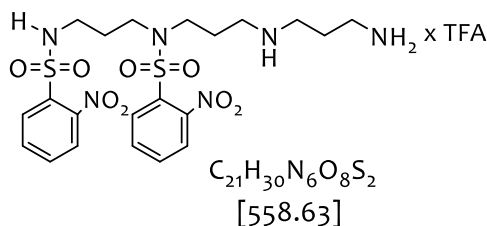
HPLC: t_R = 4.36 min (10%→90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: \geq 94%.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 0.91 (s, 6H, Dde-CH₃), 1.80-1.92 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂), 2.23 (bs, 4H, Dde-CH₂), 2.36 (s, 3H, Dde=CH₃), 2.82-3.00 (m, 8H, CH₂NHCH₂, CH₂CH₂NH₂), 3.31-3.40 (m, 4H, NNsCH₂, DdeNHCH₂), 7.75-7.81 (m, 5H, 2x CH_{arom}, NH₃⁺), 7.82- 7.89 (m, 1H, CH_{arom}), 7.95-8.00 (m, 1H, CH_{arom}), 8.49 (bs, 4H, NH₂⁺), 13.29 (t, 1H, ³*J* DdeNH; DdeNHCH₂ = 5.7 Hz, DdeNHCH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 17.5 (Dde=CH₃), 24.2 (CH₂CH₂CH₂), 28.1 (CH₂CH₂CH₂), 27.9 (Dde-CH₃), 36.6 (CH₂CH₂NH₂), 40.4 (DdeNHCH₂), 44.7 (CH₂NHCH₂), 45.5 (NNsCH₂), 52.4 (Dde-CH₂), 124.9, 130.0, 132.7, 135.0 (C_{arom}.), 199.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₂₅H₃₉N₅O₆SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 538.2693, gef.: 538.2694.

***N*-3-((3-aminopropyl)amino)propyl)-2-nitro-*N*-3-((2-nitrophenyl)sulfonamido) propyl) benzensulfonamid 45**



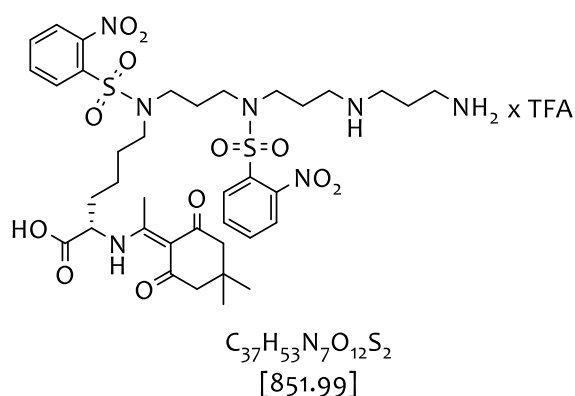
HPLC: $t_R = 5.39$ min (10%→90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: $\geq 94\%$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 1.65$ -1.73 (m, 2H, $NNsCH_2CH_2CH_2NNs$), 1.80-1.91 (m, 4H, $NNsCH_2CH_2CH_2NH$, $CH_2CH_2NH_2$), 2.79-2.92 (m, 6H, $NHNsCH_2$, $NNsCH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2CH_2NH_2$), 2.93-3.01 (m, 2H, $NHCH_2CH_2CH_2NH_2$), 3.25-3.39 (m, 4H, $NNsCH_2CHCH_2NNs$), 7.73-8.00 (m, 11H, NH_3^+ , CH_{arom}), 8.09 (t, 1H, $^3J_{NsNHCH_2; NsNH} = 5.7$ Hz, $NsNH$), 8.51 (bs, 2H, NH_2^+) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 23.8$ ($CH_2CH_2NH_2$), 25.1 ($NNsCH_2CH_2CH_2NH$), 28.3 ($NHNsCH_2CH_2$), 36.3 ($CH_2CH_2NH_2$), 40.2 ($NHNsCH_2$), 44.2 ($NHCH_2CH_2CH_2NH_2$), 44.5 ($NNsCH_2CH_2CH_2NH$), 45.3 ($NNsCH_2$), 124.7, 139.7, 132.5, 134.5 (C_{arom}) ppm.

HR-MS (ESI) $C_{21}H_{30}N_6O_8S_2H^+$ [$M+H^+$], ber.: 559.1642, gef.: 559.1639.

***N*⁶-3-((*N*-3-((3-aminopropyl)amino)propyl)-2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)-*N*²-(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl)-*N*⁶-((2-nitrophenyl)sulfonyl)-*L*-lysin 46**



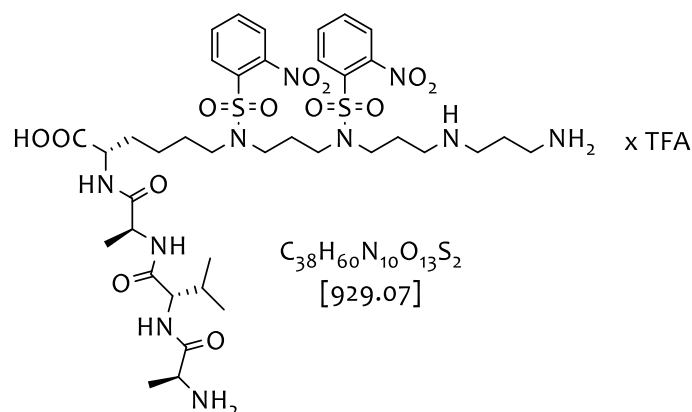
1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 0.93$ (s, 6H, Dde- CH_3), 1.11-1.27 (m, 2H, γ - CH_2), 1.39-1.47 (m, 2H, δ - CH_2), 1.66-1.80 (m, 4H, β - CH_2 , $NNsCH_2CH_2CH_2NNs$), 1.82-1.92 (m, 4H, $NNsCH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2CH_2NH_2$), 2.29 (s, 4H, Dde- CH_2), 2.41 (s, 3H, Dde= CH_3), 2.82-2.93 (m, 4H, $NNsCH_2CH_2CH_2NH$, $NHCH_2CH_2CH_2NH_2$), 2.92-3.01 (m, 2H, $NHCH_2CH_2CH_2NH_2$), 3.13-3.20 (m, 4H, ϵ - CH_2 , $NNsCH_2CH_2CH_2NNs$), 3.26 (t, 2H, $^3J =$

7.6 Hz, NNsCH₂CHCH₂NNs), 3.36 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, NNsCH₂CH₂CH₂NH), 4.51 (pq, ³J = 7.0 Hz, 1H, α-CH), 7.69-8.00 (m, 11H, CH_{arom.}, NH₃⁺), 8.50 (bs, 2H, NH₂⁺), 13.55 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, α-NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆, 300 K) δ = 17.8 (Dde=CH₃), 21.8 (C-γ), 24.5 (NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 27.1 (NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 27.6 (C-δ), 27.9 (Dde-CH₃), 31.7 (C-β), 36.4 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.3 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.7 (NNsCH₂CH₂CH₂NH), 45.0 (NNsCH₂CHCH₂NNs), 47.3 (C-ε), 52.5 (Dde-CH₂), 55.5 (C-α), 124.4, 130.0, 132.5, 134.9, 134.6 (C_{arom.}), 199.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₃₇H₅₃N₇O₁₂S₂H⁺ [M+H]⁺, ber.: 852.3259, gef.: 852.3266.

Tetrapeptid 47



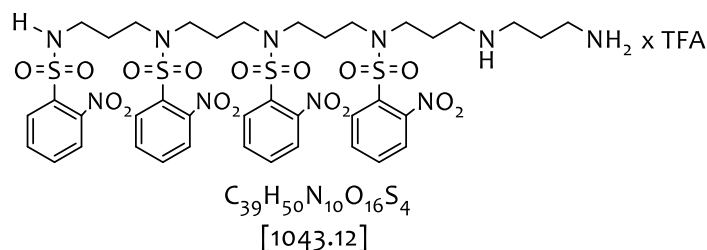
HPLC: t_R = 7.58 min (40%→80% in 10 min, 0.42 mL/min), Reinheit: ≥ 98%.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 300 K) δ = 0.84 (d, 3H, ³J = 6.7 Hz, Vγ-CH₃), 0.87 (d, 3H, ³J = 6.7 Hz, Vγ-CH₃), 1.12-1.20 (m, 2H, Kγ-CH₂), 1.94 (d, 3H, ³J = 7.1 Hz, A³β-CH₃), 1.32 (d, 3H, ³J = 7.0 Hz, A¹β-CH₃), 1.34-1.44 (m, 2H, Kδ-CH₂), 1.46-1.57 (m, 1H, Kβ-CH₂), 1.58-1.75 (3H, Kβ-CH₂, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.81-1.91 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 1.94-2.04 (m, 1H, Vβ-CH), 2.82-2.92 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.92-3.00 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.11-3.22 (m, 4H, Kε-CH₂, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 3.25 (t, 2H, ³J = 7.5 Hz, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 3.35 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, NNsCH₂CH₂CH₂NH), 3.91-3.97 (m, 1H, A¹α-CH), 4.11-4.17 (m, 1H, Kα-CH), 4.20-4.25 (m, 1H, Vα-CH), 4.33-4.39 (m, 1H, A³α-CH), 7.78-8.02 (m, 17 H, CH_{arom.}, NH₃⁺, A¹α-NH₃⁺, A¹-NH, A³-NH, K-NH), 8.34 (d, 1H, ³J = 8.7 Hz, V-NH), 8.52 (bs, 2H, NH₂⁺) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 17.4 (A¹-C β), 17.9 (V-C γ), 18.7 (A³-C β), 19.3 (V-C γ), 22.5 (K-C γ), 24.3 (NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 26.9 (NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 27.5 (K-C δ), 30.5 (V-C β), 31.0 (K-C β), 36.3 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.3 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.7 (NNsCH₂CH₂CH₂NH), 45.1 (NNsCH₂), 47.6 (K-C ϵ), 48.4 (A¹-C α), 48.8 (A³-C α), 51.7 (K-C α), 58.2 (V-C α), 124.6, 129.6, 132.7, 134.7 (*C*_{arom.}) ppm.

HR-MS (ESI): C₃₈H₆₀N₁₀O₁₃S₂H⁺ [M+H]⁺, ber.: 929.3813, gef.: 929.3855.

***N*-(3-((3-aminopropyl)amino)propyl)-2-nitro-*N*-(3-((2-nitro-*N*-(3-((2-nitro-*N*-(3-((2-nitrophenyl)sulfonamido)propyl)phenyl)sulfonamido)propyl)phenyl)sulfonamido)propyl)phenyl)sulfonamid 50**



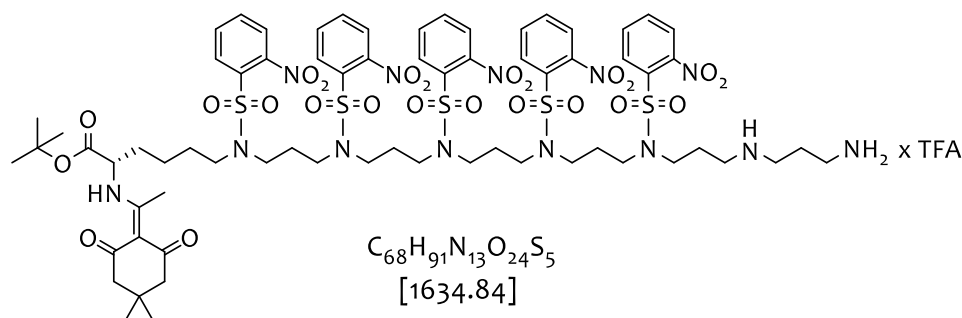
HPLC: t_R = 6.36 min (20%→90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: \geq 95%.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 1.56-1.68 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.69-1.78 (m, 2H, NNsCH₂CH₂CH₂NNsCH₂CH₂CH₂NH), 1.82-1.90 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NH, CH₂CH₂NH₂), 2.79-2.92 (m, 6H, NHNsCH₂, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.93-3.01 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.10-3.23 (m, 8H, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 3.24-3.30 (m, 2H, CH₂NNsCH₂CH₂CH₂NH), 3.35 (t, 2H, CH₂NNsCH₂CH₂CH₂NH, ³*J*_{NsCH₂; NsNCH₂CH₂} = 6.8 Hz), 7.69-7.98 (m, 19H, NH₃⁺, CH_{arom.}), 8.02 (t, 1H, ³*J*_{NsNHCH₂; NsNH} = 5.8 Hz, NsNH), 8.49 (bs, 2H, NH₂⁺) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 24.1 (CH₂CH₂NH₂), 25.2 (NNsCH₂CH₂CH₂NH), 27.2 (NNsCH₂), 28.4 (NHNsCH₂CH₂), 36.6 (CH₂CH₂NH₂), 40.5 (NHNsCH₂), 44.2 (CH₂NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.4 (CH₂NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 45.3 (NNsCH₂), 124.6, 129.8, 129.9, 132.8, 134.7 (*C*_{arom.}) ppm.

HR-MS (ESI): C₃₉H₅₀N₁₀O₁₆S₄H⁺ [M+H]⁺, ber.: 1043.2378, gef.: 1043.2362.

(S)-1-amino-29-((1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl)amino)-8,12,16,20,24-pentakis((2-nitrophenyl)sulfonyl)-4,8,12,16,20,24-hexaazatriacontan-30-*oat tert*-butylester 51



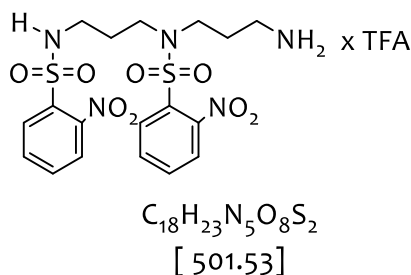
HPLC: $t_R = 4.52$ min (40%→80% in 5 min, 0.45 mL/min), Reinheit: $\geq 99\%$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 0.94$ (s, 6H, Dde-CH₃), 1.07-1.22 (m, 2H, γ -CH₂), 1.34-1.53 (m, 13H, δ -CH₂, ^tBu-CH₃), 1.56-1.79 (m, 10H, β -CH₂, 4x NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.79-1.96 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.29 (s, 4H, Dde-CH₂), 2.41 (s, 3H, Dde=CH₃), 2.81-2.92 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.92-3.01 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.08-3.31 (m, 18H, ϵ -CH₂, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 3.31-3.418 (m, 2H, NNsCH₂CH₂CH₂NH), 4.54 (pq, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, α -CH), 7.79-8.54 (m, 23H, $CH_{arom.}$, NH_3^+), 8.54 (bs, 2H, NH_2^+), 13.55 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, α -NH) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 17.6$ (Dde=CH₃), 21.6 (C- γ), 24.3 (NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 26.3 (NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 26.9 (^tBu-CH₃) 27.1 (C- δ), 27.4 (Dde-CH₃), 31.3 (C- β), 36.4 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.4 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.8 (CH₂NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.5 (NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 48.9 (C- ϵ), 52.5 (Dde-CH₂), 54.6 (C- α), 124.1, 129.4, 132.2, 130.8, 134.6, ($C_{arom.}$), 199.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{68}H_{91}N_{13}O_{24}S_5H^+$ [M+H]⁺, ber.: 1634.5042, gef.: 1634.4976.

***N*-(3-aminopropyl)-2-nitro-*N*-(3-((2-nitrophenyl)sulfonamido) propyl) benzylsulfonamid 54**



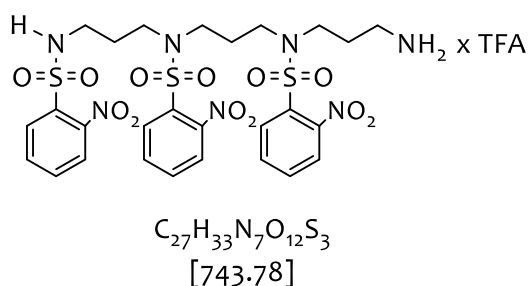
HPLC: $t_R = 4.82$ min (20%→90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: $\geq 99\%$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300K) $\delta = 1.64$ -1.72 (m, 2H, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.74-1.85 (m, 2H, NNsCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.72-2.79 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.81-2.89 (m, 2H, NHNsCH₂), 3.25-3.34 (m, 4H, NNsCH₂CHCH₂NNs), 7.67 (bs, 3H, NH₃⁺), 7.79-7.99 (m, 8H, CH_{arom}), 8.09 (t, 1H, $^3J_{NsNHCH_2}$; NsNH = 5.7 Hz, NsNH) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6 , 300K) $\delta = 26.5$ (CH₂CH₂NH₂), 28.5 (NHNsCH₂CH₂), 36.8 (CH₂CH₂NH₂), 40.5 (NHNsCH₂), 45.2, 45.6 (CH₂NsNCH₂), 124.7, 139.7, 132.5, 134.5 (C_{arom}.) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{18}H_{23}N_5O_8S_2H^+$ [M+H]⁺, ber.: 502.1064, gef.: 502.1061.

***N*-(3-aminopropyl)-2-nitro-*N*-(3-((2-nitro-*N*-(3-((2-nitrophenyl)sulfonamido) propyl) phenyl)sulfonamido)propyl)benzylsulfonamid 55**



HPLC: $t_R = 6.01$ min (20%→90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: $\geq 98\%$.

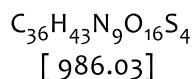
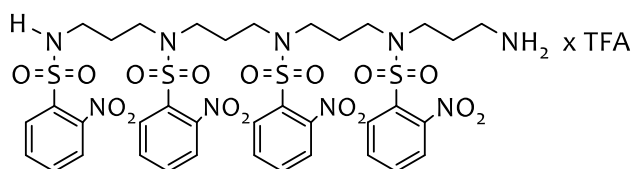
1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300K) $\delta = 1.57$ -1.65 (m, 2H, NHNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.65-1.74 (m, 2H, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.76-1.83 (m, 2H, NNsCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.72-2.78 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.79-2.86 (m, 2H, NHNsCH₂), 3.11-3.19 (m, 2H, CH₂NNsCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.19-3.26 (m, 4H, NNsCH₂CHCH₂NNs), 3.29-3.36 (t, 2H,

$^3J_{\text{NsNHCH}_2; \text{NsNCH}_2\text{CH}_2} = 7.3 \text{ Hz}$, $\text{NNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, 7.66 (bs, 3H, NH_3^+), 7.74-7.90 (m, 12H, CH_{arom}), 7.99 (t, 1H, $^3J_{\text{NsNHCH}_2; \text{NsNH}} = 5.8 \text{ Hz}$, NsNH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300K) $\delta = 26.4$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 27.1 ($\text{NNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NNs}$), 28.4 ($\text{NHNsCH}_2\text{CH}_2$), 36.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 40.5 (NHNsCH_2), 45.1, 45.3 ($\text{NNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NNs}$), 124.7, 139.7, 132.5, 134.5 (C_{arom}) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{S}_3\text{H}^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$], ber.: 744.1420, gef.: 744.1422.

***N*-(3-aminopropyl)-2-nitro-*N*-(3-((2-nitro-*N*-(3-((2-nitro-*N*-(3-((2-nitrophenyl) sulfonamido)propyl)phenyl)sulfonamido)propyl)phenyl)sulfonamido)propyl)benzylsulfonamid 56**



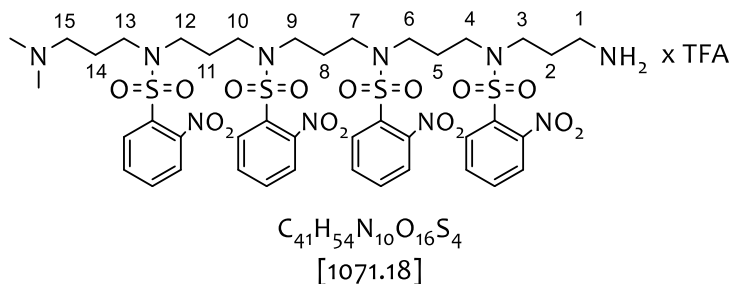
HPLC: $t_R = 6.78 \text{ min}$ (20% → 90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: $\geq 96\%$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300K) $\delta = 1.5$ -1.66 (m, 2H, $\text{NHNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NNs}$), 1.66-1.75 (m, 4H, $\text{NNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NNs}$), 1.75-1.84 (m, 2H, $\text{NNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.69-2.78 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.78-2.88 (m, 2H, NHNsCH_2), 3.08-3.27 (m, 10H, $\text{CH}_2\text{NNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $\text{NNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NNs}$), 7.66 (bs, 3H, NH_3^+), 7.74-7.90 (m, 12H, CH_{arom}), 7.99 (t, 1H, $^3J_{\text{NsNHCH}_2; \text{NsNH}} = 5.7 \text{ Hz}$, NsNH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 26.5$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 27.1 ($\text{NNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NNs}$), 28.4 ($\text{NHNsCH}_2\text{CH}_2$), 36.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 40.5 (NHNsCH_2), 45.1, 45.3 ($\text{NNsCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NNs}$), 124.7, 139.7, 132.5, 134.5 (C_{arom}) ppm.

HR-MS (ESI⁺): $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_{16}\text{S}_4\text{H}^+$ [$\text{M}+\text{H}^+$], ber.: 986.1769, gef.: 986.1783.

***N*-(3-aminopropyl)-*N*-(2-methyl-6,10,14-tris((2-nitrophenyl)sulfonyl)-2,6,10,14-tetraazaheptadecan-17-yl)-2-nitrobenzensulfonamid 58**

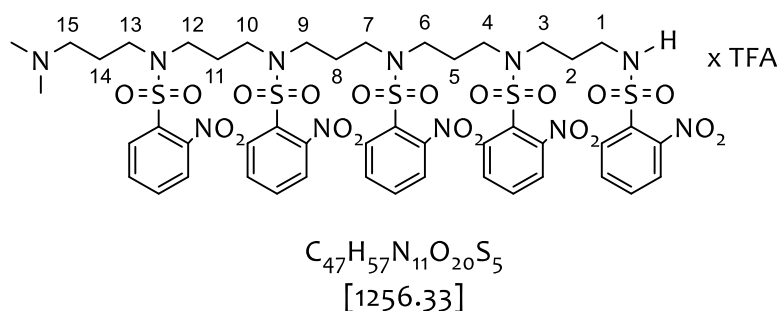


1H -NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.49-1.98 (m, 10H, 2-, 5-, 8-, 11-, 14-*CH*₂), 2.71 (d, 6H, 1J = 4.4 Hz, N(*CH*₃)₂), 2.87-3.05 (m, 2H, 15-*CH*₂), 3.05-3.42 (m, 18H, 1-, 3-, 4-, 6-, 7-, 9-, 10-, 12-, 13-*CH*₂), 7.43-8.07 (m, 19H, NH₃⁺, *C*_{arom.}), 9.45 (bs, 1H, HN(*CH*₃)₂⁺) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) = 27,6 (C-2, C-5, C-8, C-11, C-14), 42.6 N(*CH*₃)₂, 44,8 (C-1, C-3, C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-12, C-13), 54.8 (C-15), 124.7, 129.9, 152.9, 154.9 (*C*_{arom.}) ppm.

HR-MS (ESI): C₄₁H₅₄N₁₀O₁₆S₄H⁺ [M+H⁺], ber.: 1071.2662, gef.: 1071.2675.

Sulfonsäureamid 59



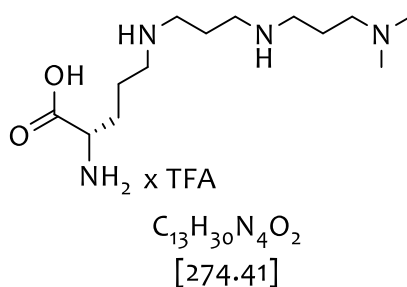
HPLC: t_R = 7.51 min (20%→90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: \geq 97%.

1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.55-1.69 (m, 6H, 2-, 5-, 8-*CH*₂), 1.70-1.77 (m, 2H, 11-*CH*₂), 1.85-1.94 (m, 2H, 14-*CH*₂), 2.75 (d, 6H, 1J = 4.9, N(*CH*₃)₂), 2.83 (q, 2H, 3J = 6.4 Hz, 1-*CH*₂), 2.97-3.06 (m, 2H, 15-*CH*₂), 3.09-3.24 (m, 12H, 3-, 4-, 6-, 7-, 9-, 10-*CH*₂), 3.26 (t, 2H, 3J = 7.4 Hz, 12-*CH*₂), 3.31 (t, 2H, 3J = 7.1 Hz, 13-*CH*₂), 7.23-7.99 (m, 20H, *CH*_{arom.}), 8.04 (t, 1H, 3J = 6.4 Hz, NsNH), 9.45 (bs, 1H, HN(*CH*₃)₂⁺) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 23.7 (C-14), 27.2 (C-5, C-8, C-11), 28.6 (C-2), 40.5 (C-1), 42.6 N(*CH*₃)₂, 45,2 (C-3, C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-12, C-13), 54.6 (C-15), 124.7, 129.9, 152.9, 154.9 (*C*_{arom.}) ppm.

HR-MS (ESI): C₄₇H₅₇N₁₁O₂₀S₅H⁺ [M+H]⁺, ber.: 1256.2446, gef.: 1256.2458.

***N*-ω,ω-Dimethyl-dipropylenamin-(L)-ornithin 70**

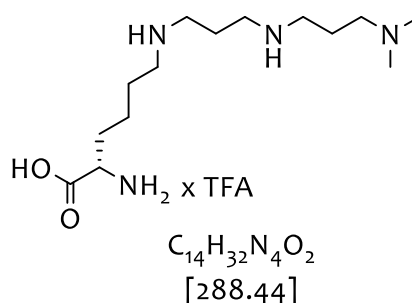


1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 1.61-1.89 (m, 4H, γ -CH₂, β -CH₂), 1.89-2.03 (m, 4H, HNCH₂CH₂CH₂NH), 2.79 (d, 6H, 1J = 3.2 Hz, N(CH₃)₂), 2.89-3.05 (m, 8H, δ -CH₂, CH₂NH), 3.06-3.17 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂) 3.95 (m, 1H, α -CH), 8.31 (bs, 3H, α -NH₃⁺), 8.68 (bs, 2H, 2°-NH₂⁺), 8.79 (bs, 2H, 2°-NH₂⁺), 9.78 (bs, 1H, 3°-HN⁺(CH₃)₂) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 21.2 (HNCH₂CH₂CH₂NH), 21.9 (C- γ), 22.8 (HNCH₂CH₂CH₂NH), 27.4 (C- β), 42.6 (N(CH₃)₂), 44.4 (CH₂NH), 46.7 (C- δ), 54.1 (CH₂N(CH₃)₂), 51.9 (C- α) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₃H₃₀N₄O₂H⁺[M+H]⁺, ber.: 275.2447, gef.: 275.2452.

***N*-ω,ω-Dimethyl-dipropylenamin-(L)-lysin 71**

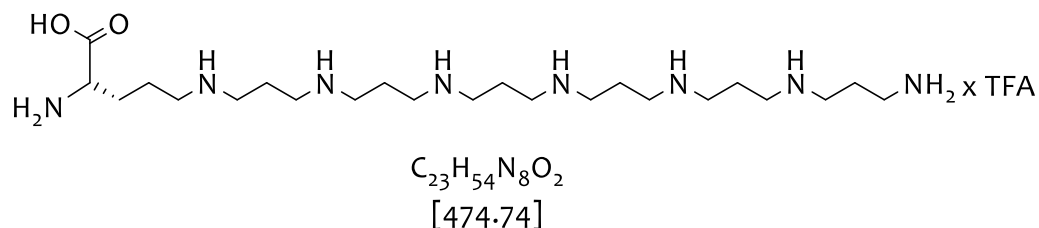


1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 1.32-1.42 (m, 1H, γ -CH₂), 1.42-1.52 (m, 1H, γ -CH₂), 1.55-1.66 (m, 2H, δ -CH₂), 1.68-1.87 (m, 2H, β -CH₂) 1.87-2.04 (m, 4H, HNCH₂CH₂CH₂NH) 2.80 (d, 1J = 4.4 Hz, 6H, N(CH₃)₂) 2.84-2.93 (m, 2H, ϵ -CH₂) 2.93-3.048 (m, 6H, CH₂NH), 3.06 - 3.18 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂), 3.98 (pq, 1H, 3J = 5.7 Hz, α -CH), 8.26 (bs, 3H, α -NH₃⁺), 8.65 (bs, 2H, 2°-NH₂⁺), 8.81 (bs, 2H, 2°-NH₂⁺), 9.78 (bs, 1H, 3°-HN⁺(CH₃)₂) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 21.8 (C- γ), 21.2, 22.9 (HNCH₂CH₂CH₂NH) 25.5 (C- δ), 29.9 (C- β), 42.6 (N(CH₃)₂), 44.3 (CH₂NHCH₂), 46.8 (C- ϵ), 54.0 (CH₂N(CH₃)₂), 52.2 (C- α) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{14}H_{32}N_4O_2H^+[M+H]^+$, ber.: 289.2603, gef.: 289.2609.

δ -Oligopropylenamin-(L)-ornithin 75

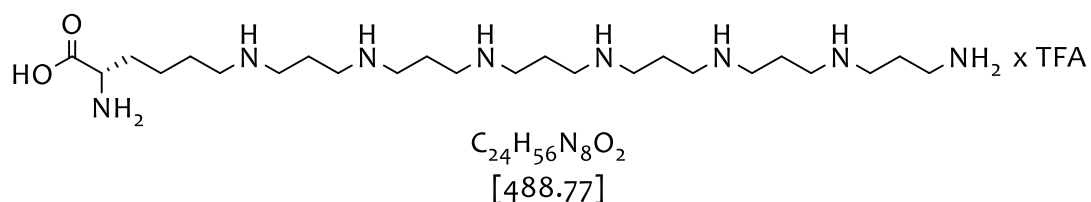


1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 1.62-1.81 (m, 2H, γ -CH₂), 1.82-2.01 (m, 14H, β -CH₂, HNCH₂CH₂CH₂NH), 2.83 (m, 2H, δ -CH₂), 2.92-3.09 (m, 24H, CH₂NHCH₂), 3.93-3.98 (m, 1H, α -CH), 7.85 (bs, 3H, 1°-NH₃⁺), 8.32 (bs, 3H, α -NH₃⁺), 8.59, 8.71, 8.79, 8.91 (bs, 8H, 2°-NH₂⁺) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 22.8 (C- γ), 23.3 (HNCH₂CH₂CH₂NH), 27.5 (C- β), 44.5 (CH₂NHCH₂), 36.6 (C- δ), 52.0 (C- α) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{23}H_{54}N_8O_2H^+[M+H]^+$, ber.: 475.4448, gef.: 475.4454.

ϵ -Oligopropylenamin-(L)-lysin 76

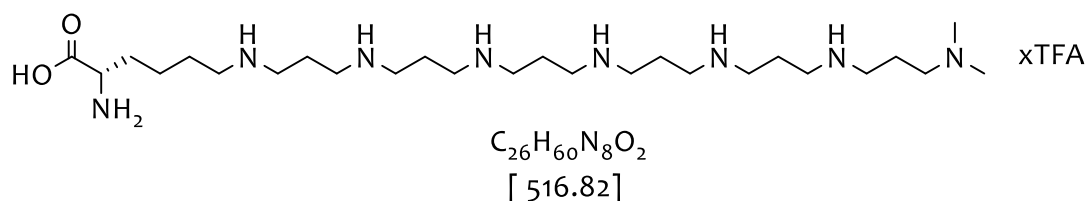


1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 1.31-1.51 (m, 2H, γ -CH₂), 1.55-1.67 (m, 2H, δ -CH₂), 1.71-2.03 (m, 14H, β -CH₂, HNCH₂CH₂CH₂NH), 2.85-2.90 (m, 2H, ϵ -CH₂), 2.92-3.09 (m, 24H, CH₂NHCH₂), 3.89-3.92 (m, 1H, α -CH), 7.87 (bs, 3H, 1°-NH₃⁺), 8.26 (bs, 3H, α -NH₃⁺), 8.69 (bs, 1H, 2°- ϵ -NH₂⁺), 8.83, 8.93 (bs, 6H, 2°-NH₂⁺) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 22.1 (C- γ), 22.6 (HNCH₂CH₂CH₂NH), 25.5 (C- δ), 29.8 (C- β), 44.4 (CH₂NHCH₂), 46.8 (C- ϵ), 51.8 (C- α) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{24}H_{56}N_8O_2H^+[M+H]^+$, ber.: 489.4605, gef.: 489.4611.

***N*-ω,ω-Dimethyl-oligoropylenamin-(L)-lysin 77**

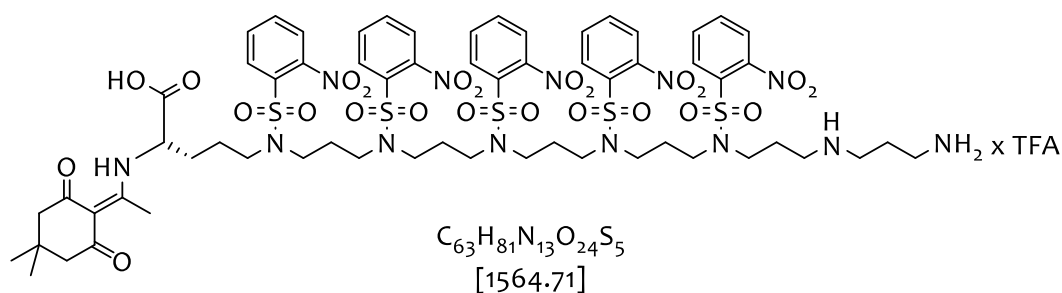


¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.32-1.41 (m, 1H, γ -CH₂), 1.42-1.50 (m, 1H, γ -CH₂), 1.54-1.66 (m, 2H, δ -CH₂), 1.55-1.65 (m, 2H, β -CH₂), 1.87-2.04 (m, 12H, HNCH₂CH₂CH₂NH), 2.77-2.81 (bs, 6H, N(CH₃)₂), 2.84-2.92 (m, 2H, ϵ -CH₂), 2.92-3.06 (m, 22H, CH₂NHCH₂). 3.08-3.16 (m, 2H, CH₂N(CH₃)₂), 3.89-3.92 (m, 1H, α -CH), 8.25 (bs, 3H, α -NH₃⁺), 8.69 (bs, 1H, 2°- ϵ -NH₂⁺), 8.78- 8.98 (bs, 10H, 2°-NH₂⁺), 9.45 (bs, 1H, HN(CH₃)₂⁺) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 22.9 (C- γ), 22.9 (HNCH₂CH₂CH₂NH) 25.4 (C- δ), 29.9 (C- β), 42.6 (N(CH₃)₂), 44.4 (CH₂NHCH₂), 46.8 (C- ϵ), 53.9 (CH₂N(CH₃)₂), 52.1 (C- α) ppm.

HR-MS (ESI): C₂₆H₆₀N₈O₂H⁺[M+H]⁺, ber.: 517.4917, gef.: 517.4921.

(*S*)-1-amino-28-((1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl)amino)-8,12,16,20,24-pentakis((2-nitrophenyl)sulfonyl)-4,8,12,16,20,24-hexaazanacosan-29-säure 73



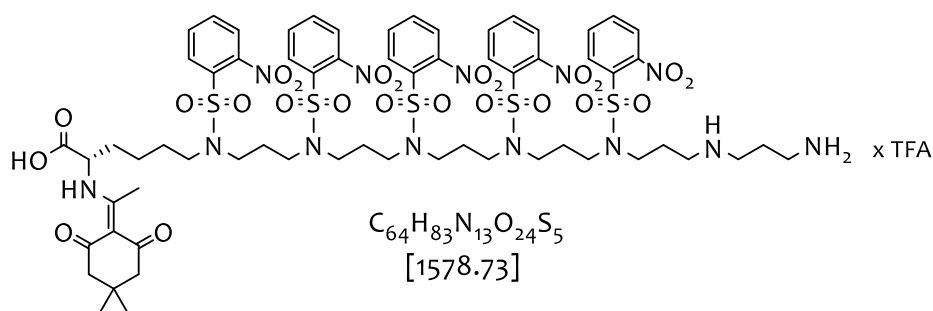
HPLC: t_R = 4.38 min (40% → 80% in 5 min, 0.45 mL/min), Reinheit: \geq 99%.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 0.94 (s, 6H, Dde-CH₃), 1.37-1.55 (m, 2H, γ -H₂) 1.56-1.79 (m, 10H, β -H₂, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.80-1.92 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.28 (s, 4H, Dde-CH₂), 2.40 (s, 3H, Dde=CH₃), 2.79-2.92 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.92-3.01 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.08-3.22 (m, 16H, NNsCH₂CH₂NNs), 3.22-3.29 (m, 2H, δ -H₂) 3.31-3.40 (m, 2H, NNsCH₂CH₂CH₂NH), 4.54 (pq, 1H, ³J = 6.6 Hz, α -H), 7.72-8,06 (m, 23H, CH_{arom.}, 1°-NH₃⁺), 8.52 (bs, 2H, 2°-NH₂⁺), 13.55 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, α -NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 17.6 (Dde=CH₃), 23.1 (C-γ), 23.5 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 24.5 (NNsCH₂CH₂CH₂NH), 26.4 (NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 27.5 (Dde-CH₃), 28.7 (C-β), 35.9 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 43.7 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.5 (NNsCH₂CHCH₂NNs), 44.6 (NNsCH₂CH₂CH₂NH), 46.4 (C-δ), 52.0 (Dde-CH₂), 55.3 (C-α), 123.9, 129.3, 132.0, 134.2, 134.6, (C_{arom.}), 199.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₆₃H₈₁N₁₃O₂₄S₅H⁺ [M+H]⁺, ber.:1564.4193, gef.:1564.4194.

(S)-1-Amino-29-((1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl)amino)-8,12,16,20,24-pentakis((2-nitrophenyl)sulfonyl)-4,8,12,16,20,24-hexaazatriacontan-30-säure 74



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 0.94 (s, 6H, Dde-CH₃), 1.06-1.33 (m, 2H, γ-H₂), 1.34-1.53 (m, 2H, δ-H₂), 1.56-1.79 (m, 10H, β-CH₂, 4x NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.79-1.96 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.29 (s, 4H, Dde-CH₂), 2.41 (s, 3H, Dde=CH₃), 2.81-2.92 (m, 4H, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.92-3.01 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.08-3.31 (m, 18H, ε-H₂, NNsCH₂CHCH₂NNs), 3.31-3.418 (m, 2H, NNsCH₂CH₂CH₂NH), 4.54 (pq, ³J = 7.0 Hz, 1H, α-H), 7.79-8.54 (m, 23H, CH_{arom.}, NH₃⁺), 8.54 (bs, 2H, NH₂⁺), 13.55 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, α-NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 17.6 (Dde=CH₃), 21.3 (C-γ), 24.3 (NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 26.3 (NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 27.1 (C-δ), 27.4 (Dde-CH₃), 31.3 (C-β), 35.9 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 43.8 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.1 (NNsCH₂CH₂CH₂NH), 44.5 (NNsCH₂CHCH₂NNs), 46.6 (C-ε), 51.6 (Dde-CH₂), 55.3 (C-α), 124.1, 129.4, 132.2, 130.8, 134.6, (C_{arom.}), 199.2 (Dde-CO) ppm.

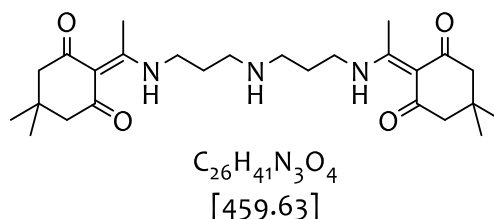
HR-MS (ESI): C₆₄H₈₃N₁₃O₂₄S₅H⁺ [M+H]⁺, ber.: 1578.4367, gef.: 1578.4350.

5.6 Synthesen in Lösungen

5.6.1 Herstellung der Grundbausteine

*N*¹,*N*⁹-bis-1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl-norspermidin

(*Bis*-Dde-Norspermidin) 2



0.97 mL Norspermidin (6.90 mmol, 1.00 eq) und 2.50 (13.9 mmol, 2.00 eq) 2-Acetyldimedon (Dde-OH) wurden in 50 mL EtOH gelöst und 2.5 h unter Rühren auf 80 °C erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 50 mL EtOAc aufgenommen und die organische Phase dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Durch säulenchromatographisches Aufreinigen und Trocknen am Hochvakuum wurden 1.91 g *Bis*-Dde-Norspermidin (4.16 mmol, 60%) als gelblicher kristalliner Feststoff erhalten.

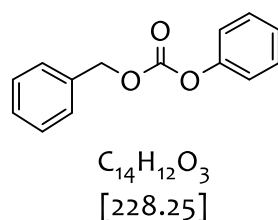
DC: $R_f = 0.33$ (DCM/MeOH 9:1).

¹H-NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$, 300 K) = 0.94 (s, 12 H, 4 x Dde- CH_3), 1.71 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2$), 2.26 (s, 4H, Dde- CH_2), 2.48 (s, 6H, 2 x Dde= CH_3), 2.58 (t, 4H, $^3J = 6.6$ Hz, CH_2NHCH_2), 3.48 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2NHDde), 13.24 (bs, 2H, DdeNH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$, 300 K) = 17.2 (Dde= CH_3), 27.8 (Dde- CH_3), 28.5 ($CH_2CH_2CH_2$), 29.7 ($C(CH_3)_2$), 40.7 (DdeNH CH_2), 46.0 (CH_2NHCH_2), 52.3 (Dde- CH_2), 172.7 (Dde-Cq), 196.3 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{26}H_{41}N_3O_4H^+$ [M+H]⁺, ber.: 460.3175, gef.: 460.3182.

Phenylbenzylkohlen säure ester (PBK-Ester) 21



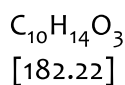
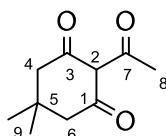
Die Lösung aus 10.0 g (106 mmol, 1.00 eq) Phenol und 50 mL 10%iger Natronlauge wurde unter Rühren auf 0 °C abgekühlt. In diese Lösung wurden innerhalb 30 min bei 0 °C 16 mL (111 mmol 1.04 eq) Benzylchlorformiat zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT erwärmt und weitere 12 h gerührt. Anschließend wurde die ölige Phase abgetrennt, die wässrige Phase dreimal mit jeweils 50 mL Ether extrahiert. Die Etherauszüge wurden mit dem Öl vereinigt und zur Zerstörung noch vorhandenen Carbobenzoxychlorids mit Pyridin gewaschen. Dann wurde die organische Phase mit 2 M Salzsäure angesäuert sowie mehrfach mit Wasser gewaschen. Von der mit Natriumsulfat getrockneten Etherlösung wurde zunächst der Ether und anschließend der Phenylbenzylkohlen säureester im Ölpumpenvakuum destilliert (Sdp._{0.1} 127-131 °C). Es konnten 16.8 g (73.7 mmol, 69%) des Esters **21** als farblose Flüssigkeit isoliert werden.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = 5.28 (s, 2H, CH₂Ph), 7.24-7.31 (m, 3H, CH_{arom}), 7.40-7.46 (m, 8H, CH_{arom}.) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = 70.6 (CH₂Ph), 121.0, 126.0, 128.5, 128.7, 128.8, 129.5, 134.8, 151.2, 153.7 (C_{arom}.) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₄H₁₂O₃H⁺ [M+H]⁺, ber.: 229.0865, gef.: 229.0872.

2-Acetyl-5,5-dimethyl-cyclohexan-1,3-dion (Dde-OH)



Zur Herstellung der Polyphosphorsäure wurden unter Rühren 70.0 g Phosphorpentoxid zur 60 mL Phosphorsäure (85%) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf 100 °C erhitzt. Zur so erhaltenen Polyphosphorsäure wurden 14.0 g (100 mmol) Dimedon sowie 13.2 mL (230 mmol, 2.30 eq) Essigsäure beigefügt. Die Reaktionsmischung wurde 6 h bei 100 °C gerührt und weitere 12 h stehen gelassen. Zur Aufarbeitung wurde langsam mit Wasser hydrolysiert (Überhitzungsgefahr!) und fünfmal mit jeweils 50 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend eingengt und säulenchromatographisch gereinigt

(Pentan/Ethylacetat 10:1). Es wurden 11.7 g (65.0 mmol, 65%) des Produktes als gelber kristalliner Feststoff erhalten.

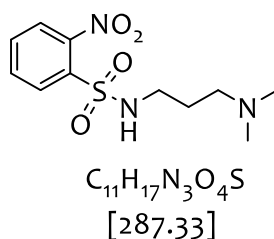
DC: $R_f = 0.3$ (n-Hexan/Ethylacetat 5:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 300 K) $\delta = 1.07$ (s, 6H, 9- CH_3), 1.59 (s, 1H, 2-H), 2.36 (s, 2H, 4- H_2), 2.53 (s, 2H, 6- H_2), 2.60 (s, 3H, 8- CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 300 K) $\delta = 28.1$ (2 x C-9), 28.4 (C-8), 30.5 (C-5), 46.7 (C-6), 52.4 (C-4), 112.4 (C-2), 195.2 (C-1), 197.6 (C-3), 202.3 (C-7) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{H}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 183.1016, gef.: 183.1015.

N*-(3-Dimethylaminopropyl)-2-nitrobenzolsulfonamid **28*



Zu einer Lösung von 3.15 mL (25.0 mmol, 1.00 eq) *N,N*-Dimethyl-1,3-diaminopropan sowie 3.40 mL (25.0 mmol, 1.00 eq) Triethylamin in 50 mL Dichlormethan wurden 2.80 g (12.5 mmol, 0.05 eq) 4-Nitrobenzolsulfonylchlorid zugefügt. Nachdem die Mischung 24 h bei RT gerührt wurde, wurde diese mit 30 mL halbgesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Anschluss dazu am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde anschließend einer säulenchromatographischen Aufreinigung (Chloroform/Methanol 5:1) unterworfen. Nach dem Trocknen im Ölpumpenvakuum wurden 4.02 g (14.0 mmol, 56%) des geschützten Triamins **28** als gelber Feststoff erhalten.

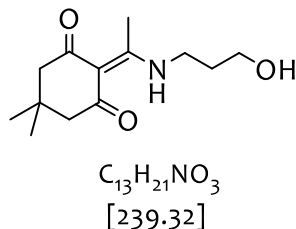
DC: $R_f = 0.23$ (Chloroform/Methanol 5:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 1.62$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.16 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.33 (t, $^3J_{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2}$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2 = 5.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.11 (t, $^3J_{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2}$, $\text{CH}_2\text{NHNS} = 5.9$ Hz, 2H, CH_2NHNS), 7.60 (bs, 1H, NHNS), 7.61-7.68 (m, 2H, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 7.72-7.77 (m, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 8.01-8.05 (m, 1H, $\text{C}_{\text{arom.}}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 25.2$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 44.5 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 46.3 (CH_2NHNS), 58.9 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 124.6, 130.2, 132.6, 135.1 ($\text{C}_{\text{arom.}}$) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{11}H_{17}O_4N_3SH^+ [M+H]^+$, ber.: 288.1018, gef.: 288.1006.

2-(1-((3-hydroxypropyl)amino)ethyliden)-5,5-dimethylcyclohexan-1,3-dion 38



In 50 mL Ethanol wurden 0.50 g (6.7 mmol, 1.00 eq) 3-Aminopropanol vorgelegt. Dazu wurden 1.22 g (6.7 mmol, 1.00 eq) Dde-OH **6** beigefügt und 4 h refluxiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Pentan/Ethylacetat 2:1 → 1:4, Ethylacetat pur). Es wurden 1.60 g (1.6 mmol, 98%) des Dde-geschützten Aminoalkohols **38** als gelber kristalliner Feststoff isoliert.

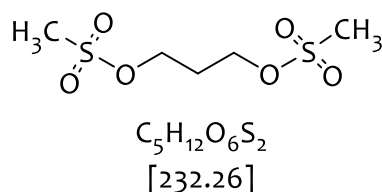
DC: $R_f = 0.42$ EtOAc

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 0.94$ (s, 6H, 2 x Dde-CH₃), 1.72 (qn, $^3J = 6.6$ Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.26 (s, 4H, Dde-CH₂), 2.48 (s, 3H, Dde=CH₃), 3.48 (m, 4H, CH₂CH₂OH, NHDdeCH₂), 4.63 (bs, 1H, OH), 13.25 (NHDde) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 17.0$ (Dde=CH₃), 27.6 (Dde-CH₃), 31.4 (CH₂CH₂CH₂), 39.3 (CH₂NHDde), 57.3 (CH₂CH₂OH), 169.1 (Dde-Cq), 196.9 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{13}H_{21}O_3NH^+ [M+H]^+$, ber.: 240.1592, gef.: 240.1594.

1,3-Propandiyl-dimethansulfonat 32



In 2.0 mL eisgekühltes Pyridin mit 1.0 mL 1,3-Propandiol (14.45 mmol, 1.00 eq) wurden 3.14 mL Methansulfonsäurechlorid (40.47 mmol, 2.80 eq) langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 0° C rühren gelassen. Anschließend wurde diese mit einer gesättigten wässrigen Natriumchlorid-Lösung verdünnt und mit EtOAc mehrfach extrahiert.

Danach wurden die gesammelten organischen Phasen erneut mit der gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und im Anschluss dazu über Mg_2SO_4 getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde zweimal mit DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Es wurden 2.53 g (10.84 mmol, 75%) als gelbliches Öl erhalten.

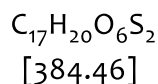
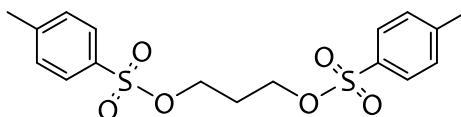
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 1.85$ (qn, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.19 (s, 6H, Mesylat- CH_3), 4.28 (t, 4H, $^3J = 6.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 27.4$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 37.5 (Mesylat- CH_3), 68.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_6\text{S}_2\text{H}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 233.0154, gef.: 233.0158.

Brechungsindex: 1.468

1,3-Bis(tosyloxy)propan 33



In 1.5 mL Pyridin wurden 0.5 mL 1,3-Propandiol (6.90 mmol, 1.00 eq) vorgelegt. Dazu wurden 3.2 g Methansulfonsäurechlorid (16.9 mmol, 2.80 eq) gelöst in 6.0 mL Pyridin bei 0°C langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 4h bei 0°C gerührt. Der gebildete weiße Niederschlag wurde abfiltriert und mit 1 N HCl- sowie gesättigter NaHCO_3 Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Das Produkt wurde aus Methanol umkristallisiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt *in vacuo* getrocknet. Es wurden 2.20 g (5.72 mmol, 83%) des Produktes als kristalliner weißer Feststoff erhalten.

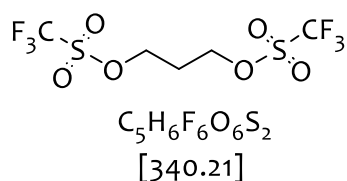
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 1.91$ (qn, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.42 (s, 6H, Tosylat- CH_3), 4.00 (t, 4H, $^3J = 6.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 7.47 (d, 2H, $^3J = 8.2$ Hz, $\text{C}_{arom.}$), 7.73 (d, 2H, $^3J = 8.5$ Hz, $\text{C}_{arom.}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 21.3$ (Tosylat- CH_3), 27.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 66.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 125.4 (Cq), 6, 127.5, 127.9, 132.1 145.00 ($\text{C}_{arom.}$) ppm.

Schmelzpunkt: $91\text{-}92^\circ\text{C}$.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 407.0599, gef.: 407.0603.

1,3-Bis(trifluoromethansulfoxy)propan 34



In 3.0 mL DCM_{abs.}, wo zuvor 0.86 g (3 mmol, 2.00 eq) Trifluormethansulfonsäureanhydrid gelöst waren, wurde eine Mischung aus 0.11 g des 1,3-Propandiols (0.15 mmol, 1.00 eq) und 0.24 g Pyridin (3 mmol, 2.00 eq) und 3.0 mL DCM zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde mehrere Stunden bei RT rühren gelassen. Anschließend wurde diese mit einer gesättigten wässrigen Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und mit EtOAc extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden erneut mit der gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Mg₂SO₄ getrocknet und eingengt. Nach dem Trocknen des Produktes *in vacuo* konnten 0.65 g (1.92 mmol, 64%) des Produktes als rötliche Flüssigkeit erhalten werden.

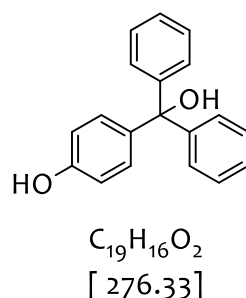
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = 2.37 (qn, 2H, ³J = 5.7 Hz, CH₂CH₂CH₂), 4.68 (t, 4H, ³J = 5.7 Hz, CH₂CH₂CH₂) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = 29.3 (CH₂CH₂CH₂), 71.3 (CH₂CH₂CH₂), 118.5 (q, ¹J_{C-F} = 313 Hz) ppm.

¹F-NMR (282.40 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = -75.14 (SO₂CF₃) ppm.

HR-MS (ESI): C₅H₆F₆O₆S₂H⁺ [M+H]⁺, ber.: 340.9588, gef.: 340.9592.

4-(Hydroxydiphenylmethyl)phenol 35



13.44 g AlCl₃ (0.10 mol, 1.00 eq) wurden in 30 mL CS₂ vorgelegt. Hinzu wurden unter ständigem Rühren 19 mL (0.10 mol, 1.00 eq) des α,α -Diphenyldichlormethan verdünnt mit 10 mL CS₂, zugetropft. Nachdem die Reaktionslösung rot geworden war, wurden langsam 9.47 g (0.10 mol, 1.00 eq) Phenol ebenfalls in CS₂ gelöst, zugegeben. Die Suspension wurde 3 h bei 50°C refluxiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 300 mL Eiswasser

gequencht und mit 200 mL Et₂O extrahiert. Die gesammelten, organischen Phasen wurden eingengt. Der im Kolben zurückgebliebene Rückstand wurde in 300 mL 1 N-wässrigen KOH-Lösung aufgenommen. Das Produkt wurde durch langsame Zugabe von KHCO₃ gefolgt von konzentrierter Salzsäure im Eisbad gefällt. Das Produkt wurde mit Et₂O extrahiert und die gesammelten, organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Trocknen des Rohproduktes *in vacuo* wurde dieses aus Benzol umkristallisiert. Es wurden 19.9 g (0.07 mol, 73%) des Produktes als gelber kristalliner Feststoff erhalten.

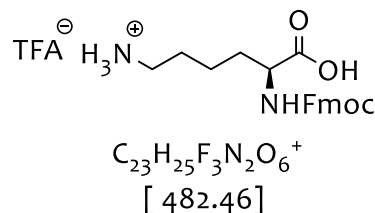
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = 6.24 (s, 1H, PhOH), 6.67 (d, ³J_{H3-H2} = 8.6 Hz, 2H, Ph-3-CH), 6.96 (d, ³J_{H2-H3} = 8.6 Hz, 2H, Ph-2-CH), 7.19-7.31 (m, 10H, C_{arom.}), 9.34 (s, C_q-OH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = 127.8, 128.1 (C_{arom.}), 146.1 (C_q) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₉H₁₅O₂Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 299.1044, gef.: 299.1043.

5.6.2 Synthesen der Lysin-Derivate

N-α-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-lysin·TFA (Fmoc-L-Lys-OH)



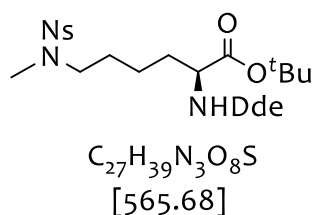
5.00 g (10.7 mmol, 1.00 eq) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH wurden in 50 mL Dichlormethan vorgelegt. Dazu wurden 10 mL Trifluoressigsäure zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt und 3 h gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingengt und fünfmal mit jeweils 30 mL Dichlormethan coevaporiert. Der Rückstand wurde zweimal mit Ether gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Es wurden 5.21 g (10.7 mmol, quant.) des TFA-Salzes **1** als farbloser, stark hygroskopischer Feststoff erhalten, der anschließend sofort weiter umgesetzt wurde.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.38-1.40 (m, 2H, γ-CH₂), 1.55-1.62 (m, 2H, δ-CH₂), 1.62-1.74 (m, 2H, β-CH₂), 2.79-2.81 (m, 2H, ε-CH₂), 3.94-3.99 (m, 1H, α-CH), 4.24-4.33 (m, 3H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 7.33 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom.}), 7.42 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom.}) 7.63 (d, ³J_{α-NH, α-H} = 8.0 Hz, 1H, α-NH), 7.72-7.75 (m, 2H, Fmoc-CH_{arom.}), 7.88 (d, ³J = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH_{arom.}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 22.7$ (C- γ), 26.7 (C- δ), 30.3 (C- β), 46.8 (Fmoc-CH), 53.8 (C- ϵ), 56.0 (C- α), 65.6 (Fmoc- CH_2), 120.2, 125.4, 127.2, 127.8, 140.9, 143.9 (C_{arom.}), 156.4 (Fmoc-CO), 174.7 (COOH) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{H}^+$ [M+H]⁺, ber.: 369.1806, gef.: 369.1811.

N^2 -(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylen)ethyl)- N^6 -methyl- N^6 -((2-nitrophenyl)sulfonyl)-L-lysin *tert*-butyl ester **7**



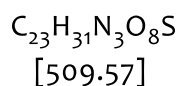
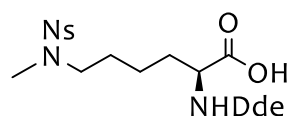
1.22 g (2.21 mmol, 1.00 eq) des geschützten Lysins **26** wurden in 30 mL Acetonitril vorgelegt. Hinzu wurden 1.38 g K_2CO_3 (10.0 mmol, 4.50 eq) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt, woraufhin 169 μL (2.70 mmol, 1.20 eq) MeI sowie eine Spatelspitze von TBAI zugegeben wurde. Nach etwa 12 h Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung mit MeOH gequenchet. Anschließend wurde die Reaktionslösung eingengt und der im Kolben verbliebene Rückstand mit Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde im Anschluss dazu mit Ethylacetat mehrfach extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Mg_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Nach dem wiederholten Coevaporieren mit DCM wurden 0.59 g (1.04 mmol, 85%) des monomethylierten Lysins **7** erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 0.95$ (s, 6H, 2 x Dde- CH_3), 1.21-1.36 (m, 2H, γ - CH_2), 1.44 (s, 9H, $^t\text{Bu-CH}_3$), 1.51-1.60 (m, 2H, δ - CH_2), 1.48-1.85 (m, 2H, β - CH_2), 2.30 (bs, 4H, 2 x Dde- CH_2), 2.43 (s, 3H, Dde- CH_3), 2.81 (s, 3H, N(CH_3)), 3.17 (t, $^3J_{\epsilon\text{-H}_2, \delta\text{-H}_2} = 7.1$ Hz, 2H, ϵ - CH_2), 4.24 (q, $^3J_{\alpha\text{-H}_2, \beta\text{-H}_2} = 7.4$ Hz, 1H, α -CH), 7.81-7.91 (m, 2H, $\text{CH}_{arom.}$), 7.96-7.98 (m, 2H, $\text{CH}_{arom.}$), 13.57 (d, $^3J_{\alpha\text{-NH}, \alpha\text{-H}} = 7.4$ Hz, 1H, α -NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 18.0$ (Dde= CH_3), 21.6 (C- γ), 26.8 (C- δ), 27.8 ($^t\text{Bu-CH}_3$), 28.2 (Dde- CH_3), 30.0 (Dde- C_q), 32.0 (C- β), 34.4 N(CH_3), 49.5 (C- ϵ), 56.2 (C- α), 52.8 (Dde- CH_2), 83.2 ($^t\text{Bu-C}_q$), 108.2 (Dde- C_q), 124.7, 130.3, 132.9, 135.0 (C_{arom.}), 169.2 (Dde- C_q), 173.2 (COO ^tBu), 196.6 (Dde-CO), 199.2 (Dde-CO) ppm.

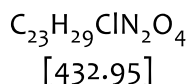
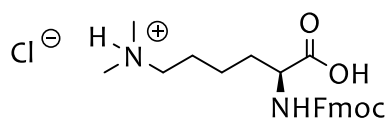
HR-MS (ESI): $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_1\text{Na}^+$ [M+Na]⁺, ber.: 588.2347, gef.: 588.2350.

N*- α -[1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl]-*N*- ϵ -(methyl)-*N*- ϵ -(2-nitrobenzolsulfonyl)-L-lysine Dde-L-Lys(MeNs)-OH **8*



226.3 mg (0.40 mmol, 1.00 eq) **9** wurden in 10 mL Dichlormethan vorgelegt. Diese Lösung wurde mit 1.23 mL (16.0 mmol, 40.0 eq) Trifluoressigsäure sowie 480 μ L (3.00 mmol, 7.50 eq) Triethylsilan versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch eingengt, mit 5.6 mL (32.0 mmol, 80.0 eq) DIPEA versetzt und mehrfach mit Dichlormethan coevaporiert. Das Produkt **8** wurde als hochviskoser, gelber Rückstand erhalten und direkt weiter umgesetzt.

***N*- α -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*N*- ϵ -dimethyl-L-lysine-hydrochlorid
Fmoc-L-Lys(Me₂)-OH **48****



In 40 mL Dioxan wurden 5.00 g (10.4 mmol, 1.00 eq) Fmoc-L-Lys-OH·TFA gelöst. Nachdem das Edukt vollständig gelöst war, wurden 4.2 mL (51.8 mmol, 5.00 eq) 37%iger Formaldehyd-Lösung sowie 1.8 mL Essigsäure zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden portionsweise 3.52 g (93.6 mmol, 9.00 eq) Natriumborhydrid zugegeben. Durch die Zugabe von Essigsäure wurde der pH-Wert der Reaktion durchgehend zwischen 3-6 gehalten. Nachdem die Hälfte des Natriumborhydrids zugegeben war, wurden erneut 4.2 mL 37%ige Formaldehyd-Lösung (51.75 mmol, 5.00 eq) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend auf RT erwärmt und 12 h rühren gelassen. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch mit 30 mL Wasser verdünnt und angesäuert (pH~6). Nach Entfernen der organischen Lösungsmittel wurde der Rückstand achtmal mit 50 mL Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Es wurde jeweils dreimal mit 6 M Salzsäure, Wasser und Chloroform coevaporiert. Der Rückstand wurde anschließend mehrfach mit Ether behandelt.

Nach dem Trocknen *in vacuo* konnten 3.80 g (8.8 mmol, 85%) des Dimethyllysins Hydrochlorid **48** als farbloses Pulver erhalten werden.

DC: $R_f = 0.35$ (Methanol/Wasser 95:5).

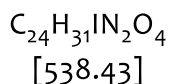
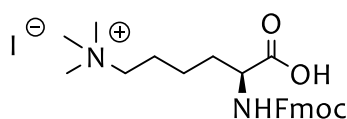
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 1.32\text{-}1.48$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 1.71-1.75 (m, 4H, $\delta\text{-CH}_2$, $\beta\text{-CH}_2$), 2.28 (s, 3H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.96-3.01 (m, 2H, $\varepsilon\text{-CH}_2$), 3.93-3.97 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 4.24-4.29 (m, 3H, Fmoc- CH , Fmoc- CH_2), 7.33 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.42 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.66-7.74 (m, 3H, $\alpha\text{-NH}$, Fmoc- CH), 7.89 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc- CH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 22.7$ (C- γ), 23.2 (C- δ), 30.3 (C- β), 41.8 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 46.8 (Fmoc- CH), 53.8 (C- ε), 56.0 (C- α), 65.6 (Fmoc- CH_2), 120.2, 125.4, 127.2, 127.8, 140.7, 143.9 (C- arom.), 156.4 (Fmoc-CO), 173.7 (COOH) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{H}^+$ [M+H] $^+$, ber.: 397.2127, gef.:397.2125.

***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*N*- ε -trimethyl-L-lysiniiumiodid**

Fmoc-L-Lys(Me₃)-OH **49**



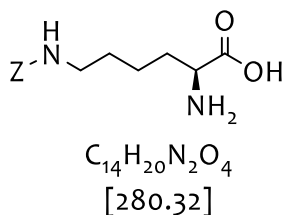
800 mg (1.85 mmol, 1.00 eq) **48** wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 325 μL (1.85 mmol, 1.00 eq) DIPEA und 1150 μL (18.5 mmol, 10.0 eq) Methyljodid wurde das Reaktionsgemisch 16 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurden 5.0 mL Methanol zugegeben und 3 h gerührt. Die Lösung wurde eingeeengt und mehrfach mit Dichlormethan und Diethylether coevaporiert. Nach dem Trocknen *in vacuo* wurden 996.1 mg (1.85 mmol, quant.) Fmoc-L-Lys(Me₃)-OH (**49**) als farbloser, stark hygroskopischer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) $\delta = 1.26\text{-}1.38$ (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 1.48-1.80 (m, 4H, $\beta\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$), 3.03 (s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.22-3.30 (m, 2H, $\varepsilon\text{-CH}_2$), 3.88-4.00 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 4.18-4.37 (m, 3H, Fmoc- CH , Fmoc- CH_2), 7.33 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.42 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.56-7.65 (m, 1H, $\alpha\text{-NH}$), 7.72 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.90 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc- $\text{CH}_{\text{arom.}}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 22.3$ (C- γ), 24.1 (C- δ), 31.3 (C- β), 46.7 (Fmoc-CH), 52.2 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 54.3 (C- α), 65.2 (C- ϵ), 65.9 (Fmoc- CH_2), 119.9, 125.2, 129.9, 127.6, 140.7, 143.9 ($C_{\text{arom.}}$), 156.4 (Fmoc-CO), 173.8 (COOH) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4\text{H}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 411.2284, gef.: 411.2286.

N*- ϵ -Benzyloxy-carbonyl-L-lysin (**H-Lys(Z)-OH**) **22*



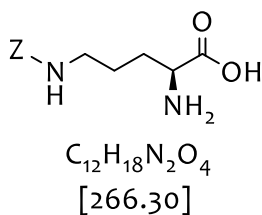
6.40 g (160 mmol, 2.05 eq) NaOH wurden in 200 mL 70 EtOH gelöst. Zu dieser Lösung wurden 14.2 g (78.0 mmol) L-Lysin·HCl gegeben. Es wurde unter Rückfluß erhitzt und über 30 min 18.7 g (82.0 mmol, 1.05 eq) PBK-Ester **21** zugetropft. Nach 3 h Reflux wurde auf RT abgekühlt und 12 h stehen gelassen. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Nach Trocknung über P_2O_5 wurden 11.4 g (41.0 mmol, 51%) des geschützten Lysins **22** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 1.29$ -1.41 (m, 4H, γ - CH_2 , δ - CH_2), 1.73-1.76 (m, 2H, β - CH_2), 2.99 (m, 2H, ϵ - CH_2), 3.91-3.93 (m, 1H, α -CH), 5.05 (s, 2H, CH_2Bn), 7.23-7.35 (m, 6H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$, α -NH), 8.28 (s, 3H, ϵ - NH_3^+) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 21.4$ (C- γ), 28.8 (C- δ), 29.8 (C- β), 39.5 (C- ϵ), 51.9 (C- α), 65.2 (Z- CH_2), 113.2, 117.2, 127.9, 128.3, 137.4 ($C_{\text{arom.}}$), 158.4 (Z-CO), 172.1 (COOH) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{H}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 281.1501, gef.: 281.1497.

***N*-ε-Benzylxy-carbonyl-L-ornithin (H-Orn(Z)-OH)**



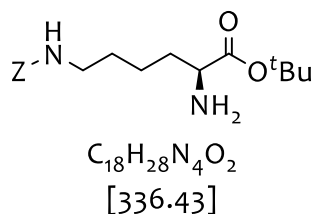
Synthese von H-Orn(Z)-OH erfolgte analog zur Herstellung des gleichartigen Lysin-Derivates **22** (s. oben). Bezogen auf einen 3.50 millionären Ansatz ergab sich eine Ausbeute von 54% (1.89 mmol).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.42-1.51 (m, 2H, γ-CH₂), 1.84-2.01 (m, 2H, β-CH₂), 2.92-3.05 (m, 2H, δ-CH₂), 3.12-3.19 (m, 1H, α-CH), 5.00 (s, 2H, CH₂Bn), 7.22-7.42 (m, 5H, CH_{arom.}) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 25.3 (C-γ), 29.8 (C-β), 40.1 (C-δ), 56.1 (C-α), 65.6 (Z-CH₂), 128.1, 128.6 (C_{arom.}), 158.4 (Z-CO), 172.1 (COOH) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₄H₂₀N₂O₄H⁺ [M+H]⁺, ber.: 281.1501, gef.: 281.1497.

N*-ε-Benzylxycarbonyl-L-lysin-*tert*-butylester (H-L-Lys(Z)-O^tBu) **23*



In 30 mL Dioxan wurden 2.00 g (7.14 mmol) H-L-Lys(Z)-OH **22** vorgelegt und bei 0 °C mit 2.0 mL konz. Schwefelsäure versetzt. Nach der Zugabe von 20 mL Isobuten wurde das Gefäß gut verschlossen und 4 d bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch auf 35 mL 2 M Natriumhydroxid gegossen und 30 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend dreimal mit 30 mL Ether extrahiert und die gesammelten, organischen Phasen mit 50 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden 2.12 g (6.25 mmol, 88%) des geschützten Lysin-Derivats **23** als gelbliche Flüssigkeit erhalten.

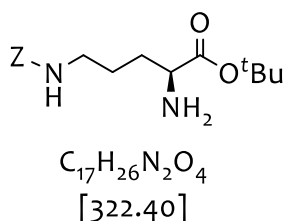
DC: R_f = 0.45 (*n*-Butanol/Wasser/Ethanol 5:1:4).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = 0.92-0.97 (m, 4H, γ -CH₂, δ -CH₂), 1.19-1.24 (bs, 11H, ^tBu-CH₃, β -CH₂), 2.89, (q, ³J _{ϵ -H₂, δ -H} = 6.5 Hz, 2H, ϵ -CH₂), 3.06, (t, ³J _{α -H, β -H₂} = 6.2 Hz, 1H, α -CH), 4.81, (s, 2H, Z-CH₂), 5.81, (bs, 1H, ϵ -NH), 7.05-7.09 (m, 5H, Z-CH_{arom.}) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = 23.1 (C- γ), 28.2 (^tBu-CH₃), 29.9 (C- δ), 34.7 (C- β), 39.9 (C- ϵ), 55.2 (C- α), 66.9 (Z-CH₂), 81.2 (^tBu-C_q), 128.1, 128.6, 136.8 (C_{arom.}), 156.6 (Z-CO), 176.2 (COO^tBu) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₈H₂₈O₄N₂H⁺ [M+H]⁺, ber.: 337.2127, gef.: 337.2123.

***N*- δ -Benzyloxycarbonyl-L-ornithin-*tert*-butylester (H-L-Orn-(Z)-O^tBu)**



Synthese von (H-L-Orn-(Z)-O^tBu) erfolgte analog zur Herstellung des gleichartigen Lysin-Derivates **23** (s. oben). Bezogen auf einen 3.54 millimolaren Ansatz ergab sich eine Ausbeute von 89% (2.49 mmol).

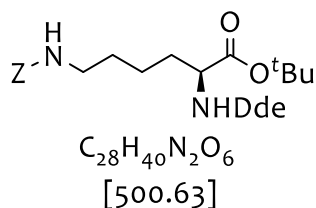
DC: R_f = 0.45 (*n*-Butanol/Wasser/Ethanol 5:1:4).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.39 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.43-1.52 (m, 2H, γ -CH₂), 1.83- 2.13 (bs, 2H, β -CH₂), 2.92-3.04 (m, 2H, δ -CH₂), 3.11-3.19 (m, 2H, α -H), 5.00, (s, 2H, Z-CH₂), 7.19-7.43 (m, 5H, Z-CH_{arom.}) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 18.2 (Dde-CH₃), 25.3 (C- γ), 28.1 (^tBu-CH₃), 29.9 (C- β), 39.9 (C- δ), 52.8 (Dde-CH₂), 55.8 (C- α), 65.8 (Z-CH₂), 81.2 (^tBu-C_q), 127.9, 128.7 (C_{arom.}), 156.6 (Z-CO), 169.4 (Dde-C_q), 174.2 (COO^tBu), 198.1 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₇H₂₆O₄N₂H⁺ [M+H]⁺, ber.: 323.1970, gef.: 323.1974.

N*- α -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl]-*N*- ϵ -benzyloxycarbonyl-L-lysine-*tert*-butylester (Dde-L-Lys(Z)-O^tBu) **24*



In 50 mL Ethanol wurden 1.50 g (4.46 mmol, 1.00 eq) H-L-Lys(Z)-O^tBu **23** vorgelegt. Dazu wurden 0.80 g (4.46 mmol, 1.00 eq) Dde-OH beigelegt. Die Reaktionsmischung wurde 24 h gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Pentan/Ethylacetat 2:1 → 1:4, Ethylacetat pur). Es wurden 2.15 g (4.29 mmol, 96%) des orthogonal geschützten Lysins **24** als gelbes Öl isoliert.

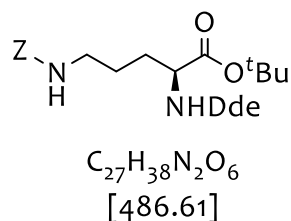
DC: $R_f = 0.30$, (Hexan/Ethylacetat 1:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K) $\delta = 1.01$ (s, 6H, 2 x Dde-CH₃), 1.45 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.50-1.57 (m, 4H, γ -CH₂, δ -CH₂), 1.88-1.92 (m, 2H, β -CH₂), 2.33 (bs, 2H, Dde-CH₂), 2.38 (bs, 2H, Dde-CH₂), 2.48 (s, 3H, Dde-CH₃), 3.18 (q, ³ $J_{\epsilon-H_2, \delta-H_2} = 6.5$ Hz, 2H, ϵ -CH₂), 4.23 (m, 1H, α -H), 5.01 (bs, 1H, ϵ -NH), 5.06 (s, 2H, Z-CH₂), 7.31-7.34 (m, 5H, Z-CH_{arom.}), 13.75 (d, ³ $J_{\alpha-NH, \alpha-H} = 7.2$ Hz, 1H, α -NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, 300 K) $\delta = 18.6$ (Dde-CH₃), 22.3 (C- γ), 28.2 (^tBu-CH₃), 28.2 (Dde-CH₃), 29.5 (C- δ), 30.2 (Dde-C_q), 32.1 (C- β), 40.4 (C- ϵ), 52.6 (Dde-CH₂), 53.7 (Dde-CH₂), 56.9 (C- α), 66.9 (Z-CH₂), 83.3 (^tBu-C_q), 108.4 (Dde-C_q), 128.2, 128.6, 136.7 (C_{arom.}), 156.5 (Z-CO), 169.4 (Dde-C_q), 173.2 (COO^tBu), 197.1 (Dde-CO), 199.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{28}H_{40}O_6N_2Na^+$ [M+Na]⁺, ber.: 523.2784, gef.: 523.2786.

***N*- α -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl]-*N*- δ -benzyloxycarbonyl-L-ornithin-*tert*-butylester (Dde-L-Orn(Z)-O^tBu)**



Synthese von (H-L-Orn-(Z)-O^tBu) erfolgte analog zur Herstellung des gleichartigen Lysin-Derivates **24** (s. oben). Bezogen auf einen 3.16 millimolaren Ansatz ergab sich eine Ausbeute von 69% (1.73 mmol).

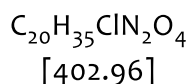
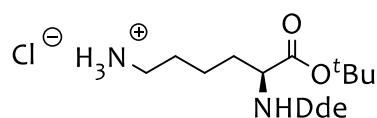
DC: $R_f = 0.3$, (Pentan/Ethylacetat 1:1)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) $\delta = 0.96$ (s, 6H, 2 x Dde-CH₃), 1.44 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.44-1.54 (m, 2H, γ -CH₂), 1.78-1.82 (m, 2H, β -CH₂), 2.31 (bs, 2H, Dde-CH₂), 2.44 (bs, 2H, Dde-CH₂), 2.97-3.06 (m, 2H, δ -CH₂), 4.23 (q, ³*J* = 6.1 Hz, 1H, α -H), 5.01 (s, 2H, Z-CH₂), 7.28-7.37 (m, 5H, Z-CH_{arom.}), 13.58 (d, ³*J* _{α -NH, α -H} = 7.4 Hz, 1H, α -NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) $\delta = 18.2$ (Dde-CH₃), 25.5 (C- γ), 28.01 (^tBu-CH₃), 28.4 (Dde-CH₃), 30.0 (C- β), 40.2 (C- δ), 52.8 (Dde-CH₂), 56.1 (C- α), 65.6 (Z-CH₂), 127.9, 128.6 (C_{arom.}), 156.5 (Z-CO), 169.4 (Dde-C_q), 173.2 (COO^tBu), 198.1 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₂₇H₃₈O₆N₂H⁺ [M+Na]⁺, ber.: 487.2808, gef.: 487.2802.

N*- α -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl]-L-lysin-*tert*-butylester-hydrochlorid (Dde-L-Lys-O^tBu) **25*



1.50 g (3.00 mmol, 1.00 eq) Dde-L-Lys(Z)-O^tBu **24** wurden in 30 mL Dioxan gelöst. Anschließend wurde diese Reaktionslösung mit 4.2 mL 1 M HCl angesäuert und mit 0.20 g (12 Gew.%) Pd/C versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 12 h unter einer H₂-Atmosphäre gerührt. Die so erhaltene Suspension wurde über *Celite* filtriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde das Produkt *in vacuo* getrocknet. Es konnten 1.13 g (2.80 mmol, 89%) des Hydrochlorids **25** als zähes gelbliches Öl isoliert werden.

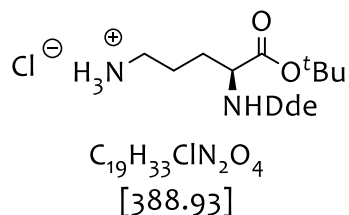
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) $\delta = 0.95$ (s, 6H, 2 x Dde-CH₃), 1.35-1.38 (m, 2H, γ -CH₂), 1.44 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.56-1.61 (m, 2H, δ -CH₂), 1.77-1.86 (m, 2H, β -CH₂), 2.29 (s, 4H, 2 x Dde-CH₂), 2.43 (s, 3H, Dde-CH₃), 2.75-2.78 (m, 2H, ϵ -CH₂), 4.56 (m, 1H, α -CH), 7.87 (bs, 3H, ϵ -NH₃⁺), 13.59 (d, ³*J* _{α -NH, α -H} = 7.5 Hz, 1H, α -NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) $\delta = 17.7$ (Dde-CH₃), 21.6 (C- γ), 26.5 (C- δ), 27.5 (^tBu-CH₃), 27.7 (Dde-CH₃), 29.6 (Dde-C_q), 31.7 (C- β), 38.2 (C- ϵ), 52.3, 52.4 (2 x Dde-CH₂), 55.7

(C- α), 82.2 (^tBu-C_q), 107.4 (Dde-C_q), 169.4 (Dde-C_q), 172.4 (COO^tBu), 196.7 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₂₀H₃₄O₄N₂H⁺ [M+H]⁺, ber.: 367.2597, gef.: 367.2592.

***N*- α -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl]-*N*- δ -(2-nitrobenzolsulfonyl)-L-ornithin-*tert*-butylester (Dde-L-Orn(Ns)-O^tBu)**



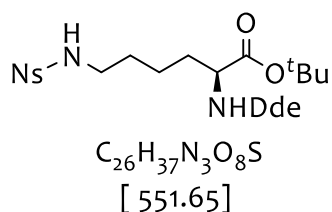
Synthese von (H-L-Orn-(Z)-O^tBu) erfolgte analog zur Herstellung des gleichartigen Lysin-Derivates **25** (s. oben). Bezogen auf einen 2.95 millimolaren Ansatz ergab sich eine Ausbeute von 82% (2.41 mmol).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 0.96 (s, 6H, 2 x Dde-CH₃), 1.45 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.48-1.69 (m, 2H, γ -CH₂), 1.79-1.93 (m, 2H, β -CH₂), 2.31 (s, 4H, 2 x Dde-CH₂), 2.45 (s, 3H, Dde-CH₃), 2.74-2.88 (m, 2H, δ -CH₂), 4.59-4.70 (m, 1H, α -CH), 7.87 (s, 3H, δ -NH₃⁺), 13.6 (d, ³J _{α -NH, α -H} = 7.5 Hz, 1H, α -NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 18.1 (Dde=CH₃), 25.4 (C- γ), 28.3 (Dde-CH₃), 28.9 (^tBu-CH₃), 29.7 (C- β), 38.3 (C- δ), 52.6 (2 x Dde-CH₂), 55.8 (C- α), 82.9 (^tBu-C_q), 107.4 (Dde-C_q), 172.8 (COO^tBu), 197.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₉H₃₂O₄N₂H⁺ [M+H]⁺, 353.2440, gef.: 353.2443.

N*- α -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl]-*N*- ϵ -(2-nitrobenzolsulfonyl)-L-lysin-*tert*-butylester (Dde-L-Lys(Ns)-O^tBu) **26*



1.10 g (2.73 mmol, 1.00 eq) Dde-L-Lys-O^tBu·HCl **25** wurden in 25 mL Dioxan gelöst, mit 5.0 mL 10%iger Kaliumcarbonat-Lösung versetzt und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung

wurden 0.64 g (2.87 mmol, 1.05 mmol) 4-Nitrobenzolsulfonylchlorid langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 12 h bei RT gerührt und anschließend auf 60 mL Methyl-*tert*-butylether gegossen. Danach wurde mit 60 mL Wasser sowie 60 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt von **26** benötigte keine weitere Reinigung und wurde direkt weiter umgesetzt. Es konnten 1.37 g (2.48 mmol 92%) des Produktes **26** als gelbes Öl isoliert werden.

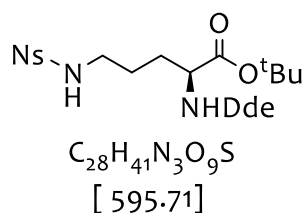
DC: $R_f = 0.52$ (Ethylacetat).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 300 K) $\delta = 1.02$ (s, 6H, 2 x Dde- CH_3), 1.38-1.48 (m, 2H, γ - CH_2), 1.45 (s, 9H, $^t\text{Bu-CH}_3$), 1.53-1.61 (m, 2H, δ - CH_2), 1.83-1.90 (m, 2H, β - CH_2), 2.39 (bs, 4H, 2 x Dde- CH_2), 2.48 (s, 3H, Dde- CH_3), 3.03 (q, $^3J_{\epsilon\text{-H}_2, \delta\text{-H}_2} = 6.8$ Hz, 2H, ϵ - CH_2), 4.24 (m, 1H, α -CH), 5.24 (t, $^3J_{\epsilon\text{-NH}, \epsilon\text{-H}_2} = 5.8$ Hz, 1H, ϵ -NH), 8.03-8.07 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 8.35-8.39 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 13.71 (d, $^3J_{\alpha\text{-NH}, \alpha\text{-H}} = 7.3$ Hz, 1H, α -NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 300 K) $\delta = 18.2$ (Dde- CH_3), 22.2 (C- γ), 27.9 ($^t\text{Bu-CH}_3$), 28.4 (Dde- CH_3), 29.2 (C- δ), 30.0 (Dde- C_q), 32.0 (C- β), 42.2 (C- ϵ), 52.2 (Dde- CH_2), 53.5 (Dde- CH_2), 56.7 (C- α), 83.2 ($^t\text{Bu-C}_q$), 108.2 (Dde- C_q), 125.4, 130.8, 132.7, 133.4, 133.6, 148.4 (C $_{\text{arom.}}$), 169.1 (Dde- C_q), 173.3 (COO ^tBu), 196.5 (Dde-CO), 199.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_8\text{Na}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 574.2198, gef.: 574.2194.

***N*- α -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylyden)ethyl]-*N*- δ -(2-nitrobenzolsulfonyl)-*L*-ornithin-*tert*-butylester (Dde-*L*-Orn(Ns)-*O* ^tBu)**



Synthese von (Dde-*L*-Orn-(Ns)-*O* ^tBu) erfolgte analog zur Herstellung des gleichartigen Lysin-Derivates **26** (s. oben). Bezogen auf einen 2.82 millimolaren Ansatz ergab sich eine Ausbeute von 89% (2.51 mmol).

DC: $R_f = 0.52$ (Ethylacetat pur).

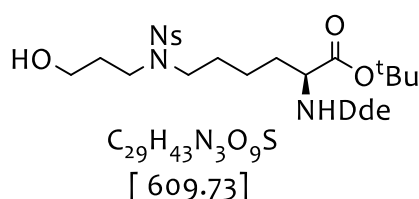
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 0.95$ (s, 6H, 2 x Dde- CH_3), 1.41 (s, 9H, $^t\text{Bu-CH}_3$), 1.45-1.56 (m, 2H, γ - CH_2), 1.77-1.79 (m, 2H, β - CH_2), 2.30 (bs, 4H, Dde- CH_2), 2.40 (bs,

3H, Dde=CH₃), 2.91-2.95 (m, 2H, δ-CH₂), 4.56 (pq, ³J_{α-H2, β-H2} = 7.5 Hz, 1H, α-CH), 7.83-7.86 (m, 2H, CH_{arom.}), 7.94-7.99 (m, 2H, CH_{arom.}), 8.16 (t, ³J_{δ-NH, δ-H2} = 5.8 Hz, 1H, δ-NH), 13.73 (d, ³J_{α-NH, α-H} = 7.6 Hz, 1H, α-NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 18.2 (Dde=CH₃), 25.3 (C-γ), 28.2 (Dde-CH₃), 28.9 (^tBu-CH₃), 29.8 (C-β), 42.6 (C-δ), 52.7 (Dde-CH₂), 56.1 (C-α), 83.6 (^tBu-C_q), 124.8, 129.7, 132.8, 134.4 (C_{arom.}), 169.1 (Dde-C_q), 173.1 (COO^tBu), 197.3 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₂₈H₄₁N₃O₉SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 596.2641, gef.: 596.2639.

N*-α-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylen)ethyl]-*N*-ε-[3-hydroxypropyl]-*N*-ε-(2-nitrobenzolsulfonyl)-*L*-lysin-*tert*-butylester **27*



Eine Lösung aus 1.30 g (2.36 mmol, 1.00 eq) Dde-*L*-Lys(Ns)-O^tBu **26** sowie 1.50 g Kaliumcarbonat (10.6 mmol, 4.50 eq) in 15 mal Dimethylformamid wurde mit 22.0 mg (0.06 mmol, 0.03 eq) Tetrabutylammoniumiodid versetzt. Dazu werden 271 µL (3.07 mmol, 1.30 eq) 3-Brompropanol zugefügt. Diese Reaktionsmischung wurde auf 60 °C erwärmt und weitere 8 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach wurde es auf 50 ml Wasser gegossen und zweimal mit jeweils 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend dreimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der vereinigten, organischen Phasen über Magnesiumsulfat wurde das Produkt am Rotationsverdampfer eingeeengt und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Ethylacetat pur → Ethylacetat/Methanol 4:1). Es wurden 0.95 g (1.56 mmol, 65%) des Produktes **27** als gelbliches Öl erhalten.

DC: R_f = 0.25 (Ethylacetat pur).

HPLC: t_R = 4.89 min (40% → 80% in 5 min, 0.45 mL/min), Reinheit: ≥ 97%.

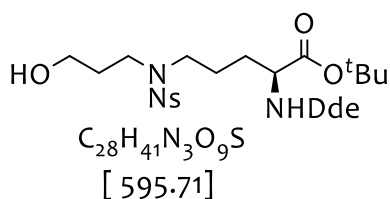
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K) δ = 0.95 (s, 6H, 2 x Dde-CH₃), 1.28-1.37 (m, 2H, γ-CH₂), 1.44 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.47-1.59 (m, 2H, δ-CH₂), 1.68-1.76 (m, 2H, β-CH₂), 1.75-1.84 (m, 2H, CH₂CH₂OH), 2.29 (bs, 4H, 2 x Dde-CH₂), 2.41 (s, 3H, Dde-CH₃), 3.24 (t, ³J_{εH2, δ-H2} = 7.2 Hz, 2H, ε-CH₂), 3.34 (t, ³J_{NCH2, CH2CH2OH} = 6.9 Hz, 2H, NCH₂), 3.59 (t, ³J_{CH2OH, CH2CH2OH}

= 5.9 Hz, 2H, CH_2OH), 4.18-4.25 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 7.52-7.57 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.61-7.68 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.89-7.94 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 13.62 (d, $^3J_{\alpha\text{-NH}, \alpha\text{-H}} = 7.5$ Hz, 1H, $\alpha\text{-NH}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 300 K) $\delta = 18.2$ (Dde- CH_3), 22.8 (C- γ), 28.3 ($^t\text{Bu-CH}_3$), 28.3 (C- δ), 28.6 (Dde- CH_3), 30.4 (Dde- C_q), 31.3 (C- β), 32.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 44.8 (NCH_2), 47.5 (C- ϵ), 52.4 (Dde- CH_2), 53.6 (Dde- CH_2), 56.8 (C- α), 59.6 (CH_2OH), 83.6 ($^t\text{Bu-C}_q$), 108.5 (Dde- C_q), 130.8, 132.1, 133.9, 134.0, 148.2 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 169.2 (Dde- C_q), 172.9 (COO^tBu), 197.1 (Dde-CO), 199.6 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_9\text{SH}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 610.2806, gef.: 610.2793.

***N*- α -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl]-*N*- δ -[3-hydroxypropyl]-*N*- δ -(2-nitrobenzolsulfonyl)-*L*-ornithin-*tert*-butylester**



Synthese dieses Ornithin-Bausteines erfolgte analog zur Herstellung des gleichartigen Lysin-Derivates **27** (s. oben). Bezogen auf einen 2.50 millimolaren Ansatz ergab sich eine Ausbeute von 69% (1.73 mmol).

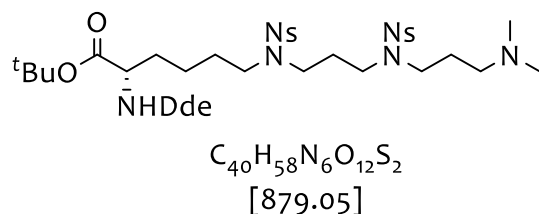
DC: $R_f = 0.25$ (Ethylacetat).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz, 300 K) $\delta = 0.95$ (s, 6H, 2 x Dde- CH_3), 1.42 (s, 9H, $^t\text{Bu-CH}_3$), 1.46-1.64 (m, 4H, $\gamma\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1.69-1.80 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 2.30 (bs, 4H, 2 x Dde- CH_2), 2.41 (s, 3H, Dde= CH_3), 3.27-3.36 (m, 4H, $\delta\text{-CH}_2$, NNsCH_2), 3.36-3.41 (m, 2H, CH_2OH), 4.54-4.57 (pq, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, $\alpha\text{-H}$), 7.79-7.90 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.93-7.97 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 7.98-8.03 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{arom.}}$), 13.57 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, $\alpha\text{-NH}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 300 K) $\delta = 17.5$ (Dde- CH_3), 23.2 (C- γ), 27.2 ($^t\text{Bu-CH}_3$), 28.6 (Dde- CH_3), 29.0 (C- β), 31.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 44.7 (C- δ), 46.7 (NNsCH_2), 52.1 (Dde- CH_2), 55.3 (C- α), 57.8 (CH_2OH), 83.6 ($^t\text{Bu-C}_q$), 108.5 (Dde- C_q), 124.1, 129.6, 132.3, 134.3 ($\text{C}_{\text{arom.}}$), 169.2 (Dde- C_q), 172.9 (COO^tBu), 197.1 (Dde-CO), 199.6 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_9\text{SH}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 596.2641, gef.: 596.2645.

(S)-6-[[3-[(3-Dimethylaminopropyl)-(2-nitrobenzolsulfonyl)-amino]-propyl]-2-nitrobenzolsulfonyl)-amino]-2-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden)-ethyl-amino]-hexansäure-*tert*-butylester **29**



2.51 g (9.59 mmol, 1.70 eq) PPh₃ und 1.9 mL (9.59 mmol, 1.70 eq) DIAD wurden in 80 mL THF_{abs.} bei 0 °C gerührt, bis das Betain entstanden war, was sich an der Trübung der Reaktionslösung erkennen ließ. Zu dieser Suspension wurden 2.43 g (8.46 mmol, 1.50 eq) *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-2-nitrobenzolsulfonamid **28** zugegeben und 20 min gerührt. Anschließend wurden 3.44 g (5.64 mmol) des Lysins **27**, gelöst in 10 mL abs. THF, zugetropft. Man ließ 3 d bei RT rühren und entfernte das Lösungsmittel *in vacuo*. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch gereinigt (CHCl₃/MeOH 5:1) und es konnten 4.60 g (5.23 mmol, 93%) der Verbindung **29** als gelbes Öl erhalten werden.

DC: $R_f = 0.41$, CHCl₃/MeOH (5:1).

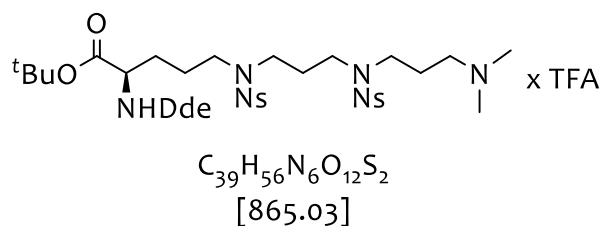
HPLC: $t_R = 6.33$ min (30% → 90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: $\geq 97\%$.

¹H-NMR (300 MHz, CHCl₃, 300 K) $\delta = 0.96$ (s, 6H, Dde-CH₃), 1.23-1.33 (m, 2H, γ -CH₂), 1.39 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.46-1.55 (m, 2H, δ -CH₂), 1.61-1.70 (m, 2H, CH₂CH₂N(CH₃)₂), 1.75-1.85 (m, 4H, N_sNCH₂CH₂CH₂NN_s, β -CH₂), 2.14 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.23 (m, CH₂N(CH₃)₂), 2.28 (s, 2H, Dde-CH₂), 2.34 (s, 2H, Dde-CH₂), 2.41 (s, 3H, Dde=CH₃), 3.18-3.29 (m, 8H, 3 x CH₂NN_s, ϵ -CH₂), 4.17 (pq, ³J = 6.8 Hz, 1H, α -CH), 7.53-7.57 (m, 2H, CH_{arom.}), 7.60-7.65 (m, 4H, CH_{arom.}), 7.89-7.95 (m, 2H, CH_{arom.}), 13.66 (d, ³J _{α -NH, α -H} = 7.5 Hz, 1H, α -NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CHCl₃, 300 K) $\delta = 18.2$ (Dde=CH₃), 22.2 (C- γ), 26.0 (CH₂CH₂N(CH₃)₂), 27.6 (C- δ), 27.9 (^tBu-CH₃), 28.2 (Dde-CH₃), 28.4 (Dde-CH₃), 30.0 (Dde-C α), 32.2 (C- β), 45.0 (CH₂NN_s), 45.1 (N(CH₃)₂), 45.3 (CH₂NN_s), 46.0 (CH₂NN_s), 47.4 (C- ϵ), 52.2 (Dde-CH₂), 53.6 (Dde-CH₂), 56.3 (C- α), 56.7 (CH₂N(CH₃)₂), 83.2 (^tBu-C α), 108.2 (Dde=C α), 124.1, 124.2, 130.6, 130.8, 131.8, 132.8, 132.9, 133.6, 147.9 (C_{arom.}), 169.1 (Dde=C α), 172.9 (COO^tBu), 196.8 (Dde-CO), 199.3 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₄₀H₅₈N₆O₁₂S₂H, [M+H]⁺ ber.: 879.3633, gef.: 879.3627.

***N*- α -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl]-*N*- ϵ -[3-hydroxypropyl]-*N*- δ -(2-nitrobenzolsulfonyl)-*L*-ornithin-*tert*-butylester**



Synthese dieses Ornithin-Bausteines erfolgte analog zur Herstellung des gleichartigen Lysin-Derivates **29** (s. oben). Bezogen auf einen 2.20 millimolaren Ansatz ergab sich eine Ausbeute von 69% (1.52 mmol).

DC: $R_f = 0.41$, $CHCl_3/MeOH$ (5:1).

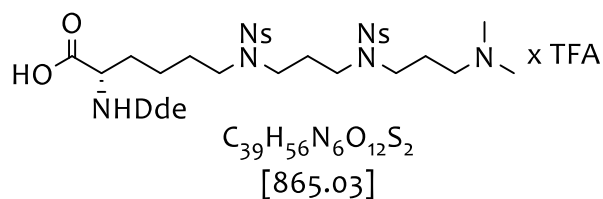
HPLC: $t_R = 5.96$ min (30% \rightarrow 90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: $\geq 97\%$.

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$, 300 K) $\delta = 0.94$ (s, 6H, Dde- CH_3), 1.41 (s, 9H, tBu - CH_3), 1.44-1.64 (m, 4H, γ - CH_2 , $CH_2CH_2N(CH_3)_2$), 1.67-1.77 (m, 4H, β - CH_2 , $NsNCH_2CH_2CH_2NNs$), 2.13 (bs, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.16-2.26 (m, 2H, $CH_2N(CH_3)_2$), 2.29 (s, 4H, Dde- CH_2), 2.41 (s, 3H, Dde= CH_3), 3.16-3.31 (m, 8H, 3 x CH_2NNs , δ - CH_2), 4.55 (pq, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, α -CH), 7.82-7.97 (m, 8H, $CH_{arom.}$), 13.55 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1H, α -NH) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$, 300 K) $\delta = 17.4$ (Dde= CH_3), 23.1 (C- γ), 25.2 ($CH_2CH_2N(CH_3)_2$), 26.5 ($NsNCH_2CH_2CH_2NNs$), 27.1 (tBu - CH_3), 27.6 (Dde- CH_3), 28.8 (C- β), 30.0 (Dde-Cq), 44.3 ($N(CH_3)_2$), 44.7 (C- δ), 46.4 (CH_2NNs), 52.1 (Dde- CH_2), 55.1 (C- α), 55.4 ($CH_2N(CH_3)_2$), 83.2 (tBu -Cq), 108.2 (Dde=Cq), 124.2, 129.5, 132.1, 134.4 ($C_{arom.}$), 169.1 (Dde=Cq), 172.9 (COO tBu), 198.8 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{39}H_{56}N_6O_{12}S_2H$, $[M+H]^+$ ber.: 865.3459, gef.: 865.3468.

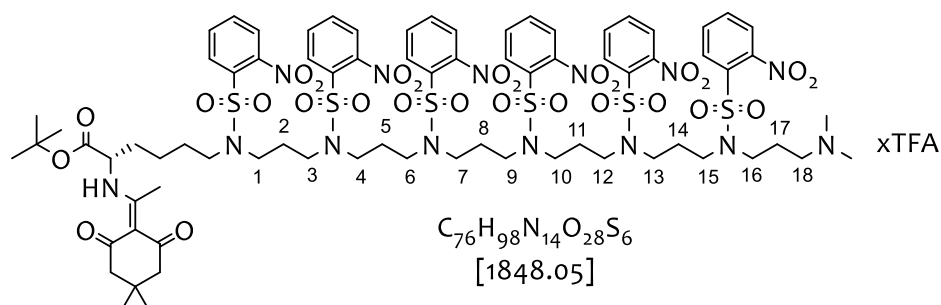
(*S*)-6-[[3-[(3-Dimethylaminopropyl)-(2-nitrobenzolsulfonyl)-amino]-propyl]-2-nitrobenzolsulfonyl]-amino]-2-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-ethyl-amino]-pentansäure **29a**



539 mg (0.61 mmol) **29** wurden in 6.0 mL DCM mit 1.9 mL (24.4 mmol, 40.0 eq) TFA und 0.72 mL (4.58 mmol, 7.50 eq) Et₃SiH versetzt und 12 h bei RT gerührt. Nach Einengen der Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer wurde dreimal mit DCM evaporiert und der Rückstand mit Et₂O behandelt. Es konnten 530 mg (0.61 mmol, quant.) der Aminosäure als hygroskopischer Feststoff erhalten werden, die sofortige Umsetzung verlangte.

HPLC: $t_R = 4.77$ min (30%→90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: $\geq 97\%$.

(S)-31-((1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl)amino)-2-methyl-6,10,14,18,22,26-hexakis((2-nitrophenyl)sulfonyl)-2,6,10,14,18,22,26-heptaazadotriacontan-butylester **60**



Synthese des oligoaminverlängerten Lysins **60** erfolgte analog zur Herstellung des gleichartigen Lysin-Derivates **29** ausgehend von dem Lysin-Aminopropanol **27** und dem Sulfonamid **59** (s. oben), allerdings verlief die Reaktion in absolutem DCM statt in THF. Nach beendeter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch eingengt und das Produkt in kaltem Et₂O gefällt. Der ausgefallene weiße Niederschlag wurde anschließend mit Wasser und Ether gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Das Produkt **60** benötigte keine weitere Reinigung und wurde direkt weiter umgesetzt. Bezogen auf einen 2.20 millimolaren Ansatz ergab sich eine Ausbeute von 72% (1.58 mmol).

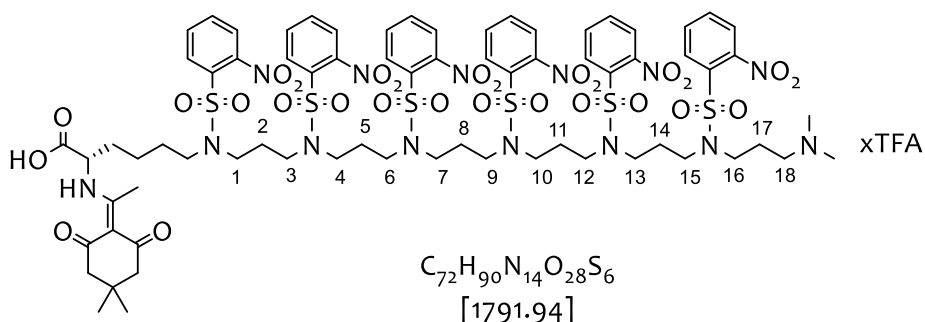
HPLC: $t_R = 7.58$ min (40%→90% in 8 min, 0.42 mL/min), Reinheit: $\geq 98\%$.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) $\delta = 0.94$ (s, 6H, Dde-CH₃), 1.10-1.27 (m, 2H, γ -CH₂), 1.40 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.40-1.53 (m, 2H, δ -CH₂), 1.59-1.70 (m, 8H, 2-, 5-, 8-, 11-CH₂), 1.71-1.81 (m, 4H, β -CH₂, 14-CH₂), 1.83-1.95 (m, 2H, 17-CH₂), 2.29 (bs, 6H, Dde-CH₂), 2.39 (s, 3H, Dde=CH₃), 2.76 (d, ¹J = 4.9 Hz, 6H, N(CH₃)₂), 2.97-3.06 (m, 2H, 18-CH₂), 3.10-3.23 (m, 18H, ϵ -CH₂, 3-, 4-, 6-, 7-, 9-, 10-, 12-, 13-), 3.26 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, 15-CH₂), 3.31 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, 16-CH₂), 4.47-4.55 (m, 1H, α -CH), 7.74-8.03 (m, 25H, CH_{arom.}), 9.49 (bs, 1H, HN(CH₃)₂⁺), 13.55 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, α -NH) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 17.3 (Dde=CH₃), 21.5 (C- γ), 22.8 (C-17), 26.3 (C-2, C-5, C-8, C-11, C-14), 26.9 (C- δ), 27.4 (Dde-CH₃), 31.2 (C- β), 41.9 (N(CH₃)₂), 44.4 (C-3, C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-12, C-13, C-15, C-16), 46.7 (C- ϵ), 52.0 (Dde-CH₂), 53.7 (C-18), 55.4 (C- α), 124.0, 129.3, 132.3, 134.4 (C_{arom.}), 199.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): C₇₆H₉₈N₁₄O₂₈S₆H⁺[M+H⁺], ber.: 1847.5062, gef.: 1847.5072.

(S)-31-((1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl)amino)-2-methyl-6,10,14,18,22,26-hexakis((2-nitrophenyl)sulfonyl)-2,6,10,14,18,22,26-heptaazodotriocontan-32-säure 61



240 mg (0.13 mmol) **60** wurden in 6.0 mL DCM mit 0.40 mL (5.20 mmol, 40.0 eq) TFA und 156 μL (0.98 mmol, 7.50 eq) Et₃SiH versetzt und 12 h bei RT gerührt. Nach Einengen der Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer wurde dreimal mit DCM evaporiert und der Rückstand mit Et₂O behandelt. Es konnten 235 mg (0.61 mmol, quant.) der Aminosäure als weißer hygroskopischer Feststoff erhalten werden, die sofortige Umsetzung verlangte.

HPLC: t_R = 6.38 min (40% \rightarrow 90% in 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit: \geq 98%.

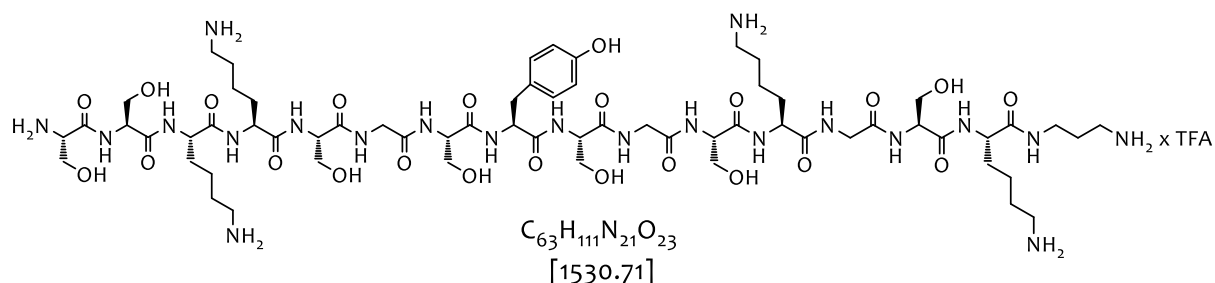
^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 0.95 (s, 6H, Dde-CH₃), 1.09-1.26 (m, 2H, γ -CH₂), 1.40-1.52 (m, 2H, δ -CH₂), 1.59-1.71 (m, 8H, 2-, 5-, 8-, 11-CH₂), 1.72-1.81 (m, 4H, β -CH₂, 14-CH₂), 1.83-1.95 (m, 2H, 17-CH₂), 2.28 (bs, 6H, Dde-CH₂), 2.39 (s, 3H, Dde=CH₃), 2.76 (d, 1J = 4.9 Hz, 6H, N(CH₃)₂), 2.97-3.07 (m, 2H, 18-CH₂), 3.10-3.23 (m, 18H, ϵ -CH₂, 3-, 4-, 6-, 7-, 9-, 10-, 12-, 13-), 3.26 (t, 3J = 7.4 Hz, 2H, 15-CH₂), 3.32 (t, 3J = 7.4 Hz, 2H, 16-CH₂), 4.47-4.55 (m, 1H, α -CH), 7.74-8.03 (m, 25H, CH_{arom.}), 9.49 (bs, 1H, HN(CH₃)₂⁺), 13.54 (d, 3J = 7.5 Hz, 1H, α -NH) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , 300 K) δ = 17.3 (Dde=CH₃), 21.4 (C- γ), 22.8 (C-17), 26.4 (C-2, C-5, C-8, C-11, C-14), 26.9 (C- δ), 27.4 (Dde-CH₃), 31.2 (C- β), 41.8 (N(CH₃)₂), 44.4 (C-3, C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-12, C-13, C-15, C-16), 46.6 (C- ϵ), 52.0 (Dde-CH₂), 53.7 (C-18), 54.8 (C- α), 124.0, 129.2, 132.3, 134.4, (C_{arom.}), 199.2 (Dde-CO) ppm.

HR-MS (ESI): $C_{72}H_{90}N_{14}O_{28}S_6H^+[M+H^+]$, ber.: 1791.4450, gef.: 1791.4446.

5.7 Synthese der Silaffin-1A₁-Derivate

Silaffin-1A₁-PDA **19**



Die Synthese von der C-terminal umgepolten Silaffin-1A₁-Sequenz ohne posttranslationale Modifikationen **19** wurde nach der allgemeinen Anleitung 5.2.1 durchgeführt. Das Rohpeptid wurde nach der Anleitung 5.2.18 abgespalten und gefällt. Nach der chromatographischen Aufreinigung konnten 67% (21.3 mg, 0.010 mmol) des Peptids **19** als gelbliches TFA-Salz erhalten werden.

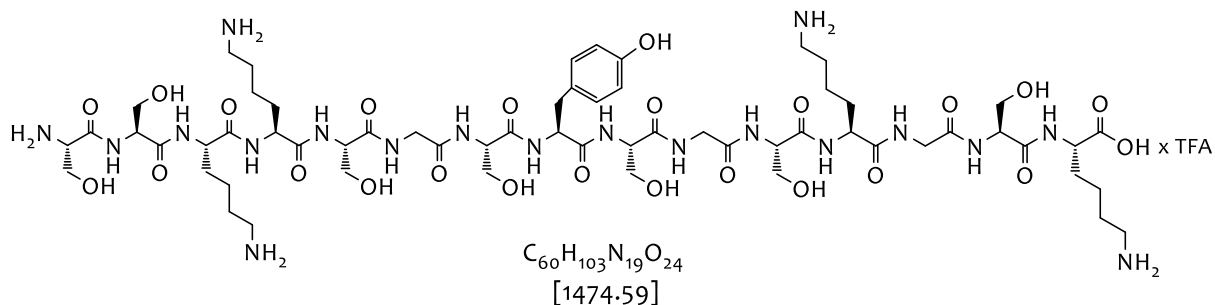
Experimenteller Teil

Tabelle 16: ^1H - und ^{13}C -NMR von Silaffin-1A₁-PDA 19 (600 MHz, 300 K, 50 mM KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Bestimmte Signale konnten aufgrund der Wasserunterdrückung nicht zugeordnet werden.

Aminosäure	NH / COR	α -CH	β -CH ₂	Andere
Ser ¹	-	4.31 – 4.42 m; 61.1	3.69 – 3.85 m	α -NH ₃ ⁺ 7.44 bs
Ser ²	8.72 d (6.6)	4.45 – 4.50 m; 61.1	3.80 – 3.85 m	
Lys ^{3,4}	8.37 – 8.42 m	4.22 – 4.31 m; 53.9	1.64 – 1.88 m; 30.1	γ -CH ₂ 1.27 – 1.46 m; 21.9 δ -CH ₂ 1.53 – 1.64 m; 26.3 ϵ -CH ₂ 2.91 bs; 39.3 ϵ -NH ₃ ⁺ 7.44 bs
Gly ⁶	8.28 – 8.34 m	3.87 – 3.93 m; 42.6		
Tyr ⁸	8.20 – 8.27 m	4.54 – 4.58 m; -	2.86 – 3.02 m; 36.1	CH _(arom) 6.76 d (8.7 Hz) CH _(arom) 7.07 d (8.8 Hz)
Gly ¹⁰	8.37 – 8.42 m	3.87 – 3.93 m; 42.6		
Lys ¹²	8.28 – 8.34 m	4.16 – 4.21 m; 54.0	1.64 – 1.88 m; 30.1	γ -CH ₂ 1.27 – 1.46 m; 21.9 δ -CH ₂ 1.53 – 1.64 m; 26.3 ϵ -CH ₂ 2.91 bs; 39.3 ϵ -NH ₃ ⁺ 7.44 bs
Gly ¹³	7.76 t (5.9)	3.87 – 3.93 m; 42.6		
Ser ^{5,7,9, 11,14}	8.07 – 8.18 m 8.20 – 8.27 m 8.28 – 8.3, m	4.31 – 4.42 m; 61.1	3.69 – 3.85 m; 61.2	
Lys ¹⁵	8.34 – 8.37 m	4.23 – 4.31 m; 54.0	1.64 – 1.87 m; 30.3	γ -CH ₂ 1.28 – 1.45 m; 21.9 δ -CH ₂ 1.53 – 1.64 m; 26.2 ϵ -CH ₂ 2.91 bs; 39.4 ϵ -NH ₃ ⁺ 7.43 bs
PDA ^{16*}	α -NH 8.03 t (6.6) γ -NH ₃ ⁺ 7.44, bs	3.18 – 3.28 m; 36.1	1.73 – 1.88 m; 26.6	γ -CH ₂ 2.86 – 3.02 m; 37.1

HR-MS (MALDI-TOF): für $C_{63}H_{111}N_{21}O_{23}H^+$ $[M+H]^+$, ber.: 1531.709, gef.: 1531.165.

R5-Peptid (20)



Die Synthese des nativen Silaffin-1A₁ ohne posttranslationale Modifikationen wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschriften (s. Kapitel 5.2.1) durchgeführt. Das Rohpeptid wurde nach der Vorschrift 5.2.18 abgespalten und gefällt. Nach der semipräparativen Aufreinigung konnten 37% (3.67 mg, 0.002 mmol) des R5-Peptids als farbloses TFA-Salz erhalten werden.

HPLC: $t_R = 8.85$ min (5%→10%, 20 min, 0.42 mL/min), Reinheit: 94%.

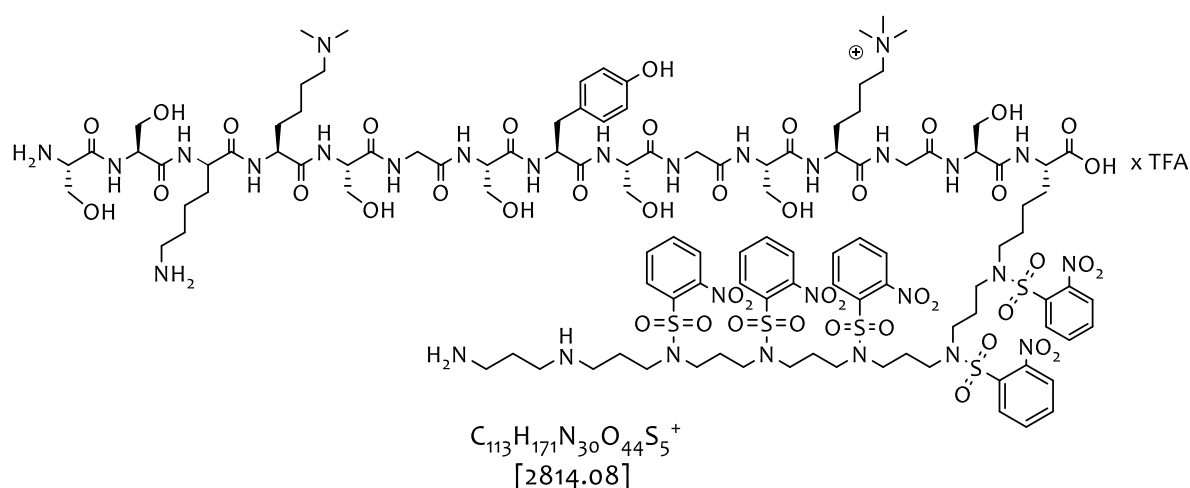
Experimenteller Teil

Tabelle 17: ^1H - und ^{13}C -NMR von Silaffin-1A₁-R5 Peptid (600 MHz, 300 K, 50 mM KH_2PO_4 -Puffer/ D_2O 9:1). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Bestimmte Signale konnten aufgrund der Wasserunterdrückung nicht zugeordnet werden.

Aminosäure	NH / COR	α -CH	β -CH ₂	Andere
Ser ¹	-	4.31 – 4.42 m; 55.6	3.69 – 3.86 m; 61.1	α -NH ₃ ⁺ 7.43, bs
Ser ²	8.71 d (6.6)	4.45 – 4.49 m; 55.6	3.79 – 3.86 m; 61.1	
Lys ^{3, 4, 12}	8.37 – 8.41 m	4.23 – 4.31 m; 53.9	1.64 – 1.87 m; 30.3	γ -CH ₂ 1.28 – 1.45 m; 21.9 δ -CH ₂ 1.53 – 1.64 m; 26.3 ϵ -CH ₂ 2.91 bs; 39.4 ϵ -NH ₃ ⁺ 7.43 bs;
Gly ⁶	8.30 – 8.34 m	3.90 – 3.93 m; 42.5		
Tyr ⁸	8.20 – 8.26 m	4.54 – 4.57 m; -	2.84 – 3.02 m; 36.0	CH _(arom) 6.75 d (8.8) CH _(arom) 7.07 d (8.7 Hz); 115.4, 130.5
Gly ¹⁰	8.37 – 8.41 m	3.90 – 3.93 m; 42.5		
Gly ¹³	7.77 t (6.1)	3.89 d (6.0); 42.5		
Lys ¹⁵	8.34 – 8.37 m	4.23 – 4.31 m; 53.9	1.64 – 1.87 m; 30.3	γ -CH ₂ 1.28 – 1.45 m; 21.9 δ -CH ₂ 1.53 – 1.64 m; 26.2 ϵ -CH ₂ 2.91 bs; 39.4 ϵ -NH ₃ ⁺ 7.43 bs
Ser ^{5, 7, 9, 11, 14}	8.07 – 8.16 m 8.20 – 8.26 m 8.30 – 8.34 m	4.31 – 4.42 m; 55.6	3.69 – 3.856 m; 61.1	

HR-MS (MALDI-TOF): C₆₀H₁₀₃N₁₉O₂₄⁺ [M+K]⁺, ber.: 1512.838, gef.: 1512.963.

Silaffin-1A₁-Derivat 53



Herstellung des Silaffin-1A₁-Derivates **53** erfolgte manuell nach den im Abschnitt **5.2** erfassten Synthesevorschriften. Ausgehend von dem oligopropylenaminverlängerten Lysin-Harz **52** (0.01 mmol) konnte das erste oligopropylenamin-modifizierte Silaffin-1A₁-Derivat erhalten werden. Nach der chromatographischen Aufreinigung konnten 62% (21 mg, 0.006 mmol) des Peptids **53** als gelbliches TFA-Salz erhalten werden.

HPLC: $t_R = 5.82 \text{ min (10\% \rightarrow 90\%, 8 \text{ min, } 0.42 \text{ mL/min), Reinheit } \geq 99\%$.

Experimenteller Teil

Tabelle 18: ^1H - und ^{13}C -NMR von Silaffin-1A₁-Derivat 53 (500 MHz, DMSO-*d*₆). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

Aminosäure	NH / COR	α -CH	β -CH ₂	Andere
Ser ¹	-	3.89 – 3.96 <i>m</i> ; 54.3	3.50 – 3.68 <i>m</i> ; 61.2	α -NH ₃ ⁺ 8.03-8.19
Ser ²	8.57 <i>d</i> (7.0)	4.38 – 4.46 <i>m</i> ; 54.8	3.50 – 3.68 <i>m</i> ; 61.2	
Lys ³	8.06 – 8.10 <i>m</i>	4.23 – 4.29 <i>m</i> ; 52.5	1.64 – 1.87 <i>m</i> ; 31.3	γ -CH ₂ 1.15 – 1.39 <i>m</i> ; 22.3 δ -CH ₂ 1.58 – 1.80 <i>m</i> ; 26.7 ϵ -CH ₂ 2.72-2.79 <i>m</i> ; 39.1 ϵ -NH ₃ ⁺ 7.66 <i>bs</i> ;
Lys ⁴	8.00 – 8.06 <i>m</i>	4.30 – 4.35 <i>m</i> ; 53.9	1.64 – 1.87 <i>m</i> ; 31.3	γ -CH ₂ 1.15 – 1.39 <i>m</i> ; 22.3 δ -CH ₂ 1.49 – 1.56 <i>m</i> ; 26.9 ϵ -CH ₂ 2.95-3.00 <i>m</i> ; 56.8 ϵ -N(CH ₃) ₂ 2.74 <i>d</i> (4.8); 42.3
Gly ⁶	-	3.73 – 3.85 <i>m</i> ; 42.5		
Tyr ⁸	-	4.54 – 4.57 <i>m</i> ; -	2.84 – 3.02 <i>m</i> ; 36.2	CH _(arom) 6.63 <i>d</i> (8.4 Hz); CH _(arom) 7.03 <i>d</i> (8.4 Hz); 115.1, 130.4
Gly ¹⁰	-	3.73 – 3.85 <i>m</i> ; 42.5		
Lys ¹²	8.11 – 8.17 <i>m</i>	4.27 – 4.33 <i>m</i> ; 52.5	1.64 – 1.87 <i>m</i> ; 31.3	γ -CH ₂ 1.15 – 1.39 <i>m</i> ; 22.3 δ -CH ₂ 1.36 – 1.42 <i>m</i> ; 27.6 ϵ -CH ₂ 3.19-3.26 <i>m</i> ; 65.4 ϵ -N(CH ₃) ₃ 3.01 <i>bs</i> ; 52.3 ϵ -N(CH ₃) ₃ H 9.38 <i>bs</i>
Gly ¹³	-	3.72-3.85 <i>m</i> ; 42.5		
Lys ¹⁵	8.06 – 8.09 <i>m</i>	4.09 – 4.14 <i>m</i> ; 52.1	1.64 – 1.87 <i>m</i> ; 31.3	γ -CH ₂ 1.15 – 1.39 <i>m</i> ; 22.3 δ -CH ₂ 1.58 – 1.80 <i>m</i> ; 26.7 ϵ -CH ₂ 3.13-3.18 <i>m</i> ; 47.4
Ser ^{5, 7, 9, 11, 14}	-	4.25 – 4.50 <i>m</i> ; 55.2	3.50– 3.68 <i>m</i> ; 61.2	

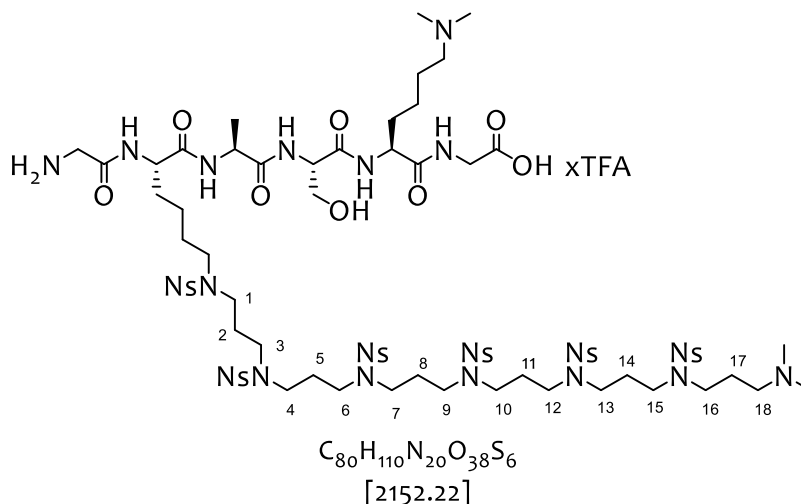
Sonstige Signale:

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) 1.46-1.80 (m, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.82-1.89 (m, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.83-2.89 (m, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.93-2.99 (m, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.13-3.39 (m, NNsCH₂CHCH₂NNs), 3.31-3.39 (t, ³J = 6.7 Hz, NNsCH₂CH₂CH₂NH), 7.75-8.19 (m, CH_{arom.}, K¹⁵-NH₃⁺, S¹-NH₃⁺, NH-), 8.53 (bs, K¹⁵-NH₂⁺, K⁴ε-N(CH₃)₂H⁺) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 24.7 (NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 26.9 (NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 36.4 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.2 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.6 (CH₂NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.9 (NNsCH₂CHCH₂NNs), 124.5, 129.8, 132.6, 132.8, 134.8 (C_{arom.}).

HR-MS (ESI): C₁₁₃H₁₇₀N₃₀O₄₄S₅H₂⁺ [M+2H]⁺/2, ber.:938.3620, gef.:938.3612.

Pentapeptid 64



Herstellung des ausgewählten Fragmentes (152-155) aus Sil-3 erfolgte manuell nach den im Abschnitt 5.2 aufgelisteten Synthesevorschriften. Ausgehend vom Glycin-Harz **63** (0.01 mmol) konnte das oligopropylamin-modifizierte Mini-Silaffin Sil-3 (152-125) erhalten werden. Nach der chromatographischen Aufreinigung konnten 84% (19.1 mg, 0.008 mmol) des Peptids **64** als gelbliches TFA-Salz erhalten werden.

HPLC: $t_R = 6.73$ min (10%→90%, 8 min, 0.42 mL/min), Reinheit ≥ 99%.

Tabelle 19: ^1H - und ^{13}C -NMR von Silaffin-1A₁-Derivat 64 (500 MHz, DMSO-*d*₆). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

Aminosäure	NH / COR	α -CH	β -CH ₂	Andere
Gly ¹	-	3.55 – 3.61 m; 40.5		
Lys ²	8.52 d (8.2)	4.36 – 4.41 m; 52.8	1.51 – 1.62 m; 32.0	γ -CH ₂ 1.17 – 1.22 m; 22.3 δ -CH ₂ 1.57 – 1.68 m; 27.0 ϵ -CH ₂ 3.13-3.20 m; 47.9 N(CH ₃) ₂ 2.76 bs; 42.6 N(CH ₃) ₂ H 9.39 bs
Ala ³	8.33 d (7.5)	4.36 – 4.41 m; 48.3	1.20 d (7.1); 18.8	
Ser ⁴	8.06 d (7.8)	4.27-4.34 m; 55.2	3.53 – 3.63 m; 62.2	OH-5.01 bs
Lys ⁵	7.95-8.00 m	4.27 – 4.33 m; 52.5	1.68 – 1.77 m; 31.8	γ -CH ₂ 1.26 – 1.34 m; 22.3 δ -CH ₂ 1.37– 1.45 m; 28.1 ϵ -CH ₂ 2.94-3.02 m; 56.9 ϵ -N(CH ₃) ₂ 2.76 bs; 42.6 ϵ -N(CH ₃) ₂ H 9.31 bs
Gly ⁶	8.29 t (5.8)	3.73 – 3.79 m; 41.0		COOH 12.6

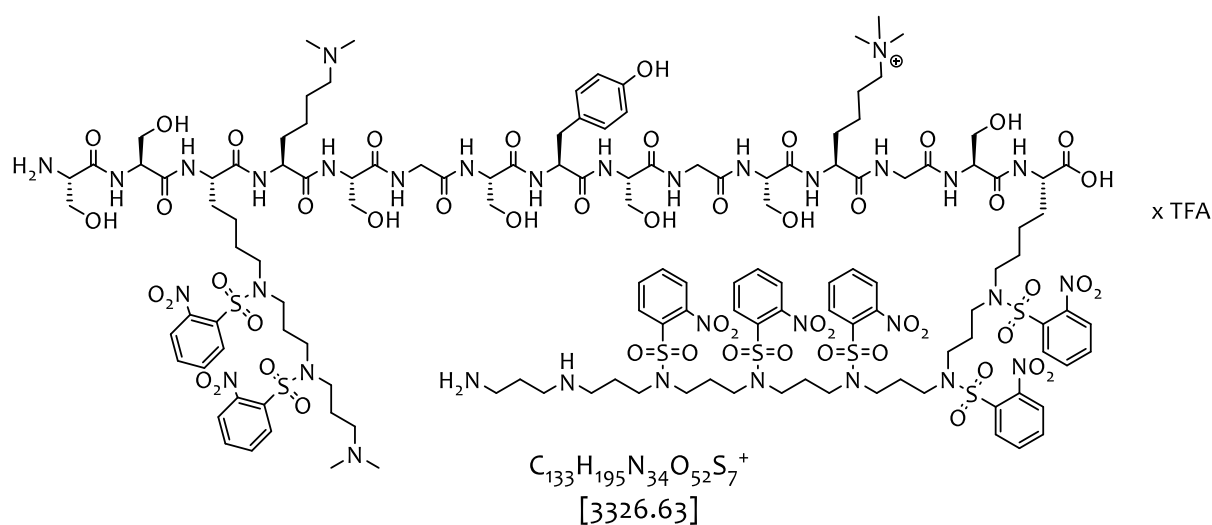
Sonstige Signale:

^1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) 1.59-1.77 (m, 2-, 5-, 8-, 11-, 14-CH₂), 1.84-1.92 (m, (m, 17-CH₂), 2.97-3.03 (m, 2H, 18-CH₂), 3.09-3.36 (3-, 4-, 6-, 7-, 9-, 10-, 12-, 13-, 15, 16), 7.78-8.17 (m, CH_{arom.}) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 23.7 (C-17), 27.1 (C-2, C-5, C-8, C-11, C-14), 45.2 (C-3, C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-12, C-13, C-15, C-16), 54.6 (C-18), 121.8, 122.1, 127.5, 132.0, 132.6, 135.0, 138.0, 142.2 (C_{arom.}) ppm.

HR – MS (ESI): C₈₀H₁₁₀N₂₀O₃₂S₆H₂⁺ [M+2H]^{+/2}, ber.: 1028.2068, gef.: 1028.8046.

Silaffin-1A₁-Derivat 65



Herstellung des Silaffin-1A₁-Derivates **65** mit verschiedenen Lysin-Modifikationen erfolgte manuell nach den im Abschnitt **5.2** erfassten Synthesevorschriften. Ausgehend von dem oligopropylenaminverlängerten Lysin-Harz **62** (0.01 mmol) konnte das modifizierte Silaffin-1A₁-Derivat erhalten werden. Nach der chromatographischen Aufreinigung konnten 48% (16 mg, 0.004 mmol) des Peptids **53** als gelbliches TFA-Salz erhalten werden.

HPLC: $t_R = 6.09$ min (10%→90%, 8 min, 0.45 mL/min), Reinheit $\geq 99\%$.

Experimenteller Teil

Tabelle 20: ^1H - und ^{13}C -NMR von Silaffin-1A₁-Derivat 65 (500 MHz, DMSO-*d*₆). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

Aminosäure	NH / COR	α -CH	β -CH ₂	Andere
Ser ¹	-	3.89 – 3.96 <i>m</i> ; 54.5	3.47 – 3.66 <i>m</i> ; 62.2	α -NH ₃ ⁺ 8.03-8.17
Ser ²	-	4.45 – 4.50 <i>m</i> ; 54.7	3.47 – 3.66 <i>m</i> ; 62.2	
Lys ³	-	4.25 – 4.39 <i>m</i> ; 52.7	1.51 – 1.76 <i>m</i> ; 31.4	γ -CH ₂ 1.14 – 1.32 <i>m</i> ; 22.7 δ -CH ₂ 1.57 – 1.76 <i>m</i> ; 26.9 ϵ -CH ₂ 2.72-2.76 <i>m</i> ; 47.1 N(CH ₃) ₂ 2.76 <i>d</i> (4.5); 42.6
Lys ⁴	-	4.25 – 4.39 <i>m</i> ; 52.7	1.51 – 1.76 <i>m</i> ; 31.4	γ -CH ₂ 1.14 – 1.32 <i>m</i> ; 22.7 δ -CH ₂ 1.57 – 1.76 <i>m</i> ; 26.9 ϵ -CH ₂ 2.92-3.02 <i>m</i> ; 56.8 ϵ -N(CH ₃) ₂ 2.74 <i>d</i> (4.6); 42.6
Gly ⁶	-	3.68 – 3.86 <i>m</i> ; 42.3		
Tyr ⁸	-	4.54 – 4.57 <i>m</i> ; -	2.86 – 3.04 <i>m</i> ; 36.2	CH _(arom) 6.62 <i>d</i> (8.3 Hz); CH _(arom) 7.03 <i>d</i> (8.3 Hz); 115.2, 130.6
Gly ¹⁰	-	3.73 – 3.85 <i>m</i> ; 42.5		
Lys ¹²	-	4.25 – 4.39 <i>m</i> ; 52.7	1.51 – 1.76 <i>m</i> ; 31.4	γ -CH ₂ 1.14 – 1.32 <i>m</i> ; 22.7 δ -CH ₂ 1.34 – 1.46 <i>m</i> ; 27.9 ϵ -CH ₂ 3.18-3.25 <i>m</i> ; 65.5 ϵ -N(CH ₃) ₃ 3.00 <i>bs</i> ; 52.6 ϵ -N(CH ₃) ₃ H 9.38 <i>bs</i>
Gly ¹³	-	3.68-3.86 <i>m</i> ; 42.3		
Lys ¹⁵	-	4.07 – 4.14 <i>m</i> ; 52.2	1.51 – 1.76 <i>m</i> ; 31.4	γ -CH ₂ 1.14 – 1.32 <i>m</i> ; 22.7 δ -CH ₂ 1.57 – 1.76 <i>m</i> ; 26.9 ϵ -CH ₂ 3.11-3.19 <i>m</i> ; 47.8
Ser ^{5, 7, 9, 11, 14}	-	4.23 – 4.43 <i>m</i> ; 55.2	3.47– 3.66 <i>m</i> ; 62.2	

Sonstige Signale:

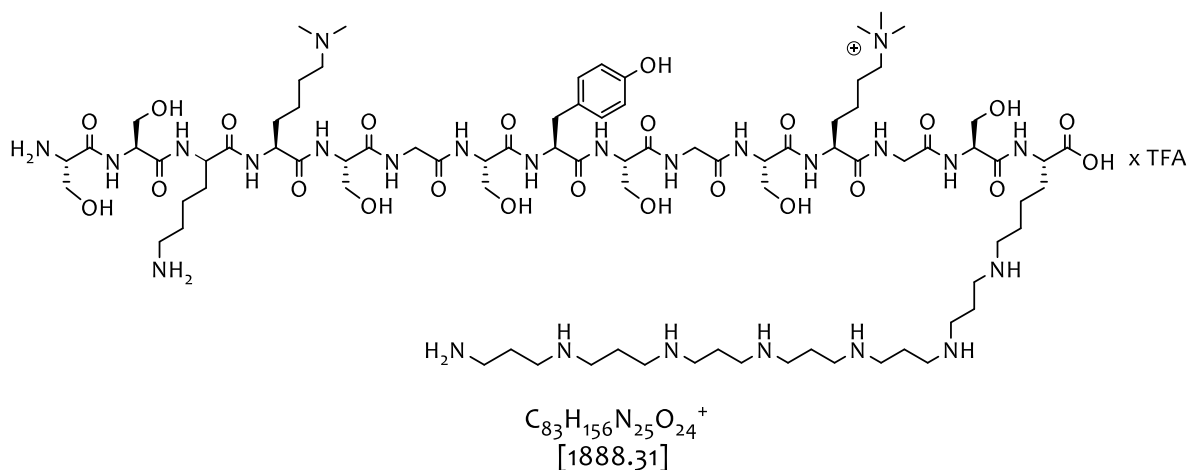
^1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) 1.57-1.78 (m, NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 1.80-1.91 (m, NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.80-2.91 (m, NNsCH₂CH₂CH₂NH,

NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.91-2.99 (m, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.08-3.38 (m, NNsCH₂CHCH₂NNs, NNsCH₂CH₂CH₂NH), 7.77-8.00 (m, CH_{arom.}, ^xNH-), 8.01-8.21 (bs, K¹⁵-NH₃⁺, S¹α-NH₃⁺, K¹⁵-NH₂⁺, K³ε-N(CH₃)₂H⁺, K⁴ε-N(CH₃)₂H⁺, K³ε-N(CH₃)₂H⁺), 9.18 bs (K¹²ε-N(CH₃)₃H⁺) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 24.4 (NNsCH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 27.1 (NNsCH₂CH₂CH₂NNs), 36.6 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.5 (NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 44.8 (CH₂NHCH₂CH₂CH₂NH₂), 45.2 (NNsCH₂CHCH₂NNs), 124.5, 120.7, 125.2, 129.9, 135.1 (C_{arom.}).

HR-MS (ESI): C₁₃₃H₁₉₅N₃₄O₅₂S₇H₂⁺ [M+H]⁺/3, ber.:1109.3986, gef.:1109.3986.

Entschütztes Silaffin-1A₁-Derivat **66**



Das geschützte Silaffin-Analogon **53** (0.003 mmol) wurde zum in DCM vorgequollenem Harz zusammen mit 5.00 eq (0.020 mmol) DIPEA gegeben. Nach 12 h Beladungszeit in DMF wurde das Harz mehrfach mit DMF gewaschen. Anschließend wurde das am Harz gebundene Silaffin-1A₁ mit 2-Mercaptoethanol (10.0 eq pro Ns) und DBU (5.00 eq pro Ns) nach Vorschrift 5.2.16 behandelt. Das entschützte Peptid **66** konnte so rein nach der Abspaltung vom Harz (s. Abschnitt 5.2.18) gewonnen werden. Die massenspektrometrische Analysen der entschützten Silaffin-1A₁-Analoge wurden von A. MILENTYEV aus der Arbeitsgruppe Dr. A. SHEVCHENKO (TU Dresden) durchgeführt. Hierbei wurde die Probe in 50 uL 2.5%iger wässriger Ameisensäure gelöst und mehrfach mit einem GluFib-Peptid-Standard in der Endkonzentration von 25 fmol/ uL verdünnt. MS-Spektrum wurde auf einem Q EXACTIVE Massenspektrometer (THERMO FISHER SCIENTIFIC) durch direkte Infusion der Probe unter Verwendung einer NanoMate-Ionenquelle im positiven Ionenmodus aus 50% Acetonitril in 2.5%iger Ameisensäure gewonnen.

Experimenteller Teil

Tabelle 21: ^1H - und ^{13}C -NMR von Silaffin-1A₁-Derivat 66 (500 MHz, DMSO-*d*₆). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

Aminosäure	NH / COR	α -CH	β -CH ₂	Andere
Ser ¹		4.25 – 4.42 m; 55.5	3.57 – 3.67 m; 62.1	α -NH ₃ ⁺ 8.06-8.14
Ser ²	8.59 d (7.8)	4.25 – 4.42 m; 55.5	3.57 – 3.67 m; 62.1	
Lys ³	7.98-8.02 m	4.33 – 4.42 m; 52.7	1.52 – 1.83 m; 31.4	γ -CH ₂ 1.26 – 1.43 m; 22.4 δ -CH ₂ 1.51 – 1.67 m; 25.3 ϵ -CH ₂ 2.85-2.91 m; 39.3
Lys ⁴	7.98-8.02 m	4.33 – 4.42 m; 52.7	1.52 – 1.83 m; 31.4	γ -CH ₂ 1.23 – 1.43 m; 22.4 δ -CH ₂ 1.51 – 1.67 m; 25.3 ϵ -CH ₂ 2.96-3.01 m; 57.1 ϵ -N(CH ₃) ₂ 2.74 d (4.8); 42.5
Gly ⁶	-	3.73 – 3.84 m; 42.4		
Tyr ⁸	-	4.54 – 4.57 m; -	2.84– 2.91 m; 36.5	CH _(arom) 6.63 d (8.6 Hz); CH _(arom) 7.03 d (8.6 Hz); 115.2, 130.6
Gly ¹⁰	-	3.73 – 3.85 m; 42.5		
Lys ¹²	8.10-8.14 m	4.25 – 4.32 m; 52.7	1.52 – 1.83 m; 31.4	γ -CH ₂ 1.26 – 1.43 m; 22.4 δ -CH ₂ 1.51 – 1.67 m; 25.3 ϵ -CH ₂ 3.18-3.25 m; 65.5 ϵ -N(CH ₃) ₃ 3.02 bs; 52.4
Gly ¹³	-	3.73-3.84 m; 42.4		
Lys ¹⁵	8.17 d (5.8)	4.25 – 4.32 m; 52.7	1.52 – 1.83 m; 31.4	γ -CH ₂ 1.26 – 1.43 m; 22.4 δ -CH ₂ 1.51 – 1.67 m; 25.3 ϵ -CH ₂ 2.86-2.91 m; 47.1
Ser ^{5, 7, 9, 11, 14}	-	4.25 – 4.42 m; 55.5	3.57– 3.67 m; 62.1	

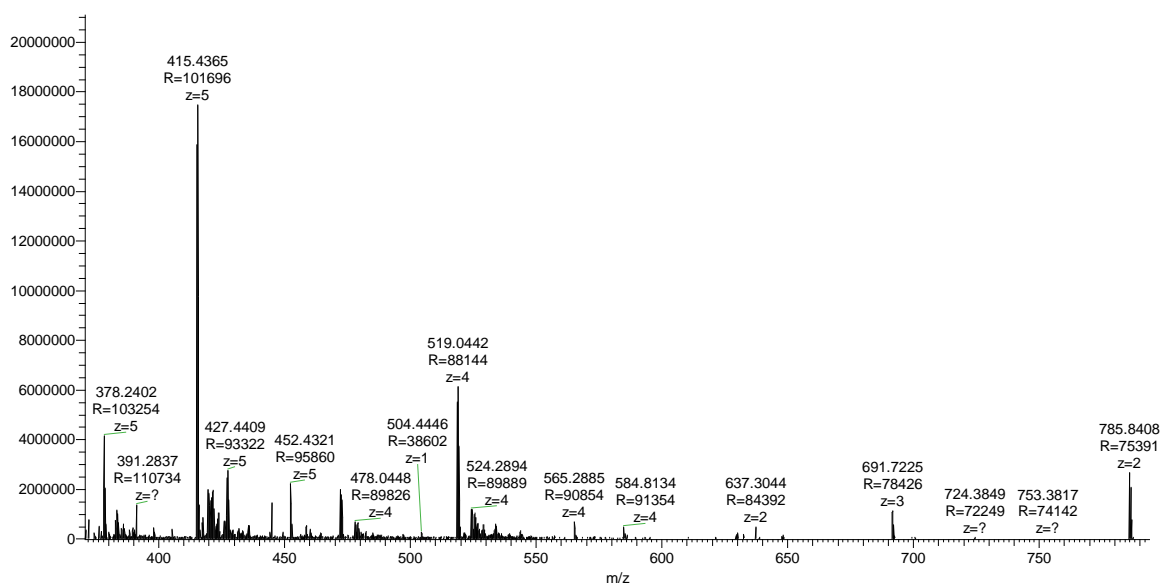
Sonstige Signale:

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 83-2.02 (m, HNCH₂CH₂CH₂NH), 2.72-2.76 (d, ³J = 4.8 Hz, K⁴-N(CH₃)₂, K¹⁵-N(CH₃)₂), 2.92-3.04 (m, CH₂NHCH₂), 3.02 (s, K¹²-N(CH₃)₃), 7.87 (bs, K¹⁵-NH₃⁺, K³ ϵ -NH₃⁺, S^x-NH), 7.91-7.98 (m, 2x S^x-NH), 7.98-8.02 (K³-NH, K⁴-NH, S^x-NH, G^x-NH), 8.06-8.14 (S¹- α -NH₃⁺, K¹²-NH, G^x-NH), 8.17 (t, ³J = 5.8 Hz, K¹⁵-NH, G^x-NH), 8.58 (bs, K⁴ ϵ -N(CH₃)₂H⁺), 8.59 (d, ³J = 7.8 Hz, Ser¹-NH), 8.70-8.97 (bs, K¹⁵-NH₂⁺), 9.32 (K¹² ϵ -N(CH₃)₃H⁺) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 22.9 (HNCH₂CH₂CH₂NH), 42.5 (N(CH₃)₂), 44.4 (CH₂NHCH₂), 52.4 (N(CH₃)₃) ppm.

20150331_MB329_1-10_GLUFIB_25fmol_pos #11-186 RT:
T: FTMS + p NSI Full ms [100.00-1500.00]

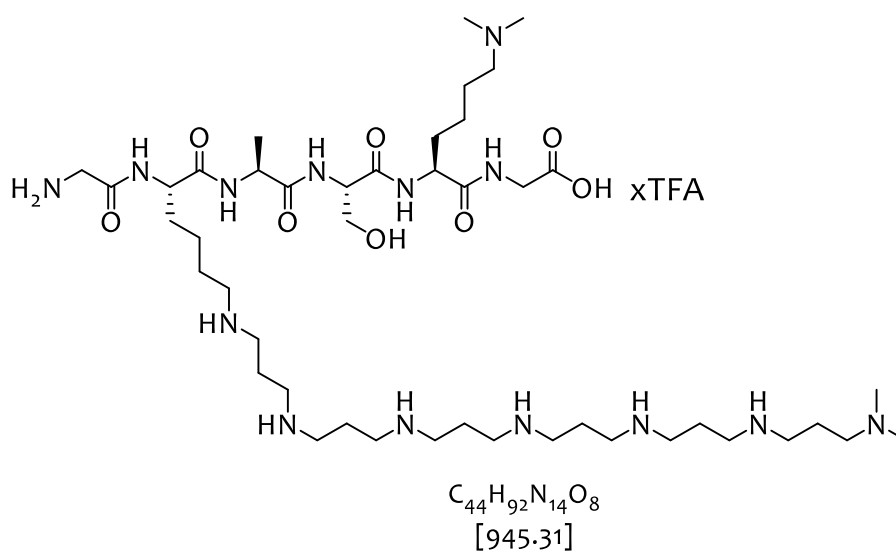
5E7



HR – MS (ESI): C₈₃H₁₅₆N₂₅O₂₄H₁⁺ [M+H]⁺, ber.: 1888.1833, gef.: 1887.1750.

C₈₃H₁₅₆N₂₅O₂₄H₄⁺ [M+4H]⁺/5, ber.: 378,2402 gef.: 378.2837.

Entschütztes Sil-3-Derivat 78



Das geschützte Silaffin-Analogon **64** (0.004 mmol) wurde zum in DCM vorgequollenem Harz zusammen mit 5.00 eq (0.02 mmol) DIPEA gegeben. Nach 12 h Beladungszeit in DMF wurde das Harz mehrfach mit DMF gewaschen. Anschließend wurde das am Harz gebundene Silaffin-1A₁ mit 2-Mercaptoethanol (10.0 eq pro Ns) und DBU (5.00 eq pro Ns) nach Vorschrift 5.2.16 behandelt. Das entschützte Peptid **78** konnte so nach der Abspaltung vom Harz (s. Abschnitt 5.2.18) rein gewonnen werden.

Tabelle 22: ^1H - und ^{13}C -NMR von Silaffin-1A₁-Derivat 78 (500 MHz, DMSO-*d*₆). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

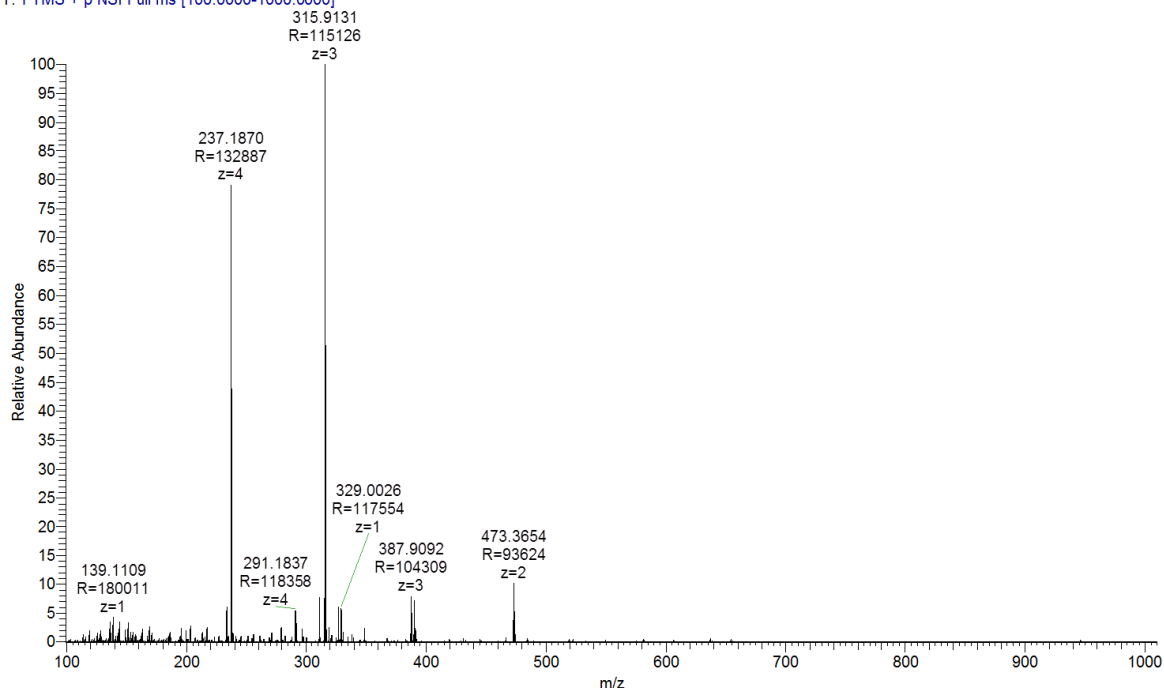
Aminosäure	NH / COR	α -CH	β -CH ₂	Andere
Gly ¹	-	3.56 – 3.63 m; 40.5		αNH_3^+ 7.98 bs
Lys ²	8.53 d (8.1)	4.33 – 4.38 m; 48.4	1.49 – 1.61 m; 31.8	γ -CH ₂ 1.25 – 1.40 m; 22.4 δ -CH ₂ 1.54 – 1.67 m; 23.5 ϵ -CH ₂ 2.84-2.90 m; 47.1 N(CH ₃) ₂ 2.78 bs; 42.5 N(CH ₃) ₂ H 8.61 bs
Ala ³	8.21 d (7.4)	4.36 – 4.41 m; 48.3	1.23 d (7.1); 18.2	
Ser ⁴	7.89 d (7.4)	4.29-4.35 m; 55.1	3.52 – 3.59 m, 3.61-3.68 m; 62.0	
Lys ⁵	7.92 d (8.2)	4.27 – 4.33 m; 52.5	1.63 – 1.80 m; 31.8	γ -CH ₂ 1.25 – 1.40 m; 22.4 δ -CH ₂ 1.54– 1.63 m; 25.5 ϵ -CH ₂ 2.95-3.01 m; 56.9 ϵ -N(CH ₃) ₂ 2.74 d (4.9); 42.5 ϵ -N(CH ₃) ₂ H 8.61 bs
Gly ⁶	8.24 t (5.8)	3.73 – 3.79 m; 40.9		

Sonstige Signale:

^1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.87-2.04 (m, HNCH₂CH₂CH₂NH), 2.74 (d, 3J = 4.9 Hz, K⁵ ϵ -N(CH₃)₂), 2.78 (bs, K²-N(CH₃)₂), 2.91-3.08 (m, CH₂NHCH₂), 3.09-3.15 (m, CH₂N(CH₃)₂), 8.61, 8.79, 8.85 (bs, K²-NH₂⁺), 9.39 (bs, K⁵ ϵ -HN(CH₃)₂⁺), 9.74 (bs, K²-HN(CH₃)₂⁺) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 22.9 (HNCH₂CH₂CH₂NH), 42.4 (N(CH₃)₂), 44.4 (CH₂NHCH₂), 54.1 (CH₂N(CH₃)₂) ppm.

pos_MB513_1-100 #2-172 RT: 0.02-1.67 AV: 171 NL: 6.80E7
 T: FTMS + p NSI Full ms [100.0000-1000.0000]

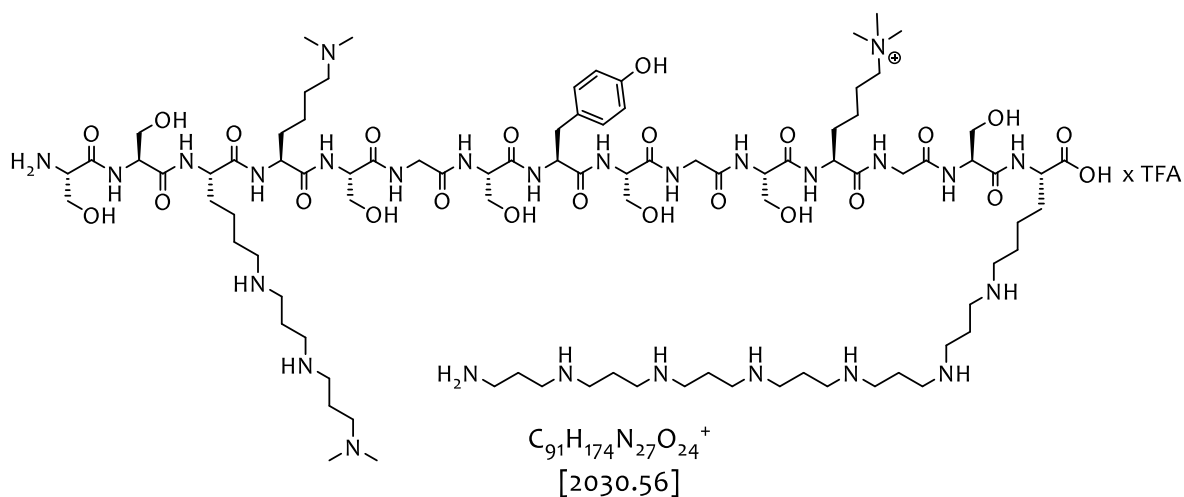


HR – MS (ESI): $C_{44}H_{92}N_{14}O_8H^+$ $[M+H]/2^+$, ber.: 472.3611, gef.: 472.3664.

$C_{44}H_{92}N_{14}O_8H_3^+$ $[M+3H]/3^+$, ber.: 315.9147, gef.: 315.9133.

$C_{44}H_{92}N_{14}O_8H_4^+$ $[M+4H]/4^+$, ber.: 237.1870, gef.: 237.1870.

Entschütztes Silaffin-1A₁-Derivat **79**



Das geschützte Silaffin-Analogon **65** (0.003 mmol) wurde zum in DCM vorgequollenem Harz zusammen mit 5.00 eq (0.013 mmol) DIPEA gegeben. Nach 12 h Beladungszeit in DMF wurde das Harz mehrfach mit DMF gewaschen. Anschließend wurde das am Harz gebundene Silaffin-1A₁ mit 2-Mercaptoethanol (10.0 eq pro Ns) und DBU (5.00 eq pro Ns) nach Vorschrift 5.2.16 behandelt. Das entschützte Peptid **79** konnte so nach der Abspaltung vom Harz (s. Abschnitt 5.2.18) rein isoliert werden.

Experimenteller Teil

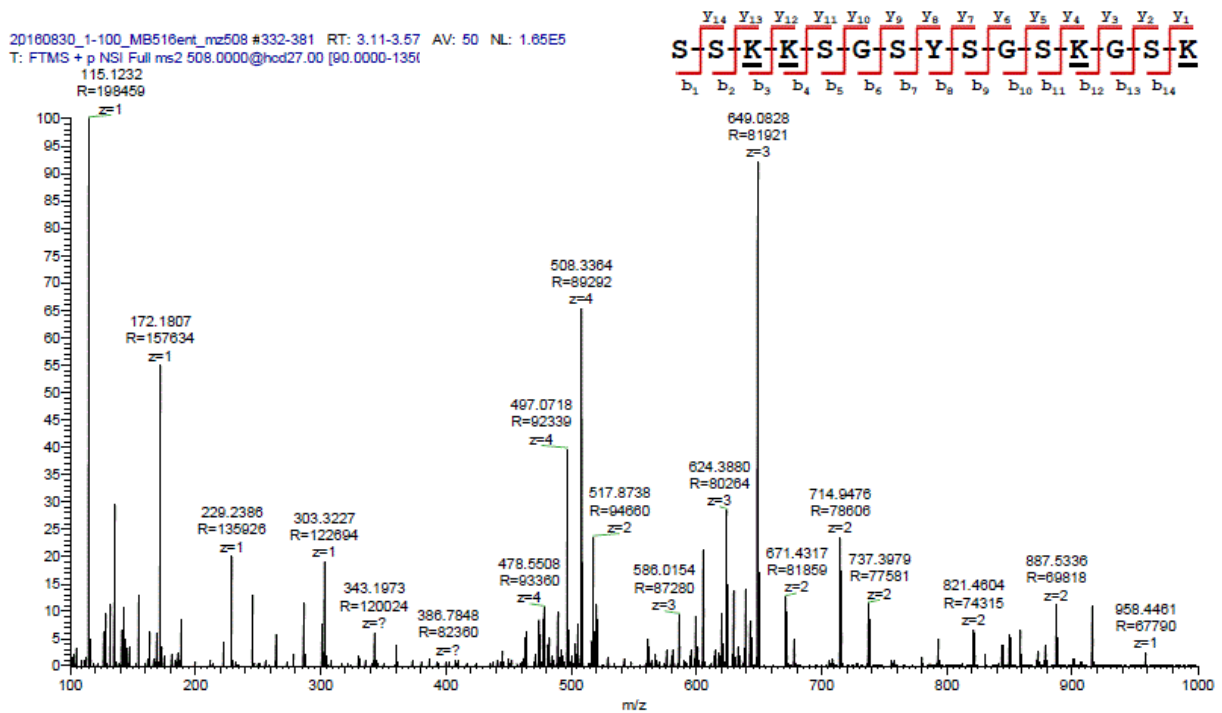
Tabelle 23: ¹H- und ¹³C-NMR von Silaffin-1A₁-Derivat 79 (500 MHz, DMSO-*d*₆). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm, Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

Aminosäure	NH / COR	α -CH	β -CH ₂	Andere
Ser ¹	-	4.25 – 4.43 <i>m</i> ; 55.2	3.50 – 3.65 <i>m</i> ; 61.8	α -NH ₃ ⁺ 8.06-8.14
Ser ²	8.50 <i>d</i> (7.8)	4.25 – 4.43 <i>m</i> ; 55.2	3.50 – 3.65 <i>m</i> ; 61.8	
Lys ³	-	4.17 – 4.24 <i>m</i> ; 51.7	1.59 – 1.63 <i>m</i> , 1.71-1.77 <i>m</i> ; 30.6	γ -CH ₂ 1.25 – 1.39 <i>m</i> ; 21.7 δ -CH ₂ 1.55 – 1.63 <i>m</i> ; 23.4 ϵ -CH ₂ 2.79-2.84 <i>m</i> ; 39.3 N(CH ₃) ₂ 2.79 <i>d</i> (3.9); 42.3
Lys ⁴	7.61 <i>d</i> (6.8)	4.11 <i>q</i> (6.4); 57.3	1.58 – 1.64 <i>m</i> ; 1.74-1.80 <i>m</i> ; 31.1	γ -CH ₂ 1.25 – 1.39 <i>m</i> ; 22.2 δ -CH ₂ 1.54 – 1.61 <i>m</i> ; 25.1 ϵ -CH ₂ 2.94-3.01 <i>m</i> ; 56.6 ϵ -N(CH ₃) ₂ 2.74 <i>d</i> (3.9); 42.2
Gly ⁶	-	3.65 – 3.81 <i>m</i> ; 42.1		
Tyr ⁸	-	4.44 – 4.50 <i>m</i> ; 54.5	2.82 – 3.01 <i>m</i> ; 36.3	CH _(arom) 6.63 <i>d</i> (8.6 Hz); CH _(arom) 7.03 <i>d</i> (8.6 Hz); 114.9, 130.1
Gly ¹⁰	-	3.65 – 3.81 <i>m</i> ; 42.1		
Lys ¹²	-	4.26 – 4.35 <i>m</i> ; 52.5	1.59-1.64 <i>m</i> ; 1.72 – 1.77 <i>m</i> ; 31.7	γ -CH ₂ 1.25 – 1.39 <i>m</i> ; 22.2 δ -CH ₂ 1.54 – 1.61 <i>m</i> ; 25.1 ϵ -CH ₂ 3.19-3.27 <i>m</i> ; 65.3 ϵ -N(CH ₃) ₃ 3.02 <i>bs</i> ; 52.2
Gly ¹³	7.73-7.77 <i>bs</i>	3.65-3.81 <i>m</i> ; 42.1		
Lys ¹⁵	-	4.17 – 4.24 <i>m</i> ; 51.7	1.59 – 1.63 <i>m</i> ; 1.71-1.77 <i>m</i> ; 30.6	γ -CH ₂ 1.63 – 1.69 <i>m</i> ; 21.7 δ -CH ₂ 1.55 – 1.63 <i>m</i> ; 23.4 ϵ -CH ₂ 2.81-2.89 <i>m</i> ; 46.8
Ser ^{5, 7, 9, 11, 14}	-	4.25 – 4.43 <i>m</i> ; 55.2	3.50– 3.65 <i>m</i> ; 61.8	

Sonstige Signale:

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 1.83-1.99 (m, HNCH₂CH₂CH₂NH), 2.74 (d, ³J = 3.9 Hz, K⁴ ϵ -N(CH₃)₂), 2.79 (d, ³J = 3.9 Hz, K¹⁵-N(CH₃)₂), 2.92-3.04 (m, CH₂NHCH₂), 3.02 (s, K¹² ϵ -N(CH₃)₃), 3.09-3.14 (CH₂N(CH₃)₂), 7.71 (bs, K¹⁵-NH₃⁺, G³-NH), 7.77-7.92 (bs, 1^o-NH₃⁺, S¹ α -NH₃⁺), 7.92-8.02 (S^x-NH), 8.02-8.24 (S¹-NH, Y⁸-NH, K^x-NH, G^x-NH), 8.50 (d, ³J = 7.8 Hz, S²-NH), 8.58 (bs, K⁴ ϵ -N(CH₃)₂H⁺), 8.77, 8.89 (bs, K¹⁵-NH₂⁺), 9.72 (K¹² ϵ -N(CH₃)₃H⁺) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 22.6, 23.9 (HNCH₂CH₂CH₂NH), 42.2 (K⁴ ϵ -N(CH₃)₂), 42.3 (K¹⁵-N(CH₃)₂), 44.2 (CH₂NHCH₂), 53.8 CH₂N(CH₃)₂, 52.2 (N(CH₃)₃) ppm.



HR – MS (ESI): C₉₁H₁₇₄N₂₇O₂₄H₄⁺ [M+4H]/4⁺, ber.: 508.3385, gef.: 508.3364.

6. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
ACR	engl.: acidic and cystein-rich domain
AD	Morbus Alzheimer
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AS	Aminosäure
b	breit
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSE	engl.: bovine spongiforme enzephalopathie, Rinderwahnsinn
Bu	Butyl
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CPPs	engl.: cell penetrating peptides
CSF	engl.: cerebrospinal fluid
CTC-Harz	2-Chlorotriylchlorid-Harz
d	Tag, Dublett (NMR)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCM	Dichlormethan
dd	Doppeldublett (NMR)
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Di-iso-propylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	engl.: deoxyribonucleic acid
EDT	1,2-Ethandithiol
ELISA	engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eq	Äquivalente
ESI	Elektronensprayionisation
Et	Ethyl
fCJK	familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
FFI	fatale familiäre Insomnie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
gef.	gefunden
ges.	gesättigte wässrige Lösung von
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker
h	Stunde
HAOt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HATU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-O-(7-azabenzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorophosphat
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorophosphat
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	engl.: high performance liquid chromatography
HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie
HSQC	engl.: Heteronuclear Single Quantum Coherence
HV	Hochvakuum, <0.1 mbar
iCJK	Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
IVIG	intravenöse Immunglobuline
kat.	katalytisch
Kir-Kanal	engl.: inward rectifying Kalium-Kanal

LCPAs	engl.: Long-chain polyamines
LM	Lösungsmittel (HPLC)
LP	Lumbalpunktion
Lsg.	Lösung
M	molare Masse (g mol ⁻¹)
M	Molarität
m	Multiplett (NMR), mittlere Intensität (IR)
Me	Methyl
min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
Ms	Methansulfonyl (mesyl)
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
nAbs-PrP	natürliche PrP-Autoantikörper
ⁿ J	skalare Kopplung über n Bindungen (NMR)
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	engl.: nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanzspektroskopie
NOESY	engl.: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NSPD	Norspermidin, (<i>Bis</i> (3-aminopropyl)amin
nvCJK	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
OXYMA	Hydroxyimino-cyanoessigsäureethylester
PD	Morbus Parkinson
PDA	1,3-Propylendiamin
PET	Positronen-Emission-Tomographie
PG	engl.: protecting group
Prion	engl.: proteinaceous infectious particle
PrP	Prion-Protein
PrPC	Prion Protein Cellular

PrPSc	Sc für "Scrapie"
PTMs	posttranslationale Modifikationen
ROESY	engl.: Rotational Nuclear Overhauser Effect
sCJK	sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SDA	strukturdirigierende Agenzien
SDV	engl.: silica deposition vesicel
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
SPR	engl.: surface plasmon resonance spectroscopy, Oberflächenplasmonen- resonanzspektroskopie
TBAI	Tetrabutylammonium-iodid
Tf	Triflylgruppe
TFA	Trifluoroacetic acid
TIPS	Triisopropylsilan
TMOS	Tetramethylorthosilicat
TOCSY	engl.: Total Correlation Spectroscopy
Tos	p-Toluolsulfonyl (tosyl)
TSE	engl.: Transmissible Spongiforme Enzephalopathien
TSP	Natriumtrimethylsilylpropionat
Z (Cbz)	Benzyloxycarbonyl-Gruppe
ZNS	Zentralnervensystem

7. Literaturverzeichnis

- ¹ *Lexikon der Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Copyright **1999**.
- ² Askar A., Biogene Amine in Lebensmitteln und ihre Bedeutung, *Ernähr. Umsch.* **1982**, 29, 143-148.
- ³ Askar A., Elsaidy S., Bassiouny S., Biogenic amines in fish products. *Dtsch. Lebensm. - Rundsch.* **1986**, 82, 188-191.
- ⁴ Treptow H., *Biogene Amine in Lebensmitteln*, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, **1986**.
- ⁵ Beutling D., *Biogene Amine in der Ernährung*, Springer-Verlag, Berlin, **1996**.
- ⁶ Chargaff E., *Experimentia* **1950**, 6, 201.
- ⁷ Geneste H., Hesse M., *Chemie in unserer Zeit* 32, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, **1998**.
- ⁸ Askar A., Treptow H., *Biogene Amine in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung*, Verlag: E. Ulmer, **1986**.
- ⁹ Beutling D., Dorothea M., *Biogene Amine in der Ernährung*. Verlag: Springer, **1996**.
- ¹⁰ Weiß C., Fort- und Weiterbildung/ Basiswissen aktualisiert Ernährungsumschau **2009/3**, 172-179.
- ¹¹ Rehner G., Daniel H., *Biochemie der Ernährung*. 2. Aufl. Spektrum Verlag, Heidelberg, **2002**.
- ¹² Steinmüller R., Hygiene-Report, *Biogene Amine in Lebensmitteln*, Harnisch Verlag, Nürnberg, **2015/1**, 12-17.
- ¹³ Dunkelberg H., Gebel T., Hartwig A., (Hg): *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie*, Wiley VCH, Weinheim, **2007**.
- ¹⁴ Poulin R., Pelletier G., Pegg A. E., *Biochemical Journal* **1995**, 311(Pt 3), 723-7.
- ¹⁵ Marton L. J., Pegg A. E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1995**, 35, 55.
- ¹⁶ Tabor C. W., Tabor H., *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, 53, 749.
- ¹⁷ Gentile V., et al., *Journal of Cell Biology* **1992**, 119(2), 463-74.
- ¹⁸ Kusunoki S. and. Yasumasu I., *Developmental Biology* **1978**. 67(2), 336-45.
- ¹⁹ Lewenhoeck D. A., *Philos. Trans. R. Soc. London* **1678**, 12, 1040.
- ²⁰ Igarashi K., Kashiwagi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000/19**, 271(3), 559-64.

- ²¹ Guggisberg A., Hesse M., Alkaloids, *Academic Press* **1983**, 22, 25.
- ²² Guggisberg A., Hesse M., Alkaloids, *Academic Press* **1998**, 50, 219.
- ²³ **a)** Pegg A. E., McCann P. P., Polyamine metabolism and function, *American Journal of Physiology* **1982**, 243(5), 212-21; **b)** McCormack S. A., Johnson L.R., *Journal of Physiology and Pharmacology* **2001**, 52(3), 327-49; **c)** Schindler M., Koppel D. E., Sheetz M. P., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**, 77(3), 1457-61; **d)** Schuber F., *Biochemical Journal* **1989**, 260(1), 1-10; **e)** Seiler N., *Neurochemical Research* **2000**, 25(4), 471-490; **f)** Wang J.Y., *et al.*, *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **2000**, 278(2), 303-14; **g)** Wallis S. *et al.*, *Molecular Biology of the Cell* **2000**, 11(3), 1077-92; **h)** Tobias K. E., Kahana C., *Cell Growth and Differentiation* **1995**, 6(10), 1279-85; **i)** Ray R. M. *et al.*, *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **2000**, 278(3), 480-9.
- ²⁴ Evans K. L., Malmberg R. L., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **1989**, 40, 235.
- ²⁵ Pegg A. E., *Cancer Research* **1988**, 48(4), 759-74.
- ²⁶ Seiler N., Atanassov C. L. and Raul F., *International Journal of Oncology* **1998**, 13(5), 993.
- ²⁷ Janne J., Poso H., Raina A., *Biochemica et Biophysica Acta* **1978**, 473(3-4), 241-93.
- ²⁸ Soler A. P., *et al.*, *Cancer Research* **1998**, 58(8), 1654-1659.
- ²⁹ Seiler N. and Dezeure F., *International Journal of Biochemistry* **1990**, 22(3), 211-8.
- ³⁰ Edwards M. L., Snyder R. D., Stemerik D. M., *Med. Chem.* **1991**, 34, 2414.
- ³¹ Quigley G., Teeter M. M., Rich A., *Puoc. Natl. Acad. Sn. USA* **1978**, 71i, 64.
- ³² Esposito D., Del Vecchio P., Barone G., *Am. Chem. SOC.* **1997**, 119, 2606.
- ³³ Cohen S.S., *Ann. N. Y. Acad. Sei.* **1970**, 171, 869.
- ³⁴ Cohen S.S., *Introduction to the Polyamine*, Prentice-Hall, New Jersey, **1971**.
- ³⁵ Zillig W., Krone W, Albers M., Hoppe-Seyler's, *Z. Physiol. Chem.* **1959**, 317, 131.
- ³⁶ Otake Y., Uchida K., *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 76, 94.
- ³⁷ Frydman B., Westler W. M. und Samejima K., *Org. Chem.* **1996**, 61, 2588.
- ³⁸ Mizushima N., Komatsu M., *Cell* **2011**, 147, 728-741.
- ³⁹ Richter-Landsberg C., Autophagie als Überlebensstrategie, *Biologie in unserer Zeit*, 6/2012, 374.

- ⁴⁰ Wong Y. C., Holzbaur E. L., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, 21, 111(42), 4439-4448.
- ⁴¹ Bild der Wissenschaft, online-Ausgabe, 3/2014, 26.
- ⁴² Mizushima N., Levine M., *Nature* **2008**, 451, 1069-1075.
- ⁴³ Madeo F., Sigrist S. J., *Nature Neuroscience* **2013**, 16, 1453–1460.
- ⁴⁴ F. Madeo *et al.*, *Genes Dev.* **2009**/1, 23 (19), 2253-9.
- ⁴⁵ Toru M., Kurumaji A., Ishimaru M., *Life Sciences* **1994**, 55(22), 1683-99.
- ⁴⁶ Klockgether T. and Turski L., *Annals of Neurology* **1993**, 34(4), 585-93.
- ⁴⁷ Beal M. F., *et al.*, *Journal of Neurochemistry* **1990**, 55(4), 1327-39.
- ⁴⁸ Schafer A., Benz H., W. Fiedler W., Guggisberg A., Bienz S., Hesse M., Alkaloid, *Academic Press*. **1994**, 45, 1.
- ⁴⁹ Nason D. M., Jasys V. J., Kelbaugh P. R., *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2337.
- ⁵⁰ Kimura E., *Tetrahedron* **1992**, 48, 6175.
- ⁵¹ Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., *Biochemie, 6 Auflage*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2007**.
- ⁵² Lees G. J., Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders, *Neuroscience (Oxford, United Kingdom)* **1993**, 54(2), 287-322.
- ⁵³ Meldrum B., Garthwaite J., *Trends in Pharmacological Sciences* **1990**, 11 (9), 379-87.
- ⁵⁴ Andine P., *et al.*, *Developmental Brain Research* **1991**, 64(1-2), 115-20.
- ⁵⁵ Brown K., Mastrianni J. A., *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **2010**, 23, 277-298.
- ⁵⁶ Belay E. D., Schonberger L. B., *Annu. Rev. Public Health* **2005**, 26, 191-212.
- ⁵⁷ P. Gambetti P., Q. Kong Q, W. Zou W., P. Parchi P., Chen S. G., *British Medical Bulletin* **2003**, 66, 213-239.
- ⁵⁸ Collinge J., *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, 24, 519-550.
- ⁵⁹ Isaacs J. D., Jackson G. S., Altmann D. M., *Clin. Exp. Immunol.* **2006**, 146, 1-8.
- ⁶⁰ a) Biasini E., Turnbaugh J. A., Unterberger U., Harris D. A, *Trends in Neurosciences* **2012**, 35, 92-103; b) Gaggelli E., F. Bernardi F., Molteni E., Pogni R., Valensin D., Valensin G., Remelli M., Luczkowski M., Kozlowski H., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 996-1006. c) Lasmézas C. I., *British Medical Bulletin* **2003**, 66, 61-70; d) M. S. Palmer M. S., Dryden A. J., Hughes J. T., Collinge J., *Nature* **1991**, 352, 340-342.

- ⁶¹ Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., *Nature*, **1996**, 382, 180-182.
- ⁶² Wie X, Roettger Y., Tan B, He Y., Dodel R., Hampel H., Wie G., Haney J., Gu H., Johnstone B. H., Liu J., Farlow M. R., Du Y., *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 12858-12866.
- ⁶³ Roettger Y., Zerr I, Dodel R., Bach J.-P., *PLoS ONE* **2013**, 8, 67743.
- ⁶⁴ Roettger Y., Dissertation: Humane Autoantikörper bei Prionerkrankungen, Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- ⁶⁵ Tariot P. N. *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.* **2004**, 291(3), 317-324.
- ⁶⁶ a) Luo J., Yu C.-H., Yu H., Borstnar R., Kamerlin S. C. L., Gräslund A., Abrahams J. P., Wärmländer S. K. T. S., *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, 4, 454-462; b) Luo J., Mohammed I., Wärmländer S. K. T. S., Hiruma Y., Gräslund A., Abrahams J. P., *Biomacromolecules* **2014**, 15, 1985–1991.
- ⁶⁷ R. Wieneke, Dissertation:“ Synthese von Polyaminen und Silaffinen aus Diatomeen und Charakterisierung ihrer Funktion bei der Biomineralisation von Siliziumdioxid“ Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- ⁶⁸ Benoiton L., *Canadian Journal of Chemistry*, **1964**, 42 (9), 2043-2047.
- ⁶⁹ Belyaev A., Krasko E., *Synthesis*, **1991**, 5, 417-419.
- ⁷⁰ a) Mori Y., Aki K., *Journal of chromatography B* **2011**, 879(29), 3303–3309; b) Fujii N., **2005**, 28(9), 1585-1589; c) Wolosker H., Blackshaw S., Snyder S. H., *PNAS* **1999**, 96(23), 13409-13414; d) Ritz-Timme S., Collins M. J., *Ageing research reviews*, **2002**, 1, 43-59.
- ⁷¹ a) Bäuerlein E., *Angew. Chem.* **2003**, 115, 636-664; b) Lowenstamm H. A., Weiner S., *Biomineralization*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**; c) Bäuerlein E., *Handbook of Biomineralization*, Biological Aspects and Structure Formation, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2007**.
- ⁷² Peytcheva A., Antonietti M., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40(18), 3380-3383.
- ⁷³ a) Perry C. C., Keeling-Tucker T., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 537-550; b) Weiner S., Addadi L., *J. Mater. Chem.* **1997**, 7, 689-702.
- ⁷⁴ Ed.: Baeuerlein E., *Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.

- ⁷⁵ a) Sumper M., Brunner E., *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 17-26; b) Sumper M., Kröger N., *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2059-2065; c) Tacke R., *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3197-3200; d) Perry C. C., *Rev. Mineral. Geochem.* **2003**, *54*, 291-327.
- ⁷⁶ a) Tacke R., *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*(20), 3015-3018; b) Treguer P., Nelson D. M., Vanbennekom A. J., Demaster D. J., Leynaert A. & Queguiner B. The Silica Balance in the World Ocean-a Reestimate, *Science* **1995**, *268*(5209), 375-379.
- ⁷⁷ Norton T. A., M. Melkonian, R. A. Andersen, *Algal biodiversity. Phycologia* **1996**, *35*, 308.
- ⁷⁸ <https://www.bgbm.org/de/wissenschaft-diatomeen>, abgerufen am 25.07.2016 um 13:21Uhr.
- ⁷⁹ Bradbury J., *PLoS Biology* **2004**, *2*, 1512-1515.
- ⁸⁰ a) Pollehne, F., Leipe T., Bahl R., Hansen R., *Baltic Sea Science Congress* **2001**; b) N. Kröger N; R. Deutzmann R., Sumper M., *Science* **1999**, *286*, 1129-1132.
- ⁸¹ Wetherbee R., *Science* **2002**, *298*, 547.
- ⁸² Kröger N., Poulsen N., *Annu. Rev. Genet.* **2008**, *42*, 83-107.
- ⁸³ Drum R. W., Pankratz H. S., Post mitotic fine structure of *Gomphonema parvulum*, *J. Ultrastruct. Res.* **1964**, *10*, 217-223.
- ⁸⁴ Del Amo Y., Brzezinski M. A., *J. Phycol.* **1999**, *35*, 1162-1170.
- ⁸⁵ Hildebrand M., Wetherbee R., *Silicon Biomineralization*, Ed.: W. E. G. Müller, Springer: Berlin, **2003**, *33*, 11-57.
- ⁸⁶ Bernecker A. C., Dissertation: „Die Biomineralisation von Silica: Langkettige Polyamine und Aminolipide als selbstorganisierende Template für biomimetische Präzipitationen“, Georg-August-Universität Göttingen, **2009**.
- ⁸⁷ Schechner G., Dissertation; „Über die festkörperchemischen Eigenschaften biomineralisierter Kieselsäuren und über die biomimetische Synthese mesostrukturierter Alkylsaccharid-Kieselsäure-Komposite“, Universität Hannover, **2000**.
- ⁸⁸ Datenblatt Siliciumdioxid (PDF) bei MERCK, abgerufen am 27.07.2016.
- ⁸⁹ Riedel E., Janiak C., *Anorganische Chemie, 7 Auflage*, Berlin, **2007**.
- ⁹⁰ Datenblatt: pyrogene Kieselsäure (PDF) WACKER, abgerufen am 27.07.2016.
- ⁹¹ Iler R. K., *The Chemistry of Silica*, Wiley: New York, **1979**.

- ⁹² Hollemann A. F., Wiberg E., Wiberg N, Lehrbuch der anorganischen Chemie, Ed.: de Gruyter: New York, **1985**, 91-100.
- ⁹³ Brinker C. J., Non-Cryst J., *Solids* **1988**, *100*, 31-50.
- ⁹⁴ Coradin, T., Lopez P. J., *ChemBioChem* **2003**, *4*(4), 251-259.
- ⁹⁵ Allen L. H., Matijevic E., Colloid J., *Interface Sci.* **1970**, *33*, 420-429.
- ⁹⁶ Schwieger W., Klumpp W., Al-Thabaiti Shaeel A., Hartmann M., *Chemie Ingenieur Technik* **2016**, *88*, 237-257.
- ⁹⁷ Hecky R. E., K. Mopper K., Kilham P., Degens E. T., *Mar. Biol.* **1973**, *19*, 323-331.
- ⁹⁸ Kröger N., Sumper M., In *Biom mineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application*; E. Baeuerlein, Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **2000**, 152-170.
- ⁹⁹ Nakajima T., Volcani B. E., *Science* **1969**, *164*(886), 1400.
- ¹⁰⁰ Nakajima T., Volcani B. E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *39*(1), 28-33.
- ¹⁰¹ Kröger N., Bergsdorf C., Sumper M., *European journal of biochemistry/ FEBS* **1996**, *239*(2), 259-264.
- ¹⁰² Kröger N., Bergsdorf C., Sumper M., *Embo J* **1994**, *13*(19), 4676-4683.
- ¹⁰³ Volcani B. E., Simpson T. L., In *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems*, Eds.: New York, Heidelberg, Berlin, **1981**, 157-200.
- ¹⁰⁴ Kröger N., Lehmann G., Rachel R., Sumper M., *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 99-105.
- ¹⁰⁵ Kröger N., Wetherbee R., *Protist* **2000**, *151*(3), 263-273.
- ¹⁰⁶ Kröger N., Lorenz S., Brunner E. Sumper M., *Science* **2002**, *298*(5593), 584-586.
- ¹⁰⁷ Davis A. K., Hildebrand M., Palenik B., *Eukaryotic Cell* **2006**, *5*(7), 1157-1168.
- ¹⁰⁸ Davis A. K., Hildebrand M., Palenik B., *J. Phycol.* **2005**, *41*(3), 577-589.
- ¹⁰⁹ Sumper M., Brunner E., *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1187-1194.
- ¹¹⁰ Wenzl S., Hett R., Richthammer P., Sumper M., *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*(9), 1729-1732.
- ¹¹¹ Shimizu K., Cha V G., Stucky D., Morse D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 6234.
- ¹¹² Shimizu K., Morse D. E., In *Biom mineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application*; E. Baeuerlein, Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, **2000**, 207-220.

- ¹¹³ Kröger N., Deutzmann R., Bergsdorf C., Sumper M., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97(26), 14133-14138.
- ¹¹⁴ Sumper M., Brunner E., Lehmann G., *FEBS Lett* **2005**, 579(17), 3765-3769.
- ¹¹⁵ Sumper M., Lehmann G., *Chembiochem.* **2006**, 7(9), 1419-1427.
- ¹¹⁶ Zhou Y., Shimizu K., Cha J. N., Stucky G. D., Morse D. E., *Angew. Chem.* **1999**, 38, 780-782.
- ¹¹⁷ Cha J. N., Shimizu K., Zhou Y., Christiansen S. C., Chmelka B. F., Stucky G. D., Morse. D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 361-365.
- ¹¹⁸ Poulsen N., Sumper M., Kröger N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100(21), 12075.
- ¹¹⁹ Poulsen N., Kröger N., *J. Biol. Chem.* **2004**, 279(41), 42993-42999.
- ¹²⁰ Sumper M., Hett R., Lehmann G., Wenzl S., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46(44), 8405.
- ¹²¹ Armbrust E. V., Berges J. A., Bowler C., Green B. R., Martinez D., Putnam N. H., Zhou S., Allen A. E., Apt K. E., Bechner M., Brzezinski M. A., Chaal B. K., Chiovitti A., Davis A. K., Demarest M. S., Detter J. C., Glavina T., Goodstein D., Hadi M. Z, Hellsten U., Hildebrand M., Jenkins B. D., Jurka J., Kapitonov V. V., Kroger N., Lau W. W. Y., Lane T. W., Larimer F. W., Lippmeier J. C., Lucas S., Medina M., Montsant A., Obornik M., Parker M. S., Palenik B., Pazour G. J., Richardson P. M., Rynearson T. A., Saito M. A., Schwartz D. C., Thamtrakoln K., Valentin K., Vardi A., Wilkerson F. P., Rokhsar D. S., *Science* **2004**, 306, 79-86.
- ¹²² Sumper M., *Science* **2002**, 295, 2430-2433.
- ¹²³ Hawkins K. M., Wang S. S.-S., Ford D. M., Shantz D. F., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9112-9119.
- ¹²⁴ Brunner E., Lutz K., Sumper M., *Phys. Chem. Chem. Phys* **2004**, 6, 854-857.
- ¹²⁵ Gröger C., Lutz K., Brunner E., *Cell Biochem. Biophys.* **2008**, 50, 23-39.
- ¹²⁶ Sumper M., Lorenz S., Brunner E., *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5350-5353.
- ¹²⁷ Sumper M., *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2301.
- ¹²⁸ Sumper M., Lorenz S., Brunner E., *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, 42(42), 5192-5195.
- ¹²⁹ Lutz K., Gröger C., Sumper M, Brunner E., *Phys. Chem. Chem. Phys* **2005**, 7, 12812.
- ¹³⁰ Mizutani T., Nagase H., Ogoshi H., *Chem. Lett.* **1998**, 27(2), 133-134.

- ¹³¹ Vrieling E. G., Gieskes W. W. C., Beelen T. P. M., *J. Phycol.* **1999**, *35*, 548-559.
- ¹³² Li C.-W., Chu S., Lee M., *Protoplasma* **1989**, *151*, 158-163.
- ¹³³ Kröger N. & Poulsen N., in Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation (Ed.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH: Weinheim, **2007**, 43-58.
- ¹³⁴ Vrieling E.-G., Beelen T. P. M., van Santen R. A., Gieskes W. W. C., *Angew.Chem.* **2002**, *114*, 1613-1616.
- ¹³⁵ S. Horstmann, Dissertation: „Streng biomimetische Modellsysteme für die Biomineralisation von Siliciumdioxid“, Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, **2006**.
- ¹³⁶ Pickett-Heaps J., Schmid A. M. M., Edgar L. A., The cell biology of diatom valve formation, *Bristol Biopress* **1990**.
- ¹³⁷ Kröger N., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 662-669.
- ¹³⁸ Robinson D. H., Sullivan C. W., *TIBS* **1987**, *12*, 151-154.
- ¹³⁹ Vrieling E. G., Gieskes W. W. C., Beelen T. P. M., *J. Phycol.* **1999**, *35*, 548-559.
- ¹⁴⁰ Gordon R., Drum R. W., *Int. Rev. Cytol.* **1994**, *150*, 243-272.
- ¹⁴¹ Schmid A. M. M., *Protoplasma* **1994**, *181*, 43-60.
- ¹⁴² a) McIntosh J.M., Corpuz G.O., Layer R. T., *J Biol Chem.* **2000**, *42*, 32391-32397; b) Prialt auf der Website der europäischen Arzneimittelagentur, abgerufen am 04.07.2016.
- ¹⁴³ a) Schulz J.B., *et al.*, *Molecular and Cellular Biochemistry* **1997**, *174*, 193-197; b) Usherwood P.N., *Farmaco* **2000**, *55*(3), 202-205; c) Rock D.M., Macdonald R.L., *Molecular Pharmacology* **1992**, *41*(1), 83-88.
- ¹⁴⁴ a) Hahn F., Schepers U., *Combinatorial Chemistry on Solid Supports*, Ed.:S. Bräse, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2007**, 278, 135; b) Hone N. D., Payne L. J., *Tetrahedron Lett* **2000**, *41*, 6149-6152.
- ¹⁴⁵ a) Kocienski P. J., *Protecting Groups*, Thieme, Stuttgart, **2005**; b) Atwell G. J., Denny W. A., *Synthesis*, Stuttgart **1984**, 1032; c) Murahashi S. I., Naota T., Nakajima N., *Chem Lett* **1987**, *5*, 879; d) Adamczyk M., Fishpaugh J. R., Heuser K. J., *Org Prep Proced Int* **1998**, *30*, 339; e) Zang E. L., Sadler P. J., *Synth Comm.* **1997**, *27*, 3145.
- ¹⁴⁶ a) Manov N., Bienz S., *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7893; b) Manov N., Tzouros M., Chesnov S., Bigler L., Bienz S., *Helv Chim Acta* **2002**, *85*, 2827; c) da Silva E. T.,

Cunha A. S., Lima E. L. S., *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12*, 3207; **d)** da Silva E. T., Fona F. S., Lima E. L. S., *J Brazil Chem Soc* **2004**, *15*, 433.

¹⁴⁷ **a)** Kan T, Fukuyama T., *Chem Commun.* **2004**, *4*, 353-359; **b)** Olsen C. A., Jorgensen M. R., Witt M., Mellor I. R., Usherwood P. N. R., Jaroszewski J. W., Franzyk H., *European J Org Chem.* **2003**, 3288; **c)** Olsen C. A., Witt M., Hansen S. H., Jaroszewski J. W., Franzyk H., *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6046-6055.

¹⁴⁸ **a)** Nagarajan S., Ganem B., *J Org Chem* **1985**, *50*, 5735; **b)** Mcmanis J. S., Ganem B., *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2041; **c)** Nash I. A., Bycroft B. W., Chan W. C., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2625; **d)** Karigiannis G., Papaioannou D., *Eur. J.Org. Chem.* **2000**, 1841-1863; **e)** Olsen C. A., Jorgensen M. R., Hansen S. H., Witt M., Jaroszewski J. W., Franzyk H., *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1703.

¹⁴⁹ Brückner R., Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden. *3 Auflage*, Spektrum-Akademischer Verlag, **2004**.

¹⁵⁰ **a)** Dixon M. J., Maurer R. I., Biggi C., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4513-4526; **b)** Bycroft B. W., Chan W. C., Chhabra S. R., Teesdale-Spittlea P. H., Hardyb P. M., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1993**, 776-777; **c)** Bycroft B. W., Chan W. C., Chhabra S. R., Hone N. D., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1993**, 778-779.

¹⁵¹ Wienecke R., Dissertation: „Synthese von Polyaminen und Silaffinen aus Diatomeen und Charakterisierung ihrer Funktion bei der Biomineralisation von Siliziumdioxid,, Philipps-Universität zu Marburg, **2009**.

¹⁵² Tung C.-H., *Biopolymers* **2004**, *76*, 391-403.

¹⁵³ König W., Geiger R., *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.

¹⁵⁴ **a)** Hall D. G., Laplante C., Manku S., Nagendran J., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 698-699; **b)** Wang F., Manku S., Hall V, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1581-1583; **c)** Manku S., Laplante C., Kopac D., Chan T., Hall D. G., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 874-885; **d)** Nefzi A., Ostresh J. M., Houghten R. A., *Tetrahedron* **1999**, *55*, 335-344; **e)** Nefzi A., Giulianotti M. A., Ong N. A., Houghten R. A., *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3349-3350; **f)** Nefzi A., Ostresh J. M., Meyer J.-P., Houghten R. A., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 931-934.

¹⁵⁵ **a)** Brown H. C., Heim P., *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 912-916; **b)** Brown H. C., Narasimhan S., Choi Y.O.N.G.M., *Synthesis* **1981**, *6*, 441-442.

- ¹⁵⁶ Batokha M.: Diplomarbeit: „Synthese und Anwendung kationischer Peptide“, Philipps-Universität zu Marburg, **2012**.
- ¹⁵⁷ Haas C.: Bachelorarbeit: Philipps-Universität zu Marburg, **2014**.
- ¹⁵⁸ Lane C. F., *Aldrichem. Acta* **1973**, 6, 51-58.
- ¹⁵⁹ Gasparini G., Sargsyan G., Bang E.-K., Sakai N., Matile S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 7328-7331.
- ¹⁶⁰ Jullian M., Hernandez A., Maurras A., Puget K., Amblard M., Martinez J., Subra G., *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 260-263.
- ¹⁶¹ Eintrag zu Fluorescein. In: Römpp Online. Georg Thieme Verlag, abgerufen am 26.08. **2016**.
- ¹⁶² Laugel N., Hemmerle J., Porcel C., Voegel J. C., Schaaf P., Ball V., *Langmuir* **2007**, 23(7), 3706-3711.
- ¹⁶³ Patwardhan S. V., Clarson S. J., *Silicon Chemistry* **2002**, 1(3), 207-21.
- ¹⁶⁴ Zollfrank C., Scheel H., Greil P., *Advanced Materials* **2007**, 19(7), 984.
- ¹⁶⁵ Yeh Y. Q., Chen B. C., Lin H. P., Tang C. Y., *Langmuir* **2006**, 22(1), 6-9.
- ¹⁶⁶ Cermeño P., Falkowski P. G., Romero O. E., Schaller M. F., Vallina S. M., *PNAS* **2015**, 112(14), 4239-4244.
- ¹⁶⁷ Bernecker A., Wieneke R., Riedel R., Seibt M., Geyer A., Steinem C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 1023-1031.
- ¹⁶⁸ Wieneke R., Bernecker A., Riedel R., Sumper M., Steinem C., Geyer A., *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 5482-5486.
- ¹⁶⁹ Suzuki K., Sato S., Fujita M., *Nature Chemistry*, **2010**, 2, 25-29.
- ¹⁷⁰ Silverstein T. B., *J. Chem. Educ.*, **2012**, 1474-1475.
- ¹⁷¹ Belton D. J., Patwardhan S. V., Annenkov V. V., Danilovtseva E. N., Perry C. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2008**, 5963-5968.
- ¹⁷² Lechner C., Dissertation: „Functional analysis and biotechnological applications of silaffin peptides“ Universität München, **2013**.
- ¹⁷³ Lechner C. C., Becker F. W., *Chem. Sci.* **2012**, 3500-3504.
- ¹⁷⁴ Olsen C. A., Witt M., Jaroszewski J. W., Franzyk H., *Org Lett.* **2004**, 6, 1935.

- ¹⁷⁵ Keinanen T. A., Hyvonen T., Pankaskie M. C., Vepsalainen J. J., Eloranta T. O., *J Biochem* **1994**, *116*, 1056.
- ¹⁷⁶ Chhabra S. R., Khan A. N., Bycroft B. W., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1095.
- ¹⁷⁷ Olsen C. A., Witt M., Jaroszewski J. W., Franzyk H., *Org Lett.* **2003**, *5*, 4183.
- ¹⁷⁸ Tomasi S., Picard S., Laine C., Babonneau V., Goujeon A., Boustie J., Uriac P., *J Comb Chem.* **2006**, *8*, 11.
- ¹⁷⁹ Picard S., Le Roch M., Renault J., Uriac P., *Org Lett.* **2004**, *6*, 4711.
- ¹⁸⁰ Fukuyama T., Jow C. K., Cheung M., *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373.
- ¹⁸¹ Dankwardt S. M., Smith D. B., Porco J. A., Nguyen C. H., *Synlett* **1997**, *7*, 854.
- ¹⁸² Beaver K. A., Siegmund A. C., Spear K. L., *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1145.
- ¹⁸³ Strømgaard K., Andersen K., Ruhland T., Krogsgaard-Larsen P., Jaroszewski J. W., *Synthesis* **2001**, *6*, 877-884.
- ¹⁸⁴ Sasaki Y., Coy D. H., *Peptides* **1987**, *8*, 119.
- ¹⁸⁵ Sasaki Y., Murphy W. A., Heiman M. L., Lance V. A., Coy D. H., *J Med Chem.* **1987**, *30*, 1162.
- ¹⁸⁶ Vergnon A. L., Pottorf R. S., Player M. R., *Abstr Pap Am. Chem.Soc.* **2003**, *225*, 305.
- ¹⁸⁷ Vergnon A. L., Pottorf R. S., Player M. R., *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 91.
- ¹⁸⁸ Karigiannis G., Mamos P., Balayiannis G., Katsoulis I., Papaioannou D., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5117.
- ¹⁸⁹ Vassis S., Karigiannis G., Balayiannis G., Militopoulou M., Mamos P., Francis G. W., Papaioannou D., *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1579.
- ¹⁹⁰ Akamatsu H., Kusumoto S., Fukase K., *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8867.
- ¹⁹¹ Choi S., Bruce I., Fairbanks A. J., Fleet G. W. J., Jones A. H., Nash R. J., Fellows L. E., *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5517-5520.
- ¹⁹² Ostresh J. M., Schoner C. C., Hamashin V. T., Nefzi A., Meyer J.-P., Houghten R. A., *J. Org. Chem.* **1998**, *27*, 8622-8623.
- ¹⁹³ Hidai Y., Kann T., Fukuyama T., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4711-4714.
- ¹⁹⁴ Mąkosza M.: „Organische Reaktionen in Zweiphasen-Systemen“, *Chemie in unserer Zeit*, 1978, *12*(5), 161-168.

- ¹⁹⁵ Hidai Y., Kan T., Fukuyama T., *Chem.Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1570.
- ¹⁹⁶ Kann T, Kobayashi H., Fukuyama T., *Synlett*, **2002**, *8*, 1338-1340.
- ¹⁹⁷ Chhabra S. R., Khan A. N., Bycroft B. W., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1099-1102.
- ¹⁹⁸ Biron E., Chatterjee J., Kessler H., *J. Peptide Sci.* **2006**, *12*, 213-219.
- ¹⁹⁹ Mitsunobu O., *Synthesis* **1981**, 1-28.
- ²⁰⁰ Zhi-Ping Huang, Jin-Tang Du, Yu-Fen Zhao, Yan-Mei Li, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2006**, *12*, 187-193.
- ²⁰¹ Perich J. W, Ede N. J., Eagle S., Bray A. M., *Lett. Pept. Sci.* **1999**, *6*, 91-97.
- ²⁰² Jad Y. E., Acosta G. A., Khattab S. N., de la Torre B. G., Govender T., Kruger H. G., El-Faham A., Albericio F., *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2393-2398.
- ²⁰³ Sumper M., Hett R., Lehmann G., Wenzl S., *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8557-8560.
- ²⁰⁴ Jad Y. E., Khattab S. N., de la Torre B. G., Govender T., Kruger H. G., El-Faham A., Albericio F., *Org Biomol Chem.* **2014**, *12*, 8379-85.
- AGUZZI A, Heikenwalder M, Polymenidou M. (2007) Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, *8*, 552-561.
- AMENITSCH, H., Benetti, F., Ramos, A., Legname, G., and Requena, J. R. (2013) SAXS structural study of PrP(Sc) reveals ~11 nm diameter of basic double intertwined fibers. *Prion*, *7*, 496–500.
- ANTONYUK S. V., Trevitt C. R., Strange R. W., Jackson G. S., Sangar D., Batchelor M, Cooper S., Fraser C., Jones S., Georgiou T., Khalili-Shirazi A., Clarke A. R., Hasnain S.S and Collinge J. (2009) Crystal structure of human prion protein bound to a therapeutic antibody. *PNAS*, *106* (8), 2554-2558.
- ARIAS C. A., Martín-Martinez M. (1999) Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Molecular microbiology*, *31*(6), 1653-1664.
- Baldwin, M. A., Stahl, N., Reinders, L. G., Gibson B.W., PRUSINER S.B., & Burlingame A.L. (1990). Permethylated and tandem mass spectrometry of oligosaccharides having free hexosamine: Analysis of the glycoinositol phospholipid anchor glycan from the scrapie prion protein. *Anal. Biochem.* *191*, 174-182.

- BAUMGARTH N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effe Gold, M., R. Pul, J. P. Bach, M. Stangel, R. DODEL (2012) Pathogenic and physiological autoantibodies in the central nervous system. *Immunol Rev.*, 248(1), 68-86.
- BENNER, E. J., R. L. Mosley, C. J. Destache, T. B. Lewis, V. Jackson-Lewis, S. Gorantla, C. Nemachek, S. R. Green, S. Przedborski, H. E. Gendelman (2004). Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(25), 9435-40.
- BORCHELT, D. R., Scott, M., Taraboulos, A, Stahl N. & Prusiner S. B. (1990) Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.*, 110, 743-752.
- Brown, P., and GAJDUSEK, D. C. (1991). The human spongiform encephalopathies: kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and the Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 172, 1–20.
- Cao R., ZHANG Y. (2004) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr. Opinion in Gen. & Dev.*, 14(2), 155–164.
- CASTILLA J, Saá P, Hetz C, Soto C. (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, 121(2), 195-206.
- CAUGHEY B, LANSBURY P. T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci.*, 26, 267-98.
- CAUGHEY B, RAYMOND G. J., Priola S. A., Kocisko D. A., Race R. E., Bessen R. A., Lansbury P. T. Jr, Chesebro B. (1999) Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistant PrP in cell culture and cell-free systems. An update. *Mol Biotechnol.*, 13(1), 45-55.
- CAUGHEY B., Kocisko D. A, Raymond G. J., (1995) Aggregates of scrapie-associated prion protein to the protease resistant state, *Chem. Biol.*, 2, 807-817.
- CAUGHEY B. & RAYMOND G. J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.*, 266, 18217-18223.

- CAUGHEY, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., & Caughey, W.S. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie- associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672-7680.
- CHABRY J., Priola, S. A., Wehrly, K., Nishio , J., Hope, J., Chesebro, B. (1999) Species-Independent Inhibition of Abnormal Prion Protein (PrP) formation by a Peptide Containing a Conserved PrP Sequence. *J. Virol.*, 73, 6245-6250.
- CHRISTIAN, B. E., M. E. Haque and L. L. Spremulli (2010) The effect of spermine on the initiation of mitochondrial protein synthesis. *Biochemical and biophysical research communications* 391.
- CITRON, M. (2004) Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov.*, 9(5), 387-98.
- COHEN F. E, Prusiner S. B. (1998) Pathologic conformations of prion proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 793-819.
- COIL D. A, Miller A. D. (2004) Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J Virol.*, 78(20), 10920-6.
- COLBY D. W., PRUSINER S. B., (2011) *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1, 3(1).
- COLLINGE *et. al* (1997) Human Prion Diseases and Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). *Hum. Mol. Genet.*, 6 (10), 1699-1705
- CORTEZ L, SIM V. (2014) The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion*, 8(2).
- DAVANIPOUR Z., Goodman L., Alter M., Sobel E., Asher D. & Gajdusek D.C. (1984) Possible modes of transmission of Creutzfeldt Jakob disease. *New England Journal of Medicine*, 311, 24.
- De Armond, S. J., Yang, S. L., Lee, A., Bowler, R., Taraboulos, A., Groth, D., and PRUSINER S. B. (1993) Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 6449-6453.
- DLOUHY S. R., Hsiao K., Farlow M. R, Faroud T., Conneally P. M., Johnson P., Prusiner S. B., *et al.* (1992) Possible person-to-person transmission of Creutz-feld-Jacob disease. *N. Engl. J. Med.*, 290, 692-693.

DODEL, R., H. Hampel, C. Depboylu, S. Lin, F. Gao, S. Schock, S. Jackel, X. Wei, K. Buerger C., Hoft B., Hemmer H., Moller J., Farlow M., Oertel W. H., Sommer N., Du Y. (2002). Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 52(2), 253-256.

DOH-URA K, Iwaki T, Caughey B. (2000) Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J. Virol.*, 74, 4894-4897.

DONEVAN, S. D. and M. A. Rogawski (1995) Intracellular polyamines mediate inward rectification of Ca(2+)-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92.

DONNE D. G., J. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T.L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner P. E. Wright, H. J. Dyson (1997) Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): The N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13452-13457.

Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Fröhlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, MADEO F. (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol.*, 11(11), 1305-1314.

FERNÁNDEZ-BORGES N, de Castro J, Castilla J. (2009) In vitro studies of the transmission barrier. *Prion*, 3, 220-223.

Flores F. B., Sanchez-Bel P., Estañ M. T., MARTINEZ-RODRIGUEZ M. M., Moyano E., Morales B., Campos J. F., Garcia-Abellán J. O., Egea M. I., Fernández-Garcia N., Romojaro F., Bolarín M. C. (2010) The effectiveness of grafting to improve tomato fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 211-217.

FRIEDMAN M. *et al.* (2010) Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chemistry & biodiversity*, 7(6), 1491-1530.

GABIZON, A., A, Barenholz, Y, Bialer, M (1993) Prolongation of the circulation time of doxorubicin encapsulated in liposomes containing a polyethylene glucol-derivatized phospholipid: pharmacokinetic studies in rodents and dogs. *Pharm. Res.*, 10, 703.

GASSET, M., Baldwin, N., A., Fletterick R.J., Prusiner, S.B., (1993) Perturbation of secondary structure of the scrapie prion protein under conditions associated with changes in infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1-5.

GILCH S, Winklhofer K. F, Groschup M. H, Nunziante M, Lucassen R, Spielhauer C, Muranyi W, Riesner D, Tatzelt J, Schätzl H. M. (2001) Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J.*, 20: 3957-3966.

GRIFFITH, J. S. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature*, 215(5105), 1043-4.

GROVEMAN, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., and Caughey, B. (2014) Parallel in-register intermolecular β -sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J. Biol. Chem.*, 289, 24129-24142.

HASHIMOTO A. *et al.* (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS letters*, 296(1), 33-36.

HEGDE, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., De Fea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Lingappa, V. R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science*, 279, 827-834

HEPPNER, F. L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M. A., Rüllicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R. M., Kalinke, U., and Aguzzi, A. (2001) Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science*, 294, 178-182.

HSIAO K., Dlouhy S. R, Farlow M. R., Cass C., Da Costa M., Conneally P. M., Hodes M. E., Ghetti B. & Prusiner S. B (1992) Mutant prion proteins in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nature Genetics*, 1, 68-71.

IGARASHI, K. and K. KASHIWAGI (2010) Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol Biochem.*, 48(7), 506-12.

INGRAM, R. E., Overbey, T. & Fortier, M. (2001) Individual differences in dysfunctional automatic thinking and parental bonding: Specificity of maternal care. *Personality and Individual Differences*, 30, 401-412.

ISA, T., M. Iino, S. Itazawa and S. Ozawa (1995) Spermine mediates inward rectification of Ca^{2+} -permeable ampa receptor channels. *Neuroreport*, 6.

Jahng, J. W., Ryu, V., Yoo, S. B., Noh, S. J., Kim, J. Y. and Lee, J. H. (2010) Mesolimbic dopaminergic activity responding to acute stress is blunted in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience*, 171, 144-152.

JARRETT J. T., LANSBURY P. T. Jr. (1992) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 73(6), 1055-1058.

KAYED R, Head E, Thompson J. L, McIntire T. M, Milton S. C, Cotman C. W, Glabe C. G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 18; 300(5618), 486-9.

KHOSRAVANI H., Zhang Y., Tsutsui S., Hameed S., Altier C., Hamid J., Chen L., Villemaire M., Ali Z., Jirik F. R., Zamponi G. W. (2008) Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol.*, 5, 181(3), 551-65.

KOH, D. S., N. Burnashev and P. Jonas (1995). Block of native Ca⁽²⁺⁾-permeable ampa receptors in rat brain by intracellular polyamines generates double rectification. *The Journal of physiology* 486 (2).

Konno R., BRÜCKNER H., D'Aniello A., Fisher G., Fujii N., Homma H. (2007) D-amino acids: a new frontier in amino acids and protein research-practical methods and protocols. *Nova Science Publishers*, 629.

KREIL G. *et al.* (1994) Peptides containing a D-amino acid from frogs and molluscs. *The Journal of biological chemistry* 269(15), 10967-10970.

KURATA, H. T., L. J. Marton and C. G. Nichols (2006) The polyamine binding site in inward rectifier K⁺ channels. *The Journal of general physiology* 127.

LEGNAMÉ G., Baskakov I. V, Nguyen H. O, Riesner D, Cohen F. E, DeArmond S. J, Prusiner S. B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science*, 305(5684), 673-6.

LINDEN, R., Martins, V. R., Prado, M. A., Cammarota, M., Izquierdo, I., Brentani, R. R., *et al.* (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.*, 88, 673-728.

LOPATIN, A. N., E. N. Makhina and C. G. Nichols (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372.

MABBOTT N. A., BRUCE M. E. (2001) The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol.*, 82(10), 2307-18.

MacDonald S. T, Sutherland K, IRNSIDE J. W (1996) Prion protein genotype and pathological phenotype studies in sporadic Creutzfeld-Jacob disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 22, 285-386.

MASTRIANNI J.A., Nixon R, Layzer R, Telling G. C. Han D., DeArmond S. J. *et al.* (1999) Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *N. Engl. J. Med.*, 12(4), 187.

MIYAMOTO, S., K. Kashiwagi, K. Ito, S. Watanabe and K. Igarashi (1993). Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in escherichia coli. *Archives of biochemistry and biophysics* 300.

MORILLAS M., Vanik. D. L, Surewicz W. K. (2001) On the mechanism of alpha-helix to beta-sheet transition in the recombinant prion protein. *Biochemistry*, 40, 23 6982-7.

MOTHET J. P., Parent A. T., Wolosker H., Brady R. O., Jr., Linden D. J., Ferris C. D., *et al.* (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 4926-4931.

NEFF, F., X. Wei, C. Nolker, M. Bacher, Y. Du, R. Dodel (2008) Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders. *Autoimmun Rev.*, 7(6), 501.

NICOLAS, E., Chenouard, N., Olivo-Marin, J.C., Guichet, A. (2009) A dual role for actin and microtubule cytoskeleton in the transport of Golgi units from the nurse cells to the oocyte across ring canals. *Mol. Biol. Cell.*, 20(1), 556-568.

NITTA, T., K. Igarashi and N. Yamamoto (2002) Polyamine depletion induces apoptosis through mitochondria-mediated pathway. *Experimental cell research*, 276.

OESCH B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, *et al.* (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40(4), 735-46.

OWEN F, Poulter M, Lofthouse R, Collinge J, Crow TJ, Risby D, Baker HF, Ridley RM, Hsiao K, Prusiner SB. (1989) Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet.*, 7, 1(8628), 51-2.

PAN G, *et al.* (1993) Mechanism of cleavage and ligation by FLP recombinase: classification of mutations in FLP protein by in vitro complementation analysis. *Mol Cell Biol*, 13(6), 3167.

PARCHI P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H. (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol.*, 46(2), 224-33.

PATTISON I. H. (1965) *J. Comp. Pathol.*, 75, 159-164.

Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Burton, D. R., and PRUSINER, S. B. (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, 412, 739-743.

Peters P. J., Mironov A. Jr., Peretz D., van Donselaar E., Leclerc E., Erpel S., DE ARMOND S. J., Burton D. R., Williamson R. A., Vey M., and PRUSINER S. B. (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol.*, 162(4), 703-717.

POULTER M.O, Barker, J. L, O`Carroll, A.-M. Lolait, S. J, Mahan L.C. (1992) *J. Neurosci.*, 12, 2888-2900.

PRUSINER, S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252, 1515-1522.

Ravikumar B, SARKAR S, RUBINSZTEIN D. C. (2008) Clearance of mutant aggregate-prione proteins by autophagy. *Methods Mol Biol.*, 445, 195-211.

REQUENA, J. R., and WILLE, H. (2014). The Structure of the infectious prion protein: experimental data and molecular models. *Prion*, 8, 60-66.

REYNOLDS, M.P., Singh, R.P., Ibrahim, A., Ageeb, O.A.A., Larqué-Saavedra, A. & Quick, J.S. (1998). Evaluating physiological traits to complement empirical selection for wheat in warm environments. *Euphytica*, 100: 84-95.

RIEK R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber & K. Wüthrich (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, 382, 180-182.

ROBINSON T. *et al.* (1976) D-amino acids in higher plants. *Life sciences*, 19(8), 1097-1102.

ROETTGER Y, Du Y, Bacher M, Zerr I, DODEL R, *et al.* (2013) Immunotherapy in prion disease. *Nat Rev Neurol.* 9(2), 98-105.

SCHIPPER, R. G., L. C. Penning and A. A. Verhofstad (2000) Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: Effectors or protectors? *Seminars in Cancer Biology* 10.

SHARONOVA I. N, Vorobjev V. S, Haas H. L (1998) High-affinity copper block of GABA(A) receptor-mediated currents in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 522–528.

SMIRNOVAS V., Baron G. S., Offerdahl D. K., Raymond G. J., Caughey B., Surewicz W. K. (2011) Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18, 504-506.

STAHL N., PRUSINER S. B. (1991) Prions and Prion proteins. *FASEB J.*, 5, 2799-2807.

Steele A. D., Lindquist, S., and AGUZZI, A. (2007) The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion*, 1, 83-93.

SWIETNICKI, W., M, MORILLAS, S. G. Chen, P. Gambetti, W.K. Surewicz (2000) Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP 90-231. *Biochemistry*, 39, 424-431.

TARABOULOS A., Serban D., & Prusiner S. B. (1990) Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently-infected cultured cells. *J. Cell Biol.*, 110, 2117-2132.

Tatum M. H., Cohen-Krausz S., Khalili-Shirazi A., Jackson G.S., Orlova E.V., COLLINGE J., Clarke A. R., Saibil H. R. (2006) Elongated oligomers assemble into mammalian PrP amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.*, 357, 975-985.

TAYLOR, J. P., J. Hardy, K. H. Fischbeck (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 296(5575), 1991-1995.

TELLING G. C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F. E., DeArmond S. J., Prusiner S. B. (1995) Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 83(6), 79-90.

TOBLER, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride, J. C. Manson (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, 380(6575), 639-42.

TREVITT C. R., COLLINGE J. (2006) A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain.*, 129(9), 2241-65.

TURK E., Teplow D.B., Hood L. E. & Prusiner S. B. (1988) Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.*, 176, 21-30.

VAN HEIJENOORT J. (2001) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep.* 18(5), 503-19.

VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ *et al.* (2012) Structural Organization of Mammalian Prions as Probed by Limited Proteolysis. *PLoS One*, 7 (11).

VILETTE S, Piron, E, Cointault, F. and Chopinet, B. (2008) Centrifugal spreading of fertilizer: deducing three dimensional velocities from horizontal outlet angles using computer vision. *Biosystems Engineering*, 99(4), 496-507.

WATANABE S., Kusama-Eguchi K., Kobayashi H., Igarashi K., (1991). "Estimation of polyamine binding to macromolecules and atp in bovine lymphocytes and rat liver." *The Journal of biological chemistry*, 266.

WEAVER V.M., PETERSEN O.W., Wang F., Larabell C.A., Briand P., Damsky C., Bissell M. J. (1997) Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture and In Vivo by Integrin Blocking Antibodies. *The Journal of Cell Biology*, 137 (1) 231-245.

WEISSMANN C., Raeber A. J., Montrasio F., Hegyi I., Frigg R., Klein M. A., AGUZZI A. (2001) Prions and the lymphoreticular system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 356, 177.

WEKSLER M. E., Relkin N., Turkenich R., LaRusse S., Zhou L., Szabo P. (2002). Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol.*, 37(7), 943-8.

WILL R. G., MATTHEWS W. B. (1992) Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, 45(3), 235-8.

WILLIAMS K., *et al.*, (1993) Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs in vivo and in vitro, *Neuron*, 10, 267-78.

WILLIAMS K. (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *The Biochemical journal*, 325 (Pt 2) (Department of Pharmacology, University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, PA 19104-6084, USA)

WINKLHOFER K. F and TATZELT J. (2000) Cationic lipopolyamines induce degradation of PrPSc in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biol Chem.*, 381, 463-469.

WOLOSKER H., Dumin E., Balan L., Foltyn V. N. (2008) D-amino-acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS J.*, 275, 3514-3526.

WOPFNER F, Weidenhöfer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz T. F, Werner T, SCHÄTZL H. M. (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol.* 289(5), 1163-78.

YOU H., Tsutsui, S., Hameed S., Kannanayakal T. J., Chen, L., Xia, P., *et al.* (2012) Abeta neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 1737-1742.

Zamponi G. W. and STYS P. K. (2009) Role of prions in neuroprotection and neurodegeneration: a mechanism involving glutamate receptors? *Prion*, 3, 187–189.