

Fluoreszente Aminosäuren als Elektronentransfer- und Transmembransonden

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. Nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Samantha Cornetta Wörner

aus Baden-Baden, Baden-Württemberg

Karlsruhe, 2019

Dekan:	Prof. Dr. Manfred Wilhelm
Referent:	Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
Korreferent:	Prof. Dr. Anne S. Ulrich
Tag der mündlichen Prüfung:	17.10.2019

Meiner Familie

Magie ist nur Wissenschaft,
die wir noch nicht verstehen.

- Arthur C. Clarke

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2016 bis Oktober 2019 am Institut für Organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden am Institut für biologische Grenzflächen II, ebenfalls am Karlsruher Institut für Technologie, in der Gruppe von Prof. Dr. Anne S. Ulrich durchgeführt.

Im Besonderen möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht bedanken. Die hervorragende Betreuung, die Unterstützung in jeglichen Anliegen, sowie das interessante Thema haben mir die Promotionszeit leichter gemacht. Des Weiteren möchte ich mich für den wissenschaftlichen Freiraum im Zuge des arbeitskreisüberschneidenden Themas und das Vertrauen diesbezüglich bedanken.

Meinen besonderen Dank auch an Prof. Dr. Anne S. Ulrich, welche mir mit der Themenstellung die Möglichkeit gegeben hat, meine wissenschaftlichen Interessen und Freiheiten ausleben zu können. Die sehr gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft Ihres Instituts hat so manchen frustrierenden Tag gerettet.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- dem *Graduiertenkolleg 2039* (DFG) für die umfangreichen, wissenschaftlichen Möglichkeiten und die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.
- Claudia Sommer für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in jeglichen organisatorischen Anliegen und die aufmunternden, lustigen Gespräche.
- Annette Hochgesand für die labortechnische Unterstützung besonders den MALDI Messungen, der Organisation im Arbeitskreis und für den besten Gewürzhirschkuchen.
- Angelika Mösle und Lara Hirsch für die Messung der analytischen Proben, sowie Richard von Budberg für das Reparieren meiner Glasgeräte.
- Fabienne Speck und Daniel Sack für das Messen der NMR Proben.
- Larissa Doll, Sara Müller und Julia Leier für das Korrekturlesen meiner Arbeit.
- den „Unterreinern“, besonders Julia Leier und Nadine Michenfelder, für das Beantworten jeglicher physikalischen Fragen, das Aufnehmen der transienten Absorptionsspektren und euren unermüdlichen Optimismus und Ausgeglichenheit.
- dem Arbeitskreis Ulrich, besonders bei Dr. Parvesh Wadhvani, Dr. Jochen Bürck, Dr. Johannes Reichert, Bianca Posselt und Siegmund Roth für die umfangreiche Hilfsbereitschaft und Unterstützung von tröpfelnden HPLCs bis detaillierten

Geräteerklärungen. Tim, der mir gerne mal gezeigt hat, wie „Dapbig“ ich sein kann, Ronja, die mit dem Sorgenfresserchen den perfekten Begleiter für die Promotion gestellt hat, Annika für deine endlose Hilfsbereitschaft und fröhliche Art, Lena für diverse Diskussionen, um mir die biologischen Anwendungen näher zu bringen und dass du mich mit deiner Schnorchelleidenschaft angesteckt hast und Paddy, für diverse Joggingrunden in denen du dir so manches anhören musstest sowie die zahlreichen Marvel-Nachhilfestunden.

- Kerstin und Andrea für eure unermüdliche Unterstützung egal, ob Synthese oder Massenpingpong, euer immer offenes Ohr und die vielen Verköstigungen in Form von Plätzchen, Marmeladen und weihnachtlichem Spaghetti Carbonara. Ihr habt so manchen Tag versüßt - in jeglicher Beziehung.
- meinen Kollegen Dr. Nadine Gass, Dr. Heidi-Kristin Walter, Dr. Krisana Peewasan, Dr. Barbara Reiß, Dr. Jeannine Steinmeyer, Dr. Sergej Hermann, Dr. Benjamin Lehmann, Dr. Robert Hofsäß, Dr. Christian Schwechheimer, David Rombach, Dr. Damian Ploschik, Dr. Franziska Rönicke, Ulrike Reisacher, Christoph Bickmann, Larissa Doll, Yannic Fritz, Dorothée Ganz, Julian Gebhard, Dennis Harijan, Katja Krell, Arthur Kuhlmann, Fabian Lang, Sara Müller, Daniel Sack, Fabienne Speck, Hülya Ucar, Karen Möbius, Manuel Schupp, Fabian Weick, Lara Hirsch und Sina Jaschik für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die lustigen Mittagspausen und das Verständnis für meine Campus Nord-Pendelei.
- Lari für deine quirlige, flippige Art, dass du genauso ein Organisations-Sauberkeitsfimmel hast, wie ich und wir trotz manchem emotionalen Ausbruch (oder gerade deshalb?) einfach auf einer Wellenlänge sind. #larissadollfanclub
- Sara - mein Sonnenschein - du hast mir gezeigt, was wirklich wichtig ist und mich so manches Mal geerdet. Die langen Laborabende mit dem Fürst der Finsternis waren die produktivsten – besonders die in den Weihnachtshosen.
- Katja für deine bewundernswerte Selbstlosigkeit, dein unterdrücktes Lachen und dein wahnsinnig breites Wissen – neidisch ich bin.
- Flavian dafür, dass du jedes Hörspiel und jeden Musikwunsch mitgemacht hast und mit deinem unendlich ruhigen Wesen der richtige Gegenpol warst.
- Julian dem Frechdachs mit dem weichen Herzen. Du bist eine wahre Bereicherung für den Arbeitskreis.
- Hülya für deine trockenen, lustigen Sprüche, die einen einfach immer vom Hocker hauen.
- Fritzi - Was machen sie denn Da? – für deine absolut verrückte, ehrliche, Nerv tötende, lustige Art und dass du mir gezeigt hast, was es heißt eine harte Schale und einen weichen Kern zu haben. Ich hoffe der ein oder andere Tanzabend steht uns noch bevor.

- Fabse – dafür, dass du mir gezeigt hast, dass man sich nicht alles zu Herzen nehmen muss und mir so manche Fahrt mit dem geliebten Campus Nord Shuttle erspart hast.
- Arthur für diverse Krauleinheiten und so mancher hitzigen Diskussion über diesen Spin und diese Bahn – gut, dass mit Pelmeni immer alles wieder gut ist.
- Binja für deine herzliche Art und das wohl lustigste Praktikum. Nur das mit dem Navigieren müssen wir nochmal üben.
- Jeannine für deine ruhige und realistische Art und die herzliche Aufnahme im Arbeitskreis.
- Barb für deine Motivation sowohl sportlicher als auch naturwissenschaftlicher Natur.
- meinen Studenten Luca Münzfeld und Karen Möbius sowie meinem Hiwi Hannes Kucher für das Interesse und die Begeisterungsfähigkeit an meiner Arbeit und die vielen lustigen Labortage.
- meinem Bachelorbetreuer Barry – du hast mir den AKW schmackhaft gemacht.
- meiner Chemielehrerin Gabriele Vogler, die mir eine Alternative zu meinem eigentlichen Traum nähergebracht hat.
- Hanna, Caro und David für das gemeinsame Durchbeißen durch's Studium, die lustigen Abende die vieles leichter gemacht haben und das gemeinschaftliche Leiden und Lachen während der Promotion.
- Lisa, Julia, Janina und Dominik für eure jahrelange Freundschaft, euer Verständnis und eure Unterstützung, wenn die Zeit mal wieder knapp und ich „ein wenig“ gestresst war.
- Kristine für die Unterstützung in den letzten 19 Jahren. Dein immer offenes Ohr, dein liebenswürdiges Wesen, dein Verständnis und dass du mir meinen größten Fehler verziehen hast.

Der größte Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meinem Bruder Claudius, für eure bedingungslose Unterstützung nicht erst in den letzten drei Jahren. Ohne euch wäre so vieles und besonders diese Arbeit nicht möglich gewesen. Und Claudius – danke, dass du mich immer zum Lachen bringst und mein ruhiger Gegenpol bist.

Zu guter Letzt möchte ich Max danken. Nicht nur deine unermüdliche Geduld mit mir und der Versuch alles zu verstehen, was ich im Labor so mache, hat mir viel geholfen. Auch, dass du mich immer zwingst den Kopf frei zu bekommen und wir dadurch wunderbare unvergessliche Erlebnisse schaffen, ist ein perfekter Ausgleich zum Laboralltag.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Symbole.....	VI
I. Einleitung und Themenstellung	1
II. Teil A: Flavin-Projekt.....	5
1. Theoretische Hintergründe.....	5
1.1 Photoinduzierter Elektronentransfer und MARCUS Theorie	7
1.2 Superaustausch-Mechanismus	11
1.3 <i>Hopping</i> -Mechanismus.....	11
1.4 Flavin	12
1.5 Elektronentransfer in biologischen Flavin-Systemen.....	16
2. Aufbau des Systems.....	19
3. Synthese der flavinmodifizierten Aminosäure.....	21
3.1 Synthesestrategie I	21
3.2 Synthesestrategie II	22
4. Synthese der Peptide.....	26
4.1 ET in Polyprolinpeptiden	27
4.2 ET durch EGFR-Peptide	28
5. Optische Charakterisierung.....	30
5.1 Optische Eigenschaften der Flavin-Aminosäure 1.....	30
5.2 Elektronentransfer zwischen nicht-kovalent gebundenen Partnern	32
5.3 Elektronentransfer zwischen kovalent gebundenen Partnern.....	38
6. Zusammenfassung und Ausblick	50
III. Teil B: 4-Aminophthalimid-Projekt.....	53
1. Theoretische Hintergründe.....	53
1.1 Solvatochromie	53
1.2 4-Aminophthalimid	54
2. Synthese der 4AP-modifizierten Aminosäure.....	57

2.1	Synthese des 4AP-Bausteins 2	57
2.2	Synthese des 4AP-Bausteins 3	58
2.3	Synthese des 4AP-Bausteins 4	60
3.	Synthese der Peptide.....	63
4.	Optische Charakterisierung.....	64
4.1	Optische Eigenschaften der 4AP-Aminosäuren 2, 3 und 4.....	64
4.2	Optische Eigenschaften der 4AP-modifizierten Peptide.....	66
4.3	Strukturelle Eigenschaften der 4AP-modifizierten EGFR-Peptide.....	69
4.4	<i>In-vivo</i> Experimente.....	70
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	71
IV.	Experimentalteil.....	73
1.	Materialien und Methoden.....	73
2.	Synthesevorschriften Flavin-Projekt.....	81
3.	Synthesevorschriften 4AP-Projekt.....	91
4.	Synthese der Peptide.....	108
5.	Zusätzliche Abbildungen und Spektren.....	122
V.	Anhang.....	130
VI.	Literaturverzeichnis.....	133

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
4AP	4-Aminophthalimid
4DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminophthalimid
A	Absorbanz oder Akzeptor
AcOH	Essigsäure
Äq.	Äquivalente
B	Brückenelemente
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CD	Circulardichroismus
CHCl ₃	Chloroform
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
CuAAC	kupferkatalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition
d	<i>days</i> ; Tage
D	Donor
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	<i>double distilled</i>
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EI	Elektronenstoßionisation
Em.	Emission
E _{ox}	Reduktionspotential der Oxidation des Donors im Grundzustand
E _{red}	Reduktionspotential der Reduktion des Akzeptors im Grundzustand
ET	Elektronentransfer
EtOAc	Essigsäurethylester
EtOH	Ethanol

FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fc	Ferrocen
FMN	Flavinmononukleotid
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
G [‡]	freie Aktivierungsenergie
G ⁰	freie Reaktionsenthalpie
h	Planksches Wirkungsquantum
H ₂ O	Wasser
H _{AD}	elektronische Kupplung
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>high resolution mass spectroscopy</i> /hochaufgelöste Massenspektroskopie
I	Emissionsintensität
k	Geschwindigkeitskonstante
k _{ET}	Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante
LC	<i>liquid chromatography</i> /Flüssigkeitschromatographie
L _{DA}	Donor-Akzeptor-Distanz
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
m/z	Masse-zu-Ladung
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Met	Methionin
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MTHF	Methylentetrahydrofolat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> /Kernspinresonanzspektroskopie
OCD	orientierter Circular dichroismus
P/L	Peptid-zu-Lipid

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> /phosphatgepuffert
Phe	Phenylalanin
POPC	Phosphatidylcholin
POPG	Phosphatidylglycerol
PP	Polyprolin
RF	Riboflavin
RP	<i>reversed phase</i> /Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Singulettzustand
SHE	<i>standard hydrogen electrode</i> /Standardwasserstoffelektrode
T	Triplettzustand
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
^t BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TICT	<i>twisted intermolecular charge transfer</i>
TIS	Triisopropylsilan
TM	Transmembran
TMS	Trimethylsilan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolett
V	Volt
Vis	<i>visible</i> /sichtbar
v	Schwingungsquantenzahl

Symbole

Δ	Differenz
ρ	chemische Verschiebung
τ_F	Fluoreszenzlebensdauer
ε	molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient
Φ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
ν	Frequenz
π	Kreiszahl
δ	chemische Verschiebung
\ln	natürlicher Logarithmus
μ	mikro
λ	Wellenlänge oder Reorganisationsenergie
\hbar	Planksches Wirkungsquantum
T	Temperatur
Å	Angström
β	Zerfallsfaktor der elektronischen Kopplung
n	nano

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*^[a] und an den von der *IUPAC-IUB-Kommission*^[b] empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden *kursiv* geschrieben.

^[a] Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

^[b] IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC).

I. Einleitung und Themenstellung

Die Zelle als kleinste lebende Einheit aller Organismen wird oft als abgeschlossenes System betrachtet. Diese abgegrenzte Darstellung bezieht sich jedoch nur auf ihre Struktur. Ein stetiger Austausch zwischen extra- und intrazellulärer Seite ist zur Selbsterhaltung essentiell. Um dabei die Barriere der Zellmembran überwinden zu können, nutzt die Natur hauptsächlich Membranproteine.^[1] Sie sind Schlüsselproteine für viele spezifische Funktionen, wie dem Transport von Substanzen und Ladungen, der Zell-Zell-Erkennung, der Signalübertragung, dem Katalysieren von Stoffwechselprozessen (Enzymaktivität) und der Verbindung zu anderen Zellen. Dabei wird zwischen zwei Arten von Membranproteinen unterschieden: auf der Oberfläche assoziierte (periphere) und die Membran durchspannende (integrale/intrinsische), bei denen nur ein kleiner Teil des Proteins in der hydrophoben Lipiddoppelschicht vorliegt (circa 20–25 Aminosäuren).^[2] Einen Einblick in die Topologie der Biomembrane und der dort lokalisierten Proteine bietet die Gefrierbruch- und Gefrierätzelektronenmikroskopie. Dabei wird das Zellmedium eingefroren, gebrochen und nach Bedampfen mit Schwermetallen mittels Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Diese Methode liefert zwar einen Überblick über die Membranbestandteile, ermöglicht aber keine Visualisierung der in der Zelle stattfindenden Prozesse.

Eine dazu ergänzende Methode stellt der Gebrauch fluoreszenter Sonden dar, besonders im Hinblick auf *in vivo* Echtzeitaufnahmen. Neben der Lokalisierung der Zellbestandteile in lebenden Organismen können durch die Fluoreszenzmarkierung lichtinduzierte und Transportprozesse visualisiert werden. Die supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie^[3] ermöglicht einen detaillierten Einblick, wobei die Wahl des fluoreszenten Farbstoffs auf das jeweilige Anwendungsgebiet abgestimmt werden muss. Um störende Nebenreaktionen durch den Farbstoff zu vermeiden, sollte dieser von natürlich vorkommenden Farbstoffen oder sonstigen intrazellulären Strukturen abgeleitet sein. Die Vielfalt der Farbstoffe im Hinblick auf ihre Eigenschaften, wie Redoxaktivität oder Solvatochromie erschließt zusätzliche Anwendungsgebiete.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen neue Aminosäuren als Fluoreszenzmarker Anwendung finden. Dabei soll der natürliche Farbstoff Flavin als Elektronentransferprobe und 4-Aminophthalimid als Transmembransonde eingesetzt werden.

Flavin als Elektronentransfersonde

Zu den peripheren Membranproteinen gehören beispielsweise die Enzyme, welche am Lipidstoffwechsel beteiligt sind. Dies gilt auch für das in der Mitochondrienmembran lokalisierte und am Elektronentransport beteiligte Cytochrom C. Um diesen für die Atmungskette fundamentalen Prozess des Elektronentransfers besser zu verstehen, ist es von Vorteil, die komplexe Konformation natürlicher Proteine zu verkleinern. Der Fokus der bisherigen Untersuchungen lag hauptsächlich auf bio-inspirierten, (α)-helikalen Peptiden.^[4-6] Dieses Peptidmodell bietet neben der einfachen Immobilisierung auf Oberflächen den Vorteil einer einfachen Funktionalisierung. Durch eingeführte redoxaktive Einheiten ist eine präzise Aussage über Elektronentransferkinetiken möglich. Eine Vielzahl der Elektronentransfermodelle basiert auf immobilisierten Peptiden. Dabei fungieren oftmals Prolin- oder Aib- (2-Methylalanin) Homooligomere als Peptidmatrix.^[7, 8] Angelehnt an die Natur wurde in dieser Arbeit Flavin als Elektronenakzeptor gewählt. Dieser Fluorophor soll als Aminosäureseitenkette (1) N-terminal in Peptidmodelle eingeführt werden (siehe Abbildung 1).

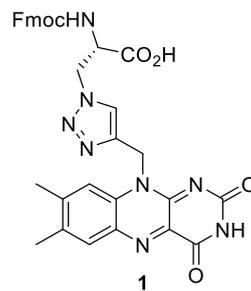


Abbildung 1: Struktur der flavinmodifizierten Aminosäure 1.

Angesichts der natürlichen Redoxpartner des Flavins in Enzymen sollen dafür tryptophanhaltige Peptide als Elektronentransfermodelle eingesetzt werden.^[9, 10] In Kombination mit lichtinduziertem Flavin dient Tryptophan als Elektronendonator. Das spektrale Verhalten des Flavins unter lichtinduziertem Elektronentransfer soll zunächst in Polyprolinpeptiden einen ersten Einblick in das Elektronentransfermodell bieten. Um einen Elektronentransfer über eine Membran zu generieren, soll ein weiteres Peptidmodell basierend auf dem α -helikalen Transmembranfragment des EGF-Rezeptors (*epidermal growth factor receptor*) entwickelt werden (K⁶⁴²-V⁶⁷⁴) (siehe Abbildung 2). Durch die Verwendung unterschiedlicher Peptidmodelle soll der Einfluss der Lokalisierung und der Anzahl der Tryptophane im Peptidgerüst untersucht werden.

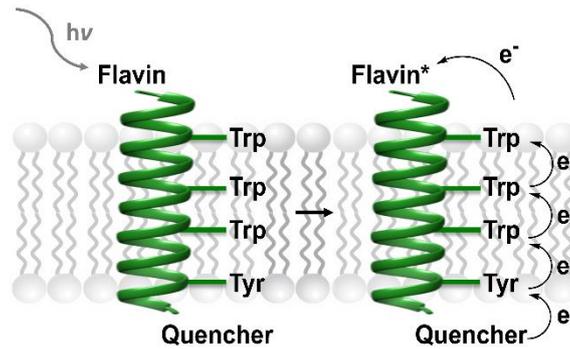


Abbildung 2: Veranschaulichung des lichtinduzierten Elektronentransfers über transmembrane Peptide.

4-Aminophthalimid als Transmembransonde

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist der Gebrauch solvatochromer, fluoreszenter Aminosäuren. Eine Änderung der Umgebungspolarität kann durch einen Farbwechsel visualisiert werden. Hinsichtlich der lokalen Polaritätsänderungen membrangebundener Peptide und Proteine durch Anordnung in die Membran soll der solvatochrome Farbstoff 4-Aminophthalimid (4AP) Anwendung finden. Dies stellt eine ergänzende Analyse zu den herkömmlichen Methoden, wie orientierte Circularspektroskopie^[11] und Festphasen-NMR^[12] dar, welche keine Aussage über die Lokalisierung spezieller Peptidpositionen in der Membran treffen können. Verglichen mit vorherigen Studien, in welchen 4-*N,N*-Dimethylaminophthalimid als Aminosäure eingeführt wurde,^[13] soll in dieser Arbeit der nichtmethylierte Fluorophor aufgrund seiner höheren Fluoreszenzquantenausbeuten in polarer Umgebung Anwendung finden.

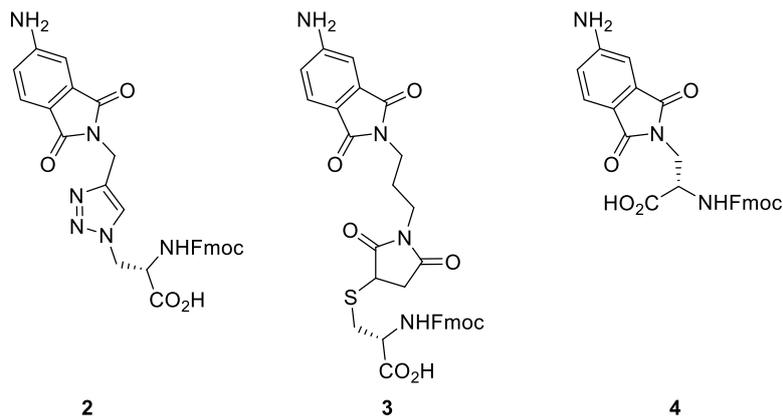


Abbildung 3: Strukturen der drei 4AP-modifizierten Aminosäuren 2, 3 und 4.

Es sollen drei neue solvatochrome und strukturell unterschiedliche Aminosäuren auf Basis des solvatochromen Farbstoffes 4-Aminophthalimid (2-4) synthetisiert und spektroskopisch untersucht werden (siehe Abbildung 3). Sowohl ein mittlerer als auch N-terminaler Einbau in das

α -helikale Transmembranfragment des EGF-Rezeptors (G^{640} - V^{674}) soll die Anwendung des umgebungsempfindlichen, fluoreszenten Fluorophors als Transmembransonde verdeutlichen und eine fluoreszente Bildgebung lebender Zellen ermöglichen (siehe Abbildung 4).^[14]

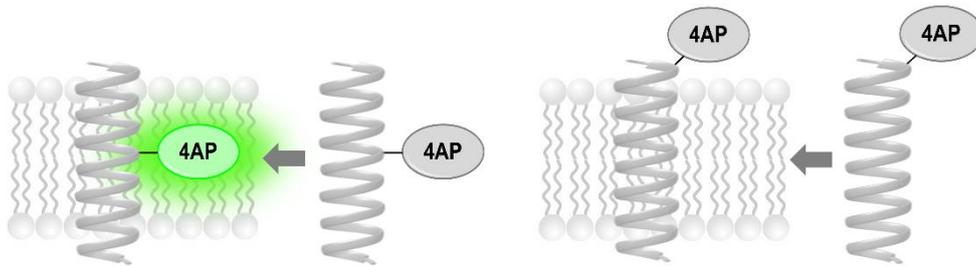


Abbildung 4: Schematische Darstellung des 4-Aminophthalimids (4AP) als Transmembransonde.

II. Teil A: Flavin-Projekt

1. Theoretische Hintergründe

Eines der bekanntesten Beispiele, welche Licht als Energiequelle nutzt und energiereiche organische Moleküle generiert, beschreibt die Photosynthese.^[15] Auch die Funktion des Auges folgt der Wahrnehmung und Weiterleitung von Lichtreizen und beschreibt damit einen von vielen lichtinduzierten Vorgängen der Natur.^[16] All diese Prozesse basieren auf dem photo-physikalischen Prozess der Absorption elektromagnetischer Strahlung und dessen Folgeprozesse. Einen anschaulichen Überblick dieser Übergänge bietet das JABŁOŃSKI-Termschema (Abbildung 5).^[17, 18]

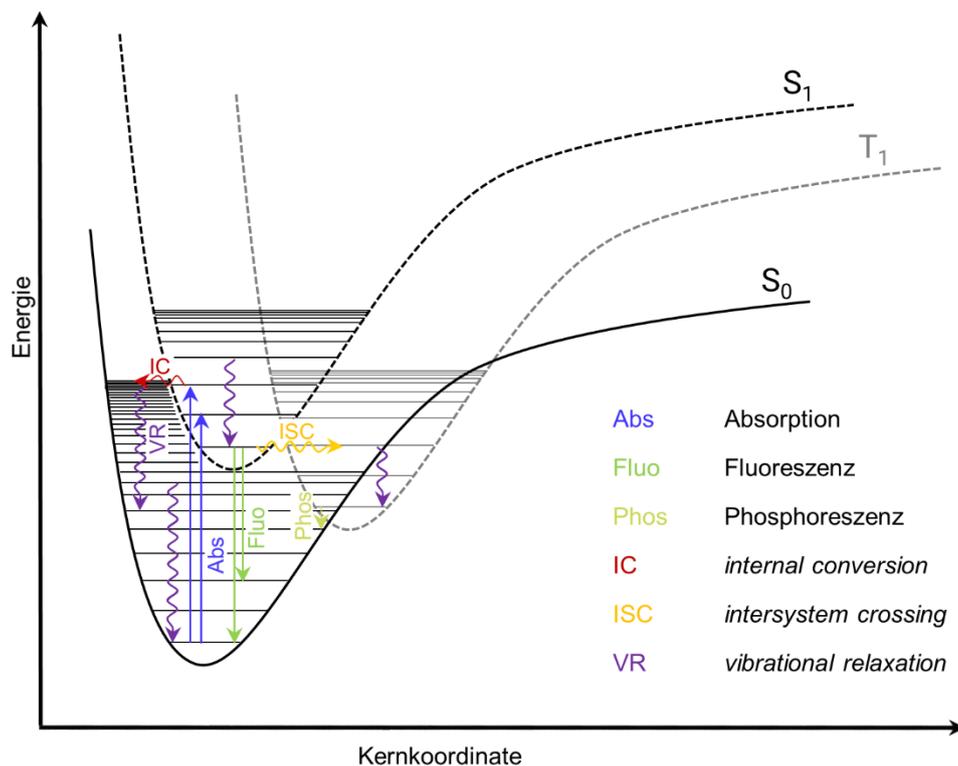


Abbildung 5: JABŁOŃSKI-Diagramm zur Darstellung photophysikalischer Prozesse nach Absorption elektromagnetischer Strahlung. Elektronische Zustände sind als Potentialkurven, Schwingungsniveaus als horizontale Linien dargestellt, nicht strahlende Prozesse mit gewellten Pfeilen, strahlende mit glatten.^[17, 18]

Zunächst wird ein Elektron nach elektronischer Anregung eines absorbierenden Stoffes mit ausreichender Energie ($h\nu \geq \Delta E$ zwischen initialem und finalem Zustand)^[19] vom elektronischen Singulett-Grundzustand S_0 ($v = 0$) in elektronische Singulett-Energieniveaus höheren Zustandes

übertragen (Schwingungszustände $v = 0, 1, 2, \dots$). Dieser Übergang basiert auf der Wechselwirkung des oszillierenden elektrischen Feldes der UV-Vis-Strahlung mit den Elektronen des absorbierenden Moleküls. Der dabei wahrscheinlichste Übergang wird durch das FRANK-CONDON-Prinzip beschrieben.^[20, 21] Es beschreibt den vertikalen Übergang vom elektronischen Grundzustand in den angeregten Zustand, bei welchem der Kernabstand durch die schnelleren Elektronenbewegungen gleich bleibt. Infolge der besten Überlappung der beteiligten Schwingungswellenfunktionen wird größtenteils in die jeweiligen energetisch höheren Schwingungszustände angeregt.^[22-24] Daraus ergibt sich die Struktur des Absorptionsspektrums, welches die Übergänge in die verschiedenen Schwingungsniveaus veranschaulicht. Im Anschluss an die Anregung eines Elektrons finden nach Schwingungsrelaxation in den niedrigsten Schwingungszustand des elektronisch angeregten Singulett-Zustandes weitere strahlende und nicht-strahlende Übergänge statt.^[25-27] Dabei findet bei strahlenden Prozessen der Energieaustausch durch Abgabe von Photonen statt. Strahlungslose Prozesse wiederum beschreiben die Abgabe der elektronischen Energie in Form von Schwingungsenergie und der Abgabe von Wärme. Die innere Konversion (*internal conversion*) beschreibt dabei einen strahlungslosen Übergang von einem höheren zu einem tieferen elektronischen Zustand gleicher Multiplizität. Strahlungslose Übergänge zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität von einem besetzten Singulett- zu einem Triplettzustand (oder vom Triplett- zum Singulettzustand) werden wiederum unter Interkombination (*inter system crossing*) zusammengefasst. Anschließend an innere Konversion oder Interkombination relaxiert das Elektron wieder in den niedrigsten Schwingungszustand der elektronisch angeregten Zustände. Die nun folgenden möglichen, strahlenden Prozesse unterscheiden sich je nach elektronischem Zustand. Fluoreszenzprozesse finden zwischen elektronischen Zuständen derselben Multiplizität (Singulett-Zustände) unter Emission von Photonen statt. Da der überwiegende Beitrag der Fluoreszenz aus dem tiefsten Schwingungsniveau zu erwarten ist (Regel von KASHA)^[25, 28], handelt es sich bei der Fluoreszenz um eine spiegelbildliche Darstellung zur Absorptionsbande, welches lediglich eine bathochrome Verschiebung (Stokes-Verschiebung) aufweist. Somit stellt das Absorptionsspektrum die Schwingungsstruktur des elektronisch angeregten Zustandes und das Fluoreszenzspektrum die Schwingungsstruktur des Grundzustandes dar. Analoge Prozesse können aus dem Triplett-Zustand T_1 durch strahlenden Übergang in den elektronischen Singulett-Grundzustand S_0 erfolgen, was als Phosphoreszenz bezeichnet wird. Durch die nötige Spinkkehr dieses Prozesses läuft die Phosphoreszenz allgemein langsamer ab als Photonenemission mittels Fluoreszenz (n_s versus μ_s bis s). Die längere Population des elektronischen Triplettzustandes stellt einen Ausgangspunkt für folgende intermolekulare Elektronentransfer-Prozesse dar.^[29]

1.1 Photoinduzierter Elektronentransfer und MARCUS Theorie

Der photoinduzierte Elektronentransfer (ET) ist einer der fundamentalsten photochemischen Prozesse, wie beispielsweise im Flavoenzym DNA-Photolyase.^[30] Dabei ist der photoinduzierte ET initialer Schritt zur DNA Reparatur (siehe Kapitel 1.5). Allgemein wird beim ET ein Elektron von einem Donor (D) auf einen Akzeptor (A) übertragen. Dieser ET kann entweder vom angeregten Donor auf den passenden Akzeptor stattfinden (oxidativer ET) oder vom Donor auf den angeregten Akzeptor (reduktiver ET), wie in Abbildung 6 schematisch dargestellt.^[31]

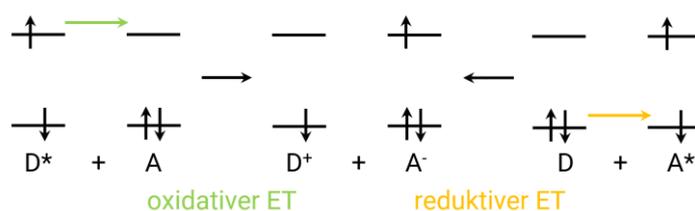


Abbildung 6: Schematische Darstellung des oxidativen und reduktiven photoinduzierten Elektronentransfers.

Die theoretische Grundlage des Elektronentransfers folgt den Arbeiten von MARCUS,^[32-35] welche 1992 mit dem Nobelpreis der Chemie ausgezeichnet wurden.^[34] Darin wird ein Modell bezüglich des Elektronentransfers zweier solvatisierter Moleküle beschrieben. Es wird dabei zwischen Elektronentransferreaktionen in der inneren und der äußeren Sphäre unterschieden. Als innere Sphäre werden Liganden betrachtet, während umgebende Lösungsmittelmoleküle, bzw. die elektrostatische Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel die äußere Sphäre darstellen. Basierend auf den nicht stattfindenden Bindungsbrüchen und -bildungen in ET-Reaktionen beschränkt sich die MARCUS-Theorie auf Reaktionen in der äußeren Sphäre. Die beim ET stattfindenden elektronischen Übergänge finden, beschrieben durch das FRANCK-CONDON-Prinzip^[22-24], deutlich schneller statt als die Bewegungen der Atome und Moleküle. Folglich kann die Position der Reaktanden und des Lösungsmittels während des Elektronentransfers als konstant betrachtet werden.

Um die Vielfalt möglicher Vorgänge, welche beim ET auftreten in einer eindimensionalen Betrachtungsweise zu vereinen, wurde die so genannte effektive Solvenskoordinate nach MARCUS und HUSH eingeführt. In ihr sind Bindungslängen-, Winkel- und Solvathüllenänderungen in einer Reaktionskoordinate zusammengefasst. Zusätzlich wird für die Potentialkurven des

initialen und finalen Zustandes harmonisches Verhalten in Form von gleichförmigen Parabeln vorausgesetzt, wie in Abbildung 7 dargestellt.^[27, 36]

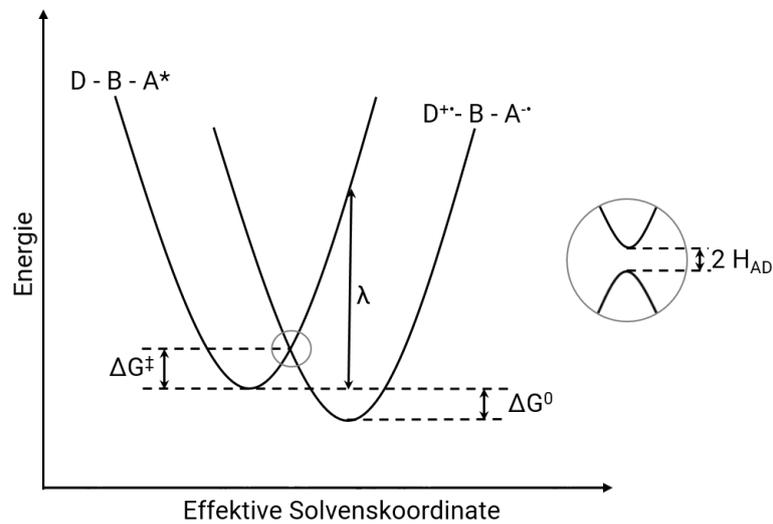


Abbildung 7: Beschreibung des Elektronentransfers nach MARCUS. Die Aufspaltung der Potentialkurven durch den Beitrag der elektronischen Kopplung H_{AD} und somit der adiabatische Reaktionsverlauf wurde rechts als Vergrößerung dargestellt. ΔG^\ddagger als freie Aktivierungsenergie ist der energetische Abstand zwischen Minimum des initialen Systems und Kreuzungspunkt der Potentialkurven. Die Reorganisationsenergie λ entspricht dem Abstand zwischen dem Minimum vor dem Elektronentransfer und der Energie der Potentialkurve bei der Minimumsgeometrie des finalen Zustandes. Die freie Reaktionsenthalpie ΔG^0 repräsentiert den Energieunterschied zwischen den Minima der beiden Zustände. B beschreibt vorhandene Brückenelemente.

Ein ET ist nur am Schnittpunkt der beiden Parabeln möglich. Die Bestimmung der freien Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger ergibt sich aus Gleichung (1):

$$\Delta G^\ddagger = \frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda} \quad (1)$$

$$k_{ET} = A * e \left(-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4 \lambda k_B T} \right) \quad (2)$$

$$\lambda = \lambda_i + \lambda_o \quad (3)$$

Nach EYRING lässt sich die Elektronentransferrate k_{ET} ausgehend von der freien Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger bestimmen, wie in Gleichung (2) dargestellt.^[37, 38] Die Reorganisationsenergie λ repräsentiert dabei die Energie, welche benötigt wird, um die innere und äußere Sphäre nach einem ET anzupassen. Es wird zwischen innerer und äußerer Reorganisationsenergie unterschieden (siehe Gleichung (3)). Die innere Reorganisationsenergie λ_i beschreibt den Schwingungsanteil, also die Änderungen von Bindungslängen und -winkeln.^[39] Die Reorganisation der Solvathülle nach dem ET wird durch die äußere Reorganisationsenergie λ_o ausgedrückt.^[32] Somit folgt aus der Elektronentransferrate k_{ET} , dass der Elektronentransfer

schnell ist, wenn die Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger klein ist. Wenn die Beiträge der freien Reaktionsenthalpie ΔG^0 (negativ für Ladungstrennungen) und der Reorganisationsenergie λ (positiv) ähnlich groß sind, ist ΔG^\ddagger wiederum klein (siehe Abbildung 8 B).^[27, 36, 40, 41]

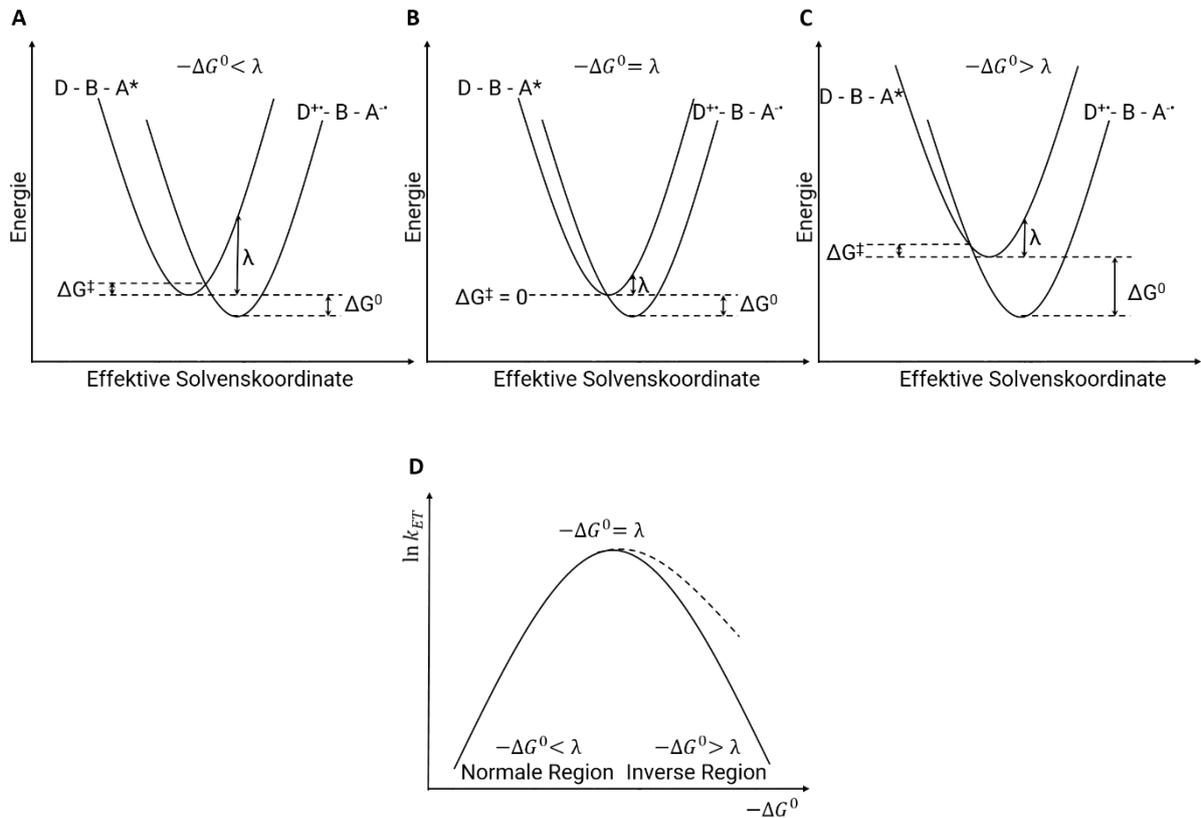


Abbildung 8: Darstellung des Einflusses der Verhältnisse freier Reaktionsenthalpie ΔG^0 und Reorganisationsenergie λ . **A-C:** Potentialkurven für verschiedene Verhältnisse von ΔG^0 zu λ . **D:** Schematische Darstellung der Abhängigkeit von $\ln k_{ET}$ und $-\Delta G^0$. Die experimentelle Entwicklung zeigt eine langsamere Abnahme der Geschwindigkeitskonstante mit steigendem $-\Delta G^0$ (- - -).^[40, 42]

Wird $\ln k_{ET}$ gegen $-\Delta G^0$ aufgetragen, sinkt die Geschwindigkeitskonstante mit kleinerer und größerer Reaktionsenthalpie entsprechend Gleichung (2). Dies resultiert aus der quadratischen Abhängigkeit von $(\lambda + \Delta G^0)$ und führt zu dem so genannten MARCUS-invertierten Bereich. Physikalisch könnte dieses Verhalten so beschrieben werden, dass bei zu großer frei werdender Reaktionsenergie das System nicht mehr in der Lage ist, die Energie schnell genug abzuführen und somit die Reaktion langsamer wird. Damit müssen die freie Reaktionsenthalpie ΔG^0 und die Reorganisationsenergie λ in ausgewogenem Verhältnis zueinanderstehen. Eine maximale Elektronentransferrate ist für $\Delta G^\ddagger = 0$ ($-\Delta G^0 = \lambda$) gegeben (Abbildung 8 B). Hier ist ein aktivierungsloser Übergang zwischen initialem Zustand und Produktzustand gegeben.^[43, 44] Die Zustände bei größeren und kleineren $-\Delta G^0$ können nur durch thermische Anregung ermöglicht werden, was jedoch unwahrscheinlicher ist als ein ET aus einem thermisch nicht angeregten

Zustand. Die experimentelle Entwicklung zeigt jedoch eine langsamere Abnahme der Geschwindigkeitskonstante mit steigendem $-\Delta G^0$ (gestrichelter Verlauf Abbildung 8 D).^[40, 42] Desweiteren konnte erst 30 Jahre nach Postulieren des MARCUS-invertierten Bereichs dessen Existenz experimentell nachgewiesen werden. 1984 gelang es MILLER, CALACATERRA und CLOSS mit Hilfe einer homologen Reihe von Akzeptor-Spacer-Donor-Verbindungen mit steigender Energiedifferenz zwischen den Redoxzentren, eine zunächst steigende und anschließend fallende Geschwindigkeit der Ladungsumverteilung aufzunehmen.^[42]

Der in Gleichung (2) aufgeführte präexponentielle Faktor A zeigt zudem eine Abhängigkeit von der Art der Elektronentransferreaktion. Dabei wird zwischen diabatischen/nicht-adiabatischen und adiabatischen Reaktionen unterschieden.^[27, 45, 46] Adiabatische Reaktionen zeichnen sich durch eine starke elektronische Kopplung H_{AD} zwischen Donor und Akzeptor aus. Der ET verläuft auf der unteren Potentialkurve (siehe Abbildung 7) und jedes Erreichen des Sattelpunktes führt zum ET. Die Elektronentransferrate ist dabei abhängig von der Reorganisation der inneren und äußeren Sphäre und der Schwingungsfrequenz am Übergangszustand ν_n .

$$k_{ET} = \nu_n * e \left(-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4 \lambda k_B T} \right) \quad (4)$$

$$\text{mit } \nu_n = \frac{k_B T}{\hbar} \quad (5)$$

Eine schwache Kopplung zwischen Donor und Akzeptor spricht wiederum für einen nicht-adiabatischen Zustand. Das Erreichen des Sattelpunktes ist kein Garant für eine Reaktion. Stattdessen kann das System von einer Potentialkurve auf die andere springen. Somit beinhaltet der präexponentielle Faktor die Abhängigkeit der elektronischen Kopplung zwischen Donor und Akzeptor. Es ergibt sich für die Elektronentransferrate folgender Zusammenhang:^[33]

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} H_{AD}^2 * e \left(-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4 \lambda k_B T} \right) \quad (6)$$

Die elektronische Kopplungsmatrix H_{AD} zeigt hierbei eine exponentielle Distanzabhängigkeit zwischen Donor und Akzeptor (L_{AD}) und dem Zerfallsfaktor der elektronischen Kopplung β . Dieser ist wiederum abhängig von der Umgebung des Systems.

$$H_{AD}^2 \propto e^{-\beta * L_{DA}} \quad (7)$$

Dadurch wird die exponentielle Abhängigkeit der Elektronentransferrate vom Donor-Akzeptor-Abstand deutlich.^[47]

1.2 Superaustausch-Mechanismus

Die in der MARCUS-Theorie beschriebene exponentielle Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers kann durch den Superaustausch-Mechanismus (*superexchange*) bzw. Tunnelprozess beschrieben werden.^[33, 48] Dabei werden die Orbitale der Brückenbausteine zwischen Ladungsdonor und -akzeptor als großes, delokalisiertes Molekülorbital betrachtet. Durch diese Vermischung kommt es zu einer Vergrößerung der elektronischen Kopplung und ein Elektronentransfer ist wahrscheinlicher. Charakteristisch ist dabei die einstufige Wanderung der Ladung, welche nie auf den Brückenbausteinen aufzufinden ist (Abbildung 9).^[49, 50]

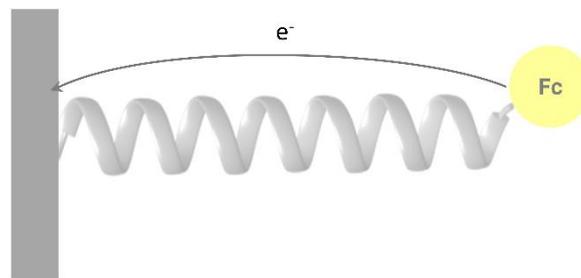


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Superaustausch-Mechanismus mit Ferrocenkonjugat (Fc) als Elektronendonator.

Beim Superaustausch-Mechanismus ist die Elektronentransferrate k_{ET} exponentiell von der Donor-Akzeptor-Distanz L_{DA} abhängig (siehe Gleichung (7) und (8)).^[49, 51]

$$k_{ET} \propto e^{-\beta L_{DA}} \quad (8)$$

Spätere Experimente mit einem ET über Distanzen von 200 Å konnten jedoch nicht mit dem Modell des Superaustausch-Mechanismus erklärt werden.^[52] Deshalb wurde in diesem Zusammenhang ein weiteres Modell entwickelt, welches die geringere Abstandsabhängigkeit des Ladungstransfers behandelt (siehe Kapitel 1.3).

1.3 Hopping-Mechanismus

Die Postulierung des *Hopping*-Mechanismus ist auf ET-Prozesse über 20 Å zurückzuführen, welche durch den Superaustausch-Mechanismus nicht mehr beschreibbar sind.^[53] Bei diesem Mechanismus wird die Ladung in mehreren Schritten zwischen Donor und Akzeptor transportiert, den so genannten *stepping stones* (siehe Abbildung 10).^[54-56] Dies erlaubt kurze

Tunneldistanzen für jeden Schritt. Die somit möglichen hohen Elektronentransferraten sind von der Anzahl der *stepping stones*, sowie von der Lage der Potentiale des Donors und Akzeptors relativ zu den Brückenbausteinen abhängig. Es ergibt sich für den längsten Schritt des ETs der geschwindigkeitsbestimmende Prozess.

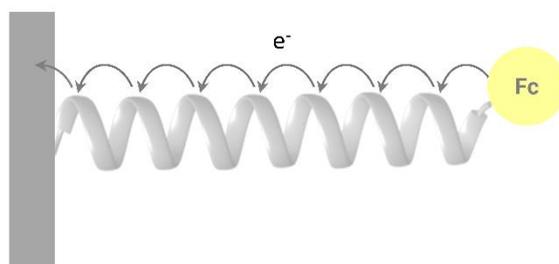


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Hopping-Mechanismus mit Ferrocenkonjugat (Fc) als Elektronendonator.

Ein Beispiel eines ET-Prozesses, welcher dem Prinzip des *Hopping-Mechanismus* folgt, ist in Enzymen, wie der DNA-Photolyase zu finden, in welchem die *stepping stones* durch aromatische Aminosäuren repräsentiert werden.^[30]

1.4 Flavin

Einer der prominentesten Farbstoffe in der Photokatalyse, welches an diversen Redoxreaktionen als Coenzym teilnimmt, ist Riboflavin (RF) (auch bekannt als Vitamin B₂).^[57] Flavin als Cofaktor ist in der Lage in diesen Prozessen entweder ein oder zwei Elektronen zu vermitteln.^[58] Der Name Flavin bezieht sich auf die Basisstruktur des Heterozyklus 7, 8-Dimethylisalloxazin, welcher auch die Schlüsselkomponente des katalytischen Zyklus ist (siehe Abbildung 11).^[59]

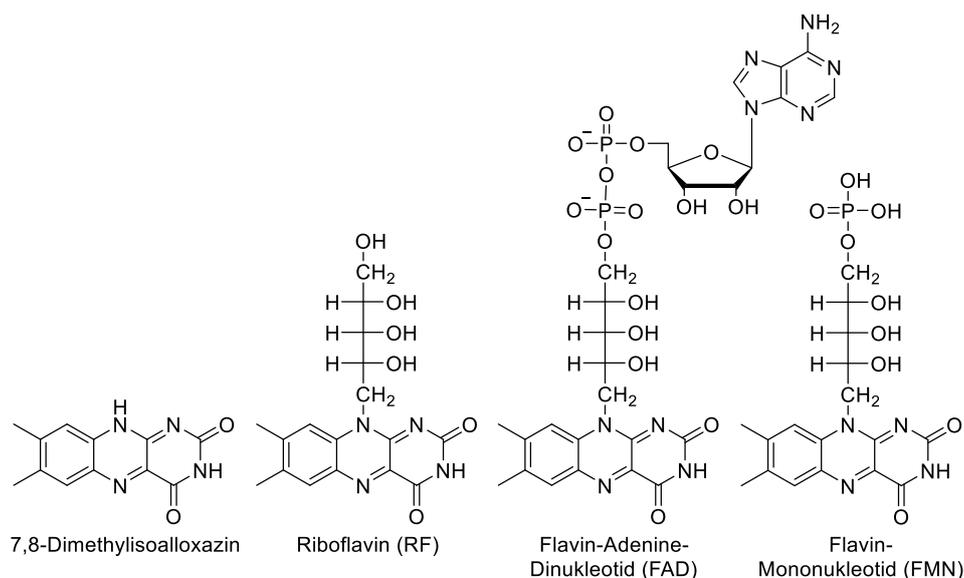


Abbildung 11: Flavin-Grundstruktur; Riboflavin, Flavin-Adenin-Dinukleotid und Flavin-Mononukleotid als Vertreter der Cofaktoren in diversen Flavoenzymen.

1879 wurde von dem englischen Chemiker A. WYNTHYER BLYTH ein hellgelbes Pigment aus Kuhmilch isoliert, welches er als Lactochrom bezeichnete (heute bekannt als Riboflavin).^[60, 61] 1934 wiederum konnten RICHARD KUHN und PAUL KARRER die erste Synthese des RF-Bausteins etablieren und dessen molekulare Struktur bestätigen (Abbildung 11).^[61, 62] Der Name Riboflavin basiert dabei auf der Ribityl-Seitenkette und der hellgelben Farbe (Latein: *flavus* - gelb). Die Entdeckung Flavins als Baustein von Enzymen gelang schlussendlich dem schwedischen Biochemiker HUGO THEORELL. Damit wurde dessen Rolle als Cofaktor in der Enzymkatalyse manifestiert.^[61] Hunderten flavinhaltiger Enzymen wird heutzutage eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen zugesprochen.^[57, 58, 62]

Die vielseitige Anwendung des Flavins in biologischen Prozessen beruht auf den drei unterschiedlichen Redoxzuständen: oxidiert, einelektronenreduziert (Semichinon-Form) und zweielektronenreduziert (Flavohydrochinon).^[58] Jeder dieser Zustände wiederum kann, abhängig vom pH-Wert, in drei unterschiedlichen Protonierungszuständen vorliegen.^[63] Die neutrale (oxidierte) Form Fl_{ox} existiert zwischen den pH-Werten 1 und 9. Über pH 10 liegt die deprotonierte Form ($\text{Fl}_{\text{ox}}(-\text{H}^+)$ in Abbildung 12) und unter pH 1 die protonierte Form (HFl_{ox}^+ in Abbildung 12) vor. Unter einem Einelektronentransferprozess wird die Semichinon-Form gebildet. Diese wiederum liegt bei pH = 2 im protonierten kationischen Zustand H_2Fl^{+} und bei pH = 8 in seiner anionischen Form Fl^- vor. Durch Übertragung von zwei Elektronen auf Fl_{ox} entsteht das Flavohydrochinon, welches bei pH > 0 protoniert (H_3Fl^+) und bei pH = 6.7 deprotoniert wird ($\text{HFl}_{\text{red}}^-$).

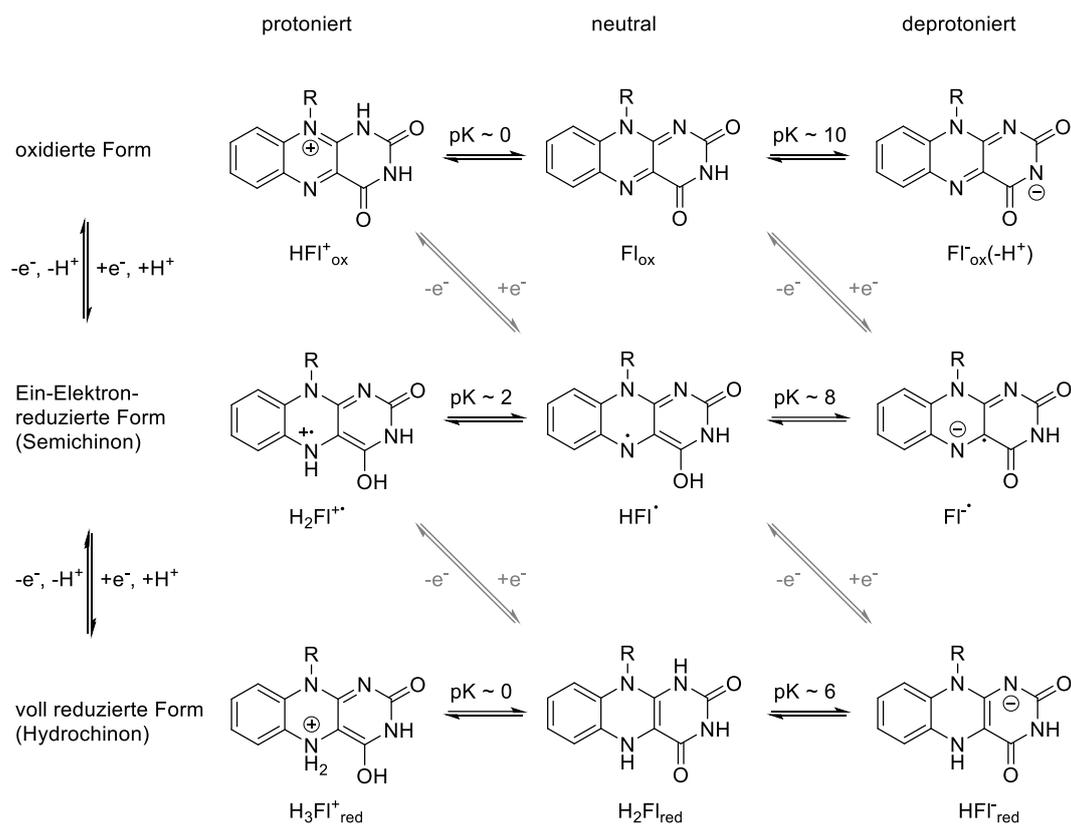


Abbildung 12: Redox- und Protonierungszustände des Flavinbausteins.

Flavinanaloga, abgeleitet von den in Abbildung 11 aufgeführten Cofaktoren Flavin-Mononukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), haben ihr großes Potential bezüglich ihrer katalytischen Anwendung besonders in photokatalytischen Prozessen gezeigt.^[64, 65] Speziell in transienten Absorptionsstudien wurden die spektralen Unterschiede der verschiedenen Redoxzustände zur Aufklärung der photokatalytischen Reaktionen genutzt (siehe Abbildung 13).^[9, 10, 30, 66-68] Neutrales, oxidiertes Flavin absorbiert im sichtbaren Bereich mit einem Absorptionsmaximum im blauen Wellenlängenbereich. Die Absorptionsbanden bei $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$ und 373 nm entsprechen den Übergängen zwischen dem elektronischen Grundzustand S_0 zu den angeregten Zuständen S_1 ($\lambda_{\text{max}} = 442\text{-}450 \text{ nm}$) und S_2 ($\lambda_{\text{max}} = 360\text{-}375 \text{ nm}$).^[63] Die erste Bande bei $\sim 440 \text{ nm}$ zeigt in Wasser eine geringere vibronische Feinstruktur als in weniger polaren Lösungsmitteln, wie Ethanol oder Acetonitril.^[69, 70] Abweichend davon zeigt die zweite Bande ein ausgeprägtes solvatochromes Verhalten (Solvatochromie siehe Kapitel 1.1 Teil B).^[71, 72] Während in nicht polaren Lösungsmitteln ein Absorptionsmaximum bei $\sim 330 \text{ nm}$ aufzunehmen ist, zeigt Wasser eine Rotverschiebung zu 375 nm .^[63, 71, 72] Flavoenzyme spiegeln diese unterschiedlichen Absorptionscharakteristika wieder. Es findet sich eine Form ähnlich der des proteinfreien Flavins ($\lambda_{\text{max}} = 360\text{-}375 \text{ nm}$), während die zweite eine Blauverschiebung der 375 nm Bande umfasst. Dies gleicht dem

Spektrum freier Flavinanaloga in nicht-polaren Lösungsmitteln.^[63, 69] Eine Erklärung für dieses spektroskopische Verhalten wäre, dass die erste Form der wässrigen Phase zugewandt ist, während die zweite Form voll oder teilweise in der hydrophoben Umgebung des Enzyms oder Proteins eingebettet ist. Die dritte Absorptionsbande zwischen 260–270 nm zeigt, wie die erste Bande, einen geringen Umgebungseinfluss.^[72] Vorausgehende Studien weisen den drei Absorptionsbanden $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge zu.^[73-76]

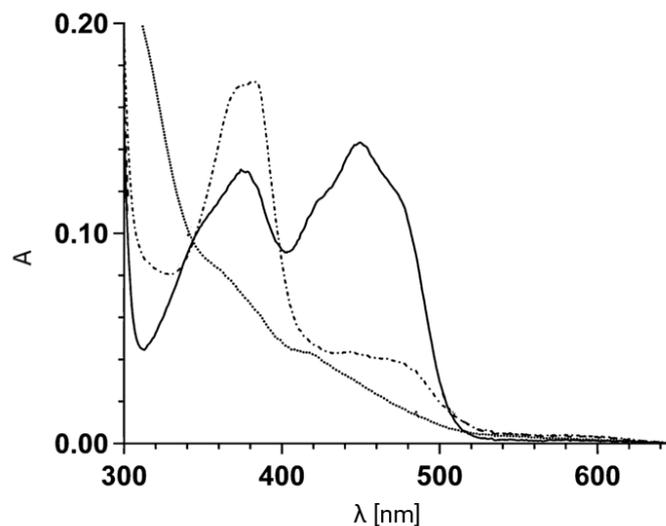


Abbildung 13: Spektrale Eigenschaften der unterschiedlichen Redoxzustände des Flavinbausteins entnommen aus ^[66]. Die Absorptionsspektren repräsentieren die oxidierte Form Fl_{ox} (durchgezogene Linie); die anionische Semichinon-Form Fl⁻ (---) und die Hydrochinon-Form HFl_{red} (••••) des FAD Cofaktors in *Arabidopsis thaliana* GALDH.

Eine vergleichsweise stärkere solvatochrome Abhängigkeit zeigt die Fluoreszenzquantenausbeute (0,26 für wässrige Lösungen bis 0,47 in Acetonitril).^[77] Neben den charakteristischen Absorptionsbanden zeigt Flavin in wässriger Lösung eine helle Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$.^[63, 69] Neben einer pH-Abhängigkeit wird die Fluoreszenzintensität durch diverse organische Verbindungen, wie aromatische Kohlenwasserstoffe und Aminosäuren gelöscht. Mit einer Interkombinationsrate (*intersystem crossing*-Rate) von $\Phi_{\text{isc}} = 0,7$ und einem daraus resultierenden $\pi\pi^*$ -Tripletzzustand hat Flavin bei tiefen Temperaturen eine langlebige Phosphoreszenz von 0,1–0,2 s ($\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$).^[63, 78] Der angeregte Tripletzzustand des Flavins kann unter Energietransfer mit Sauerstoff im Grundzustand reagieren und Singulett-Sauerstoff erzeugen (${}^3\text{Fl}^* + {}^3\text{O}_2 \rightarrow \text{Fl}_{\text{ox}} + {}^1\text{O}_2$). Dieser wiederum agiert als sehr reaktives Zwischenprodukt und kann mit vielen Verbindungen weiterreagieren.^[63, 79]

1.5 Elektronentransfer in biologischen Flavin-Systemen

Flavoproteine können, basierend auf der Natur ihres Substrats, der katalysierten Reaktion und ihrer physiochemischen Eigenschaften kategorisiert werden.^[61, 80, 81] Dabei wird zwischen lichtinduzierten und nicht-lichtinduzierten enzymatischen Reaktionen unterschieden.

Ein lichtunabhängiges Enzym bezeichnet die FAD-abhängige Monooxygenase. Die Katalyse geht vom voll reduzierten Flavin (FADH^{\cdot}) aus und reagiert mit molekularem Sauerstoff. Unter Einzelelektronentransfer zwischen voll reduziertem Flavin und Triplett-Sauerstoff resultiert ein Flavinsemichinon-Superoxid-Radikalpaar.^[59, 81] Dieses wird unter Spininversion zum Hydroperoxyflavin umgewandelt. Durch O-O-Bindungspolarisation und daraus resultierender Sauerstofffreigabe katalysiert das Enzym die Monooxygenierung langkettiger Aldehyde.^[59, 82] Monooxygenasen integrieren also ein Sauerstoffatom in das vorhandene Substrat, während das andere zu Wasser reduziert wird. Flavinabhängige Oxidasen wiederum katalysieren die Reduktion beider Sauerstoffatome zu Wasser.^[83] Der Mechanismus der Katalyse umfasst eine reduktive und eine oxidative Halbreaktion.^[84] Zunächst wird in der reduktiven Halbreaktion das Flavin (Fl_{ox}) unter direktem Hydridtransfer vom Substrat aus reduziert. Das reduzierte Flavin (HFl_{red}) wird nun unter Reaktion mit molekularem Sauerstoff zum oxidierten Flavin regeneriert.

Neben der *dark role* der Flavoproteine nutzen auch eine Vielzahl an flavinabhängigen Enzymen Licht als Reaktionskatalysator. Eines dieser lichtabhängigen Flavoenzyme ist die DNA-Photolyase. DNA-Photolyasen wurden in Pflanzen, niedrigeren Organismen und australischen Kängurus nachgewiesen.^[85] Unter Verwendung von blauem oder UV-nahem Licht (360–500 nm) wird beispielsweise die Reparatur der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) in DNA katalysiert.^[85-87] Photolyasen können, bezüglich der zu reparierenden Schäden in zwei Kategorien eingeteilt werden: CPD-Photolyasen, welche Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere reparieren und (6-4)-Photolyasen, welche 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte ((6-4)PP Photoprodukte) reparieren. CPD-Schäden entstehen durch [2+2]-Cycloaddition zwischen benachbarten Thyminen (siehe Abbildung 68), die (6-4)PP Photoprodukte basieren auf der PATERNÒ-BÜCHI Cycloaddition (siehe Abbildung 69). Die Reparatur der UV-induzierten Schäden findet mit den, in der aktiven Seite nicht-kovalent gebundenen Cofaktoren statt (FAD und Methylentetrahydrofolat (MTHF), als Beispiel des zweiten Cofaktors). Das voll reduzierte Flavin (FADH^{\cdot}) wird entweder durch direkte Photonenabsorption oder durch Energietransfer vom zweiten Cofaktor auf das Flavin angeregt (siehe Abbildung 14).

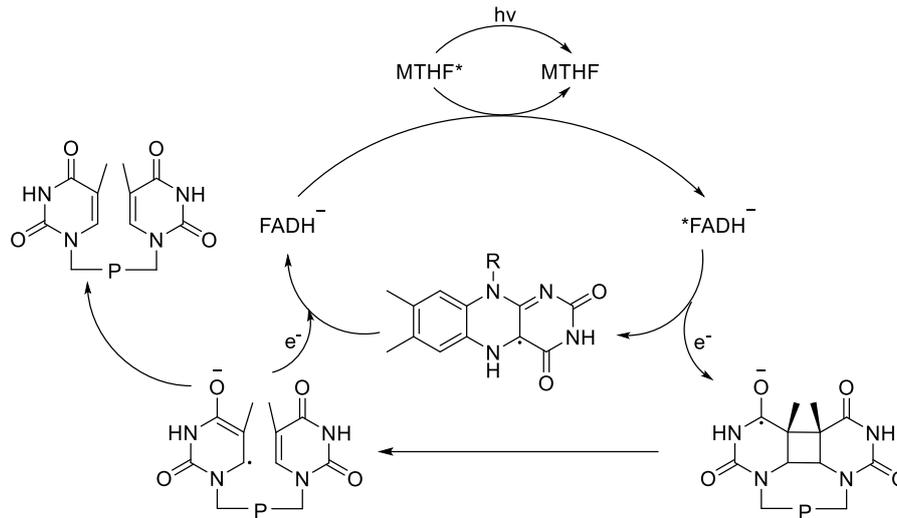


Abbildung 14: Reparaturmechanismus des CPD-Schadens unter Verwendung der DNA-Photolyase II.

Dabei werden die Photolyasen zusätzlich anhand ihres zweiten Cofaktors eingeteilt. Typ I nutzt als Antennenpigment 8-Hydroxy-5-Desazariboflavin während Typ II MTHF (siehe Abbildung 67) als zweiten Cofaktor trägt.^[88] Der initiale Schritt der Photokatalyse beschreibt die Anbindung der beschädigten Nucleotide an der aktiven Seite. Das jeweilige Antennenpigment absorbiert ein Photon und transferiert die Anregungsenergie auf das voll reduzierte Flavin ($FADH^-$). Nach Anregung der Flavin-Einheit wird ein Elektron auf das CPD übertragen und unter Radikalbildung der Cyclobutanring gespalten.^[58] Um den katalytischen Zyklus zu vollenden, wird ein Elektron des formierten Radikals zurück auf $FADH^-$ übertragen.^[89]

Eine weitere Flavoenzymklasse wird durch die Cryptochrom-Proteine repräsentiert. Sie weisen die gleiche Struktur, wie DNA-Photolyasen auf, besitzen jedoch nicht die Photoreparaturaktivität. Cryptochrome nutzen nicht-kovalent gebundenes FAD in Kombination mit MTHF als weiteren Cofaktor zur Regulation der inneren, zirkadischen Uhr in Tieren und des Wachstums bzw. der Entwicklung von Pflanzen.^[90, 91]

Zur Entwicklung künstlicher Enzyme auf Basis der Aktivität natürlicher Enzyme haben sich Peptide als ideale Kandidaten erwiesen. Sie bieten einen übersichtlichen, ersten Einblick in die Elektronentransferkaskade.^[92] Die dabei zu berücksichtigenden Einflüsse stellen der Donor-Akzeptor-Abstand^[6, 93], das Dipolmoment^[94, 95], die Sekundärstruktur^[7] und die benachbarten Aminosäuren^[96, 97] dar. Im Fokus steht bei allen Faktoren der Einfluss auf die Elektronentransferrate und der daraus resultierende Mechanismus des Elektronentransfers (siehe Kapitel 1.2 und 1.3). Dabei wird sowohl der Superaustauschmechanismus befürwortet^[98] als

auch ein Mechanismus, welcher bei kurzen Donor-Akzeptor-Abständen Superaustauschmechanismus und mit wachsendem Abstand *Hopping*-Mechanismus repräsentiert.^[99] Beispielsweise nutzten SISO *et al.* Polyglutamatpeptide als wiederkehrende Einheit ($n = 0-8$) zwischen Donor und Akzeptor um die Abstandsabhängigkeit des ET zu untersuchen.^[100] Die Elektronentransferraten zeigten für $n = 0$ (3.9 Å) bis $n = 8$ (15.9 Å) eine exponentielle Abhängigkeit. Somit wird innerhalb dieses Abstandes ein Superaustausch angenommen. Untersuchungen, welche Polyproline als Peptidmatrix nutzen, erweiterten den Abstand zwischen Donor und Akzeptor ($n = 0-9$). Für die Peptide mit den Wiederholungseinheiten $n = 0$ bis $n = 4$ konnte ein klarer exponentieller Abfall der Elektronentransferrate mit steigendem Donor-Akzeptor-Abstand detektiert werden. Dies bestätigt den Superaustauschmechanismus in Abständen bis 18 Å ($n = 4$). Für größere Abstände ($n = 5-9$) wurde eine schwache Abhängigkeit angesichts des *Hopping*-Mechanismus referiert.^[93] Ähnliche Tendenzen wurden für Peptide basierend auf 2-Methylalanin-Oligomeren (Aib-Oligomeren) gefunden.^[7] Für Peptidlängen über 110 Å konnte eine nicht-exponentielle Abstandsabhängigkeit nachgewiesen werden.^[101] Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass die Elektronentransferrate und -richtung durch das Dipolmoment des Peptides beeinflusst wird.^[102, 103] Es konnte nachgewiesen werden, dass in helikalen Peptiden ein ET gekoppelt mit dem Dipolmoment schneller stattfindet als ein ET entgegen des Dipolmomentes.^[103-105] Einen weiteren, nicht zu vernachlässigenden Einfluss zeigen redoxaktive, aromatische Aminosäuren. Sie werden als *stepping stones* in der Elektronentransferkaskade betrachtet.^[106, 107] Durch die Anwesenheit von elektronenreichen Aminosäureseitenketten konnte die Elektronentransferrate signifikant gesteigert werden.^[107] Eine erhebliche Rolle im Elektronentransferprozess wurde dabei den in der Natur verwendeten Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zugesprochen. Besonders Tryptophan und Tyrosin nehmen mit ihren niedrigen Oxidationspotentialen in vielen Flavoproteinen an den Elektronentransferprozessen teil.^[106, 108]

2. Aufbau des Systems

Das in Kapitel I beschriebene Modell zur vereinfachten Darstellung lichtinduzierter ET-Prozesse bedarf diverser Voraussetzungen. Ein photoinduzierter ET hängt unter anderem von den Redoxpotentialen der beteiligten Aminosäuren ab. Durch Anregung des Flavins und anschließender Interkombination wird der energetisch niedrigste Triplettzustand $^3\text{Fl}^*$ mit einem Redoxpotential von $E_{\text{red}} = 1.7 \text{ V vs SHE}$ (*standard hydrogen electrode*; deutsch: Standardwasserstoffelektrode) erreicht.^[63] Dies ermöglicht die Anwendung der natürlich vorkommenden Aminosäuren Tryptophan (Trp) und Tyrosin (Tyr). Beide weisen ein negatives Redoxpotential (Trp: $E_{\text{ox}} = 1.01 \text{ V vs SHE}$ und Tyr: $E_{\text{ox}} = 0.93 \text{ V vs SHE}$) als der populierte Flavintriplettzustand auf.^[109] Somit können diese als Elektronendonoren und mögliche Brückenelemente für Elektronentransferprozesse fungieren und sind in der Lage, den Triplettzustand der Flavin-Einheit auszulöschen. Oftmals werden ähnliche Kaskaden in der Natur genutzt, um die Flavinsemichinon- oder Hydrochinonform zu generieren.^[10, 30, 67, 110]

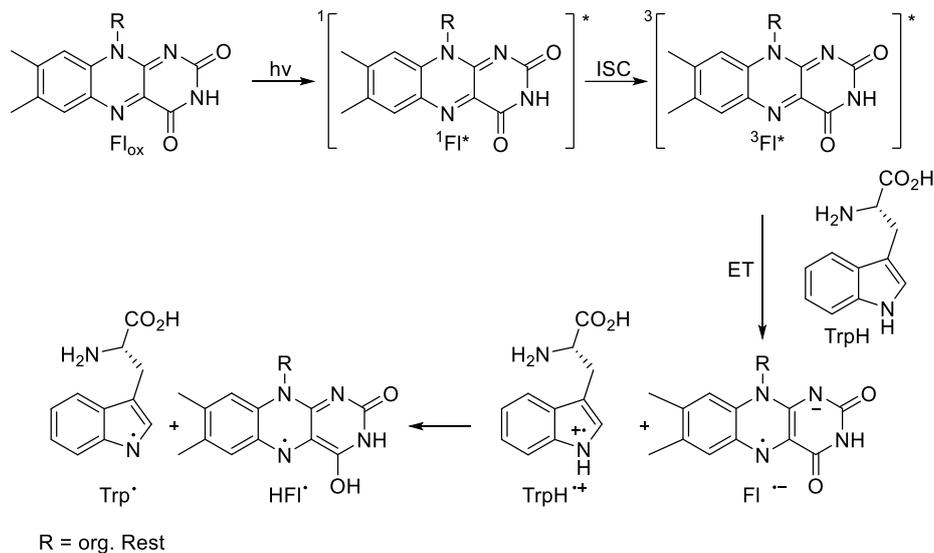


Abbildung 15: Darstellung des Elektronen- und Protonentransfers zwischen Flavin und Tryptophan.

Die aus dem ET resultierenden Radikale Trp^{\bullet} , TyrO^{\bullet} und das reduzierte Flavin $\text{Fl}^{\bullet-}$; beziehungsweise dessen protonierter Zustand FlH^{\bullet} , bieten weitere Charakterisierungsmöglichkeiten. Die unterschiedlichen Absorptionsmaxima der Elektronentransferpartner machen es möglich, diese voneinander zu differenzieren. Nach UV-Anregung spiegeln die Absorptionsmaxima bei 300, 380, 520 und 680 nm beispielsweise den Triplettzustand $^3\text{Fl}^*$ wieder.^[111] Eine Absorptionsänderung zu den Maxima bei 320 und 520 nm (FlH^{\bullet}) resultiert aus vorausgegangenem ET. Eine eindeutige Charakterisierung von Trp^{\bullet} und TyrO^{\bullet} mit

Absorptionsbanden bei 510 und 405 nm ist jedoch aufgrund der geringen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon(\text{Trp}\cdot) = 2000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(\text{TyrO}\cdot) = 3200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) schwer nachzuweisen. ^[112-114]

Das für diese Arbeit resultierende Elektronentransfermodell besteht aus einer flavin-modifizierten Aminosäure als Elektronenakzeptor, Tryptophanen als *stepping stones* und Tyrosin als finaler Elektronendonator und soll in zwei unterschiedlichen Peptidmodellen Anwendung finden. Zusätzlich wurde auf Basis der bereits gezeigten gesteigerten ET-Rate unter Anwesenheit von elektronenreichen Aminosäureseitenketten der Einbau mehrerer *stepping stones* gewählt (siehe Kapitel 4).

3. Synthese der flavinmodifizierten Aminosäure

Im Folgenden sind die einzelnen Syntheseschritte zum Aufbau der flavinmodifizierten Aminosäure dargestellt. Es wurden zwei unterschiedliche Synthesestrategien verfolgt. Die Flavin-Aminosäure **1**, dargestellt in Abbildung 16, wurde mittels kupferkatalysierter Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC-Reaktion)^[115] dargestellt, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben. Anfänglich wurde eine Darstellung der Flavin-Aminosäure, basierend auf vorangegangenen Arbeiten von CARELL *et al.* verfolgt.^[116] Um den Abstand zwischen Flavin- und Peptideinheit zu verringern, wurde dabei die aliphatischen Linkereinheit verkürzt (siehe Abbildung 17).

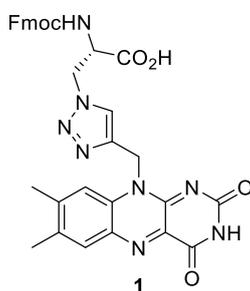


Abbildung 16: Struktur der flavinmodifizierten Aminosäure **1**.

3.1 Synthesestrategie I

Zunächst wurde eine Synthesestrategie basierend auf den Studien von CARELL *et al.* verfolgt.^[116]

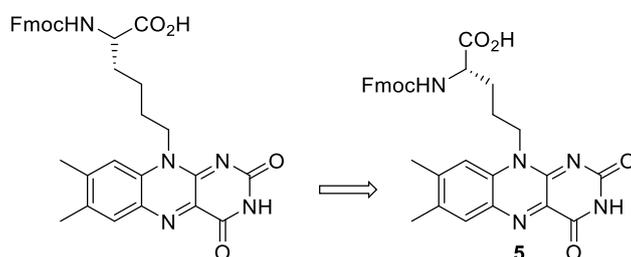


Abbildung 17: Struktur der Flavin-Aminosäure mit Lysin-Linker^[116] (links) und verkürztem Ornithin-Linker (rechts).

Zur Verkürzung der Linkereinheit wurde Boc-geschütztes L-Ornithin anstelle von Boc-L-Lys-OH als Aminosäure eingeführt (Abbildung 18). Ausgehend von **7** bestand die Synthese aus der bimolekularen Reaktion mit Boc-L-Orn-OH unter *ipso*-Angriff, um **8** in 20 % Ausbeute zu erhalten (siehe Abbildung 18). Ausgangspunkt war 4,5-Dimethyl-1,2-dinitrobenzol (**7**), welches durch

literaturbekannte Oxidation mittels H_2O_2 in 64 % Ausbeute dargestellt wurde.^[117] In der darauffolgenden hydrogenolytischen Reduktion konnte jedoch nicht das gewünschte Produkt erhalten werden. Auch die Variation der Reaktionsbedingungen, wie die Verwendung des *Pearlman's catalyst* ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$), längere Reaktionszeiten und mehr Äquivalente H_2 führten nicht zum Produkt. Um Dekompositionen der Ausgangsstoffe auszuschließen, wurden selbige Reaktionsbedingungen, wie zuvor gezeigt mit Boc-L-Lysin-OH, wiederholt. Dabei konnten die deutlich höheren Ausbeuten der Literatur reproduziert und die flavinmodifizierte Aminosäure erfolgreich synthetisiert werden.

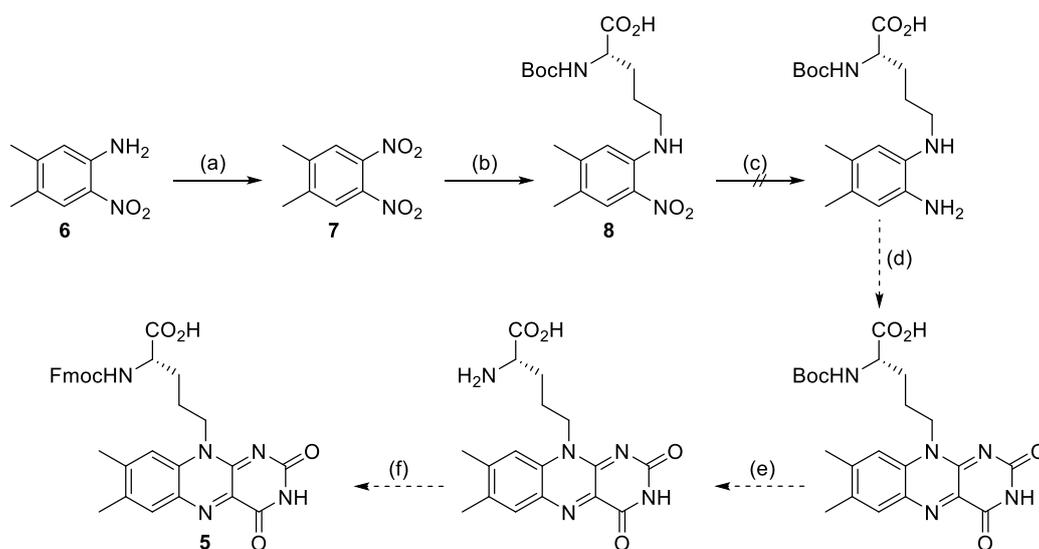


Abbildung 18: Synthese der flavinmodifizierten Aminosäure **5**: (a) H_2O_2 , AcOH, 50 °C, 16 h, 64 %; (b) Boc-L-Ornithin-OH, Pyridin, reflux, 3 d, 20 %; (c) Pd/C, H_2 , AcOH, RT, 24 h; (d) Alloxanmonohydrat, H_3BO_3 , AcOH, RT, 12 h; (e) CHCl_3/TFA (1:1), RT, 1 h; (f) Fmoc-OSu, NaHCO_3 , DMF, 0 °C, 30 min.^[116]

Mit der in der WAGENKNECHT Gruppe bekannten kupferkatalysierten Alkin-Azid-Cycloaddition wurde eine weitere Synthesestrategie verfolgt, um den Flavinbaustein in eine Aminosäure einzubringen (siehe Kapitel 3.2).

3.2 Synthesestrategie II

Ausgangspunkt der flavinmodifizierten Aminosäure **1** war die Synthese eines alkinmodifizierten Flavins, welches das Dipolarophil der CuAAC-Reaktion darstellt (Abbildung 19). Dafür wurde das kommerziell erhältliche Phenylendiaminderivat **9** alkinsubstituiert und **10** mit einer Ausbeute von 44 % erhalten. Entgegen den Angaben der Literatur^[118], erfolgte die Reaktionsführung bei

Raumtemperatur, da mit steigender Temperatur mehrfach alkylierte Nebenprodukte erhalten wurden. Die darauffolgende Synthese wurde, vorherigen Flavinsynthesen folgend, nach KUHN *et al.* durchgeführt.^[119] Aus der Kondensation mit Alloxanmonohydrat konnte **11** in Ausbeuten von 79 % erhalten werden. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Flavinderivates **11** in den zur Verfügung stehenden deuterierten Lösungsmitteln, konnte keine vollständige Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt werden. Eine annähernd vollständige Löslichkeit war lediglich in deuteriertem DMSO gegeben, dessen Referenzsignal die Methylgruppen des Moleküls **11** überlagert. Eine eindeutige Identifizierung von **11** konnte jedoch über hochauflösende Massenspektroskopie erfolgen.

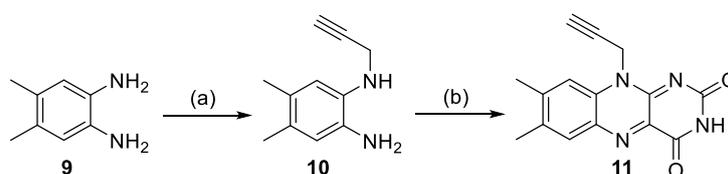


Abbildung 19: Synthese des alkinylsubstituierten Flavins **11**: (a) 3-Brompropin, K_2CO_3 , THF, RT, 24 h, 44 %; (b) Alloxanmonohydrat, B_2CO_3 , AcOH (96 %), 60 °C, 16 h, 79 %.

Infolge der Charakterisierungsschwierigkeiten wurde eine weitere Syntheseroute durchgeführt, welche durch Einführen einer TMS-Schutzgruppe die Löslichkeit des Kondensationsproduktes positiv beeinflusst (Abbildung 20). Zu diesem Zweck wurde **9** unter den gleichen Bedingungen, wie für **10** beschrieben, mit einem 3-Brom-1-trimethylsilyl-1-propin substituiert. Das TMS-geschützte Flavin-Alkin-Derivat **13** konnte gleich der bisherigen Syntheseroute (Abbildung 19) mit 60 %iger Ausbeute dargestellt werden. Durch eine effiziente Aufreinigung konnte **13** eindeutig charakterisiert werden.

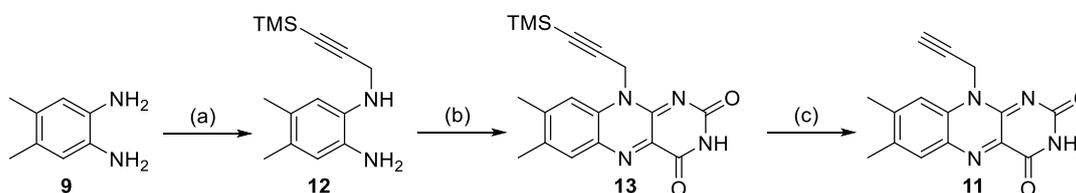


Abbildung 20: Synthese des alkinylsubstituierten Flavins **13**: (a) 3-Brom-1-trimethylsilyl-1-propin, K_2CO_3 , THF, RT, 24 h, 43 %; (b) Alloxanmonohydrat, B_2CO_3 , AcOH (96 %), 60 °C, 16 h, 60 %; (c) TBAF, THF, RT, 10 min, 44 %.

Die vergleichsweise geringeren Ausbeuten zur Synthese des TMS-geschützten Flavins **13** und die nötige TMS-Entschützung als zusätzlicher Syntheseschritt vor einer weiteren Umsetzung

stehen jedoch in keinem Verhältnis zu dem benötigten Mehraufwand. Aus diesem Grund wurde diese Syntheseroute nicht weiter verfolgt.

Erste Clickreaktionen wurden mit der synthetisierten β -Azido-Aminosäure **16** durchgeführt. Diese wurde angelehnt an die von SHETTY *et al.* beschriebene Route dargestellt (Abbildung 21).^[120] Zunächst wurde die käuflich erworbene Aminosäure Boc-L-Ser-OH (**14**) zur Einführung einer besser zu substituierenden Abgangsgruppe als Aminosäurerest mit Mesylchlorid umgesetzt. Die daraus erhaltene Aminosäure **15** wurde zur Darstellung des 1,3-Dipols als Aminosäurerest (**16**) mit Natriumazid nukleophil substituiert. Die geringe Ausbeute von 20 % wurde von Dr. S. Hermann mit der Nebenproduktbildung des Boc-Dehydroalanin-OMe erklärt.

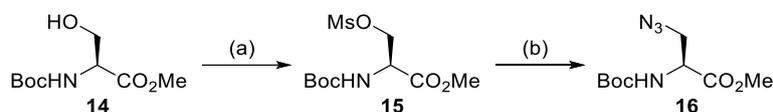


Abbildung 21: Synthese der azidmodifizierten Aminosäure **16**: (a) Et_3N , MsCl , DCM , 0°C -RT, 1 h; (b) NaN_3 , DMF , 50°C , 45 min, 20 % über zwei Stufen.

Die Reaktion zwischen 1,3-Dipol- (**16**) und Dipolarophilbaustein (**11**) erfolgte über eine kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition, wie in Abbildung 22 veranschaulicht.^[115] Mit 35 % Ausbeute konnte **17** erhalten werden.

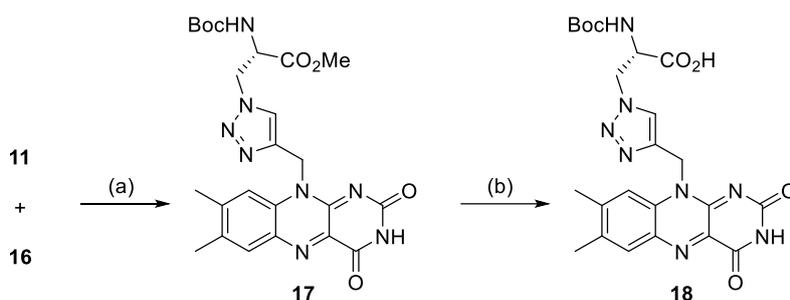


Abbildung 22: Synthese der flavinmodifizierten Aminosäure **18**: (a) Cu(I) , DIPEA , DMF , RT, 16 h, 35 %; (b) 1M NaOH , EtOH , RT, 30 min, 97 %.

Der letzte Schritt zur finalen, für die Festphasensynthese geeigneten Aminosäure (**18**) wird durch die Verseifung der C-terminalen Methoxyschutzgruppe beschrieben. Nach der Reaktion mit einmolarer Natronlauge wurde **18** erhalten. Basierend auf der Wasserlöslichkeit der dabei erhaltenen Aminosäure **18** und der, für die Elution benötigte Zugabe von Essigsäure bei der säulenchromatographischen Aufreinigung, konnte nicht effizient entsalzt werden. Alternativ

würde sich hier eine Verseifung unter Zuhilfenahme einer Base anbieten, deren entstehendes Salz durch Sublimation aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann. Spätere Kupplungsversuche an dem Peptid **PP₀₁** (siehe Tabelle 2) bestätigten die Notwendigkeit einer Entsalzung, um den Aktivester zu generieren. Auch unter Verwendung verschiedener Kopplungsreagenzien, Äquivalenten und Variation der Reaktionszeit konnte keine erfolgreiche Kopplung der Aminosäure **18** an **PP₀₁** erreicht werden (siehe Tabelle 1). Durch graphische Auswertung der LC/MS-Chromatogramme konnte das Kopplungsprodukt nur in Spuren nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Peptid-Kopplungsbedingungen der Aminosäure **18** an **PP1**.

	Aktivierungs- reagenz	Äq.	HOBt [Äq.]	DIPEA [Äq.]	LM	Reaktionszeit [d]
1	HBTU	1.20	1.20	2.40	DMF	1
2	HBTU	1.20	1.20	2.40	DMF	2
3	HBTU	2.40	1.20	2.40	DMF	2
4	PyBOP	2.40	1.20	2.40	DMF	2
5	DIC	3.60	1.20	-	DCM	2

Dahingegen konnte mit der flavinmodifizierten Aminosäure **1** eine vollständige Peptidkopplung erreicht werden. Diese wurde mittels CuAAC-Reaktion unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Aminosäure Fmoc-L-β-Azidoalanin **19** und dem Flavinbaustein **11** mit einer Ausbeute von 70 % erhalten. Um möglichst hohe Reinheit zu erreichen, wurde die Aufreinigung des Bausteins **1** mittels HPLC Säulenchromatographie durchgeführt.

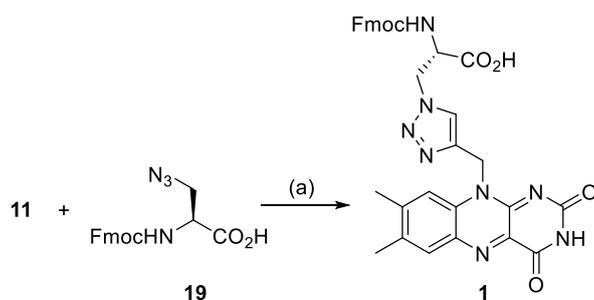


Abbildung 23: Synthese der flavinmodifizierten Aminosäure **1**: (a) NaAsc, TBTA, [Cu(CH₃CN)₄]PF₆, DMF, RT, 16 h, 70 %.

4. Synthese der Peptide

Um einen ersten Einblick in ET-Prozesse des hier gewählten Modells zu bekommen, wurden zwei unterschiedliche Peptidmodelle gewählt. Als initiales Modell wurden Peptide basierend auf Polyprolinmatrix, mit Tryptophan als *stepping stones* entlang ihrer Peptidkette und einer C-terminalen Tyrosin-Einheit, gewählt. Polyproline (PP) können in den Konformationen PPI und PPII vorliegen. Die linksgängige PPII Helix wird als gängige Konformation für Proteinfaltung angenommen und fand bereits breite Anwendung zur Separierung von ET-Brückenelementen in der Biologie und Werkstoffkunde.^[121, 122] In vielen biologischen Prozessen wird jedoch die konstant wechselnde cis-trans Isomerisierung zwischen PPI und PPII angenommen.^[123-127] Untersuchungen haben indes gezeigt, dass PPI nur in bestimmten aliphatischen Lösungsmitteln, wie n-Propanol und Butanol, vorliegt. Auch die Umwandlung der PPII-Konformation in PPI wird nur in mindestens 50 % aliphatischem Lösungsmittel beobachtet.^[128] Daraus folgt, dass die in dieser Arbeit synthetisierten Peptide PPII Konformation haben (siehe Abbildung 34). Diese zeichnet sich durch eine linksdrehende Spirale aus mit durchschnittlich 3 Aminosäureseitenketten pro Drehung. Pro Windung beträgt die Ganghöhe circa 9.3 Å. Verglichen dazu beschreibt die α -Helix eine rechtsgängige Sekundärstruktur mit 3.6 Aminosäuren je Umdrehung, wie in Abbildung 24 dargestellt. Mit einer Ganghöhe von 5.4 Å liegt damit ein geringerer Abstand der Aminosäuren vor.

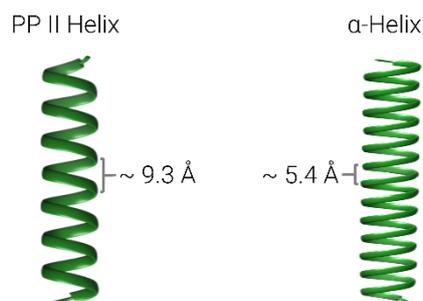


Abbildung 24: Vereinfachte Darstellung der PPII- und α -Helix.

Zur weiteren Analyse des ET wurde als Peptidmodell das 33-Aminosäuren lange, α -helikale, Transmembransegment (TM-Segment) des EGF-Rezeptors (*epidermal growth factor receptor*) genutzt (K⁶⁴²-V⁶⁷⁴).^[14]

4.1 ET in Polyprolinpeptiden

Die Auswahl der verschiedenen PP-Sequenzen wurde aufgrund unterschiedlicher Kriterien getroffen (siehe Tabelle 2). PP_{ref} wird als Referenzpeptid verwendet. Das Pendant dazu stellt PP_3 , welches als wiederkehrende Einheit zwischen den ET-Brückenelementen drei Proline aufweist. Als *stepping stones* wurden zwei Tryptophane (W_1 und W_2) mit C-terminalem Elektronendonator in Form von Tyrosin gewählt. Mit den Peptiden PP_2 und PP_1 wird die Abstandsabhängigkeit des ET zwischen Flavin und erstem folgendem Tryptophan (W_1) im Vergleich zu PP_3 beobachtbar. Es wurde dabei ein Distanzbereich zwischen erstem Tryptophan (W_1) und Flavin gewählt, welcher dem Superaustauschmechanismus folgt ($\sim 10 \text{ \AA}$). PP_{03} , PP_{02} und PP_{01} wurden gewählt um einen möglichen Einfluss des Abstandes des zweiten Tryptophans (W_2) und Tyrosins auszumachen. Alle Peptide wurden mittels Fmoc-Festphasenpeptidsynthese hergestellt, wobei die Anbindung der Flavin-Aminosäure **1**, wie in Kapitel 4 des Experimentalteils beschrieben, erfolgte.

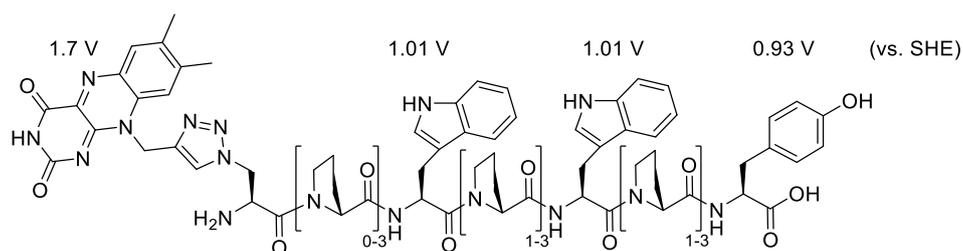


Abbildung 25: Struktur der flavinmodifizierten Polyprolin-Peptide und den Redoxpotentialen der ET-Partner.

Tabelle 2: Peptidsequenzen der flavinmodifizierten Polyprolin-Peptide.

Peptid	Sequenz
PP_{ref}	NH_2 - 1 -PPP-A-PPP-A-PPP-A-COOH
PP_3	NH_2 - 1 -PPP- W_1 -PPP- W_2 -PPP-Y-COOH
PP_2	NH_2 - 1 -PP- W_1 -PP- W_2 -PP-Y-COOH
PP_1	NH_2 - 1 -P- W_1 -P- W_2 -P-Y-COOH
PP_{03}	NH_2 - 1 - W_1 -PPP- W_2 -PPP-Y-COOH
PP_{02}	NH_2 - 1 - W_1 -PP- W_2 -PP-Y-COOH
PP_{01}	NH_2 - 1 - W_1 -P- W_2 -P-Y-COOH

4.2 ET durch EGFR-Peptide

Bei der Auswahl der EGFR-ET-Modelle wurde darauf geachtet, dass die Positionen der Tryptophane als *stepping stones* in der α -helikalen Sekundärstruktur übereinander vorzufinden sind. Dabei wurde bezüglich der Nähe beziehungsweise Höhe variiert, was zu unterschiedlicher Anzahl an *stepping stones* führte (siehe Tabelle 3). Die Anwesenheit mehrerer Tryptophan *stepping stones* ermöglicht eine gesteigerte ET-Rate. Als C-terminaler Elektronendonator wurde Tyrosin eingesetzt. Dieses wurde in den Peptiden **EGFR_{F1}** bis **EGFR_{F6}** an Position 667 (an Stelle der aromatischen Aminosäure Phe⁶⁶⁷) eingebracht mit der Ausnahme des Peptids **EGFR_{F3}** (an Position 668 (statt Met⁶⁶⁸)), um eine nahezu vollständige Peptidwindung zum vorherigen Tryptophan zu generieren. Die flavinmodifizierte Aminosäure **1** wurde mittels Fmoc-basierter Festphasensynthese N-terminal in die Peptidsequenz eingebaut. Damit findet sie sich im extrazellulären Juxtamembranbereich auf Position 641.

Synthese der Peptide

Tabelle 3: Peptidsequenzen der flavinmodifizierten EGFR-Peptide.

Peptid	Sequenz	Anzahl Trp <i>stepping stones</i>
EGFR _{wt}	NH ₂ -GPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRRHIV-COOH	-
EGFR _{F1}	NH ₂ - 1 -KIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRRHIV-COOH	-
EGFR _{F1} 1	NH ₂ - 1 -KIPS- W ₁ -ATGMVG- W -LLLLLV- W -ALGIGL- Y -MRRRHIV-COOH	3
EGFR _{F1} 2	NH ₂ - 1 -K- W ₁ -PSIATG- W -VGALLL- W -LVVALGIGL- Y -MRRRHIV-COOH	3
EGFR _{F1} 3	NH ₂ - 1 -K- W ₁ -PSIATG- W -VGALLL- W -LVVALG- W -GLF- Y -RRRHIV-COOH	4
EGFR _{F1} 4	NH ₂ - 1 -K- W ₁ -PSIATG- W -VGALLL- W -LVVALG- W -GL- Y -MRRRHIV-COOH	4
EGFR _{F1} 5	NH ₂ - 1 -K- W ₁ -PSI- W -TGM- W -GAL- W -LLL- W -VAL- W -IGL- Y -MRRRHIV-COOH	6
EGFR _{F1} 6	NH ₂ - 1 -K- W ₁ -PS- W -ATG- W -VG- W -LLL- W -LV- W -ALG- W -GL- Y -MRRRHIV-COOH	7
EGFR4	NH ₂ - K- W -PSIATG- W -VGALLL- W -LVVALG- W -GL- Y -MRRRHIV-COOH	

5. Optische Charakterisierung

Die flavinmodifizierte Aminosäure **1** wird im Folgenden spektroskopisch untersucht. Um ET-Prozesse an denen der Flavinbaustein beteiligt ist aufzuklären, wird zwischen ET-Prozessen nicht-kovalent und kovalent verknüpfter ET-Partner unterschieden.

5.1 Optische Eigenschaften der Flavin-Aminosäure **1**

Um einen ersten Einblick in das spektroskopische Verhalten der Flavin-Aminosäure **1** zu erhalten, wurden Absorptions- und Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc.}} = 440 \text{ nm}$) in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (1:1) aufgenommen. Im Hinblick auf die generell schlechte Löslichkeit der Flavinaminosäure **1** erwies sich dieses als geeignetes Lösungsmittel. Das Absorptionsspektrum zeigt dabei die für Flavin charakteristischen Maxima bei $\lambda = 266, 363$ und 444 nm und ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 524 \text{ nm}$ (siehe Abbildung 26). Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, findet sich die zweite Absorptionsbande ($S_0 \rightarrow S_1$) im spektralen Bereich für polare Umgebungen.

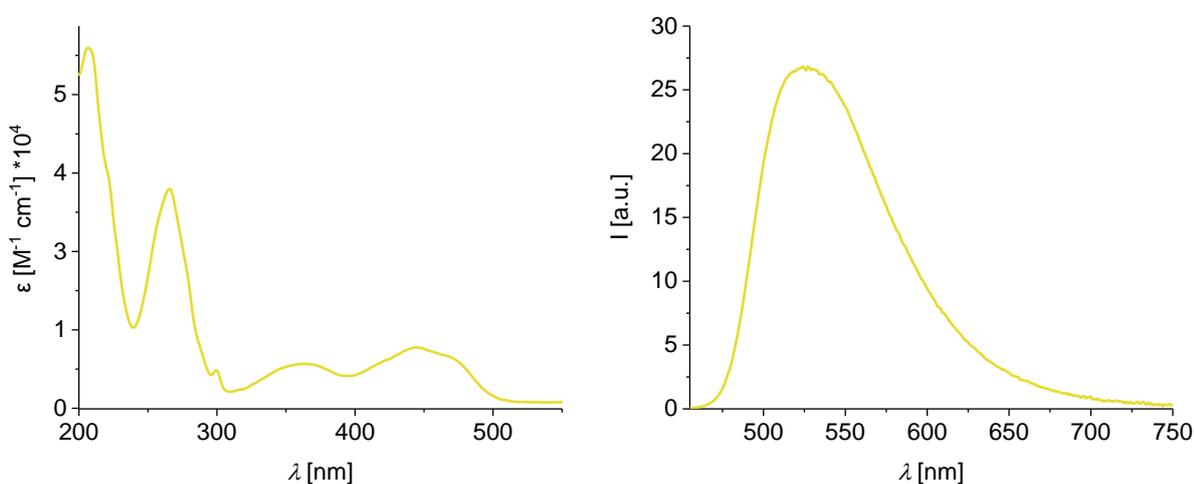


Abbildung 26: Absorption und Fluoreszenz der flavinmodifizierten Aminosäure **1** ($\lambda_{\text{exc.}} = 440 \text{ nm}$; in MeCN/H₂O (1:1)).

Zur weiteren Charakterisierung des Flavins, besonders bezüglich dessen ausgeprägter Solvatochromie, wurden Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F in verschiedenen polaren Lösungsmitteln aufgenommen und in Tabelle 4 aufgelistet.

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F dient zur Charakterisierung der Fluoreszenzeffizienz. Sie entspricht dem Verhältnis der emittierten zu den absorbierten Photonen.^[129]

$$\phi_F = \frac{\text{Anzahl der emittierten Photonen}}{\text{Anzahl der absorbierten Photonen}} = \frac{k_{em}}{k_{em} + \sum k_{nr}} \quad (9)$$

Φ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
k_{em}	Geschwindigkeitskonstante der Emission
$\sum k_{nr}$	Summe der Geschwindigkeitskonstanten der nichtstrahlenden Prozesse

Die Aminosäure **1** zeigt eine starke Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Polarität des umgebenden Lösungsmittels. Das wird mit dem 17-fachen Anstieg der Fluoreszenzeffizienz von 0.019 in Acetonitril/Wasser nach 0.329 in Essigsäureethylester deutlich.

Tabelle 4: Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F der Flavin-Aminosäure **1** in verschiedenen Lösungsmitteln ($\lambda_{exc.} = 440 \text{ nm}$).

Lösungsmittel	MeCN/H ₂ O (1:1)	DMSO	Aceton	EtOAc
Φ_F	0.019	0.073	0.312	0.329

Der Vergleich der optischen Eigenschaften der Flavin-Aminosäure **1** mit dem Referenzpeptid **EGFR_{F1}** spiegelt ebenfalls die Solvatochromie des Flavins wieder. Das Absorptionsspektrum des **EGFR_{F1}** zeigt die für Flavin charakteristischen Maxima bei $\lambda = 266, 357$ und 439 nm und ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 524 \text{ nm}$. Die zweite solvatochrome Absorptionsbande ($S_0 \rightarrow S_1$) ist mit 357 nm um 6 nm blauverschoben. Einen stärkeren Einfluss der hydrophoben Peptidumgebung zeigt das Fluoreszenzverhalten. Mit einem 4.7-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität und einem Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute um den Faktor 6.8 wird die Nähe zum hydrophoben Peptidgerüst trotz N-terminalem Einbau der Flavin-Aminosäure **1** (Φ_F (**EGFR_{F1}**) 0.13 in MeCN/H₂O; $\lambda_{exc.} = 440 \text{ nm}$; siehe Tabelle 8) offensichtlich. Die zusätzliche Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums des **EGFR_{F1}** (verglichen mit **1**) wird im Hinblick auf das erreichte Detektormaximum nicht weiter diskutiert (spätere Fluoreszenzmessungen der flavingekoppelten Peptide zeigen ein zu **1** vergleichbares Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 524 \text{ nm}$). Auf den Begriff der Solvatochromie wird in Kapitel 1.1 Teil B weiter eingegangen.

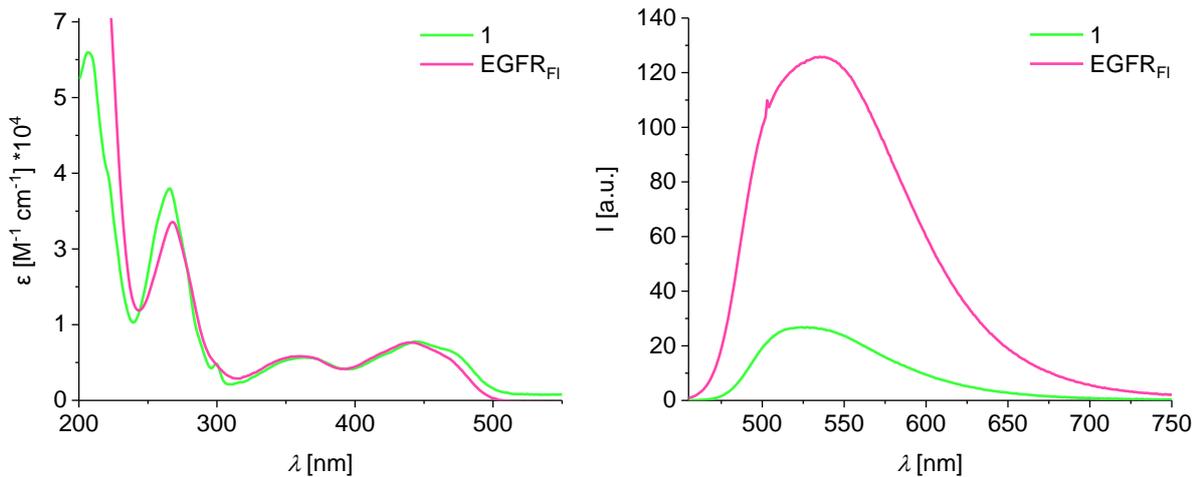


Abbildung 27: Absorption und Fluoreszenz der flavinmodifizierten Aminosäure **1** und des Peptids **EGFR_{FI}** ($\lambda_{exc.} = 440 \text{ nm}$; 0.015 mM in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)).

5.2 Elektronentransfer zwischen nicht-kovalent gebundenen Partnern

Für erste Untersuchungen der ET-Prozesse, wurde ein Modell mit frei im Lösungsmittel diffundierendem ET-Paar gewählt. Dafür wurde als Akzeptor **1** und als Donor kommerziell erhältliches Fmoc-L-Trp-OH (**W**) gewählt. Dieses wurde in unterschiedlich molarem Verhältnis zur Flavin-Aminosäure **1** gegeben. Eine daraus resultierende Fluoreszenzlöschung kann mittels STERN-VOLMER-Gleichung analysiert werden und gibt Auskunft über die Art des ET.^[130]

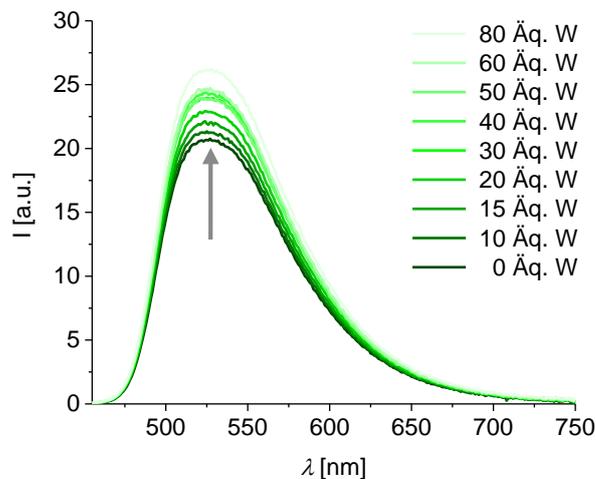


Abbildung 28: Fluoreszenz der flavinmodifizierten Aminosäure **1** in Gegenwart verschiedener Äquivalente **Fmoc-L-Trp-OH W** ($\lambda_{exc.} = 440 \text{ nm}$; 0.015 mM in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)).

Ein erfolgreicher ET von Tryptophan auf **1** würde eine Flavinfluoreszenzlöschung bewirken unter Bildung der Flavinsemichinon- oder Hydrochinonform.^[131] Diese dynamische Fluoreszenzlöschung, abhängig von der Donorkonzentration, konnte unter Verwendung von Flavin **1** und Tryptophan **W** unter nicht-kovalenten Bedingungen nicht beobachtet werden, dargestellt in

Abbildung 28. Damit kann in dem hier gewählten Modell ein diffusionskontrollierter ET ausgeschlossen werden. Der geringe Anstieg der Flavinfluoreszenz abhängig von der Donorkonzentration **W** kann mit der bereits beschriebenen solvatochromen Eigenschaft erklärt werden. Die durch das Fmoc-geschützte L-Tryptophan zunehmend hydrophobe Umgebung führt zu einem konstanten Fluoreszenzanstieg. Ein Unterschied in den Flavinabsorptionsbanden konnte durch Zugabe von Donor **W** nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 70).

Dem gegenüber wurden drei weitere ET-Modelle untersucht (siehe Abbildung 29 **A**, **B** und **C**). Zunächst wurde das Referenzpeptid **EGFR_{F1}** mit nicht-kovalent gebundenem Elektronendonator **W** (Fmoc-L-Trp-OH) in Acetonitril/Wasser spektroskopisch untersucht (Abbildung 29 **A**).

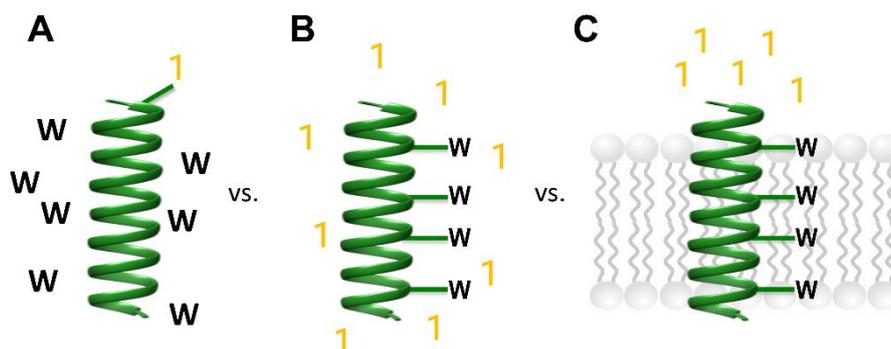


Abbildung 29: Schematische Darstellung der verschiedenen ET-Modelle; **A:** **EGFR_{F1}** und nicht-kovalent gebundenes Tryptophan (**W**) in MeCN/H₂O (1:1); **B:** **EGFR₄** und nicht-kovalent gebundenes Flavin **1** in MeCN/H₂O (1:1); **C:** **EGFR₄** und nicht-kovalent gebundenes, intravesikuläres Flavin **1** im POPC-Lipidsystem.

Auch hier konnte unter Zugabe variierender Menge an Tryptophan keine dynamische Fluoreszenzlöschung des **EGFR_{F1}** detektiert werden (siehe Abbildung 30). Somit kann unter Verwendung des flavinmodifizierten Peptids **EGFR_{F1}** und nicht-kovalent gebundenen Tryptophans ein diffusionskontrollierter ET ausgeschlossen werden. Eine solvatochrome Abhängigkeit der Fluoreszenz unter Zugabe von Fmoc-L-Trp-OH konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Dies kann durch die bereits sehr hydrophobe Umgebung des Flavins bedingt durch das Peptidgerüst begründet werden.

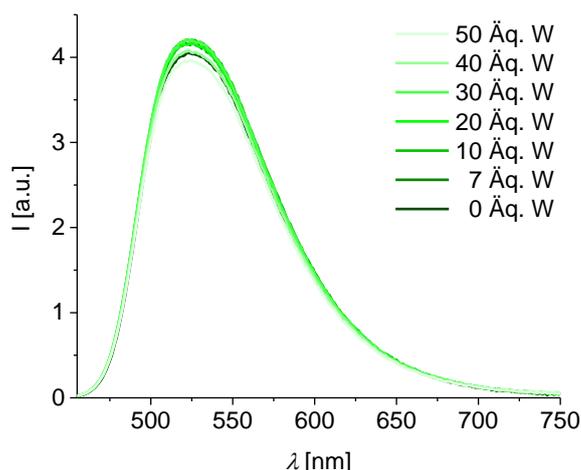


Abbildung 30: Fluoreszenz des Referenzpeptides **EGFR_{F1}** in Gegenwart verschiedener Äquivalente *Fmoc-L-Trp-OH W* ($\lambda_{exc.} = 440 \text{ nm}$; 0.02 mM in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)).

Ein dazu komplementäres ET-Modell wurde im Vergleich spektroskopisch untersucht (Abbildung 29 B). Dafür wurde ein Peptid gewählt mit vier Tryptophanen in der Peptidkette (**EGFR4**), welche als ET-Donor fungieren können. Dieses wurde in 5 molarem Überschuss mit der Flavin-Aminosäure **1** in Lösung gebracht. Die spektroskopischen Untersuchungen (siehe Abbildung 31 A und Abbildung 73 A) zeigten keinen Einfluss auf die Flavinfluoreszenz nach Zugabe von **EGFR4**. Damit kann ein diffusionskontrollierter ET zwischen **EGFR4** und **1** in Acetonitril/Wasser (1:1) ausgeschlossen werden.

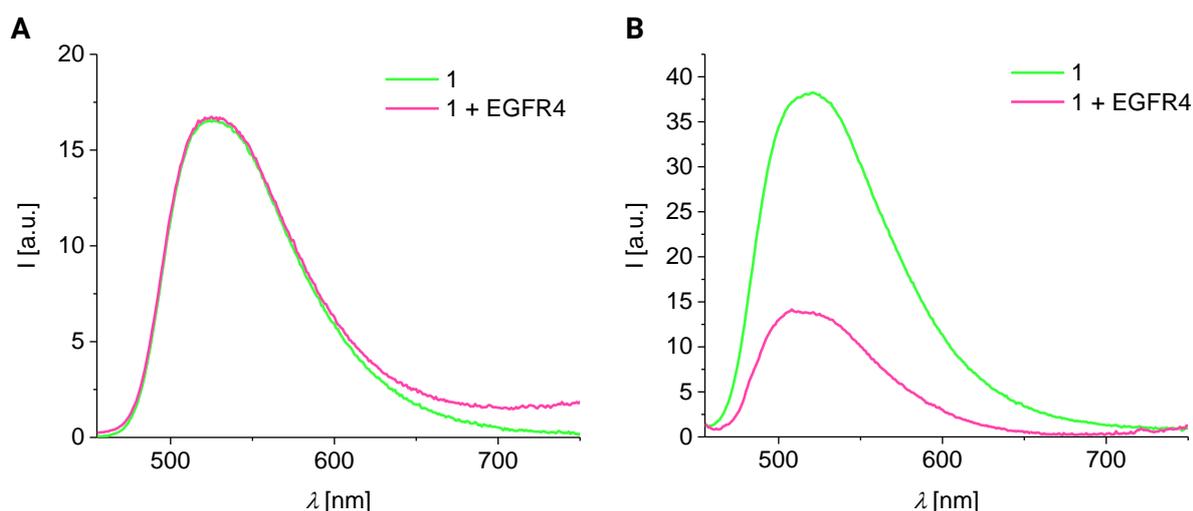


Abbildung 31: Fluoreszenz der Flavin-Aminosäure **1** in Abhängigkeit des tryptophanhaltigen Peptides **EGFR4** in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) (0.013 mM) (A) und *POPC-Lipidsystem* (0.01 mM Flavinkonzentration) (B) ($\lambda_{exc.} = 440 \text{ nm}$).

Um eine bessere Ausrichtung der ET-Partner und einen ET über das Transmembranpeptid zu ermöglichen, wurde ein Vesikelsystem gewählt (Abbildung 31 B und Abbildung 73 B). Die Vesikel

wurden dabei so präpariert, dass das membranständige **EGFR4** die Lipiddoppelschicht durchspannt (Abbildung 72) und die Flavin-Aminosäure **1** nur im Inneren der Vesikel vorzufinden sein sollte (siehe Abbildung 29 C). Das molare Verhältnis von Peptid zu Lipid (POPC) betrug 1:50, kann jedoch aufgrund der verschiedenen Präparations- und Aufreinigungsschritte leicht abweichen. Eine finale Aussage über das Verhältnis zwischen **EGFR4** und **1** ist dadurch auch schwierig. Zu Beginn wurde ein 2-fach molarer Überschuss an Flavin **1** zugegeben. Die Messungen wurden auf die gleiche Flavinkonzentration ($\lambda = 440 \text{ nm}$) angepasst (siehe Abbildung 73 B). Im Vesikelsystem zeigt die Flavinfluoreszenz nun unter Anwesenheit von **EGFR4** eine 67 % geringere Intensität. Auffällig ist auch die leichte Blauverschiebung des Emissionsmaximums um 5 nm nach Einbringen in das Vesikelsystem ($\lambda_{max}^{flu} = 520 \text{ nm}$). Dies spricht wiederum für Solvatochromie hervorgerufen durch die hydrophobe Umgebung der Lipiddoppelschicht. Somit hat die Ausrichtung des Peptids im Vesikelsystem und die daraus resultierende räumliche Nähe einen ET zwischen **EGFR4** und Flavin **1** begünstigt.

Zusätzlich wurden unter anaeroben Bedingungen mit dem ET-Modell des Peptids **EGFR_{FI}** und des nicht-kovalent gebundenem Elektronendonors **W** (Abbildung 29 A) Belichtungsexperimente durchgeführt. Eine längere Anregung wurde gewählt um die Formierung der reduzierten Flavinspezies unter diffusionskontrolliertem ET positiv zu beeinflussen. Dabei war Sauerstoffausschluss besonders wichtig, um die Bildung von Singulett-Sauerstoff und eine darauffolgende Oxidation der Indol- oder Flavin-Chromophore zu verhindern.^[132-134] Zunächst wurde **EGFR_{FI}** ohne externen Elektronendonator für eine Minute und nach Aufnahme der Spektren weitere 5 Minuten mit einer 365 nm LED belichtet. Durch diese Bestrahlung wurde nicht nur eine Fluoreszenzlöschung, sondern auch eine starke Absorptionsänderung aufgenommen (siehe Tabelle 5 und Abbildung 74).

Tabelle 5: Absorptions- und Emissionseigenschaften des **EGFR_{FI}** unter Bestrahlung bei 365 nm.

EGFR_{FI}	A_{440 nm}	A_{362 nm}	A_{320 nm}	I_{525 nm}
0 min	0.20	0.16	0.098	34.6
1 min	0.15	0.14	0.11	23.9
5 min	0.09	0.12	0.14	7.0
+ O₂	0.10	0.12 ^[a]	0.11	11.7

[a] neues Absorptionsmaximum bei $\lambda = 351 \text{ nm}$

Neben der Fluoreszenzlöschung von 80 % nach 5 Minuten anregen, lässt der Absorptionsanstieg bei $\lambda = 320$ nm und der Absorptionsabfall der Maxima bei $\lambda = 362$ nm und $\lambda = 440$ nm auf die Bildung der Hydrochinonform des Flavins schließen (siehe Absorptionsspektrum Abbildung 13). Dies kann auf einem ET, ausgehend vom Peptidrückgrat ohne zusätzlichen Einbau von elektronenreichen Aminosäureseitenketten basieren, welcher in der Literatur immer wieder diskutiert wird (Abbildung 32 **A**).^[135] Zusätzlich finden sich in der **EGFR_{F1}** Peptidsequenz mögliche Elektronendonoren in Form von Methionin, welche einen ET begünstigen.^[136] Nach anschließendem Einleiten von Sauerstoff stieg die Flavinemission wieder um 74 %. Ein zusätzlicher Anstieg der Absorption bei $\lambda = 440$ nm und eine Blauverschiebung des zweiten Absorptionsmaximums von circa 10 nm zu 351 nm spricht für die Ausbildung von Flavinhydroperoxid (FIHOOH) (siehe Abbildung 32 **B** und Abbildung 75) und nicht, wie erwartet für eine Rückoxidation zu Fl_{ox} .^[137]

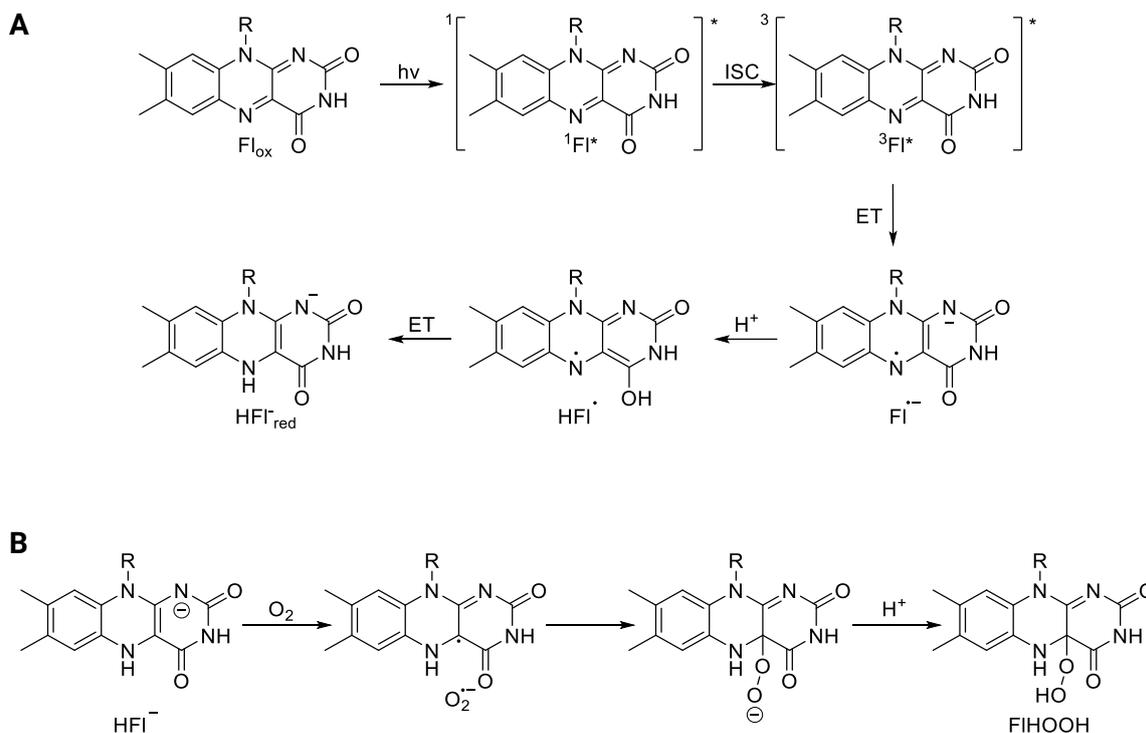


Abbildung 32: Darstellung der reduzierten Flavinspezies unter ET und Protonentransfer (**A**) und des Flavinhydroperoxid FIHOOH (**B**).

Unter Zugabe des externen Elektronendonors **W** zum **EGFR_{F1}** und anschließender Bestrahlung bei 365 nm wurde eine Fluoreszenzlöschung von 53 % nach 5 Minuten erreicht (siehe Tabelle 6 und Abbildung 74).

Tabelle 6: Absorptions- und Emissionseigenschaften des $EGFR_{FI}$ mit Tryptophan (**W**) unter Anregung bei 365 nm.

EGFR _{FI} + W	A _{440 nm}	A _{362 nm}	A _{320 nm}	I _{525 nm}
0 min	0.20	0.16	0.12	29.6
1 min	0.14	0.16	0.17	19.2
5 min	0.097	0.13	0.18	14.2
+ O ₂	0.17	0.20 ^[a]	0.20	25.0

[a] neues Absorptionsmaximum bei $\lambda = 351$ nm

Die Änderungen der Absorptionsmaxima sind wiederum vergleichbar zu den Messungen ohne Donor. Lediglich die Bande bei $\lambda = 320$ nm zeigt unter Anwesenheit des externen **W** eine schnellere Zunahme. Dies spricht für eine effizientere Bildung der Hydrochinonform (siehe Abbildung 13). Durch Einleiten von Sauerstoff zeigt sich in diesem Modell ein Fluoreszenzanstieg von 81 % und neben $\lambda = 440$ nm ein weiteres ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei $\lambda = 351$ nm. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass durch ET zwischen O₂ und Flavohydrochinon (HFI), Flavinhydroperoxid generiert wird (siehe Abbildung 32 **B** und Abbildung 75).

5.3 Elektronentransfer zwischen kovalent gebundenen Partnern

Ausgehend von den schwer zu kontrollierenden ET-Prozessen nicht-kovalent gebundener Partner wurden Peptide synthetisiert, welche die jeweiligen ET-Partner kovalent binden und durch das Peptidgerüst räumlich definiert zueinander ausrichten. Erste Testpeptide wurden auf Polyprolinmatrix synthetisiert (siehe Kapitel 4.1). Alle PP-Peptide zeigen dabei die für Flavin charakteristischen Absorptionsmaxima bei $\lambda = 268, 364$ und 444 nm und ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 521$ nm ($\lambda_{exc.} = 440$ nm) (siehe Abbildung 33). Das Peptid **PP_{ref}** stellt die Referenz dar. Mit 3 Prolinen als wiederkehrende Einheit ist es direkt vergleichbar mit dem Peptid **PP₃**. Mit einer Fluoreszenzlöschung von 67 % zeigt **PP₃** einen ET über eine Peptidganghöhe von 9 Å. In **PP₂** sind die ET-Brückenelemente durch 2 Proline voneinander entfernt. Die geringere Distanz zwischen erstem Tryptophan **W₁** und Flavin **1** wird durch eine Fluoreszenzlöschung von 88 % (verglichen mit **PP_{ref}**) und damit effizienterem ET bestätigt. Mit einer Fluoreszenzlöschung von 92 % zeigt **PP₁** eine noch stärkere Abnahme der Emissionsintensität und einem daraus zu schließenden ET. Dieser Vergleich der Fluoreszenzintensitäten bestätigt exponentielle Distanzabhängigkeit des ET zwischen Flavin und dem ersten folgenden *stepping stone* (**W₁**) entlang der Peptidkette (siehe Abbildung 76).

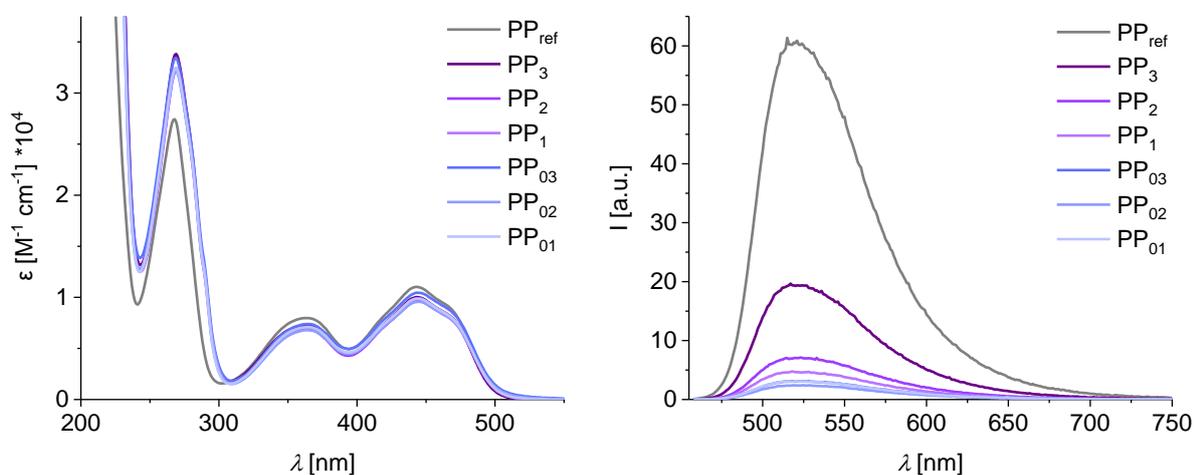


Abbildung 33: Absorption und Fluoreszenz der PP-Peptide **PP_{ref}–PP₀₁** ($\lambda_{exc.} = 440$ nm; 0.04 mM in MeCN/H₂O (1:1)).

Um einen möglichen Einfluss der folgenden *stepping stones* zu detektieren, wurden die Peptide **PP₀₃**, **PP₀₂** und **PP₀₁** synthetisiert. In allen drei Peptiden findet sich zwischen Flavin **1** und erstem Tryptophan **W₁** eine direkte Peptidknüpfung. Die darauffolgenden Brückenbausteine sind in unterschiedlichem Abstand (1–3 Proline) vorzufinden. Verglichen mit den zuvor diskutierten PP-Peptiden, zeigen alle drei Peptide eine Fluoreszenzlöschung von circa 95 % aufgrund der

direkten Anknüpfung von Flavin **1** und Tryptophan **W₁**. Ein Abstandseinfluss des zweiten Tryptophans **W₂** und des Tyrosins konnte anhand der Emissionsintensitäten demnach nicht nachgewiesen werden.

Die bereits beschriebene Distanzabhängigkeit wird auch aus den Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F ersichtlich. So nimmt die Quantenausbeute vom Referenzpeptid **PP_{ref}** um 95 % gegenüber den Peptiden **PP₀₃**, **PP₀₂** und **PP₀₁** ab (siehe Tabelle 7). Die Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute basiert auf einem Energieverlust durch nichtstrahlende Prozesse (wie hier durch stattfindenden ET) und ist damit vergleichbar mit einer Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit τ_F . Zusätzlich ist an dieser Stelle die 15-fach höhere Fluoreszenzquantenausbeute des Referenzpeptids **PP_{ref}** verglichen mit der Aminosäure **1** (Tabelle 4) zu erwähnen. Dies entspricht einem weiteren Einfluss der hydrophoben Peptidumgebung auf den solvatochromen Chromophor.

Tabelle 7: Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F , Fluoreszenzlebenszeiten τ_1 und τ_2 (mit jeweiligen relativen Amplituden) und die resultierenden Geschwindigkeitskonstanten k der Flavin-Peptide **PP_{ref}**-**PP₀₁** in MeCN/H₂O (1:1).

Peptid	$\Phi_F^{[a]}$	Fluoreszenzlebenszeiten und ET-Raten					
		τ_1 [ns] ^[b]	rel. Amp. [%]	k für τ_1 [ns ⁻¹]	τ_2 [ns] ^[b]	rel. Amp. [%]	k_{ET} für τ_2 [ns ⁻¹]
PP_{ref}	0.290	1.05	7		5.65	93	
PP₃	0.120	1.24	26	-0.146 ^[c]	4.04	74	0.070
PP₂	0.050	1.20	45	-0.119 ^[c]	3.26	55	0.130
PP₁	0.038	1.10	54	-0.043 ^[c]	3.41	46	0.116
PP₀₃	0.020	1.03	52	0.019	3.07	48	0.148
PP₀₂	0.015	0.99	66	0.058	3.07	34	0.148
PP₀₁	0.016	0.86	46	0.210	2.62	54	0.205

^[a] $\lambda_{exc.} = 440 \text{ nm}$

^[b] 0.01 mM

^[c] negative Werte nicht verwertbar

Die Fluoreszenzlebenszeit τ_F lässt sich, wie Φ_F mit den Geschwindigkeitskonstanten der stattfindenden Prozesse beschreiben und ist definiert als deren reziproke Summe:^[129]

$$\tau_F = \frac{1}{k_{em} + \sum k_{nr}} \quad (10)$$

Sie beschreibt die durchschnittliche Zeit des Moleküls im S_1 -Zustand. Die Ermittlung der Fluoreszenzlebensdauer fand per zeitlich korrelierter Einzelphotonenzählung statt. Dafür wird die Probe mit einer gepulsten LED (456 nm; Pulsdauer 1.2 ns) angeregt und die ankommenden Photonen am Detektor zeitabhängig gezählt. Das jeweilige Fluoreszenzabklingen wird durch Auftragung des Logarithmus der Anzahl der Photonen über die Zeit erhalten. Im Falle der PP-Peptide konnte das Abklingverhalten nicht durch einen einfach exponentiellen Fit dargestellt werden. Dies spricht für mehrere Fluoreszenzlebenszeiten, hervorgerufen durch beispielsweise verschiedene Orientierungen des Flavins zum Peptid. Durch einen biexponentiellen Fit ergaben sich für alle PP-Peptide zwei Lebenszeiten. Aus den erhaltenen Lebenszeiten können nun die Geschwindigkeitskonstanten k_{ET} des Elektronentransfers bestimmt werden. Die ET-Geschwindigkeitskonstante k_{ET} hängt dabei mit der Lebensdauer τ der angeregten Zustände wie folgt zusammen:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_o} \quad (11)$$

τ_o beschreibt die Lebensdauer des angeregten Zustandes der Referenzverbindung (hier **PP_{ref}**). Dabei wurde zwischen den Werten resultierend aus τ_1 und τ_2 unterschieden. Die Geschwindigkeitsraten resultierend aus der ersten Lebenszeit τ_1 weisen jedoch für die Peptide **PP₁-PP₃** negative Werte auf und sind damit nicht verwertbar. Zusätzlich zeigen die Lebenszeiten für τ_1 , trotz höchstem wählbaren Messbereich (100 ns, was einer Kanalbreite von ca. 0.027 ns entspricht) sehr nahe beieinanderliegende, kleine Werte. Bei Betrachtung der relativen Amplituden der ersten Lebenszeit τ_1 kann dennoch ein prozentual steigender Anteil detektiert werden. Die relative Amplitude stellt dabei ein Maß für die Gewichtung der einzelnen Lebenszeiten dar. Aus den gemessenen Werten ergibt sich ein zunehmender Anteil der Lebenszeit τ_1 mit geringerem Abstand zwischen Flavin und folgendem **W₁**. Mit nur 7 % Anteil an τ_1 zeigt **PP_{ref}** den geringsten Beitrag.

Bei Betrachtung der zweiten Lebenszeit τ_2 und der erhaltenen ET-Raten k_{ET} konnte eine fallende Tendenz der ET-Geschwindigkeit mit steigendem Flavin-Tryptophan(**W₁**)-Abstand festgestellt werden, was eine Art Distanzabhängigkeit bestätigt. Eine genaue Aussage über den oder die stattfindenden ET-Prozesse ist dennoch nicht möglich. Sowohl der Mechanismus (Superaustausch oder *Hopping*) als auch die ET-Partner können nicht eindeutig zugeordnet

werden. Es können ausgehend von den unterschiedlichen Tryptophanen W_1 und W_2 ET-Prozesse und unterschiedliche Peptidkonformationen, wie für Prolin nicht ausgeschlossen, Einfluss auf die ET-Geschwindigkeit haben. Dennoch kann eine Abnahme der Fluoreszenzlebenszeiten mit geringerer Flavin-Tryptophan(W_1)-Distanz gezeigt werden.

Durch Distanzvariation der ET-Partner ist somit mit der Fluoreszenzintensität sowie der Fluoreszenzquantenausbeute ein kontrollierbarer ET nachweisbar. Ein Einfluss der Helikalität war nicht ersichtlich. Das macht die Analyse der Sekundärstruktur im Hinblick auf die strukturellen Einflüsse der Flavin-Aminosäure 1 und der Tryptophane nötig. Die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) war dabei die Methode der Wahl. Die Proben wurden bei 20 °C mit einer Peptidkonzentration von 0.1 mg/mL gemessen. In allen Fällen wurde die, für PP II charakteristische Linienform mit einem starken negativen Signal bei 205 nm und einer schwachen positiven Bande bei 230 nm beobachtet (siehe Abbildung 34 A).^[138] Abhängig von der Prolinanzahl (1 bis 3) zwischen den ET-Partnern ist die negative Bande bei 205 nm stärker ausgeprägt. Das Referenzpeptid PP_{ref} mit 3 Prolinen zeigt dabei die stärkste Ausprägung. PP_3 und PP_{03} mit ebenfalls 3 Prolinen zeigen ein zueinander ähnlich starkes aber zu PP_{ref} vermindertes Signal. Eine weitere Abnahme zeigen PP_2 und PP_{02} mit zwei Prolinen zur Separation ihrer Brückenelemente. Das schwächste Signal wurde für PP_{01} und PP_1 aufgenommen. Um die Stabilität der PPII-Sekundärstruktur zu zeigen, wurden mit dem Referenzpeptid PP_{ref} temperaturabhängige Spektren aufgenommen. PP_{ref} zeigt dabei eine, für PPII literaturbekannte, Abnahme der negativen Bande bei 205 nm mit steigender Temperatur (siehe Abbildung 34 B).^[138]

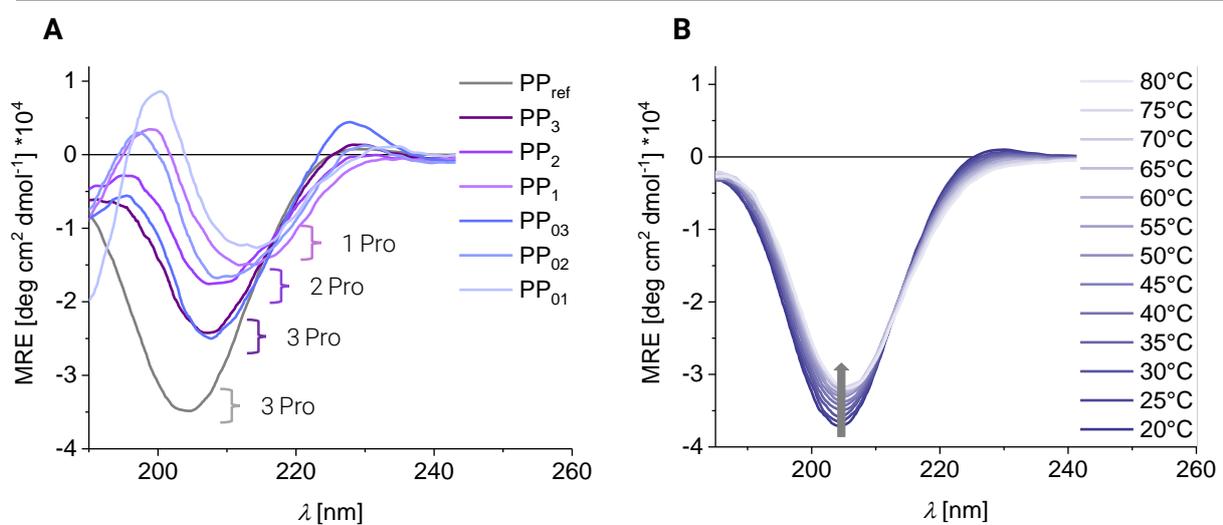


Abbildung 34: CD-Spektren der PP-Peptide PP_{ref} – PP_{01} in MeCN/ H_2O (1:1) bei 20 °C, (0.1 mg/mL) (A); CD-Spektren des Peptides PP_{ref} unter Variation der Temperatur (B) (0.1 mg/mL).

Nach Charakterisierung des distanzabhängigen ET zwischen Flavin **1** und dem nächstgelegenen Tryptophan **W₁** in den PP-Peptiden wurde ein α -helikales Peptidmodell untersucht. Auf Basis des α -helikalen Transmembranfragments des EGFR wurden die Peptide **EGFR_{FI}-EGFR_{FI6}** synthetisiert und spektroskopisch untersucht. Die EGFR-Peptide unterscheiden sich hierbei in der Anzahl an Tryptophan *stepping stones* (siehe Kapitel 4.2). Ein weiterer Unterschied ist die Position des Tryptophans **W₁**. In den Peptiden **EGFR_{FI2}-EGFR_{FI6}** findet sich das dem Flavin nächstgelegene Tryptophan **W₁** jeweils an der gleichen Stelle (Position 643 an Stelle eines Isoleucins). Lediglich **EGFR_{FI1}** unterscheidet sich hierzu. In **EGFR_{FI1}** findet sich **W₁** auf Position 646, dies ist knapp eine Peptidwindung weiter als Position 643.

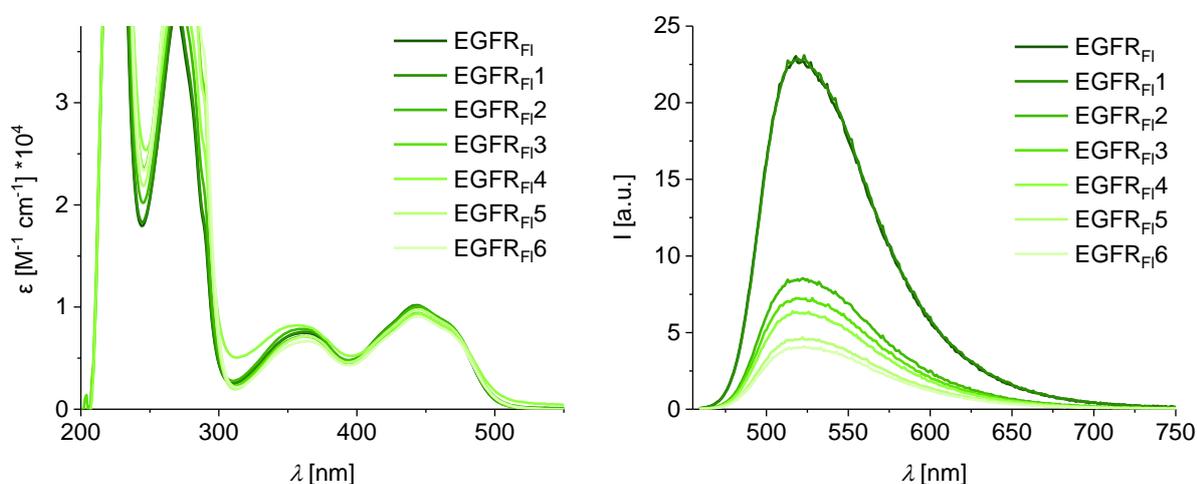


Abbildung 35: Absorption und Fluoreszenz der EGFR-Peptide **EGFR_{FI}-EGFR_{FI6}** ($\lambda_{\text{exc.}} = 440 \text{ nm}$; 0.04 mM in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1)).

Alle EGFR-Peptide wurden zunächst in Acetonitril/Wasser (1:1) mittels Absorption- und Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert (siehe Abbildung 35). Die Absorptionsspektren zeigen dabei die für Flavin charakteristischen Maxima bei $\lambda = 360$ und 444 nm . Die Absorptionsbande bei 266 nm wird von der Tryptophanabsorption überlagert. Je nach Anzahl der Tryptophane im Peptid findet sich demnach eine unterschiedlich starke Intensität der Absorptionsbande um 275 nm . Ebenfalls konnte das für Flavin charakteristische Emissionsmaximum bei $\lambda = 521 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc.}} = 440 \text{ nm}$) detektiert werden. Auch in den Emissionsintensitäten wird der Einfluss der Tryptophananzahl deutlich. Als Referenz dient das Peptid **EGFR_{FI}**. **EGFR_{FI2}** zeigt eine Fluoreszenzlöschung von 62 %. Durch die Anwesenheit von drei Tryptophanen wird durch den ET die Bildung der weniger fluoreszenten Semichinon- oder Hydrochinonform induziert. Sind 4 Tryptophane über die Peptidkette verteilt (**EGFR_{FI3}** und **EGFR_{FI4}**), wird eine noch stärkere Abnahme der Fluoreszenzintensität (67 % und 71 % Fluoreszenzlöschung) beobachtet. Mit einer

Anzahl von 6 Tryptophan *stepping stones* bei **EGFR_{F1}5** kommt es zu einer Abnahme der Emissionsintensität von 76 %. Mit einer Löschung von 81 % zeigt **EGFR_{F1}6** den stärksten Einfluss. Dies lässt sich durch die 7 Tryptophane im Peptid erklären. Lediglich **EGFR_{F1}1** zeigt keine, zum Referenzpeptid **EGFR_{F1}** abweichende Emissionsintensität. Die Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten der EGFR-Peptide in Acetonitril/Wasser zeigen somit eine Distanz-abhängigkeit sowohl zum ersten *stepping stone* **W₁** als auch eine Abhängigkeit von der Tryptophananzahl. Durch den Vergleich mit **EGFR_{F1}1** wird deutlich, dass die Distanz einer Peptidwindung zwischen Flavinbaustein 1 und Tryptophan **W₁** keine effiziente Löschung bedingt, wodurch ein ET innerhalb **EGFR_{F1}1** in Acetonitril/Wasser ausgeschlossen werden kann. Die Abhängigkeit von der Anzahl der Tryptophan *stepping stones* stützt die Notwendigkeit von Brückenbausteinen innerhalb Distanzen von circa 50 Å und spricht für einen ET, welcher über das komplette Peptid stattfindet. Auch die Fluoreszenzquantenausbeuten (siehe Tabelle 8) zeigen das gleiche spektrale Verhalten. Neben der Abhängigkeit von der Anzahl an *stepping stones* zeigt **EGFR_{F1}1** keinen Unterschied zu **EGFR_{F1}**.

Um die optischen Eigenschaften der Peptide in natürlichem Umfeld zu detektieren und eine bessere Ausrichtung der Peptide zu erhalten, wurden diese in einem POPC-Lipidsystem vermessen. Es wurde ein molares Peptid-zu-Lipid Verhältnis von 1:50 gewählt. Nach der Aufarbeitung zu unilamellaren Vesikeln wurden Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen (siehe Abbildung 36).

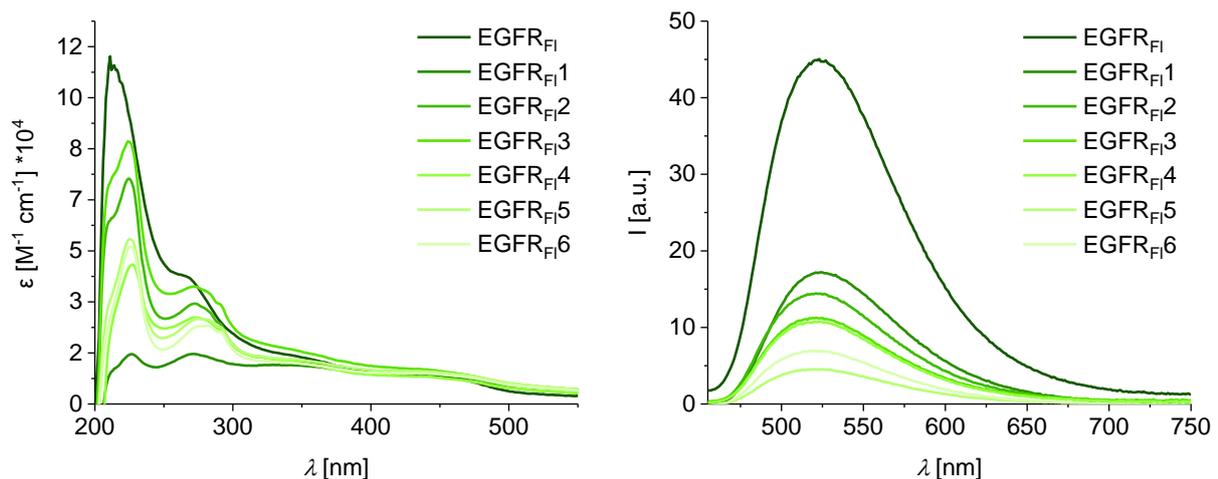


Abbildung 36: Absorption und Fluoreszenz der EGFR-Peptide **EGFR_{F1}–EGFR_{F16}** ($\lambda_{exc.} = 440$ nm; 0.012 mM Flavin in POPC-Lipiddoppelschicht mit P/L Verhältnis von 1:50).

Im Absorptionsspektrum ist dabei ein deutlicher Einfluss der trüben Vesikellösung zu erkennen. Die Proben wurden dennoch auf die Flavinkonzentration bei $\lambda = 444$ nm angepasst. Auch das

Vesikelmodell der EGFR-Peptide zeigt eine von der Tryptophananzahl abhängige Fluoreszenzlöschung. Auffällig ist die Abnahme der Emissionsintensität um 64 % im Falle des **EGFR_{F1}**, welches in Acetonitril/Wasser keine Löschung zeigt. Durch die Peptidausrichtung in der Lipiddoppelschicht kann eine bessere räumliche Anordnung der **EGFR_{F1} stepping stones** erreicht und ein ET induziert werden. Trotzdem zeigt **EGFR_{F2}** im Vergleich zu **EGFR_{F1}** mit ebenfalls 3 Tryptophanen eine 70 %ige Fluoreszenzlöschung. Dies kann durch die Nähe von Flavin und Tryptophan **W₁** begründet werden. Ein weiterer Unterschied zu den Messungen in Acetonitril/Wasser zeigen die Emissionen des **EGFR_{F5}** und des **EGFR_{F6}**. Die bessere Anordnung der **stepping stones** in **EGFR_{F5}**, mit einer Fluoreszenzlöschung von 91 %, überwiegt die höhere Tryptophananzahl in **EGFR_{F6}**. Dies zeigt eine Abnahme der Emissionsintensität von 86 %.

Tabelle 8: Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F der Flavin-Peptide **EGFR_{F1}-EGFR_{F6}** in MeCN/H₂O (1:1); POPC und POPC/POPG (25 %)-Lipiddoppelschicht mit P/L Verhältnis von 1:50.

Peptid	$\Phi_F^{[a]}$		
	in MeCN/H ₂ O	in POPC	in POPC/POPG (25%)
EGFR _{F1}	0.130	0.17	0.13
EGFR _{F1}	0.130	0.10	0.11
EGFR _{F2}	0.050	0.08	0.05
EGFR _{F3}	0.046	0.08	0.04
EGFR _{F4}	0.040	0.08	0.04
EGFR _{F5}	0.030	0.03	0.03
EGFR _{F6}	0.030	0.04	0.04

^[a] $\lambda_{exc.} = 440 \text{ nm}$

Neben den Absorptions- und Fluoreszenzmessungen wurden ebenfalls Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F gemessen. Dafür wurde zusätzlich zum POPC- ein POPC/POPG(25 %)-Lipidsystem gewählt (siehe Tabelle 8). POPG hat in vorherigen Arbeiten des Arbeitskreises ULRICH eine Klärung der Vesikellösung gezeigt. Dies konnte in Kombination mit den sehr

hydrophoben EGFR-Peptiden jedoch nicht bestätigt werden. Dennoch konnte die Abhängigkeit von der Anzahl der Tryptophane und von der Anordnung im Vesikelsystem ebenfalls beobachtet werden. Durch die Nähe zum hydrophoben Lipidsystem zeigt das solvatochrome Flavin ebenfalls eine höhere Quantenausbeute (Φ_F in POPC) verglichen mit den Messungen in Acetonitril/Wasser. Zusätzlich zeigen die polaren Kopfgruppen des POPG einen löschenden Einfluss auf die Fluoreszenzquantenausbeute.

Die Abhängigkeit des ET von der Anzahl der Brückenelemente in den EGFR-Peptiden kann mit den ET-Prozessen in DNA verglichen werden. Die Elektronentransferrate k_{ET} zeigt dabei eine Abhängigkeit von der Wahrscheinlichkeit und der Gesamtzahl der *Hopping*-Schritte (in DNA die Anzahl der Guaninbasenpaare):

$$k_{ET} \propto PN^\eta \quad (12)$$

- P Wahrscheinlichkeit eines Hopping-Schrittes
- N Gesamtzahl der *Hopping*-Schritte
- η empirische Konstante (zwischen 1 und 2)

Durch die Tryptophane als potentielle intermediäre Ladungsträger kann in den EGFR-Peptiden ein *Hopping*-Mechanismus angenommen werden. Unter Variation der Anzahl an *stepping stones* wird die Fluoreszenzintensität und -quantenausbeute beeinflusst. Daraus kann wiederum ein Einfluss auf die ET-Rate abgeleitet werden. Ein weiterer Effekt zeigt das Einbringen der Peptide in ein Vesikelsystem.

Um die strukturellen Einflüsse der Flavinaminosäure **1** und der Tryptophane zu analysieren, wurden CD- und orientierte CD-Spektren aufgenommen und mit dem unmodifizierten EGFR-Transmembranfragment **EGFR_{wt}** verglichen. Die CD-Proben wurden bei 20 °C mit einer Peptidkonzentration von 0.1 mg/mL gemessen. Dabei wurden die Proben sowohl in Acetonitril/Wasser als auch im POPC-Vesikelsystem aufgenommen (siehe Abbildung 37 **A** und **B**). Alle Peptide zeigen dabei die für eine α -Helix charakteristischen negativen Absorptionsmaxima bei 220 und 208 nm und die positive Bande bei 190 nm.^[139] Im Vesikelsystem ist der eindeutige Kurvenverlauf durch die trübe Lösung negativ beeinflusst. Dennoch ist die α -helikale Linienform deutlich erkennbar. Aus den CD-Spektren geht hervor, dass trotz starker Modifikation des EGFR-Teilstücks die Sekundärstruktur erhalten bleibt.

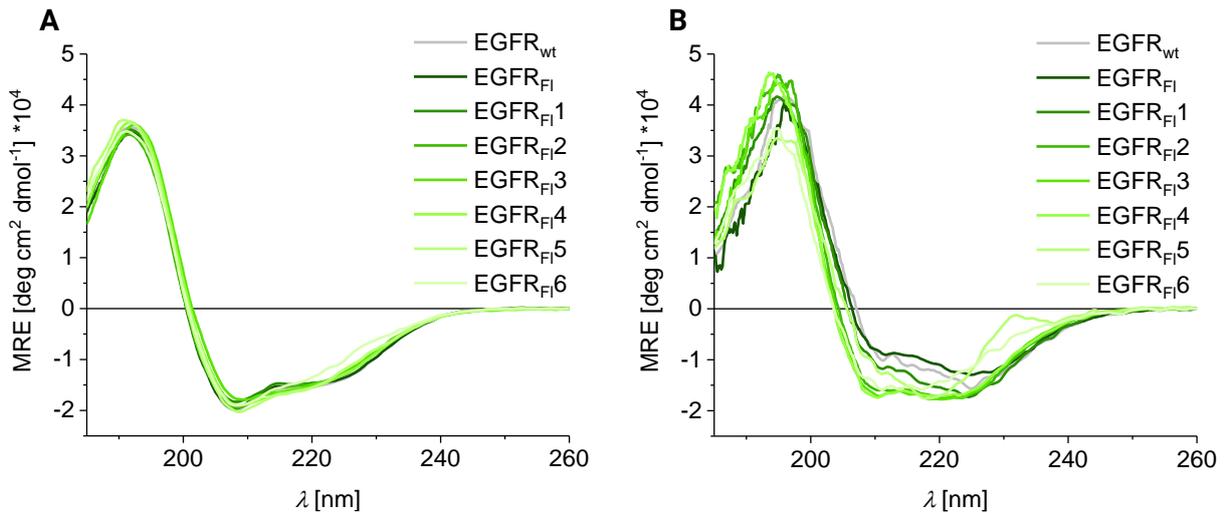


Abbildung 37: CD-Spektren der EGFR-Peptide $EGFR_{wt}$ - $EGFR_{F1-6}$ in MeCN/H₂O (1:1) bei 20 °C, (0,1 mg/mL) (A); in POPC Lipiddoppelschicht mit P/L Verhältnis von 1:50 bei 20 °C (Signale unter 200 nm zeigen Abweichungen basierend auf der Streuung der Probe) (0,1 mg/mL) (B).

Eine Aussage über die Orientierung des Peptids in der Lipiddoppelschicht kann mit Hilfe der orientierten CD-Spektroskopie (OCD-Spektroskopie) getroffen werden.

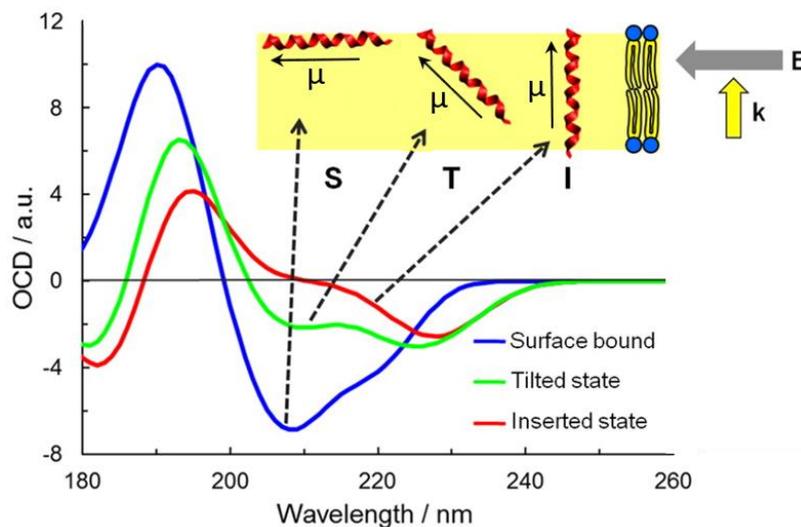


Abbildung 38: OCD-Spektrum eines α -helikalen Peptides mit unterschiedlicher Anordnung in der Membran. Blau: oberflächengebundenes Peptid; Grün: in der Membrane geneigte Anordnung; Rot: in die Membran insertiertes Peptid. Zusätzlich dargestellt ist das Übergangsdipolmoment μ des Peptids, welches mit dem elektrischen Feldvektor (grauer Pfeil) unterschiedlich stark wechselwirkt. Der elektrische Feldvektor oszilliert dabei senkrecht zum eingestrahlichten Licht k (gelber Pfeil). Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung ULRICH et al. [11] entnommen und teilweise ergänzt.

Die OCD-Spektroskopie nutzt die Wechselwirkung des elektrischen Feldvektors (E) des eingestrahlichten Lichtes mit dem Übergangsdipolmoment μ des Peptids (siehe Abbildung 38).

Durch spezielle Probenpräparation kann zwischen in die Membran insertiertem (*inserted state/I-Zustand*), geneigtem (*tilted state/T-Zustand*) oder auf der Oberfläche gebundenem (*surface bond/S-Zustand*) Peptid unterschieden werden.^[11] Als „Fingerabdruck“ wird dafür die Absorptionsintensität bei 208 nm genutzt. Ein stark negatives Signal bei 208 nm entspricht einer starken Wechselwirkung zwischen elektrischem Feldvektor E und Übergangsdipolmoment μ und somit für ein S-Zustand. Ein positives Signal entspricht einer schwachen Wechselwirkung und demnach einem in die Membran insertiertem Peptid (I-Zustand).

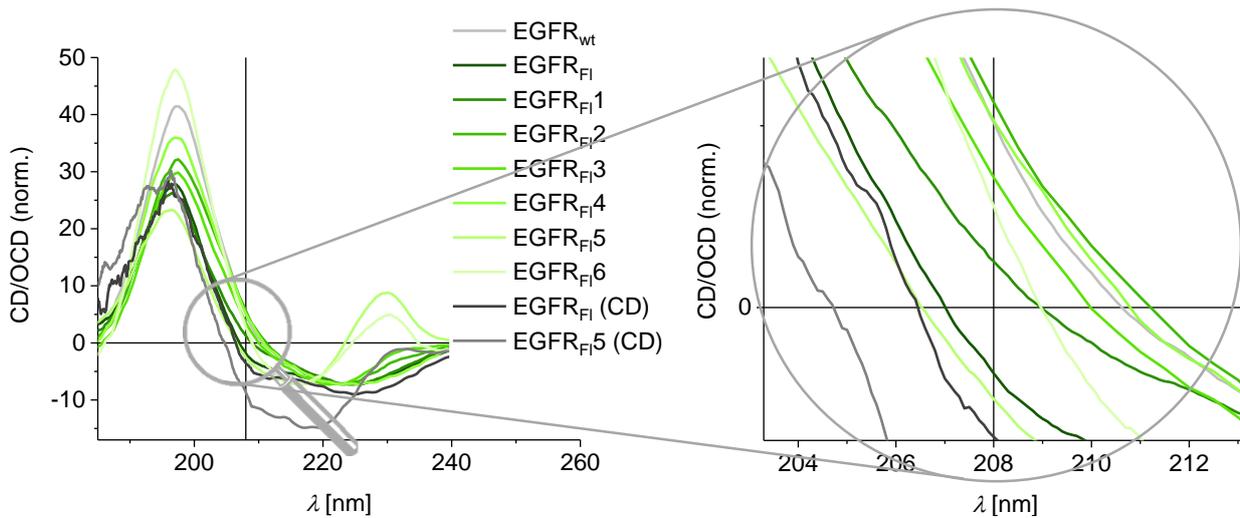


Abbildung 39: OCD-Spektren der Peptide **EGFR_{wt}**-**EGFR_{F1,6}** in POPC-Lipiddoppelschicht mit P/L Verhältnis von 1:50. Die Spektren (25 °C) wurden auf die Negativbande bei 225 nm normiert (mit Ausnahme von **EGFR_{F1,5}** und **EGFR_{F1,6}**) um ähnliche Linienformen zu illustrieren (Signale unter 200 nm zeigen Abweichungen basierend auf der Streuung der orientierten Probe).

Die OCD-Messungen der EGFR-Peptide wurden mit einem molaren Peptid zu Lipid Verhältnis von 1:50 bei 25 °C aufgenommen. Die erhaltenen Spektren wurden mit Ausnahme der Peptide **EGFR_{F1,5}** und **EGFR_{F1,6}** auf die Negativbande bei 225 nm normiert (Abbildung 39). Diese tryptophanreichen Peptide konnten aufgrund der stark ausgeprägten positiven Bande bei ~233 nm nicht angeglichen werden. Diese breite, positive Absorption wird von den aromatischen Seitenketten hervorgerufen, welche mit der Peptidbindung wechselwirken.^[140, 141] Um Informationen über die Orientierung der Peptide innerhalb der Membran zu erhalten, wurde das Signal bei 208 nm betrachtet. Dabei konnte für die Peptide **EGFR_{wt}**, **EGFR_{F1,1}**, **EGFR_{F1,2}**, **EGFR_{F1,3}**, **EGFR_{F1,4}** und **EGFR_{F1,5}** ein positives Absorptionssignal beobachtet werden, welches für senkrecht in die Membran eingebrachte Peptide (I-Zustand) spricht. Die Peptide **EGFR_{F1}** und **EGFR_{F1,5}** zeigen beide ein schwach negatives Signal. Im Vergleich zu dessen CD-Messungen (graue Linien in Abbildung 39) kann jedoch eine Abnahme des OCD-Signals bei 208 nm detektiert werden. Dies liegt darin begründet, dass eine gerichtete Anordnung in der Membran vorliegt. Es

kann sich dabei um ein leicht geneigtes Peptid (T-Zustand) oder eine Mischung aus I- und S-Zuständen handeln. Bedingt durch Streuung zeigt der Absorptionsbereich unter 200 nm Abweichungen voneinander. Die Membranproben weichen in diesem Bereich, besonders im Fall von hochkonzentrierten Proben, durch die nicht gleichmäßige Verteilung der Chromophore voneinander ab.^[142]

Um die Anwendung der EGFR-Peptide auf beispielsweise biologischer Ebene zu ermöglichen, müssen noch weitere Eigenschaften charakterisiert werden. Eine Eigenschaft beschreibt den Einfluss des Peptids auf die Stabilität und Permeabilität einer Lipiddoppelschicht. Nach Möglichkeit sollte kein, durch das Membranpeptid hervorgerufener Austausch zwischen intra- und extrazellulärer Seite stattfinden. Dafür wurden die in der Arbeitsgruppe ULRICH etablierten *Leakage*-Messungen durchgeführt. Es wurden Vesikel präpariert, welche neben dem Peptid den potentialabhängigen Chromophor DiI_{C1}(5) (1,1',3,3',3',3'-hexamethylindodicarbocyaniniodid) beinhalten. Dieser interkaliert in die Membran und zeigt eine Fluoreszenzintensität bei 680 nm ($\lambda_{\text{exc.}} = 650 \text{ nm}$) abhängig von dem Potenzial über die Membran.

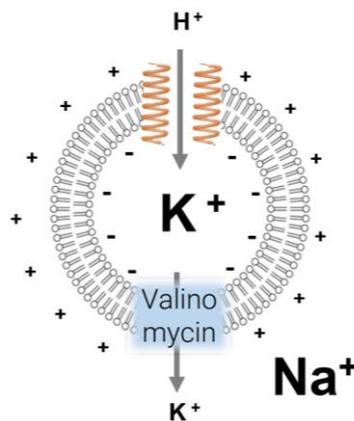


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Leakage-Messung unter Verwendung des Kaliumionophors Valinomycin.

Die Vesikel wurden dabei so präpariert, dass die Kaliumionenkonzentration innerhalb 150 mM und außerhalb 5 mM betrug. Um den osmotischen Druck zu kompensieren, wurde mit Natriumionen ausgeglichen. Daraus ergibt sich außerhalb eine Natriumionenkonzentration von 150 mM und innerhalb von 5 mM. Durch Zugabe von Valinomycin, einem Kaliumionen-Carrier wird ein Potenzialaufbau erzeugt und ein Anstieg der Fluoreszenz des DiI_{C1}(5) beobachtet (siehe Abbildung 40).

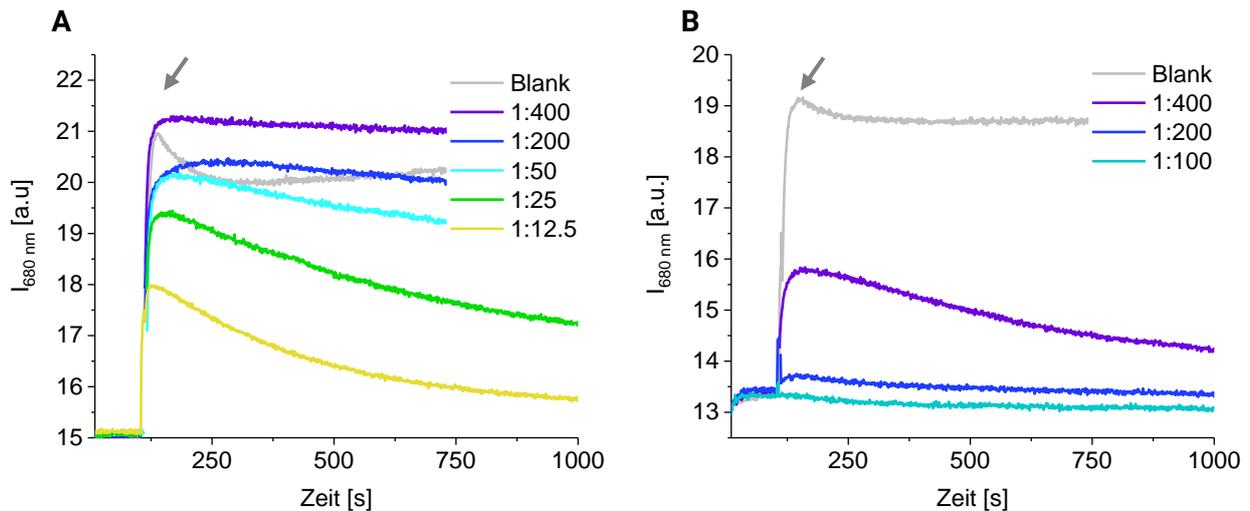


Abbildung 41: Leakage-Messungen der Peptide $EGFR_{F1}$ (A) und $EGFR_{F16}$ (B). Nach Zugabe des Ionophors Valinomycin (grauer Pfeil) zeigt die Fluoreszenz des potentialabhängigen Farbstoffs DiIC₁(5) eine peptidbedingte Abnahme des Potentials ($\lambda_{exc.} = 650\text{ nm}$; $\lambda_{em.} = 680\text{ nm}$); es wurde zwischen unterschiedlich molarem Peptid zu Lipid-Verhältnis unterschieden.

Es wurden Vesikel mit unterschiedlich molarem Peptid-zu-Lipid Verhältnis gegenübergestellt (siehe Abbildung 41). Zunächst wurde das Peptid $EGFR_{F1}$ vermessen. Abbildung 41 A zeigt für die Proben mit einem P/L-Verhältnis von 1:400 und 1:200 eine über circa 15 Minuten kaum veränderte Emissionsintensität. Bei einem P/L von 1:50 und niedriger ist eine Abnahme der Emissionsintensität und damit eine Abnahme des Potentials zu detektieren. Im Falle des Peptids $EGFR_{F16}$ konnte selbst mit einem P/L von 1:400 kein über die Zeit stabiles Membranpotential aufgebaut werden. Unter Erhöhung der Peptidkonzentration (P/L 1:200 und 1:100) ist bereits zu Beginn der Messung ein Potenzialaufbau schon nicht mehr möglich. Im Hinblick auf Trennung des intra- und extravesikulären Bereichs ergeben sich daraus für $EGFR_{F1}$ genügend stabile Vesikel. Für $EGFR_{F16}$ kann jedoch eine Permeabilität, hervorgerufen durch das Peptid nicht ausgeschlossen werden. Zu beachten ist, dass die hier verwendete *Leakage*-Messung lediglich die Permeabilität hydratisierter Kaliumionen widerspiegelt. Es kann keine Aussage über die Permeabilität größerer Moleküle getroffen werden.

Eine weitere Herausforderung stellt der nicht gerichtete Einbau der EGFR-Peptide in Lipidsysteme dar (siehe Abbildung 43 B). In dem, innerhalb dieser Arbeit untersuchten ET-System kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der ET von intravesikulärer nach extravesikulärer Seite oder umgekehrt stattfindet.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend kann das spektrale Verhalten des Flavins als Elektronentransfersonde analysiert werden. Dafür wurde Flavin als Aminosäureseitenkette mittels kupferkatalysierten Alkin-Azid-Cycloaddition (**1**) eingeführt und das für Flavin charakteristische spektrale Verhalten bestätigt (siehe Abbildung 42).

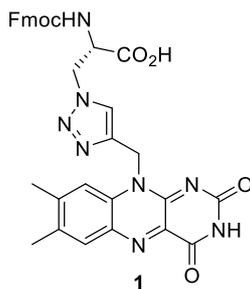


Abbildung 42: Struktur der flavinmodifizierten Aminosäure **1**.

Anschließend wurden erste Elektronentransferprozesse unter nicht-kovalenten Bedingungen untersucht. Da Flavin in seiner reduzierten Form die Flavinfluoreszenz löscht, wurde dessen Intensitätsänderung genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass ein diffusionskontrollierter Elektronentransfer zwischen **1** und Fmoc-L-Trp-OH als Elektronendonator keine dynamische Fluoreszenzlöschung mit sich bringt. Auch unter Verwendung flavinmodifizierter Peptide (**EGFR_F**) und nicht-kovalent gebundenem Tryptophan konnte kein ET detektiert werden. Erst durch die Einführung eines tryptophanhaltigen, transmembranen, α -helikalen Peptids (**EGFR4**) in ein Vesikelsystem konnte eine Fluoreszenzlöschung des in den Vesikeln innen liegenden Flavins (**1**) beobachtet werden. Dies verdeutlicht die räumliche Nähe zweier Elektronentransferpartner. Durch das Peptidgerüst ist die benötigte definierte Ausrichtung des Flavins und der Tryptophane gegeben. Dafür wurde **1** erfolgreich N-terminal in tryptophanhaltige Polyprolinpeptide eingebaut, welche sich durch die wiederkehrende Prolineinheit zwischen Flavin und Tryptophane unterscheiden. Der daraus variierende Abstand zwischen Flavin und folgendem Tryptophan konnte spektral analysiert werden. Sowohl die Fluoreszenzlöschung als auch die ϕ -quantenausbeute zeigen eine exponentielle Distanzabhängigkeit des Tryptophans zum Flavin. Eine genaue Aussage über den Mechanismus des Elektronentransfers konnte jedoch nicht getroffen werden. Aufgrund einer Distanz von maximal 9 Å liegt die Vermutung eines Superaustauschmechanismus nahe. Einen Einblick in längere Elektronentransferdistanzen zeigte das Transmembransegment des EGF-Rezeptors (K⁶⁴²-V⁶⁷⁴). Flavin **1** wurde N-terminal an das EGFR-Peptid geknüpft und die Anzahl der Tryptophane in der Peptidkette

variiert. Die daraus resultierenden flavinmodifizierten Peptide zeigten sowohl in Lösung als auch im Lipidsystem eine Abhängigkeit der Flavinfluoreszenzlöschung von der Anzahl der Tryptophane. Auffällig war auch der positive Einfluss der definierten Ausrichtung im Lipidsystem auf den Elektronentransfer. Mit einer Peptidlänge von ~ 50 Å und einer Abhängigkeit von der Anzahl der Tryptophane kann für den Elektronentransfer des EGFR-Peptidmodells ein *Hopping*-Mechanismus angenommen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass trotz der vielen Modifikationen die native Struktur des EGFR-Transmembransegments erhalten bleibt. Alle EGFR-Peptide wiesen eine α -helikale, membrandurchspannende Helix auf. Im Rahmen dieser Arbeit war es somit möglich eine zu den gängigen ET-Analysen, wie transientser Absorptionsspektroskopie, komplementäre Methode unter Fluoreszenzauslese zu etablieren. Um eine genaue Aussage über die am ET teilhabenden Spezies treffen zu können, sind transiente Absorptionsmessungen dennoch nötig. Erste Messungen der Flavinaminosäure **1** bestätigen die zu erwartenden Signale des Grundzustandsbleichens (GZB) bei 440 nm, der stimulierten Emission (SE) bei 521 nm und der Absorption des angeregten Flavins (Abs) bei 350–400 nm, 500 nm und 650–700 nm (siehe Abbildung 43 A).^[143] Die Überlagerung der stimulierten Emission mit möglichen Absorptionsänderungen macht zukünftige transiente Absorptionsmessungen auf längerer Zeitskala deutlich (μ s).

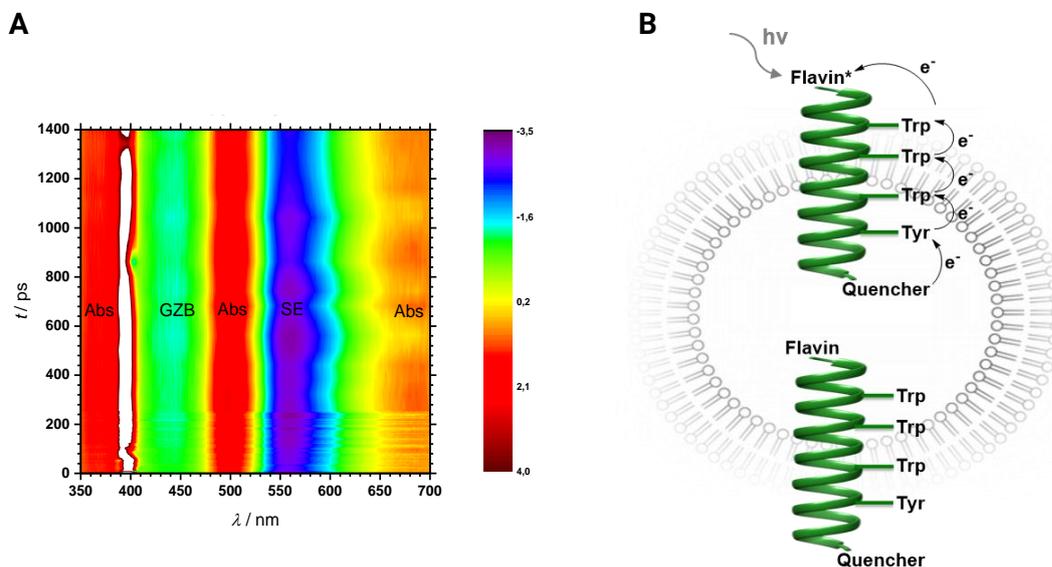


Abbildung 43: Transiente Absorptionsmessungen der Flavinaminosäure **1** ($\lambda_{exc.} = 400$ nm; 0.5 mM in MeCN/H₂O (1:1)) (A) und schematische Vesikelformierung zukünftiger EGFR-Peptidmodelle (B).

Um zusätzlich einen ET über das komplette Peptid zu verifizieren, ist der Einbau eines kovalent gebundenen Donors, welcher ein anderes spektroskopisches Verhalten als Flavin zeigt und eine

langlebige kationische Form aufweist, hilfreich (siehe Abbildung 43 **B**). Dies würde auch die Problematik des gegenseitigen Löschens bedingt durch ungerichteten Peptideinbau mindern.

Es konnte ein System zur Charakterisierung von ET-Prozessen durch Peptide entwickelt werden, das eine attraktive Alternative zur transienten Absorptionsspektroskopie darstellt. Die Synthese der neuen α -helikalen, transmembranen Peptide ermöglicht die Analyse eines lichtinduzierten Elektronentransfers über eine Zellmembran unter stationärer Fluoreszenzspektroskopie.

III. Teil B: 4-Aminophthalimid-Projekt

1. Theoretische Hintergründe

Aufbauend auf ihrer hohen Sensitivität erlauben fluoreszente Aminosäuren nicht nur einen Einblick in fundamentale Prozesse. Auch auf zellulärer Ebene kann Klarheit in den stattfindenden Prozessen geschaffen und Anwendung in der Biochemie, Biophysik und Medizin gefunden werden.^[144-146] Im Hinblick auf ihre spektrale Resonanz durch die Änderungen der umgebenden Polarität haben besonders solvatochrome Fluorophore zunehmend an Bedeutung gewonnen.^[145] Die photophysikalischen Besonderheiten dieser fluoreszenten Sensoren sind typischerweise eine Verschiebung des Emissionsmaximums, eine Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute oder -lebenszeit. In vielen dieser Fälle sind diese Änderungen einheitlich.^[147] Vorherige Arbeiten haben fluoreszente, solvatochrome α -Aminosäuren bereits genutzt, um die Interaktionen zwischen Proteindomänen und dessen Peptidinteraktionen zu analysieren.^[148, 149] Dabei wurden beispielsweise die Interaktionen mit den SH2-Proteindomänen^[150], 14-3-3-Domänen^[151], PDZ-Domänen^[152], Calmodulin^[147] und Klasse II MHC-Proteinen^[153] identifiziert. Der Vorteil kleiner, fluoreszenter Aminosäuren ist dabei der vergleichsweise wenig störende Ersatz eines natürlichen Aminosäurenrestes. So kann im Idealfall die strukturell native Struktur des Zielpeptides oder -proteins erhalten bleiben.

1.1 Solvatochromie

Wie spektrale Eigenschaften durch Umgebungsänderung beeinflusst werden, kann unter dem Begriff Solvatochromie zusammengefasst werden. Dieses Verhalten basiert auf der Änderung der HOMO-LUMO-Lücke und ist schematisch in Abbildung 44 dargestellt. Da die π -Orbitale eines Moleküls bindenden Charakter besitzen und die Elektronen hauptsächlich in Kernnähe aufzufinden sind, findet hier durch Änderung der Lösungsmittelpolarität kaum eine Beeinflussung statt. Das π^* -Orbital wiederum, kann durch polarere Lösungsmittel stabilisiert und damit energetisch herabgesenkt werden. Am stärksten wird das n-Orbital durch Lösungsmittelmoleküle beeinflusst. Dies kann durch Wechselwirkungen der n-Orbitale mit polarem Lösungsmittel beispielsweise in Form von Wasserstoffbrückenbindungen begründet werden. Daraus resultiert eine starke Absenkung der n-Orbitale.

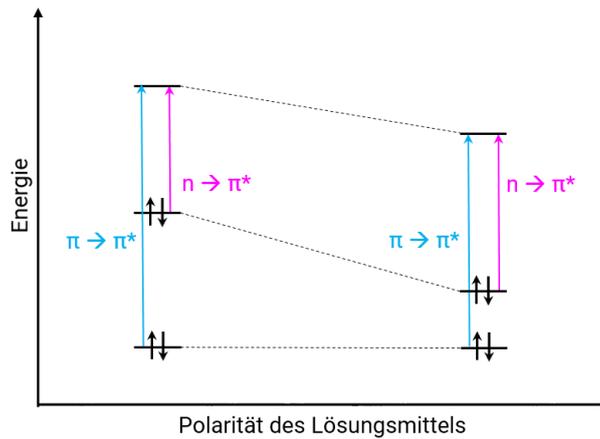


Abbildung 44: Energetische Darstellung des Lösungsmiteleinflusses auf den $n \rightarrow \pi^*$ - und $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang. Mit steigender Lösungsmittelpolarität werden $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge hypsochrom verschoben; $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge dagegen bathochrom.

Die Energiedifferenz zwischen π - und π^* -Orbitalen ergibt eine Abnahme mit steigender Lösungsmittelpolarität. Die damit hervorgerufene bathochrome Verschiebung der Absorptionswellenlängen (Verschiebung zu größeren Wellenlängen und damit weniger Energie) wird als positive Solvatochromie bezeichnet. Eine Zunahme der Energiedifferenz zwischen n - und π^* -Orbitalen führt in polarer Umgebung zu einer hypsochromen Verschiebung. Diese Entwicklung zu kleineren Wellenlängen und somit höherer Energie wird als negative Solvatochromie bezeichnet.^[154] Somit kann durch Aufnahmen der Emissionsspektren eine erkennbare Verschiebung des Maximums und oftmals auch eine Veränderung der Intensität mit veränderter Umgebungspolarität detektiert werden.

1.2 4-Aminophthalimid

Im Hinblick auf die kleine, für solvatochrome Fluoreszenzsonden gewünschte, Größe wurde in dieser Arbeit der Fokus auf 4-Aminophthalimid als solvatofluoreszenter Farbstoff gelegt. 4-Aminophthalimid (4AP) ist ein sehr kleines, aber stark umgebungsempfindliches Molekül (siehe Abbildung 45). Es besitzt eine breite Absorptionsbande bis $\lambda > 400$ nm. Damit kann es außerhalb der Protein- und Nukleinsäureabsorption angeregt werden und zeigt eine polaritätsabhängige Verschiebung des Emissionsmaximums und eine Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute. Die Verschiebung der Fluoreszenz kann dabei bis zu 115 nm ausmachen.^[155]

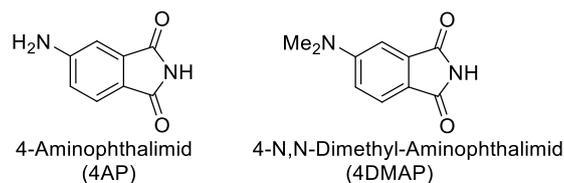


Abbildung 45: Struktur der solvatochromen Farbstoffe 4-Aminophthalimid und 4-N,N-Dimethylaminophthalimid.

Der elektronisch angeregte Zustand des 4AP hat ladungstrennten Charakter und ein somit verändertes Dipolmoment. Dieses bildet wiederum mit polaren Lösungsmitteln Wasserstoffbrückenbindungen und der angeregte Zustand wird stabilisiert. Daraus folgt eine Rotverschiebung (bathochrome Verschiebung) der Emissionswellenlänge.^[155-158] 4AP stellt somit ein Beispiel für positive Solvatochromie dar. Die Absorptionseigenschaften sind im Vergleich nur geringfügig verändert in unterschiedlicher Umgebung. Des Weiteren kommt es in wässriger Umgebung zur Exciplexbildung zwischen dem angeregten Farbstoffmolekül und den Wassermolekülen, was strahlungslose innere Konversion zur Folge hat und die Fluoreszenz partiell löscht.

Mit einer vergleichbaren Größe zur Indoleinheit von Tryptophan stellt 4AP einen isosteren Ersatz dieser natürlich vorkommenden Aminosäure dar. Bisherige Arbeiten nutzten lediglich den Farbstoff 4-N,N-Dimethylaminophthalimid (4DMAP) als Referenzaminosäure im biochemischen Kontext (siehe Abbildung 45).^[159] Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nichtmethyliertes 4AP signifikant höhere Fluoreszenzquantenausbeuten aufweist. Grund für die reduzierte Fluoreszenzintensität des angeregten 4DMAP sind die strahlungslosen Energieverluste durch den TICT Zustand (*twisted intramolecular charge transfer*).^[160]

Eine der ersten solvatochromen fluoreszenten Aminosäuren beschreibt 6-(2-Dimethylaminonaphthyl)-Alanin mit einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute und einer Blauverschiebung in polar protischer Umgebung.^[161] Diese Eigenschaft wurde zur Untersuchung von Peptid-Protein und Protein-Protein Interaktion genutzt. Der folgende, im Vergleich kleinere, solvatochrome Fluorophor 4DMAP sollte die Peptidstruktur bzw. dessen Interaktionen weniger stören. Dieser konnte mit einem sechsfachen Anstieg der Fluoreszenzintensität die Bindung des Zielproteins an das 14-3-3 Peptid ebenfalls bestätigen.^[159] Eine weitere Anwendung fand 4-Azidophthalimid als Fluoreszenzmarker zur Untersuchung bestimmter Ligandenbindungsstellen.^[162] Dabei wurde speziell auf photoreaktive Gruppen fokussiert, welche mittels C-H/Nu-H Bindung mit vielen Aminosäuren verbunden werden können. 4-Azidophthalimid repräsentiert solch einen photoaktivierbaren Fluorophor. Durch Anregung konnte der mit dem Fluorophor kovalent verknüpfte Ligand an das Zielprotein anbinden. Dies wurde unter Verwendung von der

Carbonischen Anhydrase II als Zielprotein und dem markierten 4-Sulfamoylbenzamid als Ligand erfolgreich nachgewiesen. Ebenfalls Anwendung fand diese Markierungsmethode unter Verwendung von Biotin und fluorophormarkiertem Streptavidin unter UV Anregung. 4AP und 4DMAP konnten auch als isosterer Purinbasenersatz eingesetzt und charakterisiert werden.^[163] Dabei wurde besonders der Unterschied der beiden Fluorophore nach DNA-Doppelstrangbildung deutlich. Mit einer deutlich größeren Stokes-Verschiebung und einer höheren Fluoreszenzquantenausbeute konnte 4AP als stärkerer solvatochromer Farbstoff charakterisiert werden. Sowohl WAGENKNECHT *et al.* als auch HOCEK *et al.* konnten zusätzlich den enzymatischen Einbau phthalimidmarkierter Triphosphate mittels DNA Polymerase nachweisen.^[163, 164]

Neben den solvatochromen Farbstoffen wurden zusätzlich die fluoreszenten Eigenschaften der natürlichen Aminosäure Tryptophan untersucht und durch Modifizieren der Indoleinheit verbessert. Die relativ geringe Fluoreszenzquantenausbeute von Tryptophan konnte bsw. durch Cyan-Modifikation deutlich verbessert werden (um den Faktor 4).^[165] Das daraus resultierende fluoreszente Cyan-Tryptophan wurde genutzt um die Bindung von Peptiden an Zellmembrane darzustellen. Eine signifikante Differenzierung zur Protein- und Nukleinsäureabsorption ist mit dieser Aminosäure jedoch nicht gegeben und damit auf zellulärer Ebene kritisch in der Anwendung.

2. Synthese der 4AP-modifizierten Aminosäure

Im folgenden Abschnitt sind die einzelnen Synthesen der drei 4AP-konjugierten Aminosäuren **2**, **3** und **4** (siehe Abbildung 46) dargestellt. 4AP wurde dabei als kommerziell erhältlicher Baustein in jeder der drei Aminosäuren auf unterschiedliche Art gekoppelt. Die unterschiedlichen Kopplungsmethoden beruhen zum einen auf der synthetisch leicht zugänglichen CuAAC (**2**). Die Kopplung mittels Thiol-En-Reaktion (**3**) eines maleimidmodifiziertem 4AP-Bausteins wurde basierend auf den weit verbreiteten postsynthetischen Anwendungen gewählt. Um einen zu **2** und **3** vergleichsweise wenig störenden Ersatz einer natürlichen Aminosäure darzustellen, wurde zusätzlich **4** mit direkter Verknüpfung zur Peptidbindung synthetisiert.

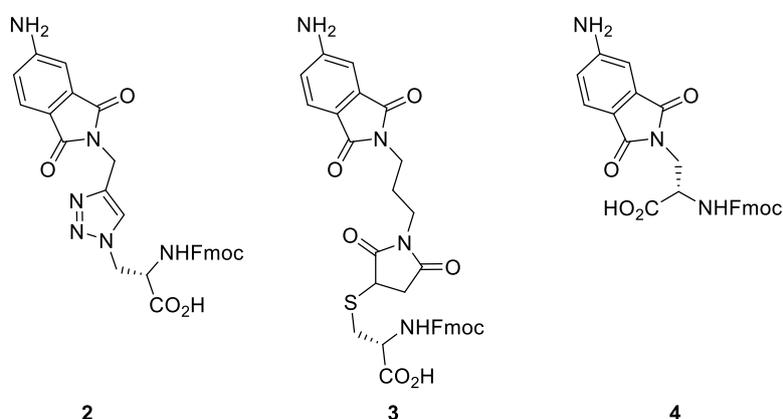


Abbildung 46: Strukturen der drei 4AP-modifizierten Aminosäuren **2**, **3** und **4**.

2.1 Synthese des 4AP-Bausteins **2**

Die 4AP-modifizierte Aminosäure **2** wurde gemäß der bereits im Flavin-Kapitel erwähnten kupferkatalysierten Alkin-Azid-Cycloaddition dargestellt (siehe Abbildung 47). Der dafür benötigte farbstoffgebundene Alkinbaustein **21** konnte der Literatur entsprechend^[164], unter nukleophilem Angriff der Imidfunktion des 4AP **20** an 3-Brompropin, synthetisiert werden. Mit einer Ausbeute von 92 % wurde die Aminosäure **2** mittels CuAAC an Fmoc- β -Azido-Alanin-OH gekoppelt. Durch anschließende HPLC-Reinigung konnte **2** von jeglichen Salzen und Verunreinigungen gereinigt werden.

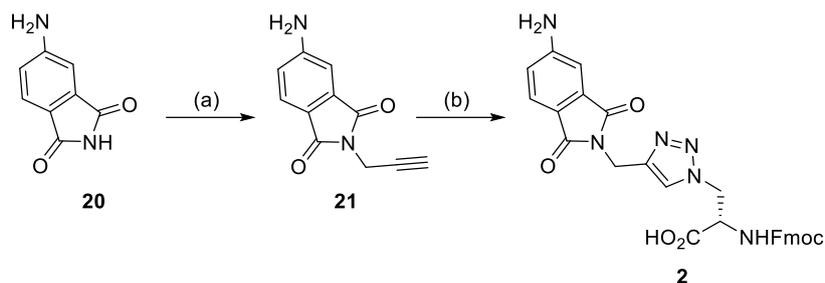


Abbildung 47: Synthese der 4AP-modifizierten Aminosäure **2**: (a) K_2CO_3 , 3-Brompropin, DMF, 60 °C, 3 h, 76 %^[164]; (b) NaAsc, TBTA, $[Cu(CH_3CN)_4]PF_6$, Fmoc- β -Azido-Alanin-OH, DMF, RT, 16 h, 92 %.

2.2 Synthese des 4AP-Bausteins **3**

Zur Darstellung der 4AP-Aminosäure **3** musste im Voraus der maleimidverknüpfte 4AP-Baustein **24** synthetisiert werden. Abbildung 48 stellt den ersten Ansatz zur Synthese dieses Bausteins dar. Zu Beginn wurde über eine Mitsunobu-Reaktion die Imid-Einheit des Maleimids **22** mit 3-Brom-1-propanol zum Bromalkylderviat **23** umgesetzt.^[166, 167] Der darauffolgende nukleophile Angriff des deprotonierten Chromophors **20** an **23** ergab jedoch nicht den gewünschten Baustein **24**. Das Substitutionsprodukt konnte nur in Form des Produktes **25** isoliert werden. Die Addition des entstandenen HBr wird dabei durch den stark elektrophilen Charakter der Maleimiddoppelbindung begünstigt.

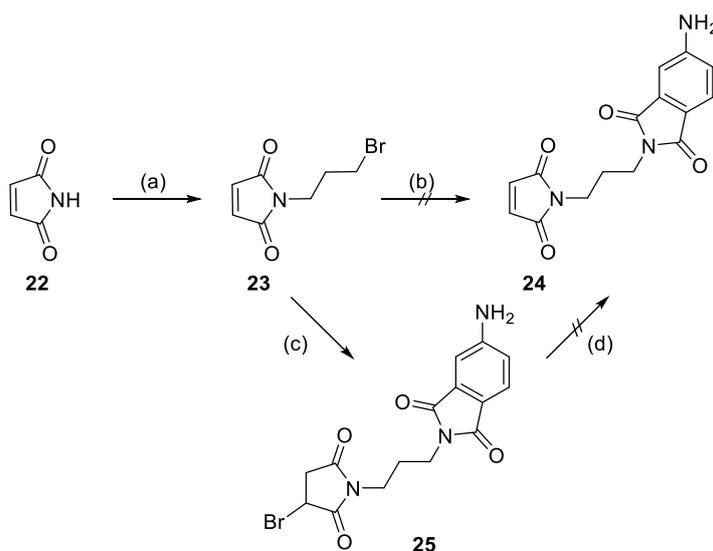


Abbildung 48: Schema des initialen Syntheserversuchs des maleimidmodifizierten 4AP-Bausteins **24**: (a) I. PPh_3 , DIAD, THF, -78 °C, 10 min, II. 3-Brom-1-propanol, **22**, THF, RT, 10 h, 90 %^[166]; (b)/(c) siehe Tabelle 16; (d) siehe Tabelle 17.

Auch unter Variation der Äquivalente eingesetzter Base, der Base selbst, der Temperatur und der Reaktionszeit konnte das gewünscht Produkt **24** nicht erhalten werden (siehe Tabelle 16). Lediglich das Substitutions-Additionsprodukt **25** wurde erhalten. Es wurden weitere Syntheseveruche gewählt, um HBr zu eliminieren (siehe Tabelle 17). Allerdings konnte dies auch unter Einsatz verschiedener Basen und Reaktionsbedingungen nicht eliminiert und somit das gewünschte Produkt **24** nicht erhalten werden.

Aufgrund der stark elektrophilen Doppelbindung des Maleimids wurde Furan als Schutzgruppe mittels DIELS-ALDER-Reaktion eingeführt (siehe Abbildung 49). Die Schützung des Maleimid-Bausteins **23** unter Erhalt von **26** verlief quantitativ. Die anschließende nukleophile Substitution fand daraufhin mit einer Ausbeute von 79 % statt. Anschließend konnte durch Retro-DIELS-ALDER-Reaktion bei einer Temperatur von 120 °C der entschützte Baustein **24** erhalten werden. Die 4AP-modifizierte Aminosäure **3** wurde letztlich unter Addition des ungesättigten Maleimids an Fmoc-L-Cys-OH **28** durch Thiol-En-Reaktion quantitativ erhalten. Dafür wurde vorausgehend die Aminosäureseitenkette der käuflich erworbenen Aminosäure Fmoc-L-Cys(Trt)-OH sauer entschützt.

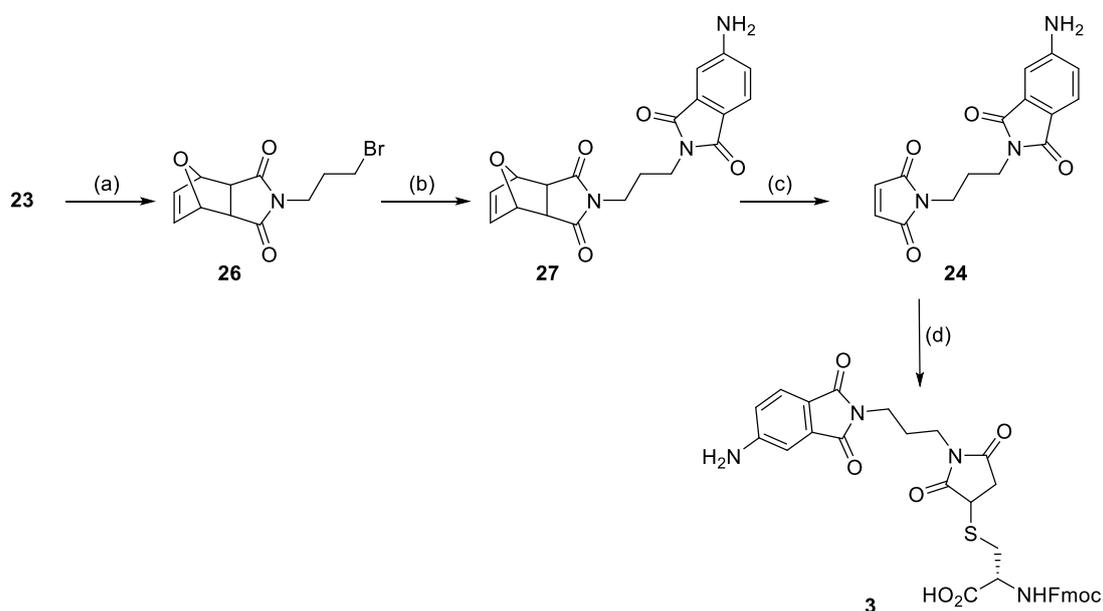


Abbildung 49: Synthese der 4AP-modifizierten Aminosäure **3**: (a) Furan, Et₂O, RT, 3 d, quant; (b) I. 4AP, K₂CO₃, DMF, RT, 1 h, II. **26**, DMF, RT, 1 h, 79 %; (c) DMSO/Toluol, 120 °C, 2 h, 81 %; (d) Fmoc-L-Cys-OH (**28**), DMF, RT, 2 h, quant.

2.3 Synthese des 4AP-Bausteins 4

Als Vergleich zu den beiden 4AP-modifizierten Aminosäuren **2** und **3**, mit vergleichsweise langer Linkereinheit zwischen α -C und Chromophor, wurde eine weitere Aminosäure mit verkürztem Abstand synthetisiert. Angelehnt an die vorherige Synthese der azidmodifizierten Aminosäure **16** wurde eine ähnliche Syntheseroute über die mesylsubstituierte Aminosäure **15** gewählt.^[120] Nach nukleophilem Angriff des deprotonierten Chromophors **20** konnte die 4AP-Aminosäure **29** mit verkürztem Linker in 28 % Ausbeute über zwei Syntheseschritte erhalten werden (Abbildung 50). Die geringe Ausbeute lässt auf zusätzliche Bildung des bereits erwähnten Nebenproduktes Boc-Dehydroalanin-OMe schließen. Eine Entfernung der C-terminalen Methoxyschutzgruppe der Aminosäure **29** konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da der Chromophor gegenüber nukleophilen Basen nicht stabil ist. Außerdem erfordert der Einbau der 4AP-Aminosäure eine basenlabile N-terminale Schutzgruppe für die spätere Festphasenpeptidsynthese unter Fmoc-Strategie. Deshalb wurde die erfolgreiche Synthesestrategie auf Fmoc-geschütztes Serin angewendet.

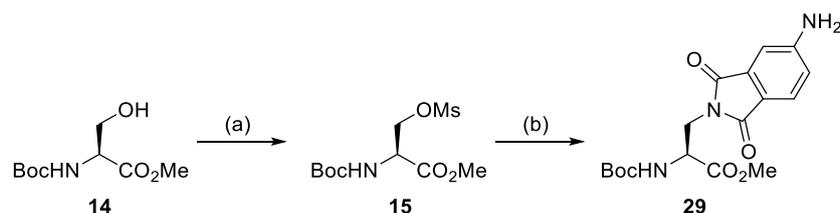


Abbildung 50: Synthese der 4AP-modifizierten Aminosäure **29**: (a) Et_3N , MsCl , DCM , $0\text{ }^\circ\text{C}$ – RT , 1 h; ^[120] (b) **20**, K_2CO_3 , DMF , RT , 2 h, 28 % über zwei Stufen.

Dem vorausgehend wurde die Aminosäure Fmoc-Ser(Trt)-OH **30** C-terminal mit einer Allylgruppe geschützt, ähnlich der Synthesestrategie von IMPERIALI *et al.*^[159] Ausgangspunkt der Substitutionsreaktion war die an ihrer Seitenkette entschützte Aminosäure **32** (Fmoc-Ser-OAll), welche unter sauren Bedingungen quantitativ erhalten wurde. Abhängig von der Basenlabilität der Fmoc-Schutzgruppe konnte jedoch die zuvor erfolgreiche Synthesestrategie über eine mesylsubstituierte Aminosäure und darauffolgende Substitution nicht erfolgreich angewendet werden. Es konnte lediglich das Additionsprodukt **33** der abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppe mit dem Chromophor 4AP **20** isoliert werden (siehe Abbildung 51).

Synthese der 4AP-modifizierten Aminosäure

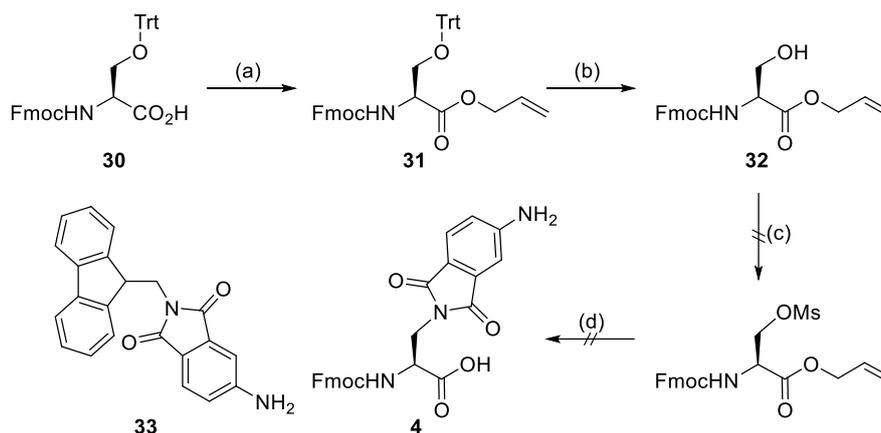


Abbildung 51: Übersicht der ersten Syntheseversucht für die 4AP-modifizierte Aminosäure **4**: (a) I. Cs_2CO_3 , MeOH, RT, 10 min, II. Allylbromid, DMF, RT, 1 h, 96 %; (b) TFA/TIS/ H_2O (92.5 % : 5 % : 2.5 %), RT, 4 h, quant; (c) Et_3N , MsCl, DCM, 0 °C-RT, 1 h; (d) 4AP, DMF, RT, 2 h.

Abgeleitet von vorheriger Literatursynthese der 4DMAP-modifizierten Aminosäure wurde eine weitere Synthesestrategie für die 4AP-Aminosäure **4** ausgearbeitet, wie in Abbildung 52 dargestellt.^[159] Ausgangspunkt war die Fmoc und Boc geschützte 2,3-Diaminopropansäure (Fmoc-L-Dap(Boc)-OH, **34**). Unter C-terminaler Einführung der Allylschutzgruppe mit folgender Seitenkettenentschützung konnte die Aminosäure **36** (Fmoc-L-Dap-OAlI) mit Literatursausbeuten erhalten werden. Mit den Reagenzien HOBt und HBTU wurde das zuvor synthetisierte 4-Aminophthalsäureanhydrid **39** direkt an die Aminosäure gekoppelt. Die darauffolgende Pd(0)-katalysierte Allylabspaltung mit PhSiH_3 als Abfangreagenz ergab schließlich die 4AP-modifizierte Aminosäure **4** in 85 % Ausbeute.

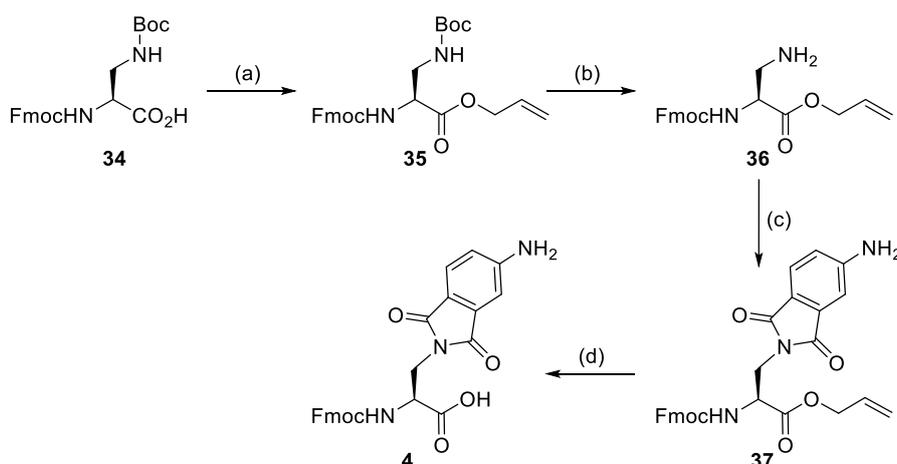


Abbildung 52: Synthese der 4AP-modifizierten Aminosäure **4**: (a) I. Cs_2CO_3 , MeOH, RT, 10 min, II. Allylbromid, DMF, RT, 1 h, 95 %; (b) TFA/TIS/ H_2O (92.5 %:5 %: 2.5 %), RT, 4 h, 100 %; (c) I. **39**, DIPEA, DMF, RT, 30 min, II. HOBt* H_2O , HBTU, DMF, RT, 16 h, 71 %; (d) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, PhSiH_3 , CH_2Cl_2 RT, 1 h, 85 %.

Mit der zuvor durch KATJA KRELL verbesserten Synthese des Bausteins 4-Aminophthal-säureanhydrid **39** durch Kondensationsreaktion mit EDC und 3 Å Molekularsieb war es möglich, eine zu den Aminosäuren **2** und **3** vergleichbare Aminosäure mit direkter Verknüpfung zur Peptideinheit zu synthetisieren (siehe Abbildung 53).

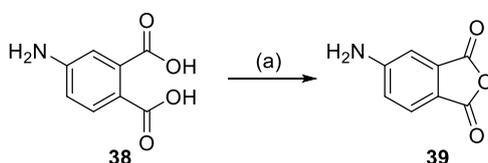


Abbildung 53: Synthese des in Abbildung 52 eingesetzten Bausteins **39**: (a) EDC, 3 Å Molekularsieb, Aceton, RT, 24 h, 80 %.

Für spätere Kopplungen wurde die Reaktivität der exozyklischen Aminogruppe des 4AP-Chromophors getestet. Zunächst wurde eine Einführung der Boc-Schutzgruppe in MeOH unter Anwendung verschiedener Äquivalente Boc₂O getestet. Auch nach Zugabe von DIPEA und verlängerter Reaktionszeit konnte kein Umsatz erreicht werden. Eine durch Triphosgen aktivierte Substitution von *tert*-Butanol in Chloroform verlief ebenfalls negativ. Die daraus folgende geringe Nukleophilie der Aminogruppe wurde in einer negativ verlaufenden Testkupplung des N- und C-terminal geschützten Bausteins **37** mit Fmoc-L-Trp-OH bestätigt. Es folgt, dass die 4AP-modifizierten Aminosäuren **2**, **3** und **4** in der Fmoc-Festphasensynthese, ohne weitere Schützung der Aminofunktion, eingesetzt werden können.

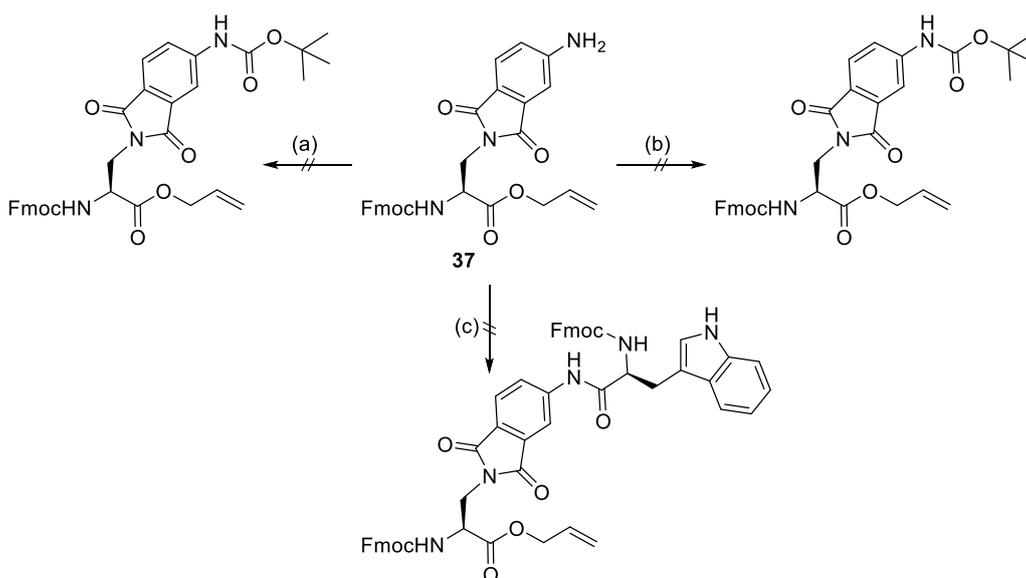


Abbildung 54: Synthesen zur Schützung der exozyklischen Aminogruppe des Chromophors 4AP: (a) Boc₂O, DIPEA, MeOH, RT, 16 h; (b) I. Triphosgen, DCM, 0 °C, 1 h, II. *t*BuOH, DCM, RT, 16 h; (c) Fmoc-L-Trp-OH, HOBT·H₂O, HBTU, DIPEA, DMF, RT, 16 h.

3. Synthese der Peptide

Als transmembranes Segment wurde auch im 4AP-Projekt das TM-Segment des EGF-Rezeptors (*epidermal growth factor receptor*) herangezogen.^[168] Das in diesem Fall 35 Aminosäuren lange Peptid setzt sich aus einem Teil der extrazellulären Juxtamembranregion (G⁶⁴⁰–P⁶⁴⁴), der hydrophoben, α -helikalen TM-Domäne (S⁶⁴⁵–M⁶⁶⁸) und Teilen der intrazellulären Juxtamembranregion (R⁶⁶⁹–V⁶⁷⁴) zusammen.

Alle drei Aminosäuren **2**, **3** und **4** wurden mittels Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese in die Peptidsequenz eingebaut. Die Bausteine **3** und **4** wurden mittig der TM-Domäne an Stelle der Aminosäure Leu⁶⁵⁶ platziert, wie in Tabelle 9 gezeigt. Als Vergleichspeptide wurden **EGFR_{AP3}** und **EGFR_{AP4}** mit der N-terminalen Kopplung der Aminosäuren **2** und **3** (an Stelle der Aminosäure Gly⁶⁴⁰) synthetisiert. Diese Modifikationen bieten einen solvatofluoreszenten Vergleich zwischen einer Lokalisation in der hydrophoben Region der Lipiddoppelschicht und der eher hydrophilen Membranoberfläche.

Tabelle 9: Peptidsequenzen der 4AP-modifizierten EGFR-Peptide.

Peptid	Sequenz
EGFR _{wt}	NH ₂ –GPKIPSIATGMVGALLLLLVLVALGIGLFMRRRHIV–COOH
EGFR _{AP1}	NH ₂ –GPKIPSIATGMVGALL– 4 –LLVVALGIGLFMRRRHIV–COOH
EGFR _{AP2}	NH ₂ –GPKIPSIATGMVGALL– 3 –LLVVALGIGLFMRRRHIV–COOH
EGFR _{AP3}	NH ₂ – 2 –PKIPSIATGMVGALLLLLVLVALGIGLFMRRRHIV–COOH
EGFR _{AP4}	NH ₂ – 4 –PKIPSIATGMVGALLLLLVLVALGIGLFMRRRHIV–COOH

4. Optische Charakterisierung

Im Folgenden werden die solvatochromen Eigenschaften der 4AP-modifizierten Aminosäuren **2**, **3** und **4** spektroskopisch untersucht. Nach Einbau der Aminosäuren in die Peptide **EGFR_{AP1}**–**EGFR_{AP4}** wird das solvatofluoreszente Verhalten des Chromophors genutzt, um diese im Membransystem zu lokalisieren und in lebenden Zellen eine fluoreszente Bildgebung zu ermöglichen.

4.1 Optische Eigenschaften der 4AP-Aminosäuren **2**, **3** und **4**

Die Solvatochromie der 4AP-Aminosäuren **2**, **3** und **4** wurde mittels Absorptions- und Fluoreszenzspektren in unterschiedlich polaren Lösungsmitteln bestimmt (siehe Abbildung 55, Abbildung 56, Abbildung 77, Abbildung 78). Im selben Lösungsmittel sind die Absorptions- und Emissionsmaxima der drei Aminosäuren ähnlich. Mit einer Rotverschiebung von 20 nm zeigen die Absorptionsmaxima eine leichte lösungsmittelbedingte Verschiebung von 364 nm nach 383 nm. Die Emissionsmaxima wiederum liegen im Bereich von 460–568 nm und weisen damit eine 100 nm Rotverschiebung von EtOAc nach Wasser auf (siehe Tabelle 18).

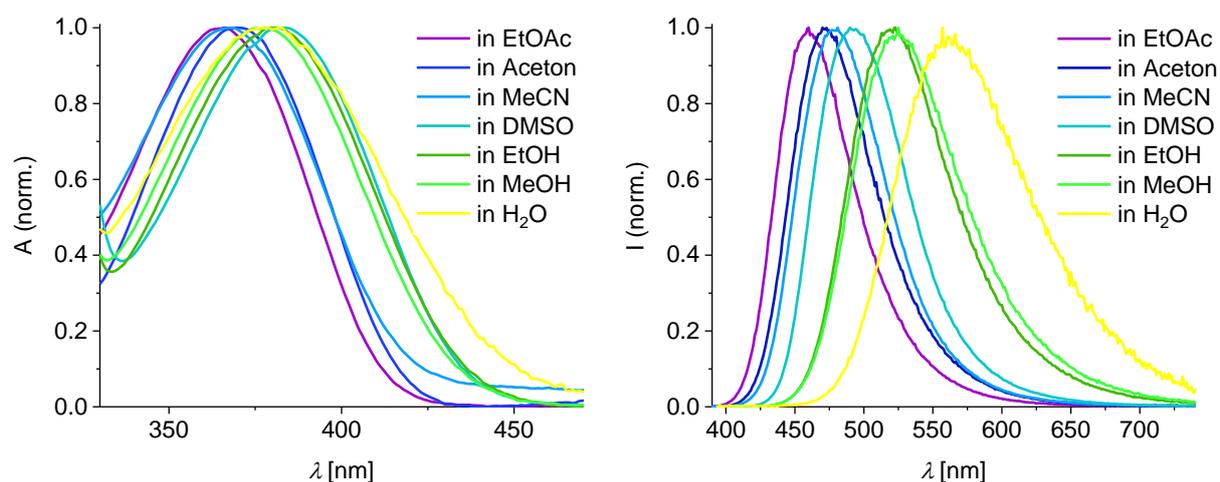


Abbildung 55: Normierte Absorption und Fluoreszenz der 4AP-Aminosäure **4** in verschiedenen Lösungsmitteln (Anregung bei λ_{abs}^{max} für jedes Lösungsmittel).

Zusätzlich wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F der 4AP-Bausteine **2**, **3** und **4** in den jeweiligen Lösungsmitteln aufgenommen und mit dem kommerziell erhältlichen 4AP verglichen (siehe Tabelle 19). In nicht-protischem Lösungsmittel liegen die Quantenausbeuten der

4AP-Bausteine im Bereich von 0.73–0.64. In Wasser sind diese jedoch sehr gering (0.040 für **2**, 0.043 für **3**, 0.051 für **4**), was auf die bereits erwähnte Exciplexbildung und der daraus resultierenden strahlungslosen Relaxation mit partieller Fluoreszenzlöschung zurückzuführen ist. Diese Tendenz der Fluoreszenzquantenausbeute ist typisch für 4AP. Dennoch konnten leicht höhere Quantenausbeuten für die Aminosäuren **2**, **3** und **4** detektiert werden. Zusätzlich zeigen sie, verglichen mit 4-*N,N*-Dimethylaminophthalimid, eine deutliche Steigerung.^[169] Dies macht den Einsatz der 4AP- statt der 4DMAP-Bausteine noch einmal offensichtlich.

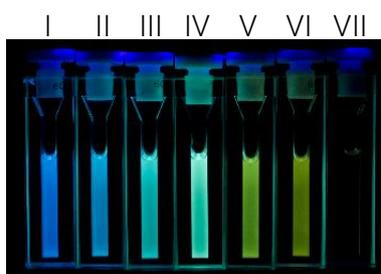


Abbildung 56: Darstellung der 4AP-Aminosäure **4** unter Anregung mit einer 360 nm UV-Lampe in verschiedenen Lösungsmitteln (I. EtOAc, II. Aceton, III. MeCN, IV. DMSO, V. EtOH, VI. MeOH, VII. H₂O).

Auffallend ist auch der fluorogene Verlauf der maleimidmodifizierten 4AP-Konjugate (siehe Abbildung 57). Es wurde bereits in der Literatur gezeigt, dass Maleimid die Fluoreszenz kovalent gebundener Chromophore löscht.^[170-172] Dementsprechend geht die Synthese der 4AP-Aminosäure **3** unter Bildung des Thioalkylsuccinimids mit einem starken Fluoreszenzanstieg einher.

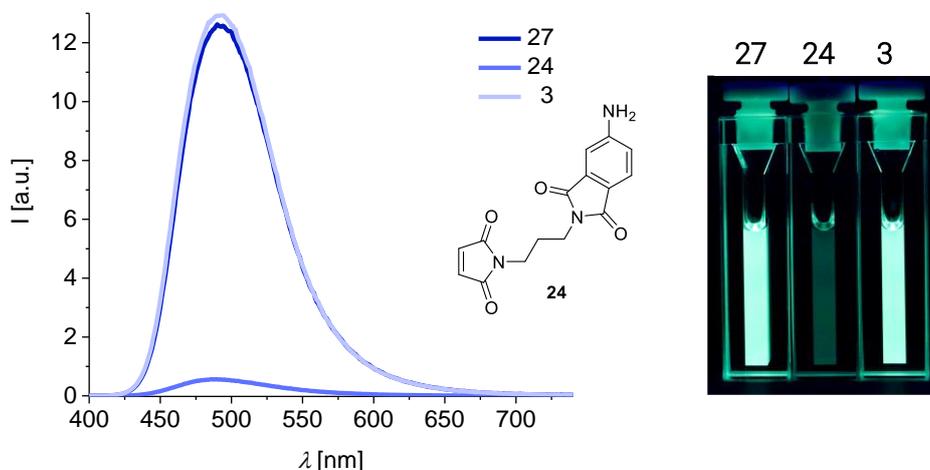


Abbildung 57: Fluoreszenz der Bausteine **27**, **24** und **3** in DMSO (links: $\lambda_{exc.} = 383$ nm; rechts: Darstellung unter Anregung mit 360 nm UV-Lampe; 0.04 mM).

Im Vergleich führt die Synthese des vorangehenden 4AP-Bausteins **24** aufgrund der entschützten Maleimidgruppe zu einer starken Fluoreszenzlöschung. Mit einer Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F um den Faktor 12 von **27** nach **24** wird diese fluorogene Eigenschaft bestätigt. Die 13-fache Zunahme unter Bildung der Aminosäure **3** wiederum stellt eine potentielle Möglichkeit zur Reaktionsverfolgung dar (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F der Syntheseschritte **27**, **24** und **3** in DMSO (0.04 mM; $\lambda_{exc.} = 390$ nm).

	27	24	3
	0.91	0.075	0.96

4.2 Optische Eigenschaften der 4AP-modifizierten Peptide

Die spektralen Eigenschaften der, mit den 4AP-Aminosäuren **2**, **3** und **4** modifizierten EGFR-Peptide wurden sowohl im POPC-Vesikelsystem als auch in protischem Lösungsmittel untersucht. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der hydrophoben Peptide in PBS-Puffer wurde dafür MeOH gewählt. Die Modifikationsposition der Peptide ermöglicht einen spektralen Vergleich zwischen hydrophobem Transmembranbereich (**EGFR_{AP1}** und **EGFR_{AP2}**) und der, dem Wasser zugewandten Membranoberfläche (**EGFR_{AP3}** und **EGFR_{AP4}**).

Signifikante Fluoreszenzänderungen zwischen POPC-Vesikelsystem und MeOH zeigen die Peptide **EGFR_{AP1}** und **EGFR_{AP2}**. Die Bausteine **4** und **3** sind in diesen Peptiden mittig des Transmembranbereiches eingebracht. Das Emissionsmaximum unterliegt einer Blauverschiebung um 34 nm, von 517 nach 483 nm für **EGFR_{AP1}** und um 28 nm von 530 nach 502 nm für **EGFR_{AP2}** (siehe Abbildung 58). Auch die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F weist nach Vesikeleinbau für **EGFR_{AP1}** einen Anstieg um den Faktor 2.1 und für **EGFR_{AP2}** um 3.3 auf (siehe Tabelle 11). Sowohl die Fluoreszenzverschiebung als auch der Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute gehen mit dem Einbringen der Peptide im Lipidsystem einher. Der jeweilige Chromophor findet sich demnach in der hydrophoben Umgebung der Lipiddoppelschicht. Die Fluoreszenzunterschiede zwischen **EGFR_{AP1}** und **EGFR_{AP2}** in protischem Lösungsmittel (MeOH) reflektieren die hohe Sensitivität des 4AP gegenüber der jeweiligen Linkereinheit zum Peptid. Der kürzere Linker in **4**, verglichen mit dem eher langen Maleimidlinker in **3**, bewirkt eine Blauverschiebung und einen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute. Dies ist auf die Nähe des Chromophors in **4** zum hydrophoben Peptidgerüst zurückzuführen.

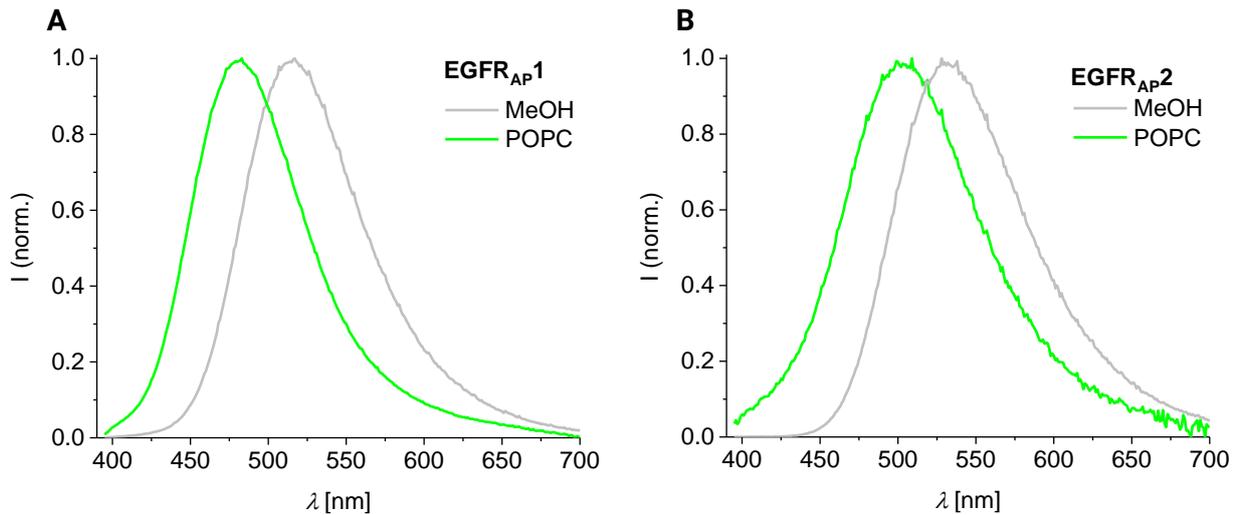


Abbildung 58: Normierte Fluoreszenz der Peptide $EGFR_{AP1}$ (A) und $EGFR_{AP2}$ (B) in MeOH und POPC-Lipidvesikel ($\lambda_{exc.} = 380 \text{ nm}$).

Demgegenüber zeigen die Peptide $EGFR_{AP3}$ und $EGFR_{AP4}$ keine signifikanten Fluoreszenzunterschiede zwischen den Messungen in MeOH und dem Einbringen in das POPC-Vesikelsystem (siehe Abbildung 59). Mit N-terminalem Einbau der Aminosäure **2** zeigt das Peptid $EGFR_{AP3}$ lediglich einen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute um den Faktor 1.4 und eine Blauverschiebung um 10 nm von 528 bis 518 nm. Diese geringen Änderungen können in der eher langen Linkereinheit der Aminosäure **2** begründet werden. Es ermöglicht eine Ausrichtung des 4AP zur Lipiddoppelschicht, wodurch der Chromophor von der polaren Umgebung abschirmt wird.

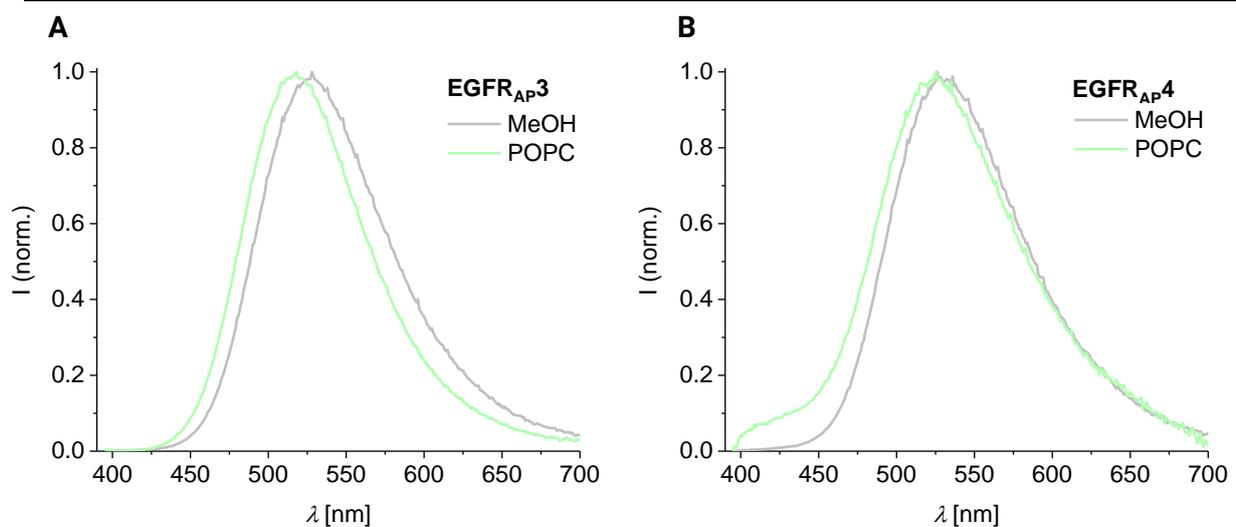


Abbildung 59: Normierte Fluoreszenz der Peptide $EGFR_{AP3}$ (A) und $EGFR_{AP4}$ (B) in MeOH und POPC-Lipidvesikel ($\lambda_{exc.} = 380 \text{ nm}$).

Die Aminosäure **4** in **EGFR_{AP4}** wiederum zeigt lediglich einen 1.3-fachen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute und eine hypsochrome Verschiebung um 4 nm. Dies liegt an der starren Struktur des Bausteins **4**, welche den Fluorophor in Richtung der wässrigen Umgebung an der Membranoberfläche orientiert und somit keinen signifikanten spektralen Unterschied zum protischen Lösungsmittel (MeOH) aufweist.

Die ausgeprägten solvatofluoreszenten Eigenschaften der Aminosäuren **2-4** erlauben somit eine Charakterisierung transmembraner Peptide (siehe Abbildung 60).

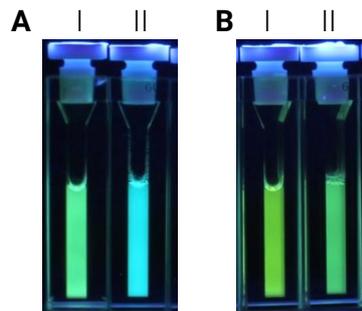


Abbildung 60: Visuelle Unterschiede der Peptide **EGFR_{AP1}** (A) und **EGFR_{AP4}** (B) in MeOH (I) und POPC-Lipidsystem (II) unter Anregung mit 360 nm UV-Lampe.

Tabelle 11: Optische Eigenschaften der Peptide **EGFR_{AP1}**–**EGFR_{AP4}** in MeOH und POPC-Vesikeln.

Peptid	λ_{fluo}^{max} [nm] ^[a]		Φ_F ^[b]	
	MeOH	POPC	MeOH	POPC
EGFR _{AP1}	517	483	0.43	0.90
EGFR _{AP2}	530	502	0.25	0.83
EGFR _{AP3}	528	518	0.27	0.39
EGFR _{AP4}	529	525	0.24	0.31

[a] $\lambda_{exc.} = 380$ nm

[b] Anregung bei 390 nm

4.3 Strukturelle Eigenschaften der 4AP-modifizierten EGFR-Peptide

Um einen möglichen Einfluss der 4AP-Modifikationen auf die Sekundärstruktur und die Ausrichtung im Lipid auszuschließen, wurden die EGFR-Peptide mittels CD- und OCD-Spektroskopie analysiert. Die CD-Proben wurden bei 20 °C mit einer Peptidkonzentration von 0.1 mg/mL in Acetonitril/Wasser gemessen (siehe Abbildung 61 A). Alle Peptide zeigen dabei die, für eine α -Helix charakteristischen, negativen Absorptionsmaxima bei 220 und 208 nm und die positive Bande bei 190 nm.^[139]

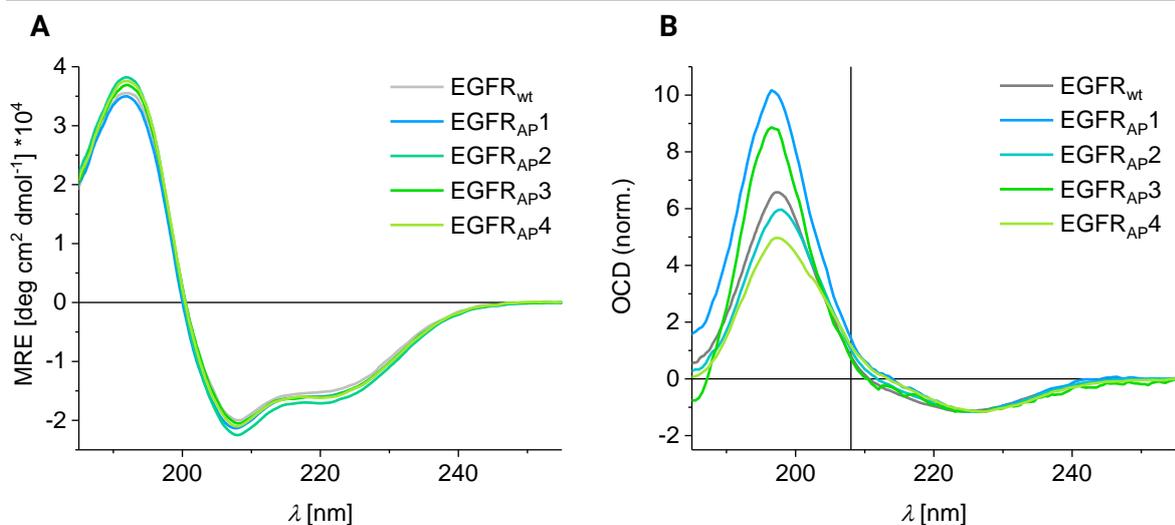


Abbildung 61: CD- und OCD-Spektren der EGFR-Peptide **EGFR_{wt}-EGFR_{AP4}**. CD-Spektren bei 20 °C, (0.1 mg/mL) (A); OCD-Spektren mit P/L-Verhältnis von 1:50 (B). Die Spektren (25 °C) wurden auf die Negativbande bei 225 nm normiert um ähnliche Linienformen zu illustrieren (Signale unter 200 nm zeigen Abweichungen basierend auf der Streuung der orientierten Probe).

Die OCD-Messungen der EGFR-Peptide wurden mit einem molaren Peptid zu Lipid (POPC) Verhältnis von 1:50 bei 25 °C aufgenommen. Die erhaltenen Spektren wurden auf die Negativbande bei 225 nm normiert (Abbildung 61 B). Um Informationen über die Orientierung der Peptide innerhalb der Membran zu erhalten, wurde das Signal bei 208 nm betrachtet. Dabei konnte für alle Peptide ein positives Absorptionssignal beobachtet werden, welches auf senkrecht in die Membran eingebrachte Peptide (I-Zustand) deutet. Wie bereits im Kapitel 5.3 beschrieben, zeigt der Absorptionsbereich unter 200 nm Abweichungen voneinander. Besonders im Fall von hochkonzentrierten Proben können die Signale durch die nicht gleichmäßige Verteilung der Chromophore voneinander abweichen.^[142] Aus den CD- und OCD-Spektren geht hervor, dass die Aminosäuren **2-4** weder die α -helikale Sekundärstruktur noch die stabile insertierte Ausrichtung (I-Zustand) des EGFR-Transmembransegments signifikant beeinflussen.

4.4 *In-vivo* Experimente

Um das Potenzial der Transmembranpeptide für die molekulare Bildgebung in Lebendzellen zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit den Peptiden **EGFR_{AP1}** und **EGFR_{AP4}** eingebracht in POPC-Vesikeln behandelt. Nach 16 h Inkubationszeit ist die Fluoreszenz des Chromophors deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 62). Es findet sich dabei eine Mischung an peptidhaltigen Vesikeln, welche an der Oberfläche der äußeren Zellmembran anzufinden sind und ein diffuses Fluoreszenzsignal lokalisiert in der äußeren Zellmembran. Um den Bereich der Membran deutlich zu machen, wurden die Zellen zusätzlich für 30 min mit Concanavalin A (ConA), welches mit einem Cyanin-basierten fluoreszenten Farbstoff (CF[®]633) markiert ist, inkubiert. ConA beschreibt ein Protein, welches spezifisch an Kohlenhydratstrukturen in der Zellwand bindet und diese in Kombination mit dem CF-Farbstoff markiert. Die unterschiedlichen Emissionsbereiche ermöglichen eine Differenzierung der Zellmembran zusammengesetzt aus der ursprünglichen Membran (rote Emission des ConA-CF633) und Zellmembran basierend auf den POPC-Vesikeln (grüne Emission des 4AP).

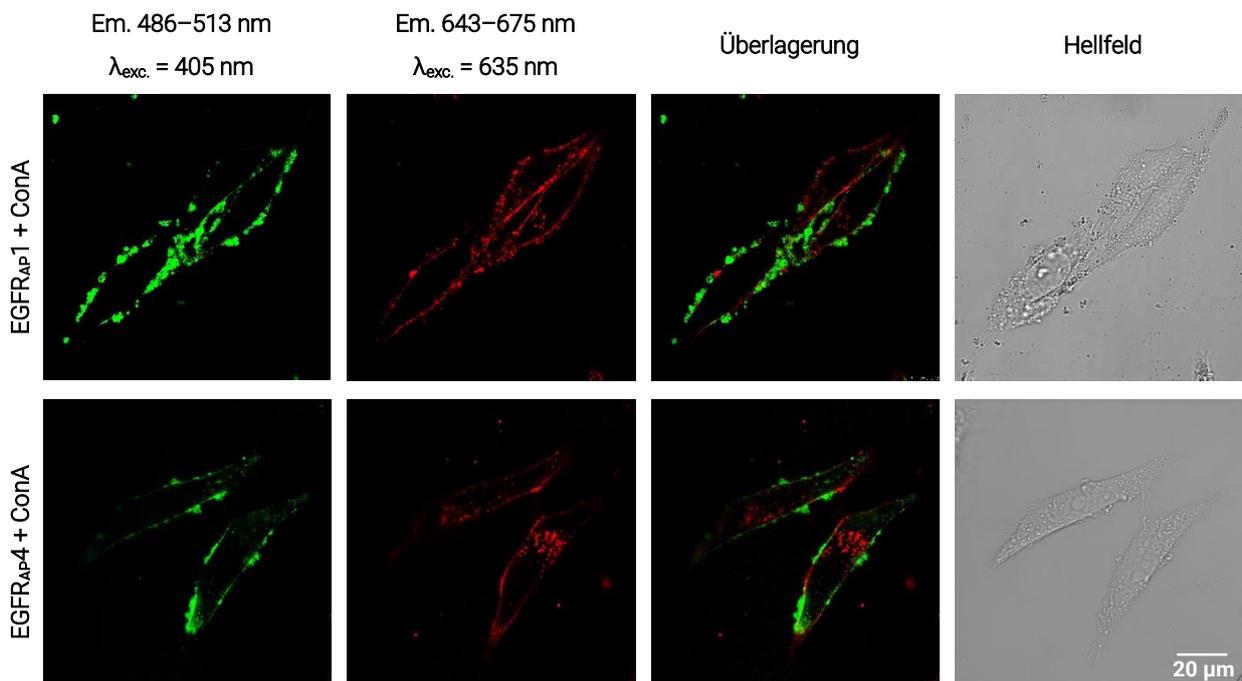


Abbildung 62: Konfokalmikroskopieaufnahmen von HeLa Zellen behandelt mit **EGFR_{AP1}** oder **EGFR_{AP4}** ($\lambda_{exc.} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 486\text{--}513 \text{ nm}$) für 16 h und ConA-CF633 ($\lambda_{exc.} = 635 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 643\text{--}675 \text{ nm}$) für 30 min.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend wurde innerhalb dieses Projekts gezeigt, dass eine umgebungsempfindliche 4AP-modifizierte Aminosäureseitenkette als Transmembransonde genutzt werden kann. Dafür wurden drei neue 4AP-Aminosäuren (siehe Abbildung 63) synthetisiert und ihre solvatochrome Eigenschaft spektroskopisch charakterisiert. Der Unterschied der drei Aminosäuren bestand in den Linkereinheiten, welche den Chromophor mit dem Peptidrückrat verknüpfen. So beschreibt die 4AP-modifizierte Aminosäure **4** neben ihren solvatochromen Eigenschaften einen nahezu isosteren Ersatz zur Indoleinheit der natürlich vorkommenden Aminosäure Tryptophan. Der strukturelle Erhalt der nativen Peptidstruktur wird durch den Einbau dieser Aminosäure idealerweise nicht beeinflusst. Ein weiterer Vorteil des 4AP-Chromophors ist durch die Anregung im sichtbaren Bereich und seiner hellen Fluoreszenz mit starker Stokes-Verschiebung gegeben. Damit ist eine Differenzierung zu Biopolymeren, welche im UV-B-Bereich angeregt werden, möglich.

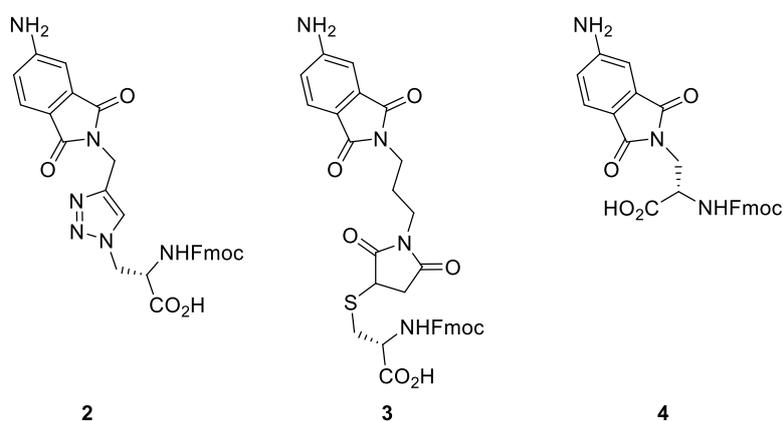


Abbildung 63: Strukturen der drei 4AP-modifizierten Aminosäuren **2**, **3** und **4**.

Die 4AP-Aminosäure **2** wurde mittels kupferkatalysierter Alkin-Azid-Cycloaddition synthetisiert. Diese Kopplungsmethode stellt eine potenzielle postsynthetische Möglichkeit zur Peptidmodifikation dar. Eine selektive Modifikation der Cysteinseitenketten in Proteinen wiederum ist durch den fluorogenen maleimidkonjugierten Chromophor **24** möglich. Die aus der Thiol-en-Reaktion resultierende Aminosäure **3** wurde ebenfalls auf ihre solvatofluoreszenten Eigenschaften untersucht. Anschließend wurden die solvatochromen Aminosäurenbausteine mittels Fmoc-Festphasenpeptidsynthese erfolgreich in das Transmembranfragment des EGF-Rezeptors (G⁶⁴⁰-V⁶⁷⁴) eingebaut. Dabei wurden zwei Modifikationspositionen gewählt. Die Peptide **EGFR_{AP1}** und **EGFR_{AP2}**, in welchen die Aminosäuren **4** und **3** in der Mitte der

Transmembranregion vorzufinden sind, zeigen eine starke Blauverschiebung um 30 nm und einen 2–3-fachen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute nach Einbringen in das Lipidsystem. Im Gegenteil dazu zeigen die Peptide **EGFR_{AP3}** und **EGFR_{AP4}** mit den N-terminal gekoppelten Aminosäuren **2** und **4** nach Vesikelformierung keine signifikanten Fluoreszenzänderungen (siehe Abbildung 64).

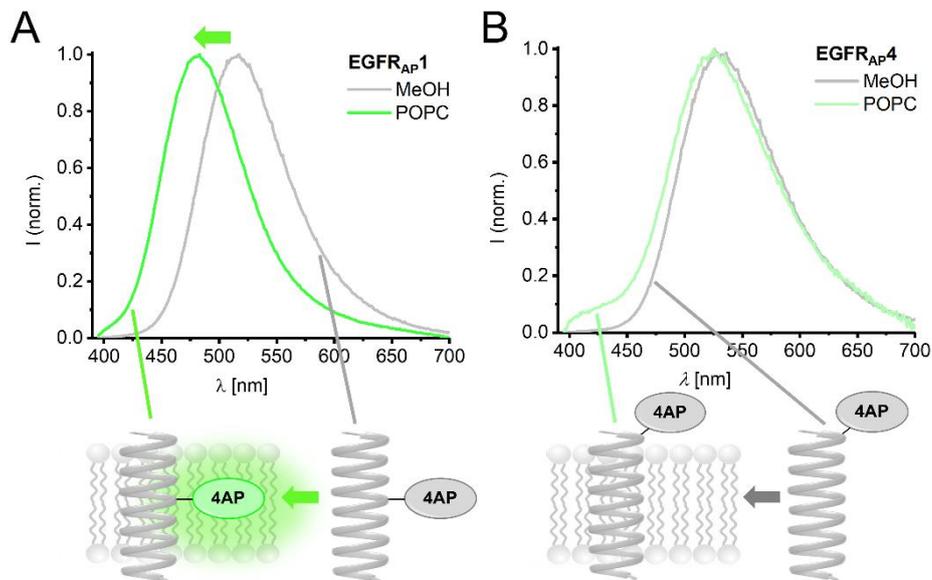


Abbildung 64: Darstellung des solvatofluoreszenten Verhaltens der Peptide **EGFR_{AP1}** (A) und **EGFR_{AP4}** (B) bei Einbringen in ein Vesikelsystem (POPC-Lipid).

Sowohl durch die Fluoreszenzverschiebung als auch durch den Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute war es möglich, zwischen einer Position in der hydrophoben Lipiddoppelschicht (**EGFR_{AP1}** und **EGFR_{AP2}**) und einer auf der Membranoberfläche (**EGFR_{AP3}** und **EGFR_{AP4}**) zu unterscheiden. Basierend auf der geringen Größe des 4AP-Chromophors und dessen aussagekräftigem Fluoreszenzverhalten konnten drei neue Aminosäuren als Transmembran-sonden etabliert werden.

IV. Experimentaltteil

1. Materialien und Methoden

Reagenzien und Lösungsmittel

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *TCI*, *ABCR*, *Sigma Aldrich*, *Fluka*, *Acros Organics*, *Iris Biotech*, *AppliChem BioChemica* und *Alfa Aesar* bezogen und wurden mindestens mit der Qualitätsstufe „zur Synthese“ verwenden. Die verwendeten Lösungsmittel erwiesen mindestens die Qualitätsstufe p.A. (*pro analysi*). Die verwendeten trockenen Lösungsmittel wurden von der Firma *Aercos Organics* bezogen und unter Argon aufbewahrt. Die bei der HPLC Reinigung verwendeten Lösungsmittel waren hochreine, organische Lösungsmittel (*HPLC grade*) und doppelt entionisiertes Wasser aus einer *Millipore-Q8*-Anlage der Firma *Merck*.

Reaktionsführung

Falls notwendig wurden für Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss die Geräte unter Argon-Atmosphäre (Schweißargon 5.0, 99.999 % Reinheit) gehandhabt. Des Weiteren wurden die Glasgeräte im Hochvakuum ausgeheizt.

Chromatographie

- **Dünnschichtchromatographie (DC)**

Der Reaktionsfortschritt wurde mit fertigen mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichteten Aluminiumplatten der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 0.25 mm überprüft. Für *reversed-phase* (RP) Analyse wurden mit Kieselgel 60 RP-18 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumplatten (Schichtdicke 0.2 mm) der Firma *Merck* genutzt. Die Detektion erfolgte unter Fluoreszenzlöschung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm beziehungsweise Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm. Zusätzlich wurde die chemische Auswertung durch Anfärben mit einer Ninhydrinlösung in n-Butanol (0.084 mM und 3 % Essigsäure) unterstützt.

- **Flash-Chromatographie (FC)**

Die rohen Reaktionsmischungen wurden unter Verwendung von Kieselgel 60 der Firma *Sigma Aldrich* mit einer Korngröße von 40–63 μm gereinigt. Die jeweiligen Säulen wurden nass gepackt und nach dem von STILL beschriebenen Verfahren mit leichtem Überdruck durchgeführt.^[173] Die zu reinigende Rohmischung wurde dabei entweder in der mobilen

Phase gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert. Präparative *reversed-phase* Chromatographien wurden automatisiert an einem *IntelliFlash 310* der Firma *Varian* durchgeführt. Dabei dienten KP-C18-HS (60 g) *reversed-phase* Säulen der Firma *Biotage* zur Aufreinigung.

- **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Die in dieser Arbeit synthetisierten Peptide und finalen Chromophoraminosäuren wurden mittels *reversed-phase* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) an einer Hochdruckgradientenanlage der Firma *Jasco MD-2010 Plus* mit einem *Multiwavelength* Detektor im Arbeitskreis ULRICH am Institut für biologische Grenzflächen II (IBG II), KIT, gereinigt. Zur präparativen Reinigung wurde eine *reversed-phase* C18 HPLC-Säule (S/N: E040722-7-6, 10 μm , *Grace Vydac*) mit einem Fluss von 10 mL/min und einer Temperatur von 35 °C verwendet. Die semipräparative Trennung wurde mit einer *reversed-phase* C4-Säule (*PerfectSil 300 C4* 10 μm , Ser. No. 29130651, Lot No. AL0117H, *MZ Analysetechnik*) mit einem Fluss von 7 mL/min unter 35 °C durchgeführt. Die hierfür verwendeten Laufmittel A und B wurden wie folgt gemischt: Laufmittel A – 90 % dd Wasser, 10 % Acetonitril, 0.1 % 1 M HCl; Laufmittel B – 90 % Acetonitril, 10 % dd Wasser, 0.1 % 1 M HCl. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 220 \text{ nm}$. Tabelle 12 dient repräsentativ für nachfolgende Gradientenangaben der säulenchromatographischen HPLC-Aufreinigung.

Tabelle 12: Exemplarischer HPLC Gradient (Wasser-Acetonitril 40–60 %).

Gradient 40–60 %	
min	% B
1	40
16	60
17	100
18	100
19	40
20	40

Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen (bsw. HPLC-Läufe) wurden nach dem Ausfrieren in flüssigem Stickstoff an einer Gefriertrocknungsanlage *Alpha 2-4 LD* der Firma *Christ* getrocknet (AK ULRICH, IBG II, KIT).

Synthetische Arbeit

Das Arbeiten unter Schutzgas wurde, wie oben aufgeführt, in ausgeheizten Reaktionsgefäßen mit Rührfisch durchgeführt. Die dabei verwendeten wasserfreien Lösemittel, sowie die Reagenzien wurden unter Standard SCHLENK-Technik verwendet und nach Herstellerangaben gelagert. Die Überführung der Flüssigkeiten wurde mittels Kunststoffspritzen und Teflonkanülen oder Mikroliterpipetten der Firma *ependorf* durchgeführt. Feststoffe wurden mittels Wägebapier transferiert. Zum Erlangen tiefer Temperaturen wurden Flachdewargefäße mit folgenden Kältemischungen verwendet:

- 0 °C Eis in Wasser
- - 15 °C NaCl in Eis
- - 78 °C Isopropanol in Trockeneis

Organische Lösemittel wurden unter vermindertem Druck an einem Rotationsverdampfer bei einer Wassertemperatur von 40 °C entfernt. Für das Entfernen von Wassermischungen wurde eine Wassertemperatur von ~60 °C gewählt.

Peptidsynthese

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden im Arbeitskreis ULRICH am IBG II, KIT angefertigt. Für die Festphasen Fmoc-Peptidsynthese wurden Fmoc-geschützte Aminosäuren und die jeweiligen Kupplungsreagenzien (DIC und Oxyma oder HOBt HBTU) der Firma *Iris Biotech* verwendet. Die Lösungsmittel wurden von den Firmen *Biosolve* oder *Acros Organics* erhalten. Automatisierte standardisierte Fmoc-Festphasensyntheseprotokolle^[174] wurden entweder an einem *Liberty blue* Mikrowellenpeptidsynthesizer der Firma *CEM* oder an einem multiplen Synthesizer (*Syro II*, Biotage) verwendet.

NMR-Spektroskopie

Zur Analyse der Stoffe wurden Kernresonanzspektren an einem *Bruker Avance 500* Spektrometer mittels der Hardware *Bruker Ascend 500* aufgenommen. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma *eurisotop* bezogen. Dafür wurden etwa 5–10 mg zu messende Substanz in 0.4 mL deuteriertem Lösungsmittel in Probenröhrchen von 5 mm Durchmesser gelöst. Die chemische Verschiebung δ wurden in *parts per million* (ppm) in Bezug auf Tetramethylsilan (TMS) als Nullpunkt angegeben. ¹H-NMR (500 MHz) und ¹³C-NMR (126 MHz) Messungen wurden entweder in DMSO-d₆ oder CDCl₃ aufgenommen und das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels zur Kalibrierung verwendet:

Experimententeil

DMSO-d ₆ :	¹ H-NMR: δ = 2.50 ppm	¹³ C-NMR: δ = 39.52 ppm
CDCl ₃ :	¹ H-NMR: δ = 7.26 ppm	¹³ C-NMR: δ = 77.16 ppm

Kopplungskonstanten J wurden in Hertz (Hz) angegeben und die Multiplizität der ¹H-Signale wie folgt angegeben: s = Singulett, br = breites Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, dt = Dublett von Triplet, t = Triplet, td = Triplet von Dublett, q = Quartett, p = Pentett, m = Multiplet.

Massenspektroskopie

Die Massenspektren wurden von der analytischen Abteilung des Instituts für organische Chemie des KIT aufgenommen. Dabei wurden die Messungen an einem *Finnigan* MAT 95 durchgeführt. EI (Elektronenstoßionisation) und FAB (*Fast Atom Bombardement*) dienten als Ionisierungsverfahren. Zusätzlich wurden MALDI-TOF Aufnahmen an einem *Biflex-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* und einem *AXIMA Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* zur Reaktionskontrolle aufgenommen. Des Weiteren wurde die Peptidsynthese und Aufreinigung mittels LC/MS am IBG II in der Arbeitsgruppe ULRICH identifiziert. Ausgestattet mit einem vorgeschalteten *1100 Series* LC-System der Firma *Agilent* unter Verwendung einer C4 (S/N NE010320-10-2, 5.00 μm; *length* 250 mm, *Vydac, Grace*) oder C18 (Lot No. E100621-2-1, Part No. 218TP52, 5 μm; *length* 250 mm, *Vydac, Grace*) *reversed phase* Säule bei 35°C und einer Flussrate von 0.3 mL/min wurden die Peptidlösungen getrennt und mit nachfolgender ESI *micro-TOFQ III* der Firma *Bruker Daltonics* analysiert. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus den Lösungsmittelkomponenten A (90 % dd Wasser, 10 % Acetonitril, 0.1 % TFA) und B (10 % dd Wasser, 90 % Acetonitril, 0.1 % TFA) verwendet. Der verwendete Gradient war wie folgt:

Tabelle 13: Gradient der säulenchromatographischen Aufreinigung der LC/MS Analyse.

C4-Säule		C18-Säule	
min	% B	min	% B
0	50	0	5
2	50	3	5
20	100	24	95
26	100	26	95
28	50	28	5
30	50	30	5

Optische Spektroskopie

Die Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in 1.0 mL fassenden Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Temperatur von 20 °C aufgenommen.

Für anaerobe Messungen wurden vom Arbeitskreis eigens entwickelte (YANNIC FRITZ) und angefertigte (Herr VON BUDBERG, Glasbläserwerkstatt Organische Chemie, KIT) 3.0 mL fassende Quarzglasküvetten verwendet. Die jeweiligen Proben wurden mittels drei Gefrier-Tau-Pump-Zyklen unter Verwendung einer Hochvakuumpumpe entgast und unter Luftausschluss in die jeweiligen Küvetten transferiert.

UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Messungen wurden an einem *Lambda 750* UV/Vis-Spektrometer mit einem *PTP-6+6* Peltierelement der Firma *Perkin Elmer* und einem *Corio™ CD* Thermostat der Firma *Julabo* aufgenommen. Alle Spektren wurden gegen das Absorptionsspektrum der verwendeten Lösungsmittel basislinienkorrigiert. Folgende Parameter wurden dabei verwendet: SBW: 2.0 nm, Durchschnittszeit: 0.1 s, Datenintervall: 1.0, Lampenwechsel 319.2 nm und 20 °C.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-4* der Firma *Jobin Yvon – HORIBA* mit einem *Haake AC200* Thermostat der Firma *Thermo Scientific* durchgeführt. Die Software *FluorEssence v3.5* diente zur Aufnahme der Spektren, welche gegen die Ramanstreuung des jeweilig verwendeten Lösungsmittels basislinienkorrigiert wurden. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Messungen mit einer Toleranz von 0.1 °C bei 20 °C aufgenommen. Zusätzlich wurden folgende Parameter verwendet: *increment*: 1.00 nm, *increment time*: 0.2 s, *integration time*: 0.10 s.

Quantenausbeuten

Fluoreszenzquantenausbeuten wurden an einem *Quantaaurus QY C11347* der Firma *Hamamatsu* in 5 mL fassenden Quarzglasküvetten durchgeführt.

Vesikel Präparation

Alle spektroskopischen Vesikel-Messungen wurden durch Co-Solubilisierung des Lipidsystems (POPC oder POPC:POPG 25%) und der jeweiligen EGFR-Peptidmutante in einer CHCl₃/MeOH (1:1) Mischung präpariert. Das Peptid zu Lipidverhältnis betrug dabei, wenn nicht anders angegeben 1:50. Nach gründlichem Vortexen wurden die organischen Lösungsmittel schonend unter Stickstoffstrom entfernt und die jeweiligen Proben für mindestens 3 h unter

vermindertem Druck getrocknet. Anschließend wurde der Lipid-/Peptidfilm in 250 μL PBS Puffer (pH 7.2) aufgenommen, um eine jeweilige Peptidkonzentration von 0.2 mM pro Probe zu erzielen. Zur Homogenisierung und Generierung multilamellarer Vesikel wurden 10 Gefrier-Tau-Zyklen durchgeführt. Unilamellare Vesikel wurden unter Zuhilfenahme eines Extruders (Mini-Extruder, *Avanti Polar Lipids, Inc.*) mittels einer 0.1 μm Polycarbonatmembran (*Avanti Polar Lipids, Inc.*) und 10 mm Filtern (*Avanti Polar Lipids, Inc.*) geformt. Separierung der Vesikel von freiem Farbstoff fand unter Größenausschlusschromatographie statt, wobei Sephacryl (100-HR, MW range 1000 100000 Da) als Säulenmaterial diente.

CD-Messungen

Die Präparation der Circular dichroismusproben erfolgte unter Berücksichtigung der finalen Peptidkonzentration von 0.1 mg/mL und wurden an einem *J-815* Spektropolarimeter der Firma *JASCO* aufgenommen. Die Messungen wurden in einer 1 mm Quartzglasküvette (*Suprasil*) in dem Bereich von 260 bis 185 nm in 0.1 nm Intervallen aufgenommen. Die konstante Temperatur des Küvettenhalters von 25 °C wurde mittels Wasserthermostat ermöglicht. Der Durchschnitt dreier Wiederholungen pro Probe mit einer Scanrate von 10 nm/min, 8 s *response time* und 1 nm Bandbreite wurde gegen eine peptidfreie Probe basislinienkorrigiert. Daraufhin wurden die CD-Messungen verschiedenen Korrekturen unterzogen, wie der *smoothing* Methode (siehe *Jasco Spectra Analysis Software*). Abschließend wurden die Spektren auf die Anzahl der mittleren Aminosäurenreste (*mean residue ellipticity*) korrigiert (AK ULRICH, IBG II, KIT).

OCD-Messungen

Orientierte CD-Experimente wurden an einer im Arbeitskreis ULRICH etablierten OCD-Zelle durchgeführt, welche computerkontrolliert gesteuert wird und mit einem *J-810* Spektropolarimeter vernetzt ist.^[11] Orientierte Proben der EGFR-Peptidsequenzen wurden im POPC Lipidsystem mit einem molaren Peptid- zu Lipid-Verhältnis von 1:50 präpariert. Die parallele Mischung von Lipid und Peptid wurde aus $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ Stammlösungen dargestellt. Ein 70 μL Aliquot jeder Probe, welche ein Maximum von 0.1 mg Lipid enthielt, wurde auf einer Quarzglasplatte platziert (20 mm Durchmesser). Die $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ Suspension wurde schonend mittels Luftstrom getrocknet, bis die jeweiligen Lösungsmittel komplett verdampft waren. Zur kompletten Trocknung wurden die Proben zusätzliche 3 h im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Proben über Nacht (mindestens 8 h) bei 30 °C in den OCD-Probenzellen hydratisiert. Die gesättigte K_2SO_4 Salzlösung (300-500 μL) am Boden der Zelle ermöglichte einen Feuchtigkeitsgehalt von ~97 %. Die OCD Spektren wurden in verschiedenen Winkeln aufgenommen. In 45° Rotationen der Zelle wurde die Probe in acht unterschiedlichen Winkeln bei 25 °C aufgenommen. Dies ermöglichte eine Minimalisierung spektraler Artefakte.^[11] Jedes

aufgenommene Spektrum wurde gegen das Hintergrundsignal referenziert und subtrahiert, welches lediglich aus einer Probe mit dem verwendeten Peptidsystem bestand (AK ULRICH, IBG II, KIT).

Belichtungsexperimente

Sowohl aerobe als auch anaerobe Belichtungsexperimente wurden an einem, von der zentralen feinmechanischen und elektronischen Abteilung der Universität Regensburg in Kooperation mit Dr. MICHAEL WEINBERGER entwickelten, Belichtungsreaktor durchgeführt. Zur Temperaturregulation dienten zwei Peltier-Elemente. Des Weiteren konnte die Belichtung mit wechselbaren LED betrieben werden (Abstrahlwinkel circa 120°). Wie bereits in vorherigen Arbeiten diskutiert^[175], wichen die tatsächlichen Emissionsmaxima der LED teilweise von den angegebenen Emissionsmaxima der Hersteller ab und wurden von Dr. BARBARA REIS mittels eines optischen Spektrometers (*OceanOptics HR2000 Spektrometer*) ermittelt (siehe Abbildung 65). Die in dieser Arbeit verwendeten LED besaßen die nominelle Wellenlänge von 365 nm mit nur leichten Abweichungen von 3–4 nm.

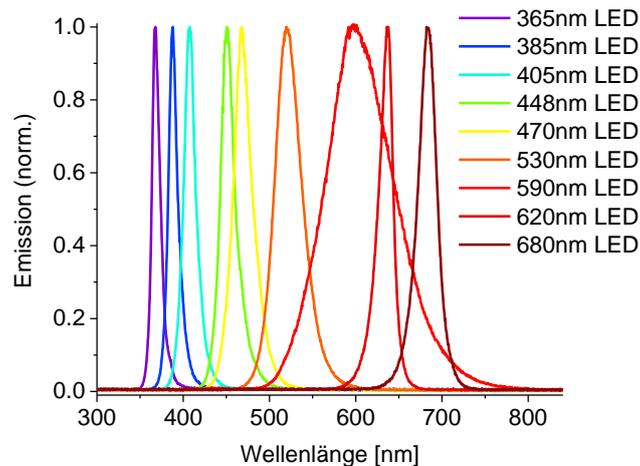


Abbildung 65: Normierte Emissionsspektren der am Belichtungsreaktor zur Verfügung stehenden LED.

Transfektion und Fluoreszenzmikroskopie

Für Zelleexperimente wurden 4×10^4 HeLa-Zellen (*Human cervix carcinoma cells*) in 8 well Slides (ibidi® μ -Slide 8 well) ausgesät. Dabei wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen mit 200 μ L *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM, high glucose, gibco) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS, PAA) und 1 U/mL Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Feuchtigkeit inkubiert.

Anschließend wurden 50 μL der jeweiligen Vesikellösungen (Vesikelpräparation siehe oben) pro well zugegeben und die Zellen für 16 h inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS Puffer wurden die Zellen mit dem Membranfarbstoff ConA (CF633TM-ConA (Concanavalin A) Konjugat, Biotium) mit einer finalen Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für 30 min inkubiert und anschließend wieder dreimal mit PBS Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mittels Konfokalmikroskopie visualisiert (*Leica TCS SPE (DMI4000)* mit einem *ACS APO 40x/1.15 OIL* Objektiv). Dabei wurden die Proben mittels Laseranregung bei 405 nm angeregt und die Emission im Bereich von 486–513 nm aufgenommen. Um den Membranbereich deutlich zu machen, wurde ConA bei 635 nm angeregt und die Emission im Bereich von 643–675 nm aufgenommen. Veranschaulicht wurden die Aufnahmen mit einer lateralen Auflösung von 2048x2048 Pixeln und 8 Bit Farbtiefe mittels des Programms *LAS X* der Firma *Leica*.

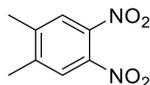
Die Zellvorbereitung und Mikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. FRANZISKA RÖNICKE am Institut für Toxikologie und Genetik, KIT durchgeführt

Fluoreszenzlebensdauermessung

Die Fluoreszenzlebensdauern wurden mittels zeitlich korrelierter Einzelphotonenmessung an einem Fluoromax-4 (siehe Fluoreszenzmessungen) mit *DeltaTime-NL* Timing module und *NL-C2* gepulster Diodensteuerung der Firma *HORIBA-Scientific* gemessen. Eine 456 nm LED diente als Anregungslichtquelle. Es wurde eine Wiederholungsrate von 1 MHz genutzt. Zur Detektion der zu messenden Emission und Verstärkung des Signals wird ein *Hamamatsu R928P* Photomultiplier verwendet. Als Detektionswellenlänge wurde das Maximum der Emission (520 nm) gewählt. Als Referenzlösung zur Messung des Streulichts wurde eine *LUDOX* (SiO_2 kolloidal in H_2O , 30 Gew. %) Lösung verwendet. Das Maß der Menge an Licht, welche den Photodetektor erreicht (α -Wert), wurde auf 1.9 % gehalten. Die erhaltenen Daten wurden mit einer *DAS6 v 6.8* Software der Firma *HORIBA-Scientific* unter biexponentieller Anpassungsfunktion ausgewertet.

2. Synthesevorschriften Flavin-Projekt

4,5-Dimethyl-1,2-Dinitrobenzol (**7**)



$C_8H_8N_2O_4$
Exakte Masse: 196,05

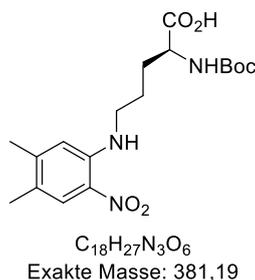
7 wurde nach Literaturvorschrift in ähnlichen Ausbeuten synthetisiert.^[117]

Es wurden 5.00 g 4,5-Dimethyl-2-nitroanilin (0.030 mol, 1.00 Äq.) in 100 mL Essigsäure (96 %) suspendiert und 23 mL H_2O_2 (0.078 mol, 8.60 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion auf ~ 50 °C erhitzt und für 16 h bei selbiger Temperatur gerührt. Beendet wurde die Reaktion durch tropfenweise Zugabe der Reaktionsmischung auf ein Wasser/Eis-Gemisch (400 mL). Der ausgefallene orange Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. **7** wurde mit einer Ausbeute von 64 % (3.78 g, 0.019 mol) erhalten.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^[117]

DC (Hexan, 9 % Essigester): $R_f = 0.29$.

(S)-2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-5-((4,5-dimethyl-2-nitrophenyl)amino)pentansäure (**8**)



Produkt **8** wurde angelehnt an bereits veröffentlichte Literatur synthetisiert.^[116]

1.00 g **7** (0.005 mol, 1.00 Äq.) und 2.01 g Boc-L-Ornithin-OH (0.0087 mol, 1.70 Äq.) wurden in 100 mL Pyridin gelöst und für 3 Tage unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (CHCl₃-MeOH 6 % + Essigsäure 1%). Es konnten 0.39 g **8** (0.001 mol, 20 %) als dunkelbraunes Öl erhalten werden.

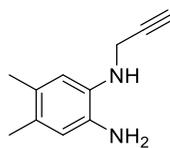
DC (DCM, 9 % MeOH): $R_f = 0.43$.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, Boc-H); 1.65 (m, 2H, CH₂); 1.90 (m, 2H, CH₂); 2.12 (s, 3H, Me); 2.24 (s, 3H, Me); 3.32 (m, 2H, CH₂); 3.80 (m, 1H, α -CH); 6.84 (m, 2H, aryl-H, NHCO); 7.80 (s, 1H, aryl-H); 8.03 (m, 1H, NH).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 18.1 (CH₃); 20.2 (CH₃); 21.3 (CH₂); 28.3 (CH₂); 41.1 (CH₂); 114.6 (aryl-C); 124.0 (quart-C); 125.4 (aryl-C); 128.7 (quart-C); 143.9 (quart-C); 147.6 (quart-C); 155.4 (quart-C); 155.5 (quart-C); 170.1 (quart-C).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für C₁₈H₂₈N₃O₆ [M+H⁺]: 382.1978; gefunden [M+H⁺]: 382.1980.

1,2-Diamin-4,5-dimethyl-N¹-(prop-2-ynyl)-benzol(**10**)



C₁₁H₁₄N₂
Exakte Masse: 174,12

10 wurde mit leichter Abwandlung der Literaturvorschrift synthetisiert^[176].

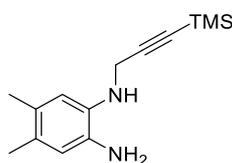
2.50 g 4,5-Dimethylbenzol-1,2-diamin **9** (0.018 mol, 1.00 Äq.) und 2.79 g K₂CO₃ (0.018 mol, 1.10 Äq.) wurden in circa 100 mL Tetrahydrofuran vorgelegt. Anschließend wurden 1.97 mL 3-Brompropin (0.018 mol, 1.00 Äq.) langsam zur Reaktionsmischung zugetropft. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurden 100 mL gesättigte NaCl-Lösung zugegeben und die wässrige Phase anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert (3x100 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Hexan-Essigester 17–33 %). **10** wurde als rotbraunes Öl mit einer Ausbeute von 44 % (1.41 g, 0.008 mol) isoliert.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^[118]

DC (Hexan, 16 % Essigester): R_f = 0.22.

HRMS-FAB (m/z): berechnet für C₁₁H₁₄N₂ [M⁺]: 174.1157; gefunden [M⁺]: 174.1158.

1,2-Diamine-4,5-dimethyl-N¹-(3-(trimethylsilyl)prop-2-ynyl)benzol (**12**)



C₁₄H₂₂N₂Si
Exakte Masse: 246,16

12 wurde mit leichter Abwandlung der Literaturvorschrift synthetisiert^[176].

1.00 g 4,5-Dimethylbenzol-1,2-diamin **9** (0.007 mol, 1.00 Äq.) und 1.12 g K₂CO₃ (0.008 mol, 1.10 Äq.) wurden in circa 100 mL Tetrahydrofuran vorgelegt. Anschließend wurden 1.06 mL 3-Brom-1-(Trimethylsilyl)-1-propin (0.007 mol, 1.00 Äq.) langsam zur Reaktionsmischung zugetropft. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurden 100 mL gesättigte NaCl-Lösung zugegeben und die wässrige Phase anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert (3x100 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Hexan-Essigester 17–33 %). **12** wurde als rotbraunes Öl mit einer Ausbeute von 43 % (0.77 g, 0.003 mol) isoliert.

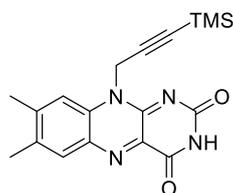
DC (Hexan, 13 % Essigester): R_f = 0.28.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.17 (s, 9H, Si-(CH₃)₃); 2.14 (s, 3H, -CH₃); 2.18 (s, 3H, -CH₃); 3.18 (bs, 2H, NH₂); 3.88 (s, 2H, -CH₂-); 6.54 (s, 1H, aryl-H); 6.56 (s, 1H, aryl-H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.1 (Si-CH₃); 19.1 (-CH₃); 19.3 (-CH₃); 35.9 (-CH₂-); 88.4 (CH₂-C≡); 103.7 (≡C-Si); 116.1 (aryl-C); 118.4 (aryl-C); 127.9 (CH₃-C); 128.1 (CH₃-C); 133.4 (C-N); 134.2 (C-N).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für C₁₄H₂₂N₂²⁸Si₁ [M⁺]: 246.1552; gefunden [M⁺]: 246.1554.

7,8-Dimethyl-10-(3-(trimethylsilyl)prop-2-ynyl)isoalloxazin (**13**)



$C_{18}H_{20}N_4O_2Si$
Exakte Masse: 352,14

0.77 g **12** (0.003 mol, 1.00 Äq.), 1.39 g Alloxanmonohydrat (0.0078 mol, 2.50 Äq.) und 0.43 g Bortrioxid (0.006 mol, 2.00 Äq.) wurden in 20 mL Essigsäure (96 %) vereint. Anschließend wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen der Mischung wurden 50 mL Wasser beigefügt und mit DCM (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Mittels Säulenchromatographie (DCM-MeOH 2.5 %) wurde das Rohprodukt gereinigt und **13** mit einer Ausbeute von 60 % (0.66 g, 0.0018 mol) als gelber Feststoff erhalten.

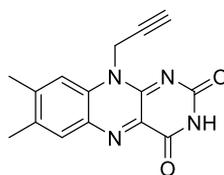
RP-DC (Wasser, 66 % Acetonitril): $R_f = 0.5$.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 0.11 (s, 9H, $-Si(CH_3)_3$); 2.41 (s, 3H, CH_3); 5.51 (s, 2H, $-CH_2-$); 7.76 (s, 1H, aryl-H); 7.92 (s, 1H, aryl-H); 11.36 (s, 1H, NH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 0.4 (Si- CH_3); 18.8 (CH_3); 20.7 (CH_3); 34.6 ($-CH_2-$); 90.1 (quart C, $CH_2-C\equiv$); 98.9 ($\equiv C-Si$); 116.5 (aryl-C); 129.8 (quart-C); 131.1 (aryl-C); 133.5 (CH_3); 136.0 (quart. C); 137.7 (quart. C); 146.2 (quart. C); 149.6 (quart C.); 155.5 (quart. C); 159.7 (quart. C).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für $C_{18}H_{21}N_4O_2^{32}S_1$ $[M+H]^+$: 353.1434; gefunden $[M+H]^+$: 353.1435.

7,8-Dimethyl-10-(prop-2-ynyl)isoalloxazin (**11**)



$C_{15}H_{12}N_4O_2$
Exakte Masse: 280,10

1.41 g **10** (0.0081 mol, 1.00 Äq.), 1.62 g Alloxanmonohydrat (0.010 mol, 1.25 Äq.) und 1.13 g Bortrioxid (0.016 mol, 2.00 Äq.) wurden in 50 mL Essigsäure vereint und über Nacht bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen der Lösung wurde das ausgefallene Produkt abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen. Produkt **11** wurde mit 79 % Ausbeute (1.79 g, 0.006 mol) als gelber fluoreszenter Feststoff erhalten.

RP-DC (Wasser, 33 % Acetonitril): $R_f = 0.14$.

Basierend auf der schlechten Löslichkeit der Verbindung **11** in den zur Verfügung stehenden deuterierten Lösungsmitteln, konnte kein aussagekräftiges NMR-Spektrum aufgenommen werden.

HRMS-EI (m/z): berechnet für $C_{15}H_{12}N_4O_2$ [M^+]: 280.0960; gefunden [M^+]: 280.0962.

Methyl (S)-3-azido-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanat (**16**)



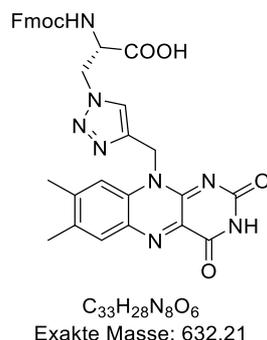
Produkt **16** wurde gemäß der Literatur synthetisiert.^[120]

In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 6.00 g Boc-L-Serin-OMe (0.027 mol, 1.00 Äq.) und 5.69 mL Triethylamin (0.041 mol, 1.50 Äq.) in 200 mL trockenem DCM unter Argon gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Bedarf und Löslichkeit wurde die Lösungsmittelmenge angepasst. Anschließend wurden 3.18 mL Methansulfonylchlorid (0.041 mol, 1.50 Äq.) zugetropft und für 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mL gesättigter NaCl-Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 x 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Beim Entfernen der organischen Lösungsmittel unter vermindertem Druck wurde die Raumtemperatur (~20 °C) nicht überschritten um Nebenprodukte zu vermeiden. Das erhaltene farblose bis leicht gelbe Öl wurde ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt. Dafür wurde das Rohprodukt in 100 mL trockenem DMF vorgelegt und 2.67 g NaN₃ (0.04 mol, 1.50 Äq.) unter Rühren zugegeben. Nun wurde die Reaktionsmischung für 45 min auf 50 °C erwärmt. Zur Beendigung der Reaktion wurden 150 mL kaltes Wasser zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (3 x 100 mL) extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde **16** säulenchromatographisch (Hexan-Essigester 17 %) aufgereinigt und mit einer Ausbeute von 20 % (1.40 g, 0.0057 mol) als farbloser Feststoff erhalten.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^[120]

DC (Hexan, 17 % Essigester): R_f = 0.32.

(S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4-(7,8-dimethyl-10-methyl-isoalloxazin)-1,2,3-triazol-1-yl)propansäure (**1**)



Zu einer Suspension von 0.50 g **11** (0.0018 mol, 1.00 Äq.) in 30 mL trockenem DMF wurden 0.106 g Natriumascorbat (0.00053 mol, 0.30 Äq.), 1.70 g TBTA (0.003 mol, 0.60 Äq.) und 0.199 g $[Cu(CH_3CN)_4]PF_6$ (0.00054 mol, 0.30 Äq.) unter Argonatmosphäre zugegeben. 0.629 g Fmoc-geschütztes β -Azido-L-Alanin (0.0018 mol, 1.00 Äq.) gelöst in 2 mL trockenem DMF wurden zur Reaktionsmischung eingetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Reaktionsmischung unter vermindertem Druck konzentriert und die rohe Reaktionsmischung mittels präparativer C18 HPLC Säulenchromatographie (Wasser-Acetonitril 30–60 %) aufgereinigt. Produkt **1** wurde als gelber, fluoreszenter Feststoff isoliert (0.78 g, 0.0012 mol, 70 %).

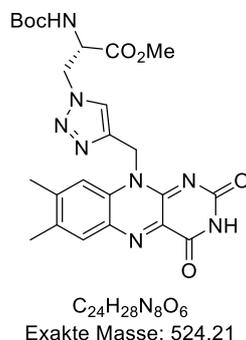
RP-DC (Wasser, 33 % Acetonitril): $R_f = 0.37$.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 2.30 (s, 3H, Flavin-Me); 2.40 (s, 3H, Flavin-Me) 4.13 (m, 3H, Fmoc-CH-CH₂); 4.49 (m, 1H, α -CH); 4.55 (m, 1H, β -CH); 4.73 (dd, 1H, $J^\beta = 4.29$ Hz, $J^2 = 13.78$ Hz, β -CH); 5.87 (s, 2H, -CH₂-N); 7.30 (m, 2H, Fmoc-H); 7.33 (m, 2H, Fmoc-H); 7.38 (m, 2H, Fmoc-H); 7.59 (d, 2H, $J^3 = 7.49$ Hz); 7.85 (m, 5H, aryl-CH, aryl-CH, CH-N, NHCO; Fmoc-H); 11.40 (bs, 1H, Fmoc-NH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 18.8 (Flavin-Me-C); 20.8 (Flavin-Me-C); 39.4 (-CH₂-); 46.1 (Fmoc-CH); 49.6 (β -C); 54.0 (α -C); 65.8 (Fmoc-CH); 116.6 (aryl-C); 120.1 (CH-N); 125.0 (Fmoc-C); 127.1 (Fmoc-C); 127.7 (Fmoc-C); 128.0 (Fmoc-C); 130.5 (aryl-C); 131.0 (quart-C); 133.7 (quart-C); 135.7 (quart-C); 135.9 (quart-C); 137.3 (quart-C); 140.6 (quart-C); 140.9 (quart-C); 143.6 (quart-C); 143.7 (quart-C); 146.4 (quart-C); 150.1 (quart-C); 155.6 (quart-C); 155.8 (quart-C); 159.9 (quart-C); 170.7 (quart-C).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für C₃₃H₂₉N₈O₆ [M+H⁺]: 633.2210; berechnet [M+H⁺]: 633.2209.

Methyl-(S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(7,8-dimethyl-10-methyl-isoalloxazin)-1,2,3-triazol-1-yl)propanat (**17**)



Es wurden 0.50 g des Flavin-Derivates **11** (0.0018 mol, 1.00 Äq.) und 0.44 g **16** (0.0018 mol, 1.00 Äq.) unter Argonatmosphäre in 20 mL trockenem DMF suspendiert. Anschließend wurden 0.34 g Cu(I)I (0.0018 mol, 1.00 Äq.) und 0.93 mL DIPEA (0.005 mol, 3.00 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittel Säulenchromatographie (Wasser-Acetonitril 20–60 %) gereinigt. **17** wurde mit einer Ausbeute von 35 % (0.34 g, 0.00065 mol) als oranger Feststoff erhalten.

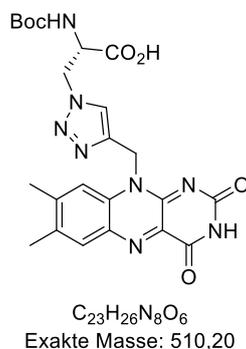
RP-DC (Wasser, 33 % Acetonitril): $R_f = 0.18$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.25 (s, 9H, Boc-H); 2.38 (s, 3H, Flavin-Me); 3.58 (s, 3H, -OMe); 3.76 (m, 1H, α -CH); 4.39 (m, 1H, β -CH); 4.67 (m, 1H, β -CH); 5.86 (m, 2H, -CH₂-N); 7.41 (m, 1H, NHCO); 7.90 (m, 3H, aryl-CH, CH-N, aryl-CH); 11.40 (bs, 1H, Fmoc-NH).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 18.4 (Flavin-Me-C); 20.4 (Flavin-Me-C); 27.6 (Boc-C); 39.3 (-CH₂-); 51.6 (β -C); 51.8 (OMe); 55.2 (α -C); 116.0 (aryl-C), 124.3 (CH-N); 130.4 (aryl-C); 128.3 (quart-C); 130.9 (quart-C); 133.7 (quart-C); 135.9 (quart-C); 137.3 (quart-C); 140.0 (quart-C); 146.4 (quart-C); 150.2 (quart-C); 154.7 (quart-C); 155.6 (quart-C); 160.2 (quart-C); 169.8 (quart-C).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für C₂₄H₂₉N₈O₆ [M+H⁺]: 525.2210; gefunden [M+H⁺]: 525.2208.

(S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(7,8-dimethyl-10-methyl-isoalloxazin)-1,2,3-triazol-1-yl)propansäure (**18**)



Zur Generierung von **18** wurden 0.34 g methoxygeschützte Flavinaminosäure **17** (0.00065 mol, 1.00 Äq.) in 5 mL Ethanol aufgenommen. Daraufhin wurde die entstandene Suspension unter Rühren bei Raumtemperatur mit 1 M NaOH Lösung im Überschuss versetzt. Anschließend wurde die rohe Reaktionsmischung direkt auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (Wasser-Acetonitril 10–50 %). Nach Trocknen konnten 0.32 g **18** (0.00063 mol, 97 %) als gelber Feststoff isoliert werden.

RP-DC (Wasser, 33 % Acetonitril): $R_f = 0.5$.

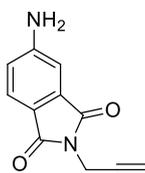
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.24 (s, 9H, Boc-H); 2.38 (s, 3H, Flavin-Me); 2.48 (s, 3H, Flavin-Me), 3.81 (m, 1H, α -CH); 4.39 (dd, 1H, $J^3 = 6.07$ Hz, $J^2 = 13.29$ Hz, β -CH); 4.69 (dd, 1H, $J^3 = 3.74$ Hz, $J^2 = 13.43$ Hz, β -CH); 5.90 (m, 2H, $-CH_2-N$); 7.90 (s, 2H, aryl-CH, CH-N); 7.93 (s, 1H, aryl-CH); 11.40 (bs, 1H, Fmoc-NH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 18.8 (Flavin-Me-C); 20.8 (Flavin-Me-C); 28.0 (Boc-C); 39.5 ($-CH_2-$); 52.0 (β -C); 55.7 (α -C); 116.8 (aryl-C), 124.6 (CH-N); 130.6 (aryl-C); 128.3 (quart-C); 130.9 (quart-C); 133.7 (quart-C); 135.9 (quart-C); 137.2 (quart-C); 140.0 (quart-C); 146.4 (quart-C); 150.2 (quart-C); 154.7 (quart-C); 155.6 (quart-C); 160.2 (quart-C); 169.8 (quart-C).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für $C_{23}H_{26}N_8O_6^{23}Na_1$ $[M+Na^+]$: 533.1873; gefunden $[M+Na^+]$: 533.1873.

3. Synthesevorschriften 4AP-Projekt

5-amino-2-(prop-2-ynyl)phthalimid (**21**)



$C_{11}H_8N_2O_2$
Exakte Masse: 200,06

Die Syntheseroute des Präparates **21** wurde von der Literatur abgeleitet.^[164]

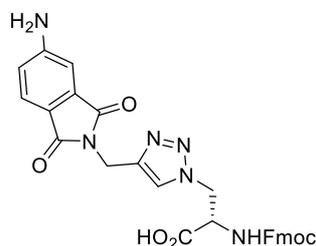
1.00 g 4-Aminophthalimid (0.0062 mol, 1.00 Äq.) wurden zu 10 mL trockenem DMF gegeben, gefolgt von 1.28 g Kaliumcarbonat (0.0092 mol, 1.50 Äq.). Nach der Zugabe von 0.88 mL 3-Brompropin (0.0062 mol, 1.00 Äq.) wurde die Reaktion für 3 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und die rohe Reaktionsmischung säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan-Ethylacetat 0–35 %). Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 76 % als gelber Feststoff erhalten (0.94 g, 0.0047 mol).

Die analytischen Daten stimmten mit den in der Literatur aufgeführten überein.^[164]

DC (Hexan, 25 % EtOAc): $R_f = 0.17$.

HRMS-EI (m/z): berechnet für $C_{11}H_8N_2O_2$ [M^+]: 200.0586; gefunden [M^+]: 200.0587.

(S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4-((5-amino-phthalimid-2-yl)methyl)-1,2,3-triazol-1-yl)propansäure (**2**)



$C_{29}H_{24}N_6O_6$
Exakte Masse: 552,18

Zu einer Suspension von 0.225 g **21** (0.00112 mol, 1.00 Äq.) in 10 mL trockenem DMF wurden 0.067 g Natriumascorbat (0.000336 mol, 0.30 Äq.), 0.357 g TBTA (0.002 mol, 0.60 Äq.) und 0.125 g $[Cu(CH_3CN)_4]PF_6$ (0.000336 mol, 0.30 Äq.) unter Argonatmosphäre zugegeben. 0.394 g Fmoc-geschütztes β -Azido-L-Alanin (0.00112 mol, 1.00 Äq.) gelöst in 2 mL trockenem DMF wurden zur Reaktionsmischung eingetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Reaktionsmischung unter vermindertem Druck konzentriert und die rohe Reaktionsmischung aufgereinigt mittels HPLC C18 Säulenchromatographie (Wasser-Acetonitril 40–100 %). Produkt **2** wurde als gelber fluoreszenter Feststoff isoliert (0.569 g, 0.001 mol, 92 %).

RP-DC (Wasser, 50 % Acetonitril): $R_f = 0.5$.

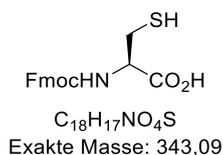
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 4.21 (m, 3H, CH_2 -CH-Fmoc); 4.48 (td, $J^3 = 4.61$ Hz, $J^3 = 8.83$ Hz, 1H, α -CH); 4.58 (m, 1H, β - CH_2); 4.72 (s, 2H, CH_2 -N); 4.74 (m, 1H, β - CH_2); 6.80 (d, 1H, $J^3 = 8.18$ Hz, CH-7); 6.95 (s, 1H, CH-4); 7.32 (m, 2H, Fmoc-H); 7.40 (t, 2H, $J^3 = 7.48$ Hz, Fmoc-H); 7.47 (d, 1H, $J^3 = 8.21$ Hz, CH-6); 7.64 (t, 2H, $J^3 = 7.98$ Hz, Fmoc-H); 7.88 (d, 3H, $J^3 = 7.62$ Hz, Fmoc-H, NH); 7.98 (s, 1H, CH-N).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 32.4 (-C- CH_2 -N); 46.5 (Fmoc- CH_2); 49.5 (β - CH_2); 54.1 (α -CH); 65.5 (Fmoc-CH- CH_2); 107.2 (CH-4); 116.7 (CH-7); 116.8 (C=C); 120.1 (Fmoc-CH); 123.8 (C=CH-N); 125.0 (CH-6); 125.2 (Fmoc-CH); 127.1 (Fmoc-CH); 127.7 (Fmoc-CH), 134.5 (C=C); 140.7 (Fmoc-C-); 142.6 (C=C-N); 143.7 (Fmoc-C); 154.9 (CO_2 N); 155.9 (C-NH $_2$); 167.4 (C=O); 167.8 (C=O); 170.7 (COOH).

Fmoc-C und Fmoc-CH ^{13}C -Signale kommen meist gemeinsam.

HRMS-FAB (m/z): berechnet für $C_{29}H_{25}N_6O_6$ $[M+H]^+$: 553.1836; gefunden $[M+H]^+$: 553.1837.

(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-L-Cystein (28**)**



1.00 g Fmoc-L-Cys(Trt)-OH (0.0017 mol, 1.00 Äq.) wurden in 50 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure (92.5 %), Triisopropylsilan (5 %) und Wasser (2.5 %) für 4 h gerührt. Nach kompletter Umsetzung wurde das Lösungsmittel entfernt und mittels C18 Säulenchromatographie (Wasser-Acetonitril 30–60 %) aufgearbeitet, um **28** in quantitativer Ausbeute als farbloser Feststoff zu erhalten (0.586 g, 0.0017 mol).

RP-DC (Wasser, 50 % Acetonitril): $R_f = 0.23$.

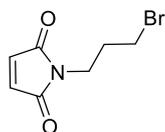
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 2.94 (dd, 1H, $J^3 = 10.20$ Hz, $J^3 = 13.62$ Hz, β - CH_2); 3.17 (dd, 1H, $J^3 = 3.97$ Hz, $J^3 = 13.67$ Hz, β - CH_2); 4.26 (m, 4H, α - CH , Fmoc- CH - CH_2 , Fmoc- CH_2); 7.31 (t, 2H, $J^4 = 7.44$ Hz, Fmoc- CH); 7.40 (td, 2H, $J^3 = 4.06$ Hz, $J^4 = 7.31$ Hz, Fmoc- CH); 7.70 (dd, 2H, $J^4 = 2.88$ Hz, $J^4 = 7.32$ Hz, Fmoc- CH); 7.78 (d, 1H, $J^3 = 8.27$ Hz, NH); 7.88 (d, 2H, $J^4 = 7.48$ Hz, Fmoc- CH); 10.21 (s, 1H, SH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 39.1 (β - CH_2); 46.6 (Fmoc- CH_2); 53.0 (α - CH); 65.8 (Fmoc- CH - CH_2); 120.1 (Fmoc- CH); 125.3 (Fmoc- CH); 127.1 (Fmoc- CH), 127.6 (Fmoc- CH), 140.7 (Fmoc- C -); 143.8 (Fmoc- C -); 156.0 (CO_2NH); 172.2 ($COOH$).

Fmoc- C und Fmoc- CH ^{13}C -Signale kommen meist gemeinsam.

HRMS-FAB (m/z): berechnet für $C_{18}H_{18}N_1O_4^{32}S_1$ $[M+H]^+$: 344.0957; gefunden $[M+H]^+$: 344.0958.

1-(3-bromopropyl)-maleimid (**23**)



$C_7H_8BrNO_2$
Exakte Masse: 216,97

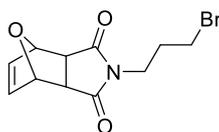
Wie bereits zuvor gezeigt, wurde **23** dargestellt.^[166] Dafür wurden 2.70 g Triphenylphosphan (0.010 mol, 1.00 Äq.) in wenigstens 30 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und mit Hilfe eines Isopropanol-Trockeneis-Gemisches auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. 2.03 mL Diisopropylazodicarboxylat (0.010 mol, 1.00 Äq.) wurden zugetropft. Die leicht gelbe Lösung wurde für weitere 10 Minuten bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Daraufhin wurden 1.58 mL 3-Brom-1-propanol (0.018 mol, 1.70 Äq.) langsam zugegeben. Nach weiteren 5 Minuten Rühren, wurde 1.00 g Maleimid (0.010 mol, 1.00 Äq.) in 2 mL Tetrahydrofuran gelöst zur Reaktionslösung zugegeben. Dem folgend wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 10 h gerührt. Die resultierende graue klare Lösung wurde unter vermindertem Druck konzentriert und die Rohmischung säulenchromatographisch getrennt (Hexan-Essigsäureethylester 17–34 %). Produkt **23** wurde als leicht gelbe Kristalle mit einer Ausbeute von 90 % (2.02 g, 0.009 mol) isoliert.

Die analytischen Daten stimmten mit denen in der Literatur aufgeführten überein.^[166]

DC (Hexan, 20 % EtOAc): $R_f = 0.37$.

HRMS-EI (m/z): berechnet für $C_7H_8N_1O_2^{79}Br_1$ [M^+]: 216.9738; gefunden [M^+]: 216.9737.

2-(3-bromopropyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-epoxyisoindole-1,3-dion (**26**)



$C_{11}H_{12}BrNO_3$
Exakte Masse: 285,00

2.02 g **23** (0.009 mol, 1.00 Äq.) wurden in 10 mL trockenem Diethylether gelöst und 3.35 mL Furan (0.046 mol, 5.00 Äq.) der Mischung zugegeben. Nach circa 3 Tagen Rühren und bestätigter vollständiger Umsetzung wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **26** wurde als farblose Kristalle mit quantitativem Umsatz (2.65 g, 0.009 mol) erhalten.

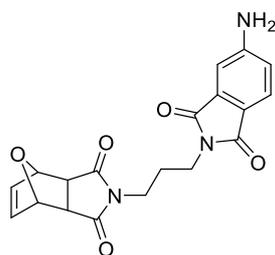
DC (Hexan, 20 % EtOAc): $R_f = 0.12$.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 1.99 (p, 2H, $J^3 = 6.86$ Hz, CH_2 -exo); 2.13 (p, 2H, $J^3 = 6.63$ Hz, CH_2 -endo); 2.84 (s, 2H, C-CH-C-endo); 3.28 (t, 2H, $J^3 = 6.77$ Hz, CH_2 -Br-exo); 3.32 (t, 2H, $J^3 = 6.76$ Hz, CH_2 -Br-endo); 3.44 (t, 2H, $J^3 = 6.87$ Hz, CH_2 -N-exo); 3.51 (d, 2H, $J^3 = 3.65$ Hz, C-CH-C-exo); 3.61 (t, 2H, $J^3 = 6.87$ Hz, CH_2 -N-endo); 5.25 (s, 2H, C-CH-O-endo); 5.31 (d, 2H, $J^3 = 2.44$ Hz, C-CH-O-exo); 6.40 (s, 2H, Aryl-H-exo); 6.50 (s, 2H, Aryl-H-endo).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 29.6 (CH_2 -Br-exo), 29.8 (CH_2 -Br-endo), 30.6 (C- CH_2 -exo), 30.7 (C- CH_2 -endo), 37.4 (-N- CH_2 -exo), 37.7 (-N- CH_2 -endo), 46.0 (-C-CH-C-exo), 47.5 (-C-CH-C-endo), 79.5 (C-CH-O-exo), 81.1 (C-CH-O-endo), 134.6 (C=C-exo), 136.6 (C=C-endo), 174.9 (C=O-exo), 176.2 (C=O-endo).

HRMS-EI (m/z): berechnet für $C_{11}H_{12}N_1O_3^{79}Br_1$ [M^+]: 285.0001; gefunden [M^+]: 285.0002.

2-(3-(5-Amino-phthalimide-2-yl)propyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-epoxyisoindole-1,3-dion (**27**)



$C_{19}H_{17}N_3O_5$
Exakte Masse: 367,12

Eine Suspension von 0.567 g 4-Aminophthalimid (0.0035 mol, 1.00 Äq.) und 1.45 g Kaliumcarbonat (0.010 mol, 3.00 Äq.) wurden in 50 mL trockenem Dimethylformamid bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt. Darauf folgte die tropfenweise Zugabe von 1.00 g **26** (0.0035 mol, 1.00 Äq.) gelöst in 5 mL trockenem Dimethylformamid. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Überprüfung erfolgreicher Umsetzung wurden 100 mL Wasser der gelben Suspension zugeben und die Mischung mit Dichlormethan (3 x 100 mL) extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgte mittels C18 Säulenchromatographie (Wasser-Acetonitril 10–30 %). Mit einer Ausbeute von 79 % (1.01 g, 0.0028 mol) wurde **27** als gelber, fluoreszenter Feststoff isoliert.

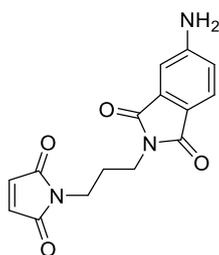
RP-DC (Wasser, 50 % Acetonitril): $R_f = 0.4$.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.61 (p, 2H, $J^3 = 7.35$ Hz, CH_2 -exo); 1.73 (p, 2H, $J^3 = 7.36$ Hz, CH_2 -endo); 2.90 (s, 2H, C-CH-C-endo); 3.21 (t, 2H, $J^3 = 7.12$ Hz, CH_2 -Br-exo); 3.34 (t, 2H, $J^3 = 6.76$ Hz, CH_2 -Br-endo); 3.39 (t, 2H, $J^3 = 6.87$ Hz, CH_2 -N-exo); 3.46 (t, 2H, $J^3 = 7.15$ Hz, CH_2 -N-endo); 3.51 (d, 2H, $J^3 = 5.08$ Hz, C-CH-C-exo); 5.11 (s, 2H, C-CH-O-endo); 5.30 (d, 2H, $J^3 = 2.84$ Hz, C-CH-O-exo); 6.48 (s, 2H, Aryl-H-exo); 6.53 (s, 4H, Aryl-H-endo; NH_2); 6.78 (dd, 1H, $J^5 = 1.72$ Hz, $J^3 = 8.20$ Hz, aryl-H-7); 6.91 (s, 1H, aryl-H-4); 7.46 (d, 1H, $J^3 = 8.20$ Hz, aryl-H-6).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 26.4 (-C- CH_2 -C); 34.7 (CH_2 -N); 35.8 (CH_2 -Br); 45.6 (-C-CH-C-exo); 47.2 (-C-CH-C-endo); 78.6 (C-CH-O-exo); 80.4 (C-CH-O-endo); 107.0 (C-4); 116.6 (C-7); 124.9 (C-6); 134.4 (C=C-exo); 134.6 (C=C); 136.5 (C=C-endo); 155.0 (C- NH_2); 167.9 (C=O); 168.2 (C=O); 176.4 (C=O).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für $C_{19}H_{18}N_3O_5$ [$M+H^+$]: 368.1246; gefunden [$M+H^+$]: 368.1244.

N-(3-(5-Amino-phthalimide-2-yl)propyl)-maleimid (24**)**



$C_{15}H_{13}N_3O_4$
Exakte Masse: 299,09

1.01 g **27** (0.00268 mol, 1.00 Äq.) wurden in 2–5 mL DMSO (so wenig wie möglich) gelöst und mit 20 mL Toluol verdünnt. Nach komplettem Lösen wurde die Reaktionsmischung auf 120 °C erhitzt und für 2 h gerührt. Nach komplettem Umsatz des Eduktes **27** (DC) wurde die Reaktionsmischung schnell auf -78 °C gekühlt. Bevor die Rohmischung säulenchromatographisch aufgereinigt wurde (DCM-Aceton 5–6 %), wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die leicht fluoreszenten, hellgelben Kristalle (**24**) wurden mit einer Ausbeute von 81 % (0.67 g, 0.0022 mol) isoliert.

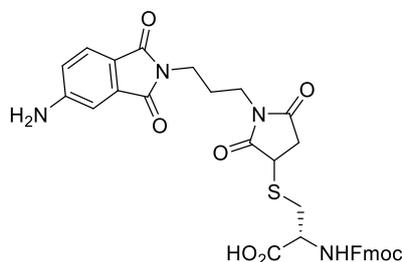
DC (DCM, 5 % Aceton): $R_f = 0.38$.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.80 (p, 2H, $J^3 = 7.31$ Hz, C- CH_2 -C); 3.39 (t, 2H, $J^3 = 7.31$ Hz, CH_2 -AMP); 3.46 (t, 2H, $J^3 = 7.18$ Hz, CH_2 -N); 6.46 (s, 2H, NH_2); 6.78 (dd, 1H, $J^5 = 1.97$ Hz, $J^3 = 8.20$ Hz, aryl- H -7); 6.90 (d, 1H, $J^5 = 1.92$ Hz, aryl- H -4); 7.00 (s, 2H, $CH=CH$); 7.46 (d, 1H, $J^3 = 8.19$ Hz, aryl- H -5).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 27.0 (-C- CH_2 -C); 34.7 (-N- CH_2 -); 35.0 (- CH_2 -Br); 107.0 (C-4); 116.5 (C-7); 124.9 (C-5); 134.4 (C=C); 134.5 (C=C); 155.0 (C- NH_2); 167.9 (C=O); 168.2 (C=O); 171.0 (C=O).

HRMS-EI (m/z): berechnet für $C_{15}H_{13}N_3O_4$ [M^+]: 299.0906; gefunden [M^+]: 299.0908.

N-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-S-(1-(3-(5-amino-phthalimid-2-yl)propyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein (3**)**



$C_{33}H_{30}N_4O_8S$
Exakte Masse: 642,18

Nach Lösen von 0.70 g **24** (0.0020 mol, 1.00 Äq.) in 50 mL trockenem DMF und Zugabe von 0.61 g **28** (0.0020 mol, 1.00 Äq.) zu der Mischung, wurde **3** dargestellt. Die Reaktionsmischung wurde dabei für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und **3** als fluoreszenter, gelber Feststoff mit quantitativer Ausbeute (1.31 g, 0.0020 mol) nach HPLC C18 Reinigung (Wasser-Acetonitril 40–100 %) erhalten.

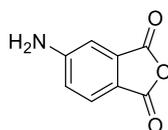
RP-DC (Wasser, 50 % Acetonitril): $R_f = 0.3$.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 1.77 (m, 2H, $-CH_2-$); 2.90 (m, 1H, $\beta-CH_2$); 3.15 (m, 2H, CH_2 -michaelad); 3.29 (m, 1H, $\beta-CH_2$); 3.36 (m, 2H, CH_2 -AMP); 3.48 (t, 2H, $J^3 = 7.11$ Hz, CH_2 -N); 4.01 (m, 1H, CH -S); 4.25 (m, 4H, Fmoc- $CH-CH_2$, Fmoc- $CH-CH_2$, $\alpha-CH$); 6.47 (s, 2H, NH_2); 6.80 (dd, 1H, $J^5 = 2.08$ Hz, $J^3 = 8.20$ Hz, aryl-H-7); 6.93 (d, 1H, $J^5 = 1.80$ Hz, aryl-H-4); 7.31 (t, 2H, $J^3 = 7.43$ Hz, Fmoc- CH); 7.40 (t, 2H, $J^3 = 7.33$ Hz, Fmoc- CH); 7.47 (dd, 1H, $J^3 = 8.19$ Hz, $J^4 = 3.39$ Hz, aryl-H-6); 7.72 (m, 2H, Fmoc- CH); 7.77 (m, 1H, CO-NH- α -C); 7.87 (d, 2H, $J^3 = 7.52$ Hz, Fmoc- CH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 26.4 (C- CH_2 -C); 32.8 ($\beta-CH_2$); 34.8 (CH_2 -N); 35.8 (CH_2 -AMP); 35.8 (CH_2 -C-S); 46.6 (Fmoc- CH); 53.6 ($\alpha-CH_2$); 65.8 (Fmoc- CH_2); 107.1 (aryl-C-4); 116.6 (aryl-C-7); 120.1 (Fmoc- CH); 121 (C=O); 124.9 (aryl-C-6); 125.3 (Fmoc- CH); 127.1 (Fmoc- CH); 127.3 (C=O); 127.7 (Fmoc- CH); 129.0 (C-quart-AMP); 134.5 (C-quart-AMP); 140.7 (Fmoc-C); 143.8 (Fmoc-C); 155.0 (C- NH_2); 168.1 (CO); 167.9 (CO).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für $C_{33}H_{31}N_4O_8^{32}S_1$ $[M+H]^+$: 643.1863; gefunden $[M+H]^+$: 643.1865.

4-Aminophthalsäureanhydrid (**39**)



$C_8H_5NO_3$
Exakte Masse: 163,03

Verbindung **39** wurde nach einer von KATJA KRELL (Arbeitsgruppe WAGENKNECHT) verbesserten Syntheseroute dargestellt. Hierfür wurden 1.50 g 4-Aminophthalsäure (0.008 mol, 1.00 Äq.) in 100 mL Aceton suspendiert, 3 Teelöffel 3 Å Molekularsieb und 3.17 g 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (0.017 mol, 2.00 Äq.) der Mischung zugegeben. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die rohe Reaktionsmischung abfiltriert und mit 100 mL Wasser verdünnt. Die Mischung wurde mit DCM (10 x 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. **39** wurde nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck mit einer Ausbeute von 80 % (1.08 g, 0.0066 mol) als gelber Feststoff erhalten.

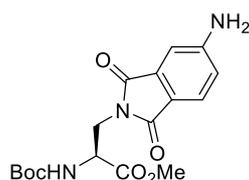
DC (DCM): $R_f = 0.78$.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 6.90 (s, 2H, $-NH_2$); 6.96 (m, 1H, Aryl-H); 6.99 (d, 2H, $J^3 = 1.79$ Hz, Aryl-H); 7.67 (d, 1H, $J^3 = 837$ Hz, Aryl-H).

^{13}C NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 107.6; 114.6; 119.4; 127.4; 134.1; 156.6; 163.0; 164.2.

HRMS-EI (m/z): berechnet für $C_8H_5N_1O_3$ [M^+]: 163.0269; gefunden [M^+]: 163.0271.

Methyl (S)-3-(5-amino-phthalimid-2-yl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanat (**29**)



$C_{17}H_{21}N_3O_6$
Exakte Masse: 363,14

Die erste Stufe dieser Synthese wurde gemäß der Literatur synthetisiert.^[120] In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 0.50 g Boc-L-Serin-OMe (0.0023 mol, 1.00 Äq.) und 0.47 mL Triethylamin (0.0034 mol, 1.50 Äq.) in 50 mL trockenem DCM unter Argon gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Bedarf und Löslichkeit wurde die Lösungsmittelmenge angepasst. Anschließend wurden 0.26 mL Methansulfonylchlorid (0.0034 mol, 1.50 Äq.) zugetropft und für 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Reaktion beendet und mit 50 mL gesättigter NaCl-Lösung verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Beim Entfernen der organischen Lösungsmittel unter vermindertem Druck wurde die Raumtemperatur (~20 °C) nicht überschritten um Nebenprodukte zu vermeiden. Das erhaltene farblose bis leicht gelbe Öl wurde ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Es wurden unter Argon 0.55 g 4AP (0.0034 mol, 1.50 Äq.) und 0.95 g K_2CO_3 (0.0068 mol, 3.00 Äq.) in trockenem DMF gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das im ersten Syntheseschritt erhaltene Öl in circa 2 mL trockenem DMF gelöst und zugetropft. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Rohmischung unter reduziertem Druck konzentriert und das Rohprodukt mittels *reversed phase* C18 Säulenchromatographie (Wasser-Acetonitril (15–50%)) getrennt. **29** wurde mit einer Ausbeute von 28 % (0.23 g, 0.00063 mol) als hellgelber Feststoff erhalten.

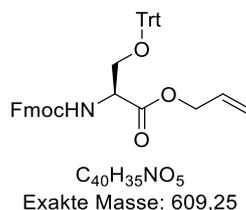
RP-DC (Wasser, 66 % Acetonitril): $R_f = 0.1$.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 1.30 (s, 9H, Boc-H); 3.57 (s, 3H, OMe); 3.80 (m, 2H, β - CH_2); 4.25 (m, 2H, α -H); 6.47 (s, 2H, NH_2); 6.78 (dd, 1H, $J^5 = 1.96$ Hz, $J^3 = 8.21$ Hz, C7-H); 6.91 (d, $J^5 = 1.88$ Hz, 1H, C4-H); 7.31 (d, $J^3 = 8.34$ Hz, 1H, NH); 7.48 (d, $J^3 = 8.19$ Hz, 1H, C5-H).

^{13}C NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 29.9 (C-Boc); 38.4 (C-OMe); 38.4 (β - CH_2); 52.2 (α -C); 78.6 (C-quart.); 107.0 (aryl-C-4); 116.6 (aryl-C-7); 125.0 (aryl-C-6); 134.4 (C-quart.); 154.0 (C-quart.); 155.2 (C-quart.); 167.7 (C-quart.); 168.1 (C-quart.); 170.7 (C-quart.).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für $C_{17}H_{22}N_3O_6$ $[M^++H^+]$: 364.1509; gefunden $[M^++H^+]$: 364.1508.

Allyl N-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-O-trityl-L-serinat (**31**)



Die Synthese der Verbindung **31** folgte gemäß der Syntheseroute von IMPERIALI *et al.*^[159] Dafür wurden 2.00 g Fmoc-L-Ser(Trt)-OH (0.0035 mol, 1.00 Äq.) und 1.14 g Cäsiumcarbonat (0.0035 mol, 1.00 Äq.) in 100 mL MeOH gelöst und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde die rohe Reaktionsmischung wiederum in 30 mL trockenem DMF aufgenommen und 0.96 mL Allylbromid (0.011 mol, 3.15 Äq.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurden 100 mL 2 %ige wässrige NaHCO₃-Lösung der Reaktionsmischung zugegeben und die Mischung mit Essigester (3 x 100 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde mittels C18 Säulenchromatographie gereinigt (Wasser-Acetonitril 20–70 %). **31** wurde als farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 96 % (2.05 g, 0.0033 mol) erhalten.

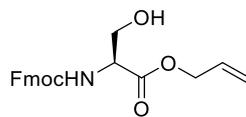
RP-DC (Wasser, 66 % Acetonitril): R_f = 0.1.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3.30 (d, J³ = 6.38 Hz, 2H, β-CH₂); 4.27 (m, 1H, Fmoc-H); 4.41 (m, 3H, Fmoc-CH₂, α-CH); 4.59 (d, J³ = 5.30 Hz, 2H, CH₂-allyl); 5.18 (d, J² = 10.51 Hz, 1H, CH₂-allyl); 5.28 (dd, J² = 17.26 Hz, 1H, CH₂-allyl); 5.86 (m, 1H, CH-allyl); 7.33 (m, 19H, Fmoc-H, Fmoc-H, Trityl-H); 7.75 (m, 2H, Fmoc-H); 7.89 (d, J³ = 7.56 Hz, 2H, Fmoc-H); 8.05 (d, J³ = 8.18 Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 46.6 (Fmoc-CH-CH₂); 56.3 (α-CH); 63.0 (β-CH₂); 65.1 (CH₂-allyl); 66.0 (Fmoc-CH₂); 117.9 (CH₂=allyl); 120.1 (Fmoc-CH); 125.3 (Fmoc-CH); 127.1 (Fmoc-CH); 127.7 (Fmoc-CH); 127.9 (Trityl-C); 128.3 (Trityl-C); 132.1 (CH=allyl); 140.7 (Fmoc-C); 143.4 (Fmoc-C); 156.0 (CO₂N); 170.1 (CO₂-α-CH).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für C₄₀H₃₅N₁₀O₅²³Na⁺ [M+Na⁺]: 632.2413; gefunden [M+Na⁺]: 632.2415.

Allyl (((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-L-serinat (**32**)



$C_{21}H_{21}NO_5$
Exakte Masse: 367,14

2.05 g **31** (0.0033 mol, 1.00 Äq.) wurden in 50 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure (92.5 %), Triisopropylsilan (5 %) und Wasser (2.5 %) gelöst und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde die Rohmischung mittels C18 Säulenchromatographie (Wasser-Acetonitril 50–85 %) gereinigt. Dabei wurde **32** mit einer Ausbeute von 1.24 g (0.0033 mol, quant.) als farbloser Feststoff erhalten.

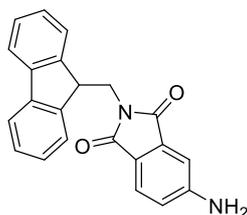
RP-DC (Acetonitril, 33 % Wasser): $R_f = 0.22$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 3.69 (d, $J^3 = 5.28$ Hz, 2H, β - CH_2); 4.17 (m, 1H, α -CH); 4.23 (m, 1H, Fmoc-H); 4.30 (m, 2H, Fmoc- CH_2); 4.59 (d, $J^3 = 5.11$ Hz, 2H, CH_2 -allyl); 5.19 (dd, $J^2 = 10.57$ Hz, $J^3 = 1.51$ Hz, 1H, CH_2 -allyl); 5.32 (dd, $J^2 = 17.26$ Hz, $J^3 = 1.66$ Hz, 1H, CH_2 -allyl); 5.88 (m, 1H, CH-allyl); 7.32 (m, 2H, Fmoc-H); 7.41 (m, 2H, Fmoc-H); 7.62 (d, $J^3 = 8.02$ Hz, 1H, NH); 7.72 (m, 2H, Fmoc-H); 7.89 (d, $J^3 = 7.52$ Hz, 2H, Fmoc-H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 46.6 (Fmoc-CH- CH_2); 56.8 (α -CH); 61.3 (β - CH_2); 64.8 (CH_2 -allyl); 65.8 (Fmoc- CH_2); 117.5 (CH_2 =allyl); 120.2 (Fmoc-CH); 125.2 (Fmoc-CH); 127.1 (Fmoc-CH); 127.8 (Fmoc-CH); 132.4 (CH=allyl); 140.8 (Fmoc-C); 143.8 (Fmoc-C); 156.1 (CO_2N); 170.5 (CO_2 - α -CH).

HRMS-EI (m/z): berechnet für $C_{21}H_{21}N_1O_5$ [M^+]: 367.1420; gefunden [M^+]: 367.1420.

2-((9H-fluoren-9-yl)methyl)isoindol-1,3-dion (**33**)



$C_{22}H_{16}N_2O_2$
Exakte Masse: 340,12

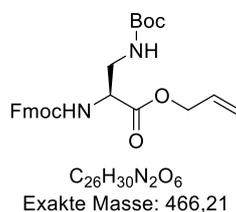
33 wurde als Nebenprodukt in der in Abbildung 51 dargestellten Syntheseroute erhalten.

RP-DC (Acetonitril, 33 % Wasser): $R_f = 0.1$.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 3.81 (d, $J^3 = 7.71$ Hz, 2H, Fmoc- CH_2); 4.41 (t, $J^3 = 7.74$ Hz, 1H, Fmoc- CH); 6.54 (s, 2H, NH_2); 6.84 (dd, $J^3 = 8.25$ Hz, $J^5 = 1.89$ Hz, 1H, AMP-aryl- H); 6.96 (d, $J^5 = 1.82$ Hz, AMP-aryl- H); 7.27 (t, $J^3 = 7.39$ Hz, 2H, Fmoc- CH); 7.39 (t, $J^3 = 5.97$ Hz, 4H, Fmoc- CH , Fmoc- CH); 7.55 (d, $J^3 = 8.19$ Hz, 1H, AMP-aryl- H); 7.89 (d, $J^3 = 8.16$ Hz, 2H, Fmoc- CH).

HRMS-EI (m/z): berechnet für $C_{22}H_{16}N_2O_2$ [M^+]: 340.1212; gefunden [M^+]: 340.1210.

Allyl (S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanat (**35**)



Die Synthese der Verbindung **35** folgte weitestgehend der Syntheseroute von IMPERIALI *et al.*^[159] Dafür wurden 1.50 g Fmoc-L-Dap(Boc)-OH (0.0035 mol, 1.00 Äq.) und 1.15 g Cäsiumcarbonat (0.0035 mol, 1.00 Äq.) in 20 mL MeOH gelöst und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde die rohe Reaktionsmischung wiederum in 30 mL trockenem DMF aufgenommen und 0.96 mL Allylbromid (0.011 mol, 3.15 Äq.) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurden 200 mL 2 %ige wässrige NaHCO₃-Lösung der Reaktionsmischung zugegeben und die Mischung mit 150 mL Essigester (3 x 150 mL) extrahiert. Das Rohprodukt wurde mittels C18 Säulenchromatographie gereinigt (Wasser-Acetonitril 50–75 %). **35** wurde als farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 95 % (1.55 g, 0.0035 mol) erhalten.

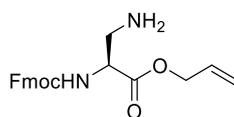
RP-DC (Wasser, 33 % Acetonitril): $R_f = 0.15$.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 1.36 (s, 9H, -C-CH₃); 3.32 (m, 2H, β -CH₂); 4.20 (m, 2H, α -CH-, Fmoc-CH-CH₂); 4.32 (m, 2H, Fmoc-CH₂); 4.55 (s, 2H, O-CH₂-CH); 5.19 (d, 1H, $J^3 = 10.43$ Hz, allyl-CH₂); 5.31 (d, 1H, $J^3 = 17.25$ Hz, allyl-CH₂); 5.88 (m, 1H, allyl-CH), 6.90 (s, 1H, Boc-NH), 7.33 (t, 2H, $J^3 = 6.91$ Hz, Fmoc-CH); 7.42 (t, 2H, $J^3 = 6.66$ Hz, Fmoc-CH); 7.66 (d, 1H, $J^3 = 7.58$ Hz, CO-NH- α -C); 7.70 (s, 2H, Fmoc-CH), 7.89 (d, 2H, $J^3 = 6.68$ Hz, Fmoc-CH).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 28.1 (C-CH₃); 41.0 (β -CH₂); 46.6 (Fmoc-CH-CH₂); 54.2 (α -CH); 65.0 (CH₂-allyl); 65.8 (Fmoc-CH₂); 78.1 (C-Boc); 117.6 (CH₂=allyl); 120.1 (Fmoc-CH); 125.2 (Fmoc-CH); 127.1 (Fmoc-CH); 127.6 (Fmoc-CH); 132.4 (CH=allyl); 140.7 (Fmoc-C); 143.7 (Fmoc-C); 155.5 (CO₂N); 155.9 (CO₂N); 170.4 (CO₂- α -CH).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für C₂₆H₃₁N₂O₆ [M+H⁺]: 467.2182; gefunden [M+H⁺]: 467.2183.

Allyl (S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-aminopropanat (**36**)



$C_{21}H_{22}N_2O_4$
Exakte Masse: 366,16

1.55 g **35** (0.0035 mol, 1.00 Äq.) wurden in 50 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure (92.5 %), Triisopropylsilan (5 %) und Wasser (2.5 %) gelöst und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde die Rohmischung mittels C18 Säulenchromatographie (Wasser-Acetonitril 30 %) gereinigt. Dabei wurde **36** mit einer Ausbeute von 1.29 g (0.0035 mol, 100 %) als farbloser Feststoff erhalten.

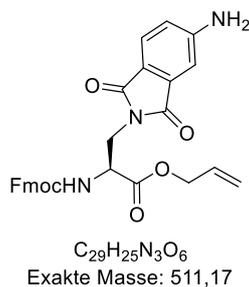
RP-DC (Acetonitril, 33 % Wasser): $R_f = 0.26$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 3.09 (dd, 1H, $J^2 = 13.00$ Hz, $J^3 = 9.53$ Hz, β - CH_2); 3.27 (dd, 1H, $J^2 = 13.00$ Hz, $J^3 = 4.61$ Hz, β - CH_2); 4.25 (t, 1H, $J^3 = 6.65$ Hz, Fmoc- $\text{CH}-\text{CH}_2$); 4.35 (m, 1H, Fmoc- CH_2); 4.41 (m, 2H, Fmoc- CH_2 , α - CH); 4.62 (m, 2H, O- CH_2 -CH); 5.21 (dd, 1H, $J^3 = 10.56$ Hz, $J^2 = 1.45$ Hz, allyl- CH_2); 5.31 (dd, 1H, $J^3 = 17.26$ Hz, $J^2 = 1.64$ Hz, allyl- CH_2); 5.89 (m, 1H, allyl- CH); 7.34 (t, 2H, $J^3 = 7.44$ Hz, Fmoc- CH); 7.43 (t, 2H, $J^3 = 7.44$ Hz, Fmoc- CH); 7.71 (d, 2H, $J^3 = 7.46$ Hz, Fmoc- CH); 7.90 (d, 2H, $J^3 = 7.50$ Hz, Fmoc- CH); 7.92 (m, 1H, CO- $\text{NH}-\alpha$ -C); 8.05 (bs, 2H, NH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 39.1 (β - CH_2); 46.5 (Fmoc- $\text{CH}-\text{CH}_2$); 51.9 (α - CH); 65.6 (CH_2 -allyl); 66.0 (Fmoc- CH_2); 118.0 (CH_2 =allyl); 120.2 (Fmoc- CH); 125.2 (Fmoc- CH); 127.1 (Fmoc- CH); 127.7 (Fmoc- CH); 132.0 (CH =allyl); 140.8 (Fmoc-C); 143.7 (Fmoc-C); 156.2 (CO_2N); 169.0 (CO_2 - α - CH).

HRMS-EI (m/z): berechnet für $C_{21}H_{22}N_2O_4$ [M^+]: 366.1580; gefunden [M^+]: 366.1581.

Allyl (S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(5-amino-phthalimid-2-yl)propanat
(**37**)



Die Kopplung von **36** und **39** wurde, angelehnt an die von IMPERIALI *et al.*^[159] dargestellte Synthesestrategie, durchgeführt. Hierfür wurden 1.29 g **36** (0.0035 mol, 1.00 Äq.) in 30 mL DMF gelöst und 1.80 mL DIPEA (0.011 mol, 3.00 Äq.) wurden tropfenweise zugegeben. Nach Zugabe von 0.69 g **39** (0.0042 mol, 1.20 Äq.) wurde die Reaktion für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Für die Bildung der Verbindung **37** wurden 0.57 g HOBt (0.0042 mol, 1.20 Äq.) und 1.60 g HBTU (0.0042 mol, 1.20 Äq.) der Mischung zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck, wurde die Rohmischung mittels C18 Säulenchromatographie gereinigt (Wasser-Acetonitril 0–100 %). Mit einer Ausbeute von 71 % (1.28 g, 0.0025 mol) wurde **37** als gelber, fluoreszenter Feststoff erhalten.

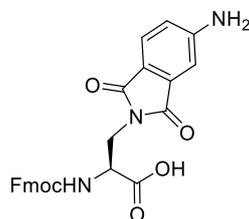
RP-DC (Acetonitril, 33 % Wasser): R_f = 0.38.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3.87 (m, 2H, β-CH₂); 4.23 (m, 3H, Fmoc-CH-CH₂, Fmoc-CH-CH₂); 4.37 (q, 1H, J³ = 7.49 Hz, α-CH); 4.51 (m, 2H, O-CH₂-CH); 5.12 (dd, 1H, J³ = 10.50 Hz, J² = 1.43 Hz, allyl-CH₂); 5.23 (dd, 1H, J³ = 17.25 Hz, J² = 1.60 Hz, allyl-CH₂); 5.77 (m, 1H, allyl-CH); 6.48 (s, 2H, NH₂); 6.79 (dd, 1H, J⁵ = 1.98 Hz, J³ = 8.24 Hz, aryl-H-7); 6.91 (d, 1H, J⁵ = 1.84 Hz, aryl-H-4); 7.30 (m, 2H, Fmoc-CH); 7.41 (t, 2H, J³ = 7.43 Hz, Fmoc-CH); 7.47 (d, 1H, J³ = 8.21 Hz, aryl-H-6); 7.66 (dd, 2H, J³ = 7.56 Hz, J⁴ = 11.50 Hz, Fmoc-CH); 7.88 (d, 2H, J³ = 7.61 Hz, Fmoc-CH); 8.00 (d, 1H, J³ = 8.26 Hz, CO-NH-α-C).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 37.6 (β-CH₂); 46.5 (Fmoc-CH-CH₂); 52.0 (α-CH); 65.4 (CH₂-allyl); 65.9 (Fmoc-CH₂); 107.1 (aryl-C-4); 116.5 (aryl-C-7); 116.6 (C-quart-AMP); 118.1 (CH₂=allyl); 120.1 (Fmoc-CH); 125.0 (aryl-C-6); 125.2 (Fmoc-CH); 127.1 (Fmoc-CH); 127.7 (Fmoc-CH); 131.9 (CH=allyl); 134.4 (C-quart-AMP); 140.7 (Fmoc-C); 143.7 (Fmoc-C); 155.9 (CO₂N); 167.6 (CO); 168.1 (CO); 169.7 (CO₂-α-CH).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für C₂₉H₂₆N₃O₆ [M+H⁺]: 512.1822; gefunden [M+H⁺]: 512.1821.

(S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(5-amino-phthalimid-2-yl)propansäure
(4)



$C_{26}H_{21}N_3O_6$
Exakte Masse: 471,14

1.28 g **37** (0.0025 mol, 1.00 Äq.) wurden in 20 mL trockenem DCM gelöst und 0.29 g $Pd(Ph_3)_4$ (0.00025 mol, 0.10 Äq.) und 6.77 g $PhSiH_3$ (0.063 mol, 25 Äq.) der Mischung zugegeben. Nach Rühren für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Reaktion über Celite filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mittels HPLC C18 Säulenchromatographie (Wasser-Acetonitril 40–100 %) aufgereinigt und **4** mit 85 %iger Ausbeute (1.00 g, 0.0021 mol) als gelber Feststoff erhalten.

RP-DC (Acetonitril, 25 % Wasser): $R_f = 0.71$.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 3.86 (m, 2H, β - CH_2); 4.19 (m, 3H, Fmoc- $CH-CH_2$, Fmoc- $CH-CH_2$); 4.28 (q, 1H, $J^3 = 8.27$ Hz, α - CH); 6.79 (dd, 1H, $J^5 = 1.97$ Hz, $J^3 = 8.22$ Hz, aryl-H-7); 6.92 (d, 1H, $J^5 = 1.90$ Hz, aryl-H-4); 7.29 (dt, 2H, $J^3 = 7.46$ Hz, $J^4 = 14.62$ Hz, Fmoc- CH); 7.40 (td, 2H, $J^3 = 7.40$ Hz, $J^3 = 3.20$ Hz, Fmoc- CH); 7.46 (d, 1H, $J^3 = 8.21$ Hz, aryl-H-6); 7.65 (dd, 2H, $J^3 = 7.50$ Hz, $J^4 = 16.60$ Hz, Fmoc- CH); 7.81 (d, 1H, $J^3 = 8.47$ Hz, CO-NH- α -C); 7.88 (d, 2H, $J^3 = 7.56$ Hz, Fmoc- CH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 38.3 (β - CH_2); 47.0 (Fmoc- $CH-CH_2$); 52.3 (α - CH); 66.3 (Fmoc- CH_2); 107.6 (aryl-C-4); 117.1 (aryl-C-7); 120.6 (Fmoc- CH); 125.4 (aryl-C-6); 125.8 (Fmoc- CH); 127.5 (Fmoc- CH); 128.1 (Fmoc- CH); 134.9 (C-quart-AMP); 141.1 (Fmoc-C); 144.2 (Fmoc-C); 155.3 (C-quart-AMP); 156.3 (CO $_2$ N); 168.1 (CO); 168.6 (CO); 171.9 (CO $_2$ H).

HRMS-FAB (m/z): berechnet für $C_{26}H_{22}N_3O_6$ $[M+H]^+$: 472.1509; gefunden $[M+H]^+$: 472.1508.

4. Synthese der Peptide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gewünschten Peptide unter Verwendung der Festphasenpeptidsynthese nach MERRIFIELD dargestellt. Die Synthese erfolgte bei den Peptidsequenzen mit Polyprolinmatrix ebenso wie bei den EGFR-Peptidmutationen automatisch mittels Fmoc-Synthesestrategie. Als feste Phase diente in beiden Fällen ein Wang-*low-load* Harz. Dieses war in beiden Fällen mit der C-terminalen Aminosäure der jeweiligen Sequenzen vorbeladen (Tyrosin für die Polyprolinsequenzen; Valin für die EGFR-Sequenzen). Für die Synthese der Polyprolineinheiten wurde ein 100 µmol Ansatz (Beladung Harz: 0.31 mmol/g) und für die EGFR-Einheiten ein 50 µmol Ansatz (Beladung Harz: 0.31 mmol/g) gewählt. Die entsprechenden Mengen Harz wurden in Filterspritzen eingewogen und über Nacht in DMF quellen gelassen. Nach Entfernen des DMF wurden die Peptidsynthesen der Polyprolinsequenzen am multiplen Synthesizer (*Syro II*, *Biotage*) und die der EGFR-Sequenzen am mikrowellenaktivierten Peptidsynthesizer (*Liberty Blue*, *CEM GmbH*) durchgeführt. Nach vollständiger Synthese wurde das Harz mit DMF, DCM und MeOH gewaschen und anschließend unter reduziertem Druck getrocknet.

Synthese am multiplen Synthesizer

Bei der Peptidsynthese am multiplen Synthesizer wurde die AS-Sequenz von N- nach C-Richtung in die Software eingegeben, woraufhin die benötigten Mengen an AS ($c = 0.57 \text{ mol/L}$ in DMF), Kopplungsreagenzien und Waschlösungen berechnet wurden. Als Kopplungsreagenz wurde eine 1:1 Mischung aus (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HBTU) ($c = 0.49 \text{ mol/L}$) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) ($c = 0.49 \text{ mol/L}$) in DMF verwendet. N, N-Diisopropylethylamin (DIPEA) ($c = 2.28 \text{ mol/L}$) wurde als Aktivatorbase verwendet und mit NMP verdünnt. Die Kopplung der AS fand als Doppelkopplung statt, in welchem bei jeder Kopplung 4.00 Äq. AS-Lösung, 4.00 Äq. HBTU/HOBt-Lösung und 8.00 Äq. DIPEA gelöst in NMP dem Harz zugegeben wurden. Die Peptidkopplung fand für 30 min bei Raumtemperatur statt. Vor der zweiten Kopplung wurde die feste Phase zwei Mal mit jeweils 2.00 mL DMF gewaschen. Die Fmoc-Entschützung fand mit 2.40 mL 20 %iger Piperidinlösung in DMF für 20 min statt. Bevor die nachfolgende AS gekoppelt wurde, wurde das Harz vier Mal mit jeweils 2.00 mL DMF gewaschen.

Mikrowellenaktivierte Peptidsynthese

Die Synthese der Transmembraneilsequenz des EGF-Rezeptors wurde an einem mikrowellenaktivierten Peptidsynthesizer der Firma *Liberty Blue* (*CEM GmbH*) dargestellt, was eine Synthese von besonders hydrophoben Aminosäuresequenzen erlaubt und geringere

Experimentaltteil

Mengen an Ausgangsprodukte für eine erfolgreiche Synthese benötigt. Auch hier wurde entgegen der Syntheserichtung die jeweilige AS-Sequenz in die Software eingegeben und die jeweiligen kalkulierten Mengen an AS ($c = 0.2 \text{ mol/L}$) in DMF gelöst. Als Kopplungsreagenzien wurde Diisopropylcarbodiimid (DIC) (0.05 mol/L) und Oxyma Pure (Ethyl cyano(hydroxyimino)acetate) (1.0 mol/L) als Aktivatorbase eingesetzt. Auch bei der Mikrowellensynthese wurde die AS-Kopplung als Doppelkopplung vorgenommen, in welcher bei jeder Kopplung 10 Äq. AS-Lösung, 10 Äq. DIC-Lösung und 10 Äq. Oxyma Pure gelöst in DMF zum Harz zugegeben wurden. Die Kopplungsreaktionen variierten dabei in Kopplungszeit und -temperatur, je nach AS, wie in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14: mikrowellenaktivierte Peptidkopplungsstrategien.

AS	Kopplung 1	Kopplung 2
Arg	25 °C für 1500 s	75 °C für 120 s
His	25 °C für 120 s	50 °C für 480 s
Generelle AS	75 °C für 15 s	90 °C für 420 s

Nach vollständiger AS-Kopplung wurde zur darauffolgenden Kopplung mit 20 %iger Piperidinlösung in DMF Fmoc-entschützt. Auch hier wurden je nach AS unterschiedliche Entschützungsstrategien verfolgt (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: mikrowellenaktivierte Fmoc-Entschützungsstrategien.

	<i>Initial deprotection</i>	<i>Deprotection</i>	<i>Wash</i>	<i>Wash</i>
Arg	3 mL 75 °C 30 s	3 mL 75 °C 180 s	2 x 2 mL	1 x 3 mL
His/Generelle AS	3 mL 75 °C 15 s	3 mL 90 °C 50 s	2 x 2 mL	1 x 3 mL

Das Einsparen der Waschzyklen zwischen den beiden Kopplungsschritten bewirkt eine enorme Zeitersparnis in Bezug auf den mikrowellenaktivierten Peptidsynthesizer.

Kovalente Kopplung der synthetisierten Fluoreszenzaminosäuren

Die Kopplungsreaktionen fanden an den nach wie vor an das Harz gebundenen Peptiden statt, wie in Abbildung 66 repräsentativ für Baustein 1 dargestellt. Dabei wurde 1.00 Äq. synthetisiertes Peptid mit 1.20 Äq. Chromophoraminosäure, 1.20 Äq. HOBt·H₂O, 1.20 Äq. HBTU und 2.40 Äq. DIPEA vereinigt. Zunächst wurden die Aminosäuren mit der adäquaten Menge an HOBt·H₂O und HBTU in circa 400 µL DMF gelöst und vermischt. Anschließend wurde das Gemisch mit der abgewogenen Menge Harz vereint, DIPEA zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler inkubiert. Nach vollständiger Reaktion wurden die gelabelten Peptide filtriert und mit DMF, DCM und MeOH mehrfach gewaschen, bis die Waschlösung farblos war. Zur weiteren Synthese oder finalen Beendigung der Peptidsynthese wurde jeweils Fmoc-entschützt unter Zugabe von circa 5 mL 20 %iger Piperidinlösung in DMF und weiterer Inkubation von 30 Minuten auf dem Plattformschüttler. Anschließend wurde das Harz wieder gewaschen wie oben aufgeführt und entweder die Synthese fortgeführt oder die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das beladene Harz im Hochvakuum getrocknet.

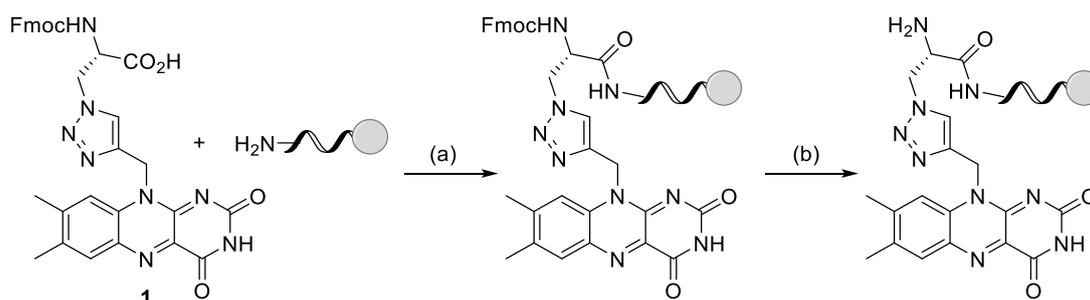


Abbildung 66: Darstellung der Peptidkupplung des Flavinbausteins 1: (a) HOBt·H₂O, HBTU, DIPEA, DMF, RT, 16 h; (b) 20 % Piperidin in DMF, RT, 30 min.

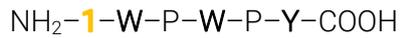
Abspaltung vom Harz

Um die gelabelten Peptide vom Harz zu trennen und die Schutzgruppen der Seitenketten zu entfernen, wurde pro 100 mg getrocknetem Harz 1 mL scharfe *Cleavage*-Lösung (77.5 % TFA 5 % TIS, 5 % TA, 5 % Phenol, 2.5 % EDT, 5 % dd H₂O) zugegeben. Die Abspaltungs- und Entschützungsreaktion fand über 4 h statt, während das Reaktionsgefäß gleichmäßig auf einem Plattformschüttler geschüttelt wurde. Nachdem das Harz abfiltriert wurde, wurde die Reaktionsmischung unter N₂ bis auf ein Volumen von circa 0.2 mL eingengt. Der Rückstand wurde in kaltem Diethylether resuspendiert und 3 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und der Niederschlag in circa 4 mL Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen, bei -80 °C gefroren und daraufhin lyophilisiert.

Ebenfalls wurde vor den jeweiligen Kopplungsreaktionen mit den Aminosäuren ein so genanntes Test-*Cleavage* vorgenommen, um die Peptidsynthese auf ihre Vollständigkeit zu überprüfen. Dieses Test-*Cleavage* wurde auch nach der Kopplungsreaktion durchgeführt um die Vollständigkeit der Reaktion zu überprüfen. Hierbei wurde eine Spatelspitze getrocknetes Harz dem Reaktionsgefäß entnommen, 200 µL milde *Cleavage*-Lösung (92.5 % TFA, 5 % TIS, 2.5 % dd H₂O) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler zur Reaktion gebracht. Nach Abfiltrieren des Harzes, wurde die Reaktionsmischung unter Argon evaporiert. Der Rückstand wurde mit 2 mL kaltem Diethylether aufgenommen und für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Fällungsprodukt in LC/MS-Lösungsmittel (Acetonitril: Wasser 50 %) resuspendiert und mittels LC/MS charakterisiert.

Peptid PP₀₁



Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **PP₀₁ (-1)** [M⁺]: 747.832; gefunden [M+H⁺]: 748.32.

Nach Kopplung mit **1**:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **PP₀₁** [M⁺]: 1139.8; [M⁺]/2: 569.9; gefunden [M+H⁺]: 1140.46; [M+H⁺]/2: 570.7.

Peptid PP₁



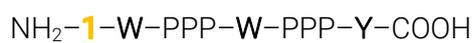
Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **PP₁ (-1)** [M⁺]: 844.95; gefunden [M+H⁺]: 845.37.

Nach Kopplung mit **1**:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **PP₁** [M⁺]: 1236.9; [M⁺]/2: 618.5; gefunden [M+H⁺]: 1237.5; [M+H⁺]/2: 619.26.

Peptid PP₀₃



Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP₀₃ (-1) [M⁺]: 1136.3; [M+H⁺]/2: 568.15; gefunden [M+H⁺]: 1136.53; [M+H⁺]/2: 568.77.

Nach Kopplung mit 1:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP₀₃ [M⁺]: 1528.3; [M⁺]/2: 764.2; gefunden [M+H⁺]/2: 764.84.

Peptid PP₃



Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP₃ (-1) [M⁺]: 1427.647; [M⁺]/2: 713.82; gefunden [M+2H⁺]: 1429.7; [M+2H⁺]/2: 715.36.

Nach Kopplung mit 1:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP₃ [M⁺]: 1819.6; [M⁺]/2: 908.8; gefunden [M+H⁺]/2: 910.92.

Peptid PP₂



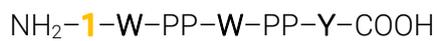
Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP₂ (-1) [M⁺]: 1136.3; [M⁺]/2: 568.15 gefunden [M⁺]: 1136.54; [M+H⁺]/2: 568.77.

Nach Kopplung mit 1:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP₂ [M⁺]: 1528.3; [M⁺]/2: 764.2; gefunden [M+H⁺]: 1529.7; [M⁺]/2: 764.86.

Peptid PP₀₂



Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP₀₂ (-1) [M⁺]: 942.065; gefunden [M⁺]: 942.44.

Nach Kopplung mit 1:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP₀₂ [M⁺]: 1334.1; [M⁺]/2: 667.1; gefunden [M+H⁺]: 1335.64; [M+H⁺]/2: 667.83.

Peptid PP_{ref}



Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP_{ref} (-1) [M⁺]: 1105.283; [M⁺]/2: 552.5 ; gefunden: [M+H⁺]/2: 553.29.

Nach Kopplung mit 1:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für PP_{ref} [M⁺]: 1497.28; [M⁺]/2: 748.64; gefunden [M+H⁺]: 1498.76; [M+H⁺]/2: 749.38.

Peptid EGFR_{F1}

NH₂-**1**-KIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRRHIV-COOH

Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für EGFR [M⁺]: 3529; [M⁺]/2: 1764.5; [M⁺]/3: 1176.3; [M⁺]/4: 882.3;
gefunden: [M⁺]/3: 1177.3607; [M⁺]/4: 883.2687.

Nach Kopplung mit 1:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für EGFR_{F1} [M⁺]: 3921; [M⁺]/2: 1960.5; [M⁺]/3: 1307; [M⁺]/4: 980.3;
gefunden: [M⁺]/2: 1961.69; [M⁺]/3: 1308.00; [M⁺]/4: 981.28.

Peptid EGFR_{F1}1

NH₂-**1**-KIPS-**W**-ATGMVG-**W**-LLLLLV-**W**-ALGIGL-**Y**-MRRRHIV-COOH

Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für EGFR₁ [M⁺]: 3821; [M⁺]/2: 1910.5; [M⁺]/3: 1273.7; [M⁺]/4: 955.3;
[M⁺ + 44]/4: 966.3; gefunden: [M+H⁺ + 44]/4: 967.0316.

Nach Kopplung mit 1:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für EGFR_{F1}1 [M⁺]: 4213; [M⁺]/2: 2106.5; [M⁺]/3: 1404.3; [M⁺]/4:
1053.3; gefunden: [M⁺]/2: 2107.26; [M⁺]/3: 1405.24; [M⁺]/4: 1053.83.

Peptid EGFR_{F6}

NH₂-**1**-K-W-PS-W-ATG-W-VG-W-LLL-W-LV-W-ALG-W-GL-Y-MRRRHIV-COOH

Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR6** [M⁺]: 4094.9; [M⁺]/2: 2047; [M⁺]/3: 1364.7; [M⁺]/4: 1023.4;
gefunden: [M⁺]/2: 2048.1025; [M⁺]/3: 1365.7339; [M⁺]/4: 1024.5471.

Nach Kopplung mit 1:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{F6}** [M⁺]: 4486; [M⁺]/2: 2243; [M⁺]/3: 1495; [M⁺]/4: 1121;
gefunden: [M⁺]/2: 2244.24; [M⁺]/3: 1496.54; [M⁺]/4: 1122.55.

Peptid EGFR_{F5}

NH₂-**1**-K-W-PSI-W-TGM-W-GAL-W-LLL-W-VAL-W-IGL-Y-MRRRHIV-COOH

Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR5** [M⁺]: 4094.9; [M⁺]/2: 2047; [M⁺]/3: 1364.7; [M⁺]/4: 1023.4;
gefunden: [M⁺]/2: 2048.1025; [M⁺]/3: 1365.7339; [M⁺]/4: 1024.5471.

Nach Kopplung mit 1:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{F5}** [M⁺]: 4502; [M⁺]/2: 2251; [M⁺]/3: 1500; [M⁺]/4: 1125;
gefunden: [M⁺]/2: 2251.64; [M⁺]/3: 1501.50; [M⁺]/4: 1126.50.

Peptid EGFR_{F4}

NH₂-**1**-K-W-PSIATG-W-VGALLL-W-LVVALG-W-GL-Y-MRRRHIV-COOH

Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR4** [M⁺]: 3919.8; [M⁺]/2: 1909.5; [M⁺]/3: 1273.2; [M⁺]/4: 954.9; gefunden: [M⁺]/2: 1911.0341; [M⁺]/3: 1274.4134.

Nach Kopplung mit **1**:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{F4}** [M⁺]: 4211.6; [M⁺]/2: 2105.8; [M⁺]/3: 1403.9; [M⁺]/4: 1052.9; gefunden: [M⁺]/2: 2106.66; [M⁺]/3: 1404.85.

Peptid EGFR_{F2}

NH₂-**1**-K-W-PSIATG-W-VGALLL-W-LVVALGIGL-Y-MRRRHIV-COOH

Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR2** [M⁺]: 3746.6; [M⁺]/2: 1872.2; [M⁺]/3: 1248.9; [M⁺]/4: 936.7; gefunden: [M⁺]/3: 1250.4035.

Nach Kopplung mit **1**:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{F2}** [M⁺]: 4138.6; [M⁺]/2: 2069.3; [M⁺]/3: 1379.5; [M⁺]/4: 1034.7; gefunden: [M⁺]/2: 2070.17; [M⁺]/3: 1380.31.

Peptid **EGFR_{F3}**

NH₂-**1**-K-W-PSIATG-W-VGALLL-W-LVVALG-W-GLF-Y-RRRHIV-COOH

Vor Kopplung:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{F3}** [M⁺]: 3835.6; [M⁺]/2: 1917.8; [M⁺]/3: 1278.5; [M⁺]/4: 958.9; gefunden: [M⁺]/2: 1919.5499; [M⁺]/3: 1280.0871.

Nach Kopplung mit **1**:

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{F3}** [M⁺]: 4227.6; [M⁺]/2: 2113.8; [M⁺]/3: 1409.2; [M⁺]/4: 1056.9; gefunden: [M⁺]/2: 2114.68; [M⁺]/3: 1409.99.

Peptid **EGFR_{wt}**

NH₂-GPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIV-COOH

Als Referenzprobe wurde das fertig aufgereinigte Peptid **EGFR_{wt}** von der ULRICH Arbeitsgruppe bereitgestellt.

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{wt}** [M+H⁺]: 3683.6; [M+H⁺]/2: 1841.8; [M+H⁺]/3: 1227.9; [M+H⁺]/4: 920.9; gefunden: [M+H⁺]/3: 1842.8935; [M+H⁺]/2: 1228.9562; [M+H⁺]/4: 921.9716.

Peptid **EGFR_{AP1}**

NH₂-GPKIPSIATGMVGALL-**4**-LLVVALGIGLFMRRRHIV-COOH

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{AP1}** [M+H⁺]: 3802.537; [M+H⁺]/2: 1901.2685; [M+H⁺]/3: 1267.512; [M+H⁺]/4: 950.634; gefunden [M+H⁺]/3: 1267.9805.

Peptid **EGFR_{AP2}**

NH₂-GPKIPSIATGMVGALL-**3**-LLVVALGIGLFMRRRHIV-COOH

Anmerkung: Der Baustein **3** fragmentiert während der ESI-TOF Analyse des Peptids **EGFR_{AP2}**. Daraus folgt für die Hauptmasse [M+H⁺-300]. Diese Masse passt exakt zu **24** und resultiert aus einer induktiven Thioetherspaltung.

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{AP2}** [M+H⁺]: 3973.577, (-300: 3673.57); [M+H⁺]/2: 1986.7885, (-300/2: 1836.788); [M+H⁺]/3: 1324.5256, (-300/3: 1224.526); [M+H⁺]/4: 993.394, (-300/4: 918.394); gefunden: [M+H⁺-300]/3: 1225.4123; [M+H⁺-300]/2: 1837.6307; [M+H⁺]/3: 1324.7790.

Peptid **EGFR_{AP3}**

NH₂-**2**-PKIPSIATGMVGALLLLLLVVALGIGLFMRRRHIV-COOH

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für **EGFR_{AP3}** [M+H⁺]: 3939.2; [M+H⁺]/2: 1969.6; [M+H⁺]/3: 1313.066; [M+H⁺]/4: 984.8; gefunden: [M+H⁺]/3: 1313.6343; [M+H⁺]/2: 1970.1509; [M+H⁺]/4: 985.2587.

Peptid EGFR_{AP4}

NH₂-4-PKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRRHIV-COOH

LC/MS (ESI) (m/z): berechnet für EGFR_{AP4} [M+H⁺]: 3858.1; [M+H⁺]/2: 1929.05; [M+H⁺]/3: 1286.033; [M+H⁺]/4: 964.525; gefunden: [M+H⁺]/3: 1286.1323; [M+H⁺]/2: 1929.7108; [M+H⁺]/4: 965.3653.

5. Zusätzliche Abbildungen und Spektren

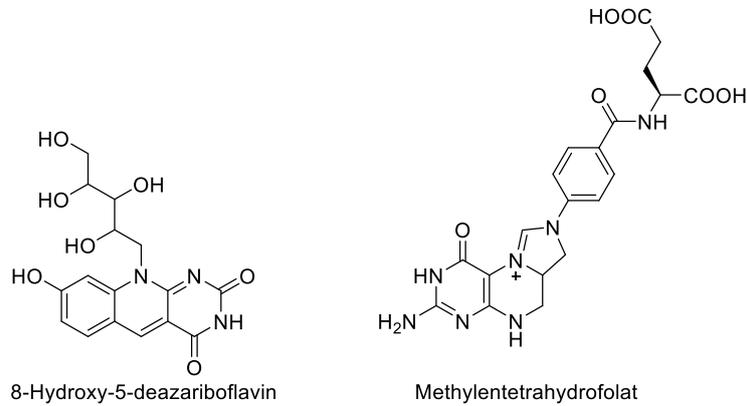


Abbildung 67: Strukturen der Cofaktoren 8-HDF und MTHF.

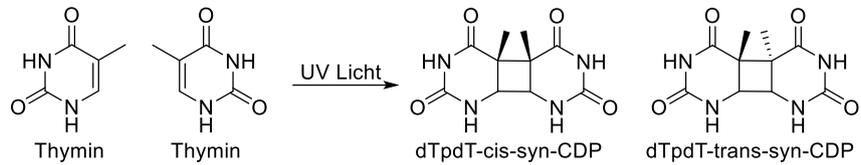


Abbildung 68: Darstellung der CPD-Photoprodukte.

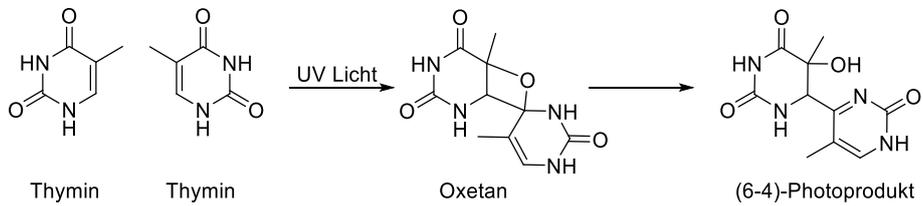


Abbildung 69: Peternò-Büchi-Reaktion zur Darstellung des (6-4)-Photoproduktes.

Experimentaltteil

Tabelle 16: Verschiedene Synthesestrategien zur Darstellung des 4AP-Bausteins **23** in DMF anhand der Synthesewege (c) und (d) in Abbildung 48.

Base	Äq.	Bedingungen	Produkt
K ₂ CO ₃	1.50	RT, 3 h	24
K ₂ CO ₃	1.50	60 °C, 3 h	24
NaH	1.20	-79 °C–RT, 16 h	24
LDA	1.00	-79 °C–RT, 16 h	-
LiHMDS	1.00	-79 °C–RT, 16 h	-
KHMDS	1.00	-79 °C–RT, 16 h	-
K ₂ CO ₃	3.00	RT, 16 h	24
K ₂ CO ₃	7.00	RT, 16 h	24
Ag ₂ CO ₃	3.00	RT, 16 h	-

Tabelle 17: Eliminierungsbedingungen des Bausteins **24**.

Base	Äq.	Bedingungen
DBU	3.50	RT, 2 d, in THF
DBU	6.00	75 °C, 2 d, in THF
Ag ₂ CO ₃	1.50	RT, 16 h, in THF
Et ₃ N	300	RT–85 °C, in Toluol

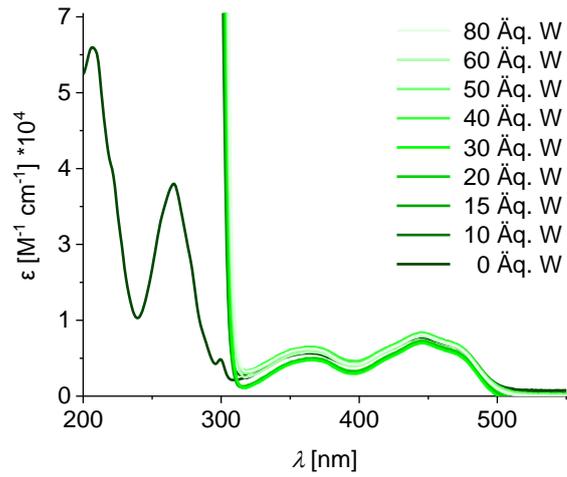


Abbildung 70: Absorption der flavinmodifizierten Aminosäure **1** in Gegenwart verschiedener Äquivalente Fmoc-L-Trp-OH **W** (0.015 mM in MeCN/H₂O (1:1)).

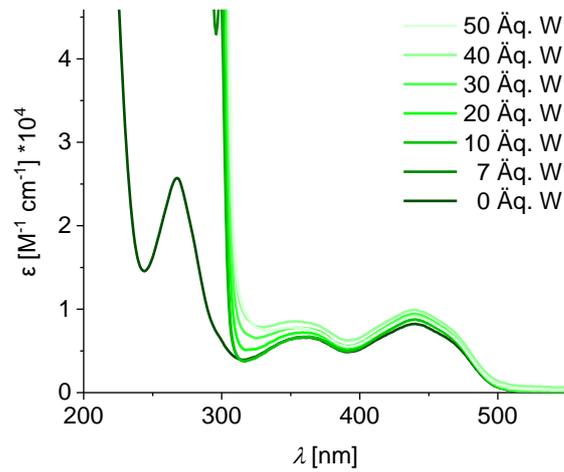


Abbildung 71: Absorption des flavinmodifizierten Peptides **EGFR_{F1}** in Gegenwart verschiedener Äquivalente Fmoc-L-Trp-OH **W** (0.022 mM in MeCN/H₂O (1:1)).

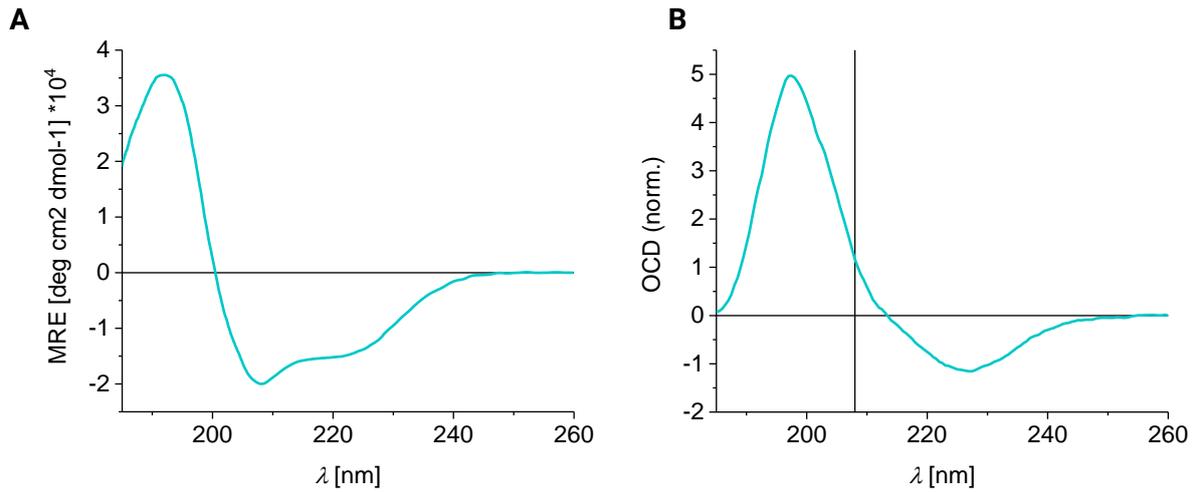


Abbildung 72: CD- und OCD-Spektrum des EGFR-Peptids **EGFR4** (A und B); CD-Spektren bei 20 °C, (0.1 mg/mL); OCD-Spektren mit P/L Verhältnis von 1:50, 25 °C.

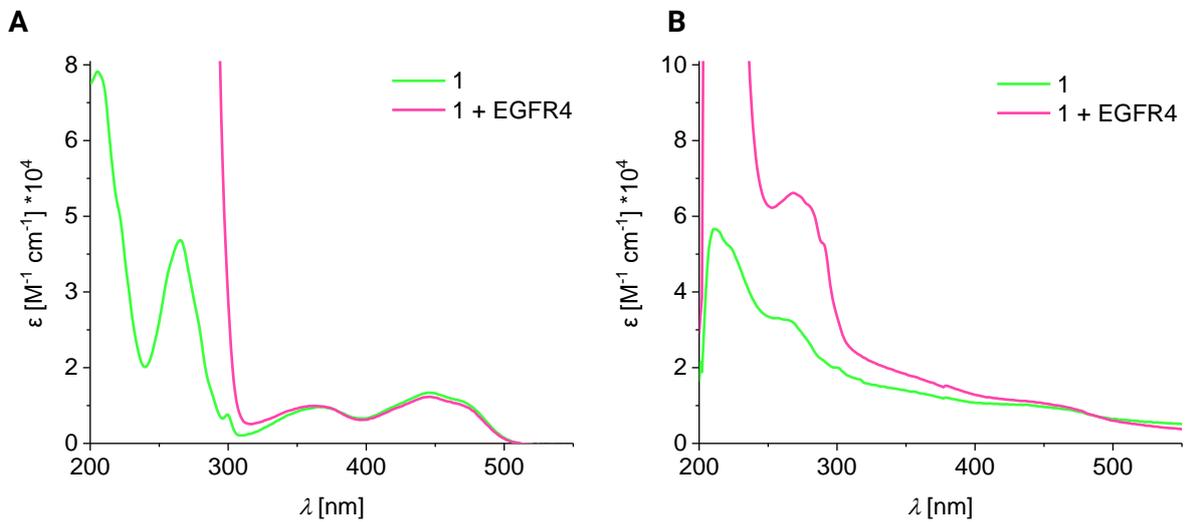


Abbildung 73: Absorption der Flavin-Aminosäure **1** in Abhängigkeit des tryptophanhaltigen Peptides **EGFR4** in MeCN/H₂O (1:1) (0.013 mM) (A) und POPC-Lipidsystem (0.01 mM Flavinkonzentration) (B).

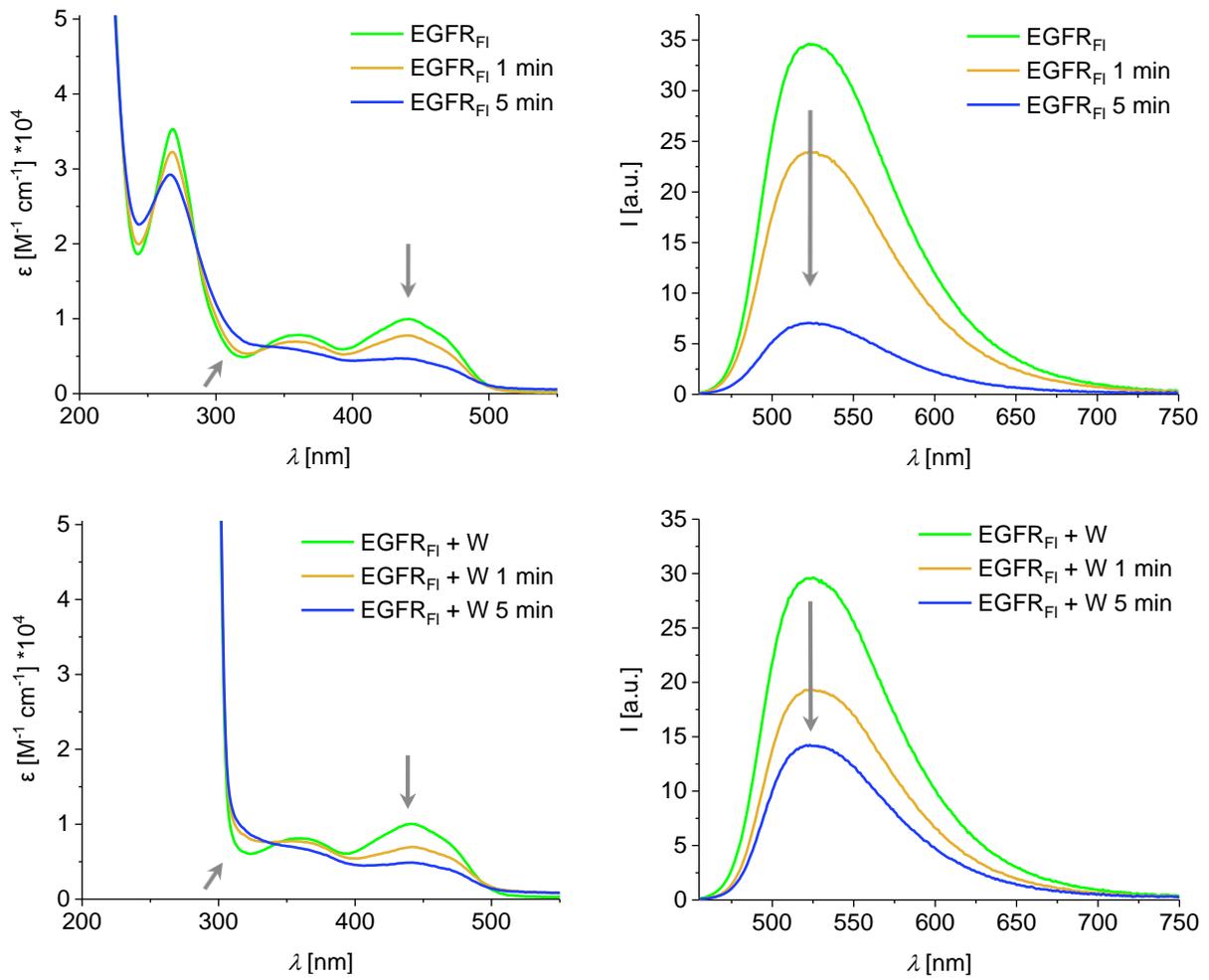


Abbildung 74: Absorption und Fluoreszenz des **EGFR_{F1}** ohne (oben) und mit (unten) Tryptophan (**W**) unter Anregung bei 365 nm ($\lambda_{exc.} = 440$ nm; 0.02 mM in MeCN/H₂O (1:1)).

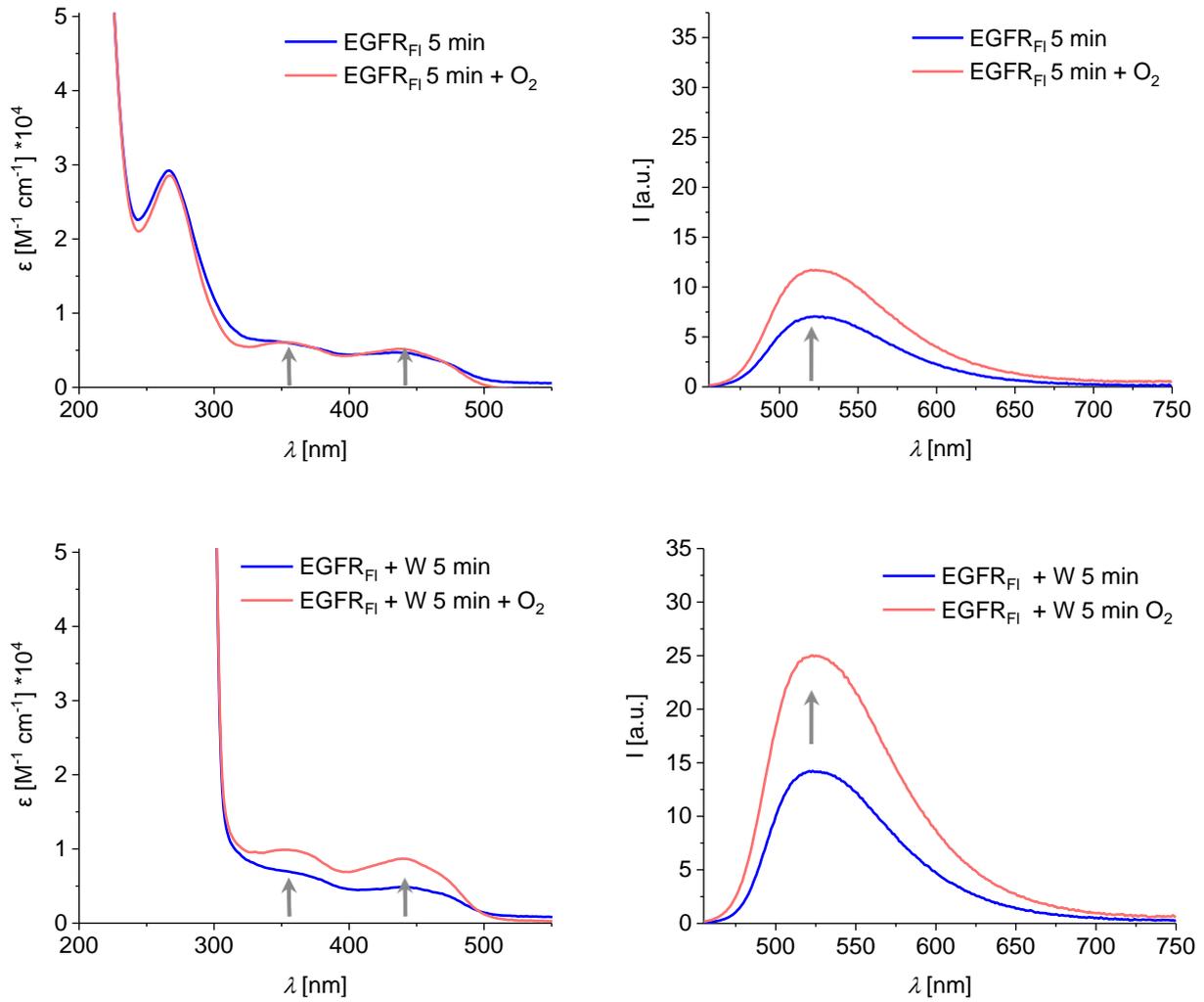


Abbildung 75: Absorption und Fluoreszenz des EGFR_{F1} ohne (oben) und mit (unten) Tryptophan (**W**) nach Anregung bei 365 nm und anschließenden Oxidation.

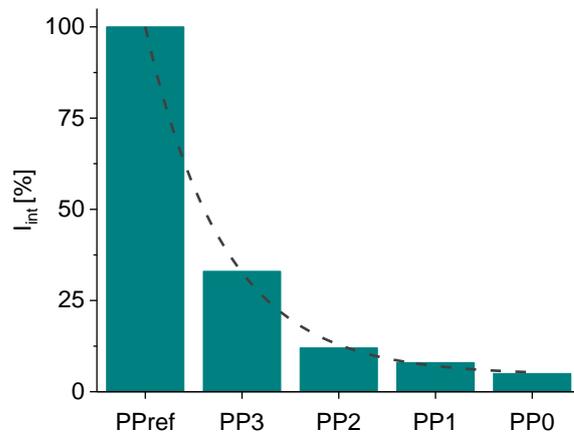


Abbildung 76: Integrierte Fluoreszenzintensitäten der PP-Peptide monoexponentiell gefittet.

Experimentaltteil

Tabelle 18: UV/Vis Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der Bausteine **2**, **3** und **4** in verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungs- mittel	4		2		3	
	λ_{abs}^{max} [nm]	λ_{fluo}^{max} [nm]	λ_{abs}^{max} [nm]	λ_{fluo}^{max} [nm]	λ_{abs}^{max} [nm]	λ_{fluo}^{max} [nm]
EtOAc	367	460	365	460	365	463
Aceton	368	471	368	474	367	470
MeCN	369	477	370	480	370	480
DMSO	383	491	384	490	383	492
EtOH	381	519	381	519	380	524
MeOH	378	525	378	531	377	531
H ₂ O	379	561	380	563	380	568

Tabelle 19: Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F des 4AP und der Bausteine **2**, **3** und **4**. ($\lambda_{exc.} = 400$ nm).

Lösungs- mittel	4AP	2	3	4
	Φ_F			
EtOAc	0.45	0.73	0.65	0.70
Aceton	0.47	0.68	0.64	0.74
MeCN	0.42	0.72	0.62	0.77
DMSO	0.83	1	0.96	0.99
EtOH	0.33	0.40	0.37	0.42
MeOH	0.21	0.25	0.23	0.28
H ₂ O	0.031	0.04	0.043	0.051

Experimentaltteil

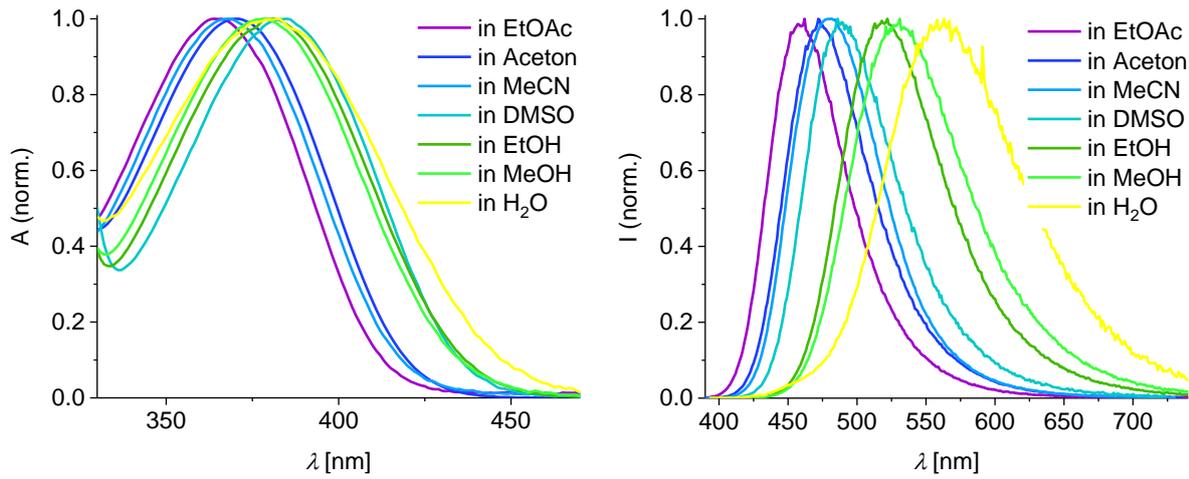


Abbildung 77: Absorption und Fluoreszenz der 4AP-Aminosäure **2** in verschiedenen Lösungsmitteln (Anregung bei λ_{max}^{abs} für jedes Lösungsmittel).

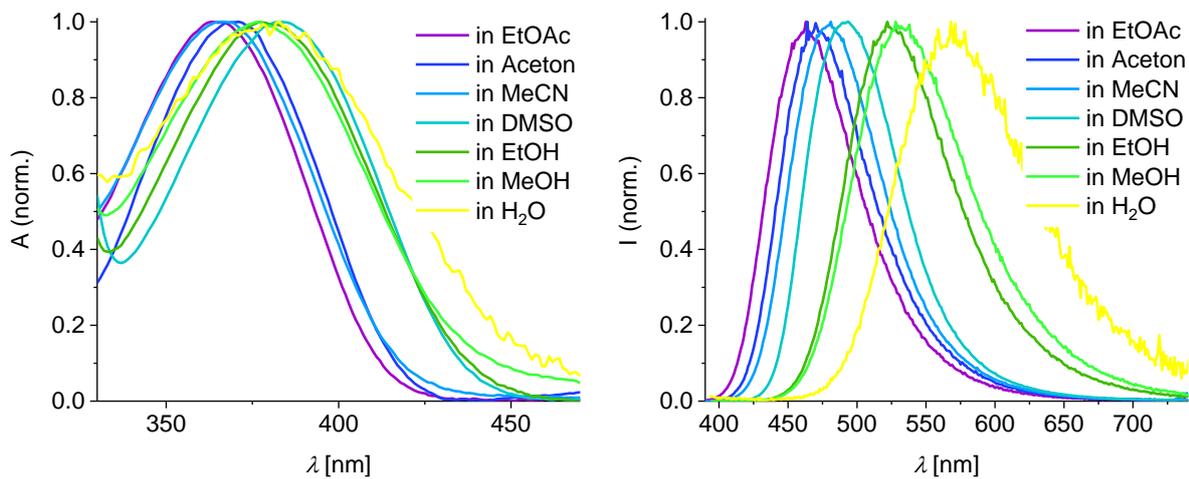


Abbildung 78: Absorption und Fluoreszenz der 4AP-Aminosäure **3** in verschiedenen Lösungsmitteln (Anregung bei λ_{max}^{abs} für jedes Lösungsmittel).

V. Anhang

Publikationen

S. Wörner, F. Röncke, A. S. Ulrich, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem*, **2019**, *accepted*
DOI: 10.1002/cbic.201900520

S. Barrois, S. Woerner, H.-A. Wagenknecht, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, 13(8), 1126-1129.

Posterbeiträge und Konferenzen

"Light induced electron transfer across transmembrane peptides"

S. Wörner, Anne S. Ulrich, H.-A. Wagenknecht, 35th European Peptide Symposium (Dublin, August 2018)

"Long range electron transfer across transmembrane peptides"

S. Wörner, Anne S. Ulrich, H.-A. Wagenknecht, Symposium on Molecular Architectures for Fluorescent Imaging of Cells (Karlsruhe, October 2017)

Lehre

Wintersemester 2016/2017	Betreuung des Wahlpflichtpraktikums in Biochemie für Studierende der Chemie, chemische Biologie am KIT
März 2017–Juni 2017	Betreuung des Auszubildenden Felix Mazza im ersten Ausbildungsjahr zum Chemielaboranten
Sommersemester 2017	Betreuung des Wahlpflichtpraktikums in Biochemie für Studierende der Chemie, chemische Biologie am KIT
Juli 2017–Nov. 2017	Betreuung des Vertiefungspraktikums von Luca Münzfeld

Wintersemester 2017/2018	Betreuung des organisch-chemischen Grundpraktikums für Studierende der Chemie, chemischen Biologie und Lebensmittelchemie am KIT
Okt. 2018–März 2019	Betreuung des Vertieferpraktikums von Karen Möbius
Nov. 2018–Jan. 2019	Betreuung des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende der Chemie und der Chemischen Biologie
Feb. 2019–Apr. 2019	Betreuung des Hilfwissenschaftlers Hannes Kucher
Mai 2019–Jun 2019	Betreuung des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums für Studierende der Chemie und der Chemischen Biologie

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe und die Satzung *des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)* zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe. Weiterhin versichere ich, dass die elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen übereinstimmt und die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut gesichert ist.

Karlsruhe, den 4. Dezember 2019

Samantha Wörner

VI. Literaturverzeichnis

- [1] J. F. Danielli, H. Davson, *J. Cell. Physiol.* **1935**, 5, 495-508.
- [2] P. C. Heinrich, Müller, Matthias, Graeve, Lutz Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie, Vol. 9*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2014**.
- [3] L. Möckl, D. C. Lamb, C. Bräuchle, *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, 53, 13972-13977.
- [4] D. Matsushita, H. Uji, S. Kimura, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20, 15216-15222.
- [5] Y.-C. Lai, C.-Y. Lin, M.-R. Chung, P.-Y. Hung, J.-C. Horng, I. C. Chen, L.-K. Chu, *J. Phys. Chem. C* **2017**, 121, 4882-4890.
- [6] H. S. Mandal, H.-B. Kraatz, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 3, 709-713.
- [7] J. Yu, O. Zvarec, D. M. Huang, M. A. Bissett, D. B. Scanlon, J. G. Shapter, A. D. Abell, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1132-1134.
- [8] N. P. A. Monney, T. Bally, B. Giese, *J. Phys. Org. Chem.* **2015**, 28, 347-353.
- [9] J. Li, Z. Liu, C. Tan, X. Guo, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Nature* **2010**, 466, 887.
- [10] P. Müller, E. Ignatz, S. Kiontke, K. Brettel, L.-O. Essen, *Chem. Sci.* **2018**, 9, 1200-1212.
- [11] J. Bürck, P. Wadhvani, S. Fanghänel, A. S. Ulrich, *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 184-192.
- [12] E. Strandberg, A. S. Ulrich, *Concept Magn. Reson. A* **2004**, 23A, 89-120.
- [13] M. E. Vazquez, D. M. Rothman, B. Imperiali, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1965-1966.
- [14] E. V. Bocharov, D. M. Lesovoy, K. V. Pavlov, Y. E. Pustovalova, O. V. Bocharova, A. S. Arseniev, *BBA* **2016**, 1858, 1254-1261.
- [15] Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Retrieved from <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/photosynthese/51369> (August 2019).
- [16] A. G. Purves D, Fitzpatrick D, *Neuroscience, Vol. 2*, Sinauer Associates, Cary, NC, USA, **2001**.
- [17] A. Jabłoński, *Nature* **1933**, 131, 839-840.
- [18] A. Jabłoński, *Z. Phys.* **1935**, 94, 38-46.
- [19] H.-J. F. G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [20] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie, Vol. 3*, Wiley-VCH Weinheim, **2001**.
- [21] J. W. P. Klán, *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*, Wiley, Chichester, **2009**.

-
- [22] J. Franck, E. G. Dymond, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1926**, 21, 536-542.
- [23] E. Condon, *Phys. Rev.* **1926**, 28, 1182-1201.
- [24] E. U. Condon, *Phys. Rev.* **1928**, 32, 858-872.
- [25] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, 9, 14-19.
- [26] D. Wöhrle, M. W. Tausch, W.-D. Stohrer, *Photochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [27] J. W. P. Klán, *Photochemistry of Organic Compounds - From Concepts to Practice*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2009**.
- [28] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 3, Springer, Singapore, **2006**.
- [29] D. S. McClure, *J. Chem. Phys.* **1949**, 17, 905-913.
- [30] C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Nature* **2000**, 405, 586-590.
- [31] G. Burdzinski, J. C. Hackett, J. Wang, T. L. Gustafson, C. M. Hadad, M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 13402-13411.
- [32] R. A. Marcus, *J. Chem. Phys.* **1956**, 24, 966-978.
- [33] R. A. Marcus, N. Sutin, *BBA* **1985**, 811, 265-322.
- [34] R. A. Marcus, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1111-1121.
- [35] S. F. Nelsen, J. Adamus, J. J. Wolff, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1589-1590.
- [36] N. J. Turro, *Principles of molecular photochemistry : an introduction*, University Science Books, Sausalito, Calif., **2009**.
- [37] B. S. Brunschwig, N. Sutin, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 187, 233-254.
- [38] P. F. Barbara, T. J. Meyer, M. A. Ratner, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 13148-13168.
- [39] R. A. Marcus, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1964**, 15, 155-196.
- [40] A. Nitzan, *Chemical Dynamics in Condensed Phase*, Oxford University Press, Oxford, New York, **2006**.
- [41] R. A. Marcus, *Rev Mod Phys.* **1993**, 65, 599-610.
- [42] J. R. Miller, L. T. Calcaterra, G. L. Closs, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3047-3049.
- [43] P. Hemmerich, W. R. Knappe, H. E. Kramer, R. Traber, *Eur. J. Biochem.* **1980**, 104, 511-520.
- [44] P. M. Hare, C. E. Crespo-Hernández, B. Kohler, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 18641-18650.
- [45] S. R. G. Gilbert, S. C., *Theory of unimolecular and recombination reactions*, Blackwell Scientific, Hoboken, **1990**.

-
- [46] H. T. Baer, W. L., *Unimolecular Reaction Dynamics: Theory and Experiments*, Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- [47] H. B. Gray, J. R. Winkler, *PNAS USA* **2005**, *102*, 3534.
- [48] G. L. Closs, J. R. Miller, *Science* **1988**, *240*, 440.
- [49] H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **1961**, *35*, 508-515.
- [50] M. A. Ratner, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 4877-4883.
- [51] C. C. Moser, J. M. Keske, K. Warncke, R. S. Farid, P. L. Dutton, *Nature* **1992**, *355*, 796.
- [52] M. E. Núñez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 85-97.
- [53] B. E. Ramirez, B. G. Malmström, J. R. Winkler, H. B. Gray, *PNAS USA* **1995**, *92*, 11949-11951.
- [54] N. A. P. Kane-Maguire, in *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I* (Eds.: V. Balzani, S. Campagna), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2007**, pp. 37-67.
- [55] Y.-j. Ye, J. Ladik, *Int. J. Quantum Chem.* **1994**, *52*, 491-506.
- [56] C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen, P. L. Dutton, *Nature* **1999**, *402*, 47-52.
- [57] A. M. Edwards, in *Flavins: Photochemistry and Photobiology, Vol. 6*, The Royal Society of Chemistry, **2006**, pp. 1-11.
- [58] G. Li, V. Sichula, K. D. Glusac, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 10758-10764.
- [59] F. G. Gelalcha, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3338-3361.
- [60] A. W. Blyth, *J. Am. Chem. Soc.* **1879**, *35*, 530-539.
- [61] V. Massey, *Biochem. Soc. Trans* **2000**, *28*, 283.
- [62] R. Kuhn, F. Weygand, *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **1934**, *67*, 2084-2085.
- [63] P. F. Heelis, *Chem. Soc. Rev.* **1982**, *11*, 15-39.
- [64] G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 403-415.
- [65] R. Cibulka, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 915-932.
- [66] N. G. H. Leferink, W. A. M. van den Berg, W. J. H. van Berkel, *FEBS J.* **2008**, *275*, 713-726.
- [67] P. Müller, J. Yamamoto, R. Martin, S. Iwai, K. Brettel, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15502-15505.
- [68] Y. M. Gindt, E. Vollenbroek, K. Westphal, H. Sackett, A. Sancar, G. T. Babcock, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3857-3866.
- [69] J. K. Eweg, F. Müller, A. J. W. G. Visser, C. Veeger, D. Bebelaar, J. D. W. v. Voorst, *Photochem. Photobiol.* **1979**, *30*, 463-471.

-
- [70] M. Sun, T. A. Moore, P.-S. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1730-1740.
- [71] E. Sikorska, I. V. Khmelinskii, W. Prukała, S. L. Williams, M. Patel, D. R. Worrall, J. L. Bourdelande, J. Koput, M. Sikorski, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 1501-1508.
- [72] A. J. W. G. Visser, F. Müller, *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 593-608.
- [73] T. Climent, R. González-Luque, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13584-13590.
- [74] J.-y. Hasegawa, S. Bureekaew, H. Nakatsuji, *J. Photochem. Photobiol., A* **2007**, *189*, 205-210.
- [75] C. Neiss, P. Saalfrank, M. Parac, S. Grimme, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 140-147.
- [76] M. Kowalczyk, E. Sikorska, I. V. Khmelinskii, J. Komasa, M. Insińska-Rak, M. Sikorski, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2005**, *756*, 47-54.
- [77] K. Yagi, N. Ohishi, K. Nishimoto, J. D. Choi, P.-S. Song, *Biochemistry* **1980**, *19*, 1553-1557.
- [78] P.-S. Song, W. E. Kurtin, *Photochem. Photobiol.* **1969**, *10*, 211-214.
- [79] O. M. Pereira, J. R. Smith, L. Packer, *Photochem. Photobiol.* **1976**, *24*, 237-242.
- [80] S. Shinkai, N. Honda, Y. Ishikawa, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6286-6292.
- [81] V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22459-22462.
- [82] H. Harant, R. de Martin, P. J. Andrew, E. Foglar, C. Dittrich, I. J. D. Lindley, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26954-26961.
- [83] in *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2006**, pp. 408-408.
- [84] P. F. Fitzpatrick, *J. Label. Compd. Rad.* **2007**, *50*, 1016-1025.
- [85] A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2-9.
- [86] P. F. Heelis, R. F. Hartman, S. D. Rose, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 289-297.
- [87] K. Malhotra, S. T. Kim, A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 8712-8718.
- [88] A. Sancar, F. W. Smith, G. B. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6028-6032.
- [89] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. M. Eker, T. Carell, L.-O. Essen, *Science* **2004**, *306*, 1789.
- [90] M. Ahmad, A. R. Cashmore, *Nature* **1993**, *366*, 162-166.
- [91] A. R. Cashmore, *Cell* **2003**, *114*, 537-543.
- [92] J. Horsley, J. Yu, Y. Q. Yeoh, A. Abell, in *Peptides and Peptide-based Biomaterials and their Biomedical Applications* (Eds.: A. Sunna, A. Care, P. L. Bergquist), Springer International Publishing, Cham, **2017**, pp. 131-153.

-
- [93] R. A. Malak, Z. Gao, J. F. Wishart, S. S. Isied, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13888-13889.
- [94] E. Gatto, A. Porchetta, M. Scarselli, M. De Crescenzi, F. Formaggio, C. Toniolo, M. Venanzi, *Langmuir* **2012**, *28*, 2817-2826.
- [95] M. Lauz, S. Eckhardt, K. M. Fromm, B. Giese, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 13785-13788.
- [96] J. Gao, P. Müller, M. Wang, S. Eckhardt, M. Lauz, K. M. Fromm, B. Giese, *Angew. Chem. Int.* **2011**, *50*, 1926-1930.
- [97] M. Wang, J. Gao, P. Müller, B. Giese, *Angew. Chem. Int.* **2009**, *48*, 4232-4234.
- [98] B. Han, X. Chen, J. Zhao, Y. Bu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15849-15859.
- [99] S. Antonello, F. Formaggio, A. Moretto, C. Toniolo, F. Maran, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2874-2875.
- [100] M. Sisido, S. Hoshino, H. Kusano, M. Kuragaki, M. Makino, H. Sasaki, T. A. Smith, K. P. Ghiggino, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10407-10415.
- [101] Y. Arikuma, H. Nakayama, T. Morita, S. Kimura, *Langmuir* **2011**, *27*, 1530-1535.
- [102] S. Yasutomi, T. Morita, S. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14564-14565.
- [103] E. Galoppini, M. A. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2299-2300.
- [104] B. R. Chaudhry, J. D. E. T. Wilton-Ely, A. B. Tabor, D. J. Caruana, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 9996-9998.
- [105] T. Morita, S. Kimura, S. Kobayashi, Y. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2850-2859.
- [106] M. Cordes, B. Giese, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 892-901.
- [107] M. Cordes, O. Jacques, A. Köttgen, C. Jasper, H. Boudebous, B. Giese, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2008**, *350*, 1053-1062.
- [108] S. D. Paredes, C. Barriga, R. J. Reiter, A. B. Rodríguez, *IJTR* **2009**, *2*, 23-36.
- [109] E. J. Land, A. J. Swallow, *Biochemistry* **1969**, *8*, 2117-2125.
- [110] T. Biskup, B. Paulus, A. Okafuji, K. Hitomi, E. D. Getzoff, S. Weber, E. Schleicher, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 9249-9260.
- [111] C.-Y. Lu, Y.-Y. Liu, *BBA* **2002**, *1571*, 71-76.
- [112] S. V. Jovanovic, S. Steenken, M. G. Simic, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 684-687.
- [113] W. A. Prütz, F. Siebert, J. Butler, E. J. Land, A. Menez, T. Montenay-Garestier, *BBA* **1982**, *705*, 139-149.
- [114] G. Merenyi, J. Lind, X. Shen, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 134-137.
- [115] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int.* **2002**, *41*, 2596-2599.

-
- [116] T. Carell, H. Schmid, M. Reinhard, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8741-8747.
- [117] J. Svoboda, H. Schmaderer, B. König, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1854-1865.
- [118] R. Kumar, R. K. Arigela, S. Samala, B. Kundu, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 18828-18833.
- [119] F. W. R. Kuhn, *Ber. dtsch. Chem. Ges.* **1934**, *67*, 1459.
- [120] D. Shetty, J. M. Jeong, C. H. Ju, Y. J. Kim, J.-Y. Lee, Y.-S. Lee, D. S. Lee, J.-K. Chung, M. C. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7338-7347.
- [121] Z. Shi, K. Chen, Z. Liu, N. R. Kallenbach, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1877-1897.
- [122] S. Dobitz, M. R. Aronoff, H. Wennemers, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2420-2428.
- [123] R. L. Baldwin, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 1-21.
- [124] K. P. Lu, G. Finn, T. H. Lee, L. K. Nicholson, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 619.
- [125] F.-X. Theillet, L. Kalmar, P. Tompa, K.-H. Han, P. Selenko, A. K. Dunker, G. W. Daughdrill, V. N. Uversky, in *Intrinsically Disord. Proteins, Vol. 1*, **2013**, p. e24360.
- [126] P. Craveur, A. P. Joseph, P. Poulain, A. G. de Brevern, J. Rebehmed, *Amino Acids* **2013**, *45*, 279-289.
- [127] B. Bochicchio, A. M. Tamburro, *Chirality* **2002**, *14*, 782-792.
- [128] K.-Y. Huang, J.-C. Horng, *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 138-147.
- [129] M. H. Sauer, Johan; Enderlein, Jörg, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
- [130] M. V. Otto Stern, *Physikalische Zeitschrift* **1919**, *20*, 183-188.
- [131] J. P. Hoben, C. E. Lubner, M. W. Ratzloff, G. J. Schut, D. M. N. Nguyen, K. W. Hempel, M. W. W. Adams, P. W. King, A.-F. Miller, *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 14039-14049.
- [132] L. Crocker, L. Fruk, *Frontiers in Chemistry* **2019**, *7*.
- [133] L. Carroll, D. I. Pattison, J. B. Davies, R. F. Anderson, C. Lopez-Alarcon, M. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *118*, 126-136.
- [134] L. M. Antill, S.-y. Takizawa, S. Murata, J. Woodward, *Mol. Phys.* **2018**, 1-10.
- [135] J. G. Nathanael, L. F. Gamon, M. Cordes, P. R. Rablen, T. Bally, K. M. Fromm, B. Giese, U. Wille, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 922-926.
- [136] M. Wang, J. Gao, P. Müller, B. Giese, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4296-4298.
- [137] L. J. G. W. van Wilderen, G. Silkstone, M. Mason, J. J. van Thor, M. T. Wilson, *FEBS Open Bio* **2015**, *5*, 885-892.
- [138] J. L. S. Lopes, A. J. Miles, L. Whitmore, B. A. Wallace, *Protein Sci.* **2014**, *23*, 1765-1772.
- [139] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *BBA* **2005**, *1751*, 119-139.

-
- [140] D. Andersson, U. Carlsson, P.-O. Freskgård, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 1118-1128.
- [141] R. W. Woody, *Biopolymers* **1978**, *17*, 1451-1467.
- [142] A. J. Miles, B. A. Wallace, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4859-4872.
- [143] U. Megerle, M. Wenninger, R. J. Kutta, R. Lechner, B. König, B. Dick, E. Riedle, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 8869-8880.
- [144] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906.
- [145] A. T. Krueger, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 788-799.
- [146] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780-782.
- [147] G. Loving, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13630-13638.
- [148] V. Sharma, D. S. Lawrence, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 7290-7292.
- [149] A. T. Krueger, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 788-799.
- [150] M. E. Vázquez, J. B. Blanco, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1300-1306.
- [151] M. E. Vázquez, M. Nitz, J. Stehn, M. B. Yaffe, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10150-10151.
- [152] M. Sainlos, W. S. Iskenderian, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6680-6682.
- [153] P. Venkatraman, T. T. Nguyen, M. Sainlos, O. Bilsel, S. Chitta, B. Imperiali, L. J. Stern, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 222-228.
- [154] P. R. Schimmel, C. R. Cantor, *Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*, W. H. Freeman, **1980**.
- [155] G. Saroja, T. Soujanya, B. Ramachandram, A. Samanta, *J. Fluoresc.* **1998**, *8*, 405-410.
- [156] E. Krystkowiak, K. Dobek, A. Maciejewski, *J. Photochem. Photobiol., A* **2006**, *184*, 250-264.
- [157] M. Sajadi, T. Oberhuber, S. A. Kovalenko, M. Mosquera, B. Dick, N. P. Ernstring, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 44-55.
- [158] A. Maciejewski, E. Krystkowiak, J. Koput, K. Dobek, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 322-332.
- [159] M. Eugenio Vázquez, D. M. Rothman, B. Imperiali, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1965-1966.
- [160] T. Soujanya, R. W. Fessenden, A. Samanta, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3507-3512.
- [161] G. Weber, F. J. Farris, *Biochemistry* **1979**, *18*, 3075-3078.
- [162] K. Chiba, M. Asanuma, M. Ishikawa, Y. Hashimoto, K. Dodo, M. Sodeoka, T. Yamaguchi, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 8751-8754.
- [163] M. Merkel, L. Dehmel, N. P. Ernstring, H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 384-388.

-
- [164] J. Riedl, R. Pohl, N. P. Ernsting, P. Orsag, M. Fojta, M. Hocek, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2797.
- [165] K. Zhang, I. A. Ahmed, H. T. Kratochvil, W. F. DeGrado, F. Gai, H. Jo, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 5095-5098.
- [166] T. B. Shrestha, M. Kalita, M. R. Pokhrel, Y. Liu, D. L. Troyer, C. Turro, S. H. Bossmann, H. Durr, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1903-1909.
- [167] O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2380-2382.
- [168] E. V. Bocharov, P. E. Bragin, K. V. Pavlov, O. V. Bocharova, K. S. Mineev, A. A. Polyansky, P. E. Volynsky, R. G. Efremov, A. S. Arseniev, *Biochemistry* **2017**, *56*, 1697-1705.
- [169] T. Soujanya, R. W. Fessenden, A. Samanta, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3507-3512.
- [170] G. Kokotos, C. Tzougraki, *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 87-92.
- [171] J. Guy, K. Caron, S. Dufresne, S. W. Michnick, Skene, J. W. Keillor, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11969-11977.
- [172] J. E. T. Corrie, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 2975-2982.
- [173] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [174] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [175] B. Reis, Dissertation, Karlsruher Institut fur Technologie (Karlsruhe), **2017**.
- [176] R. Kumar, R. K. Arigela, S. Samala, B. Kundu, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 18828-18833.