

Synthese und bioanalytische Anwendung Lanthanid-markierter Peptide und Nucleinsäuren

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Ann-Kathrin Marguerre
aus
Heidelberg

2009

Kurzfassung

Die Arbeit behandelt die Entwicklung neuer Lanthanidsonden und ihre Anwendung zur Detektion von Nucleinsäuren und Enzymen durch zeitaufgelöste Lumineszenzmessungen. Zum einen wurden dazu Lanthanidkomplex-modifizierte fluorogene Peptidsubstrate, zum anderen Chelator-modifizierte Peptidnucleinsäuren (PNAs) synthetisiert.

Im funktionalisierten Peptidsubstrat wird die Lumineszenz des Lanthanidkomplexes durch einen Bis-Azo-Farbstoff (Black Hole Quencher) vollständig gelöscht. Die enzymatische Spaltung des Substrats führt zu einer räumlichen Trennung von Komplex und Quencher und so zu einem deutlichen Signalanstieg. Durch zeitaufgelöste Messung der langlebigen Lanthanidlumineszenz kann Thermolysin sehr empfindlich nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurden die besonderen photophysikalischen Eigenschaften der Lanthanidkomplexe zur Detektion von DNA eingesetzt.

An beiden Termini mit Chelatoren modifizierte Peptidnucleinsäuren wurden entwickelt und ihre Wechselwirkung mit komplementärer DNA untersucht. Diese führt zur allosterischen Destabilisierung eines zuvor gebildeten zirkularen PNA-Lanthanidkomplexes, wodurch das Metallion freigesetzt wird und mit Hilfe von Sensitizern detektiert werden kann.

In einem zweiten auf Signalverstärkung beruhenden Ansatz zur Detektion von DNA fungiert ein zirkularer DNA-Zink-Komplex als Primärsonde für eine komplementäre Ziel-DNA. Auch hier wird das Metallion durch Hybridisierung freigesetzt, jedoch anschließend nicht direkt, sondern indirekt über die Aktivierung eines Zn^{2+} -Cofaktor abhängigen Enzyms Thermolysin nachgewiesen. Eine Signalamplifikation erfolgte katalytisch über die Spaltung des oben beschriebenen fluorogenen Peptidsubstrats, welches ein starkes Lumineszenzsignal erzeugt.

Short summary

The thesis covers the development of new lanthanide-based probes and their application to the detection of DNA sequences and enzymes by time-resolved luminescence measurements. Both lanthanide-based fluorogenic peptide substrates and chelator-functionalized peptide nucleic acids (PNAs) were synthesized.

Luminescence of a lanthanide complex attached to an oligopeptide was efficiently quenched intramolecularly by a bis(azo)dye (black hole quencher 2). Enzymatic hydrolysis of this substrate leads to a spatial separation of complex and quencher and results in a significant increase of the luminescent signal. Application of time-resolved techniques enables the highly sensitive detection of the metalloendoprotease like thermolysin.

The unique photophysical properties of lanthanide complexes were also advantageous for the detection of DNA.

Peptide nucleic acids bearing chelating groups on both termini were prepared. Their interaction with complementary DNA results in an allosteric destabilization of a preformed PNA-lanthanide complex, which causes the release of the bound metal ion. The latter is detected by formation of a luminescent complex with a sensitizing ligand.

Finally, DNA was detected by enzyme-triggered amplification of a luminescent lanthanide signal. In this approach, the DNA target first hybridizes with a circular DNA-zinc complex. The released Zn^{2+} ion acts as a cofactor for an apoenzyme (apothermolysin), resulting in an active holoenzyme. The active enzyme catalyzes the cleavage of above mentioned luminescent peptide substrate. Thus, the signal can be monitored fluorometrically using time-resolved techniques, allowing the detection of target DNA with high sensitivity and sequence specificity.

Synthese und bioanalytische Anwendung Lanthanid-markierter Peptide und Nucleinsäuren

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Ann-Kathrin Marguerre
aus
Heidelberg

2009

Synthese und bioanalytische Anwendung Lanthanid-markierter Peptide und Nucleinsäuren

Gutachter: Professor Dr. Roland Krämer
 PD. Dr. Dirk-Peter Herten

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2009

Nur wer nicht sucht, ist vor Irrtum sicher .
Albert Einstein

Meinen Eltern gewidmet

Die experimentellen Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden in der Zeit von Februar 2006 bis April 2009 am Anorganisch-Chemischen Institut der RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT Heidelberg durchgeführt. Ein Teil der Untersuchungen wurde von Dezember 2007 bis Februar 2009 am EMBL (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY) in Heidelberg durchgeführt.

Der DEUTSCHEN TELEKOM STIFTUNG danke ich sehr für ein Promotionsstipendium im Zeitraum vom 01.11.06 bis zum 30.04.09 sowie für die großzügige Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Herrn PROFESSOR DR. ROLAND KRÄMER, unter dessen Anleitung diese Arbeit angefertigt wurde, danke ich sehr herzlich für die zahlreichen Anregungen, Diskussionen, sein stetes Interesse an meiner Arbeit sowie die großzügige materielle Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Aufbau und Struktur von DNA und PNA	1
1.2	Proteasen	5
1.2.1	Immobilisierung	9
1.3	Lanthanide	11
2	ZIELSETZUNG	19
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	20
3.1	Ligandensynthesen	20
3.1.1	Synthese von 2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy-hexansäure	20
3.1.2	Synthese eines <i>tert</i> -Butyl-geschützten DTPA-Derivats	21
3.1.3	Synthese von <i>tert</i> -Butyl-geschützter Iminodiessigsäure	22
3.1.4	Synthese von 4'''-substituierten 4'-Phenylterpyridinen	23
3.1.5	Synthese eines Isothiocyanat-aktivierten Methylphenylterpyridin-bisaminomethyl-tetraacetat-Europiumkomplexes	25
3.1.6	Synthese eines Isothiocyanat-aktivierten Nitrophenylterpyridin-bisaminomethyl-tetraacetat-Europiumkomplexes	28
3.1.7	Synthese eines Triazin-aktivierten Methylphenylterpyridin-bisaminomethyl-tetraacetat-Europiumkomplexes	30
3.1.8	Synthese von 4'-Phenylterpyridinbiscarbonsäuren	31
3.1.9	Übersicht der synthetisierten Verbindungen	32
3.2	Synthese der PNA-Konjugate	34
3.2.1	Synthese von C- und N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten	34
3.2.2	Synthese von N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten	36
3.2.3	Synthese von BHQ-modifizierten PNA-Konjugaten	37
3.2.4	Charakterisierung der lumineszenten PNA-Konjugate	38
3.2.5	Übersicht der synthetisierten PNA-Konjugate	39
3.3	Synthese der Peptidkonjugate	42
3.3.1	Synthese von Bis-Terpyridin-Peptidkonjugaten	42
3.3.2	Charakterisierung der Bis-Terpyridin-Peptidkonjugate	44
3.3.3	Synthese der BHQ-Peptidkonjugate	49
3.3.4	Übersicht der synthetisierten Peptidkonjugate	53
3.4	Proteasenachweis	56
3.4.1	Stand der Forschung	56
3.4.2	Strategie	58
3.4.3	Fluoreszenzmessungen	59

3.5	DNA-Nachweis auf Basis von Lanthanidionen	63
3.5.1	Stand der Forschung	63
3.5.2	Einfacher DNA-Nachweis	65
3.5.3	DNA-Nachweis durch Signalamplifikation	74
4	ZUSAMMENFASSUNG	84
5	EXPERIMENTELLER TEIL	86
5.1	Material und Methoden	86
5.2	Synthese der organischen Moleküle	88
5.3	Synthese der PNA-Konjugate	121
5.3.1	Synthese von C- und N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten	121
5.3.2	Synthese von N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten	125
5.3.3	Synthese von BHQ-modifizierten PNA-Konjugaten	128
5.3.4	Übersicht der synthetisierten PNA -Konjugate	130
5.4	Synthese der Peptidkonjugate	133
5.4.1	Synthese der Bis-Terpyridin-Peptidkonjugate	133
5.4.2	Übersicht der synthetisierten Bis-Terpyridin-Peptidkonjugate	137
5.4.3	Synthese der BHQ-Peptidkonjugate	138
5.4.4	Übersicht der synthetisierten BHQ-Peptidkonjugate	143
5.5	Durchführung der UV-Messungen	144
5.6	Durchführung der Spaltexperimente mit MALDI -TOF MS	144
5.7	Konzentrationsbestimmungen	145
5.7.1	Bis-Terpyridin-Peptidkonjugate	145
5.7.2	PNA- und DNA-Konjugate	145
5.7.3	BHQ-Peptidkonjugate	145
5.8	Thermolysin	146
5.8.1	Maßnahmen zur Vermeidung von Metallkontaminationen	146
5.8.2	Inaktivierung von Thermolysin durch Dialyse	146
5.8.3	Inaktivierung von Thermolysin durch Gelfiltration	147
5.8.4	Immobilisierung an Eupergit C®	147
5.8.5	Inaktivierung des immobilisierten Thermolysins	147
5.9	Durchführung der Fluoreszenzmessungen	148
5.9.1	Thermolysinnachweis	148
5.9.2	Einfacher DNA-Nachweis	148
5.9.3	Signalamplifikation	149
5.9.4	Eingesetzte PNA/DNA-Sequenzen	150
6	LITERATURVERZEICHNIS	151

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.** Aufbau der DNA. *Links:* Schematische Darstellung *Rechts:* Kalottenmodell.
- Abb. 2.** Watson-Crick-Basenpaarung.
- Abb. 3.** Konformationen der DNA.
- Abb. 4.** *Links:* Duplex aus DNA und PNA. *Rechts:* (a) Hoogsteen- und (b) Watson-Crick-Basenpaarung.
- Abb. 5.** Struktur des Thermolysins.
- Abb. 6.1.** „Hydroxid-Mechanismus“ als möglicher Mechanismus der Peptidhydrolyse durch Thermolysin.
- Abb. 6.2.** „Reverse Protonation Mechanismus“ als zweiter möglicher Mechanismus der Peptidhydrolyse durch Thermolysin.
- Abb. 7.** Skizze des aktiven Zentrums der Protease und Spaltungsstelle des Peptids, Nomenklatur nach SCHECHTER *et al.*
- Abb. 8.** Verschiedene Möglichkeiten der Immobilisierung: 1) Einschlussverbindungen 2) intramolekulare Quervernetzung 3) kovalente Kopplung und 4) adsorptive Anbindung.
- Abb. 9.** Kopplung eines Enzyms (blau) mit verschiedenen funktionellen Gruppen an Eupergit C[®] (braun).
- Abb. 10.** Termaufspaltung der $4f^8$ -Konfiguration.
- Abb. 11.** *Links:* Prinzip der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie: Emissionssignale werden nach einer Verzögerungszeit, in der störende Signale abklingen, aufgenommen. *Rechts:* Emissionssignale von Terbium und Europium.
- Abb. 12.** Aufbau eines lumineszenten Lanthanidkomplexes: *Links:* „Chromophoric Chelate“ *Rechts:* „Pendant Chromophore.“
- Abb. 13.** Häufig eingesetzte Lanthanidliganden.
- Abb. 14.** Energieübertragungsweg von Sensitizer auf Lanthanidion am Beispiel von Eu(III).
- Abb. 15.** Partielle Termschemata einiger lumineszenter Ln(III)-Ionen.
- Abb. 16.** Strahlungslose Deaktivierung angeregter Zustände durch vibronische Kopplung mit Wasser (*links*), LMCT (*Mitte*) und Back Energy Transfer (*rechts*).
- Abb. 17.** Photochemischer Verlauf der Lanthanidlumineszenz: eT Elektronentransfer, Em Emission, q Quencher, ET Energietransfer, BET Back Energy Transfer.
- Abb. 18.** Prinzip des „Delfia“-Systems.
- Abb. 19.** Homogener Immunoassay über LRET (A = Akzeptor, Eu = Europium).

- Abb. 20.** Allosterische Kontrolle der Hybridisierung von Tpy₂DNA durch Zink(II)-Ionen.
- Abb. 21.** Synthese von 2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy-hexansäure (1).
- Abb. 22.** Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 5.
- Abb. 23.** Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 7.
- Abb. 24.** Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 8.
- Abb. 25.** Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 11.
- Abb. 26.** Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 20.
- Abb. 27.** Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 28.
- Abb. 28.** Syntheschema der Triazin-Aktivierung von Verbindung 19.
- Abb. 29.** Syntheschema der Hydrolyse der 6,6'-Dinitrile (13, 22).
- Abb. 30.** Übersicht der synthetisierten Verbindungen 1 - 31.
- Abb. 31.** Allgemeines Syntheschema von C- und N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten.
- Abb. 32.** Allgemeines Syntheschema N-terminal modifizierter PNA-Konjugate.
- Abb. 33.** Allgemeines Syntheschema BHQ-modifizierter PNA-Konjugate.
- Abb. 34.** Emissionsspektrum des N-terminal an PNA gekoppelten Liganden 20
Rechts: Dazugehörige Lebensdauermessung von PNA 7 mit $\tau = 1.3$ ms.
- Abb. 35.** Allgemeines Syntheschema zur Darstellung der Bis-Terpyridin-Peptide.
- Abb. 36.** Vergleich der UV-Spektren von 30 μM Zn(Tpy)₂ (*links*) und 14 μM Zn(Peptid 4) (*rechts*).
- Abb. 37.** Titration von Tpy₂Peptid 4 (10 μM) mit CuSO₄ (0 - 12 μM) in 10 mM MOPS-Puffer bei pH 7 und 23 °C.
- Abb. 38.** Kinetik der Dissoziation des Zn(Tpy)₂-Komplexes bei verschiedenen TPEN-Konzentrationen.
- Abb. 39.** Kinetik der Dissoziation des Zn(Tpy₂Peptid 1)-Komplexes bei verschiedenen TPEN-Konzentrationen.
- Abb. 40.** MALDI-TOF MS Spektrum der Spaltung von Peptid 3 (23.5 μM) durch Thermolysin (100 nM bzw. 200 nM).
- Abb. 41.** Allgemeines Syntheschema zur Darstellung von BHQ-modifizierten Peptidkonjugaten.
- Abb. 42.** Effizienz der Fluoreszenzlöschung der Peptide 6 - 8 durch BHQ in Abhängigkeit ihrer Sequenzlänge.
- Abb. 43.** *Links:* Vergleich der Anregungsspektren von (1) freiem Liganden (Verbindung 20, 5 μM) und (2) gespaltenem Peptid 6. *Rechts:* Fluoreszenzanstieg des Lanthanidsignals durch Spaltung von Peptid 6 durch Thermolysin/Eupergit C[®].

- Abb. 44.** Struktur des Black Hole Quenchers 2 = Q (*links*) und des gekoppelten lumineszenten Liganden 20(*rechts*).
- Abb. 45.** Schematische Darstellung des Thermolysinnachweises: Spaltung eines lumineszenten Peptids durch Thermolysin.
- Abb. 46.** *Links*: Spaltung der Peptide 6 - 8 (3 μ M) mit 500 pM Thermolysin in 2 mM Tris-HCl. *Rechts*: (1) Zeitaufgelöstes Anregungsspektrum ($\lambda_{em} = 617$ nm) und (2) Emissionsspektrum des gespaltenen Peptids 6.
- Abb. 47.** Spaltung von Peptid 6 (3 μ M) durch Thermolysin (1 nM - 50 pM), dargestellt als Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Zeit.
- Abb. 48.** Vergleich der Enzymempfindlichkeit zwischen Peptid 6 und MOCAC.
- Abb. 49.** Lineweaver-Burk-Diagramm von Thermolysin 500 pM (*links*) und 250 pM (*rechts*). Einschub: Michaelis-Menten-Diagramm.
- Abb. 50.** Intermolekularer Energietransfer am Templat mit Salicylsäure als Sensitizer und einem Tb-DTPA-Komplex als Akzeptor.
- Abb. 51.** Schematischer Aufbau des einfachen Nucleinsäurenachweises auf Lanthanidionenbasis.
- Abb. 52.** Simulation eines geschlossenen (*links*) und geöffneten (*rechts*) Rings in Lösung mit DPA als Sensitizer und DTPA als ringbildende n Liganden.
- Abb. 53.** (1) Fluoreszenz- und (2) Phosphoreszenzmessung von Verbindung 30 (3 nM) mit Eu(III) (1 nM).
- Abb. 54.** *Links*: Simulation des geschlossenen (DTPA)₂-Rings in Anwesenheit von Verbindung 30. *Rechts*: Simulation des Ringschlusses mit DTPA.
- Abb. 55.** Fluoreszenz eines Eu-DPA-Komplexes (200 nM Eu, 600 nM DPA) und Löschung durch Zugabe von PNA.
- Abb. 56.** Löschung der Fluoreszenz eines Eu-DPA-Komplexes. *Links*: partielle Öffnung des Lanthanidrings in Anwesenheit von cDNA *Rechts*: keine Öffnung durch Zugabe von scrDNA 1.
- Abb. 57.** Untersuchung der N-terminal modifizierten PNA-Konjugate.
- Abb. 58.** Ausbildung „linearer Strukturen“ durch längere Inkubation des PNA 1/cDNA-Hybrids mit Eu(III).
- Abb. 59.** Fluorimetrische Detektion von verschiedenen Target-DNAs durch PNA 2.
- Abb. 60.** Signalkaskade mit enzymatischer Amplifikation. Die Nucleinsäure-detektion mit Tpy₂DNA erfolgt über Reaktivierung von Apocarboanhydrase durch Zink-Cofaktoren.
- Abb. 61.** Schematische Darstellung der autonomen Signalkaskade.

- Abb. 62.** Eingesetzte Liganden für die enzymatische Signalkaskade. Tpy-Ligand der DNA-Sonde (*links*), Black Hole Quencher 2 (*Mitte*) und lumineszenter Eu-Komplex **20** (*rechts*).
- Abb. 63.** Messung der Restaktivität nach Inaktivierung von Thermolysin/Eupergit C[®] mit 2 mM (1) NOTP, (2) EDTA und (3) Phenanthrolin nach 2 Tagen.
- Abb. 64.** Untersuchung der Reaktivierung von Thermolysin/Eupergit C[®].
- Abb. 65.** Fluorimetrische Detektion von DNA über enzymatische Amplifikation des Signals. Im Vergleich Peptid **6** und MOCAC.
- Abb. 66.** Lebensdauermessung des durch Thermolysin/Eupergit C[®] (0.57 μ M) gespaltenen Peptids **6**.
- Abb. 67.** Schematische Darstellung des Thermolysinnachweises.
- Abb. 68.** Nachweis von DNA durch allosterische Umwandlung in ein Lanthanidion.
- Abb. 69.** Nachweis von DNA durch eine zweistufige Signalkaskade.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin/Alanin
Alloc	Allyloxycarbonyl
BHQ	Black Hole Quencher 2
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DABCYL	4-([4-(Dimethylamino)phenyl]azo)benzoesäure
DABCYL-SE	([4-(Dimethylamino)phenyl]azo)benzoesäure succinimidylester
DCM	Dichlormethan
dd	Doppeldublett
DELFLIA	Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoro-Immunoassay
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIEA	<i>N,N'</i> -Diisopropylethylamin
Dithizon	Diphenylthiocarbazon
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPA	2,6-Bispicolinsäure
dt	Doppeltriplett
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDANS	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)aminonaphthalen-5-sulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
F, Phe	Phenylalanin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Guanin/Glycin
Glu	Glutamat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
HOBT	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
L	Leucin
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry

LCR	Ligase Chain Reaction
LRET	Luminescence Resonance Energy Transfer
Lys, k, K	Lysin
m	Multipllett
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mmDNA	mismatch DNA
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
Mtt	4-Methyltrityl
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NOTP	1,4,7-Triazacyclononan- <i>N,N',N''</i> -tris-(methylenphosphorige Säure)
NTA	Nitrilotriacetat
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMT	Photomultiplier
PG	Protecting Group
PNA	Peptidnucleinsäure
q	Quintett
quart	Quartett
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
S	Serin
s	Singulett
scrDNA	scrambled DNA
T	Thymin
t	Tripllett
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TPEN	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrakis(2-pyridyl-methyl)ethylendiamin
Tpy	Terpyridin
TR	Time-Resolved
Triazin	2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazin
Triton X	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglycol
TSU Wasser	TraceSelectUltra Wasser
UV	Ultraviolett
Vis	Visible

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Struktur von DNA und PNA

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) stellt als Träger der genetischen Information eines der wichtigsten Moleküle in zellulären Prozessen dar. Über die Abfolge der Nucleobasen wird die Zusammensetzung sowie der Aufbau von Proteinen und Molekülen codiert, die an der Proteinsynthese oder Regulierung zellulärer Stoffwechsel beteiligt sind. Die dreidimensionale Struktur der DNA wurde 1953 von WATSON und CRICK mit Hilfe von röntgenkristallographischen Untersuchungen aufgeklärt, welche zur Annahme führten, dass zwei antiparallel zueinander verlaufende DNA-Einzelstränge eine Doppelhelixstruktur ausbilden (**Abb. 1**).^[1] Daraus ließen sich auch Hinweise darauf ableiten, wie die Information gespeichert und repliziert wird.

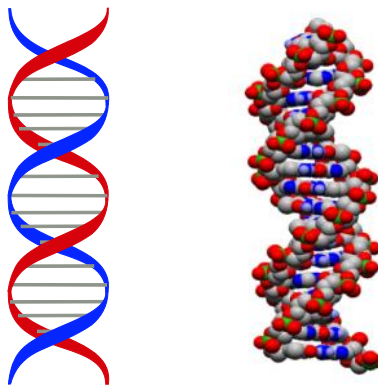


Abb. 1. Aufbau der DNA. *Links:* Schematische Darstellung *Rechts:* Kalottenmodell^[2]

Ein DNA-Einzelstrang kann als fadenförmiges Biopolymer verstanden werden, welches ein Polynucleotid darstellt. Jedes Nucleotid setzt sich aus den drei Untereinheiten Purin- oder Pyrimidinbase, 2'-Desoxyribose und einer Phosphatgruppe zusammen. Dabei ist die 3'-Hydroxygruppe einer Desoxyribose-Einheit über eine Phosphodiesterbrücke mit der 5'-Hydroxygruppe der nächsten Zuckereinheit verknüpft und bildet so das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Die Nucleobasen sind N-glykosidisch am C1-Atom der Desoxyribose mit dem Gerüst verknüpft und zeigen aufgrund ihres hydrophoben Charakters ins Innere der Doppelhelix.

Über Wasserstoffbrückenbindungen können die Basen des einen Strangs mit den Basen des anderen wechselwirken (WATSON-CRICK-Basenpaarung), wobei die

Pyrimidinbase Adenin (A) über zwei Wasserstoffbrücken an die Purinbase Thymin (T) bindet, und die Pyrimidinbase Guanin (G) drei Wasserstoffbrücken zur Purinbase Cytosin (C) ausbildet (**Abb. 2**).

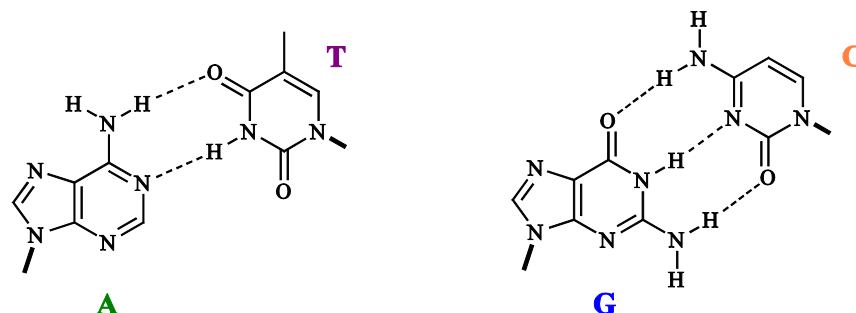


Abb. 2. WATSON-CRICK-Basenpaarung.

In Abhängigkeit ihrer Länge, der Sequenz der Nucleobasen und ihrer Umgebung (beispielsweise dem Salzgehalt in der Zelle) nimmt die DNA-Duplex verschiedene Konformationen an. Am häufigsten liegt sie, wie von WATSON und CRICK beschrieben, in der B-Form (**Abb. 3., Mitte**) als rechtsgängige Helix vor. Darin sind die Basen nahezu senkrecht zur Helixachse in einem Abstand von 0.34 nm angeordnet, wobei sich die Helixstruktur alle 3.4 nm wiederholt, jede Windung also aus zehn Basen besteht. Während die DNA für ihre B-Konformation stark hydratisiert sein muss (92 % relative Feuchtigkeit) und ein Alkalimetall als Gegenion benötigt, bildet sich die A-Form (**Abb. 3., links**), wenn die relative Feuchtigkeit unter 75% absinkt. Sie ist kompakter als die B-Form, mit etwa elf Basen pro Windung, deren Basenpaare nicht senkrecht zur Helixachse, sondern etwas geneigt sind. Eine dritte nur bei hohen Salzkonzentrationen mögliche Konformation der DNA stellt die so genannte Z-DNA dar. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Formen ist sie linksgängig und weisen ihre Phosphatgruppen im Rückgrat eine zickzackförmige Anordnung auf. Eine derartige Konformation wird von kurzen Oligonucleotiden angenommen, welche Sequenzen aus alternierenden Pyrimidinen und Purinen enthalten.

Aufgrund des großen Potentials synthetischer Oligonucleotide, die in Form von Therapeutika und als molekularbiologische Hilfsmittel eingesetzt werden können, ist ihre Weiterentwicklung und Erforschung eine wichtige Aufgabe der Biotechnologie. Peptidnucleinsäuren (PNA) wurden erstmals in den 1980er Jahren von BUCHARDT und NIELSEN beschrieben und konnten 1991 von NIELSEN *et al.* [3] als sequenz-spezifische Nucleinsäurereagenzien präsentiert werden.



Abb. 3. Konformationen der DNA: A-DNA (*links*), B-DNA (*Mitte*), Z-DNA (*rechts*).

Sie stellen DNA-Analoga und -Mimetika dar, deren negativ geladenes Desoxyribose-Phosphodiesterückgrat durch eine neutrale *N*-(2-Aminoethyl)-glycin-polyamidstruktur ersetzt ist. Dabei ist die sekundäre Aminogruppe der synthetischen Aminosäure *N*-(2-Aminoethyl)-glycin mit Essigsäure acyliert und trägt eine Nucleobase als Substituenten (**Abb. 4., links**). Zu den Vorteilen der PNA zählen neben der hohen chemischen und thermischen Stabilität auch ihre ausgeprägte Bindungsaffinität und -spezifität gegenüber DNA. Im Falle einer Hybridisierung zwischen einem PNA- und einem DNA-Einzelstrang kommt es aufgrund des neutralen PNA-Rückgrats nicht zu elektrostatischer Abstoßung der Einzelstränge untereinander, was sich in einer Erhöhung der Schmelzpunkte widerspiegelt und die Hybridisierung von der Ionenstärke unabhängig macht.^[4-6] Eine erhöhte Lebensdauer sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wird durch das Pseudopeptidrückgrat erreicht, welches die PNAs gegenüber Nucleasen und Proteasen unempfindlich macht. Ihre Bindung an DNA erfolgt in Einklang mit den WATSON-CRICK-Basenpaarungsregeln, wobei sich der PNA-Strang sowohl parallel als auch antiparallel an die Zielsequenz anlagern kann, die antiparallele Anordnung jedoch bevorzugt wird. Es können sich zum einen PNA/DNA₂-Triplexes ausbilden, in denen die PNA über WATSON-CRICK-Basenpaarung hybridisiert, zum anderen ist auch eine HOOGSTEEEN-Basenpaarung in Form von PNA₂/DNA-Triplexes möglich (**Abb. 4., rechts**). Konventionsgemäß wird der Aminoterminus eines PNA-Oligomers als äquivalent zum 5'-Ende, der C-Terminus als äquivalent zum 3'-Ende der DNA angesehen (**Abb. 4., links**).^[7] Bei reinen PNAs handelt es sich um neutrale, zur Selbstaggregation neigende Verbindungen, deren Wasserlöslichkeit häufig so gering ist, dass sie durch den Einbau geladener Gruppen wie Lysine verbessert werden muss.^[8]

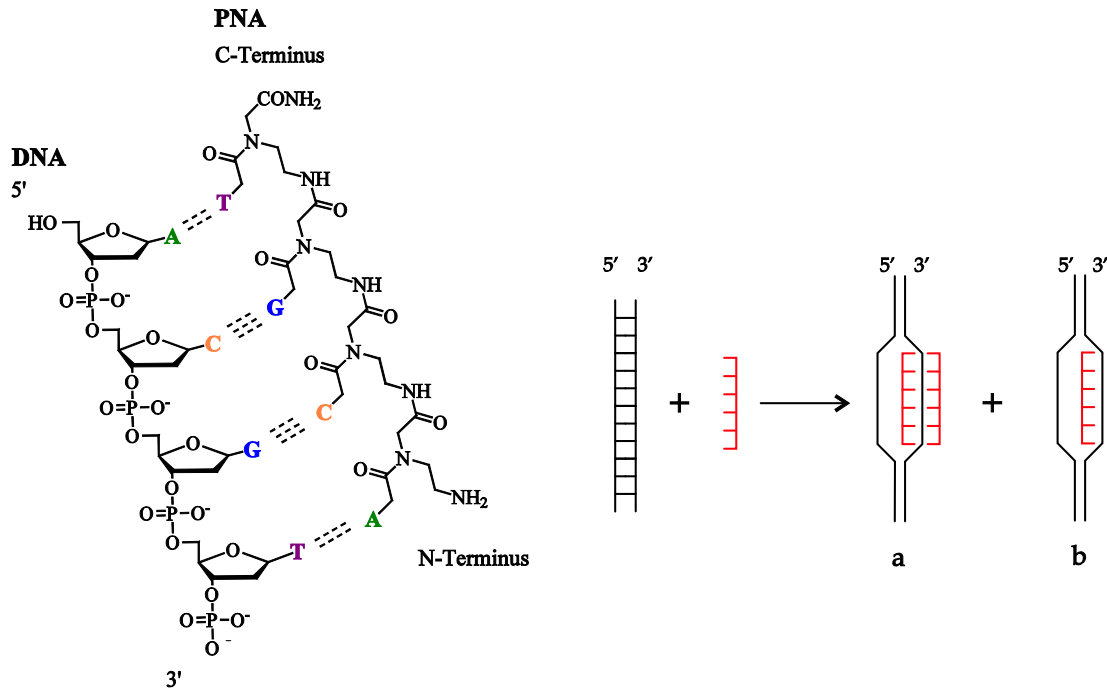


Abb. 4. Links: Duplex aus DNA und PNA. Rechts: (a) HOGSTEEEN- und (b) WATSON-CRICK-Basepaarung.

Eine Anwendbarkeit synthetischer Nucleinsäureanaloge als Antisense- (Inhibierung der Translation) und Antigenwirkstoff (Beeinflussung der Transkription) setzt eine hohe biologische Stabilität voraus, die im Fall der PNAs durch ein modifiziertes Rückgrat gegeben ist. Ihre jedoch nur eingeschränkte zelluläre Aufnahme zählt zu den Problemen ihrer Anwendung, wobei die Mikroinjektion eine Lösung bietet. Weiterhin wurden durch die Einführung chemischer Modifikationen nichtinvasive Transportstrategien u.a. die Konjugation mit Oligopeptiden, mit lipophilen Molekülen wie Adamantan ^[9] oder mit zellspezifischen Rezeptoren entwickelt. In unserer Arbeitsgruppe gelang es, zellgängige Terpyridin-modifizierte PNA-Konjugate herzustellen, deren Aufnahme durch die Zugabe von Zink(II) erheblich gesteigert werden konnte. ^[10]

1.2 Proteasen

Das Verständnis für den Ablauf biologischer Vorgänge bildet die rationale Basis für die Entwicklung neuer Medikamente. Da Enzyme an allen Stoffwechselreaktionen beteiligt sind, stehen sie und ihre Regulation in vielen Fällen im Mittelpunkt.

Entsprechend der von ihnen katalysierten Reaktion erfolgt ihre Einteilung in sechs Klassen: (1) Oxidoreduktasen, (2) Transferasen, (3) Hydrolasen, (4) Lyasen, (5) Isomerasen und (6) Ligasen. Hydrolasen, die als Katalysator für hydrolytische Spaltungen fungieren, werden in Abhängigkeit des gespaltenen Substrats in (1) Esterasen, (2) Lipasen, (3) Phosphatasen und (4) Peptidasen bzw. Proteasen unterteilt. Innerhalb der Peptidasen unterscheidet man je nach Position der hydrolysierten Bindung Exo- und Endopeptidasen. Während Exopeptidasen Peptidbindungen am jeweiligen Ende der Polypeptidkette spalten (entweder Amino- oder Carboxypeptidasen), greifen Endopeptidasen Peptidbindungen innerhalb dieser Ketten an. In Abhängigkeit der funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum können vier Klassen von Proteasen unterschieden werden: Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartylproteasen.

Eine weitere Einteilung der verschiedenen Peptidasen kann in so genannten Clans erfolgen, je nach Ähnlichkeit in der dreidimensionalen Struktur, in der Aminosäuresequenz des katalytisch aktiven Zentrums oder der Anordnung der katalytisch aktiven Gruppen

Thermolysin gehört dem MA-Clan an und stellt wie alle Enzyme dieses Clans eine zinkabhängige Metallopeptidase dar. Das Metallion ist über drei Aminosäuren an das Proteinrückgrat gebunden, während die vierte Koordinationsstelle innerhalb der tetraedrischen Geometrie von einem Wassermolekül besetzt wird. Charakteristisch für alle Zinkmetalloproteasen ist ihr Zinkbindungsmotiv **HEXXH**^[11], welches zwei Koordinationsstellen des Metallions über Histidinreste (H) besetzt, wobei X innerhalb des Motivs für eine beliebige Aminosäure steht. Besetzt ein weiterer Histidin- oder Aspartatrest die dritte Koordinationsstelle, gehört das Enzym dem Subclan MA(M) an, auch „Met-Zincins“ genannt.

Wird sie jedoch wie im Thermolysin von einem Glutamatrest (E) besetzt, zählt das Enzym zum Subclan MA(E) bzw. zu den „Glu-Zincins“. Innerhalb dieser Subclans unterscheidet man einzelne Familien, wobei Thermolysin wie 200 weitere Proteine der M4-Familie angehört. Die meisten dieser Enzyme gehören den Endopeptidasen an, deren Aktivität bei neutralem pH-Wert am größten ist. Man findet sie u.a. in Bakterien, Pilzen und Archaeen. Das aus *Bacillus thermoproteolyticus* isolierte Thermolysin (EC.3.4.24.27.) ist die am besten charakterisierte Metalloendopeptidase des MA-Clans, deren kristallographische Untersuchung als erstes gelang. [12-15] Neben katalytisch aktivem Zink [16,17] enthält Thermolysin vier Calciumionen, ca. 10 Å vom aktiven Zentrum entfernt oder an bzw. in der Nähe der Enzymoberfläche innerhalb flexibler Schleifen gebunden (**Abb. 5**). [18] Während zwei der Calciumionen (Ca1, Ca2) in einer Doppelbindungsstelle koordiniert sind (3.8 Å), befindet sich Ca3 in der N-terminalen, Ca4 in der C-terminalen Domäne. [14,15] Keines der vier Calciumionen nimmt an der Katalyse teil. Sie können jedoch die thermische Stabilität des Enzyms beeinflussen, indem sie die strukturelle Integrität aufrechterhalten und so das Enzym vor Autoproteolyse schützen. [19-21] DAHLQUIST *et al.* [22] gelang es trotz des Einsatzes von 1,10-Phenanthrolin und EDTA als Chelatoren nicht, calciumfreies aktives Thermolysin zu erhalten, da sofort nach ihrer Extraktion Autoproteolyse erfolgte. Auf diese Weise konnten sie zeigen, dass die thermische Stabilität zinkunabhängig ist und ausschließlich durch die vier Calciumionen beeinflusst wird. Kristallographische Studien mit verschiedenen Inhibitoren und Substraten führten zur Postulierung zweier unterschiedlicher Katalysemechanismen. [23-25]

Die in **Abb. 6** dargestellten Hydrolyse-Mechanismen unterscheiden sich hinsichtlich Spaltung der Peptidbindung, die in **1.** durch den Angriff eines zinkgebundenen Hydroxid-Ions und in **2.** über ein nichtkoordiniertes Wassermolekül erfolgt. Im Hydroxid-Mechanismus wird die zinkkoordinierte OH-Gruppe durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu einem Glutamatrest negativ polarisiert und so deren Nucleophilie erhöht. Weiterhin wird durch die Koordination der Carbonylgruppe des Peptids an das katalytisch aktive Zink(II) dessen Elektrophilie erhöht und die Hydrolyse erleichtert. [16,26-32] Der Transfer des Hydroxids auf die Carbonylgruppe sowie die anschließende Übertragung des Protons vom Glutamatrest auf die Aminofunktion des Peptids führt zur Spaltung der Bindung. Der alternative Mechanismus **2.** wird von der Verdrängung des an Zink koordinierten Wassers durch die Peptidcarbonylfunktion geprägt. Ihr folgt der



Abb. 5. Struktur des Thermolysins
Zn = rot, Ca = blau.

Angriff eines Wassermoleküls, welcher durch Histidin als Base (B) unterstützt wird. [33-36]

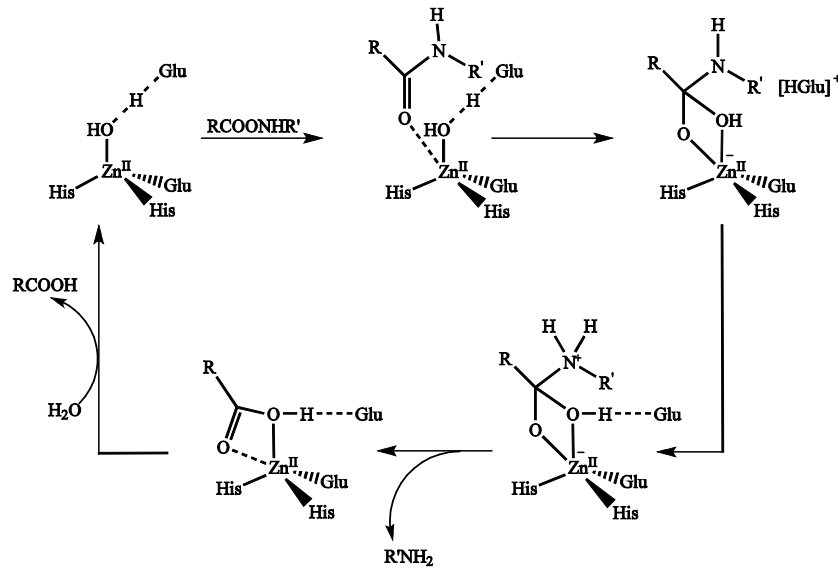


Abb. 6. 1. „Hydroxid-Mechanismus“ als möglicher Mechanismus der Peptidhydrolyse durch Thermolysin. [23]

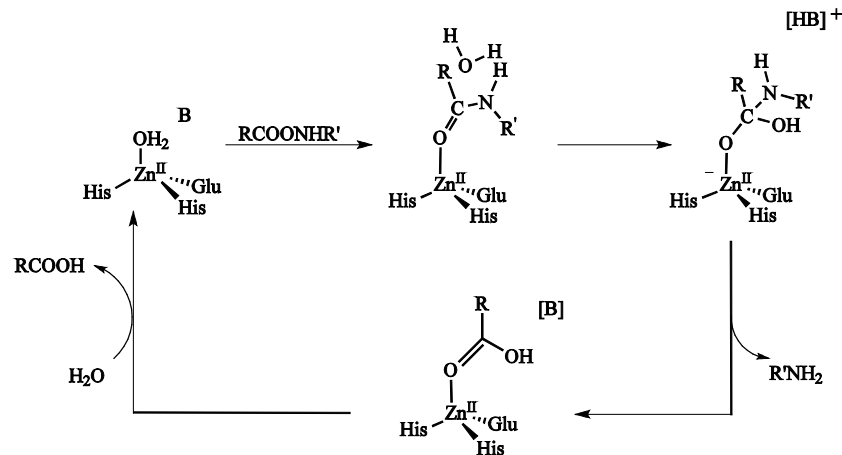


Abb. 6. 2. „Reverse Protonation Mechanismus“ als zweiter möglicher Mechanismus der Peptidhydrolyse durch Thermolysin mit Histidin als Base (B). [23]

Das bezüglich der zu hydrolysierenden Peptidsequenz unspezifische Thermolysin spaltet Peptidbindungen an der N-terminalen Seite (P₁'-Position nach der Nomenklatur von SCHECHTER und BERGER [37] (**Abb. 7.**)) von sperrigen, hydrophoben, aromatischen Aminosäureresten wie Leucin, Phenylalanin und Valin. [24,38-43]

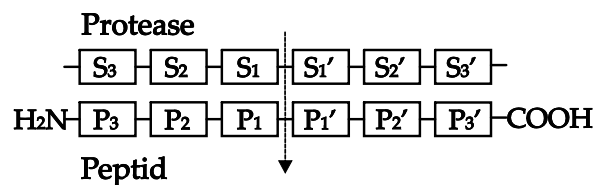


Abb. 7. Skizze des aktiven Zentrums der Protease und Spaltungsstelle des Peptids. Nomenklatur nach SCHECHTER *et al.* [37]

Thermolysin wird industriell als Peptid- und Estersynthetase für die Produktion des künstlichen Süßungsmittels Aspartam eingesetzt, findet aber auch in der biotechnologischen Industrie als unspezifische Protease für die Herstellung von Peptidfragmenten zur Sequenzierung Verwendung. [44]

Allgemein spielen Proteasen eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie beispielsweise im Proteinabbau, der Blutkoagulation, dem Zellwachstum und -wanderung sowie Entzündungen, Tumorwachstum, Metastasierung und Hormonausschüttung. Während extrazelluläre Proteasen die Hydrolyse großer Proteine zu kleinen Molekülen katalysieren, damit diese von der Zelle aufgenommen werden können, beeinflussen intrazelluläre Proteasen die Regulation des Metabolismus. [45]

Alle Enzyme der M4-Familie gehören zu den extrazellulären Metalloendopeptidasen bakterieller Herkunft und bauen dort Proteine und Peptide zur bakteriellen Ernährung ab. Häufig treten sie als Schlüsselfaktoren für die Entstehung verschiedener Krankheiten auf, so soll Coccolysin aus *Enterococcus faecalis* an einigen opportunistischen Infektionen dieses Bakteriums wie Lebensmittelvergiftung, Infektion der Weichteile oder der Harnwege beteiligt sein. Hämagglutinin/Proteinase aus *Helicobacter pylori* und *Vibrio cholerae* wird als Verursacher von Gastritis, Magengeschwüren und Cholera angesehen. [24,46-49] Daher gelten die Proteasen der M4-Familie basierend auf heutigem Wissen als potentielle Ziele in der therapeutischen Intervention.

1.2.1 Immobilisierung

In ihrer natürlich vorkommenden Form werden Enzyme seit einiger Zeit in der Lebens- und Waschmittelindustrie sowie seit Kurzem auch in der pharmazeutisch-chemischen Industrie eingesetzt. ^[45] Von besonderem Interesse ist die wachsende Zahl an Anwendungen, basierend auf immobilisierten Enzymen. Diese bieten den Vorteil der leichteren Handhabung und Abtrennung des Biokatalysators vom Produkt sowie des Recyclings und der höheren Stabilität des eingesetzten Enzyms. Da jedoch die Eigenschaften des immobilisierten Enzyms sowohl vom freien Protein, als auch vom Trägermaterial und ihrem Zusammenspiel beeinflusst werden, ist ein rationales Design und eine Vorhersage der Eigenschaften kaum möglich. So kann die Aktivität des Enzyms durch Immobilisierung abnehmen oder ganz ausbleiben. Grundsätzlich werden vier verschiedene Arten der Immobilisierung unterschieden: Die Enzyme können entweder in natürliche oder synthetische Gelmatrizen (u.a. Polysaccharide) eingebaut (**Abb. 8.1.**) oder untereinander durch bi- bzw. multifunktionelle Reagenzien (meist Glutaraldehyd) vernetzt werden (**Abb. 8.2.**). Bei der kovalenten Kopplung (**Abb. 8.3.**) des Proteins an einen festen Träger werden eine oder mehrere Aminosäureseitenketten modifiziert, wobei die meisten Reaktionen auf nucleophilen Angriffen durch Amino-, Thiol-, Hydroxyl- und Phenolgruppen beruhen. Die große Vielfalt an Kopplungsreaktionen und die weite Verfügbarkeit von bereits funktionalisierten Trägern erleichtern die Anwendung dieser Methode. Eine weitere Möglichkeit der Immobilisierung stellen adsorptiv gebundene Enzyme dar (**Abb. 8.4.**), deren Bindungsstärke zur Matrix durch Wasserstoffbrücken, hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen jedoch nur schwach sind. Daher reagieren sie sehr sensitiv auf Veränderungen in der Umgebung, was eine strenge Kontrolle der Prozessbedingungen erfordert.

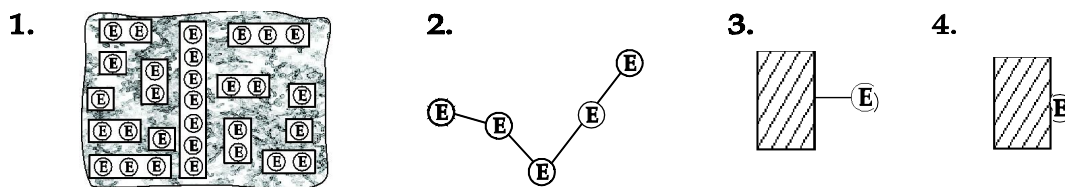


Abb. 8. Verschiedene Möglichkeiten der Immobilisierung: 1) Einschlussverbindungen 2) intramolekulare Quervernetzung 3) kovalente Kopplung und 4) adsorptive Anbindung. ^[50]

Beispiele für die industrielle Anwendung immobilisierter Enzyme finden sich in den USA, wo fixierte Glucose-Isomerase zur Umwandlung von Glucose in Fructose eingesetzt wird, oder in England, wo immobilisierte Penicillin-Acylase zur

Herstellung von 6-Aminopenicillinsäure aus Penicillin G oder V verwendet wird. ^[51] Die wenigsten der bereits entwickelten vielfältigen Protokolle zur kovalenten Immobilisierung ermöglichen jedoch eine quantitative Kopplung unter milden Bedingungen und eine hohe Haltbarkeit des aktivierten Trägers. Daher scheinen Epoxy-aktivierte Materialien wie Eupergit® C einige Vorteile zu bieten. Sie zeichnen sich durch einfache Kopplungsreaktionen unter milden Bedingungen (pH-neutral), Stabilität der geknüpften Bindung und langer Haltbarkeit des funktionalisierten Trägers aus. Zudem kann durch die hohe Dichte an reaktiven Gruppen die enzymatische Stabilität über „Multipoint“-Anbindung deutlich erhöht werden, ohne zu einer Veränderung der Proteinoberfläche wie beispielsweise mit BrCN-aktivierten Trägern zu führen. ^[51-55]

Eupergit C® wurde zwischen 1974 und 1980 bei RÖHM in Darmstadt entwickelt und besteht aus makroporösen Beads mit einem Durchmesser von 100 - 250 µm, hergestellt über Copolymerisation von *N,N'*-Methylen-bis-(methacrylamid), Glycidylmethacrylat, Allylglycidylether und Methacrylamid. ^[56] Aufgrund dieser Struktur ist es sowohl chemisch, als auch mechanisch über einen pH-Bereich von 0 - 14 stabil und wurde bereits in Verbindung mit einer großen Anzahl von Enzymen eingesetzt. Zur Immobilisierung des jeweiligen Enzyms wird dieses in wässriger, gepufferter Lösung mit dem festen Träger über einige Tage inkubiert und die verbleibenden aktiven Oxirangruppen anschließend in Puffer zu den entsprechenden Diolen hydrolysiert.

Für diesen Prozess schlagen GUISAN *et al.* ^[53] einen zweistufigen Bindungsmechanismus vor. Im ersten Schritt adsorbiert das Enzym durch hydrophobe Wechselwirkungen an den festen Träger, wodurch Amino - und Thiolgruppen an der Oberfläche des Proteins in räumliche Nähe zu den Oxirangruppen gebracht werden. Im zweiten Schritt kommt es zum nucleophilen Angriff auf die aktivierten Gruppen des Eupergit C®, wobei sehr stabile C–N und C–S Bindungen gebildet werden (**Abb. 9.**).

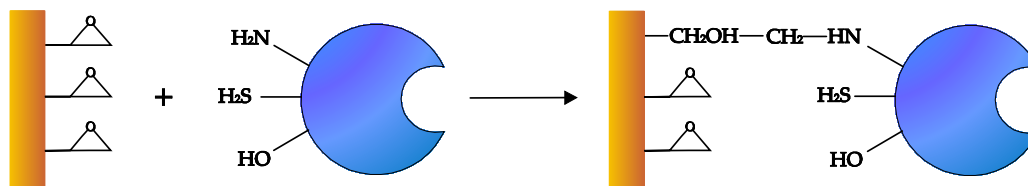


Abb. 9. Kopplung eines Enzyms (blau) mit verschiedenen funktionellen Gruppen an Eupergit C® (braun).

1.3 Lanthanide

Als Lanthanide oder Seltenerdmetalle werden die 14 auf Lanthan folgenden Elemente der Ordnungszahl 58–71 (vielfach einschließlich Lanthan) bezeichnet. Ihr Name leitet sich von dem griechischen *lanthanein* - „verborgen sein“ ab und trägt der Tatsache Rechnung, dass sie in Mineralien (Erden) fein verteilt, miteinander vermischt vorkommen und aufgrund ihrer sehr ähnlichen Eigenschaften nur schwer zu isolieren sind. Demzufolge hielt man sie lange Zeit für selten. Tatsächlich trifft dies nicht zu, denn selbst das seltenste der Lanthanide, Thulium, ist fast so häufig wie Brom.^[57] Ihre Anwendungsmöglichkeiten sind sehr vielseitig und nutzen zumeist ihre besonderen photophysikalischen Eigenschaften.

Die große Ähnlichkeit ihres chemischen Verhaltens basiert auf der Besetzung der 4f-Orbitale ($4f^n 5d^1 6s^2$), die im Innern der Atome liegen und von der 5. und 6. Schale so abgeschirmt werden, dass sie nur minimal mit ihrer Umgebung wechselwirken können. Da die Bindungen in Komplexen der charakteristischen dreiwertigen Kationen daher elektrostatischer Natur sind, werden die Koordinationszahlen und Komplexgeometrien fast ausschließlich durch Ligandeneigenschaften beeinflusst. Diese nehmen die Plätze mit kleinster Abstoßung untereinander ein, wobei die am häufigsten auftretenden Koordinationszahlen acht oder neun sind. Aufgrund ihrer hohen Ladung stellen die Lanthanidionen harte Lewis-Säuren dar, die Komplexe mit harten Basen wie Wassermolekülen, Hydroxidionen, Carboxylaten und Aminen bevorzugen. In neutralen und basischen wässrigen Lösungen sind nur negativ geladene Sauerstoff-Donorgruppen wie Carboxylate in der Lage so stark zu binden, dass sie ein Ausfallen der Lanthanid-Hydroxide $\text{Ln}(\text{OH})_3$ verhindern.^[58,59]

Die Abschirmung der 4f-Orbitale beeinflusst auch die spektroskopischen Eigenschaften der Lanthanide in erheblichem Maße und führt zu deutlichen Unterschieden im Vergleich zu den Übergangsmetallen. Dies zeigt sich unter anderem in der nur geringen Ligandenfeldaufspaltung ihrer Komplexe ($\sim 100 \text{ cm}^{-1}$), wodurch die Lage der Energieniveaus unabhängig von ihrer Umgebung bleibt, strahlungslose Deaktivierungsprozesse relativ ineffizient werden und mit der Emission von Licht konkurrieren. Im Gegensatz zu den Übergangsmetallen, deren angeregte Zustände über das Ligandenfeld ($\sim 25000 \text{ cm}^{-1}$) mit der Umgebung wechselwirken und so strahlungslos deaktiviert werden können, zeigen Lanthanidionen daher charakteristische schmale Emissionsbanden.^[60,61]

Die Energie der elektronischen $4f^n$ -Konfiguration der Lanthanide wird durch eine Kombination aus interelektronischer Abstoßung (E.I.), Spin-Bahn-Wechselwirkung (S.O.) und dem Ligandenfeld (L.F.) bestimmt (**Abb. 10**).

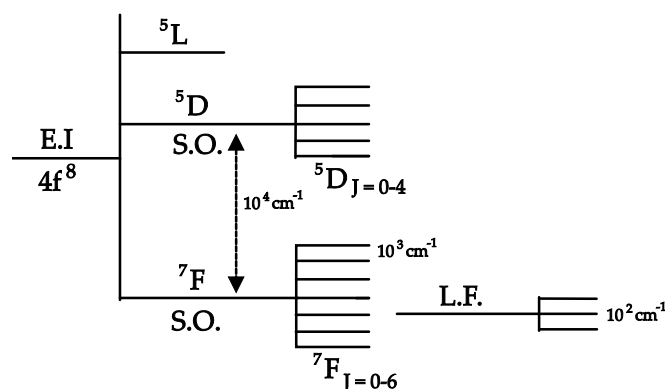


Abb. 10. Term-aufspaltung der $4f^8$ -Konfiguration. [62]

Obwohl elektrische Dipolübergänge zwischen Energieniveaus gleicher Parität nach der LAPORTE-Auswahlregel verboten sind, kommt es bei Übergangsmetallen durch unsymmetrische Schwingungen und der dadurch bedingten Aufhebung des Symmetriezentrums zu $d-d$ -Übergängen, so genannten vibronischen Übergängen. Die Extinktionskoeffizienten können dabei Werte zwischen 1 und $1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ annehmen. Durch die Abschirmung der $4f$ -Elektronen gilt das LAPORTE-Verbot bei den Lanthaniden strenger und ist der Grund für die nur kleinen Extinktionskoeffizienten mit Werten zwischen $0.1 - 1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Auch die starke Spin-Bahn-Wechselwirkung der schweren Metallionen erhöht die Wahrscheinlichkeit solcher Übergänge nicht merklich, so dass die Lebensdauer ihrer Emissionen im Millisekundenbereich liegt (Abb. 11.). [63-65]

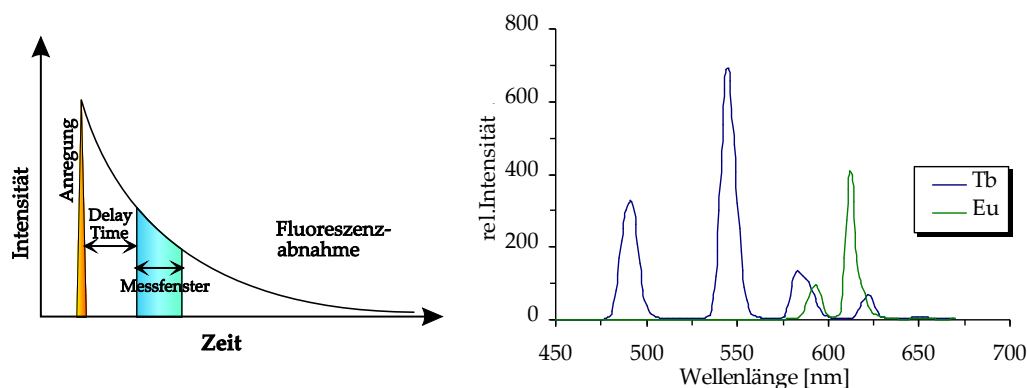


Abb. 11. Links: Prinzip der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie: Emissionssignale werden nach einer Verzögerungszeit, in der störende Signale abklingen, aufgenommen. Rechts: Emissionssignale von Terbium und Europium.

Aufgrund der geringen Extinktionskoeffizienten ist die direkte Anregung der Lanthanide nur mit Lasern möglich. Eine Alternative stellt der Einsatz von Sensitizern dar. Dies sind organische Chromophore, die entweder an multidentaten Liganden wie Polyaminocarboxylate gebunden sind (Pendant Chromophore), oder über eigene Koordinationsstellen für Lanthanide verfügen und diese komplexieren (Chromophoric Chelate) (**Abb. 12.**). Die indirekte Anregung lumineszenter Metallionen mit Hilfe von organischen Chromophoren wird Antenneneffekt genannt.

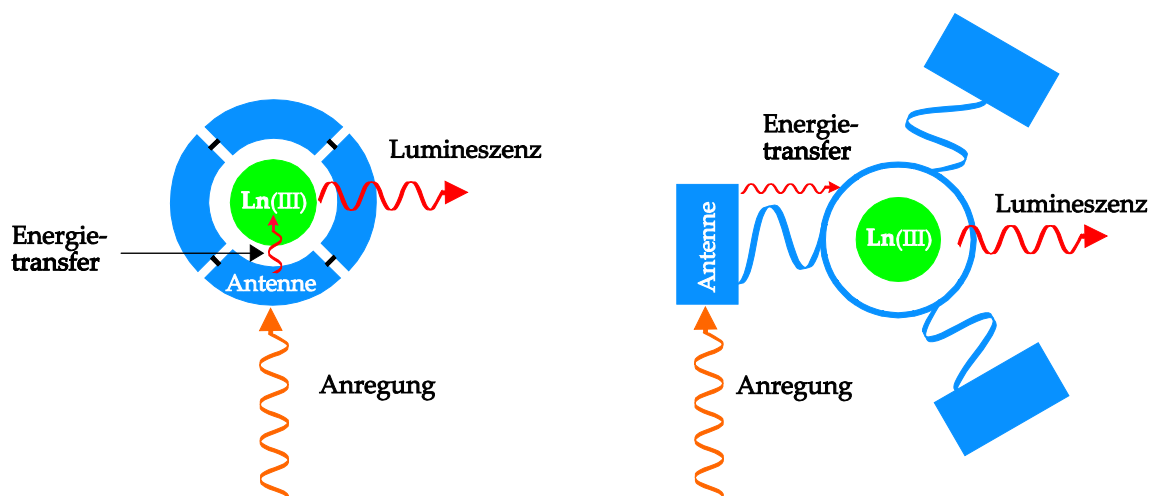


Abb. 12. Aufbau eines lumineszenten Lanthanidkomplexes: *Links:* Chromophoric Chelate
Rechts: Pendant Chromophore. ^[66]

Zu den häufig eingesetzten Polyaminocarboxylatliganden zählen EDTA, DTPA und DOTA (**Abb. 13.**), deren Bindungskonstanten im Bereich von $\geq 10^{12}$ liegen und so komplexierte Lanthanidionen nicht gegen potentiell konkurrierende Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} schnell austauschen

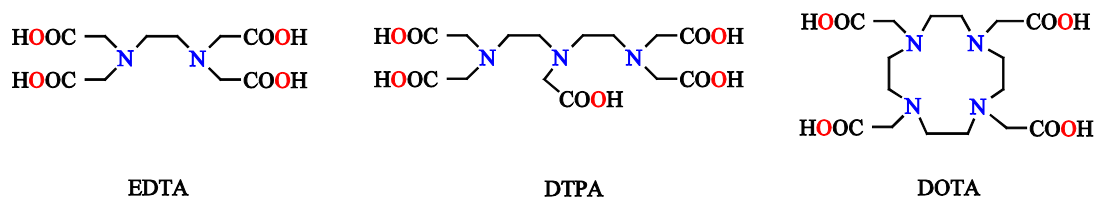


Abb. 13. Häufig eingesetzte Lanthanidliganden.

Die Energieübertragung zwischen Sensitizer und Lanthanidion erfolgt in vier Schritten (**Abb. 14.**):

1. Anregung aus dem S_0 -Grundzustand des organischen Sensitzers in den angeregten Singulett S_1 -Zustand.
2. Intersystem Crossing (ISC) vom Singulettzustand in den angeregten Triplett T_1 -Zustand des Sensitzers.
3. Intramolekularer Energietransfer vom Triplett T_1 -Zustand des Liganden auf einen angeregten Zustand des Lanthanids.
4. Strahlender Übergang vom angeregten Zustand des Metallions in seinen Grundzustand.

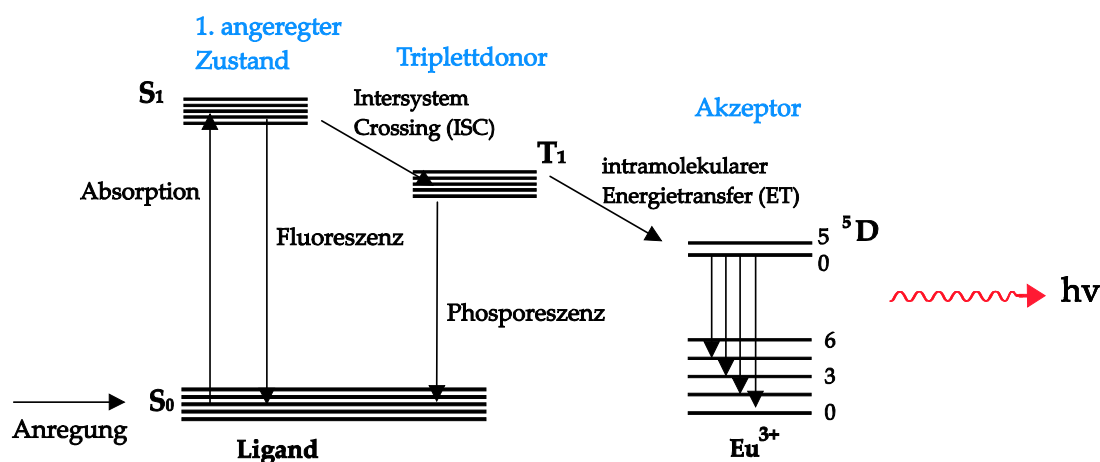


Abb. 14. Energieübertragungsweg von Sensitizer auf Lanthanidion am Beispiel von Eu(III). [62]

Ein effizienter Sensitizer sollte sowohl einen hohen Absorptionskoeffizienten als auch einen Triplettzustand aufweisen, der energetisch über dem des jeweiligen Lanthanids liegt. Zudem erhöht ein geringer Abstand zwischen Singulett- und Triplettzustand die Intersystem Crossing-Effizienz. Als Sensitizer wurden unter anderem Diketonate [67,68], Pyridine [69], Bipyridine [70,71], Terpyridine [72,73], Polyamino-carboxylate [74-76], Calixarene [77,78] und Kryptanden [79,80] eingesetzt. [58,81]

Die Energieniveaus der fünf zentralen lumineszenten Lanthanide, deren Energielücke zwischen angeregten Zuständen und dem Grundzustand ausreichend groß ist, um nicht über strahlungslose Prozesse deaktiviert zu werden, sind in **Abb. 15.** dargestellt. Zu den langlebigsten und daher am häufigsten eingesetzten Lanthaniden gehören Europium und Terbium, welche Energielücken von ungefähr $12\,150\text{ cm}^{-1}$ bzw. $14\,800\text{ cm}^{-1}$ aufweisen. Dies entspricht Emissionen im sichtbaren Bereich des Spektrums und ermöglicht so Anwendungen in der Mikroskopie oder Diagnostik. Die intensivsten Europiumbanden entstehen durch Übergänge zwischen den

5D_0 - und den 7F -Termen, wobei besonders die Bande bei 615 nm ($^5D_0 \rightarrow ^7F_2$) charakteristisch ist. An der Emission von Terbium sind 5D_4 - und 7F -Terme beteiligt, mit der intensivsten Bande bei 545 nm ($^5D_4 \rightarrow ^7F_5$) (siehe auch **Abb. 11.**, *rechts*). Die spezielle Form der Lanthanid-Emission wird häufig als „Lumineszenz“ bezeichnet, um eine Verwechslung mit dem sehr schnellen Prozess der Fluoreszenz organischer Moleküle zu verhindern. Zudem trägt es der Tatsache Rechnung, dass die Übergänge aus einem Zustand mit $S = 2$ (5D_0 für Eu) in einen Zustand mit $S = 3$ (7F_j) erfolgen (j = Gesamtbahndrehimpuls) und somit weder Fluoreszenz (Übergang von Singulett- auf Singulettzustand), noch Phosphoreszenz (Übergang von Triplett - auf Singulettzustand) entsprechen. [82-84]

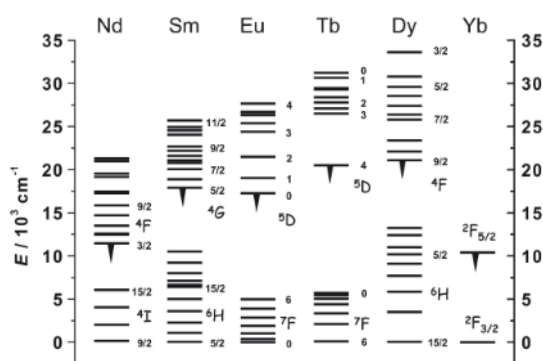


Abb. 15. Partielle Termschemata einiger lumineszenter Ln(III)-Ionen. Die emittierenden angeregten Zustände sind durch Pfeile hervorgehoben. [60]

Der intramolekulare Energietransfer kann über zwei verschiedene Wechselwirkungsmechanismen stattfinden. Dem FÖRSTER-Mechanismus liegt eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung zu Grunde, die von der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors beeinflusst wird und nur bei geringem Abstand zwischen Donor und Akzeptor effizient ist ($\sim r^{-6}$). [85]

Beim DEXTER-Transfer werden Elektronen zwischen einem Donorchromophor und einem Akzeptor ausgetauscht, wobei aus dem angeregten Zustand des Donors ein Elektron zum angeregten Zustand des Akzeptors wechselt, während ein Elektron aus dem Grundzustand des Akzeptors zum Grundzustand des Donors wechselt. Voraussetzung hierfür ist eine Überlappung der Elektronenwolken ($\sim e^{-r}$). [86]

Der größte Vorteil der langlebigen Emissionen der Lanthanide liegt in der Möglichkeit, zeitaufgelöste Techniken anzuwenden, in denen die Fluoreszenzmessung erst nach einer anfänglichen Pause beginnt und so die sonst störende Auto- oder Hintergrundfluoreszenz sowie RAYLEIGH-Lichtstreuung ausgeblendet werden (**Abb. 11.**).

Mehrere temperaturabhängige Prozesse sind imstande, die Lanthanidemission einzuschränken oder zu verhindern (**Abb. 16.**). Zum einen können die elektronischen Niveaus mit passenden Schwingungsmoden benachbarter Moleküle so wechselwirken, dass es zu einer strahlungslosen Deaktivierung kommt (**Abb. 16., links**). Die Effizienz dieses Prozesses ist von der Größe der Energielücke zwischen dem Grund- und dem angeregten Zustand des Metallions, sowie von der Schwingungsenergie des Oszillators abhängig. Das Ausmaß der Deaktivierung ist umgekehrt proportional zur Größe der Energielücke. Besonders X–H Oszillatoren wie Aminliganden oder Wasser, dessen 2. Oberton des O–H Oszillators beispielsweise der Energielücke zwischen 5D_0 und 7F_6 ($12\,300\text{ cm}^{-1}$) des Eu^{3+} -Ions entspricht, zeigen diesen Effekt. Nur durch Abschirmung des Metallions, unter Zuhilfenahme stark koordinierender Liganden, lässt sich dies minimieren und eine Emission beobachten. Eine Deaktivierung kann jedoch auch durch rein elektronische Prozesse hervorgerufen werden. Dabei kommt es zu einem Ligand-Metall Charge Transfer (LMCT), bei dem ein Elektron aus einem angeregten Singulettzustand des Sensitizers (S_1) auf das Metallion übertragen und dieses somit reduziert wird (**Abb. 16., Mitte**). Aus diesem angeregten LMCT-Zustand erfolgt die strahlungslose Deaktivierung in den Grundzustand des Sensitizers. Dieser Prozess ist vor allem für Europium(III) von Bedeutung, da es im Vergleich zu Terbium(III) ($4f^8$) aufgrund seiner Elektronenkonfiguration ($4f^6$) leichter zu reduzieren ist. Daher werden Sensitizer mit großen positiven Normalpotentialen bevorzugt.

Auch die Energiedifferenz zwischen dem angeregten Triplettzustand des Sensitizers und dem angeregten Zustand des Lanthanids kann die strahlungslose Deaktivierung beeinflussen. Beträgt diese Differenz weniger als $1\,500\text{ cm}^{-1}$ kommt es zu einer so genannten Energierückübertragung (Back Energy Transfer) auf den Sensitizer (**Abb. 16., rechts**). Da der angeregte Zustand des Tb(III)-Ions mit $20\,400\text{ cm}^{-1}$ im gleichen Bereich wie viele Aryltriplettzustände liegt, ist dieser Deaktivierungsmechanismus besonders bei diesem Lanthanidion zu beobachten.

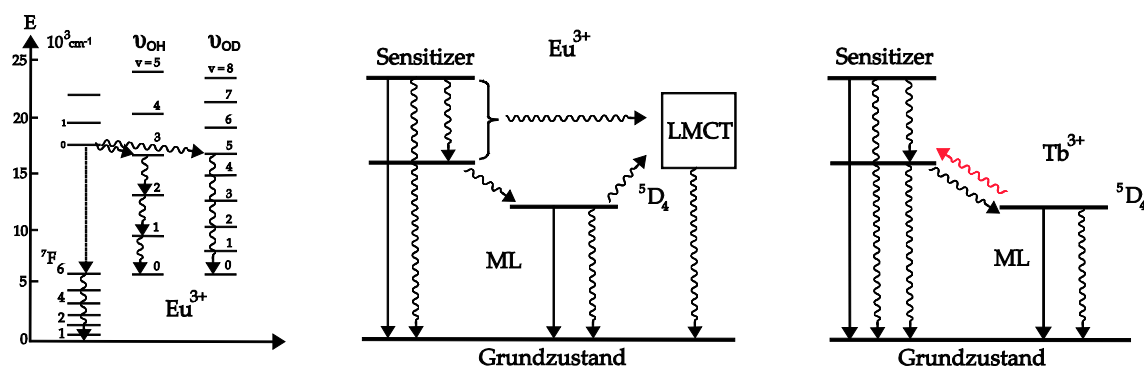


Abb. 16. Strahlungslose Deaktivierung angeregter Zustände durch vibronische Kopplung mit Wasser (*links*), LMCT (*Mitte*) und Back Energy Transfer (*rechts*).^[62]

Abb. 17. zeigt den photochemischen Verlauf der Lanthanidlumineszenz.

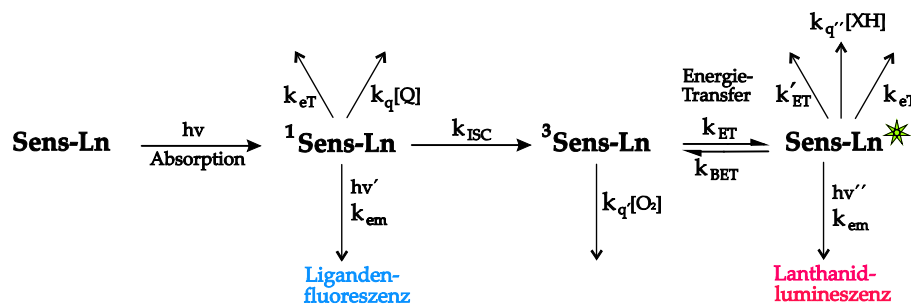


Abb. 17. Photochemischer Verlauf der Lanthanidlumineszenz: eT Elektronentransfer, Em Emission, q Quencher, ET Energietransfer, BET Back Energy Transfer. ^[84]

Die Anwendungsmöglichkeiten der Lanthanide sind sehr vielseitig. Sowohl sparsame Lampen ^[87], Licht emittierende Dioden (LEDs) ^[88], Computer- und Fernsehbildschirme, Laser (YAG-Laser), optische Fasern, als auch NMR-Shift Reagenzien und Kontrastmittel nutzen ihre charakteristischen photophysikalischen Eigenschaften

Eine weitere wichtige Anwendung besteht in der Entwicklung von analytischen Sensoren. ^[58,89] Dabei verdrängt der Analyt koordinierte Wassermoleküle durch reversible Bindung an die Lanthanide und erhöht so die Intensität der Lumineszenz und ihre Lebensdauer. Auf diese Weise ist es möglich, Anionen wie Hydrogencarbonat, Phosphat oder Lactat in Zellen in physiologischen Konzentrationen nachzuweisen.

Durch Elektronen- oder Charge-Transfer-Prozesse zwischen Analyt und dem Singulettzustand der Lanthanide wird die Wahrscheinlichkeit eines Intersystem Crossings minimiert und kommt es zur Abnahme ihres spezifischen Signals. VASSEUR *et al.* ^[90] ist es so gelungen, die Chlorid-Konzentration in biologischen Medien zu messen. Auch pH- und $p[O_2]$ -Sensoren auf Basis von Lanthanidkomplexen wurden entwickelt. Erstere beruhen auf der Protonierung der Amin- oder Carboxylatliganden und der daraus folgenden Schwächung der Koordination, letztere auf der strahlungslosen Deaktivierung des Triplett-Zustands des Sensitizers durch Sauerstoff. Auch für den quantitativen Nachweis von klinischen Substanzen, so genannten Immunoassays für Proteine (Antigene, Enzyme) und Hormone, werden Lanthanide eingesetzt.

Das so genannte „Delfia“-System (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoro-Immuno-Assay) war 1980 einer der ersten patentierten, kommerziellen, heterogenen, zeitaufgelösten Fluoroimmunoassays, welcher die traditionellen Radioimmunoassays ersetzte. Dabei werden Lanthanide zunächst mit Polyaminocarboxylat-

liganden an einen Antikörper gebunden. Um nach der heterogenen Immunreaktion den Anteil an Antigenen zu ermitteln, wird der pH-Wert erniedrigt und die Lanthanide dissoziieren in Lösung, in welcher sich ein Sensitizer befindet, der so die Lumineszenz ermöglicht (**Abb. 18.**).

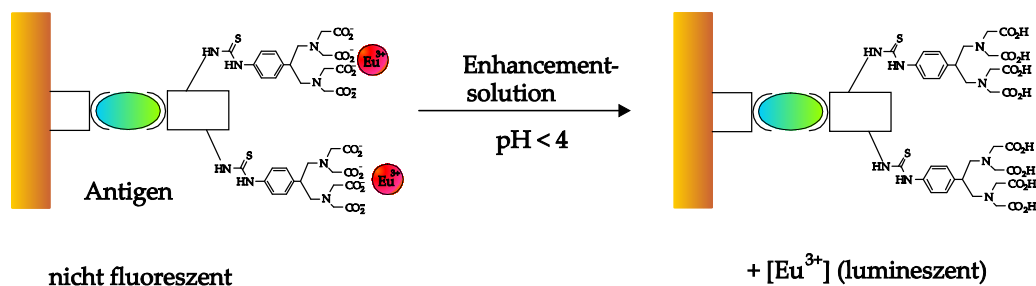


Abb. 18. Prinzip des „Delfia“-Systems. ^[62]

Da homogene Immunoassays den FRET-Effekt nutzen, haben sie den Vorteil in einem Schritt, ohne Waschen, durchgeführt werden zu können (**Abb. 19.**). Dabei kommt es zu einem Energietransfer zwischen dem angeregten Lanthanidion und einem Akzeptor, meist einem organischen Farbstoff, der zu fluoreszieren beginnt. Da die Lebensdauer der Emission des Akzeptors von der Emissionsrate des angeregten Lanthanids abhängig ist, kann die eigentliche Fluoreszenz zeitaufgelöst gemessen werden, daher nennt man dies LRET (Luminescence Resonance Energy Transfer) oder auch TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Derartige Immunoassays können 10 - 100 Mal empfindlicher und 10 - 20 Mal schneller sein als der viel verwendete ELISA-Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und weisen Nachweisgrenze bis zu 10⁻¹⁸ Mol auf. ^[91]

Die besonderen spektroskopischen Eigenschaften der Lanthanide finden auch in Hybridisierungsassays Verwendung. Für eine Übersicht des heutigen Forschungsstandes siehe Kapitel 3.5.1.

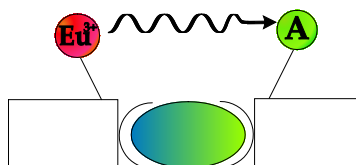


Abb. 19. Homogener Immunoassay über LRET (A = Akzeptor, Eu = Europium).

2 Zielsetzung

Viele heutzutage eingesetzte analytische und diagnostische Verfahren beruhen auf den einzigartigen photophysikalischen Eigenschaften der Lanthanide und ihrer Komplexe. Dabei führt neben den großen STOKES-Shifts und den charakteristischen, schmalen Emissionsbanden besonders die lange Lebensdauer ihrer Lumineszenz in Verbindung mit zeitaufgelösten Messungen zu deutlich verbesserten Detektionsgrenzen.

Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Anwendung lanthanidfunktionalisierter Peptide und Peptidnucleinsäuren (PNAs) für den empfindlichen Nachweis von Metalloendoproteasen wie Thermolysin sowie für den sequenzspezifischen Nachweis von DNA.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ligandensynthesen

3.1.1 Synthese von 2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy-hexansäure

Die Integration künstlicher allosterischer Bindungsstellen in Nucleinsäuren und Peptiden eröffnet die Möglichkeit, ihre Struktur und Funktion mit niedermolekularen Effektoren zu kontrollieren. Zur Bildung eines solchen allosterischen Schalters wurde Terpyridin als geeignete funktionelle Gruppe in Form eines C6-Carbonsäurelinkers an 4'-Position des aromatischen Systems eingesetzt und nach einer Literaturvorschrift synthetisiert.^[92,93] Die mit diesem Liganden modifizierten DNA-Konjugate und ihre vermittelte allosterische Kontrolle der Hybridisierung durch Metallionen wurden in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und untersucht (Abb. 20).^[94]

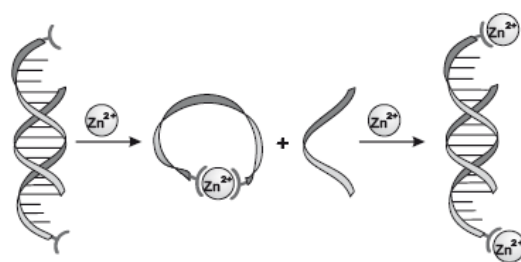


Abb. 20. Allosterische Kontrolle der Hybridisierung von Tpy₂DNA durch Zink(II)-Ionen.^[95]

4'-Chloro-2,2':6',2''-Terpyridin reagierte unter basischen Bedingungen in einer nucleophilen Substitution mit ϵ -Caprolacton zur 4'-Alkyloxycarbonsäure (**1**). Diese wurde durch saure Fällung aus der wässrigen Reaktionslösung mit einer Ausbeute von 82 % als weißer Feststoff erhalten.

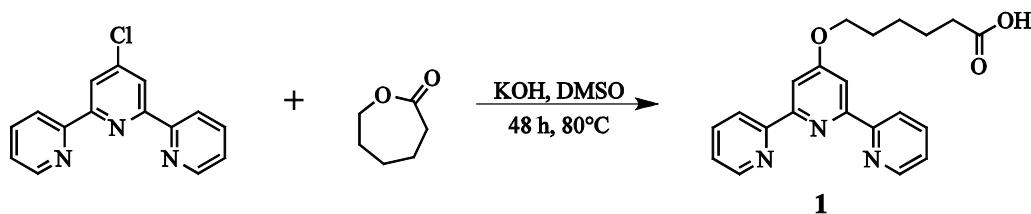
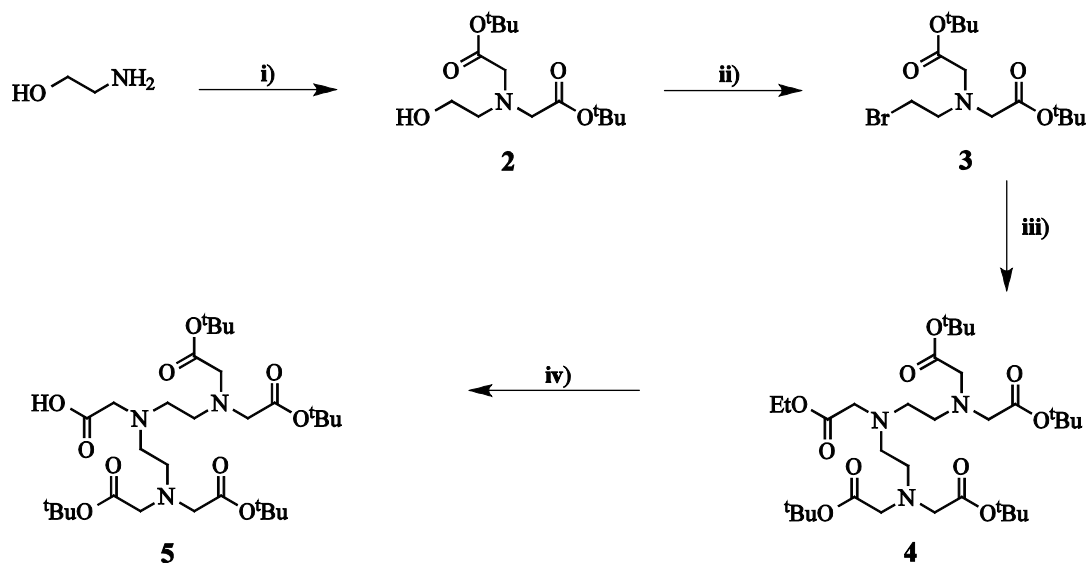


Abb. 21. Synthese von 2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy-hexansäure (**1**).

3.1.2 Synthese eines *tert*-Butyl-geschützten DTPA-Derivats

Um allosterische Schalter in Nucleinsäuren einzuführen, welche ein Primärsignal in ein Lanthanidsignal umwandeln können, sollten Polyaminocarboxylate synthetisiert werden, die zur Ankopplung an die festphasengebundene PNA über eine freie Säurefunktion verfügen, während die für die Metallkomplexierung vorgesehenen Carboxylatfunktionen geschützt sein sollten. Dazu wurden *tert*-Butylester eingesetzt, die während der Festphasensynthese der Nucleinsäure stabil sind, jedoch im Zuge des Abspaltens der Oligomere vom polymeren Träger mit Tri fluoressigsäure entfernt werden können (**Abb. 22**).

Den Ausgangspunkt für die Synthese des *tert*-Butyl-geschützten DTPA-Derivats **5** bildete Ethanolamin, welches im ersten Schritt über die Aminofunktion zweifach mit Bromessigsäure-*tert*-butylester alkyliert wurde (**i**). Der geschützte Ester wurde hierzu in Anlehnung an F. ZELDER^[96] in DMF und DIEA (*N,N'*-Diisopropylethylamin) bei 0°C vorgelegt, mit Ethanolamin bei gleicher Temperatur über 30 min sowie anschließend bei Raumtemperatur über Nacht, umgesetzt und extrahiert. Die so erhaltene Verbindung **2** wurde im nächsten Schritt mit *N*-Bromsuccinimid und Triphenylphosphin bei 0°C in Dichlormethan bromiert (**ii**).^[97] Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte Verbindung **3** isoliert und anschließend, basierend auf einer modifizierten Literaturvorschrift, zur zweifachen Alkylierung von Glycinethylesterhydrochlorid eingesetzt werden (**iii**).^[98] Dazu wurden Glycinethylesterhydrochlorid mit Verbindung **3** unter basischen Bedingungen umgesetzt und Verbindung **4** nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten. Um die zur Kopplung an Nucleinsäuren benötigte freie Carbonsäure funktion zu generieren, muss der so eingeführte Ethylester zum Erhalt der *tert*-Butylschutzgruppen basisch hydrolysiert werden (**iv**). Dies wurde mittels Natronlauge sowie anschließender milder Neutralisation mit Dowex[®]-Kationenaustauschers (Pyridiniumform) erreicht. Das dabei in hoher Ausbeute erhaltene Produkt **5** konnte direkt in festphasengebundenen Reaktionen weiterverwendet werden.



- i) $\text{BrCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$, DIEA, DMF, 30 min 0°C; 12 h RT
 ii) NBS, Triphenylphosphin, DCM, 1.5 h, 0°C
 iii) Glycinethylesterhydrochlorid, Na_2CO_3 , MeCN, 24 h, Rückfluß
 iv) NaOH, MeOH, 4 h, RT

Abb. 22. Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 5.

3.1.3 Synthese von *tert*-Butyl-geschützter Iminodiessigsäure ^[96]

Um Iminodiessigsäure an Peptidnucleinsäuren koppeln zu können wurde ein Derivat synthetisiert, das zur Anbindung an die festphasengebundene PNA über eine freie Säurefunktion verfügt, während die für die Metallkomplexierung vorgesehenen Carboxylatfunktionen als *tert*-Butylester geschützt waren.

Dazu wurde nach F. ZELDER ^[96] die Aminofunktion des Glycinethylesters zunächst zweifach mit Bromessigsäure-*tert*-butylester alkyliert und Verbindung **6** säulenchromatographisch gereinigt. Darauf folgte die Hydrolyse der Ethylesterfunktion von **6** mit Natronlauge, wobei eine milde Neutralisation mit Dowex[®]-Kationenaustauscher in Pyridiniumform erreicht wurde. Die so erhaltene Iminodiessigsäure **7** wurde zur Verknüpfung mit dem N-Terminus festphasengebundener PNA eingesetzt.

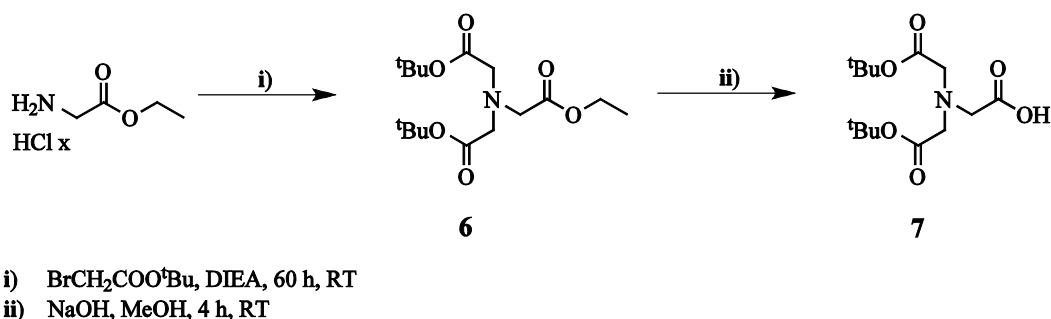


Abb. 23. Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 7.

3.1.4 Synthese von 4'''-substituierten 4'-Phenylterpyridinen

Aufgrund ihres geringen Extinktionskoeffizienten können Lanthanide direkt nur mit Lasern oder indirekt mit Hilfe eines organischen Chromophors (Sensitizer) angeregt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Sensitizer synthetisiert werden, die Lanthanidionen komplexieren und gleichzeitig die Möglichkeit der kovalenten Kopplung mit Biomolekülen wie Peptiden oder Nucleinsäuren bieten. Daher wurden Terpyridine als Grundgerüst des so genannten „Chromophoric Chelate“ (Kapitel 1.3, Abb. 12.) gewählt. Zur Erhöhung der Absorption des Sensitizers und somit einer effizienteren Bevölkung des angeregten Zustands der Lanthanide wurden zunächst Phenylterpyridinderivate synthetisiert, deren optische Eigenschaften durch elektronenziehende (Nitro-) und elektronengebende (Methyl-) Gruppen variiert werden sollten.

4'''-Methylphenylterpyridin (**8**) konnte nach einer von WANG *et al.* [99] beschriebenen einstufigen HANTZSCHEN-Pyridinsynthese erhalten werden (Abb. 24.). Dazu wurden 2-Acetylpyridin und *p*-Tolylaldehyd zusammen mit Kaliumhydroxid und Ammoniumhydroxid in Ethanol über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und so der mittlere Pyridinring aufgebaut. Nach Umkristallisation des dabei entstandenen Niederschlags konnte 4'-(4-Methylphenyl)-2,2':6',2''-terpyridin (**8**) kristallin erhalten werden.

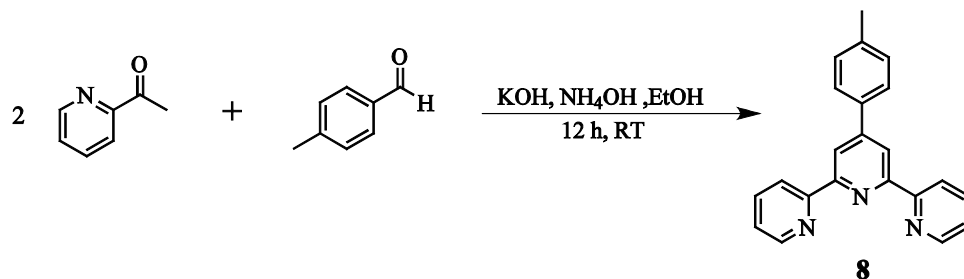


Abb. 24. Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 8.

Da die Synthese des nitrosubstituierten Phenylterpyridins nach WANG *et al.* [99] nur einen geringen Umsatz zeigte, wurde eine dreistufige Route gewählt (**Abb. 25.**), bei der im ersten Schritt 2-Acetylpyridin in einer ORTOLEVA-KING-Reaktion [100-102] mit Jod und Pyridin umgesetzt und nach Umkristallisation des entstandenen Niederschlags Verbindung **9** erhalten wurde.

Im zweiten Schritt reagierte 2-Acetylpyridin in einer CLAISEN-SCHMIDT Reaktion mit 4-Nitrobenzaldehyd zum korrespondierenden Enon **10**. Nach Umkristallisation in Ethanol wurde im letzten Schritt Verbindung **10** mit Verbindung **9** über eine MICHAEL-Addition und anschließende Ringschlussreaktion zum gewünschten 4'-(4''-Nitrophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin (**11**) in hohen Ausbeuten umgesetzt. [72].

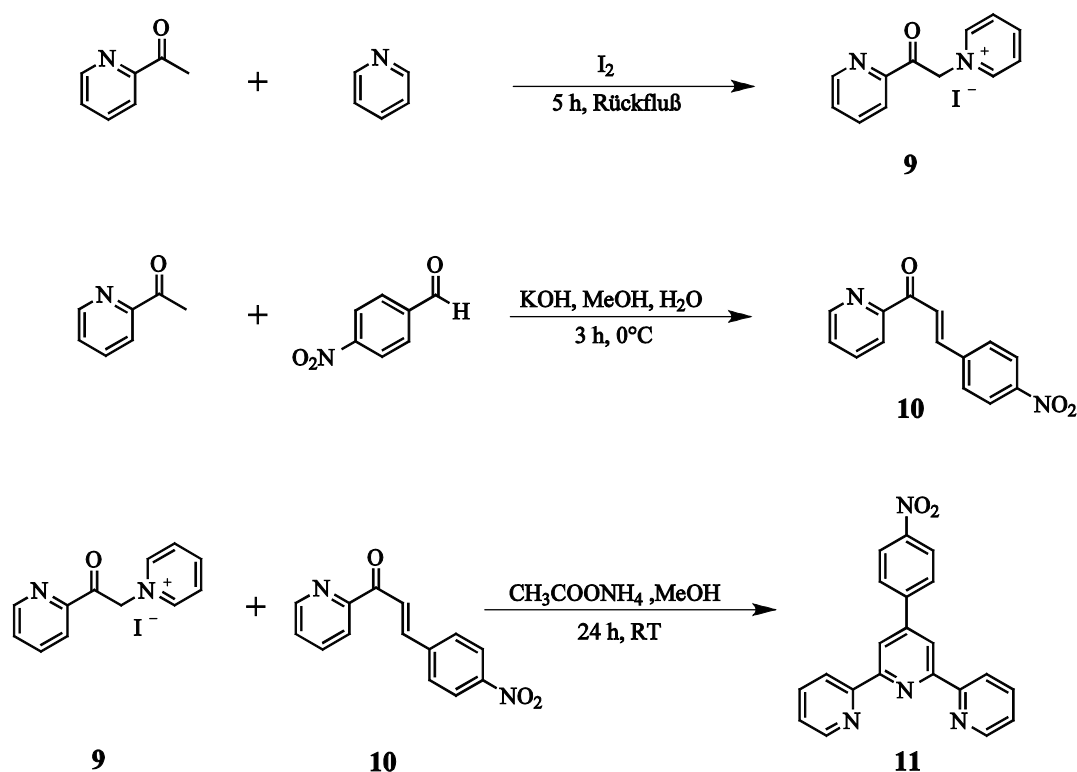


Abb. 25. Syntheschema zur Darstellung von Verbindung **11**.

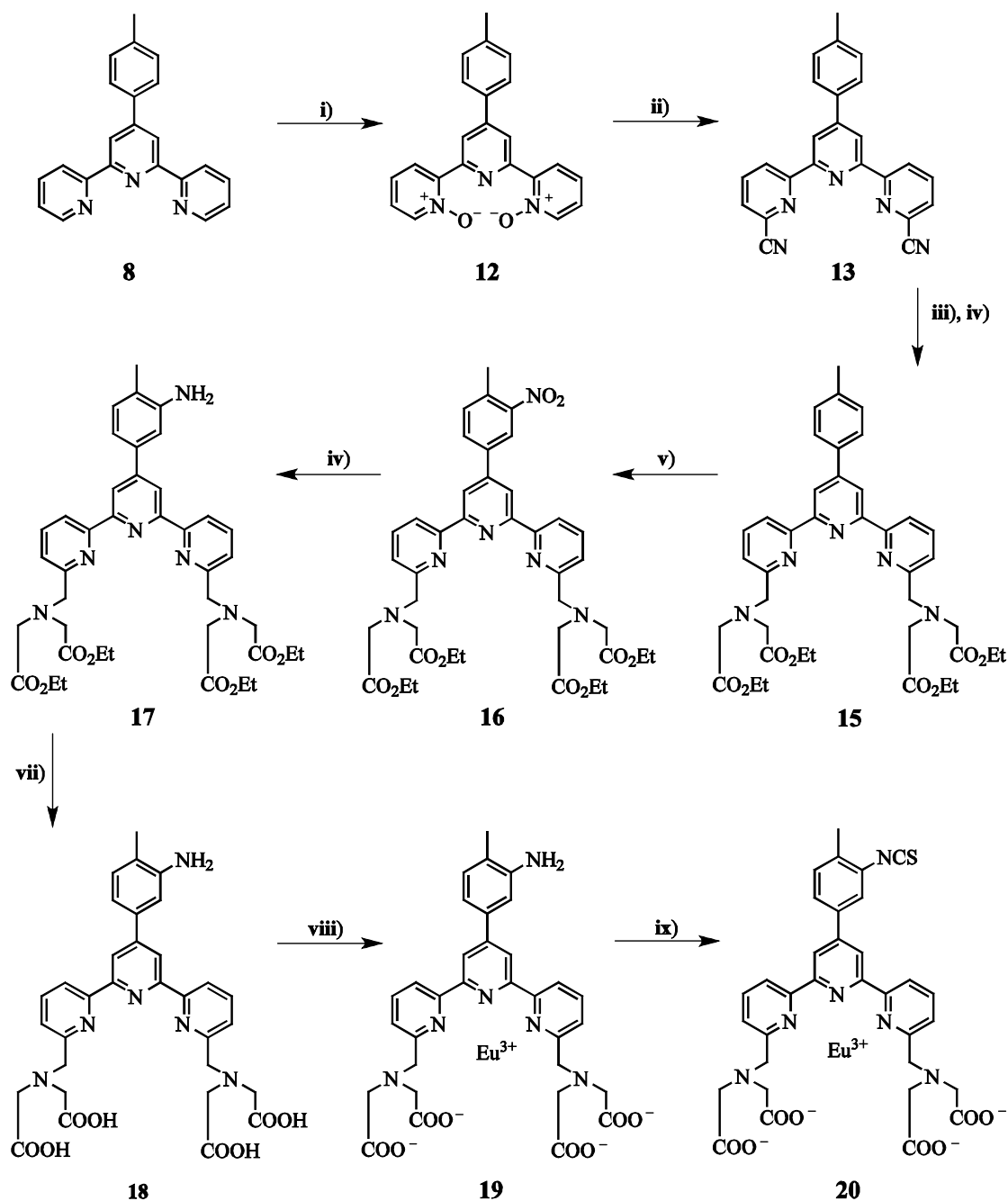
3.1.5 Synthese eines Isothiocyanat-aktivierten Methylphenylterpyridin-bisaminomethyl-tetraacetat-Europiumkomplexes

Ausgehend von 4'-(4-Methylphenyl)-2,2':6'2''-terpyridin (**8**) wurde in einer achtstufigen modifizierten Synthese {6,6''-Bis-[*N,N*-bis-(carboxymethyl)aminomethyl]-4'-(4-methyl-3-isothiocyanatophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin} Europium (III) (**20**) synthetisiert.^[103,104] Mittels aktivierter Aminofunktion sollten so Biomoleküle über Ausbildung eines Thioharnstoffderivats markiert und für zeitaufgelöste Messung der Lanthanidlumineszenz zugänglich gemacht werden.

Im ersten Schritt wurde Verbindung **8** bei Raumtemperatur über Nacht mit *m*-CPBA oxidiert und das gebildete *N,N'*-Dioxid **12** durch Umkristallisation in Acetonitril/Methanol rein erhalten (**i**). Davon ausgehend konnte über eine modifizierte REISSERT-HENZE-Reaktion mit Trimethylsilylcyanid und Benzoylchlorid Verbindung **13** nach Umkristallisation des weißen Niederschlags aus Dioxan erhalten werden (**ii**). Die Reduktion von **13** mit BH₃ in Tetrahydrofuran (BH₃xTHF) lieferte das korrespondierende Bis-Amin **14** (**iii**). Dieses wurde ohne weitere Aufreinigung zur Einführung der Carboxylatfunktionen in das Terpyridin gerüst verwendet. Dazu wurde Verbindung **14** mit Bromessigsäureethylester und DIEA über Nacht in einer nucleophilen Substitution umgesetzt (**iv**) und Verbindung **15** nach säulenchromatographischer Aufreinigung isoliert.

Über aromatische Nitrierung und anschließender Reduktion der Nitrogruppe sollte die zur Kopplung der Terpyridinderivate an Biomoleküle benötigte Aminogruppe eingeführt werden. Verbindung **15** wurde daher in konzentrierter Schwefelsäure gelöst und durch Zugabe rauchender Salpetersäure in 3'''-Position nitriert (**v**). Nach erfolgter Neutralisation und Extraktion konnte Verbindung **16** erhalten werden, welche im nächsten Schritt in heißem Ethanol gelöst und mit Zinn(II)chlorid reduziert wurde (**vi**). Zur Komplexierung und Entfernung des in Lösung befindlichen Zinns(II)/(IV) wurde die Reaktionslösung mit wässriger EDTA-Lösung versetzt und Produkt **17** nach einer Stunde aus der wässrigen Lösung extrahiert. Die in Verbindung **17** geschützten Carbonsäurefunktionen wurden mit einer Mischung aus Ethanol, Wasser und Kaliumhydroxid vier Stunden hydrolysiert und die gebildete Carbonsäure durch Ansäuern auf pH 1 ausgefällt (**vii**). Anschließend konnte der Niederschlag (**18**) ohne weitere Aufreinigung in den Europiumkomplex **19** überführt werden, wobei sich dieser in einer wässrigen Europium(III)-chloridlösung bei einem pH-Wert zwischen 6 und 7 nach 1.5 Stunden bildete (**viii**). Zur Abtrennung von überschüssigem Europium(III) als Hydroxid wurde die Reaktionslösung zunächst mit Natronlauge auf pH 8.5 gebracht und abfiltriert. Das Filtrat wurde auf einige Milliliter eingengt und mit kaltem Aceton versetzt. Der sich

dabei gebildete weiße Niederschlag zeigte unter der UV -Lampe das charakteristische rote Leuchten der Europium-Sensitizer-Komplexe. In einem letzten Reaktionsschritt sollte die unreaktive Aminogruppe des 4'-Phenylrings (**19**), im Hinblick auf die Kopplung mit Biomolekülen, in das reaktivere Isothiocyanatderivat **20** überführt werden. Dazu wurde Verbindung **19** mit einer wässrigen Lösung aus Natriumhydrogencarbonat und Thiophosgen umgesetzt, die wässrige Phase mehrmals durch Extraktion mit Chloroform von restlichem Thiophosgen befreit und auf wenige Milliliter eingeeengt. Das Produkt **20** konnte als weißer Niederschlag durch Ausfällen mit kaltem Aceton erhalten werden und zeigte unter UV-Licht ebenfalls die charakteristische Lumineszenz.



i) *m*-CPBA, DCM, 12 h, RT

iii) BH_3 , THF, 12 h, RT

v) H_2SO_4 , HNO_3 , 2 h, 0°C

vii) KOH, H_2O , EtOH, 4 h, RT

ix) CSCl_2 , NaHCO_3 , H_2O , CHCl_3 , 1.5 h, RT

ii) Trimethylsilylcyanid, Benzoylchlorid, DCM, 12 h, RT

iv) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{COEt}$, DIEA, MeCN, 12 h, Rückfluss

vi) SnCl_2 , EtOH, 4 h, Rückfluss

viii) EuCl_3 , H_2O , 1.5 h, RT

Abb. 26. Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 20.

3.1.6 Synthese eines Isothiocyanat-aktivierten Nitrophenylterpyridin-bisaminomethyl-tetraacetat-Europiumkomplexes

Alternativ zu Verbindung **20** wurde nach identischem Syntheschema und bekannter Literatur ^[72] ein Phenylterpyridinderivat synthetisiert, dessen 4'-Phenylring neben einer Isothiocyanatfunktion keine zusätzlichen Substituenten aufweist. Hierbei diente 4'-(4-Nitrophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin (**11**) als Ausgangsverbindung. Diese wurde zunächst mittels *m*-CPBA zum *N,N'*-Dioxid **21** oxidiert (**i**) und daraufhin mit Trimethylsilylcyanid in sein 6,6'-Dinitril **22** überführt (**ii**). Durch Reduktion mit BH₃ (**iii**) und anschließender nucleophiler Substitution (**iv**) erhält man nach säulenchromatographischer Au freinigung Verbindung **24** (höhere Ausbeute im Vergleich zur Literatur ^[72], 33 % gegenüber 4%). Dieses wurde durch Reduktion mit Zinn(II)chlorid (**v**) in sein Amin (**25**) umgesetzt, welches ohne Aufreinigung im nächsten Schritt basisch hydrolysiert wurde (**vi**). Der Europiumkomplex **27** konnte analog zu 3.1.5. aus der Tetracarbonsäure **26** gebildet (**vii**) und anschließend mit Thiophosgen zum aktivierten Amin **28** umgesetzt (**viii**).

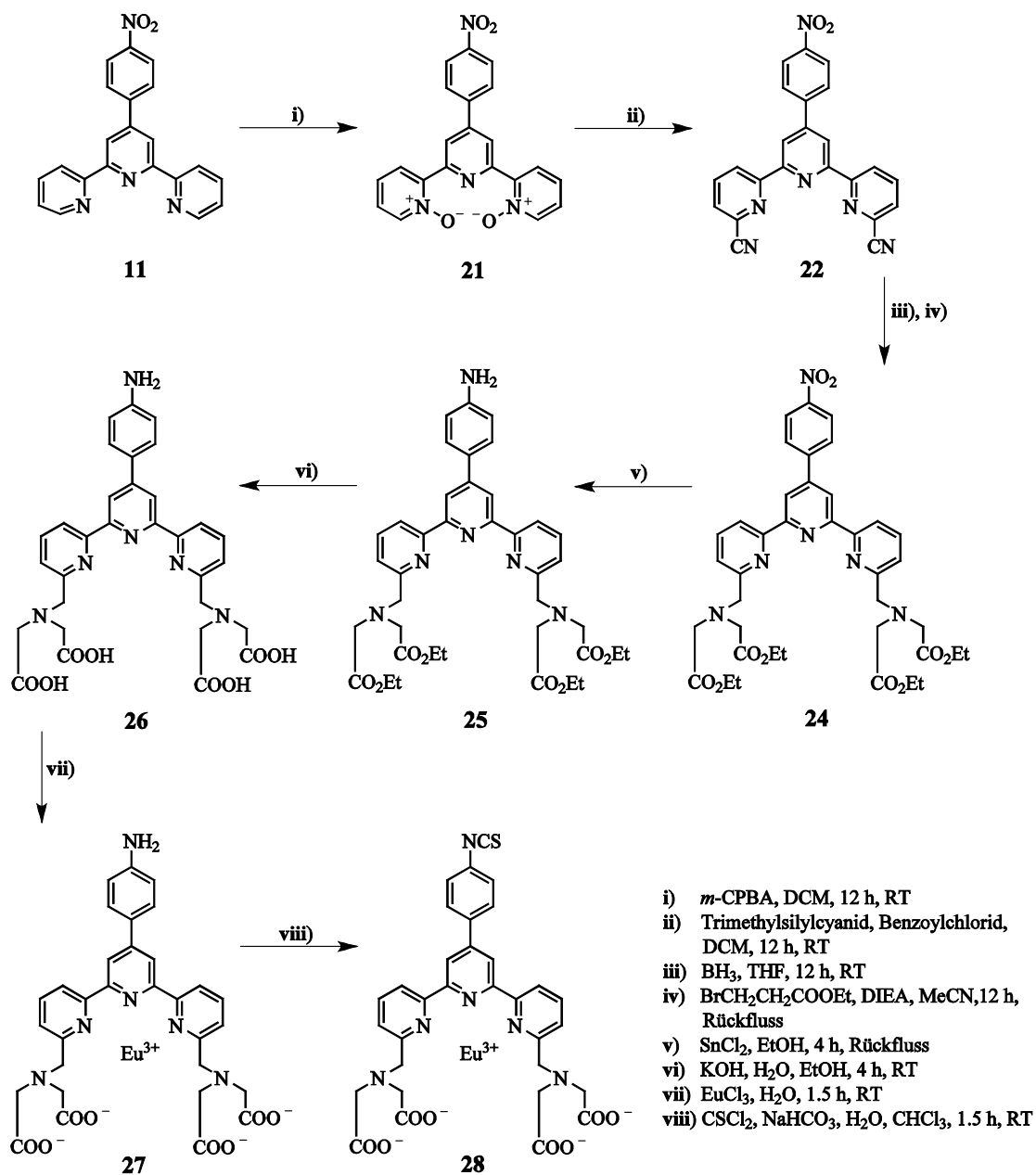


Abb. 27. Syntheschema zur Darstellung von Verbindung 28.

3.1.7 Synthese eines Triazin-aktivierten Methylphenylterpyridin-bisaminomethyl-tetraacetat-Europiumkomplexes

Zur Steigerung der Reaktivität der Aminofunktion wurde neben dem Isothiocyanatderivat **20**, ausgehend von Verbindung **19**, auch das Trichlorotriazin-derivat **29** synthetisiert.

In Anlehnung an eine Synthesevorschrift nach MUKKALA *et al.* [72] wurde dazu eine Natriumacetatlösung (pH 4.9) von {6,6''-Bis-[N,N-bis-(carboxymethyl)aminomethyl]-4'-(4-methyl-3-aminophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin}Europium(III) (**19**) mit einer Suspension aus 2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazin in einem Aceton/Wasser-Gemisch versetzt und nach Fällung des Produkts mit kaltem Aceton Verbindung **29** mit einer Ausbeute von 34 % erhalten.

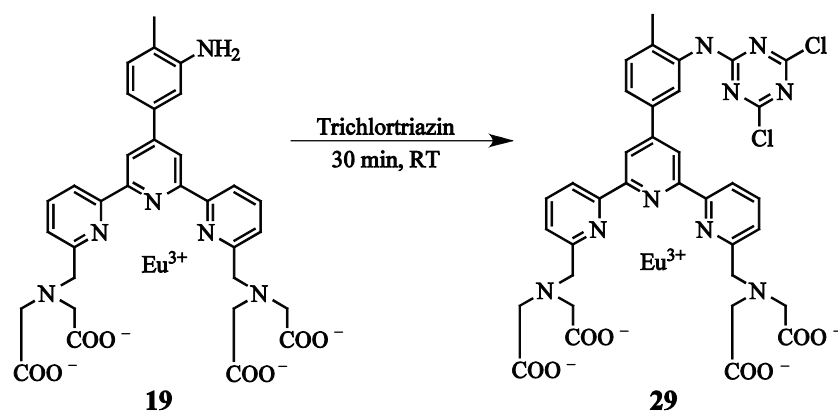


Abb. 28. Syntheschema der Triazin-Aktivierung von Verbindung **19**.

3.1.8 Synthese von 4'-Phenylterpyridinbiscarbonsäuren

Da die üblichen in Lösung eingesetzten Sensitizer, wie Chelidamsäure oder 2,6-Bispicolinsäure, nur drei Koordinationsstellen aufweisen, daher weniger stabile Komplexe bilden und für eine ausreichende Anregung der Ionen im Verhältnis 3:1 eingesetzt werden müssen, sollten Sensitizer mit einer höheren Zahl an Koordinationsstellen synthetisiert werden. Die jeweiligen 6,6'-Dinitrile (**13**, **22**) wurden daher in Anlehnung an COATES *et al.* [103,105] mit konzentrierter Salz- und Essigsäure in ihre 6,6'-Biscarbonsäure-Derivate (**30**, **31**) überführt. (Abb. 29.).

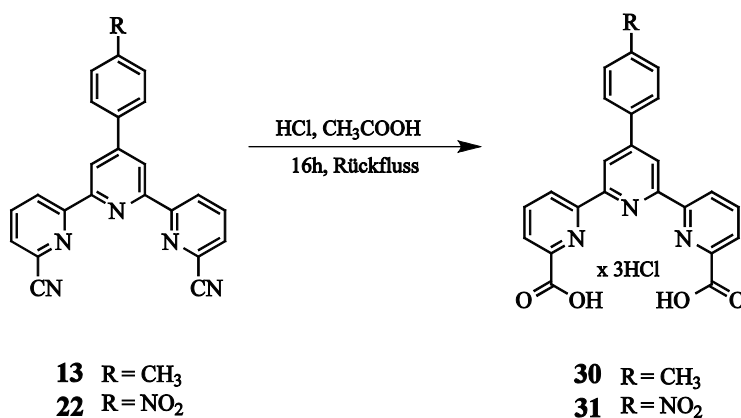
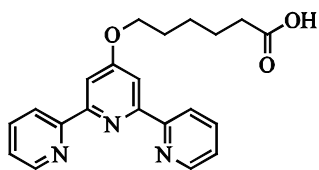
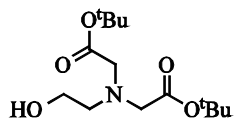
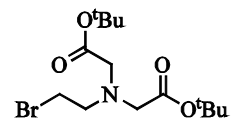
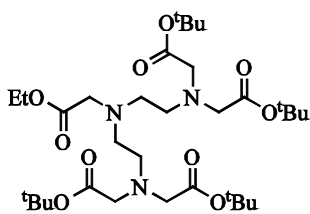
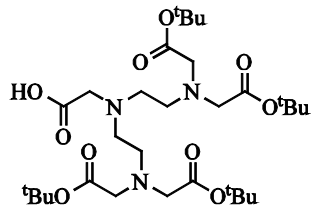
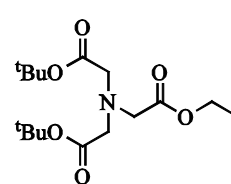
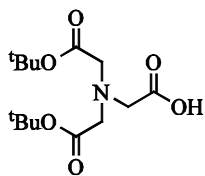
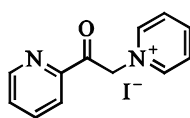
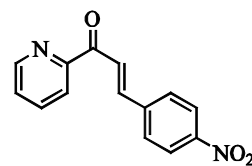
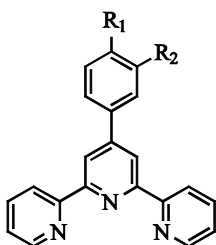
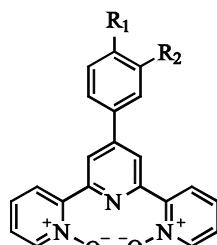
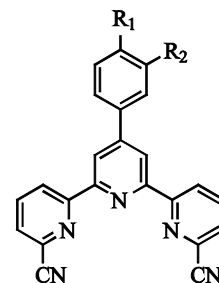
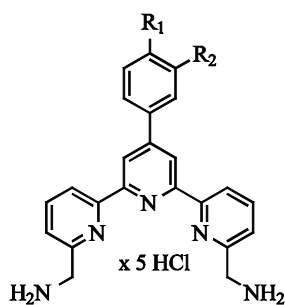
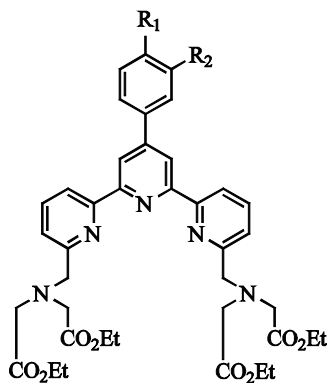
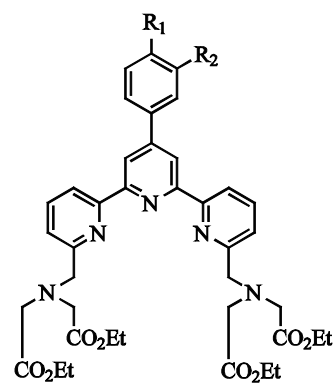


Abb. 29. Syntheschema der Hydrolyse der 6,6'-Dinitrile (**13**, **22**).

3.1.9 Übersicht der synthetisierten Verbindungen

**1****2****3****4****5****6****7****9****10****8** R₁ = CH₃ R₂ = H**11** R₁ = NO₂ R₂ = H**12** R₁ = CH₃ R₂ = H**21** R₁ = NO₂ R₂ = H**13** R₁ = CH₃ R₂ = H**22** R₁ = NO₂ R₂ = H**14** R₁ = CH₃ R₂ = H**23** R₁ = NO₂ R₂ = H**15** R₁ = CH₃ R₂ = H**24** R₁ = NO₂ R₂ = H**16** R₁ = CH₃ R₂ = NO₂**25** R₁ = NH₂ R₂ = H

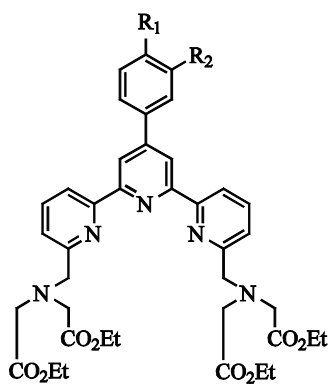
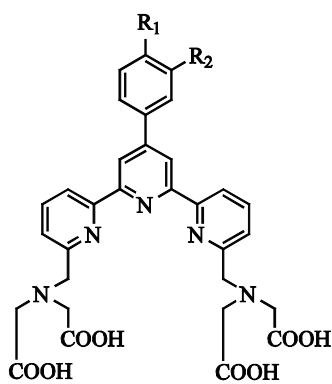
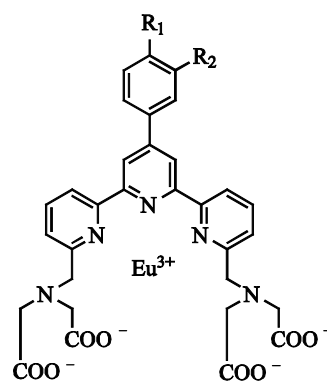
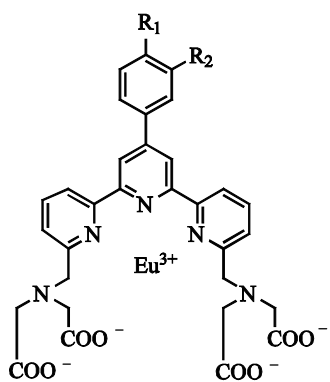
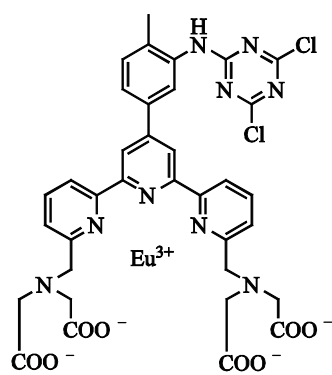
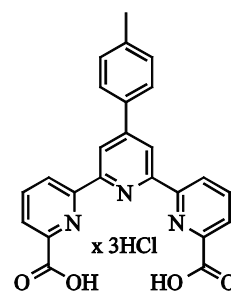
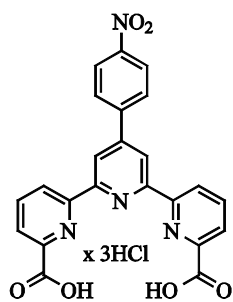
**17** $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{NH}_2$ **18** $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{NH}_2$ **26** $R_1 = \text{NH}_2$ $R_2 = \text{H}$ **19** $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{NH}_2$ **27** $R_1 = \text{NH}_2$ $R_2 = \text{H}$ **20** $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{SCN}$ **28** $R_1 = \text{SCN}$ $R_2 = \text{H}$ **29****30****31**

Abb. 30. Übersicht der synthetisierten Verbindungen 1 - 31.

3.2 Synthese der PNA-Konjugate

3.2.1 Synthese von C- und N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten

Um PNA sowohl am N- als auch C-Terminus mit verschiedenen Substituenten zu modifizieren, musste die freie Aminogruppe der Festphase zunächst mit einem geschützten Lysinbaustein umgesetzt werden. Dazu wurde im ersten Schritt eine Lösung aus Piperidin/DMF zur Abspaltung der 9-Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppe (Fmoc) der Festphase (Rink Resin[®]) verwendet (**i**), welche anschließend mit Fmoc- und N-Allyloxycarbonyl (Alloc)-geschütztem Lysin reagierte (**ii**). Zur Aktivierung der Aminocarbonsäure wurden DIEA, HOBT 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol und das Uroniumsalz HBTU *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat eingesetzt. Durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des gekoppelten Lysins konnte eine freie Aminogruppe erhalten werden (**iv**), an der die PNA-Synthese nach Standardfestphasenprotokollen am Syntheseautomaten durchgeführt wurde (**vi**). Da Peptidnucleinsäuren aufgrund ihres neutralen Rückgrats nur mäßig wasserlöslich sind, mussten zuvor zwei zusätzliche Lysinbausteine eingeführt werden (**v**). Die bei der Nucleinsäuresynthese entschützte Aminogruppe wurde anschließend mit drei unterschiedlichen Substituenten (**R**¹) modifiziert (**vii**): 4-(Methylcarbonsäure)-1,4,7-triazaheptan-1,1,7,7-tetraacetyl-*tert*-butylester (Verbindung **5**), 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-tris(*tert*-butylacetat)-10-succinimidylacetat (DOTA-mono-NHS-tris(*tert*-Butylester)) sowie ([4-(Dimethylamino)phenyl]azo)-benzoesäure succinimidylester (DABCYL-SE). Während das DTPA-Derivat **5** über eine HBTU/HOBT aktivierte Amidkopplung mit dem N-terminalen Ende des PNA-Konjugats verknüpft wurde, konnten DOTA-mono-NHS-tris(*tert*-Butylester) und DABCYL-SE in Form ihres Aktivesters, ohne Einsatz der Aktivierungsreagenzien, verwendet werden. Um die Aminogruppe des C-terminalen Endes modifizieren zu können (**ix**), wurde zunächst die Alloc-Schutzgruppe mit Tetrakis(triphenyl phosphin)palladium (Pd(PPh₃)₄) und Triphenylphosphin abgespalten (**viii**). Zur Kopplung kamen verschiedene Substituenten (**R**²) wie 4-(Methylcarbonsäure)-1,4,7-triazaheptan-1,1,7,7-tetraacetyl-*tert*-butylester (Verbindung **5**) sowie der aktivierte Europiumkomplex **20** zum Einsatz. Während das DTPA-Derivat **5** mit HOBT/HBTU aktiviert wurde, musste die Kopplung des Isothiocyanatkomplexes **20** variiert werden, da dieser in den gängigen Festphasenlösungsmitteln wie DMF, NMP, DMSO und Methanol unlöslich ist. Daher wurde er zunächst zusammen mit einer wässrigen CTAB-Suspension (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) bis zur Trockene eingeeengt, wobei CTAB hierbei als Tensid eingesetzt wurde, um die Aufnahme des Komplexes in organische Lösungsmittel zu erhöhen. Der so erhaltene Feststoff war auf diese Weise in DMF löslich und wurde

zur Modifizierung von PNA erfolgreich eingesetzt. Im letzten Schritt wurden die modifizierten PNAs mit Trifluoressigsäure/*m*-Cresol (4:1) von der Festphase abgespalten und mittels HPLC gereinigt (x). Durch die sauren Abspaltbedingungen wurden gleichzeitig die *tert*-Butylesterschutzgruppen der Polyaminocarboxylate entschützt, wobei dies nur bei einer Reaktionszeit von vier Stunden vollständig erfolgte.

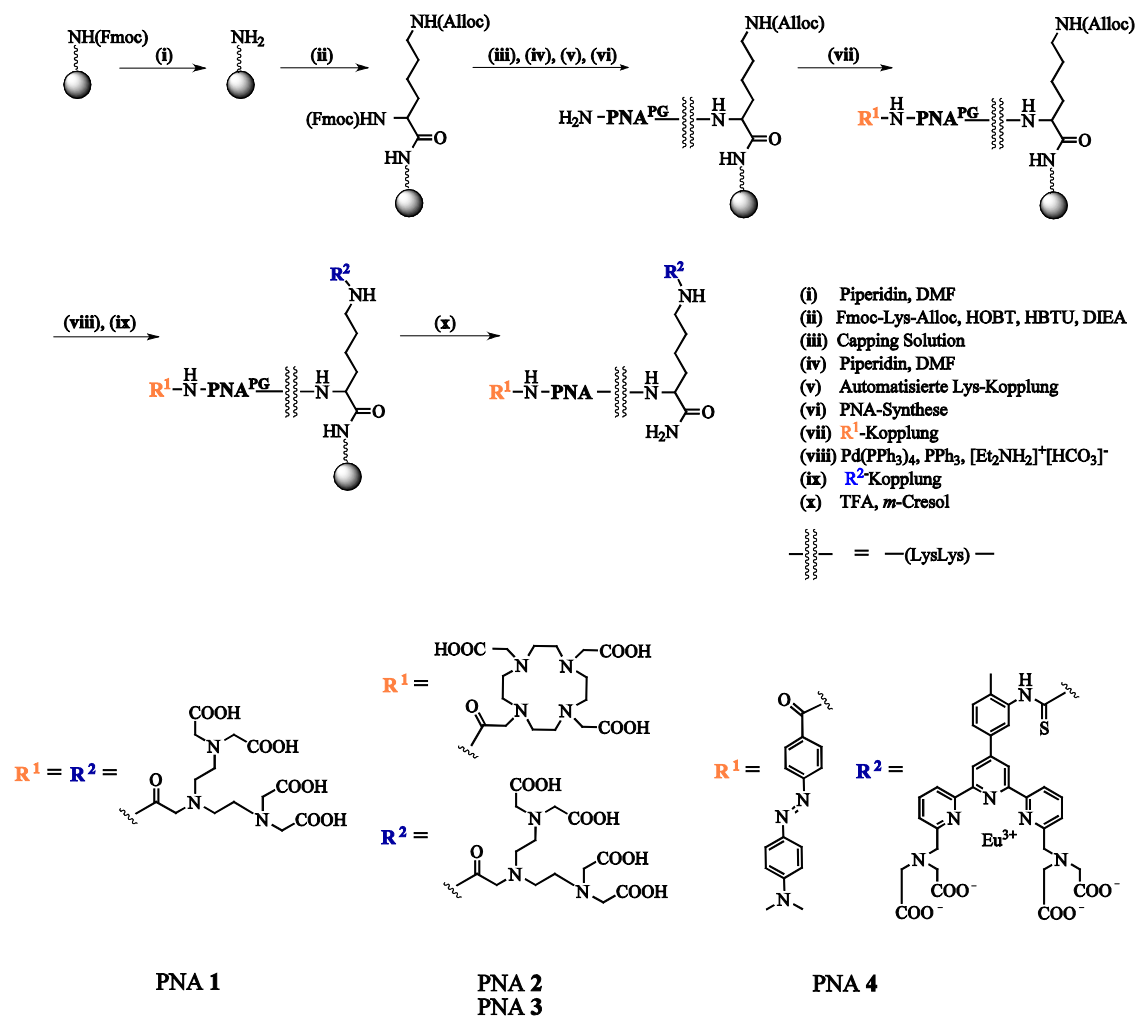


Abb. 31. Allgemeines Syntheschema von C- und N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten.

3.2.2 Synthese von N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten

Die am N-Terminus modifizierten Peptidnucleinsäuren konnten jeweils durch eine einstufige Amidkopplung synthetisiert werden. Die PNA-Synthese am Syntheseroboter erfolgte nach Standardfestphasenprotokoll (i, ii, iii) direkt am kommerziell erhältlichen festen Träger, während die jeweiligen Bausteine anschließend durch Amidbindungsknüpfung an den N-Terminus der Nucleinsäure gekoppelt wurden (iv). Die Reaktion mit DTPA (R^1 , Verbindung 5) sowie NTA (R^2 , Verbindung 7) erfolgte über die Aktivierungsreagenzien HOBT/HBTU, für die Kopplung des aktivierten Europiumkomplexes **20** (R^3) musste dieser zunächst mit Hilfe von CTAB in ein DMF-lösliches Salz überführt werden. Im letzten Schritt wurden die PNA-Konjugate mit einer TFA/*m*-Cresol Mischung von der Festphase gespalten (v) und mittels HPLC gereinigt. Durch die sauren Abspaltbedingungen wurden gleichzeitig die *tert*-Butylesterschutzgruppen der Polyaminocarboxylate entschützt, wobei dies nur bei einer Reaktionszeit von vier Stunden vollständig erfolgte.

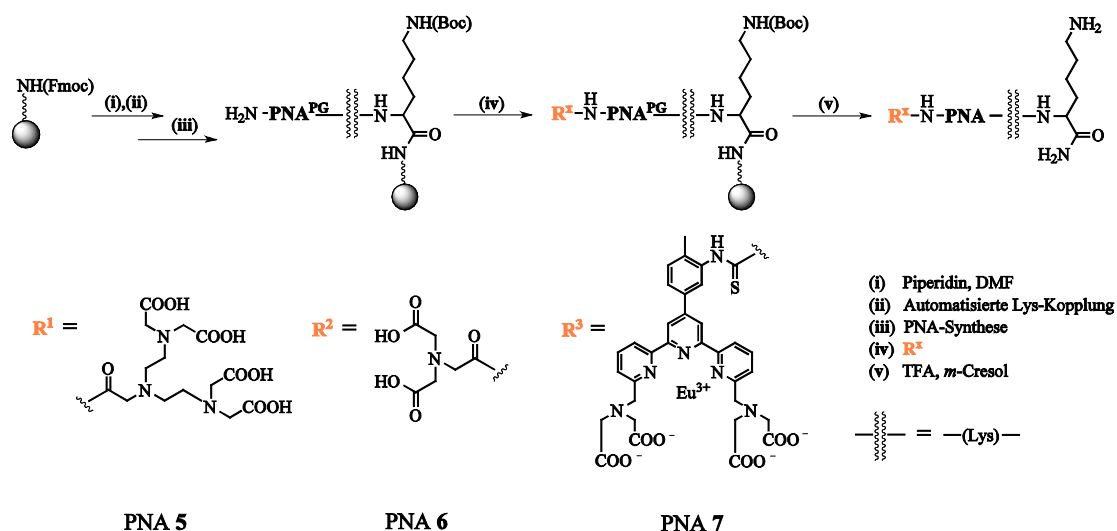


Abb. 32. Allgemeines Syntheschema N-terminal modifizierter PNA-Konjugate.

3.2.3 Synthese von BHQ-modifizierten PNA-Konjugaten

Mit der Synthese dieser Konjugate sollten Molecular Beacons auf Basis von Lanthanidionen aufgebaut und für den DNA-Nachweis eingesetzt werden. Hierzu wurde eine kommerziell erhältliche Festphase von Biosearch Technologies verwendet, deren fester Träger bereits über die ϵ -Aminogruppe eines α -Fmoc-geschützten Lysins mit einem Quencher Q (Black Hole Quencher 2) modifiziert ist. Um eine freie Aminofunktion für die PNA-Synthese zu erhalten, wurde Fmoc mit einer Piperidin/DMF Lösung entschützt (i) und die PNA-Synthese nach Standard-festphasenprotokoll am Syntheseautomaten durchgeführt (ii, iii). Nach erfolgter PNA-Synthese konnte Komplex **20** (R^1) bzw. **28** (R^2) an den N-Terminus der PNA gekoppelt werden, wobei CTAB zur Verbesserung der Löslichkeit des Liganden in DMF verwendet werden musste (iv). Im letzten Schritt wurden die modifizierten PNAs mit Trifluoressigsäure/*m*-Cresol (4:1) von der Festphase abgespalten und mittels HPLC gereinigt. Obwohl die sauren Bedingungen der Abspaltung eine Protonierung und sich daraus ergebende Dissoziation des Europium(III)-Komplexes zur Folge haben müssten, wurde dies hier nicht beobachtet. Ein möglicher Grund sind die wenig protischen Bedingungen der Abspaltung. Auch ohne externe Zugabe von Europium war die Lumineszenz des Komplexes messbar und nicht durch Titration weiter zu steigern, was auf eine Sättigung des gekoppelten Sensizers mit Lanthanid schließen lässt.

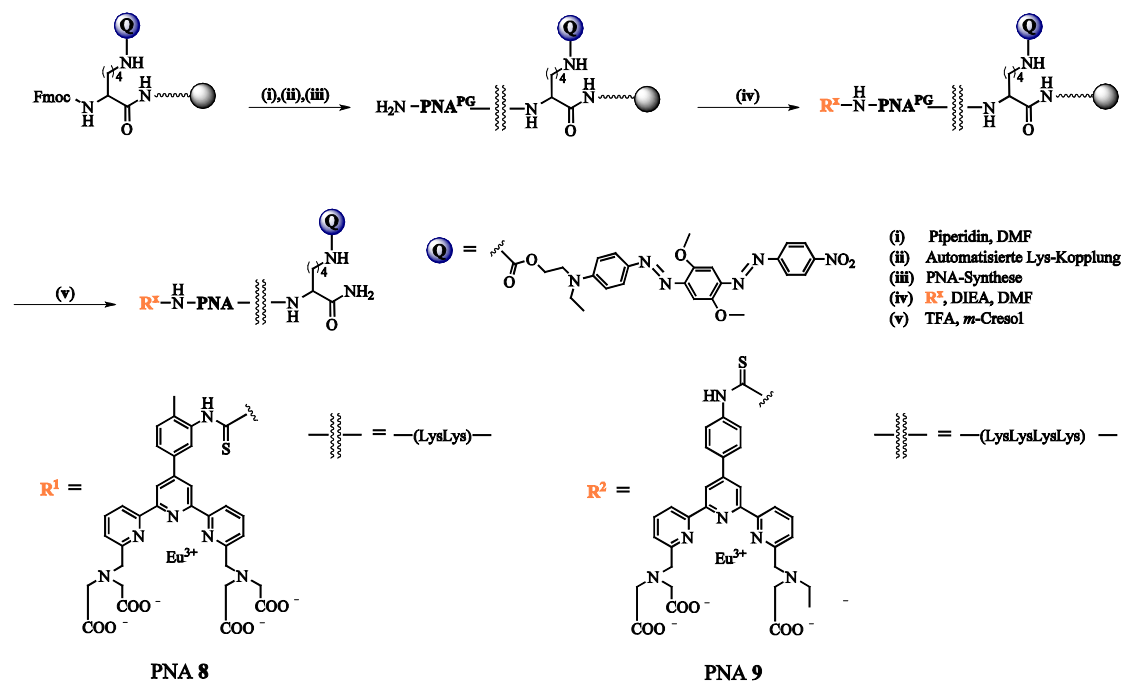


Abb. 33. Allgemeines Syntheschema BHQ-modifizierter PNA-Konjugate.

3.2.4 Charakterisierung der lumineszenten PNA-Konjugate

Um zu gewährleisten, dass die spektroskopischen Eigenschaften von Verbindung **20** und **28** durch die Kopplung an Biomoleküle nicht negativ beeinträchtigt werden, wurde PNA **7** als N-terminales, monosubstituiertes Konjugat synthetisiert und untersucht. Trotz saurer Abspaltbedingungen war es möglich, den an PNA gekoppelten Europiumkomplex zu isolieren und durch zeitaufgelöste Messtechnik am Spektrofluorimeter nachzuweisen (**Abb. 34., links**). Die unter den angegebenen Bedingungen bestimmte Lebensdauer lag im Bereich von 1.3 ms (**Abb. 34., rechts**) und zeigte, dass die Konjugation von Biomolekülen wie PNA die optischen Eigenschaften dieser Liganden nicht verändert.

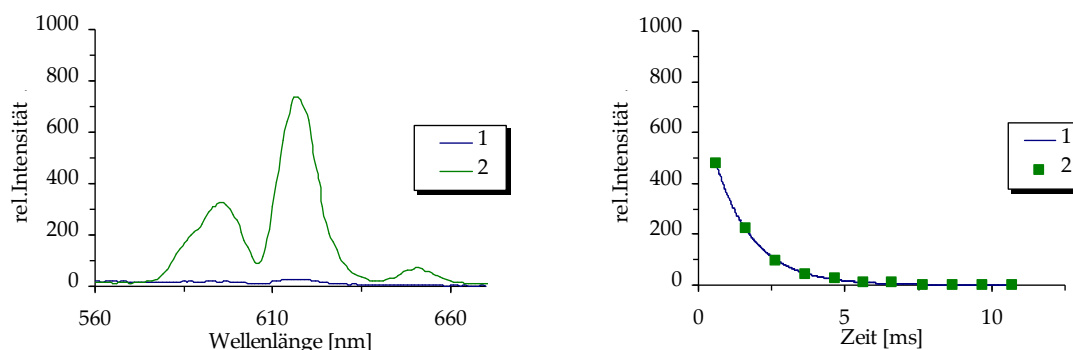


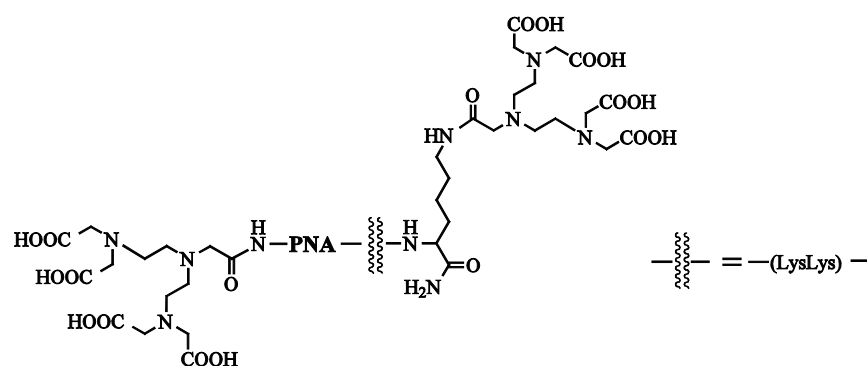
Abb. 34. *Links:* Emissionsspektrum des N-terminal an PNA gekoppelten Liganden **20** mit PNA **7** ($2 \mu\text{M}$) in 10 mM HEPES-Puffer ($\text{pH } 7.4$). (1) Fluoreszenzmodus, (2) Phosphoreszenzmodus ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, Delay Time 0.1 ms , Gate Time 1 ms , Total Decay Time 0.02 s , PMT-Spannung 800 V). *Rechts:* Dazugehörige Lebensdauermessung von PNA **7** mit $\tau = 1.3 \text{ ms}$. (1) Berechnete Kurve (monoexponentiell) (2) Aufgenommene Messpunkte ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, Total Decay Time 0.01 s).

Die mit einem Quencher und einem Lanthanidkomplex modifizierten PNA-Konjugate PNA **8** und **9** (**Abb. 33.**) wurden mit dem Ziel synthetisiert, einfache Molecular Beacons auf Lanthanidbasis zu erhalten. Während PNA **8** aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der PNA sowie des Black Hole Quenchers trotz zweier zusätzlicher Lysinbausteine nicht wasserlöslich war, wurde die Löslichkeit von PNA **9** durch Einführung von insgesamt vier dieser Bausteine deutlich verbessert. Obwohl das Absorptionsspektrum des BHQ-Quenchers dem Emissionsspektrum der Europiumkomplexe sehr ähnlich ist, konnte keine ausreichende Löschung der Emission festgestellt werden. Dies liegt an der geringen Länge der PNA-Sequenz

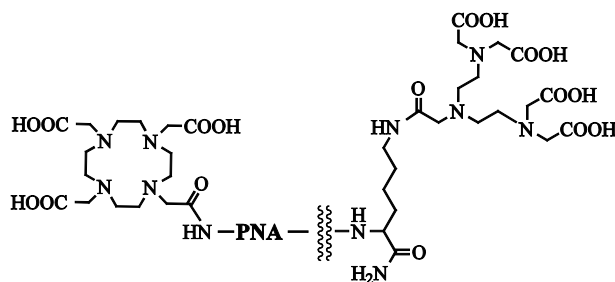
(neun Basen), durch die eine räumliche Annäherung des Quencher s und des Liganden erschwert wird. Da jedoch die automatisierte PNA-Synthese aufgrund mangelnder Qualität der kommerziell erhältlichen Basenmonomere die Synthese längerer Sequenzen erschwert und zudem durch Zugabe von komplementärer DNA keine signifikante Steigerung des lumineszenten Signals zu erzeugen war, wurde diese Strategie des DNA-Nachweises nicht weiter verfolgt. Gleiches galt auch für das PNA-Konjugat **4**, mit DABCYL als Quencher, dessen Sequenzlänge auch keine ausreichende Lumineszenzlöschung zuließ.

3.2.5 Übersicht der synthetisierten PNA-Konjugate

C- und N-terminal modifizierte PNA-Konjugate

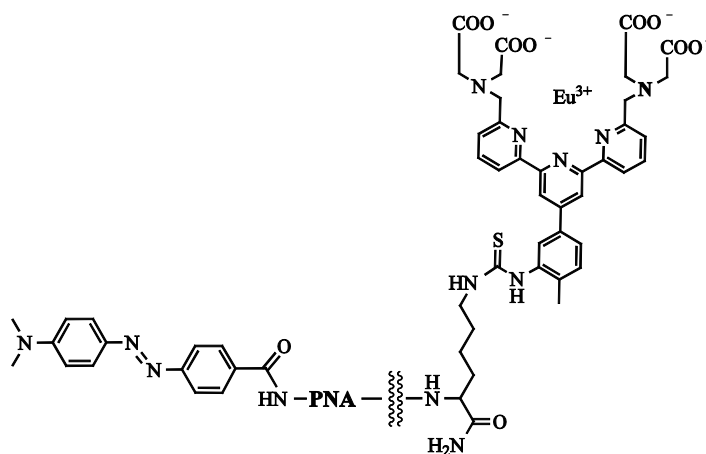


PNA 1 N -TCA CAA CTA -C



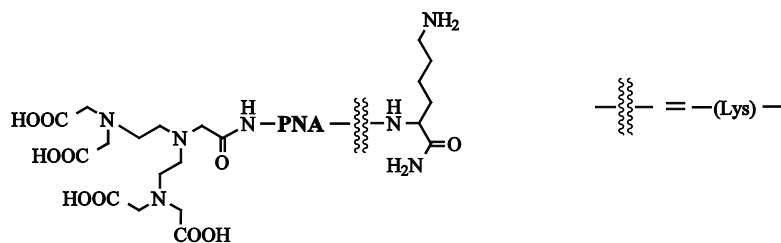
PNA 2 N -TCA CAA CTA -C

PNA 3 N -CTT ACC TCA GTT ACA -C

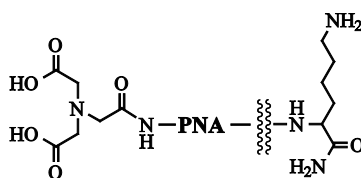


PNA 4 N -TCA CAA CTA -C

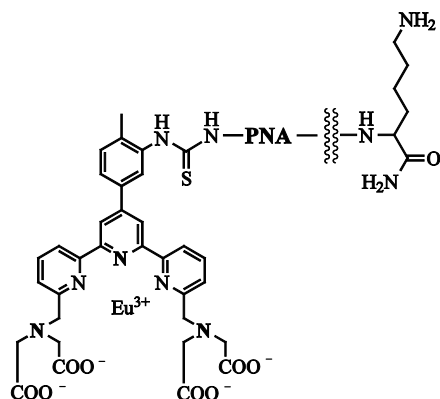
N-terminal modifizierte PNA-Konjugate



PNA 5 N -TCA CAA CTA -C

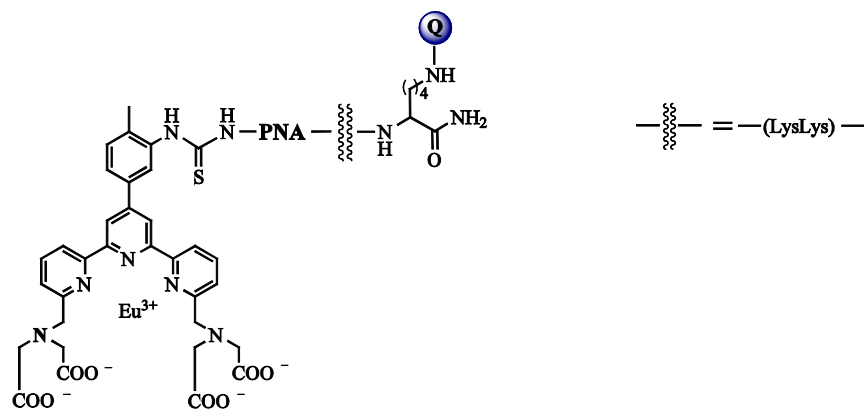


PNA 6 N -TCA CAA CTA -C

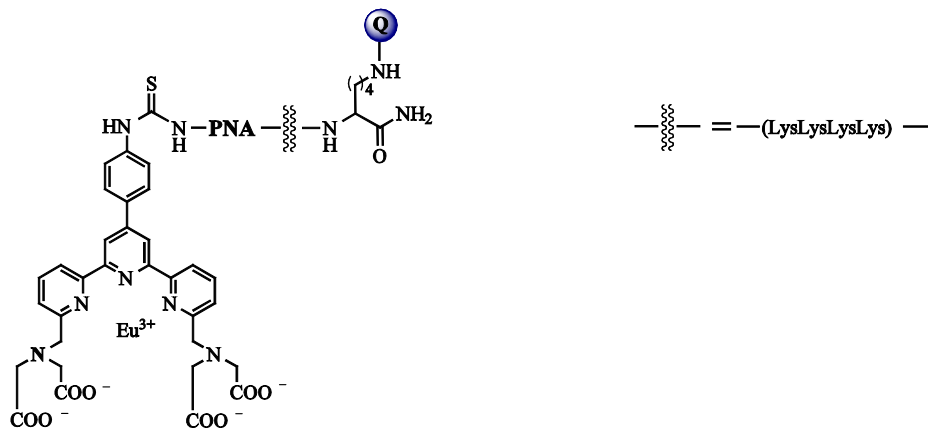


PNA 7 N -TCA CAA CTA -C

BHQ-PNA-Konjugate



PNA 8 N -TCA CAA CTA -C



PNA 9 N -TCA CAA CTA -C

3.3 Synthese der Peptidkonjugate

3.3.1 Synthese von Bis-Terpyridin-Peptidkonjugaten

Ausgehend von WANG Resin[®] wurden Peptide synthetisiert, die sowohl am C- als auch am N-Terminus mit dem Terpyridinderivat **1** modifiziert sind. Diese sollten zum einen auf ihre kinetische und thermodynamische Stabilität in Form ihrer Übergangsmetallkomplexe untersucht, zum anderen auch als Probesubstrat für die Metalloendopeptidase Thermolysin eingesetzt werden. Die zwei Terpyridineinheiten sind stellvertretend für große organische Liganden eingeführt worden und es galt herauszufinden, ob und wie diese Liganden das aktive Zentrum und somit die Substraterkennung beeinflussen. Die Synthese der Peptide erfolgte nach einer Fmoc-Entschützungsstrategie, bei der alle eingesetzten Aminosäuren mindestens eine Fmoc-Schutzgruppe trugen.

Die Kopplung der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure an WANG Resin[®] erfolgte über eine 24-stündige Reaktion unter Schutzgas mit *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und HOBT in DMF zusammen mit katalytischen Mengen an 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) (**i**). Während die Peptide **1 - 3** im ersten Reaktionsschritt mit (Fmoc)LysAlloc umgesetzt wurden, kam für Peptid **4** die Aminosäure (Fmoc)LysMtt zum Einsatz. Dies sollte ein Peptid generieren, dessen C-terminales Ende ohne Unterbrechung durch die Seitenkette eines Lysins mit dem restlichen Peptid verknüpft ist und als potentielles Substrat für die Exometallopeptidase Carboxypeptidase A dient.

Im Fall der Peptide **1 - 3** wurde anschließend die Fmoc-Schutzgruppe mit einer Piperidin/DMF-Lösung entfernt (**ii.a**), während die Mtt-Schutzgruppe des Peptids **4** solange mit 1%-iger TFA-Lösung in Dichlormethan versetzt wurde (je 3 Minuten), bis sich die Lösung nicht mehr gelb färbte (**ii.b**). Im Anschluss daran wurde 2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy-hexansäure (Verbindung **1**) über Aktivierung mit HOBT, HBTU und DIEA an die freie entschützte Aminofunktion gekoppelt (**iii.a**) und später entweder die Alloc-Schutzgruppe (**ii.c**) der Peptide **1 - 3** oder die Fmoc-Schutzgruppe des Peptids **4** entfernt. Ersteres konnte mittels Pd(PPh₃)₄ und Triphenylphosphin innerhalb von 12 Stunden erreicht werden. Die Kopplung aller weiteren Aminosäuren erfolgte mittels HOBT, HBTU und DIEA (**iii.b**), während die Fmoc-Schutzgruppen mit Piperidin/DMF entfernt werden konnten (**ii.a**). Vor der Abspaltung des synthetisierten Peptids mit wässriger TFA-Lösung (0,05% Wasser) (**iv**) wurde der zweite Terpyridin-Baustein nach bereits beschriebenem Protokoll eingeführt (**iii.a**). Durch die sauren Abspaltbedingungen war es möglich, gleichzeitig die *tert*-Butoxycarbonylschutzgruppen (Boc) der eingesetzten

Lysine sowie die *tert*-Butylschutzgruppe des verwendeten Serins zu entfernen. Die Reinigung dieser Peptide erfolgte über HPLC.

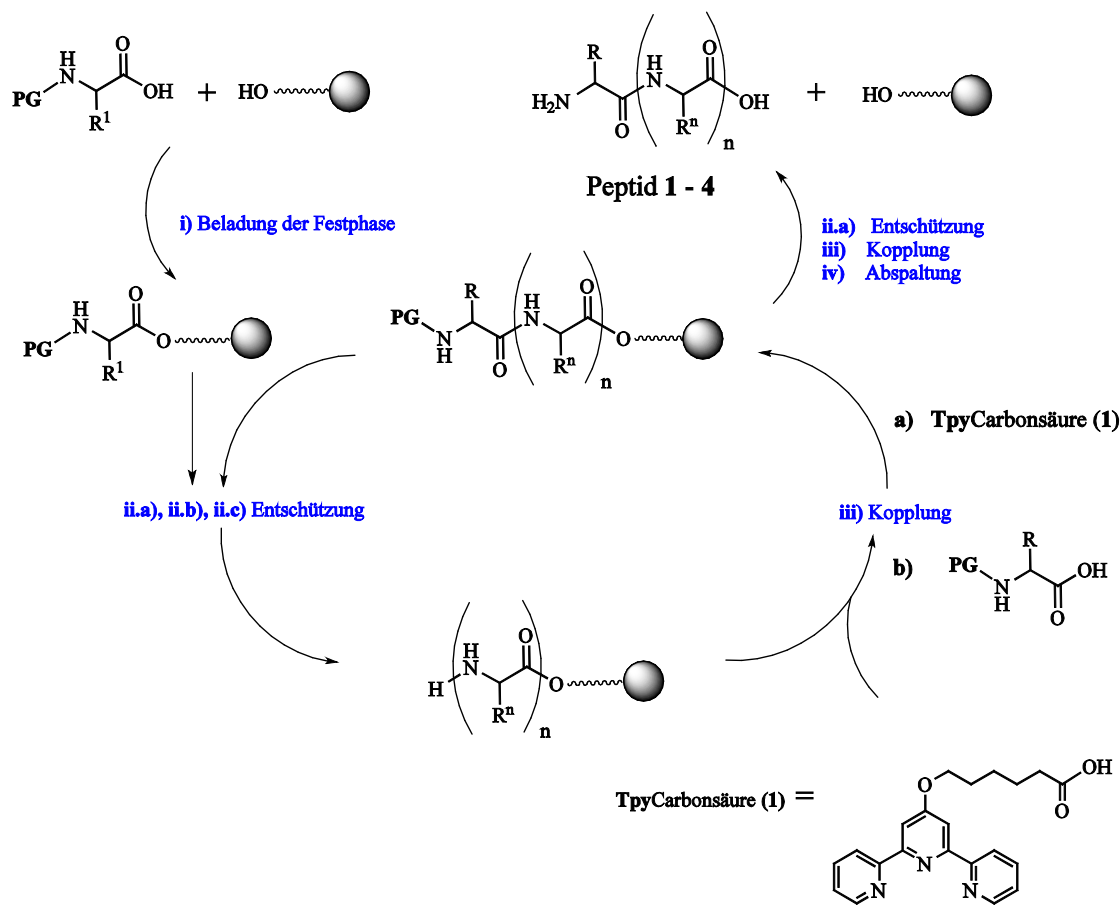


Abb. 35. Allgemeines Syntheschema zur Darstellung der Bis-Terpyridin-Peptide.

3.3.2 Charakterisierung der Bis-Terpyridin-Peptidkonjugate

3.3.2.1 Kinetische und Thermodynamische Untersuchungen

In Analogie zu den von unserer Arbeitsgruppe bereits vorgestellten Bis-Terpyridin-Desoxyribonucleinsäuren^[94] (Tpy₂DNA, Kapitel 3.1.1) wurden zweifach mit Terpyridin modifizierte Peptide synthetisiert und ihre kinetischen und thermodynamischen Stabilitäten untersucht.

Einen ersten Hinweis darauf, ob auch Bis-Terpyridinpeptide mit Zink(II), Kupfer(II) oder Eisen(II) Übergangsmetallkomplexe der Form M(Tpy₂Peptid) bilden, lieferte die UV-Spektroskopie, mit der die Anwesenheit von Metallionen im M(Tpy₂Peptid)-Komplex durch charakteristische Absorptionsbanden nachgewiesen werden konnten. Das UV-Spektrum von Tpy₂Peptid **4**, das durch Zugabe von einem Äquivalent Zink(II) erhalten wird (**Abb. 36.**, *rechts*, grüne Linie), zeigt große Ähnlichkeit zu einem Spektrum von Zn(Tpy)₂ (**Abb. 36.**, *links*, grüne Linie) und wird dem cyclischen Bis-Chelat Zn(Peptid **4**) zugeschrieben.

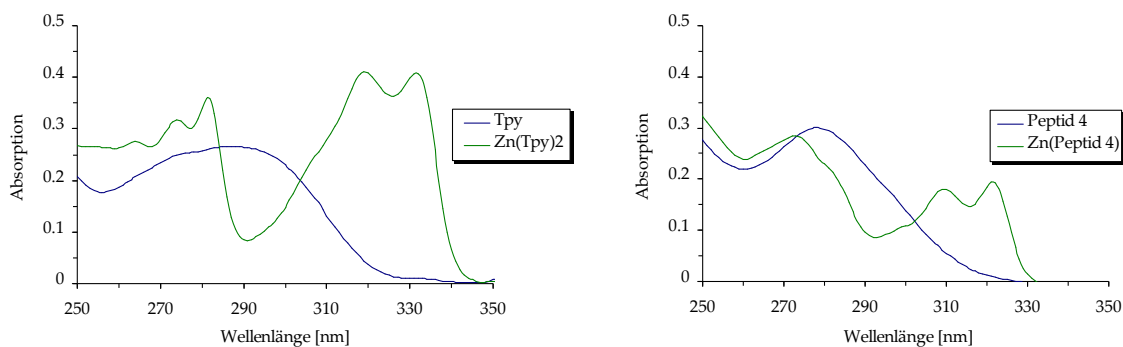


Abb. 36. Vergleich der UV-Spektren von 30 μM Zn(Tpy)₂ (*links*) und 14 μM Zn(Peptid **4**) (*rechts*), in 10 mM MOPS bei pH 7 und 23 °C. Betrachtet werden die Banden bei 333 nm für den freien Liganden, und bei 322 nm für das Peptid **4**.

Das bei der Titration von Tpy₂Peptid **4** mit Kupfersulfat erhaltene UV-Profil (**Abb. 37.**) ähnelt dem eines Cu(Tpy)₂-Komplexes und lässt daher auch den Schluss zu, dass beide Terpyridineinheiten an der Koordination des Metallions beteiligt sind.

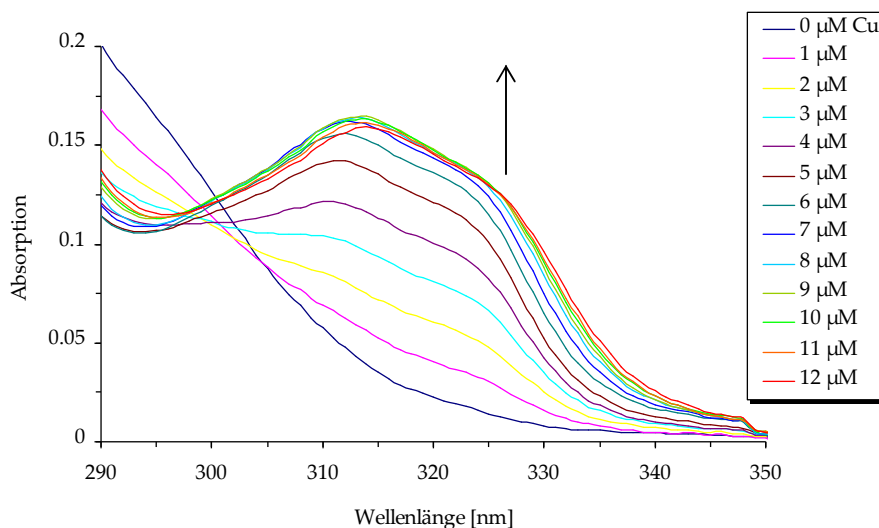


Abb. 37. Titration von Tpy₂Peptid 4 (10 μM) mit CuSO₄ (0 - 12 μM) in 10 mM MOPS-Puffer bei pH 7 und 23 °C.

Die UV-spektrophotometrische Verfolgung der Komplexbildung von Zink(II) durch freies Terpyridin bzw. Tpy₂Peptide anhand der Zn(Tpy)₂-Bande bei 333 nm bzw. 322 nm wurde genutzt, um die konkurrierende Komplexbildungsreaktion mit einem Chelatliganden L zu verfolgen. Dieser sollte nicht im UV-Bereich absorbieren und nicht zur Bildung gemischter Komplexe wie Zn(Tpy)L neigen, sondern das Metall aus dem jeweiligen Komplex extrahieren

Ein Chelatligand, der diesen Anforderungen gerecht wird ist der Ligand TPEN (*N,N,N',N'*-Tetrakis(2-pyridyl-methyl)ethyldiamin, $\log K_{\text{eff}} = 15$ für Zn(II) bei pH 7) [106], der daher zur Durchführung der kinetischen Bestimmungen verwendet wurde. Die charakteristische Absorption des Zn(Tpy)₂-Komplexes bzw. Zn(Tpy₂Peptid)-Komplexes bei 333 nm bzw. 322 nm nimmt in Gegenwart von TPEN aufgrund der Bildung eines Zn(TPEN)-Komplexes mit der Zeit ab (**Abb. 38.** und **Abb. 39.**). Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Zinkextraktion bei 40 μM TPEN konzentrationsunabhängig wird, liegt hier keine Reaktion zweiter Ordnung vor und wird die Dissoziationsgeschwindigkeit von der Frequenz der „Ringöffnung“ bestimmt. Die Halbwertszeit dafür liegt im Bereich von etwa $t_{1/2} = 90$ sec (0.025 h), woraus sich eine Dissoziationsrate von $k_d = \ln 2 / t_{1/2} \approx 27.7 \text{ h}^{-1}$ für Zn(Tpy)₂ ergibt und folgt, dass es sich bei diesem Komplex um einen kinetisch sehr labilen Komplex handelt.

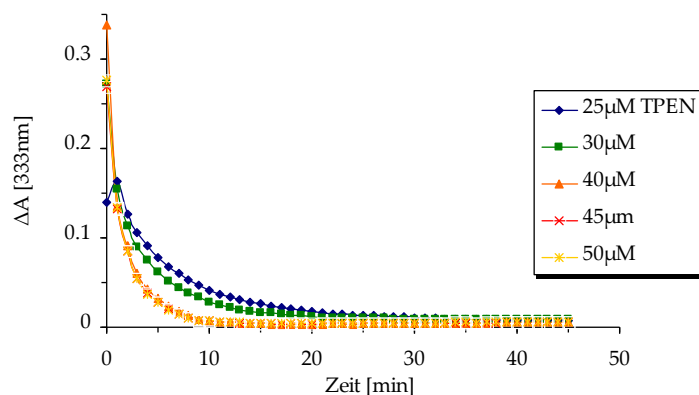


Abb. 38. Kinetik der Dissoziation des $\text{Zn}(\text{Tpy})_2$ -Komplexes bei verschiedenen TPEN-Konzentrationen mit $30 \mu\text{M}$ Tpy, $15 \mu\text{M}$ ZnSO_4 in 10 mM MOPS-Puffer bei $\text{pH } 7$ und 23°C . Abfall der $\text{Zn}(\text{Tpy})_2$ -Bande bei 333 nm relativ zu A_{333} von Tpy ohne Zink (ΔA_{333}) in Gegenwart von TPEN mit der Zeit.

Im Vergleich dazu zeigten Arbeiten aus unserer Gruppe ^[107,108], dass es im Fall von zweifach Terpyridinmodifizierten DNAs zu einer Stabilisierung dieser Komplexe kommt und ihre Dissoziationsraten unabhängig von ihrer Länge, Sequenz und Sekundärstruktur (Hairpin) im Bereich von $0.16 - 0.31 \text{ h}^{-1}$ liegen. Auch die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Bis-Terpyridinpeptide **1** - **4** wurden hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber TPEN in Anwesenheit von Zink(II) untersucht (**Tabelle 1.**, am Beispiel von Peptid **1**, **Abb. 39.**).

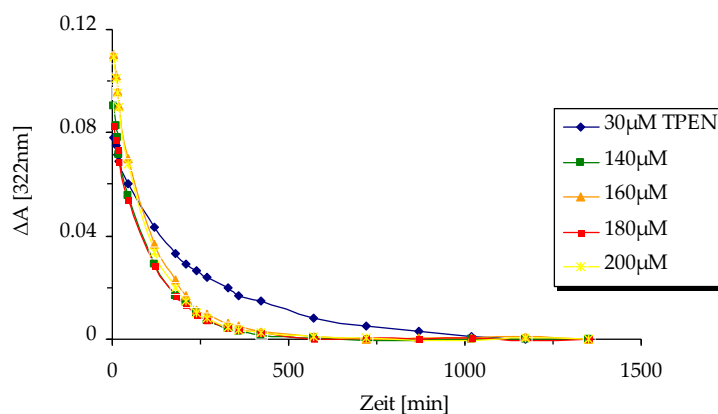


Abb. 39. Kinetik der Dissoziation des $\text{Zn}(\text{Tpy})_2$ Peptid **1**-Komplexes bei verschiedenen TPEN-Konzentrationen mit $7 \mu\text{M}$ Peptid **1**, $7 \mu\text{M}$ ZnSO_4 in 10 mM MOPS-Puffer bei $\text{pH } 7$ und 23°C . Abfall der $\text{Zn}(\text{Tpy})_2$ -Bande bei 322 nm relativ zu A_{322} von Peptid **1** ohne Zink (ΔA_{322}) in Gegenwart von TPEN mit der Zeit.

Peptid	$t_{1/2}$ [min]	k_d [h^{-1}]
1	80	0.52
2	48	0.86
3	60	0.69
4	141	0.30

Tabelle 1. Gemessene Halbwertszeiten und Dissoziationsraten der Peptide **1 - 4** (7 μ M) mit $ZnSO_4$ (7 μ M) in 10 mM MOPS-Puffer bei pH 7 und 23 °C.

Es konnte gezeigt werden, dass die Dissoziation der $ZnTpy_2$ -Komplexe durch Verknüpfung der Terpyridineinheiten über ein Peptidgerüst im Vergleich zum freien Komplex stabilisiert wird, die Stabilisierung jedoch nicht im gleichen Maße erfolgte, wie es mit der Verknüpfung durch Oligonucleotide zu beobachten war.

3.3.2.2 Substratvoruntersuchungen

Die Aminosäuresequenz der Peptide **1 - 4** wurde so gewählt, dass die Konjugate neben den thermodynamischen und kinetischen Aspekten gleichzeitig auch als potentiell Probe substrat für die Metalloendopeptidase Thermolysin eingesetzt werden konnten. Dabei sollte untersucht werden, inwiefern große organische Liganden wie Terpyridin die für Thermolysin bekannte Spaltsequenz Gly-Phe-Ser-Ala^[109] derart verändern, dass sie nicht mehr in die spezifische Bindungstasche passt und so von Thermolysin nicht erkannt und hydrolysiert werden kann.

Durch Untersuchung der Spaltreaktionen mittels MALDI-TOF MS konnte gezeigt werden, dass es Thermolysin möglich ist, alle synthetisierten Peptide zu hydrolysieren, sich jedoch die Peptide in Abhängigkeit der Sequenzlänge und der Aminosäuresubstitution in der Geschwindigkeit ihres Umsatzes unterscheiden.

Je mehr Lysinbausteine in Nachbarschaft zur Spaltsequenz eingeführt werden, desto leichter zugänglich scheint die zu spaltende Bindung für Thermolysin zu sein und desto schneller erfolgt der Umsatz des modifizierten Peptidsubstrats. Während die Bindung zwischen Glycin und Phenylalanin in Peptid **1** erst im Laufe von zwanzig Minuten vollständig gespalten ist, zeigt die Hydrolyse von Peptid **3**, mit zwei zusätzlichen Lysinbausteinen, bereits nach drei Minuten eine vollständige Spaltung. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse ist zudem von der Konzentration des Thermolysins abhängig (**Abb. 40**).

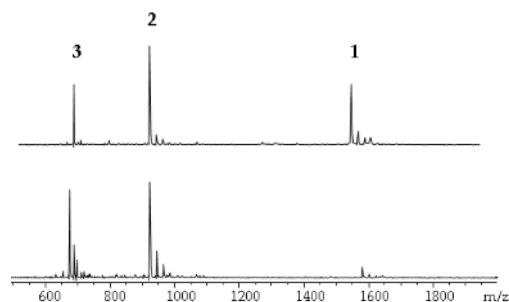


Abb. 40. MALDI-TOF MS Spektrum der Spaltung von Peptid **3** (23.5 μM) durch Thermolysin in Wasser nach 3 min. *Oben:* 100 nM Thermolysin *Unten:* 200 nM Thermolysin. [1] intaktes Peptid **3**, [2]/[3] Spaltfragmente.

Im Unterschied zu den bereits erwähnten Peptiden **1** und **3** wurde für Peptid **2** Phenylalanin durch 4-Nitrophenylalanin ersetzt. Da Thermolysin als P1'-Protease Phenylalanin als hydrophobe Aminosäure erkennt, wird die Wechselwirkung der funktionellen Gruppen der Bindungstasche durch Einführung der hydrophilen Nitrogruppe erschwert, so dass Peptid **2** auch nach 24 Stunden nicht vollständig umgesetzt ist. Dies gilt auch für Peptid **4**, bei welchem es auch aufgrund der unterschiedlichen Sequenzlänge zu sterischer Hinderung der Spaltung kommt. Da die Terpyridineinheiten nicht nur räumlich Einfluss auf die Spalteigenschaften des Thermolysins nehmen, sondern auch durch ihre Zinkbindungseigenschaften das Enzym inhibieren können, scheint durch eine ungünstige Substratwahl die Zinkextraktion zu dominieren und die Spaltung nicht mehr vollständig ablaufen zu können.

3.3.3 Synthese der BHQ-Peptidkonjugate

Zur Synthese dieser Konjugate wurde eine kommerziell erhältliche Festphase von Biosearch Technologies verwendet, deren fester Träger über die ϵ -Aminogruppe eines α -Fmoc-geschützten Lysins mit einem Quencher Q (Black Hole Quencher 2) modifiziert ist. Ziel war es, ein für Thermolysin spezifisches Substrat auf Lanthanidionenbasis aufzubauen und in DNA- sowie Thermolysinassays einzusetzen. Nach Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin/DMF (i) folgte der sukzessive Aufbau der verschiedenen Peptidsequenzen durch konsekutives Koppeln (ii.a) und Entschützen (i) der jeweiligen Aminosäuren. Da der zum Markieren des Peptids eingesetzte Ligand ein Isothiocyanatderivat darstellte, konnte ein potentieller Abbau des markierten Peptids nach EDMAN nur durch den Einsatz einer Aminosäure ausgeschlossen werden, deren reaktive Aminogruppe sich nicht in α -Carbonyl-Position, sondern innerhalb einer Seitenkette befindet. Zu diesem Zweck wurde stets Boc-Lys(Fmoc) (K^2) als letzte Aminosäure vor der Kopplung des Liganden eingeführt. Zur Verbesserung der Löslichkeit der Terpyridinliganden mussten diese zunächst mit CTAB in Wasser aufgenommen, lyophilisiert und später zur Durchführung der Festphasenreaktion in DMF gelöst werden. Im letzten Schritt wurden die modifizierten Peptide mit Trifluoressigsäure/*m*-Cresol (4:1) von der Festphase abgespalten und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Durch die sauren Abspaltbedingungen war es möglich, gleichzeitig die *tert*-Butoxycarbonylschutzgruppen (Boc) der eingesetzten Lysine sowie die *tert*-Butylschutzgruppen des Serins zu entfernen.

Da die Kopplung zwischen den Isothiocyanatderivaten (20, 28) und der Peptide nicht quantitativ verlief, konnten im zugehörigen Massenspektrum (MALDI-TOF MS) neben dem Molekülionenpeak auch die jeweils unmarkierten BHQ-Peptide identifiziert werden. Trotz Anwendung verschiedener HPLC-Bedingungen (Gradient, Säule, Temperatur) war es aufgrund von Peaküberlappung nicht möglich, die zwei Komponenten vollständig zu trennen. Daher wurden in allen weiteren Anwendungen der Peptide die Mischfraktionen mit einem prozentualen Anteil von ca. 40% an modifiziertem Peptid eingesetzt. Aufgrund des hydrophoben Charakters des Black Hole Quenchers sowie einiger Aminosäuren war die Wasserlöslichkeit des Peptids 9 stark herabgesetzt und wurde durch die Einführung von Lysin in allen übrigen Peptiden erhöht.

Zur Steigerung des Reaktionsumsatzes zwischen Peptid und Terpyridin-Liganden wurde das Trichlorotriazin-aktivierte Derivat (29) eingesetzt, dessen Reaktivität im Vergleich zu Isothiocyanaten höher ist. Da es jedoch unter den sauren Abspaltbedingungen nicht stabil war, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Neben der Kopplung am festen Träger wurde auch eine Synthesestrategie in Lösung verfolgt, die die Anbindung der Isothiocyanatderivate erleichtern sollte. Dafür wurde Peptid **11** so konzipiert, dass die für die Löslichkeit der Peptide verantwortlichen Lysine am N-Terminus in Form ihrer ϵ -Trifluoracetyl-geschützten Derivate eingesetzt wurden. Diese sollten gegenüber einer Abspaltung mittels Trifluoressigsäure stabil sein, sich in schwach ammoniakalischer Lösung einfach entschützen lassen und so eine selektive Ligandenkopplung in Lösung ermöglichen. Hier wurde aus Gründen der Synthesestrategie als letzte Aminofunktion zur Verhinderung des EDMAN-Abbaus nicht Boc-Lys(Fmoc) (K^2), sondern 6-Boc-Aminocaprinsäure eingesetzt (**ii.b**). Trotz Variation der Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Reaktionszeit) konnte das Produkt nicht isoliert und dieser Ansatz somit nicht weiterverfolgt werden.

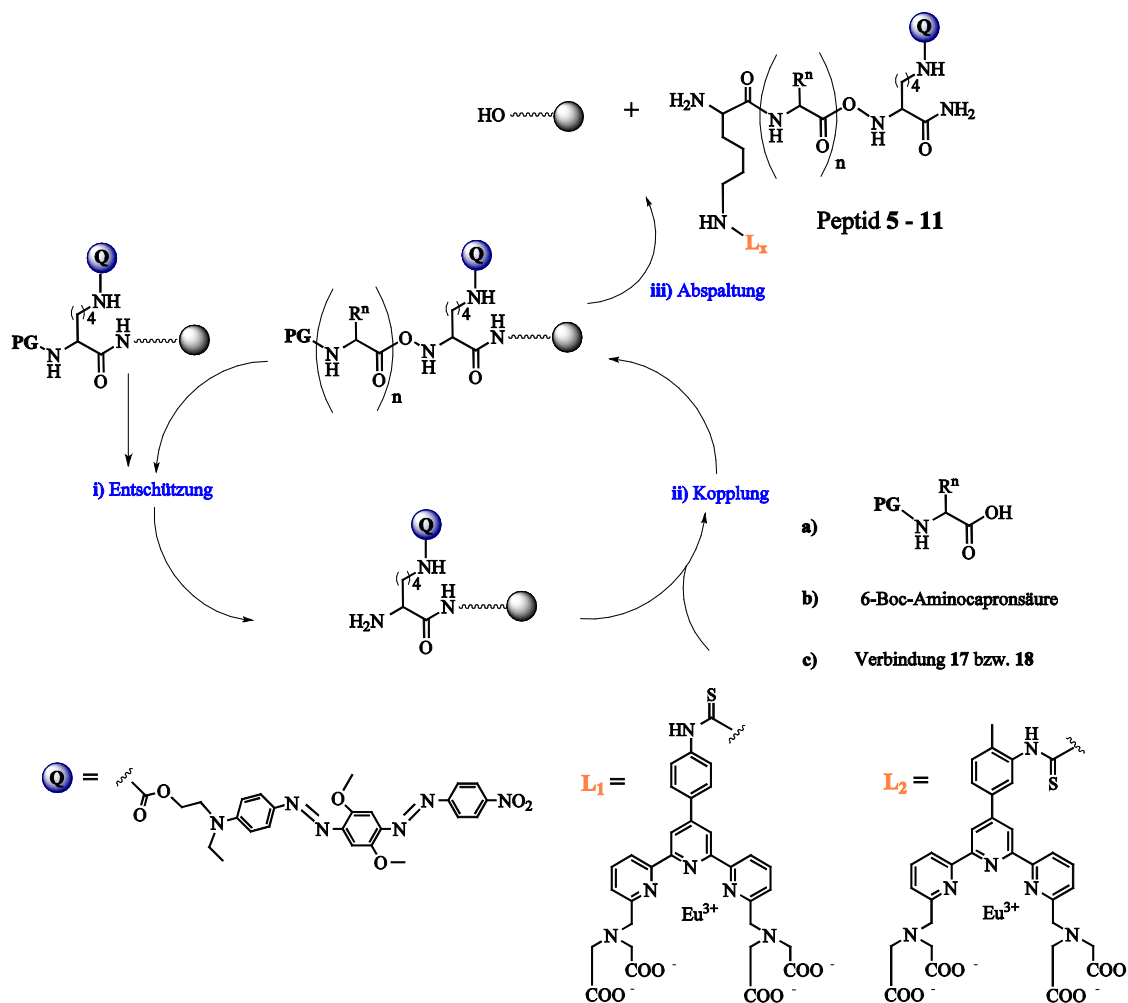


Abb. 41. Allgemeines Syntheschema zur Darstellung von BHQ-modifizierten Peptidkonjugaten.

3.3.3.1 Charakterisierung der BHQ-Peptidkonjugate

Basierend auf Vorversuchen mit Bis-Terpyridin modifizierten Peptiden (Peptide 1 - 4) die zeigten, dass Thermolysin ihre Aminosäuresequenz trotz raumbeanspruchender Liganden erkennt und selektiv spaltet (Kapitel 3.3.2.2.), wurden die BHQ-modifizierten Peptidkonjugate 5 - 11 mit entsprechenden Sequenzen synthetisiert. Um die Abstandsabhängigkeit der Fluoreszenzlöschung durch einen Quencher wie Black Hole Quencher 2 zu berücksichtigen, wurde die Zahl der Lysinbausteine variiert, wobei nur ein geringer Einfluss der Sequenzlänge auf die Effizienz der Löschung beobachtet werden konnte (Abb. 42.). Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen PNA-Konjugaten nimmt die Fluoreszenzlöschung mit kleiner werdenden Peptidsequenzen zu.

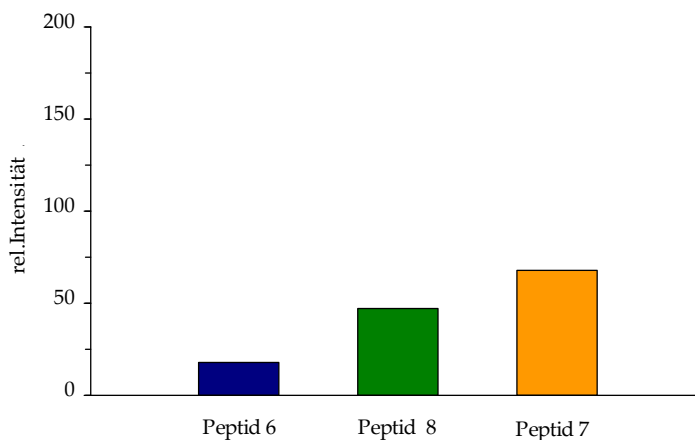


Abb. 42. Effizienz der Fluoreszenzlöschung der Peptide 6 - 8 durch BHQ in Abhängigkeit ihrer Sequenzlänge Peptid 6 > Peptid 8 > Peptid 7, mit je 50 μ M Peptid in Wasser.

Der Vergleich der Anregungsspektren des freien Komplexes 20 und des Peptids 6 zeigt eine große Ähnlichkeit und unterstreicht damit die erfolgreiche Kopplung des Europiumkomplexes mit dem Peptidgerüst (Abb. 43., links). Trotz eingeführter Modifikationen wird die Peptidsequenz sowohl von gelöstem als auch von immobilisiertem Thermolysin erkannt und ihre Glycin-Phenylalanin-Bindung gespalten, was über MALDI-TOF MS nachzuweisen war. Das Fluoreszenzspektrum in Abb. 43., rechts, zeigt den damit verbundenen Anstieg des Europiumsignals. Da Peptid 6 die geringste Hintergrundfluoreszenz aufweist, wurden alle weiteren Untersuchungen in Kapitel 3.4.3 und 3.5.3 auf dieses Peptid beschränkt.

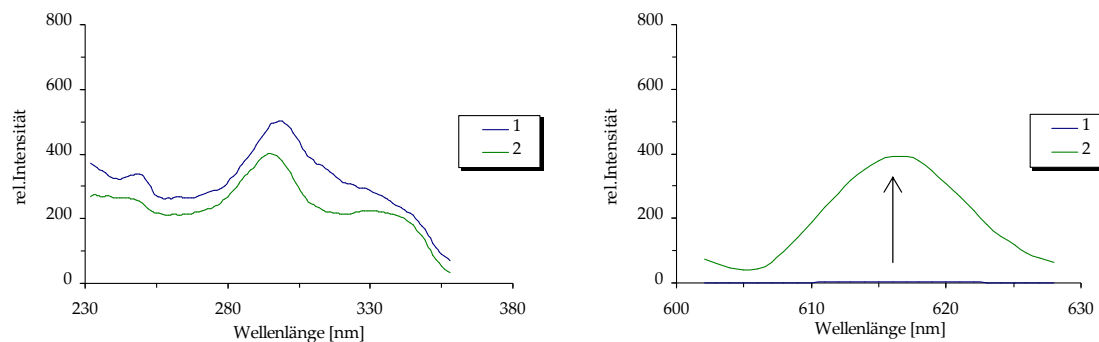
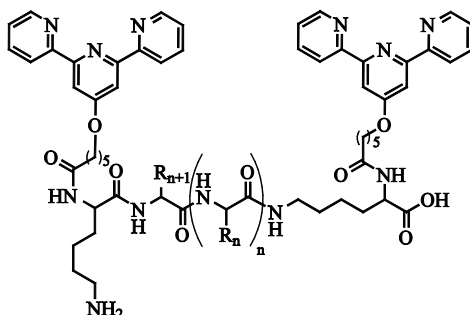


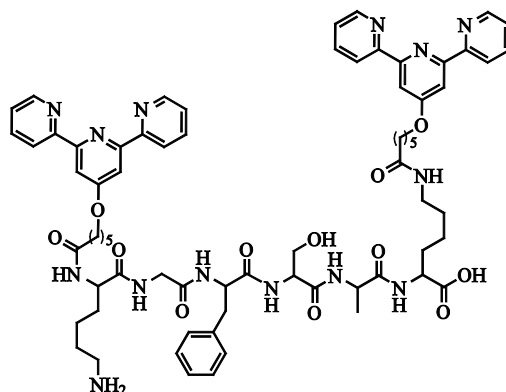
Abb. 43. *Links:* Vergleich der Anregungsspektren von (1) freiem Komplex (Verbindung **20**, 5 μM) und (2) gespaltenem Peptid **6** (5 μM) mit 5 μl Thermolysin/Eupergit C[®] nach 1.5 h in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) (λ_{em} = 617 nm, PMT-Spannung 700 V). *Rechts:* Fluoreszenzanstieg des Lanthanidsignals durch Spaltung von Peptid **6** durch Thermolysin/Eupergit C[®]. (1) 5 μM Peptid **6** (2) 1.2 h nach Zugabe von 5 μl Thermolysin/Eupergit C[®] in Wasser (λ_{ex} = 295 nm, PMT-Spannung 700 V).

3.3.4 Übersicht der synthetisierten Peptidkonjugate

Terpyridin-modifizierte Peptidkonjugate



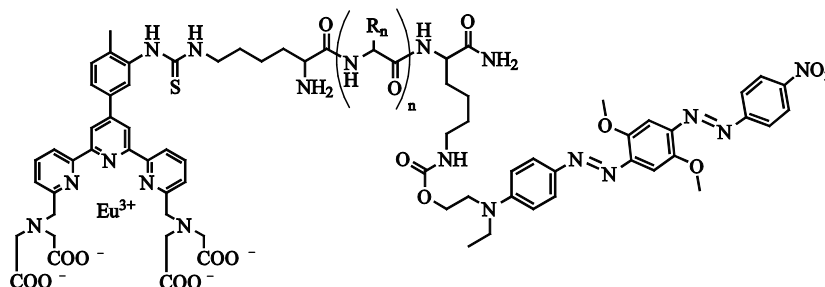
- Peptid 1 **Tpy-KGFSAK-Tpy**
 Peptid 2 **Tpy-KG-Phe(NO₂)-SAK-Tpy**
 Peptid 3 **Tpy-KKGFSAKK-Tpy**



- Peptid 4 **Tpy-KGFSAK-Tpy**

BHQ-Peptidkonjugate

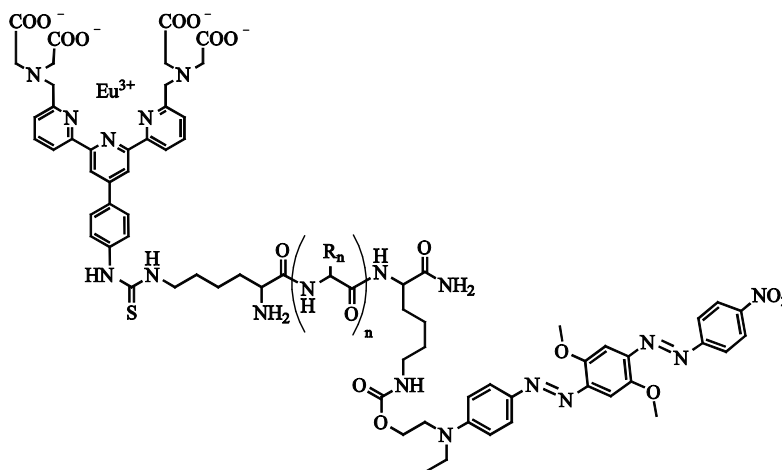
Mit L_1 = Verbindung 28 und L_2 = Verbindung 20.



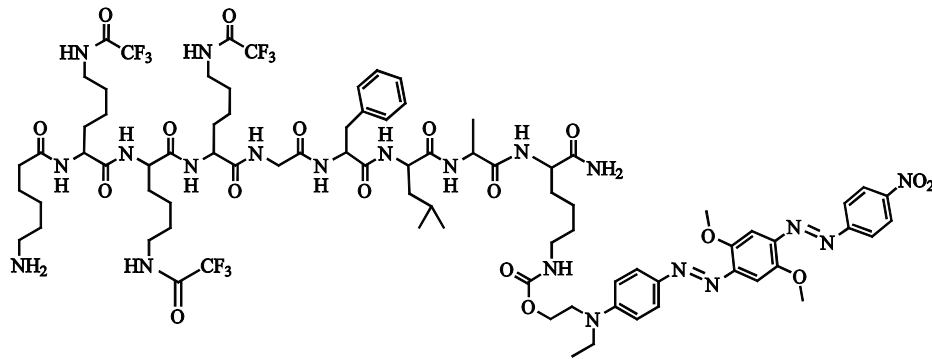
- Peptid 5 L_2 -K²-K¹K²GFSA-K-BHQ
 Peptid 6 L_2 -K²-K¹K¹GFSAK¹-K-BHQ
 Peptid 7 L_2 -K²-K²K²GFSAK²K²-K-BHQ
 Peptid 8 L_2 -K²-K¹K¹GFSAK¹K¹-K-BHQ

mit K^1 = Fmoc-Lys(Boc) N- α -Fmoc-N- ϵ -tert-Boc-L-Lysin
 K^2 = Boc-Lys(Fmoc) N- α -tert-Boc-N- ϵ -Fmoc-L-Lysin
 K^3 = Fmoc-Lys(Tfa) N- α -Fmoc-N- ϵ -Trifluoracetyl-L-Lysin

Wobei die *tert*-Butoxycarbonylschutzgruppen (Boc) der eingesetzten Lysine durch saure Abspaltung des Peptids vom festen Träger entfernt wurden.



- Peptid 9 L_1 -K²-GFSA-K-BHQ
 Peptid 10 L_1 -K²-K¹K¹GFSAK¹-K-BHQ



Peptid 11 **Aminoethyl-K³K³K³GFLA-K-BHQ**

3.4 Proteasenachweis

3.4.1 Stand der Forschung

Kontinuierliche Nachweisreaktionen für P1'-Proteasen wie Thermolysin konnten lange Zeit nicht etabliert werden, da ein Chromophor an der α -Aminogruppe eines synthetischen Peptids seine Absorptionseigenschaften durch hydrolytische Spaltung der Peptidkette kaum ändert.^[110] Dazu müsste ein künstliches Peptidsubstrat konstruiert werden, das während der Hydrolyse eine Änderung der optischen Eigenschaften an der gebildeten Säurefunktion durch Änderung der elektronischen Eigenschaften erfährt. Ein solches Molekül mit ausreichender Sensitivität ist bisher noch nicht bekannt. Nur kurze Furylacryloyl-Peptide wie *N*-(3-Furylacryloyl)glycyl-L-leucyl-amid (FAGLA) zeigen nach Spaltung ihrer einzigen Peptidbindung eine Abnahme der Absorption im UV-Bereich ($\lambda = 345$ nm).^[39] Jedoch ist dieser Effekt so gering, dass eine breitere Anwendung dieser Substrate stark eingeschränkt ist. In den letzten Jahrzehnten wurden daher Peptide mit fluoreszenten Farbstoffen markiert, um empfindliche Nachweissysteme für spezifische Proteasen basierend auf FRET zu entwickeln.

Eines der ersten fluoreszenten Substrate zur Untersuchung von Metalloendoproteasen wie Thermolysin war ein 1979 von KAM *et al.*^[111] synthetisiertes Tetrapeptid, mit einer *o*-Aminobenzoyl-Gruppe (ABz) als Fluorophor und *p*-Nitrobenzylamid (Nba) als Quencher.^[112-116] Erst die Hydrolyse und die sich daraus ergebende räumliche Trennung der beiden Komponenten ermöglichte eine Wiederherstellung der Fluoreszenz. ZIMMERMAN *et al.*^[117,118] entwickelten zur gleichen Zeit ein Peptid auf Basis des Fluorophors 7-Amino-4-methylcoumarin (Succinyl-Ala-Ala-Phe-7-amino-4-methylcoumarin). Dabei wird in einem indirekt gekoppelten Enzymassay zunächst die Bindung zwischen Phenylalanin und Alanin gespalten und in einem zweiten Schritt mit Hilfe von Leucinaminopeptidase das reine Coumarinderivat erhalten, dessen fluoreszentes Signal am größten ist.^[119-122] Im Jahr 2002 zeigten MUTA *et al.*^[123,124], dass ein von KNIGHT *et al.*^[125] veröffentlichtes Substrat für Matrix-Metalloproteasen (MOCAC, 7-Methoxycoumarin-4-acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu- β -(2,4-dinitrophenylamino)Ala-Arg-amid) auch zum sensitiven Nachweis von Thermolysin zu verwenden ist. Dieses Substrat wurde in der vorliegenden Arbeit als fluoreszentes Vergleichssubstrat eingesetzt.

Um den spezifischen Bindungsprofilen der Enzyme gerecht zu werden, setzen sich fluoreszente Peptidsubstrate meist aus mehr als sechs Aminosäuren zusammen (häufig zwischen zehn und zwölf). WEIMER *et al.*^[110] präsentierten jedoch kürzlich ein künstliches Peptidsubstrat, unter anderem auch für Thermolysin, welches nur aus zwei Aminosäuren besteht, an deren Enden EDANS (*N*-(2-Aminoethyl)amino-

naphthalen-5-sulfonsäure) als Fluorophor und DABCYL als Quencher gekoppelt sind.

Da Proteasen zu den wichtigsten Zielstrukturen in der modernen Wirkstofffindung über ein schnelles, empfindliches High-Throughput Screening von Inhibitoren zählen, werden immer neue und empfindlichere homogene Proteaseassays benötigt. Seit einigen Jahren kommen daher neben den typischen organischen Farbstoffen auch lumineszente Lanthanidkomplexe für den Nachweis dieser Enzyme zum Einsatz.^[126] Die Gruppe um I. HEMMILÄ hat am Beispiel der Caspase-3, einer Cysteinprotease, die Peptidbindungen C-terminal zu Aspartat spaltet, eine Reihe verschiedener lumineszenter Substrate entwickelt. Sie alle basieren auf dem strahlungslosen Energietransfer zwischen einem lumineszenten Lanthanidkomplex und einem nichtfluoreszenten Quencher im intakten Substrat (TR-FQA, Time-Resolved Fluorescence Quenching Assay). Das erste von ihnen vorgestellte Substrat setzt sich aus einem Europiumkomplex (W-1024) und dem Quencher DABCYL an den jeweiligen Enden einer spezifischen Peptidsequenz zusammen.^[127] Damit erreichten sie eine Nachweisgrenze von bis zu 2.5 pg/ μ l der Protease. Durch den Einsatz eines weiteren kommerziell erhältlichen Europiumkomplexes (W-1284) und des Quenchers QSY 7 wurden sogar bis zu 0.25 pg/ μ l Caspase-3 detektiert.^[128] Einen weiteren Fortschritt stellte die Möglichkeit dar, mit unterschiedlichen Lanthanidionen und ihren jeweiligen Komplexen selektiv verschiedene Caspasen nachweisen zu können.^[129] Basierend auf diesen Entwicklungen gelang es MAO *et al.*^[130] die Protease NS3-4A als antivirales Target bei Hepatitis C mit einer Konzentration von bis zu 10 pM zu detektieren. Damit wird die Evaluierung von Inhibitoren der Protease NS3-4A in Reaktionen mit sehr kleinen Enzymkonzentrationen möglich.

Einen anderen Ansatz verfolgten MIZUKAMI *et al.*^[131], in welchem der Sensitizer als Target für den Proteasenachweis fungiert. Dazu koppelten sie Aniline über unterschiedliche Funktionen an DOTA und konnten zeigen, dass ein es dieser Derivate als Terbiumkomplex luminesziert, jedoch kein Signal in seiner acetylierten Form erzeugt, die enzymatisch gespalten werden kann. Dieses System übertrugen sie auf ein für die Cysteinprotease Calpain spezifisches Peptid und erreichten so eine empfindliche Lumineszenzdetektion des Enzyms.

3.4.2 Strategie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals lumineszente, auf Lanthaniden basierende Substrate für Thermolysin stellvertretend für P1'-Proteasen entwickelt und untersucht. Hierbei handelt es sich um Oligopeptide, die C-terminal mit einem polyaromatischen Azofarbstoff, Black Hole Quencher 2 (BHQ-2, Q), modifiziert sind und N-terminal einen lumineszenten Europiumkomplex (**20**) tragen (Peptide **6 - 8**) (**Abb. 44**).

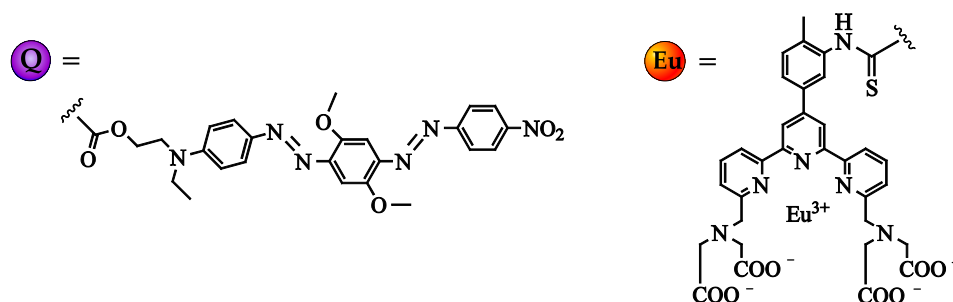


Abb. 44. Struktur des Black Hole Quenchers Q (*links*) und des gekoppelten lumineszenten Komplexes **20** (*rechts*).

Die sich durch den Einsatz von Lanthanidkomplexen ergebende Möglichkeit der zeitaufgelösten Messung lässt ein deutlich gesteigertes Signal/Rausch -Verhältnis und somit höhere Empfindlichkeiten erwarten.

Black Hole Quencher 2 wurde aufgrund der großen Überlappung seines Absorptionsspektrums mit dem Emissionsspektrum der Europiumkomplexe verwendet, womit die Voraussetzung für die effiziente Löschung der Lumineszenz im Einklang mit der FÖRSTER-Theorie^[85] erfüllt ist. Da der Quencher in Lösung zudem eine positive Ladung trägt, kann es bei nicht zu großem Abstand auch zu ionischen Wechselwirkungen zwischen ihm und dem negativ geladenen Liganden kommen, wodurch die Effizienz der Löschung und somit auch die Sensitivität dieses Assays zusätzlich gesteigert werden sollte.^[128]

Thermolysin als Vertreter der P1'-Proteasen und Metalloendopeptidasen hydrolysiert eine Bindung innerhalb des Peptids und ermöglicht dadurch die räumliche Trennung von Quencher und Komplex, dessen Lumineszenz mit einer Lebensdauer im Millisekundenbereich detektierbar wird (**Abb. 45**).

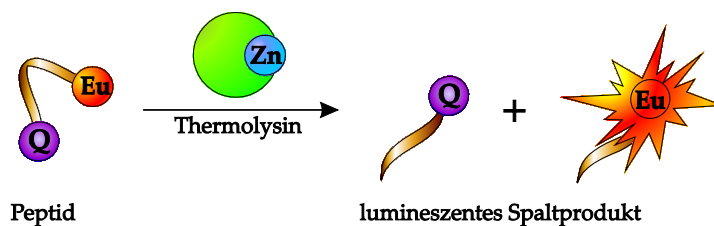


Abb. 45. Schematische Darstellung des Thermolysinnachweises: Spaltung eines lumineszenten Peptids durch Thermolysin.

3.4.3 Fluoreszenzmessungen

Zunächst wurde untersucht, wie sich Sequenz und Länge der modifizierten Peptidsubstrate **6 - 8** auf die Effizienz der Spaltung auswirken. Da der Vergleich der relativen Fluoreszenzänderung innerhalb der ersten 18 Minuten nach Zugabe des Enzyms jedoch nur geringe Unterschiede zeigte, wurde in allen weiteren Messungen Peptid **6** eingesetzt (**Abb. 46.**, *links*). Die leicht gesteigerte Umsatzgeschwindigkeit von Peptid **7** kann auf den ausschließlichen Einsatz von Boc-Lys(Fmoc) als wasserlöslichkeitserhöhende Komponente zurückzuführen sein. Dadurch sind nur ϵ -Aminofunktionen der Lysinbausteine an Peptidbindungsknüpfungen beteiligt und erhöhen so neben der Länge auch die Flexibilität des Peptids. Dadurch können Quencher und „Lanthanidfluorophor“ leichter miteinander wechselwirken und zeigt die räumliche Trennung größere Auswirkung.

Anregungs- und Emissionsspektrum des gespaltenen Peptids **6** sind in **Abb. 46.**, *rechts* dargestellt. Da die Anregung des Komplexes **20** bei 295 nm eine höhere Emissionsintensität des Peaks bei 617 nm verursacht als eine Anregung bei 330 nm, wurde erstere als Standardanregungswellenlänge in allen weiteren Untersuchungen verwendet.

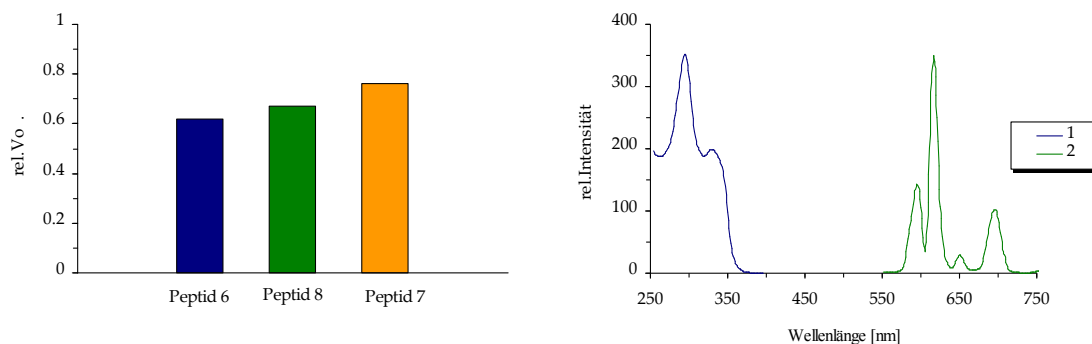


Abb. 46. Links: Spaltung der Peptide 6 - 8 ($3 \mu\text{M}$) mit 500 pM Thermolysin in 2 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$) mit 40 mM NaCl bei 23°C . Thermolysin-Stammlösung in 40 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$) mit 10 mM CaCl_2 , Peptid-Stammlösung in Wasser. V_0 entspricht der relativen Fluoreszenzänderung bei 617 nm während der ersten 18 min der Hydrolyse (Total Decay Time 0.02 s , Slit Width 10 nm , PMT-Spannung 800 V). Rechts: (1) Zeitaufgelöstes Anregungsspektrum und (2) Emissionsspektrum des gespaltenen Peptids 6 ($10 \mu\text{M}$) in 2 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$) mit 40 mM NaCl bei 23°C (PMT-Spannung 600 V).

Um die Sensitivität sowie die Detektionsgrenze des neuen Substrats zu ermitteln, wurde Thermolysin in verschiedenen Konzentrationen (1 nM - 50 pM) zu einer Lösung aus Peptid 6 ($3 \mu\text{M}$) gegeben und die Änderung der Fluoreszenz über die Zeit mittels zeitaufgelöster Messung verfolgt (Abb. 47.).

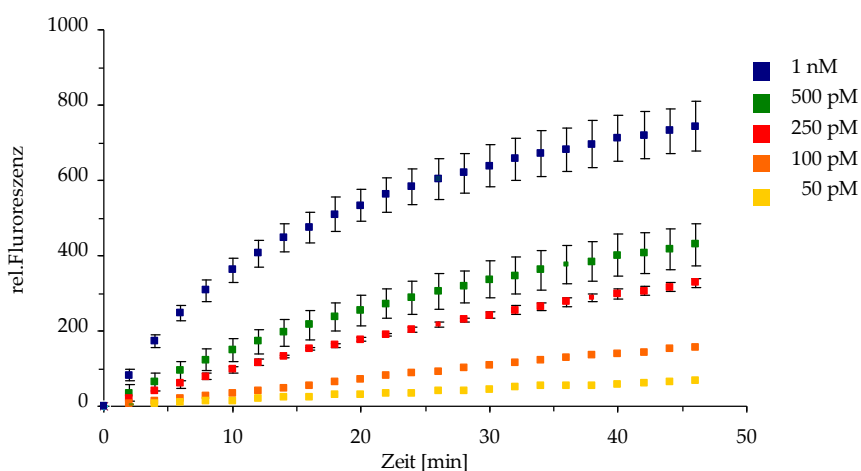


Abb. 47. Spaltung von Peptid 6 ($3 \mu\text{M}$) durch Thermolysin (1 nM - 50 pM), dargestellt als Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Zeit (Total Decay Time 0.02 s , PMT-Spannung 800 V), in 2 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$) bei 23°C mit 40 mM NaCl. Da die Fehlerbalken für 100 pM und 50 pM kleiner sind als die Werte für 250 pM werden diese nicht gezeigt.

Das Enzym ließ sich so mit einer Konzentration von bis zu 50 pM (3.5 fmol) nachweisen und erzeugte bei dieser Konzentration nach 18 min ein 8.4 mal höheres Signal im Vergleich zum Hintergrund ohne Enzym (hier nicht dargestellt).

Als eines der wenigen kommerziell erhältlichen fluoreszenten Thermolysinsubstrate wurde MOCAc (MOCAc-PLGL(Dpa)AR, 7-Methoxycoumarin-4-acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu- β -(2,4-dinitrophenylamino)Ala-Arg-amid) eingesetzt, um die Empfindlichkeit und das Signal/Rausch-Verhältnis zwischen einem fluoreszenten und einem lumineszenten Substrat (Peptid **6**) zu vergleichen. Während sich die Anfangsgeschwindigkeiten der jeweiligen Spaltung bei 3 μ M Substrat und verschiedenen Enzymkonzentrationen ähneln, zeigte Peptid **6** ein sehr viel höheres Signal/Rausch-Verhältnis als MOCAc (**Abb. 48.**), was auf die zeitaufgelöste Messtechnik zurückzuführen ist.

Während das Signal/Rausch-Verhältnis bei Enzymkonzentrationen von 100 pM für Peptid **6** 18.5 und für MOCAc noch 1.7 betrug, konnte bei 50 pM Thermolysin mit MOCAc kein Signal mehr detektiert werden. Peptid **6** zeigte bei diesen niedrigen Enzymkonzentrationen immer noch ein Signal/Rausch-Verhältnis von 8.4.

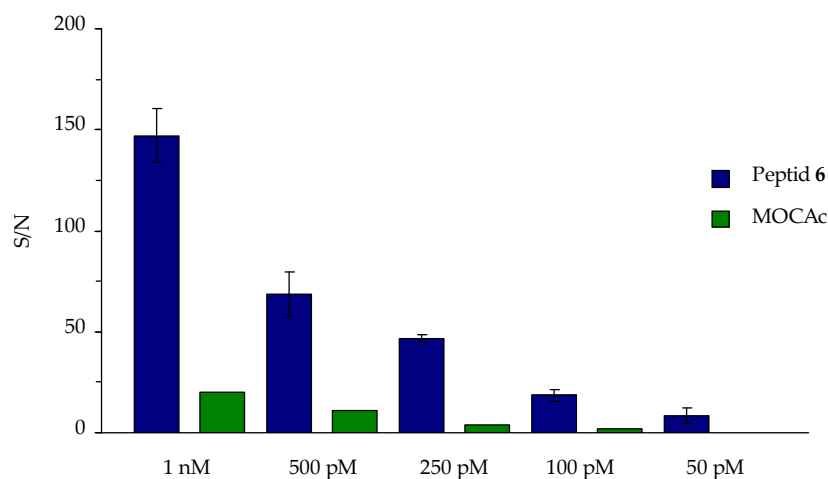


Abb. 48. Vergleich der Enzymempfindlichkeit zwischen Peptid **6** und MOCAc (3 μ M) (λ_{ex} = 328 nm, λ_{em} = 388 nm) in 2 mM Tris-HCl (pH 7.5) bei 23 °C mit 40 mM NaCl, bei gleicher Detektor-Spannung von 800 V. Das Signal/Rausch-Verhältnis entspricht dem Verhältnis der Fluoreszenzintensität in An- und Abwesenheit (Hintergrund) des Enzyms nach 18 min.

Untersuchungen der Spaltungsraten mit verschiedenen Substratkonzentrationen bei 500 pM und 250 pM Thermolysin zeigten, dass die Hydrolyse von Peptid **6** einer einfachen MICHAELIS-MENTEN-Kinetik folgte (**Abb. 49.**, Einschübe).

Die kinetischen Parameter K_m sowie k_{cat} wurden über ein LINEWEAVER-BURK-Diagramm ermittelt (**Abb. 49.**), in welchem die reziproke Umsatzgeschwindigkeit

$1/V$ gegen die reziproke Substratkonzentration $1/[S]$ aufgetragen wurde. K_m berechnet sich aus dem Abszissenschnittpunkt der Gerade ($-1/K_m$), während v_{max} über den Schnittpunkt mit der y -Achse erhalten werden kann ($1/v_{max}$). k_{cat} entspricht dem Quotienten aus Maximalgeschwindigkeit und Enzymkonzentration.

So wurde für die Hydrolyse von Peptid **6** durch Thermolysin eine MICHAELIS-MENTEN-Konstante K_m von $4.49 \pm 0.6 \mu\text{M}$, ein Wert für k_{cat} von $2.60 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$ sowie eine katalytische Effizienz k_{cat}/K_m von $5.79 \times 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ bestimmt.

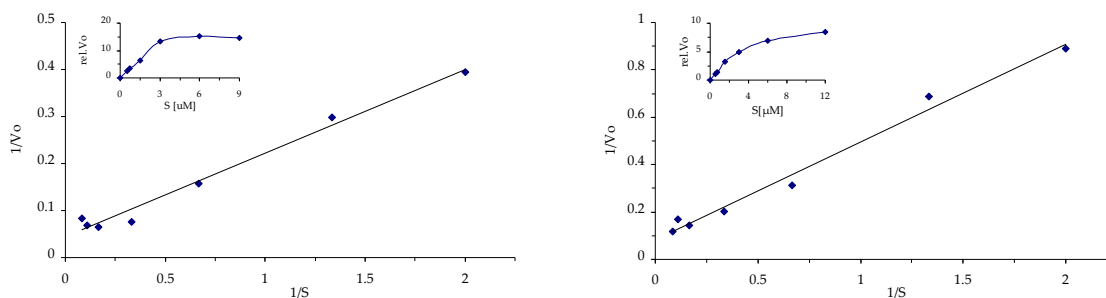


Abb. 49. LINEWEAVER-BURK-DIAGRAMM von Thermolysin 500 pM (*links*) und 250 pM (*rechts*).

Einschub: MICHAELIS-MENTEN-Diagramm. Fluoreszenzanstieg über 18 min (V_0) mit Substratkonzentrationen (Peptid **6**) von $0.5 \mu\text{M} - 12 \mu\text{M}$, in 2 mM Tris-HCl (pH 7.5) mit 40 mM NaCl bei 23°C ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 617 \text{ nm}$ Delay Time 0.1 ms, Gate Time 1 ms, Total Decay Time 0.02 s, PMT-Spannung 800 V).

Mittels MALDI-TOF MS konnte gezeigt werden, dass die Peptid-Substrate trotz großer organischer Reste von Thermolysin erkannt und selektiv zwischen Glycin (G) und Phenylalanin (F) gespalten werden.

3.5 DNA-Nachweis auf Basis von Lanthanidionen

3.5.1 Stand der Forschung

Der spezifische, empfindliche und zuverlässige Nachweis von Nucleinsäuren ist für die medizinische Diagnostik und besonders zur Erkennung von Viren, Bakterien oder Erbkrankheiten von großem Interesse. Bis in die 1990er Jahre waren Radioisotope wie ^{32}P übliche Marker für Nucleinsäuren. Deren mangelnde Stabilität und Sicherheitsprobleme führten jedoch zur Entwicklung von Fluoreszenzmarkern. Ihre Handhabung ist einfacher bei Erhalt der hohen Empfindlichkeit. Um jedoch die häufig störende Hintergrundfluoreszenz von biologischem Material und das Ausbleichen der Farbstoffe zu umgehen, wurden parallel Nachweisverfahren auf Basis von Lanthaniden entwickelt, deren langlebige Lumineszenz in zeitaufgelösten Modi zu einer weiteren Steigerung der Empfindlichkeit führte.

Die meisten dieser DNA-Assays basieren auf der Anbindung der Ziel-DNA an einen festen Träger. DAHLEN *et al.* [132] weisen das gebundene Target durch eine biotinylierte DNA nach, an die selektiv Streptavidin koppelt, welches nichtlumineszente Eu(III)-Komplexe trägt. Durch Absenken des pH-Wertes unter 4 dissoziieren die Lanthanidionen in Lösung und können durch einen Sensitizer detektiert werden. Die Nachweisgrenze liegt hierbei bei 1.9 pg der Ziel-DNA. Streptavidin kann auch mit lumineszenten Lanthanidkomplexen markiert werden [133], wobei es MATHIS *et al.* [134] durch den Einsatz eines Kryptanden gelang, bis zu 2 amol Target-DNA nachzuweisen. Im Jahr 2006 setzten MATSUMOTO *et al.* [135] immobilisierte PNA zur Hybridisierung von biotinylierter DNA ein, welche auch mit lumineszente m Streptavidin detektierbar ist.

Neben diesen indirekten Nachweismethoden konnten HURSKAINEN *et al.* über eine Transaminierung von Cytosinen [132,136] oder den Einsatz von Diaminohexanmodifizierten Deoxycytidin Phosphoramiditen [137] Einzelstrang-DNA mehrfach mit Europiumchelaten markieren und diese für die Erkennung immobilisierter komplementärer DNA verwenden.

Homogene Hybridisierungsnachweise basieren darauf, dass das Signal nur dann erzeugt oder beeinflusst wird, wenn die markierte Probe mit der Ziel-DNA hybridisiert. Da eine Immobilisierung oder Abtrennung des Nucleinsäuretargets nicht mehr nötig ist, bieten sie den Vorteil der einfachen und schnellen Handhabung. CARDULLO *et al.* [138] beschreiben drei verschiedene Möglichkeiten, FRET für Hybridisierungsassays zu nutzen. Dabei koppeln sie Fluorescein (Donor) und Rhodamin (Akzeptor) entweder an komplementäre, oder an sich am Templat ergänzende Stränge und erreichen damit jedoch aufgrund des hohen Hintergrund-

signals nur geringe Empfindlichkeiten. Um dies zu vermeiden wurden Systeme auf der Basis von Lanthaniden entwickelt.

In einem von WETMUR und Mitarbeitern ^[139] veröffentlichten Patent fungiert ein an DNA gekoppeltes Terbium(III)-Chelat als Energieakzeptor, während ein Intercalationsfarbstoff nach erfolgter Hybridisierung als Sensitizer wirkt.

SELVIN *et al.* ^[140,141] gelang es 1994, einen Europiumkomplex als „Pendant Chromophor“ (Kapitel 1.3, **Abb. 12.**) an das 5'-Ende eines DNA-Stranges zu koppeln, welcher im Falle einer Hybridisierung Energie auf einen Akzeptorfarbstoff (Cyanine 5) am 5'-Ende des komplementären Stranges überträgt. OSER *et al.* ^[142] verfolgten einen Templatansatz, in welchem Salicylsäure Energie auf einen Terbium(III)-DTPA-Komplex überträgt (**Abb. 50.**).

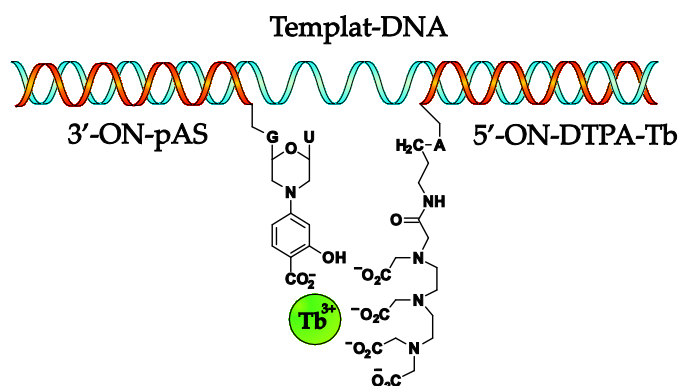


Abb. 50. Intermolekularer Energietransfer am Templat mit Salicylsäure als Sensitizer und einem Tb-DTPA-Komplex als Akzeptor.

Bei Verwendung eines β -Diketonats und eines Eu(III)-EDTA-Komplexes nach obigem Aufbau (**Abb. 50.**) konnten 0.6 pM (0.7 fmol) DNA nachgewiesen werden. ^[143] Neben einfach markierten DNA-Proben entwickelte die Gruppe um K. RAYMOND ^[144] zweifach gelabelte Proben, in welchen die Emission des Terbium-Sensitizer-Komplexes (Kapitel 1.3, Chromophoric Chelate, **Abb. 12.**) durch einen polyaromatischen Azofarbstoff (Black Hole Quencher 2) vollständig gelöscht wird. Erst die Hybridisierung komplementärer DNA ermöglicht, bedingt durch die räumliche Trennung beider Komponenten, das Lumineszieren des Lanthanids. Dies lässt sich auch durch den Einsatz von Nucleasen erreichen, welche die DNA-Proben spalten können.

3.5.2 Einfacher DNA-Nachweis

3.5.2.1 Strategie

Aufbauend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein DNA-Nachweis verfolgt, welcher basierend auf einer allosterischen Umwandlung, ein Primärsignal (Ziel-DNA) über eine DNA-Sonde in ein Metallionensignal umwandeln kann (s. **Abb. 20**).^[94] Während die Sonde dabei jedoch Metallionen wie Kupfer(II) oder Zink(II) generierte, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine PNA-Sonde entwickelt werden, die das Signal in Lanthanidionen umwandelt. Die freigesetzten Ionen treffen dann auf einen in der Assaylösung vorliegenden Sensitizer und bilden lumineszente Komplexe (**Abb. 51**). Ohne ein komplementäres DNA-Target in Lösung bildet sich ein PNA-Lanthanidring aus, der das Ion derart abschirmt, dass eine Energieübertragung ausgehend vom Sensitizer nicht möglich ist. Da Polyaminocarboxylate wie DOTA und DTPA mit ihren hohen Bindungskonstanten günstige Liganden für Lanthanide darstellen, wurden ihre Derivate für diesen Nachweis an beide Enden eines PNA-Einzelstrangs gekoppelt.

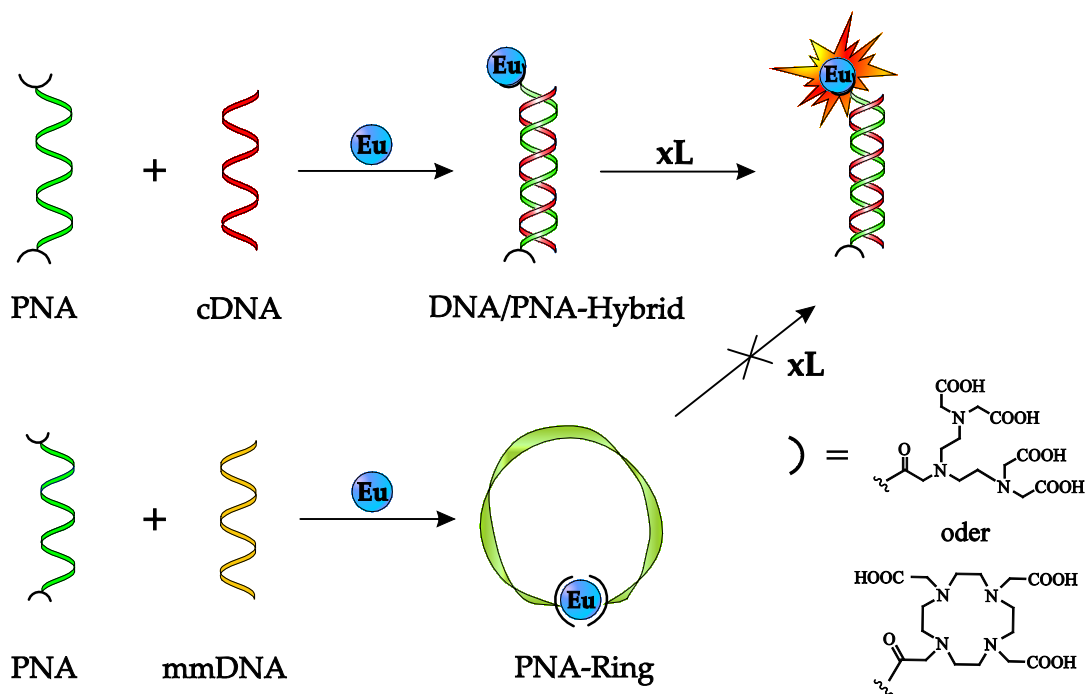


Abb. 51. Schematischer Aufbau des einfachen Nucleinsäurenachweises auf Lanthanidionenbasis.

Die PNA-Konjugate sollten aufgrund ihrer höheren Bindungsaffinität zu DNA eine verbesserte mismatch-Diskriminierung erzielen, während der Einsatz von Lanthaniden die Anwendung zeitaufgelöster Messtechniken ermöglicht und so den Nachweis empfindlicher machen sollte.

3.5.2.2 Voruntersuchungen

Um das Konzept dieses Nachweissystems zu überprüfen, wurden Vorexperimente durchgeführt, die einen Ringschluss oder eine Ringöffnung in Lösung nachahmen. Es zeigte sich, dass zwei Äquivalente des Liganden DTPA ein Lanthanidion (Europium) derart abschirmen, dass keine Energieübertragung von einem Sensitizer wie DPA, einem relativ schwach koordinierenden Liganden, stattfinden kann (**Abb. 52., links**). Liegt nur ein Äquivalent des Liganden vor, ist der Ring also geöffnet, wird die Koordination des Sensitizers an Europium möglich, und ein lumineszentes Signal entsteht (**Abb. 52., rechts**). Dies konnte auch für binäre Komplexe aus DOTA und DTPA beobachtet werden.

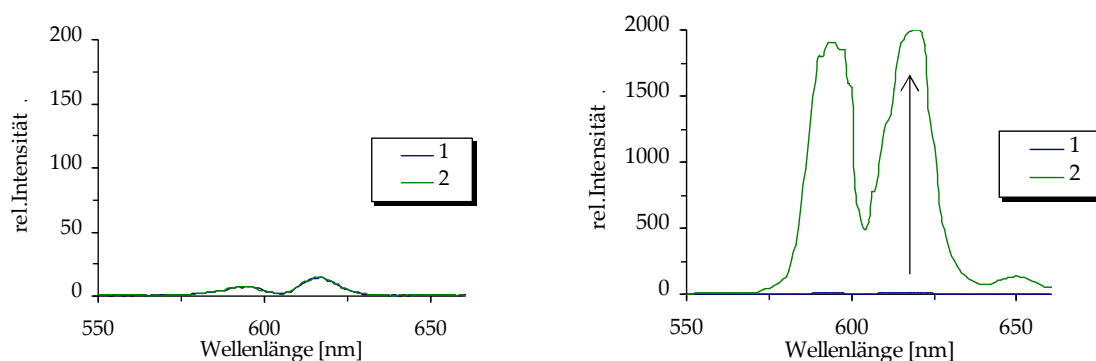


Abb. 52. Simulation eines geschlossenen (*links*) und geöffneten (*rechts*) Rings in Lösung mit DPA als Sensitizer und DTPA als ringbildenden Liganden. *Links:* (1) 10 μM Eu(III), 20 μM DTPA (2) 30 μM DPA. *Rechts:* (1) 10 μM Eu(III), 10 μM DTPA (2) 30 μM DPA in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) ($\lambda_{\text{ex}} = 270$ nm, Delay Time 0.1 ms, Gate Time 1 ms, Total Decay Time 0.02 s, Slit Width 10 nm, PMT-Spannung 800 V).

Zur empfindlicheren Detektion von Europiumionen in Lösung oder im geöffneten PNA-Ring wurden Terpyridinbiscarbonsäuren **30** und **31** als alternative Sensitizer untersucht. Sie weisen zwei zusätzliche Koordinationsstellen auf und lassen aufgrund ihres konjugierten aromatischen Systems einen höheren Extinktions-

koeffizienten und somit eine effizientere Anregung im Vergleich zu DPA erwarten. **Abb. 53.** zeigt das gemessene Signal im Fluoreszenz- sowie im Phosphoreszenzmodus, welches bei letzterem erst nach einer Verzögerungszeit von 0.1 ms aufgenommen wird. Durch die sehr empfindlichen Geräteeinstellungen (PMT-Spannung 900 V und Schlitzbreite 20 nm) ist eine Detektion von 1 nM Europium mit Verbindung **30** zeitaufgelöst sehr gut möglich. Da sich beide Sensitizer ähnlich verhalten, werden alle folgenden Untersuchungen beispielhaft nur an Verbindung **30** gezeigt.

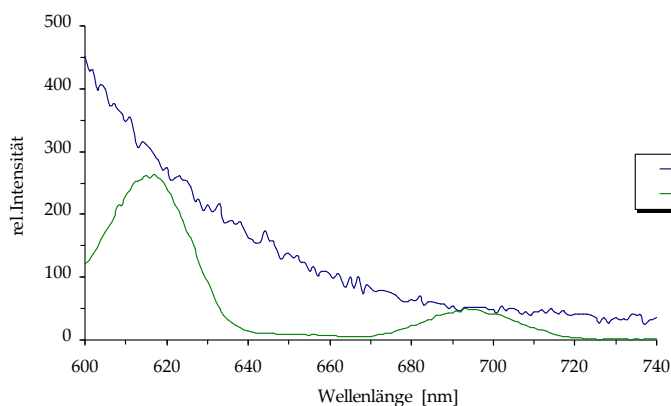


Abb. 53. (1) Fluoreszenz- und (2) Phosphoreszenzmessung von Verbindung **30** (3 nM) mit Eu(III) (1 nM) in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm, Delay Time 0.1 ms, Gate Time 1 ms, Total Decay Time 0.02 s, Slit Width 20 nm, PMT-Spannung 900 V).

Um zu gewährleisten, dass die Komplexe der Liganden **30** und **31** nicht so stabil sind, dass das Lanthanidion aus dem geschlossenen Ring extrahiert und das Signal verfälscht werden kann, wurden dazu auch Voruntersuchungen durchgeführt (**Abb. 54.**).

Während der einmal geschlossene Ring nicht durch den Sensitizer zu öffnen ist, wird Europium(III) durch einen Überschuss DTPA langsam aus dem Sensitizer-Komplex entfernt.

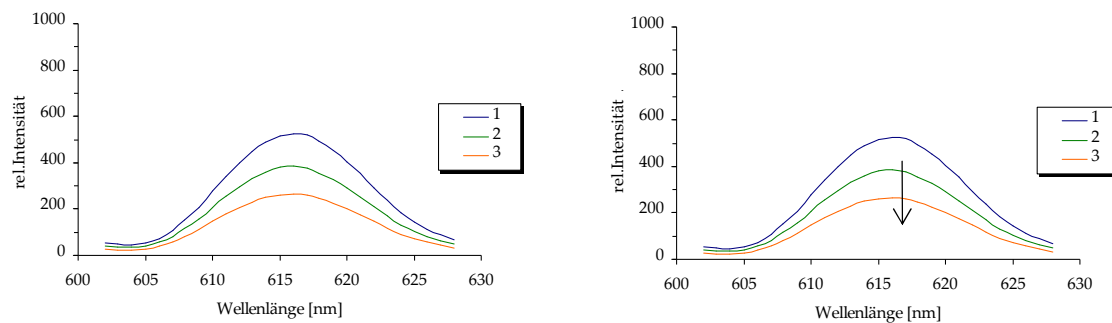


Abb. 54. *Links:* Simulation des geschlossenen $(\text{DTPA})_2$ -Rings von **30**. (1) 200 nM Eu, 400 nM DTPA (2) 600 nM Ligand **30** (3) nach 20 min, in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) bei 23 °C ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, Delay Time 0.1 ms, Gate Time 1 ms, Total Decay Time 0.02 s, Slit Width 10 nm, PMT-Spannung 800 V). *Rechts:* Simulation des Ringschlusses mit DTPA. (1) 200 nM Eu, 600 nM Ligand **30** (2) 2 μM DTPA (3) nach 20 min in 10 mM HEPES- Puffer (pH 7.4) ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, Delay Time 0.1 ms, Gate Time 1 ms, Total Decay Time 0.02 s, Slit Width 10 nm, PMT-Spannung 800 V).

3.5.2.3 Fluoreszenzmessungen

In Analogie zu den Voruntersuchungen mit DTPA und DOTA wurden die synthetisierten PNA-Konjugate **1** (DTPA₂-Konjugat) und **2** (DOTA-DTPA-Konjugat) zunächst auf ihre mögliche Ringbildung mit Europium(III) untersucht. Da PNA **3** (DOTA-DTPA-Konjugat mit längerer Sequenz) nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand um alle Studien durchzuführen, beschränken sich die Untersuchungen im Folgenden nur auf die Konjugate **1** und/oder **2**. **Abb. 55.** zeigt die Fluoreszenzabnahme eines Eu-DPA-Komplexes durch Zugabe eines Überschusses des jeweiligen Konjugats. Während zur vollständigen Fluoreszenzlöschung 1 μM PNA **1** eingesetzt werden müssen (**Abb. 55., links**), wird mit PNA **2** hierfür nur 500 nM benötigt (**Abb. 55., rechts**).

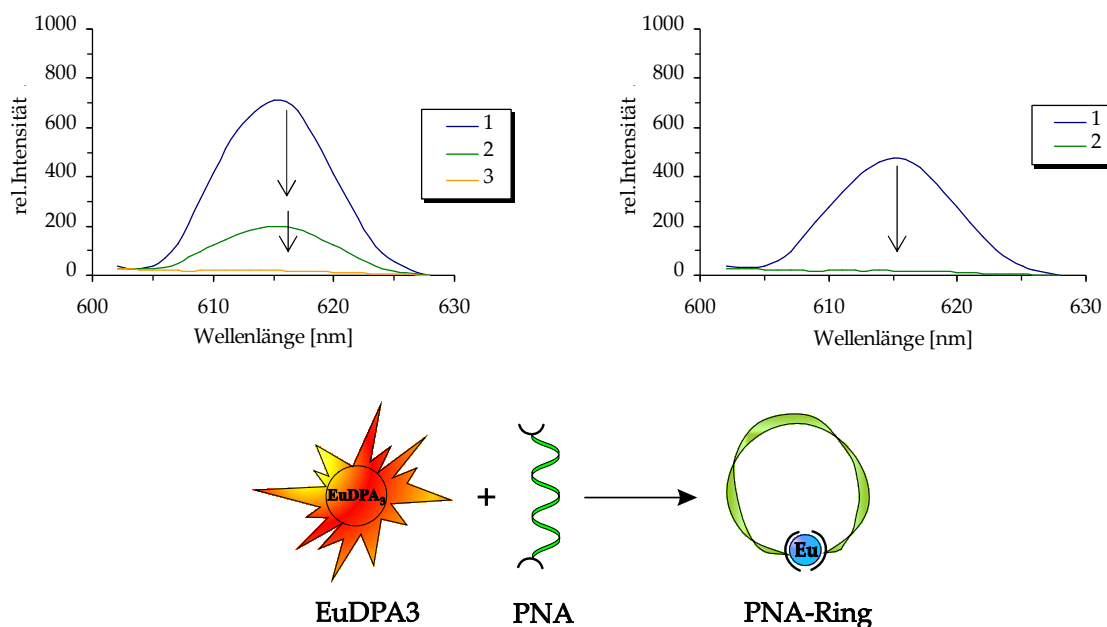


Abb. 55. (1) Fluoreszenz eines Eu-DPA-Komplexes (200 nM Eu, 600 nM DPA) und Löschung durch Zugabe von PNA. *Links:* (2), (3) je 500 nM PNA **1**. *Rechts:* (2) 500 nM PNA **2**, in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) mit 750 mM NaCl bei 23 °C ($\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$, Delay Time 0.1 ms, Gate Time 1 ms, Total Decay Time 0.02 s, PMT-Spannung 900 V).

Einen weiteren Hinweis auf die Ausbildung von Ringstrukturen lieferte die Wechselwirkung der PNA-Konjugate mit DNA. In Anwesenheit von komplementärer DNA war es möglich, den gebildeten PNA-Europiumring zu öffnen und die Fluoreszenz des gelöschten Komplexes partiell wiederherzustellen (**Abb. 56., links**). Durch die Zugabe von scrambled DNA blieb die Ring-Struktur

unbeeinflusst und die Fluoreszenzlöschung konnte aufrechterhalten werden (**Abb. 56., rechts**). Aufgrund der geringen Länge der PNA-Sequenz (neun Basen) und des daraus resultierenden niedrigen Schmelzpunktes ($\sim 42^\circ\text{C}$) erfolgte eine Hybridisierung nur durch Inkubation der Reaktionslösung bei 4°C .

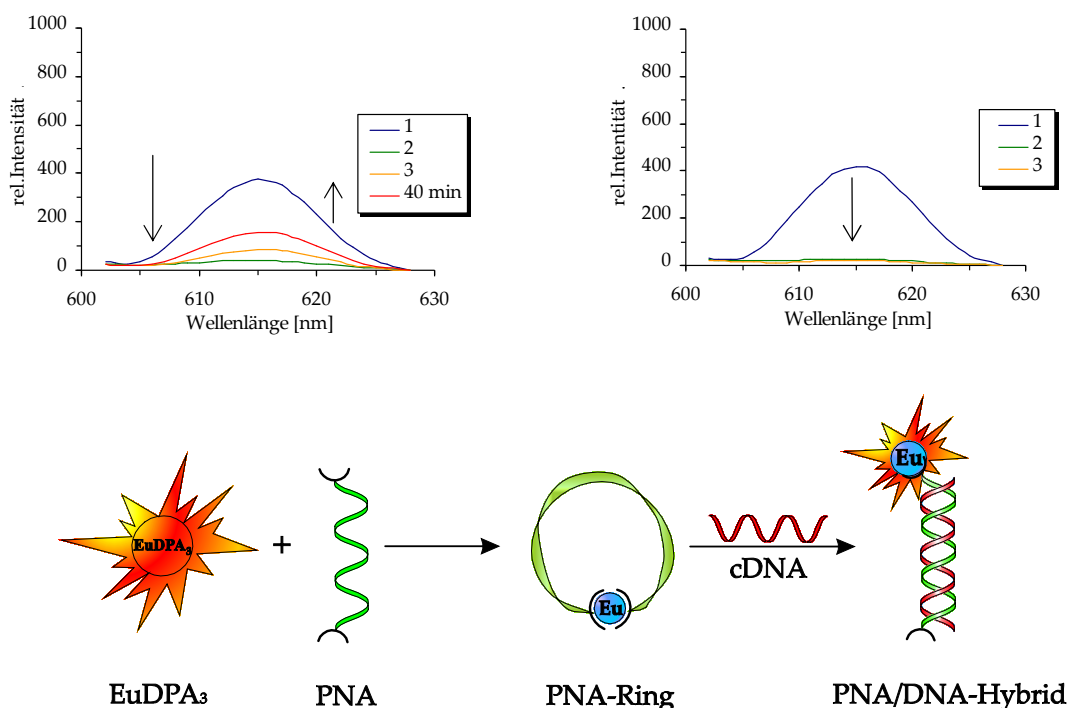


Abb. 56. (1) Fluoreszenz eines Eu-DPA-Komplexes ($2\ \mu\text{M}$ Eu, $1\ \mu\text{M}$ DPA) und Löschung durch (2) Zugabe von PNA 1 ($3\ \mu\text{M}$). Links: (3) partielle Öffnung des Lanthanidrings in Anwesenheit von cDNA ($3\ \mu\text{M}$) nach 20 min bei 4°C Rechts: (3) keine Öffnung durch Zugabe von scrDNA 1 ($3\ \mu\text{M}$) in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) mit $750\ \text{mM}$ NaCl bei 23°C ($\lambda_{\text{ex}} = 270\ \text{nm}$).

Während diese Ergebnisse anfänglich reproduzierbar waren, wurde nach einiger Zeit jedoch zum einen beobachtet, dass die Fluoreszenzlöschung unter identischen Bedingungen nicht mehr vollständig ablief, zum anderen, dass das durch DNA wiederhergestellte Signal innerhalb weniger Minuten auf den ursprünglichen Wert der Löschung sank. Diese Beobachtungen werden im Folgenden mit der Bildung linearer Strukturen sowie der Aggregation der PNA-Konjugate interpretiert, unter anderem hervorgerufen durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Stammlösungen. Um dies näher zu untersuchen, wurden PNA-Konjugate synthetisiert, die N-terminal mit DTPA (PNA 5) oder NTA (PNA 6) modifiziert waren. Während die Fluoreszenz des Eu-DPA-Komplexes in Anwesenheit eines PNA 5/DNA-Hybrids nur minimal anstieg und innerhalb von 30 min auf null sank

(**Abb. 57., links**), wurde mit PNA 6 ein deutlicher Anstieg des Signals erreicht (**Abb. 57., rechts**). Dies zeigte, dass DTPA Europium(III) ausreichend stark koordiniert und sich womöglich lineare Strukturen ausbilden können. Einem weniger stark koordinierenden Liganden wie NTA scheint dies nicht möglich zu sein.

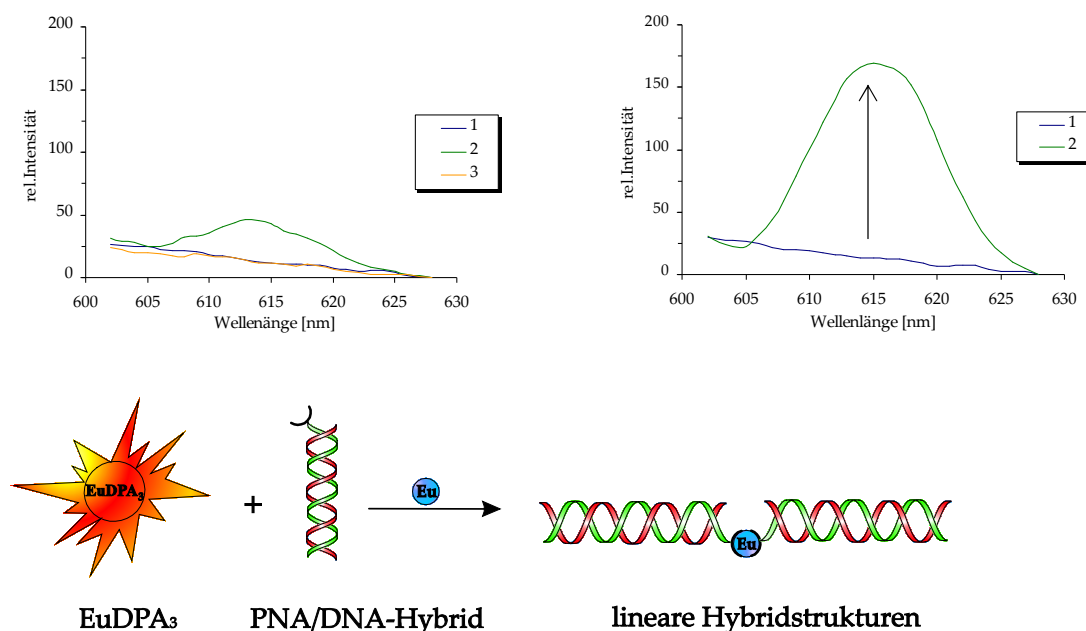


Abb. 57. Untersuchung der N-terminal modifizierten PNA-Konjugate. *Links:* (1) PNA 5 (1 μ M), cDNA mit 3 Basen Überhang (1 μ M), 1 h bei 4 °C inkubiert (2) Eu (200 nM), DPA (600 nM) (3) nach 30 min *Rechts:* (1) PNA 6 (1 μ M), cDNA mit 3 Basen Überhang (1 μ M), 1 h bei 4 °C inkubiert (2) Eu (200 nM), DPA (600 nM), in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) mit 750 mM NaCl bei 23 °C (λ_{ex} = 270 nm).

Um die Bildung dieser Strukturen zu verhindern, wurden in einem nächsten Schritt anstelle von DPA andere Sensitizer eingesetzt, die nur schwer durch DTPA zu verdrängen sind. So sollte gewährleistet werden, dass diese Sensitizer Europium im durch DNA geöffneten Ring für die Ausbildung linearer Strukturen an einer Seite blockieren. Dazu wurde die jeweilige PNA zunächst mit komplementärer DNA bei 4 °C eine Stunde inkubiert und anschließend mit Europium(III) versetzt.

Die Zugabe des Sensitizers (Verbindung 30) erfolgte erst nach 1.5 Minuten, da sich in dieser Zeit die linearen Strukturen noch nicht gebildet hatten (**Abb. 58., links**), das Konjugat ohne DNA jedoch die Möglichkeit des Ringschlusses hat. Eine Zugabe des Sensitizers nach 6 min rief keinen Signalanstieg mit komplementärer DNA mehr hervor (**Abb. 58., rechts**).

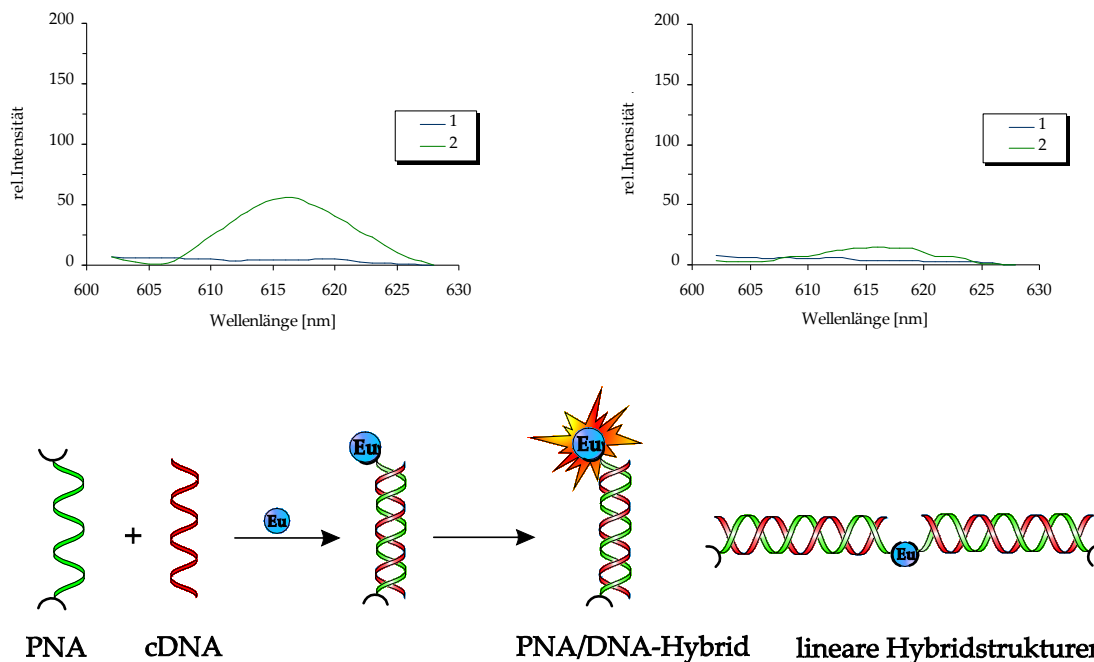


Abb. 58. Ausbildung „linearer Strukturen“ durch längere Inkubationszeit des PNA 1/cDNA-Hybrids mit Eu(III) Links: (1) 500 nM PNA 1, 1 μ M cDNA, 1 h bei 4 °C inkubiert (2) 100 nM Eu, 1,5 min Inkubation bei RT, 100 nM Verbindung 30 Rechts: (1) 500 nM PNA 1, 1 μ M cDNA, 1 h bei 4 °C inkubiert (2) 100 nM Eu, 6 min Inkubation bei RT, 100 nM Verbindung 30 in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) mit 750 mM NaCl bei 23 °C ($\lambda_{\text{ex}} = 339$ nm).

Da trotz dieser Maßnahmen eine Aggregation der PNA und somit Verfälschung des Signals nicht immer verhindert werden konnte, wurden zu jedem Experiment 0.05 % Triton X als Detergenz hinzugefügt, die jeweilige PNA/DNA-Reaktionsmischungen je drei Mal auf 90 °C geheizt, abgekühlt (13 °C/min) und 40 min bei 17 °C inkubiert (**Abb. 59.**). Unter diesen Bedingungen wurde in Anwesenheit von scrambled DNA 2 kein Signal detektiert, da der PNA-Europium-Ring gebildet wurde (**Abb. 59.** (1)). Mit mismatch DNA stieg das Signal nur um einen Faktor 5 (2), während die Zugabe von 1 μ M komplementärer DNA einen 210-fachen Anstieg (3), 500 nM komplementärer DNA einen 91-fachen Anstieg der Fluoreszenz hervorrief (4). Um zusätzlich eine „Polymerisation“ der Konjugate zu verhindern, wurden komplementäre DNAs mit sechs Basen Überhang am 5'-Ende (5) sowie drei Basen Überhang an beiden Enden untersucht (6) und waren bis zu einer Konzentration von 250 nM (18 pmol) nachzuweisen.

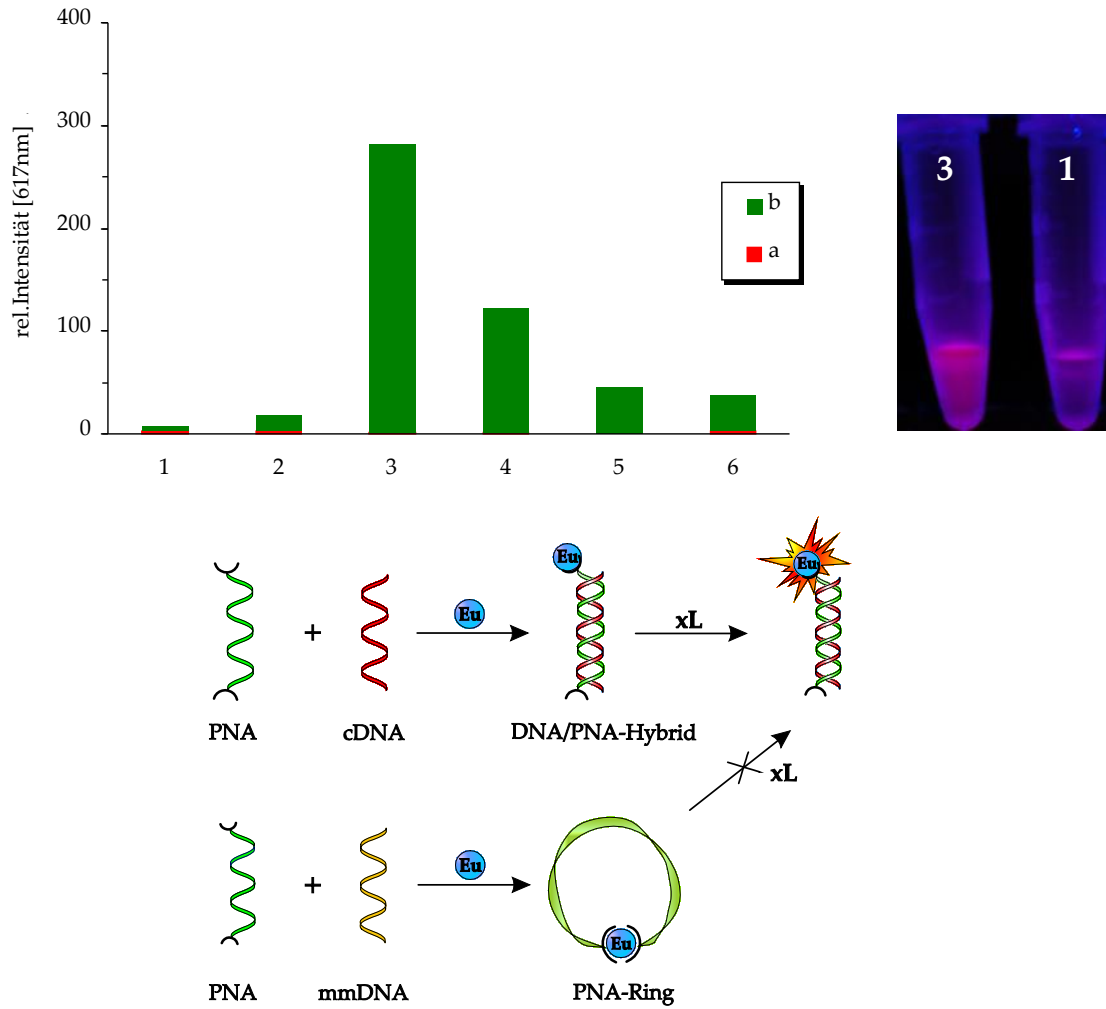


Abb. 59. Fluorimetrische Detektion von verschiedenen Target-DNAs durch PNA 2. (a) PNA 2 (1 μM), Target-DNA, 40 min bei 17 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert (b) Eu (300 nM), Ligand 30 (900 nM) in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4), 0.05% Triton X mit 750 mM NaCl bei 23 $^{\circ}\text{C}$. (1) scrDNA 2 (1 μM) (2) mmDNA (1 μM) (3) cDNA (1 μM) (4) PNA 2 (500 nM), cDNA (500 nM) (5) PNA 2 (500 nM) cDNA 6 Basen Überhang (500 nM) und (6) PNA 2 (250 nM), cDNA 3 Basen Überhang an beide Seiten (250 nM). ($\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$). Das Photo zeigt (1) und (3) unter UV-Licht.

3.5.3 DNA-Nachweis durch Signalamplifikation

3.5.3.1 Stand der Forschung

Der im Rahmen dieser Arbeit bereits beschriebene empfindliche DNA-Nachweis, basierend auf der Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Strang und der daraus resultierenden Signaldetektion, sollte durch Amplifizierungsmethoden deutlich verbessert werden. Die Targetamplifikation von DNA ist eine der häufigsten eingesetzten Detektionsmethoden und wird von der Polymerase Kettenreaktion (PCR) bestimmt, bei der nach Vervielfältigung des Analyten die Signalumwandlung in ein meist optisches Signal erfolgt.^[145] Zu diesen homogenen katalytischen Nachweisreaktionen zählen auch Rolling-Circle Amplification (RSA), Strand Displacement Amplification (SDA) und die Ligase Kettenreaktion (LCR).^[146]

Aufgrund einiger Einschränkungen dieser Methoden hat neben der Targetamplifikation besonders die Signalamplifikation in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen.^[147-149] HO *et al.*^[150] beschreiben ein kationisches Polythiophenpolymer, dessen Fluoreszenz in Gegenwart von einzelsträngiger DNA aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen gelöscht, bei der Bildung von doppelsträngiger DNA jedoch wieder hergestellt wird. Damit erreichten sie den Nachweis von 5 Doppelstrang-DNA-Molekülen, was einer Konzentration von 3 zM entspricht. Ein besonderes Augenmerk wird auf katalytische Reaktionen zur Vervielfältigung der Signale gelegt, die entweder über supramolekulare, metallorganische Katalyse^[151-156] oder biokatalytisch^[155,157-168] erfolgen können und von denen sich erhöhte Sensitivität und Anwendbarkeit erhofft wird. Dabei wandelt der Katalysator (organischer Ligand oder Enzym) jedes einzelne „Hybridisierungsereignis“ in eine Vielzahl von Substrat-Signalen um. Viele leistungsfähige, weit verbreitete Verfahren wie der heterogene ELISA-Test machen sich diese biokatalytische Verstärkung zu Nutze. Jedoch sind hier Targeterkennung und Amplifizierung durch ausgiebige, zeitraubende Waschschritte voneinander getrennt, was die Entwicklung von Strategien für homogene, einfach handhabbare Detektionsverfahren mit hoher Sensitivität zu einer aktuellen wissenschaftlichen Herausforderung macht.^[147,166]

Neben heterogenen enzymatischen Systemen^[157,158,169,170] werden daher homogene Detektionsverfahren auf Basis von Enzymen^[160,161,164,165,167], Ribozymen^[159,171-173] und DNAzymen^[162,163] näher untersucht und entwickelt, da sie ohne Immobilisierung oder Abtrennung des Nucleinsäuretargets auskommen.^[155,159-167] Sie erinnern an biologische autonome Signalkaskaden, deren Systeme ein externes Signal (z.B. Photonen) oder Stimulanzen (z.B. Hormone) erkennen und ohne weiteres Eingreifen von Außen über eine Folge von Signaltransduktionsprozessen reagieren. Das

ursprüngliche Signal wird so über katalytische Reaktionen in eine amplifizierte chemische Information umgewandelt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der PCR-unabhängigen enzymatischen Signal-amplifizierung ist das Konzept der Allosterie, bei dem erst durch Bindung eines Effektors (häufig der Analyt) an eine freie Bindungsstelle innerhalb des Biomoleküls und der daraus resultierenden Konformationsänderung die Eigenschaften des katalytisch aktiven Zentrums meist positiv (Aktivierung) beeinflusst werden. In der Natur findet sich dieses Konzept u.a. in der neuronalen Signalübertragung wieder. Ein Beispiel für die Signalamplifizierung über allosterische Katalyse ist das von SAGHATELIAN *et al.* [161] beschriebene System, welches aus einer mutanten Zink-metalloprotease besteht, die mit einem DNA-Einzelstrang kovalent verknüpft ist. An diesem Einzelstrang ist ein Phosphoramidat inhibitor gebunden, der das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms erreichen und blockieren kann. Kommt es zur Hybridisierung mit einem Target, wird der Inhibitor durch Bildung einer starren Duplexstruktur vom aktiven Zentrum abgelöst und das Enzym „angeschaltet“, welches daraufhin ein fluorogenes Peptidsubstrat umsetzt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 100 pM DNA.

Die Integration künstlicher allosterischer Bindungsstellen (Aptamere) in Nucleinsäuren eröffnet die Möglichkeit, deren Funktion durch chemische oder biologische Effektoren zu kontrollieren. Diese können die katalytische Aktivität von Enzymen [165], Ribozymen [174] oder DNAzymen [163] initiieren und eine für die Detektion verwendbare Signalverstärkung erzeugen. So gelang es der Gruppe um WILLNER [163], einen Biosensor nach Art eines Molecular Beacon [175] zu entwickeln, dessen Aptamerregion im geöffneten Zustand zusammen mit Häm in einen Komplex mit Peroxidaseaktivität ausbilden kann. Auf Grundlage dieser Konzepte entsteht zurzeit eine neue Generation molekularer Biosensoren.

Allosterisch schaltbare Enzyme, Ribozyme, DNAzyme und Proteinrezeptoren wurden bisher in erster Linie durch Sequenzvariation oder Kombination von allosterischen und funktionellen Nucleinsäure- oder Proteindomänen generiert. Trotz methodischer Fortschritte bleibt das „Maßschneidern“ allosterischer Eigenschaften von Biosensoren eine Herausforderung. Eine Alternative zum „genetischen“ Ansatz ist die Einführung kleiner Moleküle als allosterische Schalter in Biomoleküle, um ihre Funktion durch spezifische niedermolekulare Effektoren gezielt steuern zu können.

Einen wichtigen Beitrag dazu liefert die Erforschung synthetischer, supramolekularer Rezeptoren und Katalysatoren, die als bioinspirierte Modellsysteme ein besseres Verständnis allosterischer Wechselwirkungen vermitteln. [152] Nur wenige Beispiele von Hybridsystemen mit chemischen allosterischen Bindungsstellen sind bekannt, wie das einer DNA-gesteuerten Peptidase [161] oder

eines Fructose-gesteuerten Myoglobin-Boronsäure-Konjugats.^[176] Ein in unserer Arbeitsgruppe verfolgter Ansatz zur allosterischen Regulation basiert auf der Funktionalisierung von DNA-Oligonucleotiden mit Chelatliganden.^[94] Diese Funktionalisierung wurde bereits von anderen Gruppen u.a. mit Liganden wie Bipyridin, Terpyridin und Salen eingesetzt, um mittels Metallionen eine Stabilisierung der Hybride zu erreichen^[177-181] und Nanostrukturen^[182-184] aufbauen zu können, jedoch nicht im Sinne eines allosterischen Schalters.

Dazu wird ein DNA-Oligonucleotid sowohl am 3' - als auch am 5'-Terminus mit ein 2,2':6',2''-Terpyridinderivat so modifiziert, dass es als allosterischer Rezeptor mit zwei voneinander getrennten Untereinheiten für die Bindung einer komplementären Nucleinsäure und eines Metallions wirken kann. Die Komplexbildung eines Metallions schwächt die Wechselwirkung mit einem komplementären DNA -Strang und umgekehrt (negative Allosterie) (**Abb. 20**).^[95] Zum Einsatz kommt diese allosterische Umwandlung des Primärsignals (hier ein DNA-Oligonucleotid) in ein Metallionensignal in einem neuen Sensor-Konzept, das unsere Arbeitsgruppe 2006 vorstellte.^[156] Dabei aktiviert das freigesetzte Metallion (Cu(II)) als Cofaktor einen chemischen Redoxkatalysator, der ein Substrat in sein fluoreszentes Produkt umwandelt und so bis zu 5 nM (250 fmol) DNA nachweisen kann. Dieser Prototyp erreichte jedoch nicht die niedrigen Nachweisgrenzen einiger bekannter Systeme, da seine Empfindlichkeit durch die unkatalysierte Hintergrundoxidation des fluorogenen Substrats sowie die geringen Turnover-Frequenzen und langsame Reaktionszeit des chemischen Katalysators eingeschränkt ist. Durch die modulare Kombination der signalübertragenden und signalverstärkenden Einheiten kann ein solches Nachweissystem jedoch optimiert werden. Im gleichen Jahr wurde daher ein Ansatz, basierend auf einer enzymatischen Signalamplifikationskaskade, verfolgt, in welchem der chemische Katalysator durch ein Apoenzym (Apo-carboanhydrase) ersetzt wurde (**Abb. 60**).^[167] Dieses deaktivierte Enzym wird durch das freiwerdende Metallion (Zn(II)) reaktiviert und kann sowohl die Hydrolyse von Estern, als auch von CO₂ zu HCO₃ katalysieren, wobei letzteres mit sehr hohen Turnover-Raten erfolgt. Allerdings begrenzt hierbei die unvollständige Deaktivierung des eingesetzten Enzyms die Empfindlichkeit des Systems auf 0.1 μM DNA.

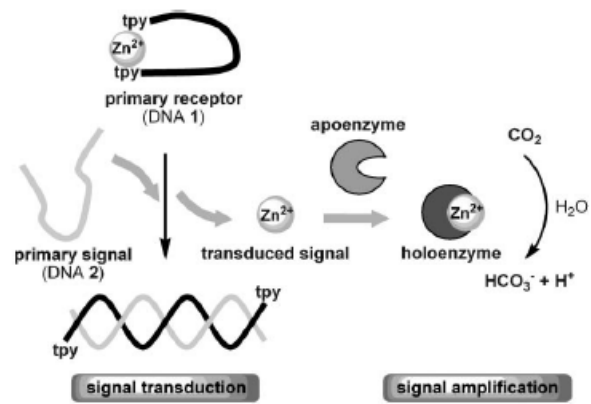


Abb. 60. Signalkaskade mit enzymatischer Amplifikation. Die Nucleinsäuredetektion mit Tpy₂DNA erfolgt über Reaktivierung von Apocarboanhydrase durch Zinkcofaktoren. [167]

3.5.3.2 Strategie

Das in der Arbeitsgruppe entwickelte Verfahren der Nucleinsäuredetektion mittels enzymatischer Signalamplifikation ^[167] sollte in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich seiner Empfindlichkeit verbessert und weiterentwickelt werden. Dazu wird ein Primärsignal (DNA-Target), wie bereits in Vorarbeiten beschrieben ^[94,156,167], durch Destabilisierung einer Zn(Tpy₂DNA)-Sonde in ein Metallionensignal umgewandelt. Im nächsten Schritt aktiviert das freigesetzte Zink(II)-Ion als Cofaktor ein Apoenzym, welches dann ein Substrat in sein fluoreszentes Spaltprodukt umsetzt. (**Abb. 59**).

Im Unterschied zu vorherigen Systemen sollte das detektierbare Signal jedoch nicht auf der Fluoreszenz eines organischen Farbstoffes, sondern auf der Lumineszenz eines Lanthanids basieren, wodurch sich mit Hilfe zeitaufgelöster Messtechniken verbesserte Nachweisgrenzen erwarten ließen. Als enzymatische Einheit wurde Thermolysin gewählt, ein robustes und gut untersuchtes Enzym, welches als Metalloendopeptidase über einen zinkabhängigen Mechanismus (Kapitel 1.2, **Abb. 6**.) Peptide hydrolytisch spaltet. Die Peptidsubstrate sollten derart konzipiert sein, dass nur ihre Spaltung ein lumineszentes Lanthanidsignal erzeugt (**Abb. 61**).

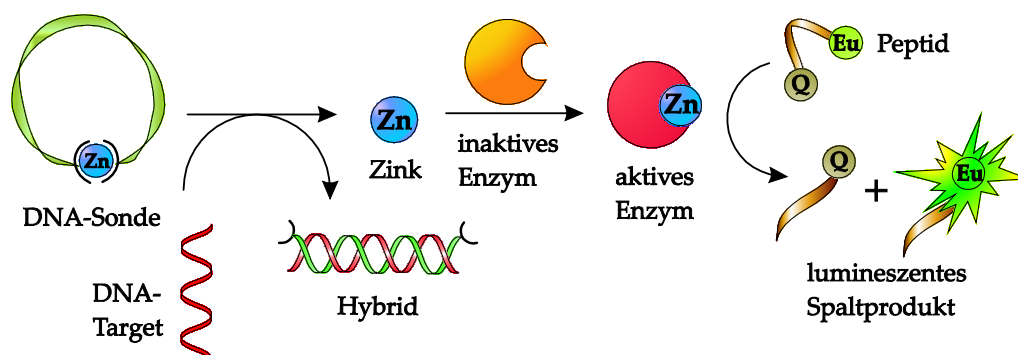


Abb. 61. Schematische Darstellung der autonomen Signalkaskade.

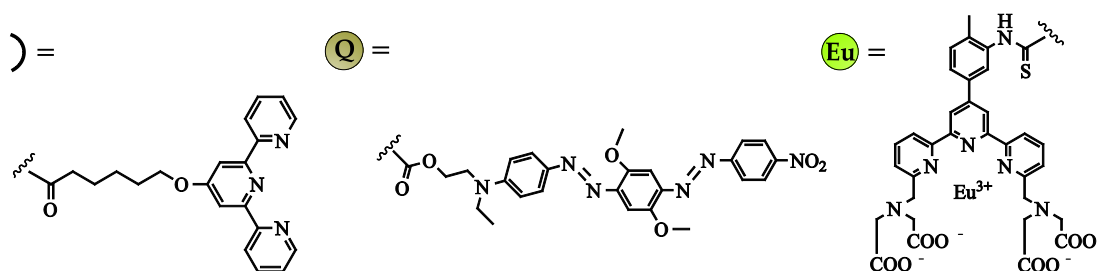


Abb. 62. Eingesetzte Liganden für die enzymatische Signalkaskade. Tpy-Ligand der DNA-Sonde (*links*), Black Hole Quencher 2 (*Mitte*) und lumineszenter Eu-Komplex **20** (*rechts*).

3.5.3.3 Inaktivierung von Thermolysin

Aufgrund der hohen Turnover-Raten von Enzymen wurde Thermolysin in seiner deaktivierten Form (Apoenzym) als Präkatalysator zur Nucleinsäuredektion mittels Signalamplifikation eingesetzt. Das Apoenzym sollte keine oder nur geringe Aktivität aufweisen und nach Reaktivierung mit Zink im Idealfall die Aktivität des Holoenzym erlangen. Von großer Bedeutung bei der Herstellung von Apoenzymen ist es, Metallkontaminationen jeglicher Art auszuschließen. Dazu wurde zum Herstellen der Puffer zunächst HPLC-Wasser im Säulenverfahren mit dem Kationentauscher Chelex[®] behandelt und alle daraus erhaltenen Puffer mit Dithizon, einem Komplexligenanden für viele Metalle, in Chloroform ausgeschüttelt.

In einem unter anderem von HOLMQUIST *et al.* [185-187] beschriebenen Verfahren wurde versucht, Apothermolysin durch Dialyse gegen 1,10-Phenanthrolin herzustellen. Da jedoch auch nach verschiedenen Dialyseprotokollen das erhaltene Enzym durch Zugabe von Zink nicht mehr zu reaktivieren war, wurde ein Ansatz von FEDER *et al.* [188-191] verfolgt, der das Apoenzym über Gelfiltration (Größenausschluss-chromatographie) erzeugt. Es sollte vermieden werden, dass Thermolysin während der langwierigen Dialyse über zwei Tage Autoproteolyse eingeht. Daher wurde das Enzym über eine mit 1,10-Phenanthrolin äquilibrierte Sephadexsäule innerhalb weniger Minuten chromatographiert und die Protein enthaltenen Fraktionen über Absorption bestimmt. Jedoch konnte auch mit dieser Methode kein reaktivierbares Apoenzym erhalten werden.

Eine in unserem Arbeitskreis entwickelte Methode zur Deaktivierung von zinkhaltigen Enzymen, wie Carboxypeptidase A oder Aldolase, basiert auf der Inkubation des Enzyms mit einem Überschuss NOTP (1,4,7-Triazacyclononan-*N,N',N''*-tris-(methylenphosphorige Säure). Dabei wird die hohe Zinkbindungskonstante des Chelatliganden genutzt ($K_{\text{Stab}} = 24.9$) [192], der eine geringe Aufnahme-rate gegenübersteht und so gewährleistet, dass trotz der Anwesenheit dieses Liganden in Lösung, eine Reaktivierung des erhaltenen Apoenzym mit Zink ohne zusätzliche Waschschrirte möglich wird. [193] Da Thermolysin jedoch neben einem Zinkion auch vier Calciumionen enthält, die dessen thermische Stabilität garantieren, schien die Deaktivierung in Lösung über NOTP, das Calcium(II) bindet, nicht möglich.

BAKKER *et al.* [194] gelang es dennoch, Thermolysin mittels EDTA ohne Stabilitätsverlust zu de- und zu reaktivieren. Sie nutzen hierfür die Immobilisierung von Thermolysin, dessen dreidimensionale Struktur durch „Multipoint“-Anbindung auch ohne Calciumionen erhalten blieb. Dafür wurden Thermolysin und Eupergit C[®] als polymerer Träger drei Tage bei 4 °C gerührt und die restlichen Oxiran-Gruppen

des festen Trägers über zwei Tage mit Puffer zu den entsprechenden Diolen hydrolysiert. Nach Abfiltrieren und Trocknen wird ein farbloses Pulver erhalten, dessen mittlere Beladung über Konzentrationsbestimmung des nichtgebundenen Thermolysins berechnet werden kann und bei 46.2 mg Thermolysin/g Eupergit C[®] liegt.

Um die Effizienz der Deaktivierung des immobilisierten Enzyms näher zu untersuchen, wurden Versuche mit NOTP, EDTA und Phenanthrolin mit verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlicher Dauer durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei gleicher Konzentration der Chelatliganden NOTP Thermolysin sehr viel schneller deaktiviert als EDTA oder Phenanthrolin. Selbst nach fünf Tagen Inkubation mit EDTA oder Phenanthrolin, bei einem Wechsel der Reaktionslösung, zeigte das Enzym noch Restaktivität. Bei höheren Chelatkonzentrationen oder längerer Inkubationszeit ist das Enzym nicht mehr reaktivierbar. **Abb. 63.** vergleicht die Restaktivität nach Inaktivierung von Thermolysin/Eupergit C[®] mit NOTP, EDTA und Phenanthrolin über zwei Tage. Während das Enzym mit NOTP fast vollständig inaktiviert werden konnte, zeigte es mit EDTA und Phenanthrolin noch hohe Restaktivität. Daher wurde die Inaktivierung in allen weiteren Messungen mit NOTP unter diesen Bedingungen durchgeführt.

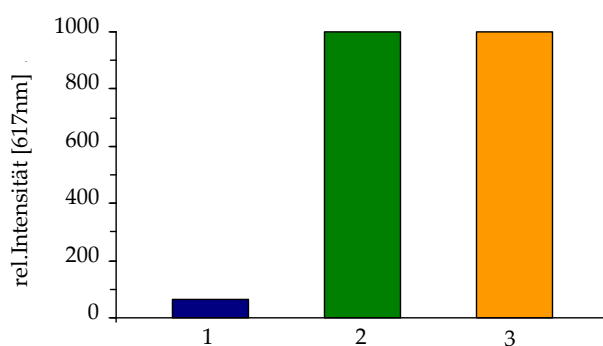


Abb. 63. Messung der Restaktivität nach Inaktivierung von Thermolysin/Eupergit C[®] mit 2 mM (1) NOTP, (2) EDTA und (3) Phenanthrolin nach zwei Tagen. Peptid 6 (50 μ M), Thermolysin/Eupergit C[®] (0.57 μ M) in TSU Wasser, nach 30 min Umsatzzeit ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm, Delay Time 0.1 ms, Gate Time 1 ms, Total Decay Time 0.02 s, PMT-Spannung 800 V).

3.5.3.4 Reaktivierung von immobilisiertem Thermolysin

Voraussetzung für den Einsatz von Thermolysin in einer enzymatischen Signalkaskade ist nicht nur eine vollständige Deaktivierung des Enzyms, sondern auch eine schnelle und effiziente Wiederherstellung seiner Aktivität.

Dafür wurde immobilisiertes Thermolysin unter den beschriebenen Bedingungen zunächst mit NOTP deaktiviert (2 mM NOTP, zwei Tage bei 4 °C) und seine Reaktivierbarkeit durch Zugabe verschiedener Mengen Zink(II) untersucht (**Abb. 64**). Im Gegensatz zu anderen Apoenzymen ^[193], deren Assoziationsraten mit Zink größer sind ($10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) als die von NOTP ($10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), ist eine effiziente Reaktivierung von immobilisiertem Apothermolysin in Anwesenheit eines Überschusses des Chelatliganden NOTP nicht möglich. Erst nach Entfernen des Liganden über mehrere Waschschrte kann die Spaltung des lumineszenten Peptids **6** durch das Enzym in Anwesenheit von Zink gemessen werden. Jedoch ist eine Reaktivierung nur bis zu einer Konzentration von 25 nM des Metallions detektierbar, mit gleichzeitiger Wiederherstellung der Aktivität auf ca. 20% des Werts des aktiven immobilisierten Enzyms. Auch der Einsatz anderer Zinksalze wie Zinknitrat und Zinkchlorid brachte keine Verbesserung der Reaktivierung. ^[187]

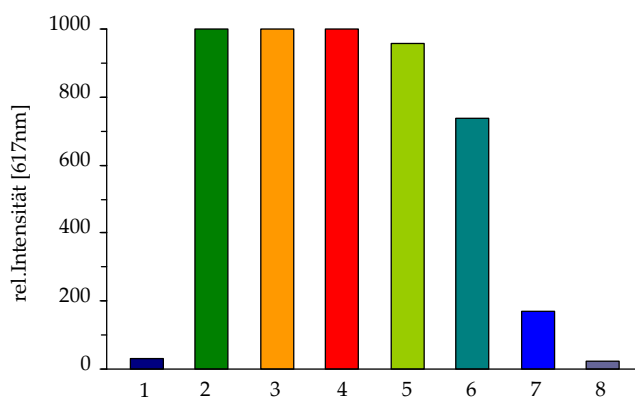


Abb. 64. Untersuchung der Reaktivierung von Thermolysin/Eupergit C[®] (0.57 μM) (inaktiviert mit 2 mM NOTP über zwei Tage, 4 °C mit ZnSO_4 und Peptid **6** (50 μM)). (1) Apoenzym (2) aktives immobilisiertes Enzym (3) 2 μM Zn (4) 1 μM Zn (5) 500nM Zn (6) 50 nM Zn (7) 25 nM Zn (8) 10 nM Zn ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$, PMT-Spannung 700 V).

3.5.3.5 Nachweis von DNA durch enzymatische Signalamplifikation

Trotz der unvollständigen Reaktivierung des immobilisierten Enzyms bei Zugabe geringer Mengen Zink wurde die enzymatische Signalkaskade, ausgelöst durch eine Ziel-DNA, untersucht. Dazu wurden die zu prüfende DNA sowie die zweifach mit Terpyridin modifizierte DNA-Sonde (Tpy₂DNA) zunächst mit 0.75 Äquivalenten Zink hybridisiert. Im Falle der komplementären DNA bildet sich ein starres Hybrid aus, welches mit Zink keinen Ring bilden kann, während mismatch DNA die Ringbildung mit Zink ermöglicht. Diese Lösung wird zu einer Suspension des inaktivierten Thermolysins gegeben und aufgrund der nur langsamen Reaktivierung am polymeren Träger 20 min inkubiert. Anschließend wird das jeweilige Substrat, Peptid **6** oder MOCAC, zugegeben und erneut 20 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Suspension wurde über Spritzenfilter abfiltriert und am Fluorimeter untersucht (**Abb. 65**).

Mit mismatch DNA steigt das Signal im Vergleich zu einer Blindprobe nur um etwa das sechsfache, während die Zugabe komplementärer DNA einen 140-fachen Fluoreszenzanstieg bewirkt. Hierfür wurden 1 µM Target-DNA mit 750 nM Zink benötigt. Der Ersatz von Peptid **6** durch das fluoreszente Peptidsubstrat MOCAC machte auch hier den Vorteil der zeitaufgelösten Messtechnik der Lanthanidkomplexe gegenüber Fluoreszenzfarbstoffen deutlich. Zwar ist auch durch MOCAC ein eindeutiger Fluoreszenzanstieg mit komplementärer DNA zu beobachten, jedoch ist das Hintergrundsignal sehr viel größer, was eine nur zwölffache Verstärkung des Signals für komplementäre DNA und eine zweifache Verstärkung für mismatch DNA zur Folge hat.

Ein weiterer Grund für das geringe Hintergrundsignal des lumineszenten Peptids **6** liegt in der Lipophilie des Quenchers und der durch die Spaltung entstehenden Peptidfragmente. Häufig kann ein Quencher bei hohen Konzentrationen einen Fluoreszenzfarbstoff auch nach Trennung der kovalenten Verknüpfung löschen und so das Signal vermindern. Bei der Spaltung des Peptids **6** entsteht ein BHQ-Peptid-Fragment, welches aufgrund fehlender Lysinbausteine in Wasser nicht mehr löslich ist und sich im Laufe der Enzymreaktion als blauer Niederschlag abscheidet. Durch Abfiltrieren der Enzymsuspension wird parallel dazu also auch ein Teil des Quenchers abgetrennt, was die Konzentrationseffekte in Lösung verhindert. Der Niederschlag könnte allerdings auch dazu führen, dass der polymere Träger und mit ihm Thermolysin derart bedeckt werden, dass eine kontinuierliche enzymatische Reaktion beeinträchtigt wird.

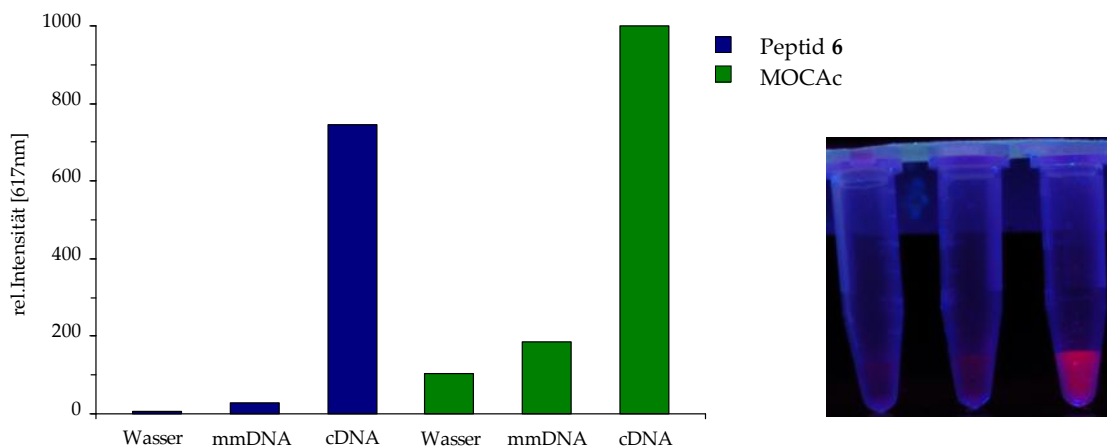


Abb. 65. Fluorimetrische Detektion von DNA über enzymatische Amplifikation des Signals. Im Vergleich **Peptid 6** und **MOCAC** (je $50 \mu\text{M}$) mit Thermolysin/Eupergit C[®] ($0.57 \mu\text{M}$) und Wasser, mmDNA ($1 \mu\text{M}$) und cDNA ($1 \mu\text{M}$), zudem mit je 0.75 nM Zn und $1 \mu\text{M}$ DNA-Sonde ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$, PMT-Spannung 700 V). Das Photo zeigt den DNA-Nachweis mit **Peptid 6** unter UV-Licht.

Die Spaltung der lumineszenten Peptide lässt sich auch durch Lebensdauer-messungen deutlich nachweisen. Während eine Lebensdauer-messung der intakten Peptide unter diesen Bedingungen aufgrund der Geräteauflösung nicht möglich war, zeigten die gespaltenen Peptide Lebensdauern zwischen 0.7 ms und 2 ms (**Abb. 66.**). Aufgrund der wenig empfindlichen Reaktivierung des immobilisierten Thermolysins war der DNA-Nachweis nur bis Konzentrationen von ca. 60 nM möglich, mit einem Signal/Rauschverhältnis von zwei für komplementäre DNA und ca. eins für mismatch DNA.

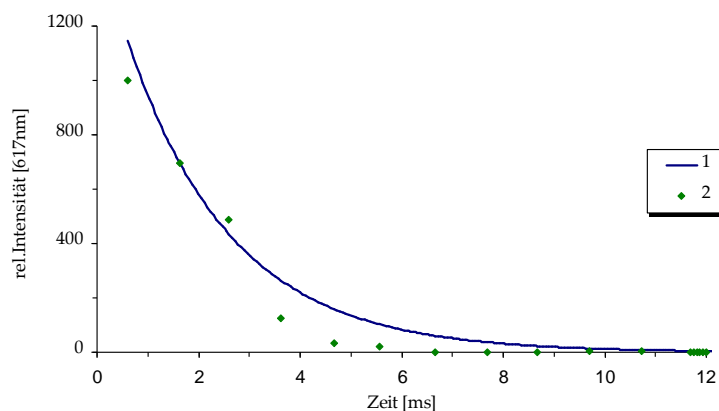


Abb. 66. Lebensdauer-messung des durch Thermolysin/Eupergit C[®] ($0.57 \mu\text{M}$) gespaltenen **Peptid 6** ($50 \mu\text{M}$) in Wasser, nach 30 min , mit $\tau \sim 2 \text{ ms}$. (1) Berechnete Kurve (monoexponentiell) (2) Aufgenommene Messpunkte ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, Delay Time 0.1 ms , PMT-Spannung 850 V).

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue Lanthanidsonden für die empfindliche Detektion von Nucleinsäuren und Enzymen durch zeitaufgelöste Lumineszenzmessungen entwickelt.

Mit der Entwicklung eines auf Lanthaniden basierenden fluorogenen Peptidsubstrats war es möglich durch Messungen der langlebigen Lanthanidlumineszenz, eine Metalloendoprotease wie Thermolysin sehr empfindlich zu detektieren. Im funktionalisierten Peptidsubstrat wird die Lumineszenz eines Lanthanidkomplexes durch einen Bis-Azo-Farbstoff (Black Hole Quencher-2) vollständig gelöscht. Die enzymatische Spaltung des Substrats führt zu einer räumlichen Trennung von Komplex und Quencher und so zu einem deutlichen Signalanstieg (**Abb. 67**). Auf diese Weise konnten bis zu 50 pM (3.5 fmol) Thermolysin mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von 8.4 nachgewiesen werden. Ein käufliches fluorogenes Peptidsubstrat mit organischem Fluorophor zeigt bei diesen Konzentrationen kein Signal.

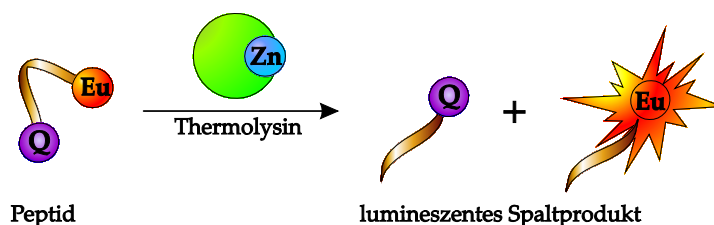


Abb. 67. Schematische Darstellung des Thermolysin-nachweises.

Lumineszierende Lanthanidkomplexe wurden darüber hinaus zur Detektion von DNA eingesetzt.

In einem ersten Ansatz wurden verschiedene Peptidnucleinsäuren entwickelt, die an beiden Termini mit Chelatoren modifiziert sind. Die Wechselwirkung mit komplementärer DNA führt zu einer allosterischen Destabilisierung eines zuvor gebildeten PNA-Lanthanidrings, wodurch das Metallion freigesetzt wird. Dieses kann mit verschiedenen Sensitizern detektiert werden (**Abb. 68**). In Anwesenheit von komplementärer DNA erhöht sich das Lumineszenzsignal. Mit diesem Verfahren war es möglich bis zu 250 nM DNA zu detektieren. Die Empfindlichkeit dieses Nachweissystems wurde jedoch möglicherweise durch die erhöhte Aggregation der mit Polyaminocarboxylaten modifizierten PNA-Konjugate und des daraus resultierenden geringen prozentualen Anteils an freiem Konjugat bei kleinen Konzentrationen begrenzt.

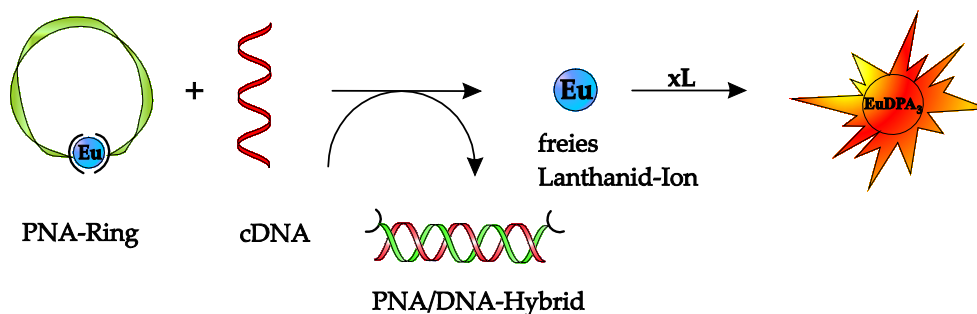


Abb. 68. Nachweis von DNA durch allosterische Umwandlung in ein Lanthanidion.

In einem zweiten Ansatz diente ein DNA-Zink-Konjugat (L_2DNA)Zn als Primärrezeptor für eine komplementäre Target-DNA (Primärsignal). Auch hier wird das Metallion durch Hybridisierung freigesetzt, jedoch anschließend nicht direkt, sondern indirekt über die Aktivität eines Zn^{2+} -Cofaktor abhängigen Enzyms detektiert. Die Signalamplifikation erfolgte katalytisch durch das zinkabhängige Enzym Thermolysin, welches aus Gründen der Stabilität und Handhabbarkeit an Eupergit C[®] immobilisiert wurde. Das zunächst benötigte zinkfreie Apoenzym wurde am festen Träger durch Inkubation mit dem Chelatliganden NOTP erhalten. Freigesetztes Zink aktiviert dann als Cofaktor das immobilisierte Apothermolysin, welches durch katalytische Spaltung des zuvor beschriebenen fluorogenen Peptidsubstrats ein starkes Lumineszenzsignal erzeugt (Abb. 69.).

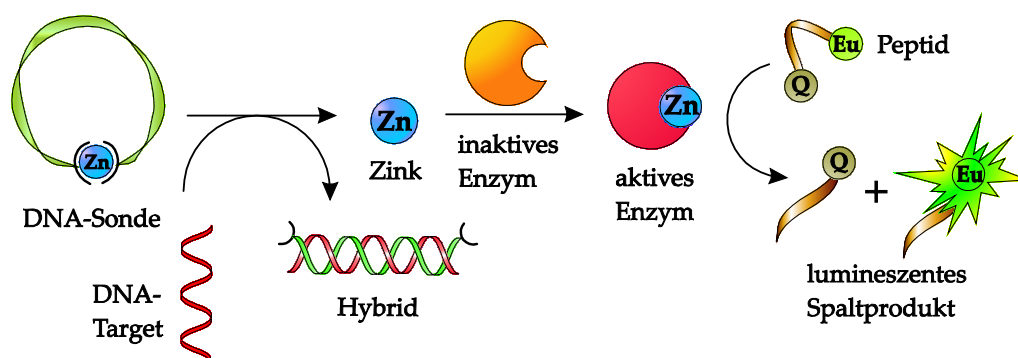


Abb. 69. Nachweis von DNA durch eine zweistufige Signalkaskade.

Basierend auf dieser Kaskade wurde DNA sequenzspezifisch mit einer Nachweisgrenze von ca. 60 nM (4.2 pmol) detektiert, wobei die nur unvollständige und verlangsamte Reaktivierung des immobilisierten Apoenzyms die Empfindlichkeit dieses Nachweissystems begrenzt.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

Die für die Synthesen und Experimente verwendeten Chemikalien wurden von Acros Organics (Geel, Belgien), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Molecular Probes (Invitrogen, Leiden, Niederlande), Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan), Biosearch Technologies (Novato, CA, USA), Macrocylics (Dallas, TX, USA) und Novabiochem (Merck, Darmstadt, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Wasserfreie Lösungsmittel wurden unter Argonatmosphäre über Molekularsieb aufbewahrt. Es wurde, soweit nicht anders angegeben, ausschließlich Wasser von HPLC-Qualität der Firma VWR International (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Reagenzien für die PNA-Synthesen wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Unmodifizierte DNA-Oligonucleotide wurden in HPLC-Reinheit von Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) geliefert. Zum Ansetzen aller Reaktionen bzw. Puffer wurden ausschließlich Plastikspatel bzw. Plastikbechergläser der Firma Semadeni (Ostermündingen, Schweiz) verwendet.

NMR-Messungen wurden am Anorganisch-Chemischen Institut mit einem Bruker AVANCE DPX 200 NMR-, einem Bruker AVANCE II 400 NMR- und einem Bruker AVANCE III 600 NMR-Spektrometer durchgeführt. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma Deutero (Kastellaun, Deutschland) bezogen. Zur Standardisierung der chemischen Verschiebungen wurden die Restwasserstoffsignale der deuterierten Lösungsmittel verwendet.

Die ESI-Massenspektren wurden im Anorganisch-Chemischen Institut an einem Q-ToF Ultima API Massenspektrometer von Micromass/Waters (Milford Massachusetts, USA) und im Organisch-Chemischen Institut an einem Bruker ApexQe Hybrid 9.4 T FT-ICR aufgenommen. Dazu wurden die organischen Moleküle entweder in DMSO bzw. Methanol gelöst und mit Acetonitril bzw. Wasser verdünnt. Die synthetisierten Peptide wurden dazu ausschließlich in Methanol gelöst und mit Wasser verdünnt.

Die MALDI-TOF Massenspektren wurden an einem Bruker BIFLEX III Spektrometer aufgenommen. Zur Analyse der synthetisierten PNA-Konjugate wurde als Matrix eine Lösung von 50 mM Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) in Acetonitril:Methanol:Wasser = 1:1:1 mit 1% Trifluoressigsäure verwendet. Die zu untersuchende Probe (1 μ l) wurde auf den Träger gegeben und mit der Matrix im Verhältnis 1:2 vermischt. Für die TFA/*m*-Cresol-Lösungen (4:1) wurden Probe und Matrix im Verhältnis 1:20 vermischt. DNA-Proben wurden mit einer Matrix aus 0.1 M wässriger Diammoniumhydrogencitratlösung und einer gesättigten 6-Aza-2-thiothymidinlösung in Acetonitril im Verhältnis 1:2 gemessen. Die zu unter-

suchenden Proben wurden im Verhältnis Probe/Matrix 1:2 gemischt. Peptidproben wurden mit einer gesättigten Lösung aus α -Cyano-4-hydroxymethylsäure als Matrix in Acetonitril:Wasser im Verhältnis 1:1 mit 0.3 % TFA gemessen. Die Genauigkeit der MALDI-TOF MS Untersuchungen mit externer Kalibrierung betrug $\pm 0.1\%$ der Molekülionennasse.

Die HPLC-Aufreinigung der PNA-Konjugate erfolgte bei 49 °C an einem Shimadzu Flüssigkeitschromatographen, der mit einem UV-Detektor und einem Säulenofen ausgerüstet war. Als Säule wurde eine Nucleosil C4 Säule (250 x 4.6 mm) der Firma Machery-Nagel mit einem Gradienten von Acetonitril (0.1 % TFA, Lösungsmittel B) in Wasser (0.1 % TFA, Lösungsmittel A) verwendet: in 35 min 0 - 35 % B, in 10 min 35 - 90 % B und 10 min 90 % B. Das Injektionsvolumen betrug 300 μ l.

Die Aufreinigung der Peptidkonjugate erfolgte am European Molecular Biology Laboratory Heidelberg (EMBL) an einem LCMS-System von Shimadzu mit einer 500 μ l Injektionsschleife. Als Säule wurde eine Nucleodur 100-5 C18 Säule (260 x 4 mm) der Firma Machery-Nagel mit einem Gradienten von Acetonitril (0.05 % TFA, Lösungsmittel B) in Wasser (0.05 % TFA, Lösungsmittel A) verwendet.

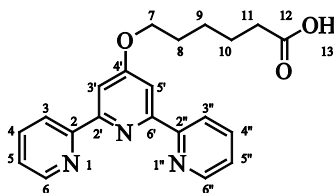
Die UV/Vis-Untersuchungen wurden an einem Varian Cary 100 Bio UV-Vis Spektrophotometer durchgeführt. Dabei wurden sowohl schwarzwandige Quarz-Semimikroküvetten (0.9 ml) der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland), als auch Kunststoff-UV-Mikroküvetten der Firma Brand (Wertheim, Deutschland) verwendet. Die Schichtdicke betrug jeweils 1 cm.

Die Fluoreszenzspektren wurden an einem Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrophotometer aufgenommen, wobei Ultra-Mikroküvetten (50 μ l) der Firma Hellma (Müllheim, Deutschland) verwendet wurden.

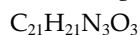
Zur Aufbewahrung von PNA- und Peptidkonjugaten bei -20 °C sowie für das Arbeiten mit Apothermolysin wurden Low-Retention Reaktionsgefäße (0.6 ml und 1.7 ml) der Firma Kisker (Steinfurt, Deutschland) verwendet, ansonsten kamen Safe Lock Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) zum Einsatz. Zur Durchmischung von Lösungen wurde ein Reax Control der Firma Heidolph bzw. der Thermomixer Comfort der Firma Eppendorf verwendet. Reaktionslösungen wurden mit der Biofuge Pico von Heraeus (Hanau, Deutschland) zentrifugiert. Wässrige Peptid-, PNA- und Oligonucleotidlösungen wurden bis zur Trockene mit einem Gefriertrockner VaCo 5 der Firma Zirbus (Bad Grund, Deutschland) eingengt. Zum Abfiltrieren des an Eupergit C[®] gebundenen Enzyms wurden Minisart-RC Aufsatzfilter der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, Deutschland) verwendet. Soweit nicht anders angegeben wurde Zink(II) als ZnSO₄ und Europium(III) als EuCl₃ eingesetzt.

5.2 Synthese der organischen Moleküle

2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy-hexansäure ^[92,93]



Verbindung 1



$$M = 363.41 \text{ g/mol}$$

Durchführung

In einem Schlenkkolben wird fein gemörseretes KOH (130.5 mg, 2.4 mmol) vorgelegt und im Vakuum unter leichter Erwärmung getrocknet. Dazu wird DMSO (20 ml) gegeben und die Suspension auf 60 °C erhitzt. Nach Zugabe von ϵ -Caprolacton (55.4 μl , 0.5 mmol) wird die Reaktionsmischung weitere 30 min bei 60 °C gerührt. Im Argongegenstrom wird 4'-Chloro-2,2':6',2''-terpyridin (133.9 mg, 0.5 mmol) hinzugefügt und die Reaktionslösung 48 h bei 60 °C gerührt. Danach wird das Gemisch auf 200 ml Wasser gegeben und Salzsäure (1 M) bis zur Erkennung einer Trübung zugetropft. Die vollständige Niederschlagsbildung wird 5 min unter Rühren abgewartet und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Dies wird solange wiederholt, bis sich keine Trübung mehr einstellt. Man erhält 150 mg (0.4 mmol) eines weißen Feststoffes, was einer Ausbeute von 82 % entspricht.

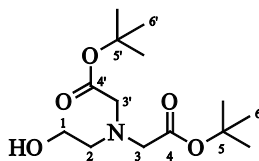
Analytik

MS [ESI] [m/z]

[M+H]⁺: berechnet: 364.16 gefunden: 364.14

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO) [ppm]:

$\delta = 1.44 - 1.64$ (m, 4H, H9/H10), $1.78 - 1.84$ (m, 2H, H8), 2.26 (t, 2H, H11, ³J = 7.2 Hz), 4.24 (t, 2H, H7, ³J = 6.8 Hz), 7.50 (ddd, 2H, H5/H5'', ³J = 6.0 Hz, ³J = 4.8 Hz, ⁴J = 1.8 Hz), 7.96 (s, 2H, H3'/H5'), 8.01 (dt, 4H, H4/H4'', ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.8 Hz), 8.62 (d, 2H, H6/H6'', ³J = 8.0 Hz), 8.71 (d, 2H, H3/H3'', ³J = 3.8 Hz).

***N,N*-Di-[(*tert*-butoxycarbonyl)methyl]-2-ethanolamin** ^[96]

Verbindung 2

C₁₄H₂₇NO₅

M = 289.19 g/mol

Durchführung

Bromessigsäure-*tert*-butylester (15.4 ml, 102.6 mmol) wird in 100 ml absolutem DMF gelöst, dann DIEA (19.6 ml, 114.6 mmol) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Über einige Minuten wird Ethanolamin (2.8 ml, 45.6 mmol) zugetropft und weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird auf RT erwärmt und über Nacht bei dieser Temperatur gerührt. Der dabei entstandene weiße Feststoff wird abfiltriert, das Filtrat mit 400 ml Wasser versetzt und diese Lösung unter vermindertem Druck eingeeengt. Der gelbliche Rückstand wird in 100 ml Wasser aufgenommen, wobei sich zwei Phasen bilden. Die wässrige Phase wird mit NaCl gesättigt, filtriert und drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zwei Mal mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 10.5 g (36.2 mmol) eines gelblichen Öls, was einer Ausbeute von 80 % entspricht.

Analytik**MS [ESI] [m/z]**

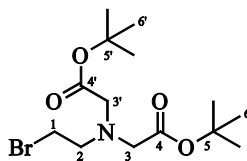
[M+H]⁺: berechnet: 290.19 gefunden: 290.17

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]

δ = 1.45 (s, 18H, H6/H6'), 2.87 (t, 2H/H2, ³J = 5.2 Hz), 3.43 (s, 4H, H3/H3'), 3.51 (t, 2H, H1, ³J = 5.0 Hz).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) [ppm]

δ = 28.1 (C6/C6'), 56.2 (C1), 57.1 (C2), 59.3 (C3/C3'), 81.5 (C5/C5'), 171.4 (C4/C4').

***N,N*-Di-[(*tert*-butoxycarbonyl)methyl]-2-bromethylamin** ^[97]

Verbindung 3
 $C_{14}H_{26}BrNO_4$
 $M = 351.10 \text{ g/mol}$

Durchführung

Verbindung 2 (10.5 g, 36.2 mmol) wird in 46 ml Dichlormethan gelöst, mit Triphenylphosphin (7.5 g, 28.7 mmol) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Zur farblosen Lösung wird über 10 min *N*-Bromsuccinimid (5.1 g, 28.7 mmol) zugegeben und weitere 1.5 h bei 0 °C gerührt, wobei sich die Lösung blass orangerot verfärbt. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man einen rötlich öligen Rückstand, der im Vakuum zu einem rosafarbenen Feststoff kristallisiert. Daraus wird das Produkt durch mehrmaliges Versetzen mit Diethylether extrahiert, wobei sich das Produkt mit gelblicher Farbe löst. Der getrocknete gelbliche Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Hexan/Ether 5:1, $R_f = 0.3$). Man erhält 8.2 g (23.4 mmol) eines farblosen Öls, was einer Ausbeute von 65 % entspricht.

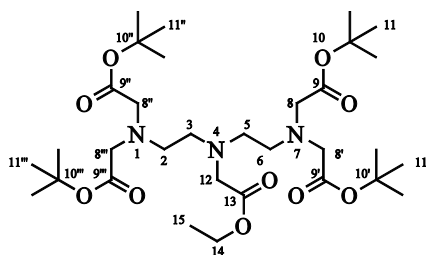
Analytik**MS [ESI] [m/z]**

$[M+H]^+$: berechnet: 352.11 gefunden: 352.03

 1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$) [ppm]

$\delta = 1.42$ (s, 18H, H6/H6'), 3.11 (t, 2H, H2, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$), 3.42 (t, 2H, H1, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$), 3.46 (s, 4H, H3/H3').

4-(Acetylethylester)-1,4,7-triazaheptan-1,1,7,7-tetraacetyl-*tert*-butylester ^[98]



Verbindung 4

C₃₂H₅₉N₃O₁₀

M = 645.42 g/mol

Durchführung

Verbindung 3 (6.0 g, 17.1 mmol) wird unter Argon in 128 ml Acetonitril gelöst und mit Glycinethylesterhydrochlorid (1.2 g, 8.5 mmol) versetzt. Zur trüben Lösung wird nun Natriumcarbonat (4.5 g, 170.4 mmol) zugegeben und die Suspension 24 h bei 82 °C refluxiert. Der dabei entstandene Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das gelbliche, zum Teil auskristallisierende Öl wird in 170 ml Dichlormethan aufgenommen und drei Mal mit 70 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 95:5, R_f = 0.5). Man erhält 4.4 g (6.8 mmol) eines gelben Öls, was einer Ausbeute von 40% entspricht.

Analytik

MS [ESI] [m/z]

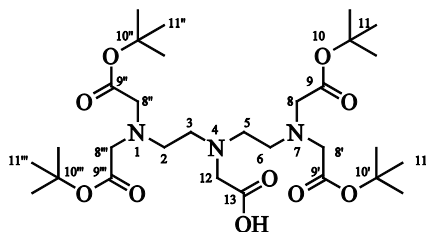
[M+H]⁺: berechnet: 646.43 gefunden: 647.10

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]

δ = 1.23 (t, 3H, H15, ³J = 7.2 Hz), 1.42 (s, 36H, H11/H11'/H11''/H11'''), 2.78 (s, 8H, H2/H3/H5/H6), 3.41 (s, 8H, H8/H8'/H8''/H8'''), 3.47 (s, 2H, H12), 4.11 (q, 2H, H14, ³J = 7.0 Hz).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) [ppm]

δ = 14.2 (C15), 28.1 (C11/C11'/C11''/C11'''), 52.3 (C3/C5), 52.9 (C2/C6), 55.0 (C12), 56.1 (C8/C8'/C8''/C8'''), 60.1 (C14), 80.8 (C10), 170.6 (C9/C9'/C9''/C9'''), 171.6 (C13).

4-(Methylcarbonsäure)-1,4,7-triazaheptan-1,1,7,7-tetraacetyl-*tert*-butylester ^[96]


Verbindung 5



$$M = 617.39 \text{ g/mol}$$
Durchführung

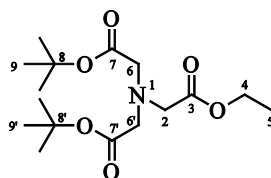
Es werden 431.3 mg von Verbindung 4 (668.2 μmol) in 42.5 ml Methanol sowie in 42.5 ml einer 0.1 M Natronlauge gelöst und 4 h bei RT gerührt. Die gelbliche Lösung wird mit Dowex[®]-Ionentauscher in Pyridiniumform neutralisiert, das Harz abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Die erhaltene Lösung wird eingeeignet und je drei Mal mit Methanol (40 ml) und Toluol (40 ml) coevaporiert. Nach Trocknen im Vakuum erhält man 410.5 mg (664.8 μmol) eines farblosen Öls, was einer Ausbeute von 96 % entspricht.

Analytik
HR-MS [ESI] [m/z]

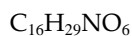
[M+H]⁺: berechnet: 618.3966 gefunden: 618.3961

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) [ppm]

$\delta = 1.43$ (s, 36H, H11/H11'/H11''/H11'''), 2.91 (s, 8H, H2/H3/H5/H6), 3.33 (s, 2H, H12), 3.42 (s, 8H/H8/H8'/H8''/H8''').

Bis-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylmethyl)-aminoessigsäureethylester ^[96]

Verbindung 6



$$M = 331.40 \text{ g/mol}$$
Durchführung

Glycinethylesterhydrochlorid (0.8 g, 6.0 mmol) wird in DMF (30 ml) und DIEA (6.2 ml, 35.4 mmol) gelöst. Anschließend wird Bromessigsäure-*tert*-butylester (8.9 ml, 60.2 mmol) zugegeben und die Reaktionslösung 60 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Ethylacetat versetzt und mit destilliertem Wasser, 10%-iger NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen (je 50 ml). Das Produkt wird mit Dichlormethan aus den wässrigen Phasen extrahiert, die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum getrocknet. Das gelbliche Öl wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , 2% EtOH/DCM, $R_f = 0.3$). Man erhält 1.8 g (5.3 mmol) eines farblosen Öls, was einer Ausbeute von 88% entspricht.

Analytik**MS [ESI] [m/z]**

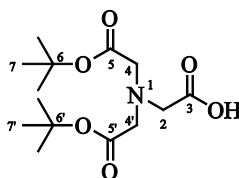
$[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet: 332.20 gefunden: 332.21

 ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3) [ppm]

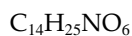
$\delta = 1.26$ (t, 3H, H5, $^3J = 7.1$ Hz), 1.45 (s, 18H, H9/H9'), 3.54 (s, 4H, H6/H6'), 3.63 (s, 2H, H2), 4.17 (q, 2H, H4, $^3J = 7.2$ Hz).

 ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3) [ppm]

$\delta = 14.2$ (C5), 28.1 (C9/C9'), 55.0 (C2), 55.9 (C6/C6'), 60.6 (C4), 81.2 (C8/C8'), 170.1 (C7/C7'), 171.0 (C3).

Bis-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylmethyl)-aminoessigsäure [96]

Verbindung 7



$$M = 303.35 \text{ g/mol}$$

Durchführung

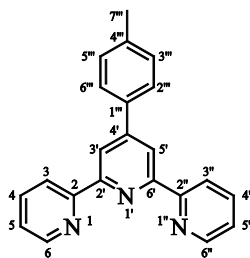
Verbindung 6 (42.5 mg, 128.2 μmol) wird in Methanol (8 ml) und Natronlauge (8 ml, 0.1 M) gelöst und 4 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Dowex[®]-Ionentauscher in Pyridiniumform neutralisiert, das Harz abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Die erhaltene Lösung wird eingeeengt und je drei Mal mit Methanol (20 ml) und Toluol (20 ml) coevaporiert. Nach Trocknen im Vakuum erhält man 27.1 mg (89.4 μmol) eines gelben Öls, was einer Ausbeute von 71 % entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

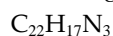
[M+Na]⁺: berechnet: 326.1580 gefunden: 326.1576

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

$\delta = 1.39$ (s, 18H, H7/H7'), 2.93 (s, 2H, H2), 3.42 (s, 4H, H4/H4').

4'-(4-Methylphenyl)-2,2':6',2''-terpyridin ^[99]

Verbindung 8



$$M = 323.14 \text{ g/mol}$$
Durchführung

Zu einer Lösung von *p*-Tolylaldehyd (4.7 ml, 40.0 mmol) in 200 ml Ethanol werden 2-Acetylpyridin (8.9 ml, 80.0 mmol) sowie KOH (6.2 g, 80.0 mmol) und 116 ml Ammoniumhydroxidlösung (25 %) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Der entstandene blass-grüne Niederschlag wird abfiltriert und aus Chloroform/Methanol umkristallisiert. Man erhält 5.4 g (16.7 mmol) farbloser Kristalle, was einer Ausbeute von 42 % entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

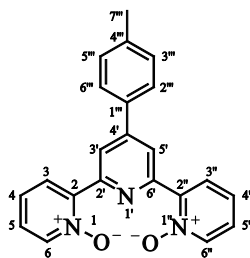
[M+H]⁺: berechnet: 324.1501 gefunden: 325.1587

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]

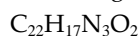
$\delta = 2.43$ (s, 3H, H7''), 7.32 (dd, 2H, H3'''/H5''', ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 7.34 (dt, 2H, H5/H5'', ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 7.83 (dd, 2H, H2'''/H6''', ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.88 (dt, 2H, H4/H4', ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 8.67 (dd, 2H, H6/H6'', ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 8.73 (dd, 2H, H3/H3', ³J = 6.6 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 8.74 (s, 2H, H3'/H5').

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) [ppm]

$\delta = 21.3$ (C7'''), 118.6 (C3'/H5'), 121.4 (C3/C3'), 123.8 (C5/C5''), 127.2 (C2'''/C6'''), 129.6 (C3'''/C5'''), 135.5 (C4'''), 136.9 (C4/C4'), 139.1 (C1'''), 149.1 (C6/C6''), 150.2 (C4'), 155.8 (C2/C2''), 156.3 (C2'/C6').

4'-(4-Methylphenyl)-2,2':6',2''-terpyridin-*N,N''*-dioxid ^[103,104]

Verbindung 12



$$M = 355.13 \text{ g/mol}$$
Durchführung

Verbindung 8 (2.1 g, 6.4 mmol) wird in 129.5 ml Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von *m*-Chlorperbenzoesäure (Gehalt: 77%) (4.2 g, 24.5 mmol) wird die Reaktionslösung über Nacht bei RT gerührt. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und die gelbliche Lösung in zwei Schritten mit 10%-iger Na₂CO₃-Lösung und Wasser (je 84 ml) ausgeschüttelt. Der dabei entstehende Niederschlag wird abfiltriert, die organischen Phasen vereinigt und unter vermindertem Druck eingengt. Die vereinten Niederschläge werden aus Acetonitril/Methanol umkristallisiert, und man erhält 1.5 g (4.2 mmol) eines farblosen Feststoffes, was einer Ausbeute von 66% entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

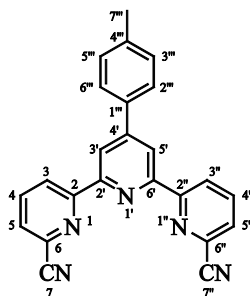
[M+H]⁺: berechnet: 356.1399 gefunden: 356.1410

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

δ = 2.39 (s, 3H, H7'''), 7.39 (d, 2H, H3'''/H5''', ³J = 8.0 Hz), 7.51 (d, 2H, H2'''/H6''', ³J = 9.0 Hz), 7.52 (t, 2H, H4/H4'', ³J = 3.0 Hz), 7.72 (d, 2H, H6/H6'', ³J = 8.2 Hz), 8.23 (t, 2H, H5/H5'', ³J = 5.8 Hz), 8.42 (dd, 2H, H3/H3'', ³J = 5.4 Hz, ⁴J = 3.0 Hz), 9.05 (s, 2H, H3'/H5').

¹³C-NMR (50 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

δ = 20.8 (C7'''), 122.5 (C5/C5''), 125.5 (C3'/C5'), 126.4 (C3/C3''), 126.7 (C4/C4''), 127.8 (C2'''/C6'''), 129.9 (C3'''/C5'''), 134.2 (C4'''), 139.2 (C6/C6''), 140.4 (C1'''), 145.8 (C2/C2'), 147.2 (C4'), 150.0 (C2'/C6').

4'-(4-Methylphenyl)-2,2':6',2''-terpyridin-6,6''-dinitril ^[103,104]


Verbindung 13



$$M = 373.13 \text{ g/mol}$$
Durchführung

Verbindung **12** (1.2 g, 3.5 mmol) wird in 26.2 ml Dichlormethan suspendiert und Trimethylsilylcyanid (2.1 ml, 16.8 mmol) zugegeben. Anschließend wird Benzoylchlorid (2.1 ml, 18.3 mmol) über einen Zeitraum von 20 min zur Reaktionslösung zugetropft, wobei mit einem Wasserbad gekühlt wird. Die weiße Suspension wird 3 h bei RT gerührt und anschließend über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Der entstandene weiße Niederschlag wird abfiltriert, getrocknet und aus Dioxan umkristallisiert. Man erhält 1.2 g (3.2 mmol) eines weißen Feststoffes, was einer Ausbeute von 93 % entspricht.

Analytik
HR-MS [ESI] [m/z]

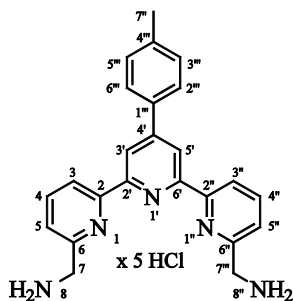
[M+H]⁺: berechnet: 374.1406 gefunden: 374.1372

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

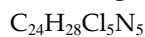
$\delta = 2.42$ (s, 3H, H7'''), 7.42 (d, 2H, H3'''/H5''', ³J = 8.0 Hz), 7.87 (d, 2H, H2'''/H6''', ³J = 8.0 Hz), 8.18 (dd, 2H, H5/H5'', ³J = 7.2 Hz, ⁴J = 0.8 Hz), 8.29 (t, 2H, H4/H4'', ³J = 8.0 Hz), 8.65 (s, 2H, H3'/H5'), 8.95 (dd, 2H, H3/H3'', ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 0.8 Hz).

¹³C-NMR (50 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

$\delta = 20.8$ (C7'''), 117.4 (C7/C7''), 118.7 (C3'/C5'), 124.9 (C5/C5''), 126.8 (C2'''/C6'''), 129.4 (C3/C3''), 129.9 (C3'''/C5'''), 132.3 (C4'''), 133.7 (C6/C6''), 139.3 (C4/C4''), 139.5 (C1'''), 149.92 (C4'), 153.8 (C2'/C6'), 156.1 (C2/C2'').

6,6''-Bis-(aminomethyl)-4'-(4-methylphenyl)-2,2':6',2''-terpyridin ^[103,104]

Verbindung 14



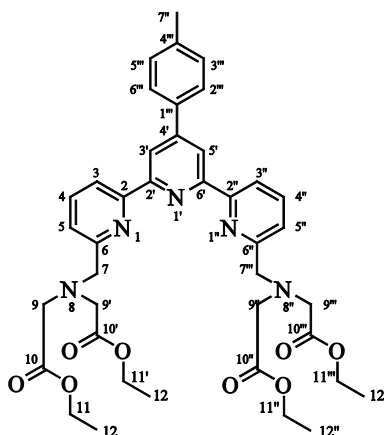
$$M = 561.08 \text{ g/mol}$$
Durchführung

Verbindung 13 (0.7 g, 1.8 mmol) wird in 13.4 ml trockenem THF suspendiert und 40 min mit Argon entgast. Danach werden 22.1 ml (22.1 mmol, 1 M) $\text{BH}_3 \times \text{THF}$ -Komplex langsam zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Die nun grau-braune Suspension wird so lange mit Methanol versetzt, bis überschüssig es BH_3 zerstört ist und keine Gasentwicklung zu beobachten ist. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der grünlich-gelbe Rückstand in 26.7 ml methanolischer HCl (1 M) 2 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen der Lösung wird der weiße Niederschlag abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Man erhält 0.6 g (1.1 mmol) des Rohproduktes, was einer Ausbeute von 62% entspricht. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

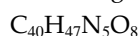
Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

$[\text{M}+\text{H}-5\text{HCl}]^+$: berechnet: 382.2032 gefunden: 382.2031

**6,6''-Bis-[N,N-bis-(ethoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-4'-(4-methylphenyl)-
2, 2':6',2''-terpyridin** ^[103,104]



Verbindung 15



M = 725.34 g/mol

Durchführung

Verbindung 14 (0.6 g, 1.1 mmol) wird in trockenem Acetonitril (19.6 ml) suspendiert, und nacheinander DIEA (5.6 ml, 31.9 mmol) sowie Bromessigsäureethylester (0.9 ml, 5.9 mmol) zugetropft. Die grünliche Lösung wird 24 h unter Rückfluss gerührt, wobei sie sich gelb färbt. Anschließend wird die Reaktionslösung abgekühlt und mit einer Mischung aus Dichlormethan (50 ml) und gesättigter Na_2CO_3 -Lösung (50 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird zwei Mal mit HPLC-Wasser (50 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das braune Öl wird säulen chromatographisch gereinigt (SiO_2 , Petrolether/Ethylacetat/Triethylamin 9:5:1, $R_f = 0.6$). Man erhält 0.5 mg (0.7 mmol) eines gelben Öls, was einer Ausbeute von 63 % entspricht.

Analytik

HR-MS [ESI] [m/z]

$[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet: 726.3503 gefunden: 726.3478

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) [ppm]

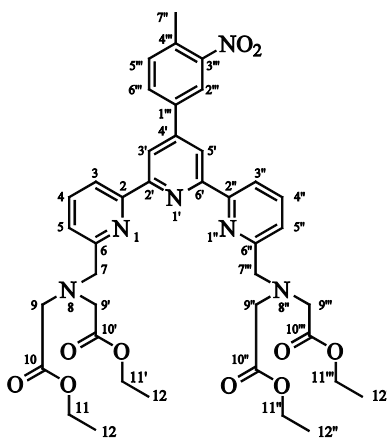
$\delta = 1.23$ (t, 12H, H12/H12'/H12''/H12''', $^3J = 7.2$ Hz), 2.44 (s, 3H, H7'''), 3.70 (s, 8H, H9/H9'/H9''/H9'''), 4.16 (quart., 8H, H11/H11'/H11''/H11''', $^3J = 7.2$ Hz), 4.19 (s, 4H, H7/H7'), 7.33 (d, 2H, H5/H5'', $^3J = 7.8$ Hz), 7.62 (d, 2H, H5'''/H3''', $^3J = 7.2$ Hz), 7.79

(d, 2H, H6'''/H2''', $^3J = 7.2$ Hz), 7.85 (t, 2H, H4/H4'', $^3J = 7.8$ Hz), 8.54 (d, 2H, H3/H3'', $^3J = 7.8$ Hz), 8.70 (s, 2H, H3'/H5').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) [ppm]

$\delta = 14.3$ (C12/C12'/C12''/C12'''), 21.4 (C7'''), 55.1 (C9/C9'/C9''/C9'''), 60.1 (C11/C11'/C11''/C11'''), 60.6 (C7/C7''), 118.7 (C3'/C5'), 119.8 (C5/C5''), 123.2 (C3/C3''), 127.2 (C2'''/C6'''), 129.7 (C3'''/C5'''), 136.0 (C4'''), 137.6 (C4/C4''), 139.0 (C1'''), 150.1 (C4'), 155.6 (C2'/C6'), 156.0 (C6/C6''), 158.3 (C2/C2''), 171.4 (C10/C10'/C10''/C10''').

6,6''-Bis-[N,N-bis-(ethoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-4'-(4-methyl-3-nitrophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin ^[103,104]



Verbindung 16

$\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{10}$

$M = 770.33$ g/mol

Durchführung

442.5 mg (0.61 mmol) von Verbindung 15 werden in 18.6 ml konz. H_2SO_4 gelöst und die gelbe Lösung auf 5°C gekühlt. Nach Zugabe von 25.3 μl rauchender HNO_3 (0.6 mmol) wird bei gleicher Temperatur 30 min gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf Eis gegeben und zunächst mit 10 %-iger, dann mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung und zuletzt mit festem Na_2CO_3 neutralisiert. Das in Form von braunen Schlieren auf der wässrigen Phase schwimmende Produkt wird mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Man erhält 0.4 mg (0.5 mmol) eines braun gelben Öls, was einer Ausbeute von 88 % entspricht.

Analytik

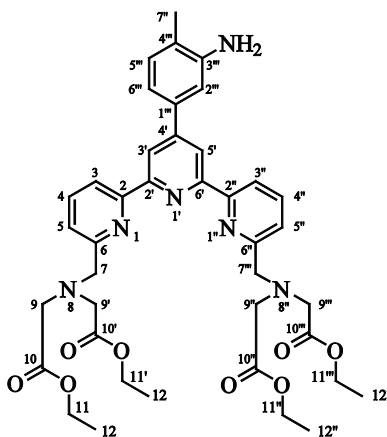
HR-MS [ESI] [m/z]

[M+H] ⁺ :	berechnet: 771.3354	gefunden: 771.3355
[M+Na] ⁺ :	793.3173	793.3171

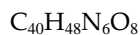
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) [ppm]

δ = 1.24 (t, 12H, H12/H12'/H12''/H12''', ³J = 7.2 Hz), 2.25 (s, 3H, H7'''), 3.77 (s, 8H, H9/H9'/H9''/H9'''), 4.17 (quart., 8H, H11/H11'/H11''/H11''', ³J = 7.2 Hz), 4.20 (s, 4H, H7/H7''), 7.55 (d, 2H, H5/H5'', ³J = 8.4 Hz), 7.71 (d, 1H, H5''', ³J = 4.8 Hz), 7.97 (t, 2H, H4/H4'', ³J = 7.6 Hz), 8.21 (d, 1H, H6''', ³J = 7.6 Hz), 8.52 (s, 1H, H2'''), 8.60 (d, 2H, H3/H3'', ³J = 6.8 Hz), 8.83 (s, 2H, H3'/H5').

6,6''-Bis-[N,N-bis-(ethoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-4'-(4-methyl-3-aminophenyl)-2, 2':6',2''-terpyridin ^[103,104]



Verbindung 17



M = 740.35 g/mol

Durchführung

Verbindung 16 (0.4 mg, 0.5 mmol) wird in trockenem Ethanol (31 ml) gelöst und die gelbe Lösung auf 60 °C geheizt. Dann werden 1.2 g (5.3 mmol) SnCl₂ × 2H₂O dazugegeben, wobei sich die Lösung rot färbt. Nach 1 h Rühren bei 70 °C wird das Gemisch auf 15 ml eisgekühlte verdünnte H₂SO₄ gegeben und 10 min gerührt. Nach Neutralisation mit 10%-iger NaHCO₃-Lösung und Zugabe von 6.2 g (13.6 mmol) EDTA (in Form seines Natriumsalzes), wird es erneut 1 h bei Raumtemperatur

gerührt. Das Produkt wird mit Dichlormethan aus der wässrigen Phase extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, Petrolether/Ethylacetat/Triethylamin 3:5:1, R_f = 0.7) und man erhält 0.2 mg (0.3 mmol) eines leicht gelben Öls, was einer Ausbeute von 52 % entspricht.

Analytik

HR-MS [ESI] [m/z]

[M+H]⁺: berechnet: 741.3612 gefunden: 741.3613

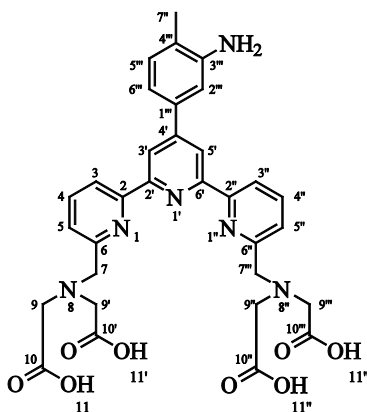
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) [ppm]

δ = 1.24 (t, 12H, H12/H12'/H12''/H12''', ³J = 7.2 Hz), 2.25 (s, 3H, H7'''), 3.72 (s, 8H, H9/H9'/H9''/H9'''), 4.17 (quart., 8H, H11/H11'/H11''/H11''', ³J = 7.2 Hz), 4.20 (s, 4H, H7/H7''), 7.19 (d, 1H, H6''', ³J = 7.6 Hz), 7.25 (d, 1H, H2''', ³J = 1.6 Hz), 7.27 (d, 1H, H5''', ³J = 4.8 Hz), 8.53 (d, 2H, H3/H3'', ³J = 7.6 Hz), 8.70 (s, 2H, H3'/H5'), 7.60 (d, 2H, H5/H5'', ³J = 7.6 Hz), 7.85 (t, 2H, H4/H4'', ³J = 7.6 Hz).

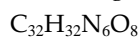
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) [ppm]

δ = 14.2 (C12/C12'/C12''/C12'''), 17.2 (C7'''), 55.0 (C9/C9'/C9''/C9'''), 60.0 (C11/C11'/C11''/C11'''), 60.6 (C7/C7'/C7''/C7'''), 113.5 (C2'''), 117.3 (C6'''), 118.6 (C3'/C5'), 119.7 (C5/C5''), 123.0 (C4'''), 123.3 (C3/C3''), 130.9 (C5'''), 137.3 (C4/C4'), 137.5 (C1'''), 145.2 (C3'''), 150.0 (C4'), 155.6 (C2'/C6'), 155.8 (C6/C6''), 158.1 (C2/C2''), 171.3 (C10/C10'/C10''/C10''').

6,6''-Bis-[N,N-bis-(carboxymethyl)aminomethyl]-4'-(4-methyl-3-aminophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin ^[103,104]



Verbindung 18



M = 628.23 g/mol

Durchführung

Verbindung 17 (187.3 mg, 253.0 μmol) wird in einer Mischung aus Ethanol (22 ml), Wasser (3.7 ml) und KOH (0.3 g, 5.1 mmol) gelöst und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 1M HCl auf pH 1 - 2 eingestellt, wobei sich ein bräunlich-weißer Niederschlag abscheidet. Dieser wird abzentrifugiert, und man erhält 157.5 mg (250.7 μmol) eines hellbraunen Pulvers, was einer Ausbeute von 99 % entspricht. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Analytik

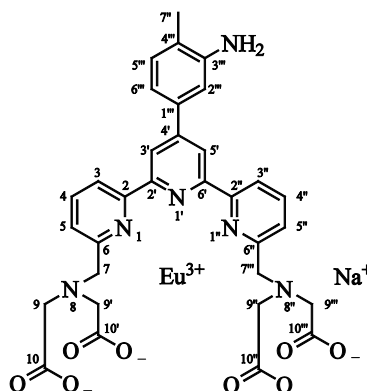
HR-MS [ESI] [m/z]

[M-H]⁻: berechnet: 627.2203 gefunden: 627.2210

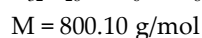
¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

δ = 4.07 (s, 8H, H9/H9'/H9''/H9'''), 4.54 (s, 4H, H7/H7''), 7.48 (d, 1H, H6''', ³J = 8.1 Hz), 7.73 (d, 2H, H5/H5'', ³J = 8.0 Hz), 7.78 (d, 1H, H6''', ³J = 6.8 Hz), 7.96 (s, 1H, H2'''), 8.15 (t, 2H, H4/H4'', ³J = 7.6 Hz), 8.68 (d, 2H, H3/H3'', ³J = 7.7 Hz), 8.75 (s, 2H, H3'/H5').

{6,6''-Bis-[N,N-bis-(carboxymethyl)aminomethyl]-4'-(4-methyl-3-aminophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin} Europium(III) ^[103,104]



Verbindung 19



Durchführung

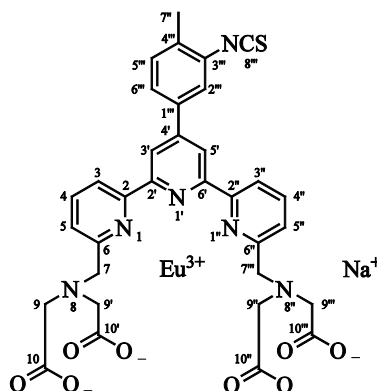
Verbindung 18 (118.7 mg, 188.9 μmol) wird in 4.1 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit verdünnter NaHCO_3 -Lösung auf 6.5 eingestellt. Innerhalb von 15 min wird bei gleichbleibendem pH-Wert eine EuCl_3 -Lösung (73.6 mg, 0.2 mmol in 203 μl Wasser) zugegeben. Die nun gelb orange Lösung wird 1.5 h bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert zwischen 5 und 7 gerührt. Anschließend wird Natronlauge (1 M) bis zu einem pH-Wert von 8.5 zugetropft, wobei sich die Lösung grüngelb färbt und sich ein Niederschlag von $\text{Eu}(\text{OH})_3$ bildet. Dieser wird abzentrifugiert und der Überstand mit kaltem Aceton (10 ml) versetzt. Nach 20 min bei 4 °C bildet sich ein flockig weißer Niederschlag, der abzentrifugiert und mehrmals mit Aceton gewaschen wird. Man erhält 120.5 mg (150.6 μmol) eines weißen Pulvers, was einer Ausbeute von 80% entspricht.

Analytik

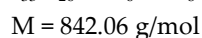
HR-MS [ESI] [m/z]

[M-Na]⁺: berechnet: 777.1186 gefunden: 777.1187

{6,6''-Bis-[N,N-bis-(carboxymethyl)aminomethyl]-4'-(4-methyl-3-isothiocyanatophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin} Europium(III) ^[103,104]



Verbindung 20



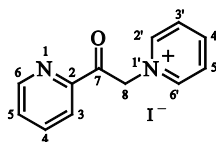
Durchführung

Thiophosgen (37 μl , 0.5 mmol) wird zu einer Mischung aus 3.2 ml Chloroform und NaHCO_3 (49.9 mg, 0.6 mmol) gegeben und 10 min gerührt. Dazu wird Verbindung **19** (106.1 mg, 132.6 μmol), in 3.2 ml Wasser gelöst, über 15 min zugetropft und die nun gelbe Lösung 1 h gerührt. Mit Chloroform (20 ml) wird die wässrige Reaktionslösung von Thiophosgen befreit, die organische Phase mit Wasser (10 ml) ausgeschüttelt und die vereinten wässrigen Phasen bis auf 1 ml unter vermindertem Druck eingengt. Nach Zugabe von Aceton (10 ml, 20 min, 4 °C) wird der entstandene Niederschlag abzentrifugiert, mehrmals mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält 104.3 mg (123.9 μmol) eines weißen Pulvers, was einer Ausbeute von 93 % entspricht.

Analytik

HR-MS [ESI] [m/z]

[M-Na]⁺: berechnet: 819.0751 gefunden: 819.0763

1-(2-Pyridylcarbonylmethyl)pyridiniumiodid [100-102]

Verbindung 9

 $C_{12}H_{11}IN_2O$

M = 326.13 g/mol

Durchführung

Es werden 2-Acetylpyridin (5.6 ml, 50.0 mmol) und Jod (12.7 g, 50.0 mmol) in 30 ml Pyridin gelöst. Die tiefviolette Reaktionslösung wird innerhalb von 1 h auf 70 °C erwärmt und weitere 5 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung abgekühlt und über Nacht bei RT gerührt. Die nun viskose Lösung wird mit 60 ml Toluol versetzt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Dieser wird dann in 200 ml heißem Wasser gelöst und erneut abfiltriert. Das Filtrat wird zur Kristallisation mit 0.1 M $KClO_4$ -Lösung versetzt, der Niederschlag abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Man erhält 10.9 g (33.4 mmol) schwarzer Nadeln, was einer Ausbeute von 67% entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

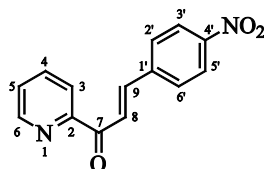
[M-I]⁺: berechnet: 199.0866 gefunden: 199.0865

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

δ = 6.51 (s, 2H, H8), 7.84 (dt, 1H, H5, ³J = 5.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 8.08 (d, 1H, H3, ³J = 7.6 Hz), 8.13 (dt, 1H, H4, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 8.27 (t, 2H, H3', H5', ³J = 7.2 Hz), 8.73 (t, 1H, H4', ³J = 7.6 Hz), 8.88 (d, 1H, H6, ³J = 4.8 Hz), 9.00 (d, 2H, H2'/H6', ³J = 6.8 Hz).

¹³C-NMR (100 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

δ = 66.6 (C8), 122.0 (C3), 127.6 (C5), 129.1 (C5'/C3'), 138.1 (C4), 146.2 (C2'/C6'), 146.3 (C4'), 149.5 (C6), 150.4 (C2), 191.4 (C7).

1-(2-Pyridyl)-3-(4-nitrophenyl)-2-propenon [72]

Verbindung 10

 $C_{14}H_{10}N_2O_3$

M = 254.24 g/mol

Durchführung

4-Nitrobenzaldehyd (4.2 g, 27.7 mmol) wird in einer eisgekühlten KOH-Lösung (1.6 g, 27.7 mmol) aus 55 ml Methanol und 11 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wird 2-Acetylpyridin (3.1 ml, 27.7 mmol) über 10 min zugetropft und die nun orange Reaktionslösung bei 0 °C 3 h gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit kaltem Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man 5.3 g (20.9 mmol) gelber Nadeln, was einer Ausbeute von 76 % entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

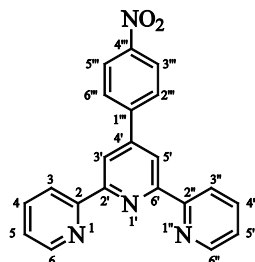
[M+H]⁺: berechnet: 255.0770 gefunden: 255.0795

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) [ppm]

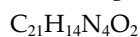
δ = 7.53 (dt, 1H, H5, ³J = 5.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 7.86 (d, 2H, H2'/H6', ³J = 8.4 Hz), 7.90 (dt, 1H, H4, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 7.91 (d, 1H, H8, ³J = 16.4 Hz), 8.20 (d, 1H, H9, ³J = 7.6 Hz), 8.27 (d, 2H, H3'/H5', ³J = 8.8 Hz), 8.43 (d, 1H, H3, ³J = 16.0 Hz), 8.75 (d, 1H, H6, ³J = 4.4 Hz).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) [ppm]

δ = 123.1 (C3), 124.1 (C8), 124.8 (C3'/C5'), 127.3 (C5), 129.2 (C2'/C6'), 137.2 (C4), 141.2 (C1'), 141.3 (C9), 148.5 (C4'), 148.9 (C6), 153.6 (C2), 188.9 (C7).

4'-(4-Nitrophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin [72]

Verbindung 11



$$M = 354.36 \text{ g/mol}$$

Durchführung

Verbindung 10 (2.6 g, 10.3 mmol), Verbindung 9 (3.4 g, 10.3 mmol) sowie getrocknetes Ammoniumacetat (4.7 g, 60.4 mmol) werden in 100 ml Methanol gelöst und über Nacht bei 70 °C unter Rückfluss gerührt. Die nun graue viskose Reaktionslösung wird abfiltriert, der Niederschlag mit gekühltem Methanol gewaschen und anschließend getrocknet. Man erhält 3.5 g (9.9 mmol) eines grauen Feststoffes, was einer Ausbeute von 96 % entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

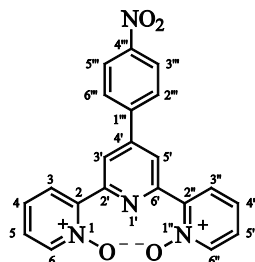
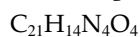
[M+H]⁺: berechnet: 355.1195 gefunden: 355.1166

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

$\delta = 7.54$ (dt, 2H, H5/H5'', ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 8.05 (dt, 2H, H4/H4'', ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.21 (d, 2H, H2'''/H6''', ³J = 8.8 Hz), 8.39 (d, 2H, H3'''/H5''', ³J = 8.8 Hz), 8.67 (d, 2H, H6/H6', ³J = 8.0 Hz), 8.75 (s, 2H, H3'/H5'), 8.76 (d, 2H, H3/H3'', ³J = 6.8 Hz).

¹³C-NMR (100 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

$\delta = 118.2$ (C3'/C5'), 120.9 (C3/C3''), 124.4 (C5/C5''), 124.6 (C3'''/C5'''), 129.0 (C2'''/C6'''), 137.5 (C4/C4''), 143.7 (C1'''), 147.2 (C4'''), 147.8 (C6/C6''), 149.3 (C4'), 154.5 (C2/C2''), 155.9 (C2'/C6').

4'-(4-Nitrophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin-*N,N''*-dioxid ^[72]Verbindung **21**

$$M = 386.36 \text{ g/mol}$$
Durchführung

Verbindung **11** (3.2 g, 9.1 mmol) wird in 180 ml Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von *m*-Chlorperbenzoesäure (Gehalt: 77%) (5.8 g, 33.7 mmol) wird die Reaktionslösung über Nacht bei RT gerührt. Der entstandene weiße Feststoff wird abfiltriert und das gelbliche Filtrat in zwei Schritten mit 10 %-iger Na₂CO₃-Lösung und Wasser (je 84 ml) ausgeschüttelt. Der dabei entstandene Niederschlag wird abfiltriert, die organischen Phasen vereint und unter vermindertem Druck eingengt. Die gesammelten Niederschläge werden aus Acetonitril/Methanol umkristallisiert und man erhält 3.1 g (8.0 mmol) eines gelblich weißen Feststoffes, was einer Ausbeute von 88 % entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

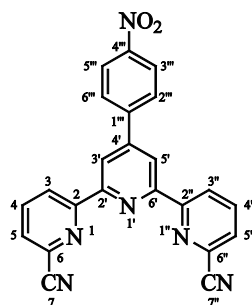
[M+H] ⁺ :	berechnet: 387.1093	gefunden: 387.1093
[M+Na] ⁺ :	409.0913	409.0905

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

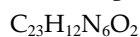
δ = 7.53 (d, 2H, H2'''', H6''', ³J = 7.6 Hz), 7.54 (t, 2H, H4/H4'', ³J = 8.8 Hz), 8.10 (d, 2H, H6/H6'', ³J = 8.4 Hz), 8.26 (t, 2H, H5/H5'', ³J = 6.8 Hz), 8.42 (dd, 2H, H3'''/H5''', ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 3.0 Hz), 8.43 (d, 2H, H3/H3'', ³J = 7.4 Hz), 9.15 (s, 2H, H3'/H5').

¹³C-NMR (100 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

δ = 123.2 (C5/C5'), 124.4 (C3'/C5'), 125.6 (C3'''/C5'''), 126.6 (C3/C3''), 127.8 (C4/C4''), 128.4 (C2'''/C6'''), 140.4 (C6/C6''), 143.5 (C2/C2''), 145.1 (C1'''), 145.4 (C4'''), 147.9 (C4'), 150.3 (C2'/C6').

4'-(4-Nitrophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin-6,6''-dinitril [72]

Verbindung 22



$$M = 404.38 \text{ g/mol}$$
Durchführung

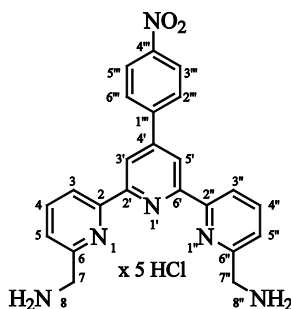
Verbindung **21** (2.4 g, 6.3 mmol) wird in 65 ml Dichlormethan suspendiert und Trimethylsilylcyanid (7.3 ml, 58.4 mmol) zugegeben. Anschließend wird Benzoylchlorid (2.7 ml, 23.4 mmol) über einen Zeitraum von 20 min zur Reaktionslösung zugetropft, wobei mit einem Wasserbad gekühlt wird. Die weiße Suspension wird über Nacht bei RT gerührt. Danach wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bis zur Hälfte eingeeengt, mit 200 ml 10%-iger K_2CO_3 -Lösung versetzt und 15 min gerührt. Das Lösungsgemisch wird abfiltriert, mehrmals mit kaltem Dichlormethan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält 2.5 g (6.2 mmol) eines weißen Feststoffes, was einer Ausbeute von 99 % entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

$[\text{M}+\text{K}]^+$: berechnet: 443.0659 gefunden: 443.0653

 $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) [ppm]

$\delta = 7.80$ (dd, 2H, H5/H5'', $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, $^4J = 1.0 \text{ Hz}$), 8.05 (t, 2H, H4/H4'', $^3J = 6.0 \text{ Hz}$), 8.08 (d, 2H, H2'''/H6''', $^3J = 7.0 \text{ Hz}$), 8.45 (d, 2H, H3'''/H5''', $^3J = 9.0 \text{ Hz}$), 8.86 (s, 2H, H3'/H5'), 8.88 (dd, 2H, H3/H3'', $^3J = 9.4 \text{ Hz}$, $^4J = 0.8 \text{ Hz}$).

6,6''-Bis-(aminomethyl)-4'-(4-nitrophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin ^[72]

Verbindung 23

 $C_{23}H_{25}Cl_5N_6O_2$

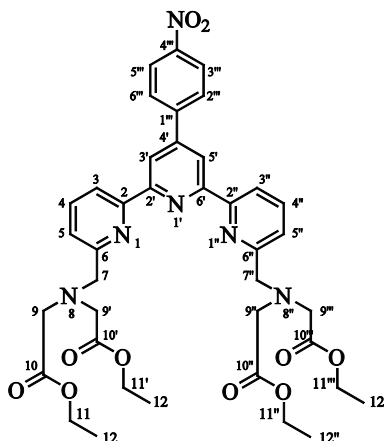
M = 592.04 g/mol

Durchführung

Verbindung 22 (1.3 g, 3.2 mmol) wird in 25 ml trockenem THF suspendiert und 40 min mit Argon entgast. Danach werden 41 ml (41 mmol, 1 M) $BH_3 \times THF$ -Komplex langsam zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die nun braune Suspension wird so lange mit Methanol versetzt, bis überschüssiges BH_3 zerstört ist und keine Gasentwicklung zu beobachten ist. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der grünlich-gelbe Rückstand in 50 ml methanolischer HCl (1 M) 2 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen der Lösung wird der entstandene rotbraune Niederschlag abfiltriert und im Vakuum getrocknet, wobei 1.0 g (1.7 mmol) des Rohproduktes erhalten werden, was einer Ausbeute von 53% entspricht. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**[M+H⁺-5HCl]: berechnet: 413.1726 gefunden: 413.1734

6,6''-Bis-[N,N-bis-(ethoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-4'-(4-nitrophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin ^[72]



Verbindung 24



M = 756.80 g/mol

Durchführung

Verbindung 23 (1.0 g, 1.7 mmol) wird in trockenem Acetonitril (24 ml) suspendiert und nacheinander DIEA (6.7 ml, 38.5 mmol) sowie Bromessigsäureethylester (1.1 ml, 10.2 mmol) zugetropft. Die orange Lösung wird 24 h unter Rückfluss gerührt, wobei sie sich gelb färbt. Die Reaktionslösung wird abgekühlt, mit einer Mischung aus Dichlormethan und gesättigter Na_2CO_3 -Lösung (jeweils 50 ml) ausgeschüttelt und die organische Phase zwei Mal mit HPLC-Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das braune Öl wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Petrolether/Ethylacetat/Triethylamin 9:5:1, $R_f = 0.5$). Man erhält 0.4 g (528.6 μmol) eines gelben Öls, was einer Ausbeute von 32% entspricht.

Analytik

HR-MS [ESI] [m/z]

[M+H]⁺: berechnet: 757.3197 gefunden: 757.3168

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) [ppm]

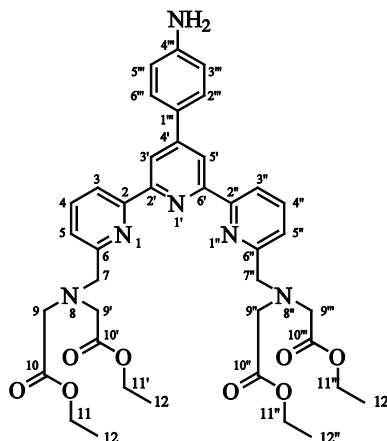
$\delta = 1.24$ (t, 12H, H12/H12'/H12''/H12''', ³J = 7.2 Hz), 3.70 (s, 8H, H9/H9'/H9''/H9'''), 4.17 (quart., 8H, H11/H11'/H11''/H11''', ³J = 7.2 Hz), 4.20 (s, 4H, H7/H7''), 7.67 (d, 2H,

H5/H5'', $^3J = 7.6$ Hz), 7.88 (t, 2H, H4/H4'', $^3J = 7.6$ Hz), 8.08 (d, 2H, H2'''/H6''', $^3J = 8.8$ Hz), 8.40 (d, 2H, H3'''/H5''', $^3J = 8.8$ Hz), 8.56 (d, 2H, H3/H3', $^3J = 7.6$ Hz), 8.75 (s, 2H, H3'/H5').

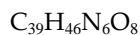
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) [ppm]

$\delta = 14.3$ (C12/C12'/C12''/C12'''), 55.0 (C9/C9'/C9''/C9'''), 60.0 (C11/C11'/C11''/C11'''), 60.6 (C7/C7''), 118.9 (C3'/C5'), 119.8 (C5/C5''), 123.5 (C3/C3''), 124.5 (C3'''/C5'''), 128.3 (C6'''/C2'''), 137.6 (C4/C4''), 145.3 (C1'''), 147.6 (C4'''), 148.1 (C4'), 154.9 (C2'/C6'), 156.4 (C6/C6''), 158.4 (C2/C6''), 171.3 (C10/C10'/C10''/C10''').

6,6''-Bis-[N,N-bis-(ethoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-4'-(4-aminophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin [72]



Verbindung 25



M = 726.34 g/mol

Durchführung

Verbindung 24 (264.7 mg, 349.8 μmol) wird in 22 ml trockenem Ethanol gelöst und auf 70 °C geheizt. 0.5 g (2.1 mmol) $\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ werden zur gelben Lösung dazugegeben, wobei sie sich rot färbt. Nach 1 h Rühren unter Rückfluss und Argon wird die Reaktionslösung, in der sich ein öliger Niederschlag abgeschieden hat, auf eine eisgekühlte gesättigte DTPA-Lösung (100 ml) gegeben und erneut 1 h bei RT gerührt. Nun wird mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung neutralisiert, mit Chloroform ausgeschüttelt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erhält man 210.7 mg (290.1 μmol) eines roten Öls, was einer Ausbeute von 83 % entspricht.

Analytik

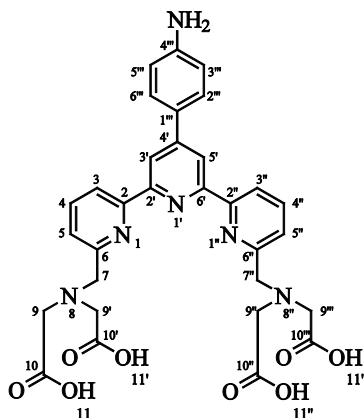
HR-MS [ESI] [m/z]

[M+H]⁺: berechnet: 727.3455 gefunden: 727.3458

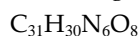
¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) [ppm]

δ = 1.24 (t, 12H, H12/H12'/H12''/H12''', ³J = 7.2 Hz), 3.70 (s, 8H, H9'/H9''/H9'''), 4.17 (quart., 8H, H11/H11'/H11''/H11''', ³J = 7.2 Hz), 4.20 (s, 4H, H7/H7'), 6.82 (d, 2H, H3'''/H5''', ³J = 8.4 Hz), 7.62 (d, 2H, H5/H5'', ³J = 7.2 Hz), 7.76 (d, 2H, H2'''/H6''', ³J = 8.4 Hz), 7.85 (t, 2H, H4/H4'', ³J = 7.6 Hz), 8.53 (d, 2H, H3/H3'', ³J = 8.0 Hz), 8.66 (s, 2H, H3'/H5')

6,6''-Bis-[N,N-bis-(carboxymethyl) aminomethyl]-4'-(4-aminophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin ^[72]



Verbindung 26



M = 614.21 g/mol

Durchführung

Verbindung 25 (196.8 mg, 270.9 μmol) wird in einer Mischung aus Ethanol (11 ml), Wasser (2 ml) und KOH (0.3 g, 5.4 mmol) gelöst und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 1 M HCl auf pH 1 - 2 gebracht, wobei sich ein roter Niederschlag abscheidet. Dieser wird abfiltriert, getrocknet, und man erhält 115.4 mg (187.9 μmol) eines dunkelroten Pulvers, was einer Ausbeute von 69% entspricht. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Analytik

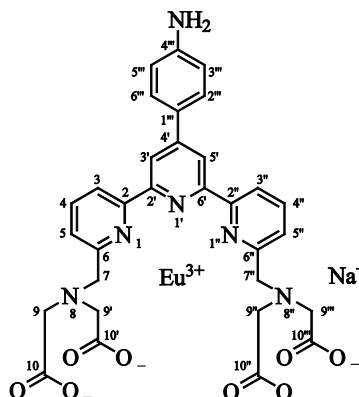
HR-MS [ESI] [m/z]

[M+H]⁺: berechnet: 615.2203 gefunden: 615.2201

¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) [ppm]

δ = 3.76 (s, 8H, H9/H9'/H9''/H9'''), 4.27 (s, 4H, H7/H7''), 6.84 (d, 2H, H3'''/H5''', ³J = 8.4 Hz), 7.66 (d, 2H, H2'''/H6''', ³J = 7.8 Hz), 7.78 (d, 1H, H6''', ³J = 6.8 Hz), 8.15 (t, 2H, H4/H4'', ³J = 7.6 Hz), 8.59 (d, 2H, H3/H3'', ³J = 8.4 Hz), 8.65 (s, 2H, H3'/H5').

{6,6''-Bis-[N,N-bis-(carboxymethyl)aminomethyl]-4'-(4-aminophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin} Europium(III) ^[72]



Verbindung 27

$C_{31}H_{26}EuN_6NaO_8$

$M = 786.09 \text{ g/mol}$

Durchführung

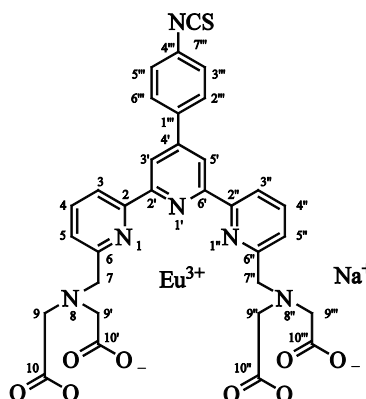
Verbindung 26 (111.5 mg, 180.7 μmol) wird in 2.2 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit verdünnter NaHCO_3 -Lösung auf 6.5 eingestellt. Innerhalb von 15 min werden bei gleichbleibendem pH-Wert 1.3 ml einer wässrigen EuCl_3 -Lösung (70.3 mg, 192.0 μmol) zugegeben. Die nun gelb-orange Lösung wird 1.5 h bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert zwischen 5 und 7 gerührt. Danach wird NaOH (1 M) bis zu einem pH-Wert von 8.5 zugetropft, wobei sich die Lösung gelb färbt und sich ein Niederschlag von $\text{Eu}(\text{OH})_3$ bildet. Dieser wird abzentrifugiert und der Überstand mit kaltem Aceton (10 ml) versetzt. Nach 20 min bei 4 °C bildet sich ein flockig weißer Niederschlag, der abzentrifugiert, mehrmals mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet wird. Man erhält 90.0 mg (112.2 μmol) eines weißen Pulvers, was einer Ausbeute von 62 % entspricht.

Analytik

HR-MS [ESI] [m/z]

[M]: berechnet: 763.1030 gefunden: 763.1034

{6,6''-Bis-[N,N-bis-(carboxymethyl)aminomethyl]-4'-(4-isothiocyanatophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin} Europium(III) [72]



Verbindung 28

$C_{32}H_{24}EuN_6NaO_8S$

$M = 805.06 \text{ g/mol}$

Durchführung

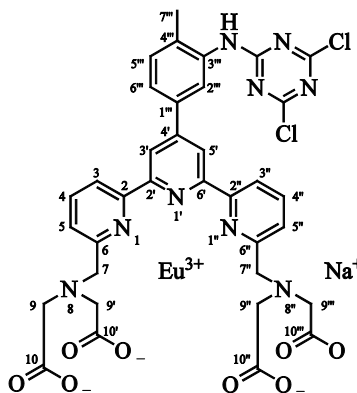
Thiophosgen (31.2 μl , 0.4 mmol) wird zu einer Mischung aus 2.7 ml Chloroform und NaHCO_3 (41.9 mg, 0.5 mmol) gegeben und 10 min gerührt. Dazu wird Verbindung 27 (87.2 mg, 108.8 μmol), in 2.7 ml Wasser gelöst, über 15 min zugetropft und anschließend die gelbe Lösung 1 h bei RT gerührt. Mit Chloroform (20 ml) wird die wässrige Reaktionslösung von Thiophosgen befreit, die organische Phase mit Wasser (10 ml) ausgeschüttelt und die vereinten wässrigen Phasen bis auf 1 ml unter vermindertem Druck eingengt. Nach Zugabe von Aceton (10 ml, 20 min, 4 °C) wird der entstandene Niederschlag abzentrifugiert, mehrmals mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält 75.3 mg (93.5 μmol) eines farblosen Pulvers, was einer Ausbeute von 86 % entspricht.

Analytik

HR-MS [ESI] [m/z]

[M]⁺: berechnet: 805.0594 gefunden: 805.0596

6,6''-Bis-[N,N-bis-(carboxymethyl)aminomethyl]-4'-(4-methyl-3-(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)-phenyl)-2, 2':6',2''-terpyridin} Europium(III) [72]



Verbindung 29

$C_{35}H_{27}Cl_2EuN_9NaO_8$

$M = 924.06 \text{ g/mol}$

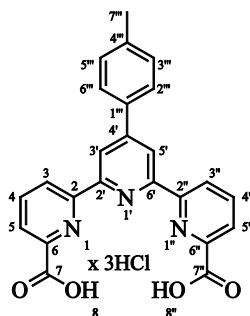
Durchführung

2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazin (3.8 mg, 21.5 μmol) wird in einer Mischung aus Aceton und Wasser (je 210 μl) suspendiert und zu einer 0.1 M Natriumacetatlösung (351 μl , pH 4.9) aus Verbindung 19 gegeben. Die Reaktionslösung wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit kaltem Aceton versetzt (5 ml, 30 min, 4 °C). Der dabei entstehende weißliche Niederschlag wird abzentrifugiert, mehrmals mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält 6.6 mg (7.2 μmol) eines weißen Pulvers, was einer Ausbeute von 34% entspricht.

Analytik

HR-MS [ESI] [m/z]

[M]: berechnet: 925.0577 gefunden: 924.0573

4'-(4'''-Methylphenyl)-2, 2':6', 2''-terpyridin-6,6''-biscarbonsäure ^[103]

Verbindung 30



M = 520.79 g/mol

Durchführung

Verbindung 13 (0.4 g, 1.1 mmol) wird in einer Mischung aus konzentrierter HCl (52.9 ml) und konzentrierter Essigsäure (26.7 ml) gelöst und 16 h unter Rückfluss gerührt. Beim Abkühlen der Reaktionslösung fällt ein weißer Feststoff aus, der abfiltriert und aus Dioxan umkristallisiert wird. Man erhält 284.2 mg (0.6 mmol) eines gelblichen Feststoffes, was einer Ausbeute von 51 % entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

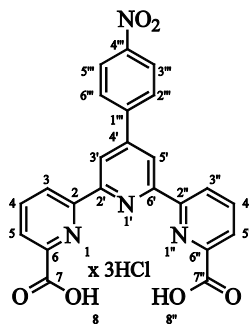
[M+H-3HCl]⁺: berechnet: 412.1297 gefunden: 412.1260

¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) [ppm]:

δ = 2.42 (s, 3H, H7'''), 7.45 (d, 2H, H3'''/H5''', ³J = 7.8 Hz), 7.89 (d, 2H, H2'''/H6''', ³J = 8.4 Hz), 8.18 (dd, 2H, H5/H5'', ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 8.23 (t, 2H, H4/H4'', ³J = 7.8 Hz), 8.91 (dd, 2H, H3/H3'', ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 8.92 (s, 2H, H3'/H5').

¹³C-NMR (150 MHz, d₆-DMSO) [ppm]:

δ = 20.8 (C7'''), 118.7 (C3'/C5'), 124.2 (C5/C5''), 125.0 (C6''/C2''), 126.9 (C3/C3''), 129.9 (C3'''/C5'''), 134.4 (C4'''), 138.9 (C4/C4''), 139.2 (C1'''), 147.8 (C6/C6''), 149.8 (C4'), 154.7 (C2/C2''), 154.8 (C2'/C6'), 165.8 (C7/C7').

4'-(4'''-Nitrophenyl)-2, 2':6', 2''-terpyridin-6,6''-biscarbonsäure ^[103]

Verbindung 31

 $C_{23}H_{17}Cl_3N_4O_6$

M = 551.76 g/mol

Durchführung

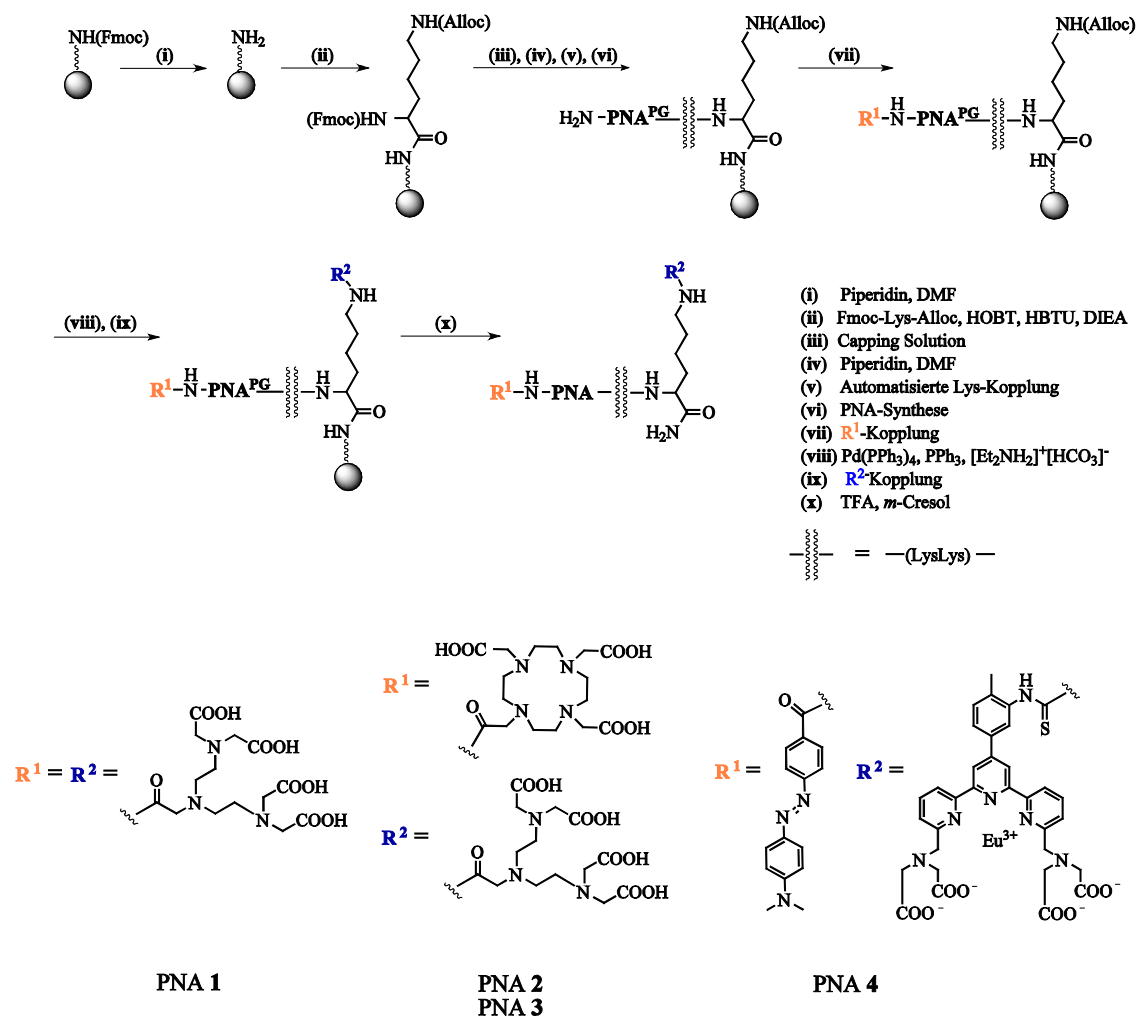
Verbindung 22 (0.3 g, 0.8 mmol) wird in einer Mischung aus konzentrierter HCl (30 ml) und konzentrierter Essigsäure (14.6 ml) gelöst und 16 h unter Rückfluss gerührt. Nach Einengen der Reaktionslösung wird in der Kälte ein Niederschlag ausgefällt, welcher abfiltriert und im Vakuum getrocknet wird. Man erhält 30 mg (54.4 μ mol) eines Feststoffes, was einer Ausbeute von 8 % entspricht.

Analytik**HR-MS [ESI] [m/z]**

[M+K-3HCl]⁺: berechnet: 481.0545 gefunden: 481.0556

5.3 Synthese der PNA-Konjugate

5.3.1 Synthese von C- und N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten



i) Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-geschützte Festphase (2 μmol) wird mit einer Piperidin/DMF-Lösung (1:4) versetzt und 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

ii) Kopplung von (Fmoc)Lys(Alloc)OH

(Fmoc)Lys(Alloc)OH (45.2 mg, 100 μmol), HOBT (13.5 mg, 100 μmol) und HBTU (34.1 mg, 90 μmol) werden 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet. Die Reagenzien werden in DMF (1 ml) gelöst, die Reaktionslösung mit DIEA (38.5 μl , 220 μmol)

versetzt und zum festen Träger (2 μmol) gegeben. Nach 45 min wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

iii) Deaktivierung restlicher Aminofunktionen

Die mit Lysin gekoppelte Festphase wird mit PNA -Capping-Solution (Essigsäureanhydrid/2,6-Dimethylpyridin 1:1) versetzt und 45 min geschüttelt. Der flüssige Anteil wird verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

iv) Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-geschützte Festphase (2 μmol) wird mit einer Piperidin/DMF-Lösung (1:4) versetzt und 45 min geschüttelt. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

v) Automatisierte Kopplung von Lysin

Die Kopplung der Lysine wird an einem Expedite 8909 Nucleinsäure-Syntheseautomaten durchgeführt, der mit einem Ansatz von 2 μmol Festphase nach Standardprotokollen arbeitet.

vi) Synthese der PNA-Sequenz der Konjugate

Die Synthese der PNA-Sequenz wird an einem Expedite 8909 Nucleinsäure-Syntheseautomaten durchgeführt, der mit einem Ansatz von 2 μmol Festphase nach Standardprotokollen arbeitet.

vii) N-terminale Kopplung verschiedener Substituenten (**R¹**)

a) Kopplung von 4-(Methylcarbonsäure)-1,4,7-triazaheptan-1,1,7,7-tetraacetyl-*tert*-butylester (Verbindung 5)

Verbindung 5 (21.5 mg, 34.8 μmol), HOBT (13.4 mg, 100 μmol) und HBTU (34.1 mg, 90 μmol) werden 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet und in DMF (1 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wird mit DIEA (38.5 μl , 220 μmol) versetzt und zum festen Träger (2 μmol) gegeben. Die Reaktionsdauer beträgt 1 h. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

b) Kopplung von DOTA-mono-NHS-tris-(*tert*-Butylester)

DOTA-mono-NHS-tris-(*tert*-Butylester) (5.1 mg, 6.14 μmol) wird 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet und anschließend in DMF (1 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wird mit DIEA (38.5 μl , 220 μmol) versetzt und zum festen Träger (2 μmol) gegeben. Die Reaktionsdauer beträgt 2 h. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 \times 1 ml), Acetonitril (3 \times 1 ml) und Dichlormethan (3 \times 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

c) Kopplung von DABCYL-Succinimidylester (DABCYL-SE)

DABCYL-SE (5.66 mg, 15.0 μmol) wird 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet und anschließend in DMF (1 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wird mit DIEA (38.5 μl , 220 μmol) versetzt und zum festen Träger (2 μmol) gegeben. Die Reaktionsdauer beträgt 2 h. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 \times 1 ml), Acetonitril (3 \times 1 ml) und Dichlormethan (3 \times 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

viii) Entschützung der Alloc-Schutzgruppe

$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2 mg, 1.7 μmol) und PPh_3 (10 mg, 38.1 μmol) werden eingewogen und 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet. Dies wird zusammen mit $\text{EtNH}_2\text{HCO}_3$ (10 mg, 95.1 μmol) in Dichlormethan (1 ml) gelöst, die präparierte Festphase mit der Reaktionslösung versetzt und 12 h geschüttelt. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit *N,N'*-Diethyldithiocarbaminsäure (0.5 % in DMF, 3 \times 1 ml), DMF (3 \times 1 ml), Acetonitril (3 \times 1 ml) und Dichlormethan (3 \times 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

ix) C-terminale Kopplung verschiedener Substituenten (R^2)**a) Kopplung von 4-(Methylcarbonsäure)-1,4,7-triazaheptan-1,1,7,7-tetraacetyl-*tert*-butylester (Verbindung 5)**

Verbindung 5 (21.5 mg, 34.8 μmol), HOBT (13,4 mg, 100 μmol) und HBTU (34,1 mg, 90 μmol) werden 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet und anschließend in DMF (1 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wird mit DIEA (38.5 μl , 220 μmol) versetzt und zum festen Träger (2 μmol) gegeben. Die Reaktionsdauer beträgt 1 h. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 \times 1 ml), Acetonitril (3 \times 1 ml) und Dichlormethan (3 \times 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

b) Kopplung von Verbindung 20

Verbindung 20 (37.2 mg, 43.4 μmol) wird zunächst in 500 μl Wasser gelöst, zu einer wässrigen Suspension von 500 μl CTAB (16.4 mg, 45 μmol) gegeben und am

Lyophilisator bis zur Trockene eingeeingt. Der so erhaltene Feststoff wird zusammen mit DIEA (38.5 μ l, 220 μ mol) in DMF (1 ml) gelöst und zum festen Träger gegeben. Nach 3 Tagen wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet

x) Abspaltung vom festen Träger, Aufarbeitung und Reinigung

Das an der Festphase gebundene PNA-Konjugat (2 μ mol) wird mit 600 μ l Abspalllösung (TFA/*m*-Cresol, 4:1) versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Die Festphase wird abfiltriert und mit 150 μ l TFA/*m*-Cresol-Lösung gewaschen. Durch diesen Abspaltvorgang werden auch alle *tert*-Butylschutzgruppen entfernt. Das Filtrat wird mit Diethylether (5 ml) versetzt (2.5 h bei 4 °C), wobei sich ein Niederschlag bildet. Dieser wird abzentrifugiert und mit Diethylether (4 x 1 ml) gewaschen. Das PNA-Konjugat wird bei Raumtemperatur getrocknet, in 200 μ l Wasser aufgenommen und mittels HPLC gereinigt.

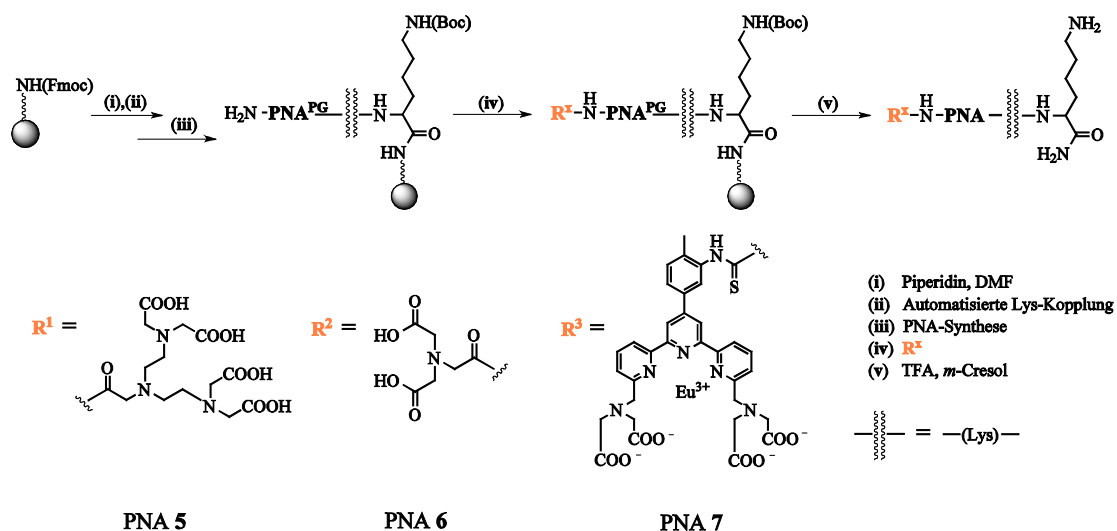
Synthetisierte PNA-Konjugate

Mit **L₁** = Verbindung 28 und **L₂** = Verbindung 20.

PNA 1	DTPA-TCACAACTAkkk-DTPA	
Ausbeute:	2.9 %	
HPLC:	R_t = 30.94 min	
MALDI-TOF MS:	C ₁₄₂ H ₂₀₄ N ₆₅ O ₄₅	
	[M+H] ⁺ : berechnet: 3539.42	gefunden: 3542.51
PNA 2	DOTA-TCACAACTAkkk-DTPA	
Ausbeute:	3.1 %	
HPLC:	R_t = 31.58 min	
MALDI-TOF MS:	C ₁₄₄ H ₂₀₉ N ₆₆ O ₄₃	
	[M+H] ⁺ : berechnet: 3550.47	gefunden: 3550.31
PNA 3	DOTA-CTTACCTCAGTTACAkkk-DTPA	
Ausbeute:	1.1 %	
HPLC:	R_t = 30.49 min	
MALDI-TOF MS:	C ₂₀₈ H ₂₉₀ N ₉₅ O ₆₄	
	[M+H] ⁺ : berechnet: 5140.73	gefunden: 5140.53

PNA 4	DABCYL-TCACAACTAkkk-L₂
Ausbeute:	0.6 %
HPLC:	R _t = 27.34 min
MALDI-TOF MS:	C ₁₆₂ H ₂₀₀ N ₆₈ O ₃₆ S
	[M+H] ⁺ : berechnet: 3705.42
	gefunden: 3709.77

5.3.2 Synthese von N-terminal modifizierten PNA-Konjugaten



i) Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-geschützte Festphase (2 µmol) wird mit einer Piperidin/DMF-Lösung (1:4) versetzt und 45 min geschüttelt. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10⁻² mbar) getrocknet

ii) Automatisierte Kopplung von Lysin

Die Kopplung der Lysine wird an einem Expedite 8909 Nucleinsäure-Syntheseautomaten durchgeführt, der mit einem Ansatz von 2 µmol Festphase nach Standardprotokollen arbeitet.

iii) Synthese der PNA-Sequenz der Konjugate

Die Synthese der PNA-Sequenz wird an einem Expedite 8909 Nucleinsäure-Syntheseautomaten durchgeführt, der mit einem Ansatz von 2 µmol Festphase nach Standardprotokollen arbeitet.

iv) N-terminale Kopplung verschiedener Substituenten (R^x)**a) Kopplung von 4-(Methylcarbonsäure)-1,4,7-triazaheptan-1,1,7,7-tetraacetyl-*tert*-butylester (Verbindung 5) (R¹)**

Verbindung 5 (21.5 mg, 34.8 μmol), HOBT (13.4 mg, 100 μmol) und HBTU (34.1 mg, 90 μmol) werden 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet und anschließend in DMF (1 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wird mit DIEA (38.5 μl , 220 μmol) versetzt und zum festen Träger (2 μmol) gegeben. Die Reaktionsdauer beträgt 1 h. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

b) Kopplung von Bis-(*N-tert*-Butyloxycarbonylmethyl)-aminoessigsäure (7) (R²)

Verbindung 7 (11.0 mg, 36.3 μmol), HOBT (13.4 mg, 100 μmol) und HBTU (34.1 mg, 90 μmol) werden 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet und anschließend in DMF (1 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wird mit DIEA (38.5 μl , 220 μmol) versetzt und zum festen Träger (2 μmol) gegeben. Die Reaktionsdauer beträgt 1 h. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

c) Kopplung von Verbindung 20 (R³)

Verbindung 20 (37.2 mg, 43.4 μmol) wird zunächst in 500 μl Wasser gelöst, zu einer wässrigen Suspension aus 500 μl CTAB (16.4 mg, 45.0 μmol) gegeben und am Lyophilisator bis zur Trockene eingeengt. Der so erhaltene Feststoff wird zusammen mit DIEA (52.5 μl , 300 μmol) in DMF (1 ml) gelöst und zum festen Träger gegeben. Nach 3 Tagen wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

v) Abspaltung vom festen Träger, Aufarbeitung und Reinigung

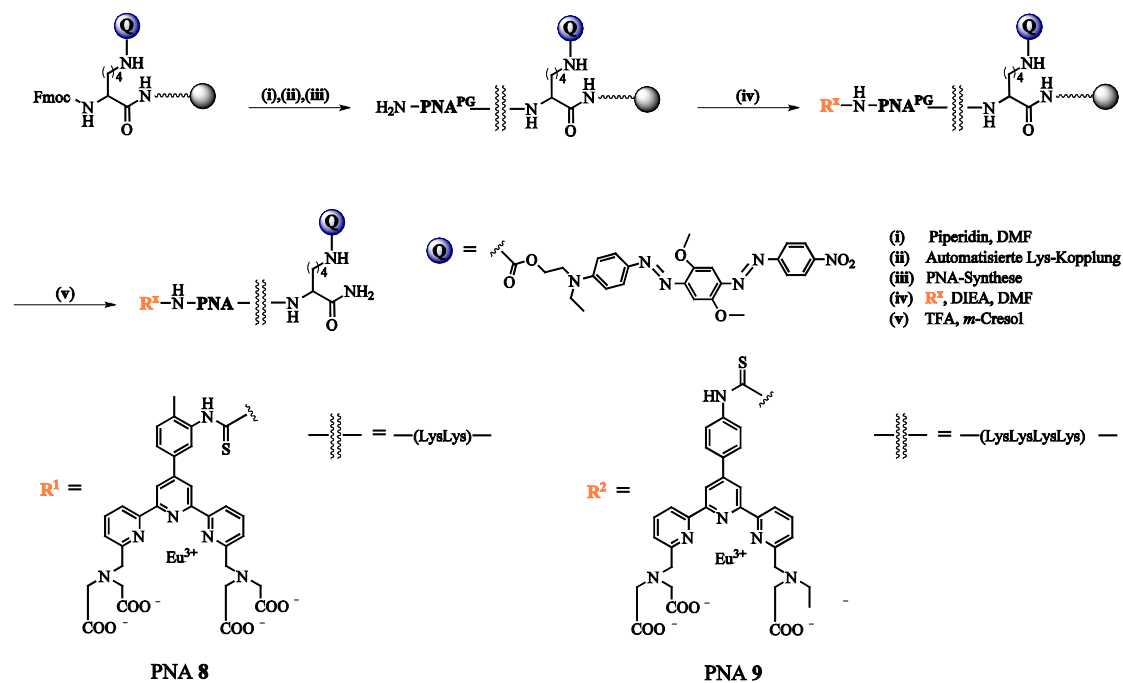
Das an der Festphase gebundene PNA-Konjugat (2 μmol) wird mit 600 μl Abspatlösung (TFA/*m*-Cresol, 4:1) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Die Festphase wird abfiltriert und mit 150 μl TFA/*m*-Cresol-Lösung gewaschen. Durch diesen Abspaltvorgang werden auch alle *tert*-Butylschutzgruppen entfernt. Das Filtrat wird mit Diethylether (5 ml) versetzt (2.5 h bei 4 °C), wobei sich ein Niederschlag bildet. Dieser wird abzentrifugiert und mit Diethylether (4 x 1 ml) gewaschen. Die PNA wird bei Raumtemperatur getrocknet, in 200 μl Wasser aufgenommen und mittels HPLC gereinigt.

Synthetisierte PNA-Konjugate

Mit **L₁** = Verbindung **28** und **L₂** = Verbindung **20**.

PNA 5	DTPA-TCACAACTAkk	
Ausbeute:	2.0 %	
HPLC:	R_t = 29.71 min	
MALDI-TOF MS:	C ₁₂₂ H ₁₆₈ N ₅₉ O ₃₆	
	[M+H] ⁺ : berechnet: 3035.16	gefunden: 3039.14
PNA 6	NTA-TCACAACTAkk	
Ausbeute:	9.9 %	
HPLC:	R_t = 29.10 min	
MALDI-TOF MS:	C ₁₁₄ H ₁₅₄ N ₅₇ O ₃₂	
	[M+H] ⁺ : berechnet: 2833.06	gefunden: 2834.50
PNA 7	L₂-TCACAACTAkk	
Ausbeute:	0.13 %	
HPLC:	R_t = 19.88 min	
MALDI-TOF MS:	C ₁₄₁ H ₁₇₂ N ₆₂ O ₃₅ S	
	[M+H] ⁺ : berechnet: 3329.18	gefunden: 3332.95

5.3.3 Synthese von BHQ-modifizierten PNA-Konjugaten



i) Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-geschützte Festphase (2 μmol) wird mit einer Piperidin/DMF-Lösung (1:4) versetzt und 45 min geschüttelt. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

ii) Automatisierte Kopplung von Lysin

Die Kopplung der Lysine wird an einem Expedite 8909 Nucleinsäure-Syntheseroboter durchgeführt, der mit einem Ansatz von 2 μmol Festphase nach Standardprotokollen arbeitet.

iii) Synthese der PNA-Sequenz der Konjugate

Die Synthese der PNA-Sequenz wird an einem Expedite 8909 Nucleinsäure-Syntheseroboter durchgeführt, der mit einem Ansatz von 2 μmol Festphase nach Standardprotokollen arbeitet.

iv) Kopplung von Verbindung 20 bzw. Verbindung 28 (R^1 , R^2)

Verbindung 20 (37.2 mg, 43.4 μmol) bzw. Verbindung 28 (36.6 mg, 43.4 μmol) wird zunächst in 500 μl Wasser gelöst, zu einer wässrigen Suspension von 500 μl

CTAB (16.4 mg, 45.0 μmol) gegeben und am Lyophilisator bis zur Trockene eingengt. Der so erhaltene Feststoff wird zusammen mit DIEA (52.5 μl , 300 μmol) in DMF (1 ml) gelöst und zum festen Träger gegeben. Nach 3 Tagen wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet

(v) Abspaltung vom festen Träger, Aufarbeitung und Reinigung

Das an der Festphase gebundene PNA-Konjugat (2 μmol) wird mit 600 μl Abspalllösung (TFA/*m*-Cresol, 4:1) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Die Festphase wird abfiltriert und mit 150 μl TFA/*m*-Cresol-Lösung gewaschen. Durch diesen Abspaltvorgang werden auch alle *tert*-Butylschutzgruppen entfernt. Das Filtrat wird mit Diethylether (5 ml) versetzt (2.5 h bei 4 °C), wobei sich ein Niederschlag bildet. Dieser wird abzentrifugiert und mit Diethylether (4 x 1 ml) gewaschen. Die PNA wird bei Raumtemperatur getrocknet, in 200 μl Wasser aufgenommen und mittels HPLC gereinigt.

Synthetisierte PNA-Konjugate

Mit **L₁** = Verbindung 28 und **L₂** = Verbindung 20.

PNA 8 **L₂-TCACA ACTAkkk BHQ**

MALDI-TOF MS: C₁₇₂H₂₀₉N₇₁O₄₁S

[M+H]⁺: berechnet: 3955.46

gefunden: 3959.46

In Wasser nicht löslich, daher keine Ausbeute berechenbar und nicht aufge reinigt durch HPLC.

PNA 9 **L₁-TCACA ACTAkkkkk BHQ**

Ausbeute: 1.67 %

HPLC: R_t = 32.72 min

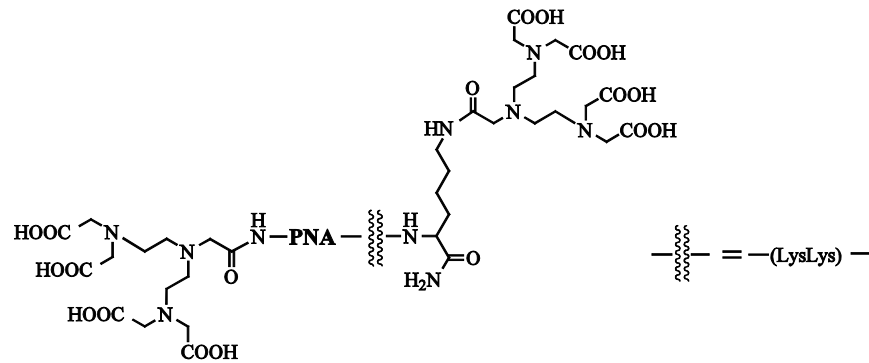
MALDI-TOF MS: C₁₈₃H₂₃₁N₇₅O₄₃S

[M+H]⁺: berechnet: 4198.78

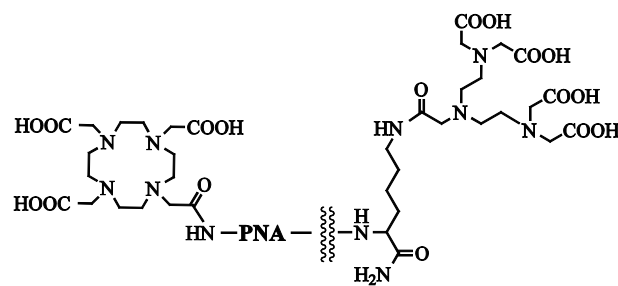
gefunden: 4203.05

5.3.4 Übersicht der synthetisierten PNA-Konjugate

C- und N-terminal modifizierte PNA-Konjugate

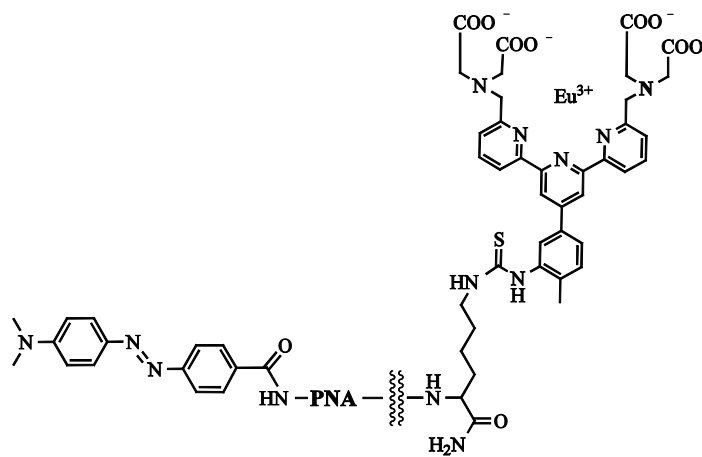


PNA 1 N -TCA CAA CTA -C

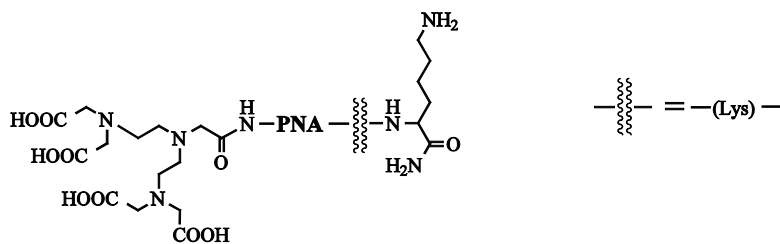


PNA 2 N -TCA CAA CTA -C

PNA 3 N -CTT ACC TCA GTT ACA -C

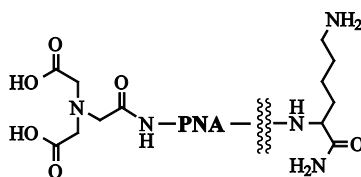


PNA 4 N -TCA CAA CTA -C

N-terminal modifizierte PNA-Konjugate

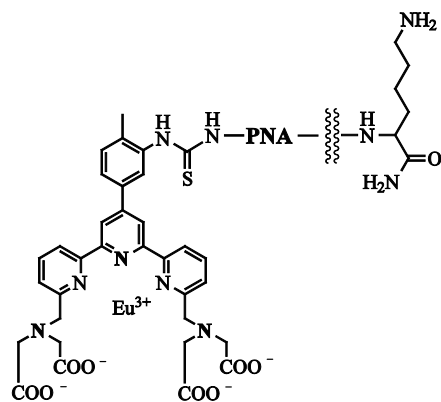
PNA 5

N -TCA CAA CTA -C



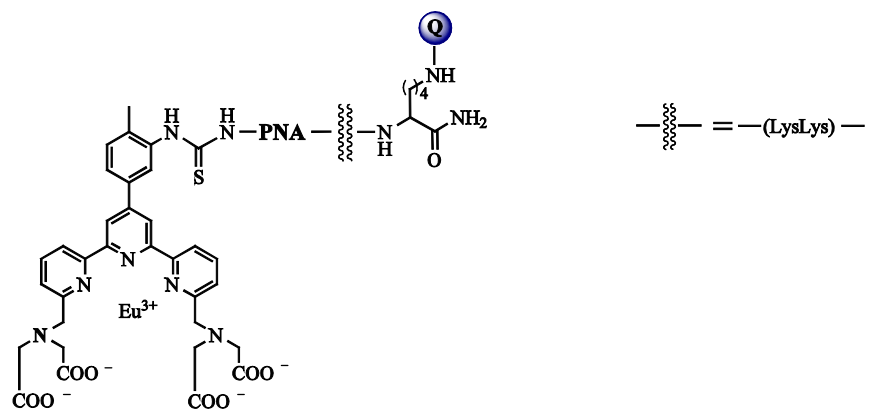
PNA 6

N -TCA CAA CTA -C



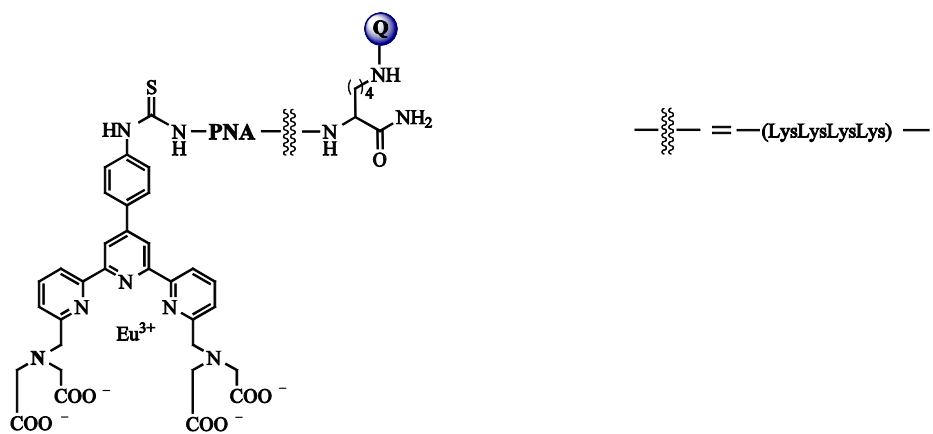
PNA 7

N -TCA CAA CTA -C

BHQ-PNA-Konjugate

PNA 8

N -TCA CAA CTA -C

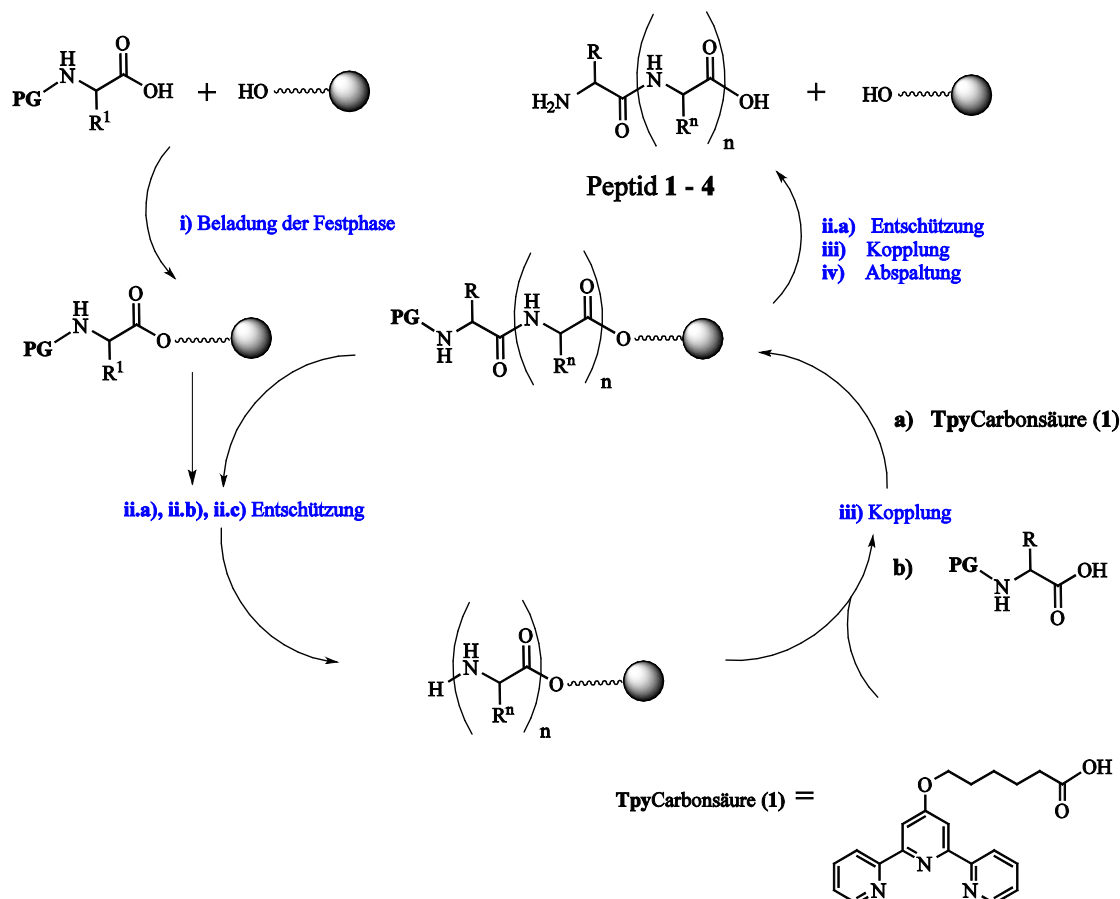


PNA 9

N -TCA CAA CTA -C

5.4 Synthese der Peptidkonjugate

5.4.1 Synthese der Bis-Terpyridin-Peptidkonjugate



i) Beladung der Festphase

Wang Resin[®] (30 mg, 30 μmol) wird zum Schwellen des Polymers zunächst 45 min in 1 ml DMF geschüttelt. Dann wird die Festphase mit einer Lösung aus HOBT (13.5 mg, 100 μmol), DIC (15.5 μl , 100 μmol), DMAP (1 kleines Pellet), der ersten zu koppelnden Aminosäure (100 μmol) und DMF (1 ml) versetzt und 24 h bei RT geschüttelt. Der flüssige Anteil wird verworfen, die Festphase mit DMF (3 \times 1 ml), Acetonitril (3 \times 1 ml) und Dichlormethan (3 \times 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet

ii.) Entschützen der Aminofunktion

a) Fmoc-Schutzgruppe

Die Fmoc-geschützte Festphase wird mit einer Piperidin/DMF-Lösung (1:4) versetzt und 45 min bei RT geschüttelt. Der flüssige Anteil wird verworfen, die

Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet. Zur Überprüfung der Kopplungsreaktion wird die Konzentration des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts nach der Fmoc-Abspaltung über die Absorption bei 300 nm bestimmt.

b) Mtt-Schutzgruppe

Die Festphase wird jeweils 3 min mit einer 1 %-igen TFA-Lösung in Dichlormethan (500 μ l) geschüttelt, solange, bis sich die Lösung nicht mehr gelb färbt.

c) Alloc-Schutzgruppe

Pd(PPh₃)₄ (2 mg, 1.7 μ mol), PPh₃ (10 mg, 38.1 μ mol) werden eingewogen und 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet. Dies wird zusammen mit EtNH₂HCO₃ (10 mg, 95.1 μ mol) in Dichlormethan (1 ml) gelöst, die präparierte Festphase mit der Reaktionslösung versetzt und 12 h geschüttelt. Danach wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit *N,N'*-Diethyldithiocarbaminsäure (0.5 % in DMF, 3 x 1 ml), DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet.

iii.) Kopplung von Carbonsäuren

a) Kopplung von Verbindung (1)

2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy-hexansäure (Verbindung 1) (25.4 mg, 70 μ mol) wird mit HOBT (13.5 mg, 100 μ mol) und HBTU (34.1 mg, 90 μ mol) 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet. Zusammen mit DIEA (38.5 μ l, 220 μ mol) werden die Feststoffe in 1 ml DMF gelöst und 1 h mit der Festphase geschüttelt. Der flüssige Anteil wird verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet

b) Kopplung von (Fmoc)-Aminosäuren

Die jeweilige (Fmoc)-Aminosäure-OH (100 μ mol), HOBT (13.5 mg, 100 μ mol) und HBTU (34.1 mg, 90 μ mol) werden 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet. Die Reagenzien werden in DMF (1 ml) gelöst, die Reaktionslösung mit DIEA (38.5 μ l, 220 μ mol) versetzt und zum festen Träger (2 μ mol) gegeben. Nach 45 min wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet

iv) Abspaltung des Peptids

Das in die feste Phase gebundene Peptid wird mit einer wässrigen TFA-Lösung (0.05 % Wasser) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird die Festphase abfiltriert und mit wenig Abspatlösung gewaschen. Dabei kommt es zur

Entschützung aller Boc-geschützten Aminofunktionen. Das Filtrat wird mit kaltem Diethylether (5 ml) versetzt (2.5 h bei 4 °C), wobei sich ein leicht rosafarbener Niederschlag bildet. Dieser wird abzentrifugiert, mit Diethylether (4 x 1 ml) gewaschen und das Peptid bei RT getrocknet. Zur Aufreinigung mittels HPLC wird es in Wasser aufgenommen.

Synthetisiert Bis-Terpyridin-Peptidkonjugate

Peptid 1 **Tpy-KGFSAK-Tpy**
Ausbeute: 43.6 %
HPLC: $R_t = 14.1$ min
MALDI-TOF MS: $C_{71}H_{86}N_{14}O_{12}$
 $[M+H]^+$: berechnet: 1327.53 gefunden: 1328.12

Gespalten von Thermolysin

Tpy-KG
MALDI-TOF MS: $C_{29}H_{36}N_6O_5$
 $[M+H]^+$: berechnet: 548.63 gefunden: 547.78

FSAK-Tpy
MALDI-TOF MS: $C_{42}H_{52}N_8O_8$
 $[M+H]^+$: berechnet: 796.91 gefunden: 795.23

Peptid 2 **Tpy-KG-Phe(NO₂)-SAK-Tpy**
Ausbeute: 55.6 %
HPLC: $R_t = 11.8$ min
MALDI-TOF MS: $C_{71}H_{85}N_{15}O_{14}$
 $[M+H]^+$: berechnet: 1372.53 gefunden: 1371.46

Gespalten von Thermolysin

Tpy-KG
MALDI-TOF MS: $C_{29}H_{36}N_6O_5$
 $[M+H]^+$: berechnet: 548.63 gefunden: 548.53

Phe(NO₂)-SAK-Tpy
MALDI-TOF MS: $C_{38}H_{44}N_8O_8$
 $[M+H]^+$: berechnet: 740.81 gefunden: 741.1

Peptid 3	Tpy-KKGFSAKK-Tpy	
Ausbeute:	53.3 %	
HPLC:	$R_t = 9.6$ min	
MALDI-TOF MS:	$C_{83}H_{110}N_{18}O_{14}$	
	[M+H] ⁺ : berechnet: 1583.87	gefunden: 1582.11
HR-MS [ESI]	[M+H] ⁺ : berechnet: 1583.8527	gefunden: 1583.8513

Gespalten von Thermolysin

Tpy-KKG

MALDI-TOF MS: $C_{35}H_{48}N_8O_6$

[M+H]⁺: berechnet: 676.81 gefunden: 675.81

FSAKK-Tpy

MALDI-TOF MS: $C_{42}H_{52}N_8O_8$

[M+H]⁺: berechnet: 925.08 gefunden: 925.54

Peptid 4

Tpy-KGFSAK-Tpy

Ausbeute: 41.2 %

HPLC: $R_t = 11.2$ min

MALDI-TOF MS: $C_{71}H_{86}N_{14}O_{12}$

[M+H]⁺: berechnet: 1327.53 gefunden: 1328.15

Gespalten von Thermolysin

Tpy-KG

MALDI-TOF MS: $C_{29}H_{36}N_6O_5$

[M+H]⁺: berechnet: 549.64 gefunden: 548.23

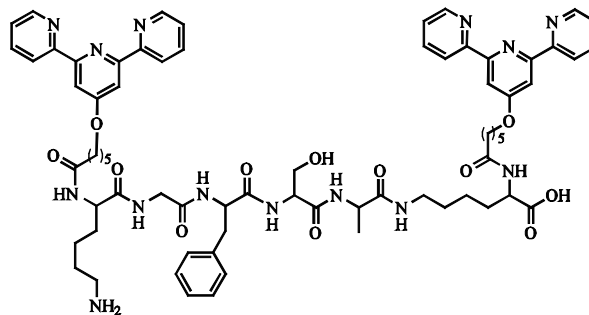
FSAK-Tpy

MALDI-TOF MS: $C_{42}H_{52}N_8O_8$

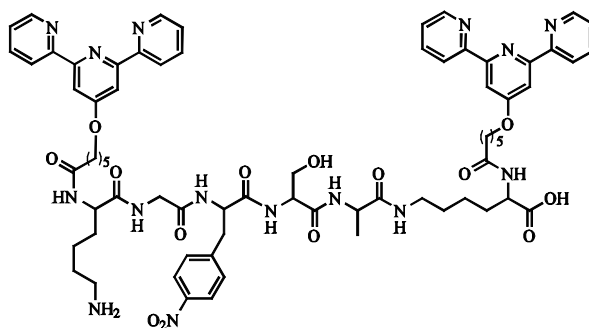
[M+H]⁺: berechnet: 797.91 gefunden: 796.66

5.4.2 Übersicht der synthetisierten Bis-Terpyridin-Peptidkonjugate

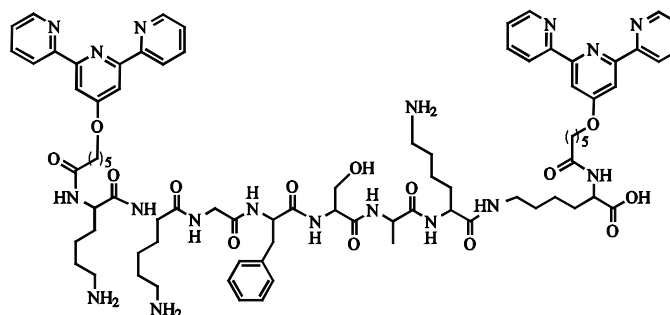
Peptid 1



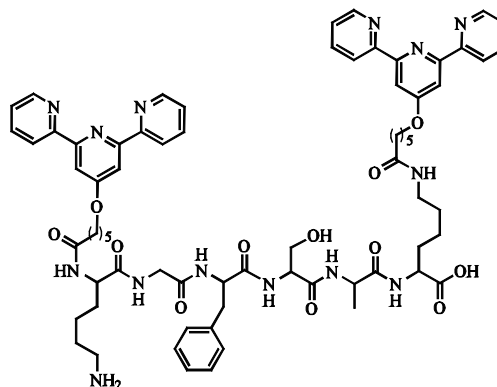
Peptid 2



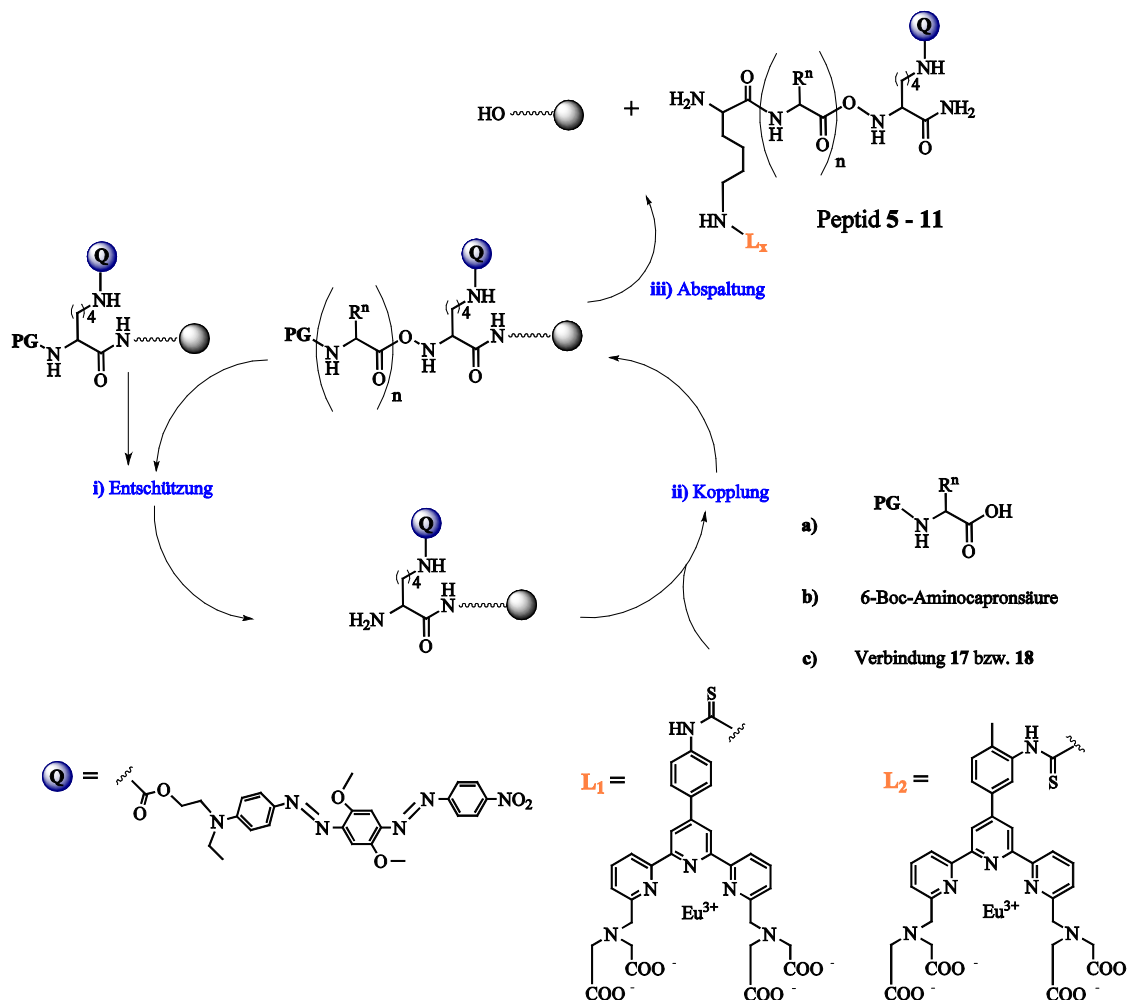
Peptid 3



Peptid 4



5.4.3 Synthese der BHQ-Peptidkonjugate



Zum Schwellen des Polymers wird die Festphase (Biosearch Technologies) zunächst 45 min in 1 ml DMF geschüttelt.

i) Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe

Zum Entschützen des Fmoc-geschützten Amins wird die Festphase (3.7 µmol) mit einer Piperidin/DMF-Lösung (1:4) versetzt und 45 min bei RT geschüttelt. Der flüssige Anteil wird verworfen, die Festphase mit DMF (3 × 1 ml), Acetonitril (3 × 1 ml) und Dichlormethan (3 × 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10⁻² mbar) getrocknet. Zur Überprüfung der Kopplungsreaktion wird die Konzentration des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts nach der Fmoc-Abspaltung über die Absorption bei 330 nm bestimmt.

ii. a) Kopplung von (Fmoc)-Aminosäuren

Die jeweilige (Fmoc)-Aminosäure-OH (100 μmol), HOBT (13.5 mg, 100 μmol) und HBTU (34.1 mg, 90 μmol) werden 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet. Die Reagenzien werden in DMF (1 ml) gelöst, die Reaktionslösung mit DIEA (38.5 μl , 220 μmol) versetzt und zum festen Träger (3.7 μmol) gegeben. Nach 45 min wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet

ii. b) Kopplung von 6-Boc-Aminocaprinsäure

6-Boc-Aminocaprinsäure (23.1 mg, 100 μmol), HOBT (13.5 mg, 100 μmol) und HBTU (34.1 mg, 90 μmol) werden 1 h im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet. Die Reagenzien werden in DMF (1 ml) gelöst, die Reaktionslösung mit DIEA (38.5 μl , 220 μmol) versetzt und zum festen Träger (3.7 μmol) gegeben. Nach 45 min wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet

ii. c) Kopplung von Verbindung 20 bzw. Verbindung 28

Verbindung 20 (37.2 mg, 43.4 μmol) bzw. Verbindung 28 (36.6 mg, 43.4 μmol) wird zunächst in 500 μl Wasser gelöst, zu einer wässrigen Suspension aus 500 μl CTAB (16.4 mg, 45 μmol) gegeben und am Lyophilisator bis zur Trockene eingeengt. Der so erhaltene Feststoff wird zusammen mit DIEA (96.3 μl , 555 μmol) in DMF (1 ml) gelöst und zum festen Träger gegeben. Nach 3 Tagen wird der flüssige Anteil verworfen, die Festphase mit DMF (3 x 1 ml), Acetonitril (3 x 1 ml) und Dichlormethan (3 x 1 ml) gewaschen und im Vakuum (10^{-2} mbar) getrocknet

iii) Abspaltung des Peptids

Das an die feste Phase gebundene Peptid wird mit 600 μl Abspalllösung (TFA/*m*-Cresol, 4:1) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird die Festphase abfiltriert und mit wenig Abspalllösung gewaschen. Dabei kommt es zur Entschützung aller Boc-geschützten Aminofunktionen. Das Filtrat wird mit kaltem Diethylether (5 ml) versetzt (2.5 h bei 4 °C), wobei sich ein dunkelblauer Niederschlag bildet. Dieser wird abzentrifugiert, mit Diethylether (4 x 1 ml) gewaschen und das Peptid bei RT getrocknet. Zur Aufreinigung mittels HPLC wird es in Wasser aufgenommen.

Synthetisierte BHQ-Peptidkonjugate

Mit **L₁** = Verbindung **28** und **L₂** = Verbindung **20**.

mit	K ¹ = Fmoc-Lys(Boc)	N- α -Fmoc-N- ϵ -tert-Boc-L-Lysin
	K ² = Boc-Lys(Fmoc)	N- α -tert-Boc-N- ϵ -Fmoc-L-Lysin
	K ³ = Fmoc-Lys(Tfa)	N- α -Fmoc-N- ϵ -Trifluoracetyl-L-Lysin

Peptid 5 **L₂-K²-K¹K²GFSA-K-BHQ**

Ausbeute: 15.5 %

HPLC: **R_t** = 16.9 min

MALDI-TOF MS: C₉₈H₁₂₁EuN₂₅O₂₃S

[M-Eu³⁺+5H]⁺: berechnet: 2053.90 gefunden: 2053.88

Gespalten von Thermolysin

L₂-K²-K¹K²G

MALDI-TOF MS: C₅₂H₆₅EuN₁₃O₁₃S⁻

[M-Eu³⁺+5H]⁺: berechnet: 1116.49 gefunden: 1116.90

FSA-K-BHQ

MALDI-TOF MS: C₄₆H₅₈N₁₂O₁₁

[M+H]⁺: berechnet: 955.44 gefunden: 954.01

Unmarkiertes BHQ-Peptid **K²-K¹K²GFSA-K-BHQ**

MALDI-TOF MS: C₆₆H₉₆N₁₈O₁₆

[M+H]⁺: berechnet: 1397.59 gefunden: 1396.14

Peptid 6 **L₂-K²-K¹K¹GFSAK¹-K-BHQ**

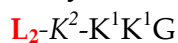
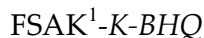
Ausbeute: 18.1 %

HPLC: **R_t** = 16.5 min

MALDI-TOF MS: C₁₀₅H₁₃₅EuN₂₇O₂₄S

[M-Eu³⁺+5H]⁺: berechnet: 2343.91 gefunden: 2194.07

HR-MS [ESI]: [M+3H]²⁺: berechnet: 1173.468 gefunden: 1173.4688

Gespalten von ThermolysinMALDI-TOF MS: C₅₃H₆₇EuN₁₃O₁₃S[M-Eu³⁺+5H]⁺: berechnet: 1130.51 gefunden: 1128.41MALDI-TOF MS: C₅₂H₇₀N₁₄O₁₂[M+H]⁺: berechnet: 1083.53 gefunden: 1084.11Unmarkiertes BHQ-Peptid K²-K¹K¹GSAK¹-K-BHQMALDI-TOF MS: C₇₂H₁₀₉N₂₁O₁₆[M+H]⁺: berechnet: 1524.84 gefunden: 1524.97HR-MS [ESI]: [M+H]⁺: berechnet: 1524.8439 gefunden: 1524.8446[M+2H]²⁺: berechnet: 762.9259 gefunden: 762.9256**Peptid 7** **L₂-K²-K²K²GSAK²K²-K-BHQ**

Ausbeute: 27.5 %

MALDI-TOF MS: C₁₁₁H₁₄₆EuN₂₉O₂₅S[M-Eu³⁺+5H]⁺: berechnet: 2322.12 gefunden: 2324.48Unmarkiertes BHQ-Peptid K²-K²K²GSAK²K²-K-BHQMALDI-TOF MS: C₇₈H₁₂₁N₂₃O₁₇[M+H]⁺: berechnet: 1653.94 gefunden: 1654.39**Peptid 8** **L₂-K²-K¹K¹GSAK¹K¹-K-BHQ**

Ausbeute: 16.3 %

MALDI-TOF MS: C₁₂₀H₁₆₃EuN₃₀O₂₆S[M-Eu³⁺+5H]⁺: berechnet: 2464.24 gefunden: 2461.12Unmarkiertes BHQ-Peptid K²-K¹K¹GSAK¹K¹-K-BHQMALDI-TOF MS: C₈₇H₁₃₈N₂₄O₁₈[M+H]⁺: berechnet: 1809.18 gefunden: 1808.08

Peptid 9 L_1-K^2 -GFSA-K-BHQMALDI-TOF MS: $C_{86}H_{97}EuN_{21}O_{21}S$ [M+H]⁺: berechnet: 1793.89 gefunden: 1793.33

In Wasser nicht löslich, daher keine Ausbeute berechenbar und nicht aufgereinigt durch HPLC.

Peptid 10 $L_1-K^2-K^1K^1$ GFSAK¹-K-BHQ

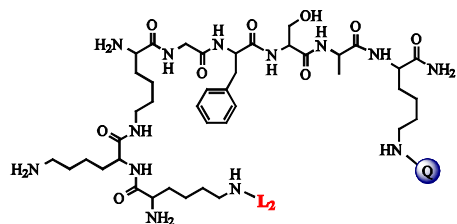
Ausbeute: 20.2 %

MALDI-TOF MS: $C_{104}H_{132}EuN_{27}O_{24}S$ [M-Eu³⁺+5H]⁺: berechnet: 2181.43 gefunden: 2184.03Unmarkiertes BHQ-Peptid $K^2-K^1K^1$ GFSAK¹-K-BHQMALDI-TOF MS: $C_{72}H_{108}N_{21}O_{16}$ [M+H]⁺: berechnet: 1524.84 gefunden: 1524.60**Peptid 11** Aminoethyl-K³K³K³GFLA-K-BHQ

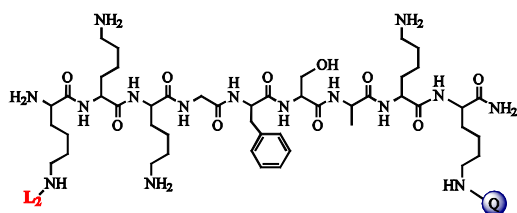
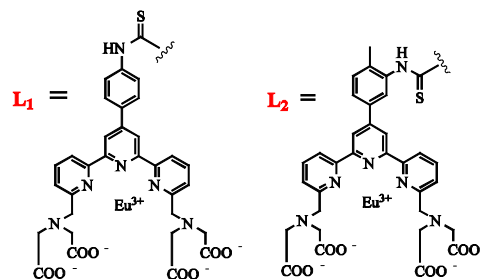
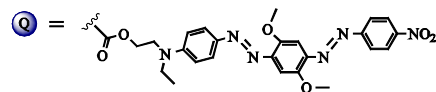
Ausbeute: 5.8 %

HPLC: $R_t = 12.65$ minMALDI-TOF MS: $C_{81}H_{111}F_9N_{20}O_{18}$ [M+H]⁺: berechnet: 1824.86 gefunden: 1823.63HR-MS [ESI]: [M+H]⁺: berechnet: 1823.8320 gefunden: 1823.8307

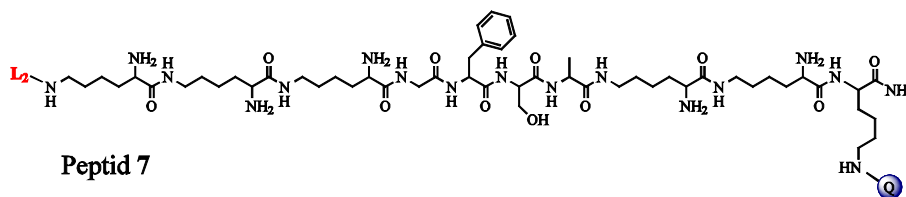
5.4.4 Übersicht der synthetisierten BHQ-Peptidkonjugate



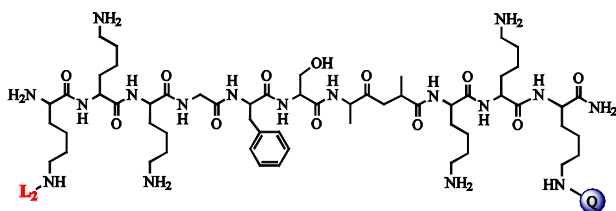
Peptid 5



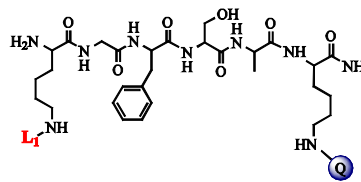
Peptid 6



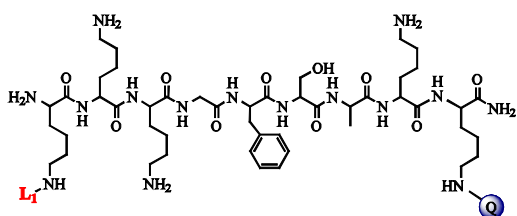
Peptid 7



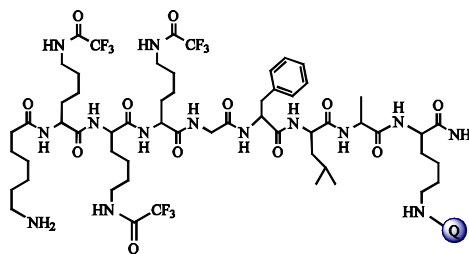
Peptid 8



Peptid 9



Peptid 10



Peptid 11

5.5 Durchführung der UV-Messungen

Die kinetischen Parameter der Zink(Terpyridin)₂-Komplexe sowie der Zink(Bis-Terpyridin-Peptide **1 - 4**) wurden über die Absorptionsabnahme der charakteristischen Zink(Tpy)₂-Banden über die Zeit ermittelt. Hierfür werden die jeweiligen Terpyridinderivate in 10 mM MOPS-Puffer (pH 7) vorgelegt und die Basislinie aufgenommen. Die Zugabe eines Äquivalents ZnSO₄ bewirkte die Bildung der jeweiligen Komplexe, was sich in einer Absorptionzunahme bei 333 nm bzw. 322 nm widerspiegelte. Bei Zugabe des Liganden TPEN wurde die kinetische Messung des Spektrums von 310 nm bis 340 nm gestartet und solange gemessen, bis die Absorption vollständig auf den Wert der reinen Terpyridinderivate abgenommen hatte und somit Zink vollständig aus den jeweiligen Komplexen extrahiert wurde. Durch Auftragen der Absorption bei 333 nm bzw. 322 nm gegen die Zeit konnten so Halbwertszeiten und Dissoziationskonstanten ermittelt werden.

5.6 Durchführung der Spaltexperimente mit MALDI-TOF MS

Die Spaltexperimente zur Untersuchung des Einflusses organischer Liganden auf die Reaktivität von Thermolysin gegenüber diesen Substraten wurden über MALDI-TOF MS verfolgt. Dazu wurde das jeweilige Peptid (23.5 µM) mit Thermolysin (200 nM, Stammlösung in 50 mM Tris-Puffer (pH 7.5) mit 10 mM CaCl₂) versetzt und die Proben in gewissen Zeitabständen untersucht.

5.7 Konzentrationsbestimmungen

5.7.1 Bis-Terpyridin-Peptidkonjugate

Die Bestimmung der Konzentration dieser Konjugate erfolgte ausschließlich über ihre Titration mit Zink(II) und Kupfer(II). Im Falle von Zink wurde das Metallion solange zugegeben, bis sich die Absorption bei 322 nm nicht mehr signifikant erhöhte. Der Äquivalenzpunkt der Kupfertitration ist erreicht, sobald die Absorption bei 312 nm wieder abnimmt und sich langsam zu verschieben beginnt. Der Mittelwert beider Äquivalenzpunkttitrationsen wurde so zur Konzentrationsbestimmung über das LAMBERT-BEERSCHE-Gesetz herangezogen.

5.7.2 PNA- und DNA-Konjugate

Die Konzentration der PNA- und DNA-Konjugate wurde über die Absorption der Nucleobasen bei 260 nm bestimmt. Je nach Modifikation wird zum errechneten Extinktionskoeffizienten der Oligonucleotide der spezifische Extinktionskoeffizient der Modifikation bei 260 nm addiert (DABCYL $\epsilon = 11\,100\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, BHQ-2 $\epsilon = 8\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5.7.3 BHQ-Peptidkonjugate

Die Konzentrationsbestimmung der BHQ-modifizierten Peptide erfolgte ausschließlich über die Absorption des Black Hole Quenchers-2 bei 579 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $38\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Das Vorliegen einer Mischung aus mit Europium-markiertem und nur mit BHQ-modifiziertem Peptid wurde nicht berücksichtigt.

5.8 Thermolysin

5.8.1 Maßnahmen zur Vermeidung von Metallkontaminationen

Generell wurden alle Puffer und Stammlösungen in Plastikflaschen aufbewahrt, die vorher mit 30 %-iger Salpetersäure und metallfreiem Wasser gespült wurden. Zum Ansetzen der Dialyse- und Gelfiltrationspuffer wurde metallfreies Wasser über die Säulentechnik mit Chelex 100[®] erhalten und die Puffer mit Dithizon (Diphenylthiocarbazon) in Chloroform ausgeschüttelt. Zudem wurden nur metallfreie Pipettenspitzen, Plastikspatel und Plastikpinzetten verwendet sowie der Einsatz von Glasgeräten vermieden. Das für alle Reaktionen mit Apoenzymen genutzte Wasser war von TraceSelectUltra Qualität.

Bei Arbeiten mit immobilisiertem Apothermolysin wurde der Waschpuffer Tris-Puffer (50 mM, pH 7.5), NaCl (1M) mit NOTP (100 nM bzw. 10 nM) über Nacht geschüttelt und alle Plastikreaktionsgefäße eine Nacht mit Tris-Puffer (50 mM, pH 7.5), NaCl (1M) und NOTP (100 nM) inkubiert.

5.8.2 Inaktivierung von Thermolysin durch Dialyse ^[185]

10 mg Thermolysin *Bacillus thermolproteolyticus rokko* (E.C.3.4.24.4) werden mehrmals in je 300 µl Wasser suspendiert und zentrifugiert und anschließend in 1 ml Tris-Puffer (0.05 M, pH 7.5) mit CaCl₂ (0.01 M) und NaBr (5 M) aufgenommen und mit 1 M NaCl-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 1.5 ml gebracht. Diese Lösung wird in einen Dialyseschlauch (Dialysemembran Spectra/Por[®]7 MWCO 3500 der Firma Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA)) gefüllt und 24 h gegen eine Lösung des gleichen Puffers mit CaCl₂ (0.01 M), NaCl (1 M) und 1,10-Phenanthrolin Hydrochlorid (2 mM) bei 4 °C gerührt. Dabei erfolgt alle 8 Stunden der Austausch der 1,10-Phenanthrolin-Lösung. Zum Entfernen des Chelatliganden wird eine zweite Dialyse ohne 1,10-Phenanthrolin durchgeführt. Anschließend wird das Apoenzym dem Dialyseschlauch entnommen und Konzentrations- sowie Aktivitätsmessungen am UV/Vis-Spektrometer durchgeführt. Hierbei diente FAGLA als Thermolysin-substrat ($\Delta\lambda = 345 \text{ nM}$). Trotz Zugabe eines Überschusses an Zink (II) konnte keine Aktivität festgestellt werden.

5.8.3 Inaktivierung von Thermolysin durch Gelfiltration

Da die beschriebene Dialyse mehrere Tage dauerte, sollte ausgeschlossen werden, dass es innerhalb dieser Zeit zur Autoproteolyse des Enzyms kommt. Daher wurde eine von FEDER *et al* ^[188] beschriebene schnelle Methode zur Inaktivierung von Thermolysin durchgeführt. Eine Sephadexsäule (G-25, DNA Grade, Amersham Biosciences) wird mit HEPES-Puffer (0.01 M, pH 7.2), CaCl₂ (0.01 M) und 1,10-Phenanthrolin (2 mM) nach einem Protokoll des Herstellers äquilibriert. Thermolysin (2 mg) wird im gleichen Puffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die gesammelten Fraktionen werden durch UV/Vis-Spektrometrie auf ihren Proteingehalt untersucht und die vereinigten Fraktionen zur Entfernung des Chelatliganden auf eine weitere äquilibrierte Säule, ohne Chelatliganden, gegeben. Die so erhaltene Apoenzymlösung konnte jedoch trotz kurzer Inaktivierungsdauer nicht durch Zugabe von Zink reaktiviert werden.

5.8.4 Immobilisierung an Eupergit C[®]

25 mg Thermolysin von *Bacillus thermolproteolyticus rokko* (E.C.3.4.24.4) werden in HEPES-Puffer (1.0 M, 15 ml, pH 7.4) und CaCl₂ (1 mM) gelöst. Dazu werden 250 mg Eupergit C[®] gegeben und die weiße Suspension in einem Plastikdöschen bei 4 °C gerührt. Nach 72 h wird das immobilisierte Thermolysin über einen Cellulosefilter abfiltriert und drei Mal jeweils 8 h bei 4 °C in Tris-Puffer (100 mM, 15 ml, pH 7.5) mit CaCl₂ (0.5%) gewaschen, um nichtreagierte Epoxygruppen zu deaktivieren. Die Suspension wird abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die feste Phase im Vakuum getrocknet. Man erhält ein weißes Pulver, dessen mittlere Beladung mittels Konzentrationsbestimmung des nichtgebundenen Thermolysins bei 46.2 mg/g Eupergit C[®] liegt.

5.8.5 Inaktivierung des immobilisierten Thermolysins

6 mg des an Eupergit C[®] immobilisierten Thermolysins werden über Nacht bei 4 °C in 1 ml 40 mM Tris-Puffer (pH 7.5) mit 2 mM NOTP und 800 mM NaCl gerührt. Die Apoenzymsuspension wird abzentrifugiert und der Deaktivierungspuffer bis auf 200 µl entfernt. Dies entspricht bei mittlerer Beladung von 46.2 mg/g einer Thermolysinkonzentration von 4 µM. Aus dieser Stammlösung werden für die jeweiligen Versuche 10 µl (0.57 µM Thermolysin) entnommen.

5.9 Durchführung der Fluoreszenzmessungen

5.9.1 Thermolysinnachweis

In einer Fluoreszenzküvette (50 μ l Messzelle) wird das jeweilige Substrat in 2 mM Tris-HCl und 40 mM NaCl (pH 7.5, bei 23 °C) vorgelegt und Thermolysin nach einigen Minuten dazugegeben, so dass das Gesamtvolumen der Probelösung 70 μ l beträgt. Während Stammlösungen von Thermolysin in 40 mM Tris-HCl und 10 mM CaCl₂ bei pH 7.5 und 23 °C vorbereitet werden, wird MOCac in DMSO gelöst und mit Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt, wobei der DMSO-Anteil in allen Messungen 0.3% beträgt. Die synthetisierten Peptide **6 - 8** werden in Wasser gelöst. Die Messung der Lanthanidlumineszenz erfolgt im zeitaufgelösten Modus, mit einer Anregungswellenlänge von 295 nm, einer Emissionswellenlänge von 617 nm und einer Verzögerungszeit (Delay Time) von 0.1 ms. Die Detektorspannung (PMT-Spannung) wird in Abhängigkeit der Substratkonzentration zwischen 600 V und 800 V gewählt. MOCac wird bei 328 nm angeregt und der Anstieg der Emission bei 388 nm gemessen. Durch Korrelation des relativen Fluoreszenzsignals mit der Konzentration an gespaltenem Peptid wird die Änderung der Fluoreszenz über die Zeit in die Reaktionsgeschwindigkeit v umgerechnet. Dabei wird angenommen, dass die gemessene Fluoreszenz des durch die Spaltung entstehenden Peptideuropiumkomplexes der Fluoreszenz des Isothiocyanatkomplexes (Verbindung **20**) entspricht. Alle kinetischen Untersuchungen stellen den Mittelwert von mindestens drei Messungen dar.

5.9.2 Einfacher DNA-Nachweis

Zur Untersuchung der Ringbildung modifizierter PNA mit Europium(III) als allosterischen Effektor werden das Lanthanid und der jeweilige Sensitizer vorgelegt und die daraus resultierende Fluoreszenz zeitaufgelöst aufgenommen. Die Anregungswellenlänge variiert in Abhängigkeit der Sensitizer mit 270 nm für DPA und 339 nm für Verbindung **30** bzw. **31**. Die Zugabe der modifizierten PNA führt, bei ausreichender Konzentration, durch Ausbilden eines PNA-Lanthanidrings zur sofortigen Löschung des Signals. Der gebildete Ring lässt sich durch Zugabe von komplementärer DNA öffnen und hat die Wiederherstellung des fluoreszenten Signals auf einen Wert von ca. 41% zur Folge.

Aufgrund von Aggregation der PNA durch häufiges Auftauen und Einfrieren der Stammlösung sowie des Ausbildens von linearen Strukturen, waren die Daten über

einen längeren Zeitraum nicht reproduzierbar. Daher wurde in allen weiteren Versuchen zu Beginn des Nachweises die jeweilige PNA mit der zu untersuchenden DNA hybridisiert. Dafür wird die Reaktionslösung je drei Mal bei konstanter Heiz- und Abkühlrate (13 °C/min) auf 90 °C erwärmt und auf 25 °C abgekühlt. Dies soll die Aggregate lösen und ihre Hybridisierung mit der Ziel-DNA erleichtern. Nach Inkubation der Lösung über 40 Minuten bei 17 °C wird zunächst Europium dazugegeben und erst 1.5 Minuten später der Sensitizer (Verbindung **30, 31**). Mit komplementärer DNA bildet sich ein starres Hybrid, das Lanthanid wird nicht vollständig abgeschirmt und es kann sich ein lumineszenter Sensitizer-Lanthanid-komplex bilden. In Anwesenheit von scrambled DNA kommt es zur Ringbildung und Abschirmung des Metallions, so dass kein Signal zu detektieren ist.

5.9.3 Signalamplifikation

Zunächst wird die Apoenzym-Suspension (6 mg Thermolysin/Eupergit C[®] auf 1 ml Deaktivierungspuffer) abzentrifugiert und der Überstand bis auf 200 µl eingengt. Jeweils 5 µl der Suspension werden auf Low Retention Eppendorftubes (200 µl) verteilt und das Apoenzym durch Waschen mit Tris-Puffer (50 mM, pH 7.5, 1 M NaCl, 100 nM NOTP und 10 nM NOTP) von überschüssigem NOTP befreit. Nach Abzentrifugieren und Entfernen des überschüssigen Waschpuffers bis auf 10 µl, werden 50 µl TSU Wasser sowie zur Reaktivierung 5 µl der entsprechenden Zink- oder DNA-Lösung gegeben.

Die DNA-Lösung setzt sich aus der Tpy₂DNA-Sonde (1 µM), der zu untersuchenden Target-DNA und Zink(II) (1 µM) in Tris-Puffer (0.03 M, pH 7.5) mit NaCl (0.6 M) zusammen. Zur Erleichterung der Hybridisierung werden die jeweiligen Lösungen (5 µl) kurz auf 85 °C geheizt und über einen Zeitraum von 30 min langsam auf 20 °C abgekühlt. Nach 20 Minuten bei 20 °C können sie auf die jeweiligen gewaschenen wässrigen Apoenzym-suspensionen gegeben werden. Da die Reaktivierung aufgrund der Immobilisierung nur langsam und unvollständig verläuft, werden die Lösungen vor Zugabe des lumineszenten Peptidsubstrats (50 µM) 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösungen über Spritzenfilter werden sie in schwarzwandigen Fluoreszenzküvetten (50 µl Messzelle) auf ihre Lumineszenz untersucht. Zum Vergleich der Deaktivierung und Reaktivierung des Enzyms wird stets auch eine Blindprobe des Apoenzym mit Wasser und Substrat gemessen. Das fluoreszente Substrat MOCac wird in DMSO gelöst und so verdünnt, dass der Anteil an DMSO in der Reaktionslösung 0.5 % beträgt. NOTP wurde von Dipl. Chem. Birgit Thaler, die DNA-Sonde von Dipl. Chem. Arnd Sprödefeld zur Verfügung gestellt.

5.9.4 Eingesetzte PNA/DNA-Sequenzen

5.9.4.1 Einfacher DNA-Nachweis

PNA 1, 2, 5, 6	5'- TCA CAA CTA -3'
cDNA	5'- TAG TTG TGA -3'
mmDNA	5'- TAG TT <u>C</u> TGA -3'
cDNA 3 Basen Überhang	5'- <u>AAC</u> TAG TTG TGA -3'
cDNA 3 Basen Überhang beide Seiten	5'- <u>AAC</u> TAG TTG TGA <u>CAA</u> -3'
cDNA 6 Basen Überhang	5'- <u>AAC AAC</u> TAG TTG TGA -3'
scrDNA 1	5'- ACT CCA CAC -3'
scrDNA 2	5'- TGT AAC TGA GGT AAG AGG -3'

5.9.4.2 Signalamplifikation

DNA-Sonde	5'- Tpy -ATC GTT ACC AAA GCA TCG T- Tpy -3'
cDNA	5'- TAC GAT GCT TTG GTA ACG AT -3'
mmDNA	5'- TAC GAT GCT TTG GTA A <u>T</u> G AT -3'

6 Literaturverzeichnis

- [1] J.D. Watson, F.H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737.
- [2] J.A. Robinson, *CHE 172: Organische Chemie für die Biologie*, **2009**, www.oci.uzh.ch/edu/lectures/material/AC_BII/.
- [3] P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497.
- [4] F. Pellestor, P. Paulasova, M. Macek, S. Hamamah, *Human Reproduction* **2004**, 19, 1946.
- [5] F. Pellestor, P. Paulasova, *Int. J. Mol. Med.* **2004**, 13, 521.
- [6] P.E. Nielsen, M. Egholm, *Peptide nucleic acids: Protocols and Applications*, Horizon scientific press ed., Wymondham, **1999**.
- [7] P. Wittung, P. Nielsen, B. Norden, *Biochemistry* **1997**, 36, 7973.
- [8] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D.W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2979.
- [9] T. Ljungstrom, H. Knudsen, P.E. Nielsen, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 965.
- [10] A. Füßl, A. Schleifenbaum, M. Göritz, A. Riddell, C. Schultz, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5986.
- [11] C.V. Jongeneel, J. Bouvier, A. Bairoch, *FEBS Lett.* **1989**, 242, 211.
- [12] B.W. Matthews, J.N. Jansonius, P.M. Colman, B.P. Schoenborn, D. Dupourque, *Nat. New Biol.* **1972**, 238, 37.
- [13] P.M. Colman, J.N. Jansonius, B.W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **1972**, 70, 701.
- [14] B.W. Matthews, L.H. Weaver, W.R. Krester, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 8030.
- [15] D.R. Holmes, B.W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **1982**, 160, 623.
- [16] B.W. Matthews, *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 333.
- [17] B.W. Matthews, J.N. Jansonius, P.M. Colman, B.P. Schoenborn, D. Dupourque, *Nature* **1972**, 238, 37.
- [18] C.A. McPhalen, N.C.J. James, M.N.G. James, *Adv. Protein Chem.* **1991**, 42, 77.
- [19] A. Fontana, *Biophys. Chem.* **1988**, 29, 181.
- [20] N.J.C. Strynadka, M.N.G. James, *Curr. Opinion Struct. Biol.* **1991**, 1, 905.
- [21] J. Feder, L.R. Garrett, B.S. Wildi, *Biochemistry* **1971**, 10, 4552.
- [22] F.W. Dahlquist, J.W. Long, W.L. Bigbee, *Biochemistry* **1976**, 15, 1103.
- [23] G. Parkin, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 699.
- [24] O.A. Adekoya, I. Sylte, *Chem. Biol. Drug Des* **2009**, 73, 7.
- [25] M.K. Pangburn, K.A. Walsh, *Biochemistry* **1975**, 14, 4050.
- [26] D.W. Christianson, W.N. Lipscomb, *Acc. Chem. Res.* **1989**, 22, 62.
- [27] W.R. Krester, B.W. Matthews, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 7704.
- [28] D.E. Tronrud, S.L. Roderick, B.W. Matthews, *Matrix Metalloproteinase Conf.* **1992**, 107.
- [29] S. Alvarez-Santos, A. Gonzalez-Lafont, J.M.Lluch, B. Oliva, F.X. Aviles, *Can. J. Chem.* **1994**, 72, 2077.
- [30] V. Pelmeshnikov, M.R.A. Blomberg, P.E. Siegbahn, *Inorg. Chem.* **2002**, 7, 284.
- [31] W.N. Lipscomb, N. Sträter, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2375.
- [32] D.G. Hangauer, A.F. Monzingo, B.W. Matthews, *Biochemistry* **1984**, 23, 5730.
- [33] W.L. Mock, J.Z. Zhang, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 6393.
- [34] W.L. Mock, D.J. Freeman, M. Aksamawati, *Biochem. J.* **1993**, 289, 185.
- [35] W.L. Mock, X. Xu, *Bioorg. Chem.* **1994**, 22, 373.
- [36] W.L. Mock, D.J. Stanford, *Biochemistry* **1996**, 35, 7369.
- [37] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27, 157.
- [38] A.P. Damoglou, H. Lindley, L.W. Stapleton, *Biochem. J.* **1971**, 123, 379.
- [39] J. Feder, J.M. Schuck, *Biochemistry* **1970**, 9, 2784.

- [40] K. Morihara, H. Tsuzuki, *Eur. J. Biochem.* **1970**, *15*, 374.
- [41] H. Matsubara, R. Sasaki, A. Singer, T.H. Jukes, *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, *115*, 324.
- [42] K. Morihara, T. Oka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *30*, 625.
- [43] H. Matsubara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *24*, 427.
- [44] H. Ooshima, H. Mori, Y. Harano, *Biotechnol. Lett.* **1985**, *7*, 789.
- [45] M.B. Rao, A. M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1998**, *62*, 597.
- [46] A.W. Smith, B. Chahal, G.L. French, *Mol. Microbiol.* **1994**, *13*, 153.
- [47] K. Hiraga, *J. Biochem.* **1999**, *125*, 202.
- [48] R.A. Finkelstein, L.F. Hanne, *Infect. Immun.* **1982**, *36*, 1199.
- [49] B.A. Booth, M. Boesman-Finkelstein, R.A. Finkelstein, *Infect. Immun.* **1983**, *42*, 639.
- [50] 2ed. (Eds.: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey), Wiley -VCH, Weinheim, **2006**, 556.
- [51] E. Katchalski-Katzir, D.M. Kraemer, *J. Mol. Cat. B* **2000**, *10*, 157.
- [52] T. Boller, C. Meier, S. Menzler, *Org. Proc. Res. Development* **2002**, *6*, 509.
- [53] C. Mateo, G. Fernandez-Lorente, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente, J. M.Guisan, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 739.
- [54] C. Mateo, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente, J. M.Guisan, *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 509.
- [55] M.J. Hernaiz, D.H.G. Crout, *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 26.
- [56] M. Pennewiss, H. Knoell, H. Masanek, Vol. DE2009218C3 (Ed.: Roehm), Germany, **1970**.
- [57] J.-C. Bünzli, C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048.
- [58] D. Parker, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 109.
- [59] A. Dossing, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 1425.
- [60] J.-C. Bünzli, *Met. Ions Biol. Syst.* **2004**, *42*, 39.
- [61] C. Turro, P.K.-L. Fu, P.M. Bradley, *Met. Ions Biol. Syst.* **2003**, *40*, 323.
- [62] P.G. Sammes, G. Yahiolglu, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *1*.
- [63] J.-C. Bünzli, *Chem. Lett.* **2009**, *38*, 104.
- [64] P.R. Selvin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, *31*, 275.
- [65] D. Parker, J.A.G. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 3613.
- [66] E.G. Moore, A.P.S. Samuel, K.N. Raymond, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 542.
- [67] H.F. Brito, O.S. Malta, J.F.S. Menezes, *J. Alloys of Compounds* **2000**, *304*, 336.
- [68] I. Hemmilä, M.V. Mukkala, M. Latva, P.J. Kiilholma, *Biochem. Biophys. Methods* **1993**, *26*, 283.
- [69] H. Takalo, V.M. Mukkala, H. Mikola, P. Liiti, I. Hemmilä, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 278.
- [70] V.M. Mukkala, J. Kankare, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1578.
- [71] J.M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 1304.
- [72] V.-M. Mukkala, M. Helenius, I. Hemmilä, J. Kankare, H. Takalo, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1361.
- [73] A.P.-d. Silva, H.Q.M. Gunaratne, T.E. Rice, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2116.
- [74] K. Mitrinen, K. Petersson, T. Piironen, T. Björk, H. Lilja, T. Lövgren, *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1115.
- [75] V.M. Mukkala, P. Litti, I. Hemmilä, H. Takalo, C. Matachescu, J. Kankare, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 295.
- [76] M. Remuinan, H. Roman, M. Alonso, J. Rodriguez-Ubis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2* **1993**, 1099.
- [77] N. Sato, N. Shinkai, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2* **1993**, 621.
- [78] N. Sabbatini, M. Guardigli, A. Mecati, V. Balzani, R. Ungaro, E. Ghidini, A. Casnati, A. Pochini, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 818.

- [79] B. Alpha, J.-M. Lehn, G. Mathis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, 26, 266.
- [80] G. Blasse, G. Dirksen, N. Sabbatini, S. Perathorner, J.-M. Lehn, J.M. Alpha, B. Alpha, *J. Phys. Chem.* **1998**, 92, 2419.
- [81] C. Turro, P.K.-L. Fu, P. Bradley, *Met. Ions Biol. Syst.* **2003**, 40, 323.
- [82] S.P. Fricker, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 524.
- [83] D. Parker, R.S. Dickins, H. Puschmann, C. Crossland, J.A.K. Howard, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 1977.
- [84] C.P. Montgomery, B.S. Murray, E.J. New, R. Pal, D. Parker, *Acc. Chem. Res.* **2009**, ASAP Section 03.02.09.
- [85] T. Förster, *Faraday Soc.* **1959**, 27, 7.
- [86] D.L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 836.
- [87] S. Shinoya, W.M. Yen, in *Phosphor Handbook*, CRC Press Inc, Boca Raton, FL, **1999**, 33431.
- [88] J. Kido, Y. Okamoto, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 2357.
- [89] D. Parker, Y. Bretonniere, *Ernst Schering Res Found Workshop* **2005**, 49, 123.
- [90] M. Vasseur, R. Fraugne, F. Alvarado, *Am. J. Physiol.* **1993**, 264, C27.
- [91] J.L. Yuan, G.L. Wang, H. Kimura, K. Matsumoto, *Anal. Biochem.* **1997**, 254, 283.
- [92] P.R. Andres, R. Lunkwitz, G.R. Pabst, K. Böhn, D. Wouters, S. Schmatloch, U.S. Schubert, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3769.
- [93] U.S. Schubert, C. Eschbaumer, O. Hien, P.R. Andres, *Tet. Lett.* **2001**, 42, 4705.
- [94] M. Göritz, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 18016.
- [95] M. Göritz, Dissertation, Universität Heidelberg (Heidelberg), **2006**.
- [96] F. Zelder, Dissertation, Universität Heidelberg (Heidelberg), **2003**.
- [97] M.A. Williams, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 1151.
- [98] S. Quici, M. Cavazzini, G. Marzanni, G. Accorsi, N. Armaroli, B. Ventura, F. Barigelletti, *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 529.
- [99] J. Wang, G.S. Hanan, *Synlett* **2005**, 8, 1251.
- [100] F. Kröhnke, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 181.
- [101] L.C. King, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, 66, 894.
- [102] W. Ried, H. Bender, *Chem. Ber.* **1956**, 89, 1893.
- [103] J. Coates, P.G. Sammes, R.M. West, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2* **1996**, 1275.
- [104] M.E. Cooper, P.G. Sammes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2* **2000**, 1695.
- [105] J. Coates, P.G. Sammes, R.M. West, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2* **1996**, 1283.
- [106] C.E. Outten, T.V. O'Halloran, *Science* **2001**, 292, 2488.
- [107] A. Sprödefeld, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (Heidelberg), **2006**.
- [108] N. Graf, Dissertation, Universität Heidelberg (Heidelberg), **2006**.
- [109] T. Ligné, E. Pauthe, J.-P. Monti, G. Gacel, V. Larreta-Garde, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1337, 143.
- [110] S. Weimer, K. Oertel, H.-L. Fuchsbaauer, *Anal. Biochem.* **2006**, 352, 110.
- [111] C.-M. Kam, N. Nishino, J.C. Powers, *Biochemistry* **1979**, 18, 3032.
- [112] R.S. Rush, M. Mitas, J.C. Powers, T. Tanaka, L.B. Hersh, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1984**, 231, 390.
- [113] W. Gottlieb, S. Meizel, *J. Andrology* **1987**, 8, 24.
- [114] H. C. Rempel, L. Pulliam, *AIDS* **2005**, 19, 127.
- [115] N. Nishino, J.C. Powers, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 3482.
- [116] D.I. Mundy, W.J. Strittmacher, *Cell* **1985**, 40, 645.
- [117] M. Zimmerman, B. Ashe, E. Yurewicz, G. Patel, *Anal. Biochem.* **1977**, 78, 41.
- [118] M. Zimmerman, J.P. Quigley, B. Ashe, C. Dorn, R. Goldfarb, W. Troll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, 75, 750.

- [119] R.A. Mumford, A.W. Strauss, J.C. Powers, P.A. Pierzchala, N. Nishino, M. Zimmerman, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 2227.
- [120] R.A. Mumford, P.A. Pierzchala, A.W. Strauss, M. Zimmerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, 78, 6623.
- [121] M. G. Spillantini, A. Panconesi, P.L. Del Bianco, F. Sicuteri, *Neuropeptides* **1986**, 8, 111.
- [122] J. O'Donnell-Tormey, J.P. Quigley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**, 80, 344.
- [123] Y. Muta, K. Inouye, *J. Biochem.* **2002**, 132, 945.
- [124] H. Oneda, Y. Muta, K. Inouye, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68, 1811.
- [125] C.G. Knight, F. Willenbrock, G. Murphy, *FEBS Lett.* **1992**, 296, 263.
- [126] J.P.M. Ian D. Clark, Arthur G. Szabo, *Clin. Biochem.* **1995**, 28, 131.
- [127] J. Karvinen, P. Hurskainen, S. Gopalakrishnan, D. Burns, U. Warrior, I. Hemmilä, *J. Biomol. Screening* **2002**, 7, 223.
- [128] J. Karvinen, V. Laitala, M.-L. Mäkinen, O. Mulari, J. Tamminen, J. Hermonen, P. Hurskainen, I. Hemmilä, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1429.
- [129] J. Karvinen, A. Elomaa, M.-L. Mäkinen, H. Hakala, V.-M. Mikkala, J. Peuralahti, P. Hurskainen, J. Hovinen, I. Hemmilä, *Anal. Biochem.* **2004**, 325, 317.
- [130] S.-S. Mao, J. DiMuzio, C. McHale, C. Burlein, D. Olsen, S.S. Carroll, *Anal. Biochem.* **2008**, 373, 1.
- [131] S. Mizukami, K. Tonai, M. Kaneko, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14376.
- [132] P. Dahlen, P. Hurskainen, T. Lövgren, *Nonisotopic DNA Probe Techniques* **1992**, 19, 1057.
- [133] E.P. Diamandis, T.K. Christopoulos, *Nonisotopic DNA Probe Techniques* **1992**, 263.
- [134] O. Prat, E. Lopez, G. Mathis, *Anal. Biochem.* **1991**, 195.
- [135] K. Hashino, M. Ito, K. Ikawa, C. Hosoya, T. Nishioka, K. Matsumoto, *Anal. Biochem.* **2006**, 355, 278.
- [136] P. Hurskainen, P. Dahlen, P. Ylikoski, M. Siitara, T. Lövgren, *Nuc. Ac. Res.* **1991**, 19, 1057.
- [137] C. Sund, J. Ylikoski, P. Hurskainen, M. Kwiatkowski, *Nucleosides and Nucleotides* **1988**, 7, 655.
- [138] R.A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, D.E. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85, 8790.
- [139] J.G. Wetmur, I. Stavrianopoulos, E. Rabbani, S. Abrahams, in *European Patent, Vol. EP 0242527*, **1987**.
- [140] P.R. Selvin, T.M. Rana, J.E. Hearst, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116.
- [141] P.R. Selvin, J.E. Hearst, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 10024.
- [142] A. Oser, G. Valet, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 1167.
- [143] G. Wang, J. Yuan, K. Matsumoto, Z. Hu, *Anal. Biochem.* **2001**, 299, 169.
- [144] M.K. Johansson, R.M. Cook, J. Xu, K.N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16451.
- [145] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.t. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich, *Science* **1988**, 239, 487.
- [146] B. Schweitzer, S. Kingsmore, *Curr. Op. Biotech.* **2001**, 12, 21.
- [147] R.M. Dirks, N.A. Pierce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 15275.
- [148] T.M. Swager, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 201.
- [149] T. Kim, T.M. Swager, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4803.
- [150] H.A. Ho, K. Doré, M. Boissinot, M.G. Bergeron, R.M. Tanguay, D. Boudreau, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12673.
- [151] Q. Wu, E.V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14682.
- [152] L. Kovbasyuk, R. Krämer, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3161.
- [153] I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7849.
- [154] N.C. Gianneschi, S.T. Nguyen, C.A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1644.
- [155] L. Zhu, E.V. Anslyn, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1208.
- [156] N. Graf, M. Göritz, R. Krämer, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4117.

- [157] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 770.
- [158] F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3548.
- [159] R.R. Breaker, *Curr. Op. Biotech.* **2002**, *13*, 31.
- [160] A. Villaverde, *FEBS Lett.* **2003**, *554*, 169.
- [161] A. Saghatelian, K.M. Guckian, D.A. Thayer, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 344.
- [162] S. Sando, T. Sasaki, K. Kanatani, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15720.
- [163] Y. Xiao, V. Pavlov, T. Niazov, A. Dishon, M. Kotier, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7430.
- [164] P. Simon, C. Dueymes, M. Fontecave, J.-L. Décout, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2824.
- [165] V. Pavlov, B. Shlyahovsky, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6522.
- [166] Y. Weizmann, Z. Cheglakov, V. Pavlov, I. Willner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2296.
- [167] N. Graf, R. Krämer, *Chem. Commun.* **2006**, 4375.
- [168] J.J. Li, Y. Chu, B.Y.-H. Lee, X.S. Xie, *Nuc. Ac. Res.* **2008**, *36*, e36.
- [169] F. Patolsky, R. Gill, Y. Weizmann, T. Mokari, U. Banin, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13918.
- [170] T. Niazov, V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, I. Willner, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1683.
- [171] M.N. Stojanovic, P.d. Prada, D.W. Landry, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 411.
- [172] J.S. Hartig, I. Grüne, S.H. Najafi-Shoushtari, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 722.
- [173] S. Sando, A. Narita, K. Abe, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5300.
- [174] M. Zivarts, Y. Liu, R.R. Breaker, *Nuc. Ac. Res.* **2005**, *33*, 622.
- [175] S. Tyagi, F.R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1991**, *14*, 303.
- [176] I. Hamachi, Y. Tajiri, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7437.
- [177] J.L. Czapinski, T.L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8618.
- [178] L. Zapata, K. Bathany, J.-M. Schmitter, S. Moreau, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1022.
- [179] T. Ihara, Y. Takeda, A. Jyo, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1772.
- [180] E. Meggers, P.L. Holland, W.B. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714.
- [181] I. Horsey, Y. Krishnan-Ghosh, S. Balasubramanian, *Chem. Commun.* **2002**, 1950.
- [182] J.S. Choi, C.W. Kang, K. Jung, J.W. Yang, Y.-G. Kim, H. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8606.
- [183] D. Mitra, N.D. Cesare, H.F. Sleiman, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5928.
- [184] K.V. Gothelf, A. Thomsen, M. Nielsen, E. Cló, R.S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1044.
- [185] B. Holmquist, B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 4601.
- [186] F.W. Wagner, *Methods in Enzymology* **1988**, *158*, 21.
- [187] A.O. Udom, F.O. Brady, *Biochem. J.* **1980**, *187*, 329.
- [188] J. Feder, L.R. Garrett, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 943.
- [189] J. Feder, L.R. Garrett, D. Kochavi, *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *235*, 370.
- [190] M. Tajima, I. Urabe, K. Yutani, H. Okada, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *64*, 243.
- [191] M.K. Pangburn, Y. Burstein, P.H. Morgan, K.A. Walsh, H. Neurath, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *54*, 371.
- [192] M.I. Kabachnik, A.N. Nesmeyanov, *Phosphorous, Sulfur and Silicon* **1990**, *49/50*, 397.
- [193] B. Thaler, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (Heidelberg), **2006**.
- [194] M. Bakker, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 622.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

„Lanthanide-based fluorogenic peptide substrate for the highly sensitive detection of thermolysin“

Ann-Kathrin Marguerre, Roland Krämer, Bioorg. Med. Chem. Lett., eingereicht.

Posterpräsentationen

„DNA-detection by lanthanide binding PNA-probes“

Ann-Kathrin Marguerre, Roland Krämer

Posterbeitrag bei der IC08 (Inorganic Chemistry Conference)

14.-18. Dezember 2008 in Christchurch (Neuseeland).

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Roland Krämer für das sehr interessante und individuelle Thema meiner Doktorarbeit, für die gute Betreuung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Bei *Dr. Andriy Mokhir* bedanke ich mich sehr herzlich für sein offenes Ohr und seine Hilfsbereitschaft bei technischen und chemischen Problemen.

Dem gesamten Arbeitskreis Krämer danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft. Besonders bedanken möchte ich mich bei *Dumitru Arian, Katharina Brühl, Lilia Clima, Subrata Dutta, Anabelle Fülöp, Tobias Graf, Nora Graf, Elmar Jentzsch, Radek Kierat, Susanne Kohlmajer, Johanna Kort, János Kovács, Larissa Mokhir, Thomas Rödler, Alexandru Rotaru, Arnd Sprödefeld, Sanjib* und *Birgit Thaler* für die gute Zusammenarbeit und schöne Zeit im Labor 207.

Arnd Sprödefeld danke ich für die bereitgestellte DNA-Sonde, *Birgit Thaler* für den bereitgestellten Liganden NOTP.

Meinen Forschungspraktikanten *Nikola Schulenberg, David Sieb* und *Katharina Brühl* danke ich für die abwechslungsreiche Zeit und Hilfe bei meiner Arbeit.

Meiner Auszubildenden und nun Chemielaborantin *Johanna Kort* danke ich für ihre unermüdliche Geduld bei der Ligandensynthese und für ihre moralische Unterstützung in allen Lebenslagen.

Den Ehemaligen *Dr. Andreas Füßl, Dr. Mareike Göritz* und *Dr. Gosia Jagoda* danke ich für ihre Unterstützung und den Erfahrungsaustausch im AK Krämer.

Manuela Gaab möchte ich für die moralische Unterstützung in den schwierigen Phasen der Doktorarbeit, dem Teilen dieser, sowie für die unterhaltsame Begleitung auf allen Stiftungsveranstaltungen danken.

Für die Bereitstellung ihrer Arbeitsmöglichkeiten und Geräte am EMBL möchte ich mich bei *PD. Dr. Carsten Schultz* und *Dr. Maja Köhn* sehr herzlich bedanken.

Der „Schultz-Gruppe“ danke ich für die freundliche Aufnahme, die vielen Hilfestellungen und technischen Einführungen.

Bei *Claudia Dienemann, Karin Gabel, Ute Wildenberg, Heike Stichnot, Heike Vongerichten* und *Volker Seyfried* bedanke ich mich sehr herzlich für die gute technische Zusammenarbeit unter anderem bei zahlreichen PNA-Synthesen, ESI-Messungen und der Zellkultivierung.

Beate Termin danke ich für die vielen NMR-Messungen an diversen Geräten.

Bei *Bianca Flock, Norbert Nieth* und *Angelika Seith* möchte ich mich für die schnellen, zuverlässigen ESI-Messungen, sowie die vielen Anregungen und Hilfestellungen bedanken.

Katharina Brühl, Susanne Kohlmaier, Dr. Helag Szelke und *Dr. János Kovács* danke ich sehr für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Andrea Nies und *Achim Friedrich* danke ich für diverse unterhaltsame kulinarische Unternehmungen während der letzten drei Jahre.

Martin Zimmer danke ich für seine Freundschaft und Rückhalt während des Studiums und darüber hinaus.

Bei *Frau Frense-Heck* und der *Deutschen Telekom Stiftung* bedanke ich mich sehr herzlich für die Organisation der lehrreichen Seminare, der geselligen Stipendiatentreffen und der persönlichen Betreuung.

Julia Effelsberg, Nina von Lindequist und *Ilona Melchinger* danke ich für Ihre Freundschaft, die mir sehr viel bedeutet.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, für ihr Verständnis, den Rückhalt und die Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Doktorarbeit.

Erklärungen gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

a) ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

b) ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 15.06.09

.....

(Ann-Kathrin Marguerre)