Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Max Planck Institute for Polymer Research

Neuartige PDI-Chromophore für die selektive Reaktion mit Disulfidbrücken in Proteinen

Diplomarbeit:
Marco Lelle

Mainz, Juli 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Juli 2009 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Müllen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K. Müllen möchte ich dafür danken, dass er mir dieses interessante und faszinierende Forschungsthema gestellt hat. Seine wissenschaftliche Förderung, sowie die zahlreichen Anregungen haben mich stets motiviert.

Abkürzungsverzeichnis

5DI	Pentarylendiimid
Cys	Cystein
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung in ppm
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMF	*N*,*N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäuren
DTT	Dithiothreitol
FD	Felddesorption
FQY	Fluoreszenzquantenausbeute
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
G-Protein	Guaninnukleotid bindendes Protein
h	Stunden
HDI	Hexyrylendiimid
HPLC	high performance liquid chromatography
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante in Hz
K	Kelvin
m	Masse
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight
NHS	*N*-Hydroxysuccinimid
NIR	nahes Infrarot
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NTA	Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
p	para
PDI	Perylentetracarboxydiimid
PEG	Polyethylenglycol
ppm	parts per million
QDI	Quaterrylendiimid

RT	Raumtemperatur
s	Singulett
t	Triplett
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TCNQ	Tetracyanoquinodimethan
TDI	Terrylendiimid
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett
v	Wellenzahl in cm^{-1}
z	Ladung

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Funktionen von Proteinen 1

1.2 Markierung von Proteinen 2

1.2.1 Strategien zur Proteinmarkierung 3

1.2.2 Anwendungen der Proteinmarkierung 11

1.3 Funktionale Perylen-Chromophore 14

1.3.1 Farbe und Farbmittel 14

1.3.2 Rylen-Farbstoffe und -Pigmente 16

1.3.3 Perylen-Chromophore 18

1.3.4 Wasserlösliche Perylen-Chromophore 22

2 Motivation und Zielsetzung 25

3 Synthese und Charakterisierung der funktionalen PDI-Chromophore 29

3.1 Darstellung des Bissulfon-Reagenz 29

3.2 Darstellung des funktionalen, wasserlöslichen PDI-Chromophors 36

3.3 Synthese des wasserlöslichen Fluoreszenz-Interkalators 41

3.4 Synthese eines hydrophoben Fluoreszenz-Interkalators 45

4 Markierung des Peptids Somatostatin 55

5 Zusammenfassung 60

6 Ausblick 62

7 Experimenteller Teil 65

7.1 Instrumentelle Analytik 65

7.2 Allgemeine experimentelle Bedingungen 66

7.3 Beschreibung der Synthesen 67

7.3.1 Synthese der funktionalen PDI-Chromophore 67

7.3.2 Markierung von Somatostatin 79

8 Danksagung 80

9 Literatur 81

1 Einleitung

1.1 Funktionen von Proteinen

Proteine sind Biomakromoleküle, die aus Aminosäuren aufgebaut sind. Die Bandbreite an Proteinen ist genauso vielfältig, wie ihre Aufgaben. Diese Tatsache macht sie auch so überaus interessant, da sie an Zahlreiche Funktionen und komplexen Prozessen der Zelle beteiligt sind.

Proteine sind dazu in der Lage äußerst selektiv Zielmoleküle (Liganden) zu erkennen, zu binden und zu transportieren.[1] Zwei der prominentesten Beispiele hierfür sind zum einen der Sauerstofftransporter Hämoglobin und zum anderen der Kaliumkanal, der bei der Einstellung des Membranpotentials eine entscheidende Rolle spielt.[2-4] Die Funktion als molekularer Transporter zu wirken ist aber nur eine von vielen, die von Proteinen erfüllt wird.

Aufgrund der enormen kombinatorischen Vielfalt von Aminosäureresten in der Proteinsequenz kann ihre Oberfläche praktisch jede Form annehmen, die zur Erkennung und Bindung von Substanzen geeignet ist. Charakteristischerweise binden die Liganden (lat. *ligare*, binden), bei denen es sich um Kohlenhydrate, Nucleinsäuren, Lipide, aber auch andere Proteine oder Xenobiotika handeln kann, in Vertiefungen der Proteinoberfläche, wobei es häufig zu einer Konformationsänderung des betreffenden Proteins kommen kann. Dabei werden die Liganden über nichtkovalente Kräfte, wie zum Beispiel Wasserstoffbrücken, nur schwach gebunden, da die Proteine mit den Liganden nur vorrübergehend interagieren und diese auch wieder loslassen sollen.[5] Bei den Motorproteinen, wie zum Beispiel dem Myosin, wird diese Konformationsänderung dazu genutzt, um eine gerichtete Bewegung auszuführen.[6] Proteine sind also auch in der Lage, mechanische Arbeit zu leisten. Ein spezieller Fall der Ligandenbindung findet bei den Enzymen statt, die an ihrer Substratbindungsstelle, dem sogenannten aktiven Zentrum, die Liganden nicht nur binden, sondern als molekularer Katalysator diese auch verändern können. Sie sind dazu in der Lage Reaktionen um den Faktor 10^6 zu beschleunigen. Mitunter kann ihre Aktivität jedoch stark vom Vorhandensein von Cofaktoren, bei denen es sich um Metallionen oder organische Moleküle, wie Vitamine, handeln kann, abhängen.[1, 7]

Neben der nichtkovalenten Ligandenbindung, kann es auch zu kovalenten Modifikationen kommen. Dabei werden die Proteine unter anderem durch Kinasen phosphoryliert, wodurch sie ihre Eigenschaften verändern. Natürlich können Ligandenbindungen und Modifikationen nicht nur aktivierende, sondern auch hemmende Auswirkungen haben. So können Vorgänge

wie die Transkription oder der Glykogenabbau reguliert werden.[8] Dies hat sich die Pharmaindustrie zu nutzen gemacht, wodurch synthetische Liganden eine herausragende therapeutische Bedeutung erlangt haben.[1, 5]

Bei der Signaltransduktion nimmt ebenfalls eine Reihe von Proteinen teil, die dafür zuständig sind, dass Signale aufgenommen, verarbeitet und letztendlich weitergeleitet werden. Dabei wird die Signalaufnahme durch Transmembranproteine, welche die Funktion eines Rezeptors ausüben, bewerkstelligt. Aber auch das eigentliche Signalmolekül, welches wie ein Ligand fungiert, kann ein Protein sein. Wie beispielsweise Insulin oder Glucagon, die eine unverzichtbare Rolle bei der Regulation des Blutzuckerspiegels einnehmen. Durch ein eingehendes Signal findet dann eine Konformationsänderung des Transmembranrezeptors statt, wodurch eine Reihe anderer Proteine, wie unter anderem die G-Proteine, und auch Enzyme aktiviert werden. Diese können sekundäre Botenstoffe freisetzen, die zum Beispiel für die Expression von Genen von besonderer Bedeutung sind.[1, 7, 9, 10]

Proteine besitzen als Strukturträger ebenfalls eine wichtige Aufgabe, wie zum Beispiel als Bestandteil des Bindegewebes, welches als Halte- und Stützapparat die Skelettmuskulatur mit dem Knochen verbindet. Oftmals können auch mehrere Proteine zusammenwirken und dem Material dadurch seine außergewöhnlichen Eigenschaften geben. Im Falle des Bindegewebes gibt es auch ein Zusammenspiel von mehreren Proteinen, Elastin sorgt in Form eines molekularen „Expanders“ für die notwendige Flexibilität, Kollagen für die Stabilität des Gewebes. Proteoglykane verhindern Kompression und die Adhäsionsproteine, wie beispielsweise Laminin und Fibronectin, wirken als Vermittler für die Zellanheftung.[11] Ein derartiges Zusammenspiel muss jedoch nicht gleichzeitig stattfinden, sondern kann auch in Form einer Kaskade ablaufen. Dies ist beispielsweise bei der Blutgerinnung der Fall. Durch eine Gefäßverletzung werden nacheinander verschiedene Proteinfaktoren aktiviert, die letztendlich dafür sorgen, dass das Faserprotein Fibrin vernetzt und eine Wunde verschlossen wird.[1, 7]

Man kann also die Proteine als „Arbeitspferde“ der Biochemie betrachten, da sie an nahezu allen biologischen Prozessen beteiligt sind.[7]

1.2 Markierung von Proteinen

Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften von Proteinen, ist das Interesse groß darüber mehr zu erfahren oder die entsprechenden Eigenschaften gar zu verbessern. Um über deren Funktionen oder Wege in der Zelle mehr Wissen zu erlangen, können Proteine modifiziert werden. Diese Verknüpfung kann es unter anderem ermöglichen Proteine in einer Zelle

sichtbar zu machen, dabei erfolgt die Markierung sowohl kovalent als auch nicht kovalent. Die Spezifität und Selektivität der Markierungsreaktion kann dabei mitunter stark variieren. Natürlich werden auch gewisse Anforderungen an den Marker gestellt, da dieser unter anderem stabil, nicht cytotoxisch und die Proteinstruktur verändernd sein soll.

1.2.1 Strategien zur Proteinmarkierung

1.2.1.1 Unspezifische Markierungsstrategien

Die Möglichkeiten ein Protein zu markieren sind beinahe so vielfältig wie die Proteine selbst. Der wohl einfachste Weg ein Protein zu funktionalisieren besteht darin, die verfügbaren funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten für die chemische Modifikation zu nutzen. Hierbei wird gleichzeitig noch eine hohe Variabilität an funktionellen Gruppen bereitgestellt, wie unter anderem die Carboxy-Gruppen von Aspartat und Glutamat, die Amino-Gruppe des Lysin oder Hydroxy-Funktion von Serin.

Reaktive Gruppen, welche in der Lage sind mit den Aminogruppen der Biomoleküle zu reagieren, stellen die am weitesten verbreitete Methode zur Proteinmarkierung dar.[12] Dafür werden in der Regel Isothiocyanate und NHS-Ester verwendet.

Die Isothiocyanate reagieren dabei auch mit Thiolresten als Nukleophil, durch das Arbeiten in alkalischem Milieu findet jedoch ausschließlich die Reaktion mit den primären Aminogruppen der Lysin-Seitenketten statt.[13] Durch den nukleophilen Angriff des Aminstickstoffs auf den elektrophilen Kohlenstoff des Isothiocyanates wird ein N-substituiertes Thioharnstoffderivat erhalten (Abbildung 1).

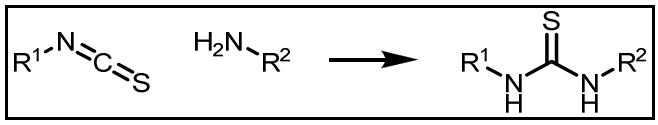


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen primärem Amin und Isothiocyanat zum *N*,*N'*-Dialkylthioharnstoff

Die heutzutage jedoch geläufigere Methode zur Markierung von Aminogruppen in Proteinen ist die Verwendung der *N*-Hydroxysuccinimidester. Die NHS-Ester reagieren mit dem Nukleophil unter Bildung der *N*-Acylierten Verbindung, dem Amid, und der Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid (Abbildung 2).[12, 14]

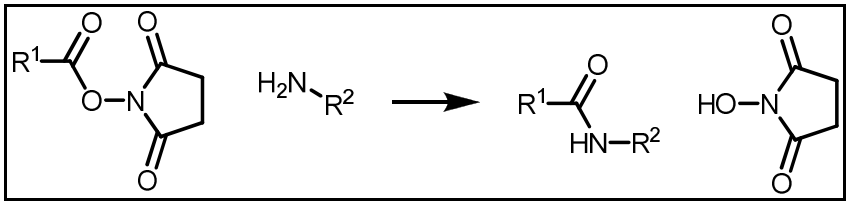


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen primärem Amin und NHS-Ester zum Amid

Die Reaktion des *N*-Hydroxysuccinimidesters mit anderen Nukleophilen des Proteins, wie Thiol- und Hydroxylgruppen, findet ebenfalls statt. Diese Reaktion liefert allerdings keine stabilen Verbindungen, da beispielsweise der mit Hydroxylgruppe gebildete Ester im Gegensatz zum Amid sehr leicht hydrolysiert werden kann.[12, 15, 16] Somit wird als Reaktionsprodukt nahezu ausschließlich das *N*-Acylierte Amin erhalten.
Darüberhinaus können auch andere Seitenketten der Aminosäuren zur Markierung von Proteinen genutzt werden, wie das Thiol des Cysteins. Dabei werden zur Markieung Verbindungen verwendet, die ein Maleinsäureimid (Maleimid) als funktionelle Gruppe tragen.[17] Das Thiol als weiches Nukleophil reagiert mit der Doppelbindung des Maleimids in einer Michael-Addition an, wobei ein stabiler Thioether entsteht (Abbildung 3).

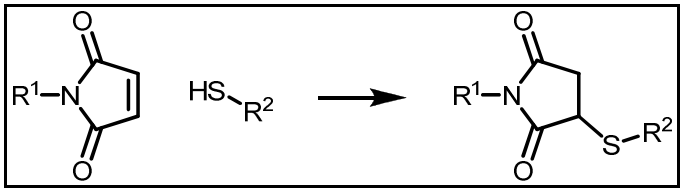


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen Maleimid und Thiol zum Michael-Additions-Produkt

Die Reaktion des Maleimids mit einem Thiolrest kann in einem pH Bereich von 6.5-7.5 selektiv durchgeführt werden. Bei einem pH Wert von 7, ist die Reaktion des Maleimids mit dem Thiol im Vergleich zum Amin um den Faktor 1000 begünstigt.[18, 19] Wenn die Reaktion jedoch bei höheren pH Werten durchgeführt wird, finden allerdings häufig auch Reaktionen mit den Aminogruppen statt.[20] Durch die pH Wert Abhängigkeit erhält die Reaktion also Selektivität und die Konkurrenzreaktion mit den Aminen des Lysins kann unterdrückt werden.

Der Nachteil der bisher beschriebenen Markierungsstrategien ist jedoch, dass sie weitgehend unspezifisch gegenüber ihrem Zielmolekül, dem Protein, reagieren. Die Ursache hierfür liegt in der relativ komplexen Struktur der Proteine, welche durch die Faltung aufgrund des hydrophoben Effekts entsteht.[7] Dadurch können bei einem großen Protein zumeist nur die funktionellen Gruppen erreicht werden, die sich auf dessen Oberfläche befinden. Weiterhin von Nachteil ist gleichzeitig die große Anzahl derselben funktionellen Gruppen, so dass in der Regel eine statistische Reaktion stattfindet, wobei ein weitgehend heterogenes Produktgemisch gebildet wird. Dafür verantwortlich ist unter anderem die Größe des Markierungsmoleküls, denn befinden sich zwei funktionelle Gruppen des Proteins in räumlicher Nähe, kann bei Verwendung eines großen Markers aufgrund der sterischen Abschirmung häufig nur eine funktionelle Gruppe genutzt werden.

1.2.1.2 Spezifische Markierungsstrategien

In der letzten Zeit wurde eine Reihe von Methoden entwickelt um Proteine äußerst spezifisch zu funktionalisieren. Hierbei spielen rekombinante Proteine eine entscheidende Rolle. Diesen wird zunächst durch gezielte genetische Modifikation, einer sogenannten Punktmutation, eine Peptidsequenz angeheftet, an der letztendlich die Markierung stattfindet. Wobei die eingefügte Peptidsequenz natürlich auch der Marker selbst sein kann.[21-23] Die angefügte Peptidsequenz, die auch als tag bezeichnet wird, soll dabei so gewählt werden, dass die Tertiärstruktur des Proteins nicht gestört wird. Gleichzeitig wird der tag auf der Oberfläche des Proteins präsentiert, um eine einfache Markierung zu ermöglichen.
Eine Peptidsequenz, die häufig für die Markierung angeknüpft wird, ist ein α-Helix-Motiv, welches an der Stelle i, i +1, i +4 und i +5 jeweils einen Cysteinrest trägt.[22-24] Zwischen den Cysteinresten wird meistens noch Prolin als Helixbrecher eingefügt, was die Struktur für die Reaktion mit dem Marker optimiert.[25] Die vorhandenen Cysteinreste werden für die kovalente Bindungsknüpfung mit kleinen Molekülen genutzt, die zwei Dithioarsolan Funktionen tragen, welche für die Anbindung an den Schwefel veranteortlich sind (Abbildung 4).[26]

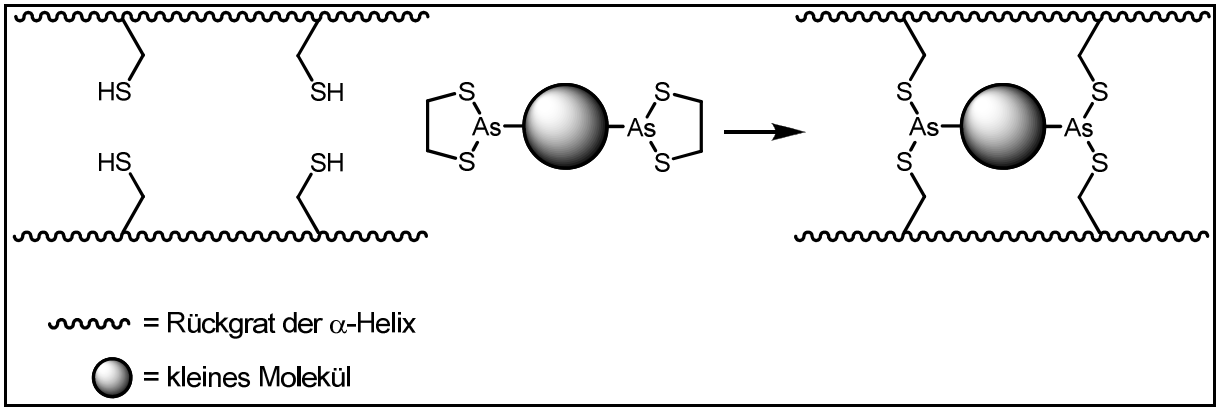


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen bis-Dithioarsolanverbindung und den Thiolen der Peptidsequenz

Der Nachteil bei der Verwendung dieser Arsenverbindungen ist deren hohe Toxizität, da sie unter anderem auch an den Cofaktor Liponsäure binden, der ebenfalls nahe beieinander liegende Cysteinreste besitzt. [22, 23]

Einem ähnlichen Reaktionsmechanismus folgt die Reaktion von bis-Boronsäure-verbindungen mit rekombinanten Proteinen, die ein Tetraserinmotiv, wie beispielsweise SSPGSS, besitzen (Abbildung 5).[27]

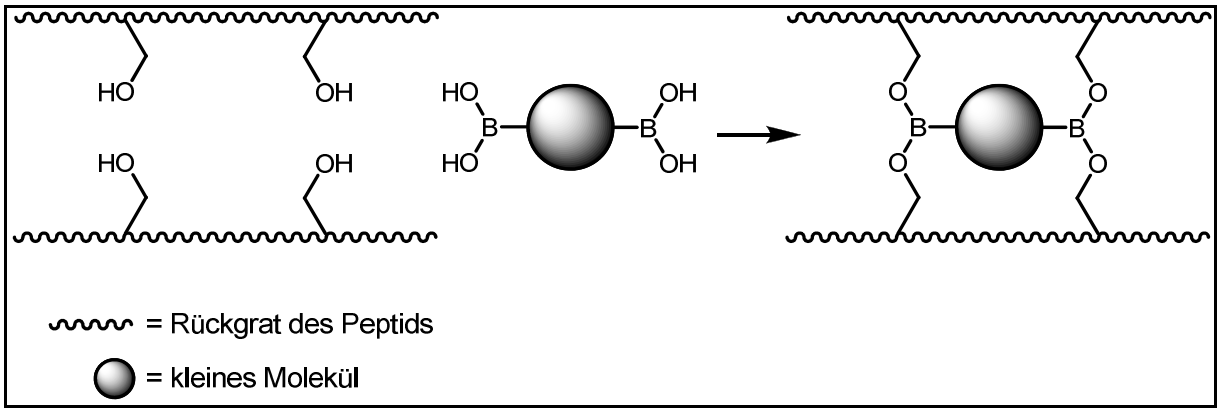


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen bis-Boronsäureverbindung und den Hydroxy-Gruppen der Peptidsequenz

Seit den 1950er Jahren ist es bekannt, dass Boronsäuren mit Polyolen, die Boronsäureester bilden. Dabei geht von den verwendeten Boronsäuren, im Vergleich zu den Dithioarsolanen, die wesentlich geringere Toxizität aus.[27]

Rekombinante Proteine können nicht nur durch kovalente Modifikationen markiert werden, sondern auch durch Ausbildung von Metall-Komplexen. Dabei werden die Liganden durch Aminosäureseitenketten der genetisch angefügten Peptidsequenz und vom eigentlichen Marker, der auch das Metallzentrum trägt, bereitgestellt.[25]

Für die nicht kovalente Markierung gibt es zahlreiche Möglichkeiten. Eine davon nutzt die Ausbildung eines Nickelkomplexes in Gegenwart von Oligohistidinen. Hierbei wird zunächst eine Oligohistidinsequenz mit etwa sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten, der sogenannte „His-tag“, in die Proteinsequenz eingefügt.[28] Dieser His-tag kann in Gegenwart von Ni^{2+} Ionen zur Ausbildung eines Komplexes mit Molekülen genutzt werden, die eine Nitrilotriessigsäure (NTA) Gruppe tragen (Abbildung 6).[29, 30]

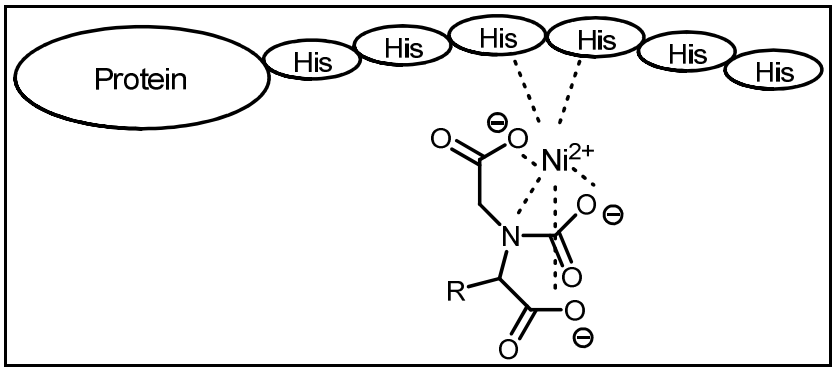


Abbildung 6: Schematische Darstellung des markierten Proteins mit Oligohistidin- NTA-Ni^{2+} Komplex

Die Anwendung des Systems bringt jedoch zwei Probleme mit sich, zum einen ist die Komplexstabilität nicht allzu hoch und zum anderen sind Ni^{2+} Ionen toxisch, da sie ein Kontaktallergen sind und krebserzeugende Wirkung besitzen. Deshalb wurden jüngst Ni^{2+} Ionen gegen Zn^{2+} Ionen getauscht, die physiologisch unbedenklich sind.[25]

Bei einer weiteren Möglichkeit der nicht kovalenten Markierung wird an das Protein zunächst ein Oligoaspartatrest angefügt. Dieser bildet mit einem kleinen Molekül, das einen multinuklearen Zn^{2+} Komplex trägt, die vollständige Metall-Chelat Verbindung aus (Abbildung 7). Je mehr Aspartatreste das Peptid bilden um so höher ist die Bindungsaffinität zum Metall.[25, 31]

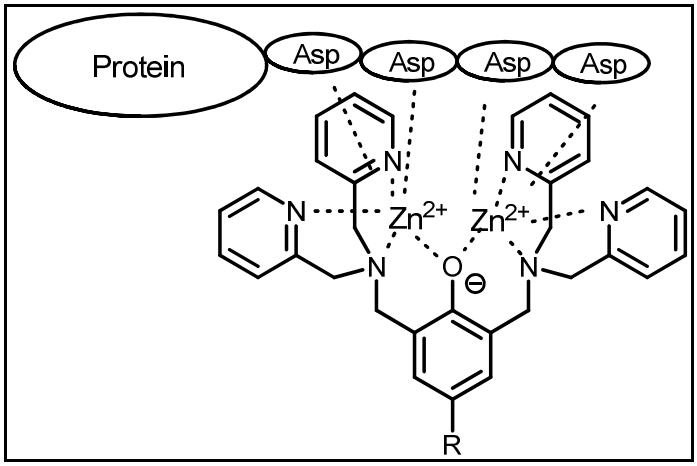


Abbildung 7: Schematische Darstellung des markierten Proteins mit Oligoaspartat- Zn^{2+} Komplex

Als Zentralatome können auch Metalle der Lanthanid-Reihe eingesetzt werden, für die natürlich auch wieder eine bestimmte Peptidsequenz (ACADYNKDGWYEELECAA) mit hoher Affinität hergestellt werden muss.[25, 32]

Obwohl die Anwendung der rekombinanten Proteine hoch spezifisch ist, hat sie den Nachteil, dass die Technik jedoch sehr anspruchsvoll und teuer ist.[33] Da der Aufwand für die Proteindarstellung, durch Klonierung, Transformation und Aufreinigung sehr groß ist und viele Schritte benötigt.

Neben den eingefügten Peptidsequenzen die zur späteren Markierung dienen, können mittels rekombinanten Proteinen auch nicht natürliche Aminosäuren mit Hilfe der uppressor *tRNA Technologie* eingeführt werden.[34] Dabei kann die nicht natürliche Aminosäure den eigentlichen Marker selbst darstellen oder zur Markierung genutzt werden.[35, 36]

Eine weitere Methode für die spezifische Markierung von Proteinen ist die sogenannte native chemische Ligation.[37-39] Bei dieser Methode werden Proteine oder Peptide, die ein N-terminales Cystein besitzen mit Verbindungen (R^1), die einen Thioester tragen, markiert (Abbildung 8). Da nicht jedes Protein ein N-terminales Cystein trägt, werden häufig auch rekombinante Proteine verwendet, man spricht dabei dann auch von exprimierter chemischer Ligation.[38]

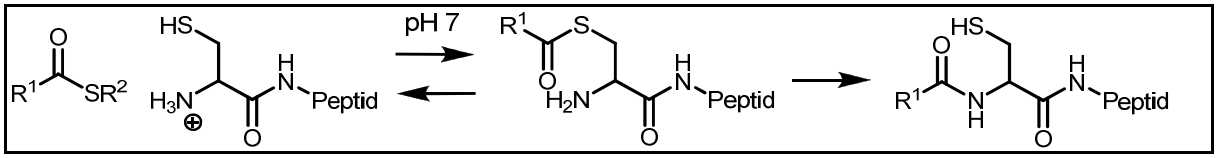


Abbildung 8: Native chemische Ligation

Zur Ausbildung der neuen Amidbindung wird zunächst der neue Thioester mit dem Thiol des Cysteins gebildet. Dieser liefert durch spontane Umlagerung irreversibel das Amid.[39]

Eine äußerst interessante Variante zur spezifischen kovalenten Markierung ist die Verwendung von Disulfidbrücken in Proteinen. Dafür wird eine Bissulfon-Verbindung verwendet, die nach Eliminierung von zwei *p*-Toluylsulfinsäuremolekülen einen doppelten Michael-Akzeptor darstellt.[40] Bei großen Proteinen muss natürlich die Voraussetzung erfüllt sein, dass die Disulfidbindung zugänglich ist.[41] Weiterhin hat diese Markierungsmethode den Vorteil, dass Struktur und Funktion des Proteins erhalten bleiben, da diejenigen Disulfidbrücken, die leicht zugänglich sind keinen großen Einfluss auf die Stukturintegrität aufweisen.[33, 40]

Für die Markierung muss zunächst die Disulfidbrücke reduziert werden. Dies wird mit den Reagenzien, wie Dithiothreitol (DTT) oder Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) erreicht.[42] Gleichzeitig wird bei dem Bissulfon, welches ein stark acides Proton trägt, im basischen Medium ein Molekül *p*-Toluylsulfinsäure eliminiert. Hierbei erhält man das Monosulfon, welches mit dem ersten Cystein in einer Michael-Addition reagiert und anschließend ein weiteres Molekül *p*-Toluylsulfinsäure eliminiert. An der wieder neu generierten Doppelbindung findet nun erneut eine Michael-Addition durch das weitere Cystein statt und liefert so das markierte Protein (Abbildung 9).[33, 40, 43]

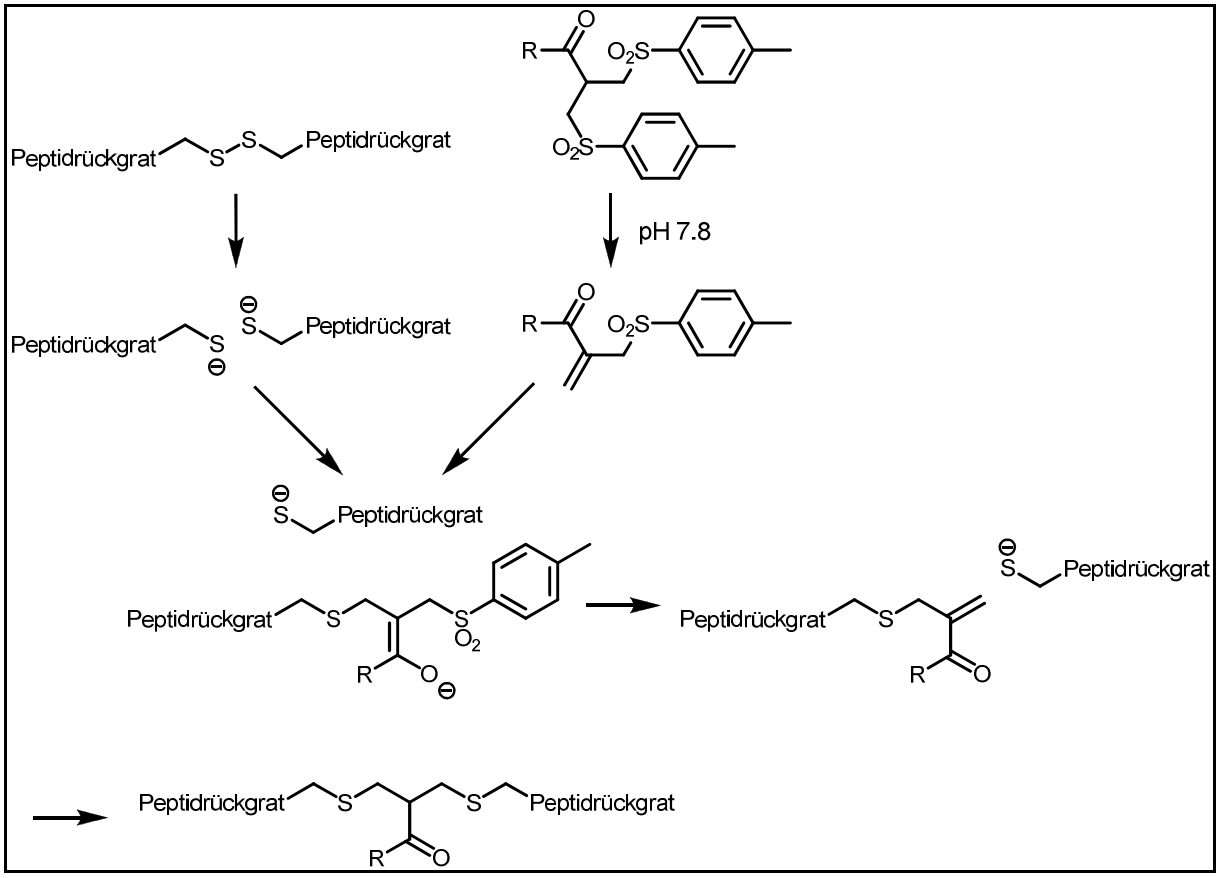


Abbildung 9: Schematische Darstellung für die Markierung von Disulfidbrücken in Proteinen

Zwischen der ursprünglichen Disulfidbrücke wird durch die zweifache Michael-Addition nun eine aus drei Kohlenstoffatomen bestehende „Brücke“ eingefügt. Dadurch bleiben die Cysteinreste in räumlicher Nähe was für den Erhalt der Stuktur und letztendlich auch der Funktion, wie beispielsweise der enzymatischen Katalyse, notwendig ist.[33, 43]

Nach dem Öffnen des Disulfids ist es ebenfalls nötig, dass die Cysteinreste sich relativ nahe beieinander befinden, da theoretisch die unerwünschte Zweifachmarkierung stattfinden könnte (Abbildung 10).

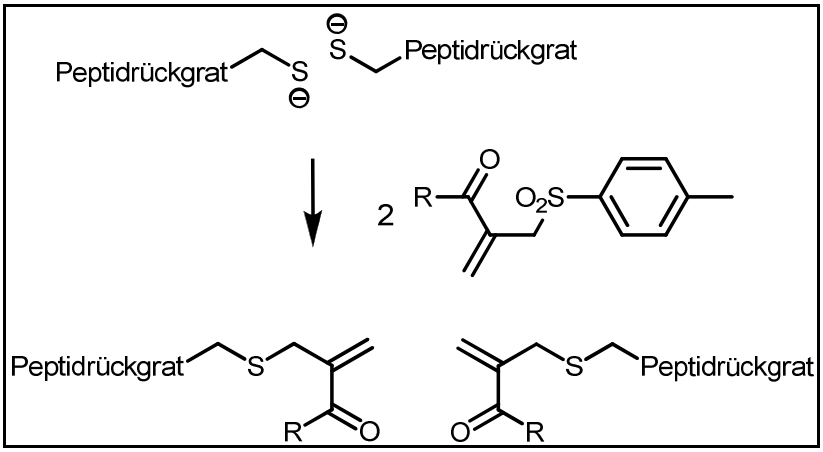


Abbildung 10: Zweifachmarkierung einer Disulfidbrücke

Die räumliche Nähe ist ein entscheidender Faktor, da auch bei einer Einfachmarkierung durch eine zu große Distanz keine zweite Michael-Addition möglich wäre. Prinzipiell wäre es auch möglich, dass nach der ersten Addition ein Cysteinrest eines zweiten Proteins addiert wird, dies ist aber aufgrund der Größe der Proteine unwahrscheinlich.

1.2.2 Anwendungen der Proteinmarkierung

Durch die Markierung von Proteinen können diese für zahlreiche Anwendungen nutzbar gemacht werden. Die Struktur und die Funktion des Proteins, beziehungsweise die Aktivität bei Enzymen, bleibt durch die Markierung aber dennoch erhalten. Jedoch kann es durch den Marker zu Änderungen der Eigenschaften des Protein-Konjugates kommen.

Durch die Einführung einer Polyethylenglycolkette mittels selektiver Markierung der Disulfidbrücke durch ein PEG-Bissulfon, können die Eigenschaften von Proteinen, wie unter anderem Interferon α-2b, zur therapeutischen Anwendung verbessert werden (Abbildung 11). Die PEGylierten Proteine zeichnen sich durch eine gesteigerte Stabilität und somit auch durch eine gesteigerte Halbwertszeit aus.[40, 43-45]

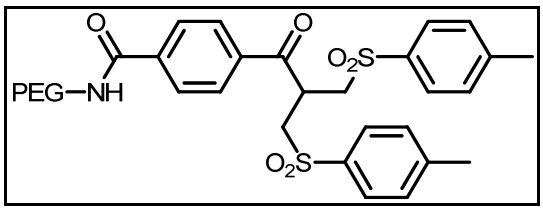


Abbildung 11: PEG-Bissulfon zur Markierung von Disulfidbrücken in Proteinen und Peptiden

Eine andere Art der Markierung bei der eine signifikante Änderung der Eigenschaften des Proteins stattfindet, passiert jeden Tag im menschlichen Körper. Denn durch O- und N-Glykosilierung der Proteine und Peptide im endoplasmatischen Reticulum und Golgi-Komplex, erlangen diese mehr Hydrophilie, um besser transportiert werden zu können. Weiterhin erfüllt die Kohlenhydrathülle die Aufgaben, als Schutz und Erkennungsmerkmal zu fungieren und ist ebenfalls für die korrekte Proteinfaltung unerlässlich.[7]
Spezifische Proteinmarkierung spielt bei der Aufreinigung von rekombinanten Proteinen durch Metallchelat-Affinitätschromatographie eine wichtige Rolle.[25] Hierbei werden die mit einem His-tag versehenen Proteine an ein Säulenmaterial gebunden, welches den Ni^{2+}/NTA Komplex trägt, während die Verunreinigungen herausgewaschen werden. Anschließend kann das reine Protein mit einer Imidazol-Lösung eluiert werden. Dieses Verfahren ist von großer Bedeutung zur Darstellung hochreiner rekombinanter Proteine, wie zum Beispiel Erythropoetin, welche auch bei der Herstellung von Medikamenten eingesetzt werden.[1]
Die native chemische Ligation als Markierungsstrategie ist für die Darstellung synthetischer Proteine von besonderer Bedeutung. Ist der Marker nämlich selbst ein Protein oder Peptid kann das ursprüngliche Protein dementsprechend verlängert werden (Abbildung 12).[37, 39]

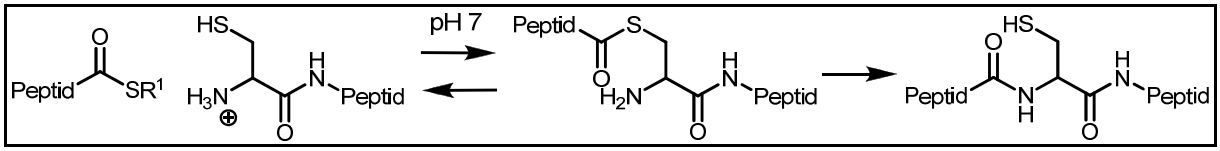


Abbildung 12: Synthese von Proteinen durch native chemische Ligation

Eine der häufigsten und wertvollsten Anwendungen ist die Markierung von Proteinen mit fluoreszierenden Verbindungen. Die bekanntesten Verbindungen, die hierfür verwendet werden sind natürlich die Fluoreszenzfarbstoffe, wie Fluoresceine, Rhodamine, Perylene, Cyanine, Oxazine und andere, Quantenpunkte oder aber das grün fluoreszierende Protein (GFP) (Abbildung 13, 14). [21, 25, 46, 47] Die Möglichkeiten den Fluoreszenzfarbstoff dem Protein hinzuzufügen sind dabei äußerst vielfältig. Dabei können die unspezifischen Markierungsmethoden über NHS-Ester, Isothiocyanate und Maleimide verwendet werden. [46, 48] Aber auch die spezifischen Methoden wie das kovalente und nicht kovalente markieren rekombinanter Proteine oder die native chemische Ligation können zur Markierung verwendet werden.[25, 30, 35, 47]

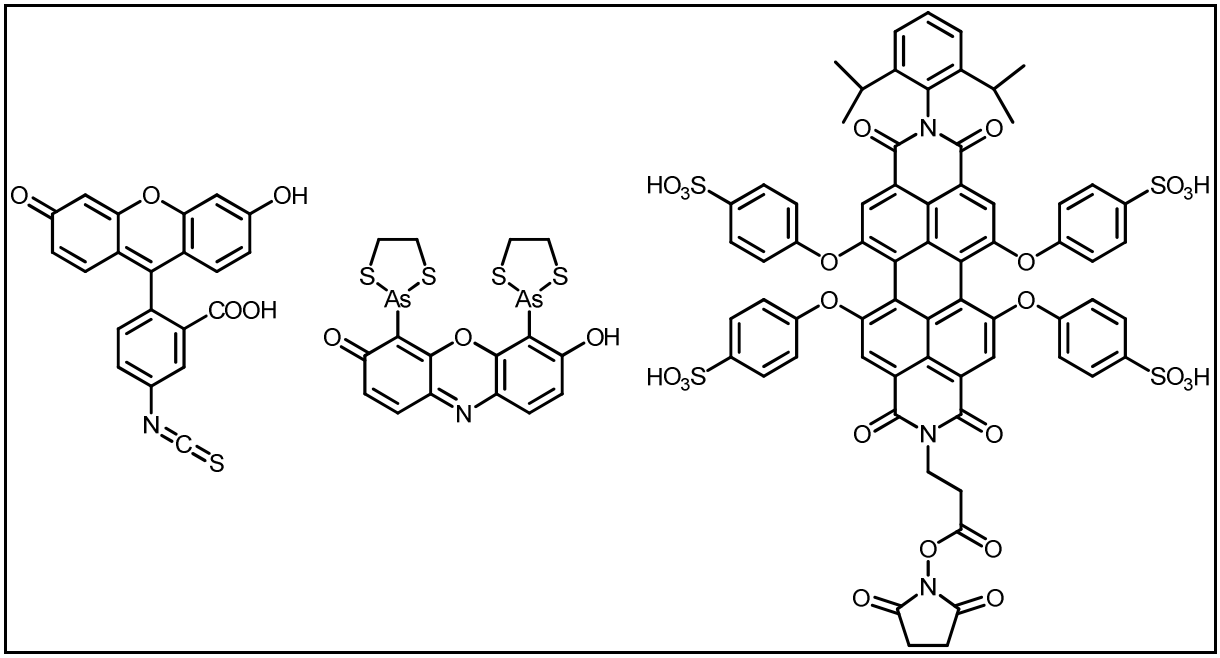


Abbildung 13: Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung von Proteinen

Das grün fluoreszierende Protein wird über rekombinante Synthese oder chemische Ligation mit dem Zielprotein verbunden.[22, 39] In den letzten Jahren hat sich das GFP als nützliche Alternative zu den synthetischen Farbstoffen erwiesen, da es in situ Markierung von Proteinen ermöglicht und mit 80 % eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute aufweist. Problematisch bei der Markierung mit GFP ist allerdings dessen Größe, die mit 238 Aminosäuren und einem Gewicht von etwa 26.9 kDa, sehr hoch ist. Dasselbe gilt für die Funktionalisierung mit Quantenpunkten, die ebenfalls aus großen Partikeln bestehen.[30] Dadurch kann es zu Störungen bei der Faltung des Zielproteins kommen, was wiederum die Aktivität entscheidend beeinflussen kann.[22, 23, 25]

Abbildung 14: Grün fluoreszierendes Protein[49]

Die so markierten Proteine stellen damit wichtige Werkzeuge für die Fluoreszenzmikroskopie und Einzelmolekülspektroskopie dar.[46] Diese ermöglicht unter anderem die Visualisierung und Lokalisierung der Proteine in Zellen. Weiterhin können somit neue Erkenntnisse zur Proteindynamik und Wechselwirkung mit anderen Biomolekülen gewonnen werden. Somit kann unter anderem die Aufklärung von komplexen biologischen Prozessen bewerkstelligt werden.[50] Bei der Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie hat man die Vorteile, dass es sich um eine nicht invasive Methode handelt und dass das Fluoreszenzsignal hoch sensitiv und spezifisch ist.[51]

1.3 Funktionale Perylen-Chromophore

1.3.1 Farbe und Farbmittel

Das Farbensehen basiert auf einem Zusammenspiel von physikalischen, chemischen, physiologischen und psychologischen Prozessen. Dabei liegt der sichtbare Bereich des elektromagnetischen Spektrums in einem Wellenlängenbereich von 400-700 nm. Farbstoffe werden durch ihre Fähigkeit Licht im sichtbaren Bereich zu absorbieren oder zu emittieren charakterisiert. Wenn Licht auf die Retina des menschlichen Auges trifft, wird daraufhin ein photochemischer Prozess initiiert. Dieser komplexe neurochemische Informationstransfer zwischen Auge und Gehirn führt letztendlich zur eigentlichen Farbwahrnehmung. Farben haben für die Menschheit schon immer eine wichtige Rolle gespielt, sie beeinflussen unsere

Emotionen, können aber auch Mittel der Kommunikation sein. Natürlich hat der Reiz der Farben auch einen erheblichen wirtschaftlichen Aspekt, womit die Synthese von Farbstoffen auch einen wesentlichen Anteil an der industriellen Revolution des 19. Jahrhunderts hatte. Aber auch in der frühen Geschichte der Menschheit wurden Farbstoffe verwendet, wie unter anderem die Höhlenmalereien belegen. Neben den Farbstoffen sind auch die Pigmente als farbige Verbindungen zu nennen. Im Gegensatz zu den Farbstoffen sind die Pigmente kleine Partikel, die in ihrem Anwendungsmedium praktisch unlöslich sind.[52] Die Farbe eines Stoffes wird durch seine spezifische Absorption des Lichtes bei einer bestimmten Wellenlänge erzeugt. Dies führt zu Absorptionsbanden mit typischen Maxima und Minima im sichtbaren Spektrum. Ein Stoff der im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 430 nm absorbiert, erscheint für das menschliche Auge gelb. Analog führen Absorptionsbanden bei 430-480, 480-550, 550-600 und 600-700 nm dazu, dass der Stoff orange, rot, violett oder respektive blau erscheint (Abbildung 15).[53]

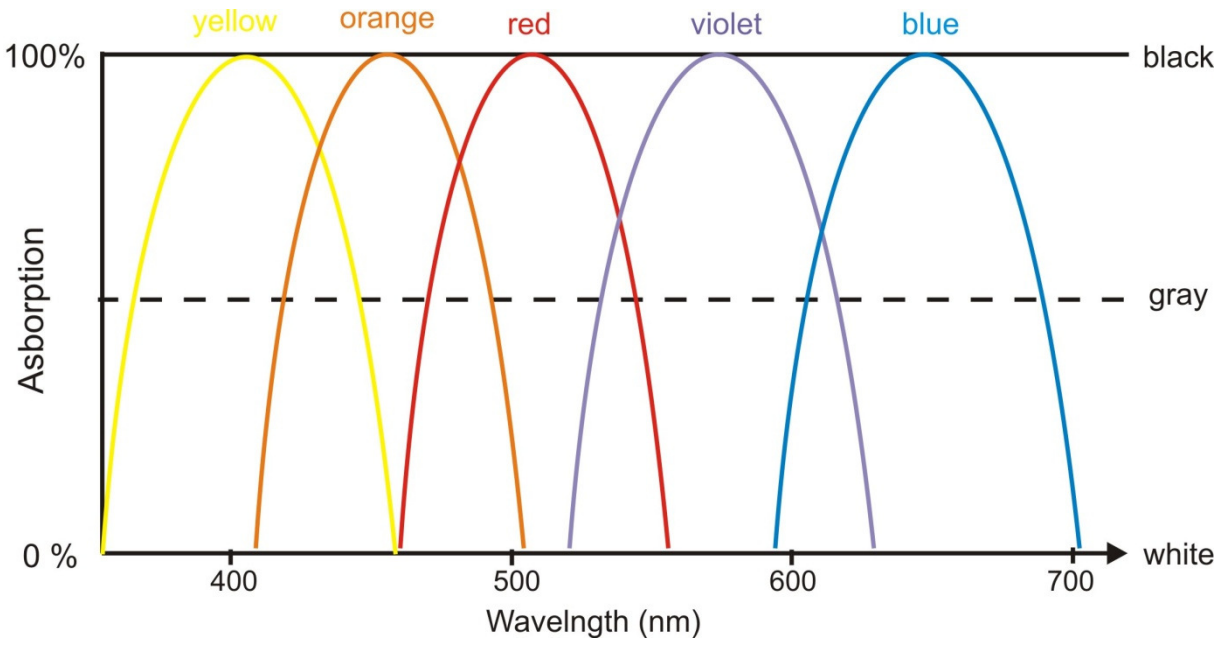


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Lichtabsorption von farbigen Stoffen[54]

Die Wahrnehmung der Farbe hängt jedoch nicht nur von der absorbierten Wellenlänge ab, sondern die Form der Absorptionsbanden spielt auch eine wichige Rolle. Je schmaler und steiler die Bande ist, desto reiner und brillianter erscheint die Farbe.

In der jüngsten Zeit ist man immer mehr daran interessiert sogenannte funktionelle Farbstoffe zu entwickeln. Bei diesen hochspezialisierten Farbmitteln stehen nicht mehr nur deren ästhetische Erscheinung im Vordergrund, sondern auch die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Materials, wie Lichtemission, photoelektrische und photochemische Aktivität, ebenso wie lichtinduzierte Polarisation. Die Triebkraft für die Entwicklung dieser neuen Verbindungen sind die rasanten Fortschritte, die auf dem Gebiet der Materialforschung, Mikroelektronik, Lasertechnik und Molekularbiologie erzielt werden. Somit reicht die klassische Definition für den Farbstoff, als eine Verbindung, die im sichtbaren Teil des Spektrums einen gewissen Wellenlängenbereich selektiv absorbiert nicht mehr aus. Vielmehr zählen auch Verbindungen, die im ultravioletten beziehungsweise im nahen Infrarotbereich absorbieren, zu den funktionellen Farbstoffen, so dass heute unter einem funktionellen Farbstoff eine chemische Verbindung verstanden wird, die elektromagnetische Strahlung durch Elektronenanregung absorbieren kann.[55]

1.3.2 Rylen-Farbstoffe und -Pigmente

Unter Rylenfarbmitteln werden alle Farbmittel zusammengefasst, deren chromogenes System aus in der *peri*-Position verknüpften Naphtalineinheiten aufgebaut ist. Sie können demnach auch als poly(*peri*-Naphtalin) bezeichnet werden (Abbildung 16).

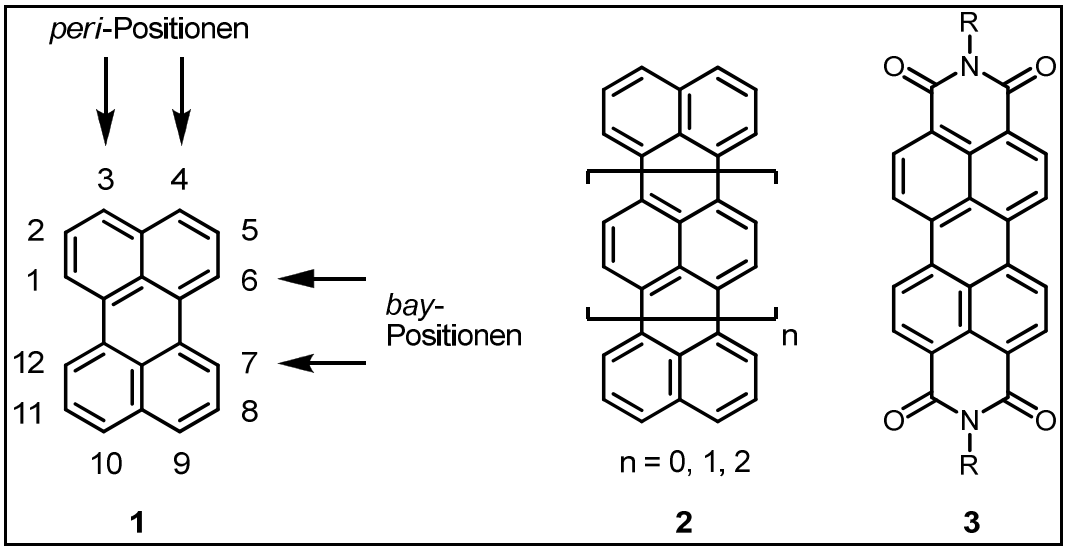


Abbildung 16: Nomenklatur des Perylens **1**, allgemeine Struktur der höheren Homologen **2** und der Perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimide **3**

Das niedrigste Homologe der Rylenreihe, das Perylen **1**, ist auch gleichzeitig der wichtigste Vertreter dieser Farbstoffklasse. Die nächst höheren Homologen sind das Terrylen mit n = 1 und das Quaterrylen mit n = 2.

Die Perylene und die Perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimide (PDI) gehören zur Klasse der Hochleistungsfarbstoffe und –pigmente.[52] Sie zeichnen sich durch eine herausragende Licht- und Wetterechtheit, Hochtemperaturbeständigkeit und überaus große Resistenz gegenüber Säuren und Basen aus.[56-58] Aufgrund ihrer Eigenschaften eignen sie sich daher gut für Dispersionsfarben und Lacke, vorzugsweise in der Automobilindustrie. Sie werden aber auch als Hochtechnologie Materialien in optoelektronischen Anwendungen, wie Solarzellen, Feldeffektransistoren, optischen Schaltern, Flüssigkristall-Displays, Licht emittierenden Dioden und Farbstofflasern eingesetzt.[59-62] Auf molekularbiologischer Ebene werden sie ebenfalls eingesetzt um Zellen anzufärben oder Proteine zu markieren.[46, 63, 64]

Die höheren Homologen der Rylenreihe belegen Schlüsselrollen im Bereich der Einzelmolekülspektroskopie (Terrylendiimide) und NIR Absorber (Quaterrylendiimide). [65-67] Sie zeigen ähnliche thermische, chemische und photochemische Stabilität, wie die Perylen-Derivate. Die Synthese der Quaterrylentetracarbonsäurediimide geht auf H. QUANTE aus der Arbeitsgruppe von Professor K. MÜLLEN zurück.[67]

Die Absorptionsspektren der Rylendiimide werden durch die Erweiterung des π-Systems um eine Naphthalineinheit bathochrom verschoben und die entsprechenden Extinktions-koeffizienten steigen nahezu linear an (Abbildung 17). Die Fluoreszenzquatenausbeute nimmt jedoch drastisch ab, während bei den Terrylendiimiden (TDI) diese noch bei etwa 90% liegt, beträgt die Fluoreszenzquantenausbeute für die Quaterrylendiimide (QDI) nur noch 5%. Die weiteren höheren Homologen Penta- und Hexarylendiimide erscheinen aufgrund ihrer Absorptionsmaxima im infraroten Bereich für das menschliche Auge farblos.

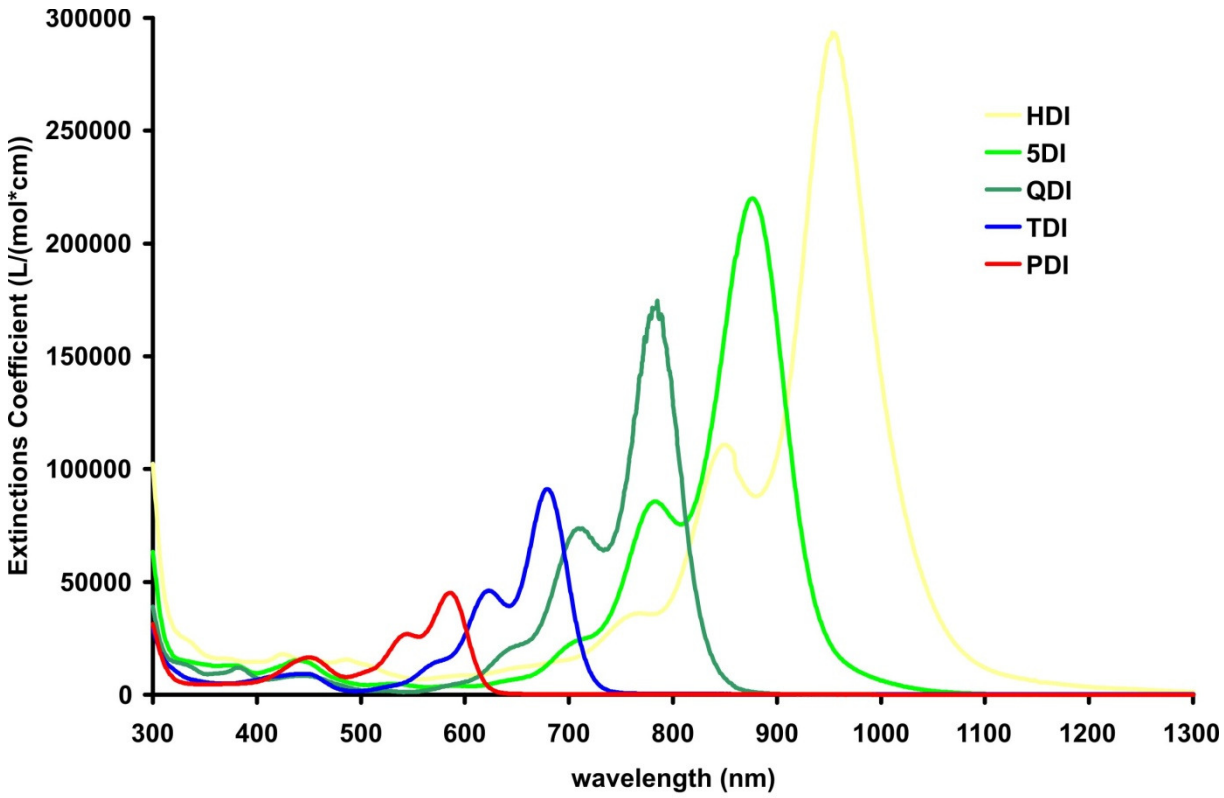


Abbildung 17: UV/Vis Absorptionsspektren der Rylendiimidreihe: Perylendiimid (PDI), Terrylendiimid (TDI), Quaterrylendiimid (QDI), Pentarylendiimid (5DI) und Hexarylendiimid (HDI)[68]

1.3.3 Perylen-Chromophore

Die technische Synthese von Perylen-Farbstoffen und -Pigmenten basiert auf einem von M. KARDOS 1913 patentiertem Verfahren (Abbildung 4).[69] Dabei wird zunächst im ersten Schritt Acenaphthen (**4**) mit Salpetersäure zu 1,8-Naphthalindicarbonsäureanhydrid (**5**) oxidiert. Die anschließende Imidisierung mit Ammoniak liefert 1,8-Naphthalindicarbonsäureimid (**6**), welches durch baseninduzierte oxidative Kupplung in Perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (**7**) überführt wird. Das Perylen-3,4:9,10-tetracarboxydianhydrid (**8**) wird durch Verseifung mit konz. Schwefelsäure dargestellt. Die N,N'-diaryl- und N,N'-dialkylsubstituierten PDI (**9**) werden durch Imidisierung von **8** mit primären aromatischen und aliphatischen Aminen synthetisiert (Abbildung 18).[56]

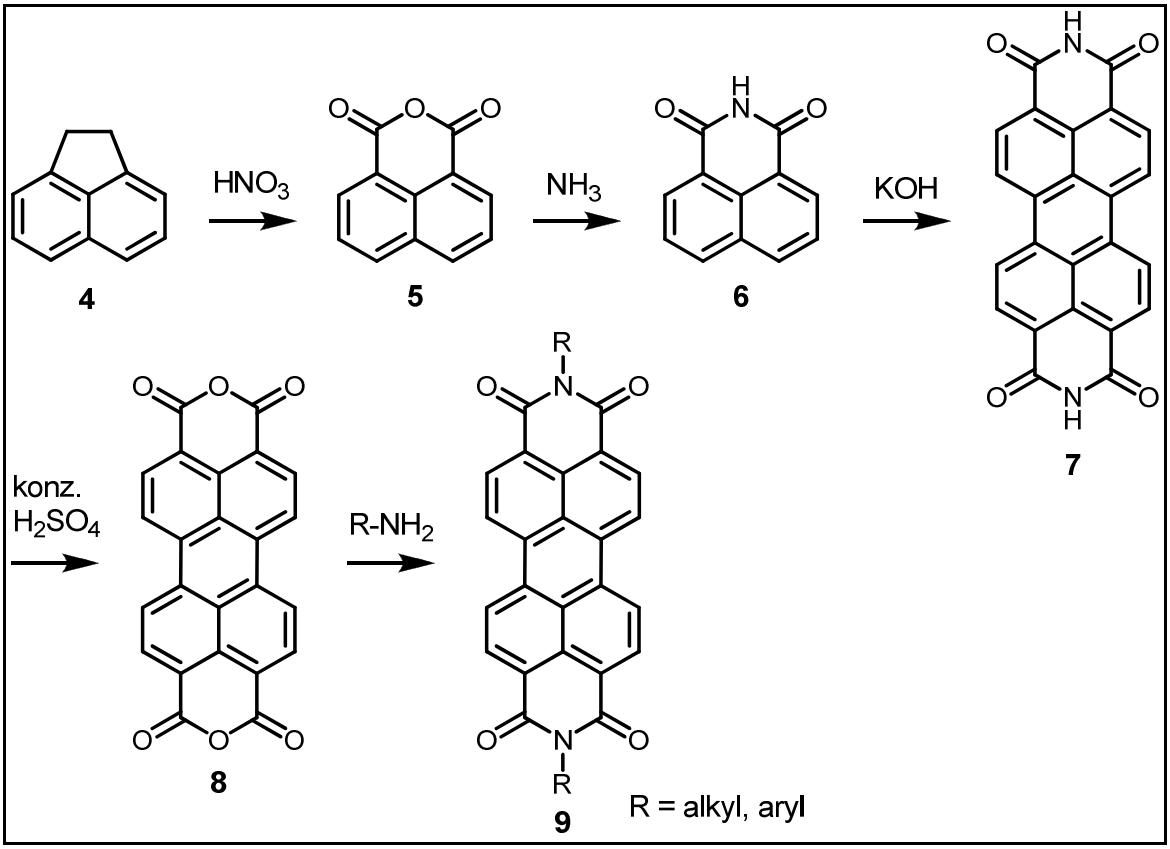


Abbildung 18: Allgemeine Syntheseroute für Perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimide

Ausgehend vom Dianhydrid **8** lässt sich durch vollständige Decarboxylierung in wässriger Kalilauge bei 200-240 °C Perylen (**1**) darstellen.

In der jüngsten Zeit wurden die Reaktionsbedingungen so weit optimiert, dass unter milden Bedingungen die 1,8-Naphtalindicarbonsäureimide direkt zu den gewünschten PDI **9** umgesetzt werden.[70]

In organischen Lösungsmitteln haben die Perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimide ein Absorptionsmaximum zwischen 510 und 530 nm mit Extinktionskoeffizienten von 5 x 10^4 bis 10^5 M^{-1} cm^{-1}. Dabei hat der Substituent am Stickstoff keinen Einfluss auf das Absorptionsmaximum, so dass alle Lösungen orange erscheien. Im Gegensatz dazu können die Farbtonunterschiede im Festkörper variieren und von rot über violett bis schwarz reichen. Im Festkörper spielt die Kristallpackung für die Farbgebung eine nicht unwesentliche Rolle, dabei können die Stickstoffsubstituenten das Packungsverhalten im Kristall und somit die Festkörperabsorption ändern. Das Packungsmotiv ist die planparallele Stapelung des chromogenen Systems. Durch den räumlichen Platzbedarf der Imidsubstituenten ist jedoch

eine deckungsgleiche überlagerung der Perylendiimide nicht möglich. Dadurch kommt es zu einer Längs- und/oder Querversetzung der einzelnen im Stapel angeordneten Moleküle, die von der Raumbeanspruchung der Substituenten abhängt. Kristallstrukturanalysen zeigen, dass bei roten Pigmenten eine schwächere Überdeckung des chromogenen Perylens vorliegt, als bei schwarzen Pigmenten.[71-73] Diese insbesondere für Perylene charakteristischen Farbtonunterschiede werden als Kristallochromie bezeichnet.

Um die Löslichkeit der Perylendiimide zu erhöhen, werden sterisch anspruchsvolle Amine, wie beispielsweise 2,6-Diisopropylanilin, 2,5-Ditertbutylanilin oder 1-Butylpentylamin in die Imidstruktur eingeführt, um eine Aggregation der Perylenchromophore zu verhindern.[56, 74] Im Gegensatz zu den Pigmenten zeigen die Perylentetracarbonsäurediimide eine intensive Fluoreszenz, mit einer extrem hohen Fluoreszenzquantenausbeute. Dadurch eignen sie sich hervorragend für den Einsatz als Farbstofflaser, wo hohe Extinktionen der Farbstofflösungen benötigt werden.

Durch das Einführen von Elektronendonoren in der *bay*-Region kann das Absorptionsmaximum bathochrom verschoben werden, damit einhergehend werden Löslichkeit erhöht und die Aggregation weiter zurückgedrängt. Um diese einzuführen wird ausgehend vom Perylendianhydrid **8** das Tetrachlorderivat **10** mit Chlorgas in konzentrierter Schwefelsäure dargestellt. Nach anschließender Imidisierung zu **11** erhält man durch vierfache Veretherung mit Phenol oder Phenolderivaten die tetraphenoxy-PDI (**12**).[64] In einem weiteren Schritt können die tetraphenoxysubstituierten Perylendianhydride (**13**) durch Verseifung mit Kaliumhydroxid in Isopropanol dargestellt werden (Abbildung 19).

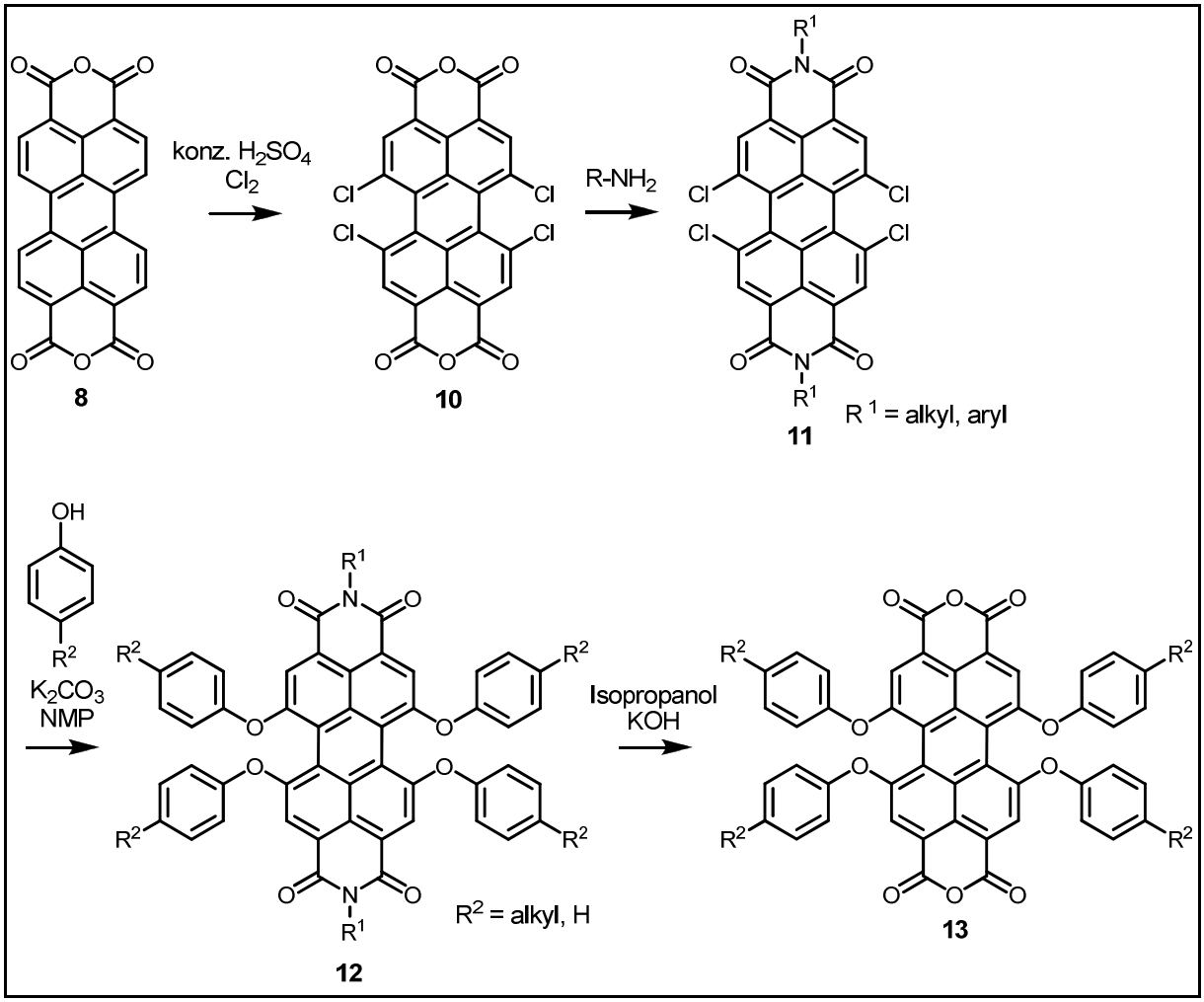


Abbildung 19: Allgemeine Syntheseroute für tetraphenoxylierte Perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimide und –anhydride

Eine bathochrome Verschiebung wird auch durch die Umsetzung der Perylendianhydride mit *ortho*-Phenylendiaminen erzielt, die Ursache dafür liegt in der Erweiterung des konjugierten π-Systems der Perylen-Struktur.[75] Die in der *bay*-Position substituierten Perylene zeichnen sich im Gegensatz zu den Bisamidinen durch ihre erhöhte Löslichkeit aus.[76]

Auch eine selektive 1,7-Substitution in der *bay*-Position kann durch vorherige Bromierung des Perylendianhydrids mit elementarem Brom in Schwefelsäure realisiert werden.[77] Durch die Wahl des Phenoxylierungsgrades des Perylendiimids kann sowohl das Absorptions- als auch das Emissionsspektrum feinstufig variiert werden.

1.3.4 Wasserlösliche Perylen-Chromophore

Um die Wasserlöslichkeit von Perylen-Farbstoffen zu erreichen müssen diese mit einer oder mehreren hydrophilen Gruppen funktionalisiert werden, da das Perylen-System mit seinem hydrophoben Charakter und aufgrund von Aggregation wasserunlöslich ist.[78]

Um den notwendigen hydrophilen Charakter einzufügen existieren eine vielzahl von Möglichkeiten, die Perylendiimid- und auch -monoimid-Chromophore können beispielsweise mit Polypeptid- oder Polyethylenglycolketten funktionalisiert werden (Abbildung 20).[51, 79]

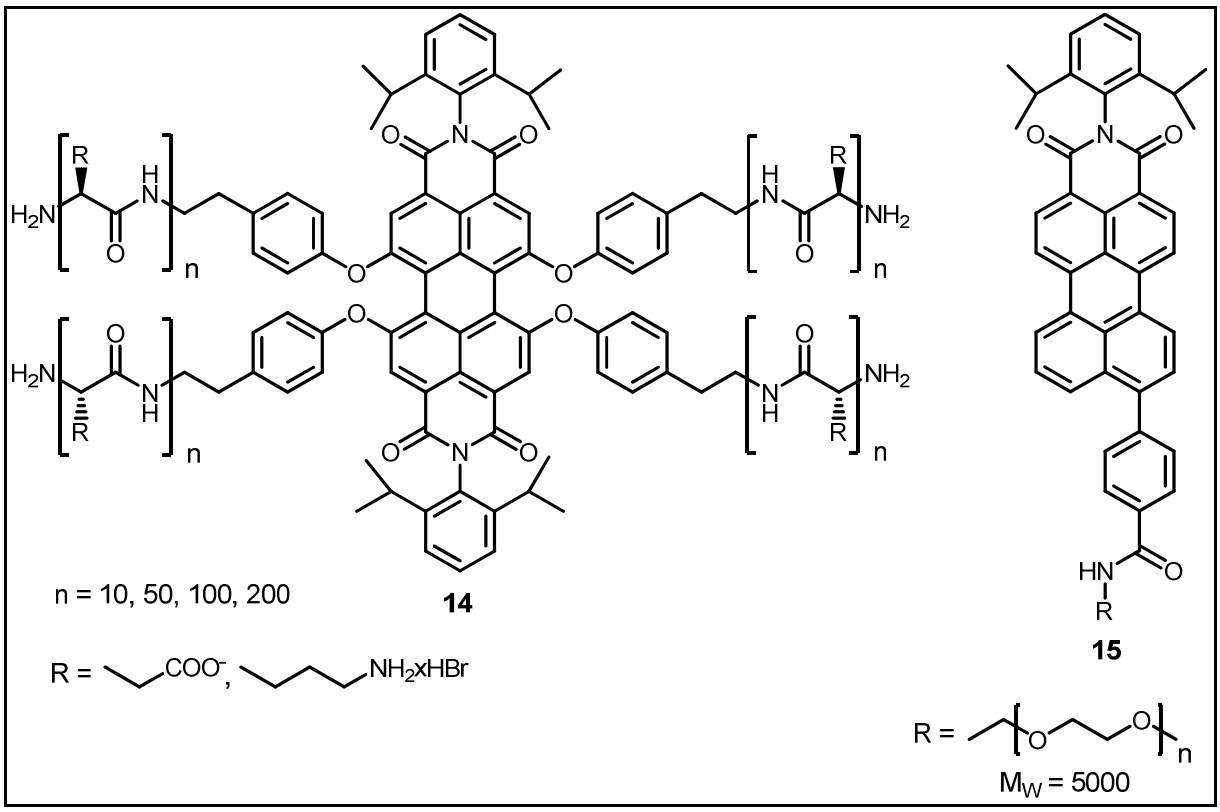


Abbildung 20: Wasserlösliche Perylen-Chromophore, die Polypeptid- und Polyethylenglycolketten tragen

Der Nachteil der in Abbildung 6 beschriebenen Perylene **14** und **15** ist, dass sie beide eine niedrige Fluoreszenzquantenausbeute besitzen.

Weiterhin ist es auch möglich die hydrophilen Gruppen, in Form von Sulfonyl-Gruppen (**18**), quaternisierten Aminen (**16**) oder Kronenethern (**17**), in die Imid-Struktur einzufügen (Abbildung 21).[78]

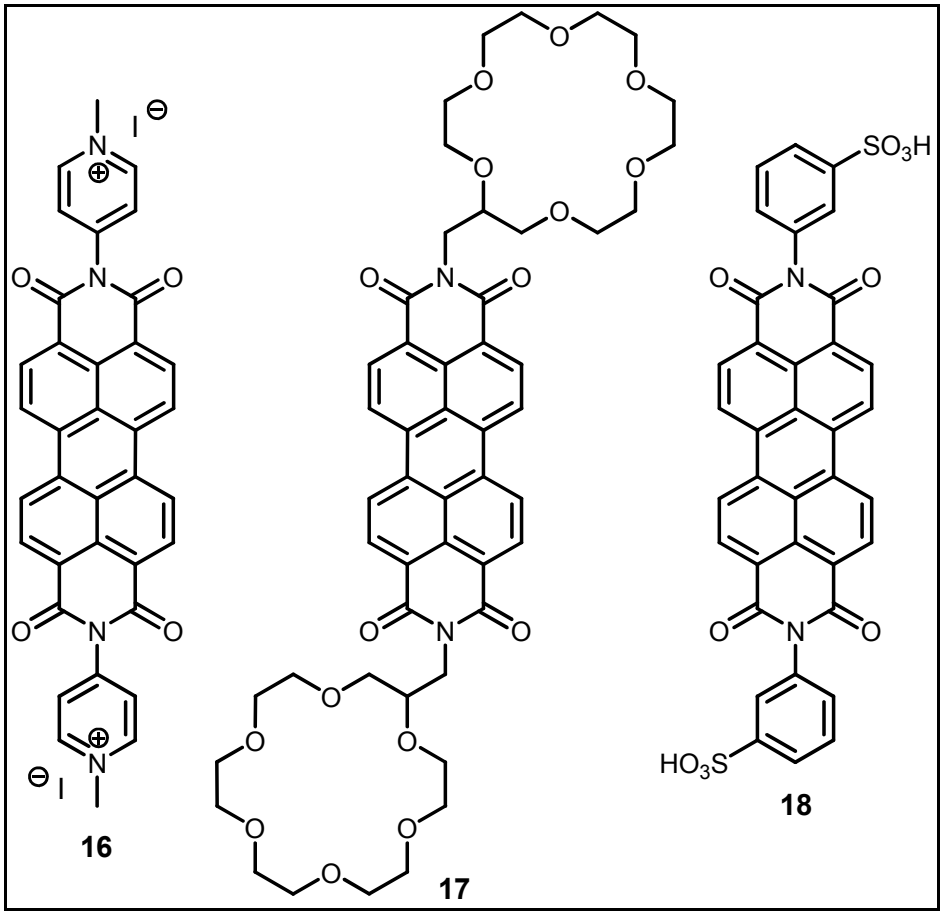


Abbildung 21: Wasserlösliche PDI-Chromophore die hydrophile Gruppen in der Imid-Struktur tragen

Wie die zuvor beschriebenen Perylen-Chromophore zeigen diese ebenfalls nur geringe Fluoreszenz in Wasser. Dies beruht auf der großen Aggregationstendenz der Farbträger in wässrigem Medium, mit starken intermolekularen π-Wechselwirkungen.[80]

Um der Aggregation entgegenzuwirken werden die hydrophilen Gruppen an Substituenten der *bay*-Position angefügt, wobei man ein nicht-planares, verdrehtes aromatisches System erhält.[81-83] Durch das Funktionalisieren von N,N´-bis-(alkyl oder aryl)-1,6,7,12-tetrachlor-3,4:9,10-tetracarboxydiimiden mit diversen *para*-substituierten Phenolen, die beispielsweise Carboxy-Gruppen tragen, erält man die gewünschten Verbindungen **19** - **22**.[81]

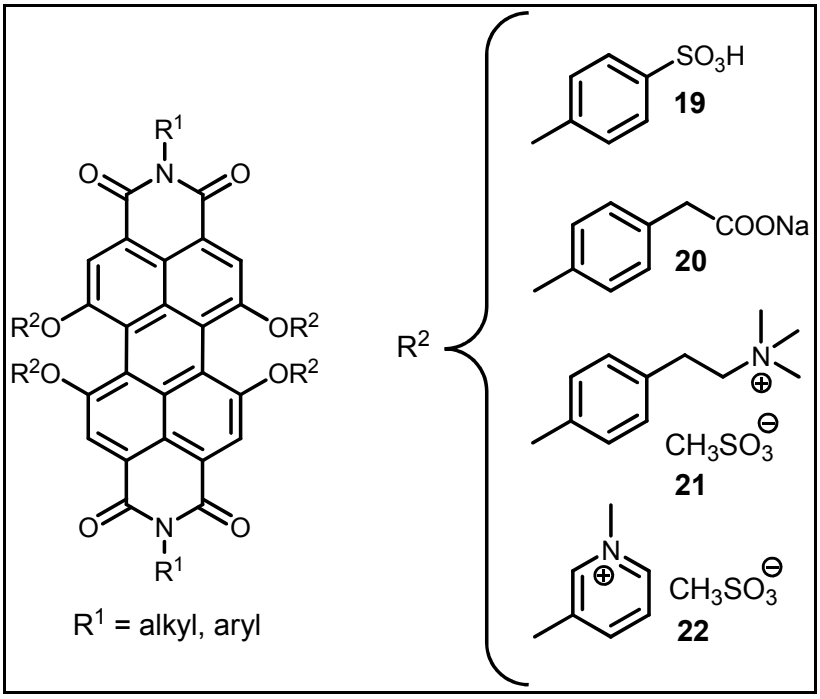


Abbildung 22: Wasserlösliche PDI, mit hydrophilen Substituenten in der *bay*-Region

Die in Abbildung 22 beschriebenen *bay*-substituierten Perylen-Chromophore können im Gramm Maßstab synthetisiert werden, ihre Löslichkeit in Wasser liegt bei bis zu 8.0 x 10^{-4} mol/l für **19** und die Fluoreszenzquantenausbeuten der Verbindungen sind im Vergleich zu den vorigen Substanzen hoch (FQY von **22** = 0.66).[81] Dabei sind die Fluoreszenzquantenausbeuten immer höher, wenn sich die polare Gruppe direkt am Phenylring des *bay*-Substituenten befindet (**22**) und nicht etwa am Ende einer Alkylkette die am Phenylring sitzt (**21**). Durch die zusätzlich vorhandenen Alylketten wird die Löslichkeit in Wasser herabgesetzt und somit auch gleichzeitig die Tendenz zur Aggregation erhöht, was letztendlich die Fluoreszenzquantenausbeute vermindert. Denselben Effekt haben ebenfalls weitere Phenylengruppen, die sich zwischen dem Perylengerüst und der hydrophilen Gruppe, in der bay-Region befinden.

Die wasserlöslichen Perylene besitzen neben den schon bekannten herausragenden Eigenschaften wie unter anderem thermische und photochemische Stabilität, auch die Eigenschaft, dass sie nicht toxisch und somit auch über eine sehr gute Biokompatibilität verfügen. Weiterhin besitzen sie Absorptions- und Emissionsmaxima über 500 nm, was außerhalb der Autofluoreszenz von Zellen liegt.[51, 81] Aufgrund ihrer Eigenschaften stellen sie damit einen perfekten Marker für Biomoleküle, wie DNA, Proteine oder Zellen, dar.[63, 64]

2 Motivation und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit stellen das Design und die Synthese eines neuartigen Perylendiimid-Chromophors (**25**) für die selektive Markierung von Disulfidbrücken in Proteinen beziehungsweise Peptiden dar. Perylenfarbstoffe besitzen den großen Vorteil gegenüber herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen, dass sie sich aufgrund ihrer hohen Photostabilität für Einzelmoleküluntersuchungen eignen. Die Kombination eines besonders lichtechten Farbstoffs und eines Reagenz, das sich für die spezifische Reaktion mit Disulfidbrücken eignet, sollte es ermöglichen, eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen für zum Beispiel einzelmolekülspektroskopische Studien zu markieren, ohne dass die Proteinsequenz verändert werden muss.

Das Synthesekonzept basiert auf der chemischen Verknüpfung eines wasserlöslichen Perylenfarbstoffs **23** unter Ausbildung einer Amidbindung mit einer Komponente, die einen doppelten Michael-Akzeptor, das sogenannte Carboxy-Bissulfon **24** trägt (Abbildung 23).

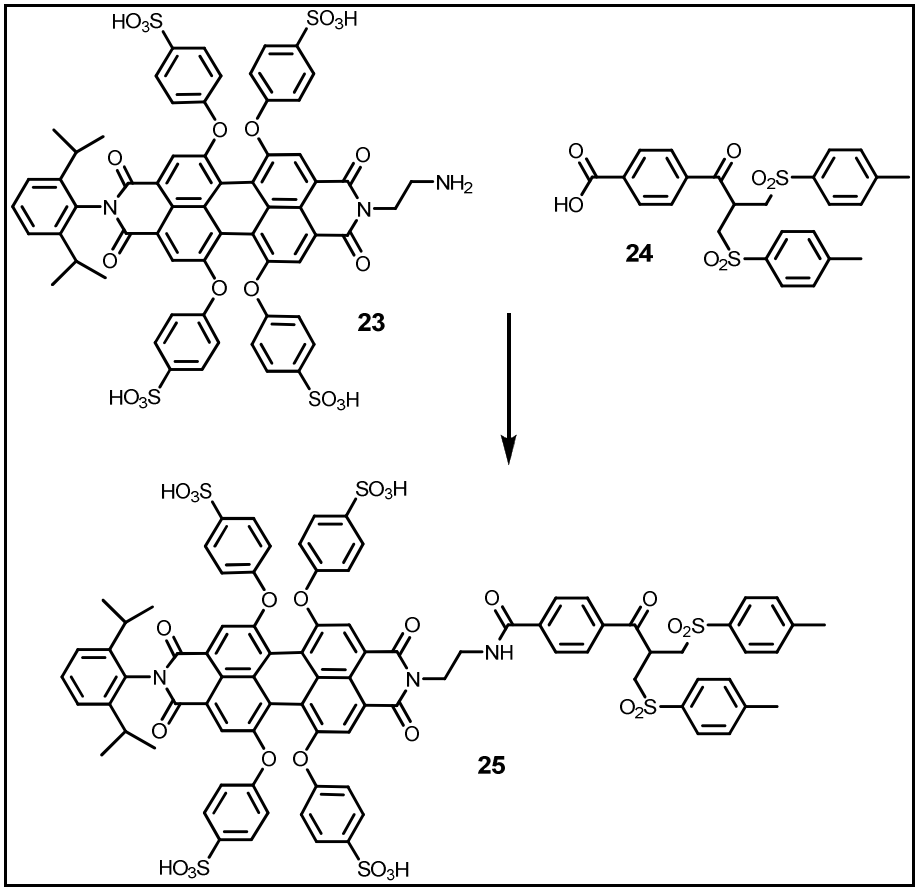


Abbildung 23: Synthese des neuartigen PDI-Chromophors **25**

Wie in der Einleitung dargestellt, konnte unter Verwendung dieses Bissulfons bereits erfolgreich gezeigt werden, dass sich Proteine spezifisch mit Polyethylenoxidresten markieren lassen. [33, 40, 43]

Als Modellpeptid wurde das zyklische Peptid Somatostatin (**26**) gewählt. Dieses besitzt eine Größe von 14 Aminosäuren und ein Gewicht 1637.9 Da, sowie eine einzelne Disulfidbrücke zwischen Cys3 und Cys14 und ist unter anderem ein wichtiger Regulator des Hormon- und Nervensystems. [33, 84] Die meisten Proteine besitzen Disulfidbrücken, jedoch sind diese in der Regel nicht immer zugänglich. Das Disulfid des Somatostatins ist hingegen leicht zugänglich, was durchaus der geringen Größe des Peptids zu verdanken ist. Aufgrund seiner Größe hat das Peptid weiterhin den Vorteil, dass es keine hoch komplexe Struktur aufweist und sich somit gut charakterisieren lassen sollte. Somit ist es äußerst unwahrscheinlich, dass Struktur und Funktion durch den Marker gravierend verändert werden. Der Erhalt der Struktur kann durch 1H-NMR Spektroskopie überprüft werden. Weitere Vorteile bei der Verwendung von Somatostatin sind, dass es eine große Toleranz gegenüber saurem oder basischem Milieu, sowie organische Solventien hat. Das macht Somatostatin somit zum perfekten Peptid für diese Markierungsstrategie und kann somit als Modell für andere Proteine und Peptide bei dieser Markierungsmethode verwendet werden.

Somatostatin soll mit einem funktionalen Perylen-Chromophor **25** markiert werden (Abbildung 24). Aufgrund der herausragenden Eigenschaften der Perylen-Chromophore sind diese ausgezeichnet für die Markierung von Biomakromolekülen geeignet. Sie zeichnen sich durch eine außergewöhnlich hohe thermische, chemische und photochemische Stabilität aus und haben ebenfalls hohe Fluoreszenzquantenausbeuten.[46] Darüberhinaus sind sie gut wasserlöslich und zeigen keine Toxizität, was ihre Biokompatibilität natürlich dementsprechend erhöht. [64, 81] Die Perylene sind damit anderen Farbstoffen, wie zum Beispiel den Cyaninen, die Oxidations- und Lichtempfindlich sind, oder den Xanthenen, die in wässriger Lösung eine große Aggregationstendenz zeigen, weit überlegen.[64]

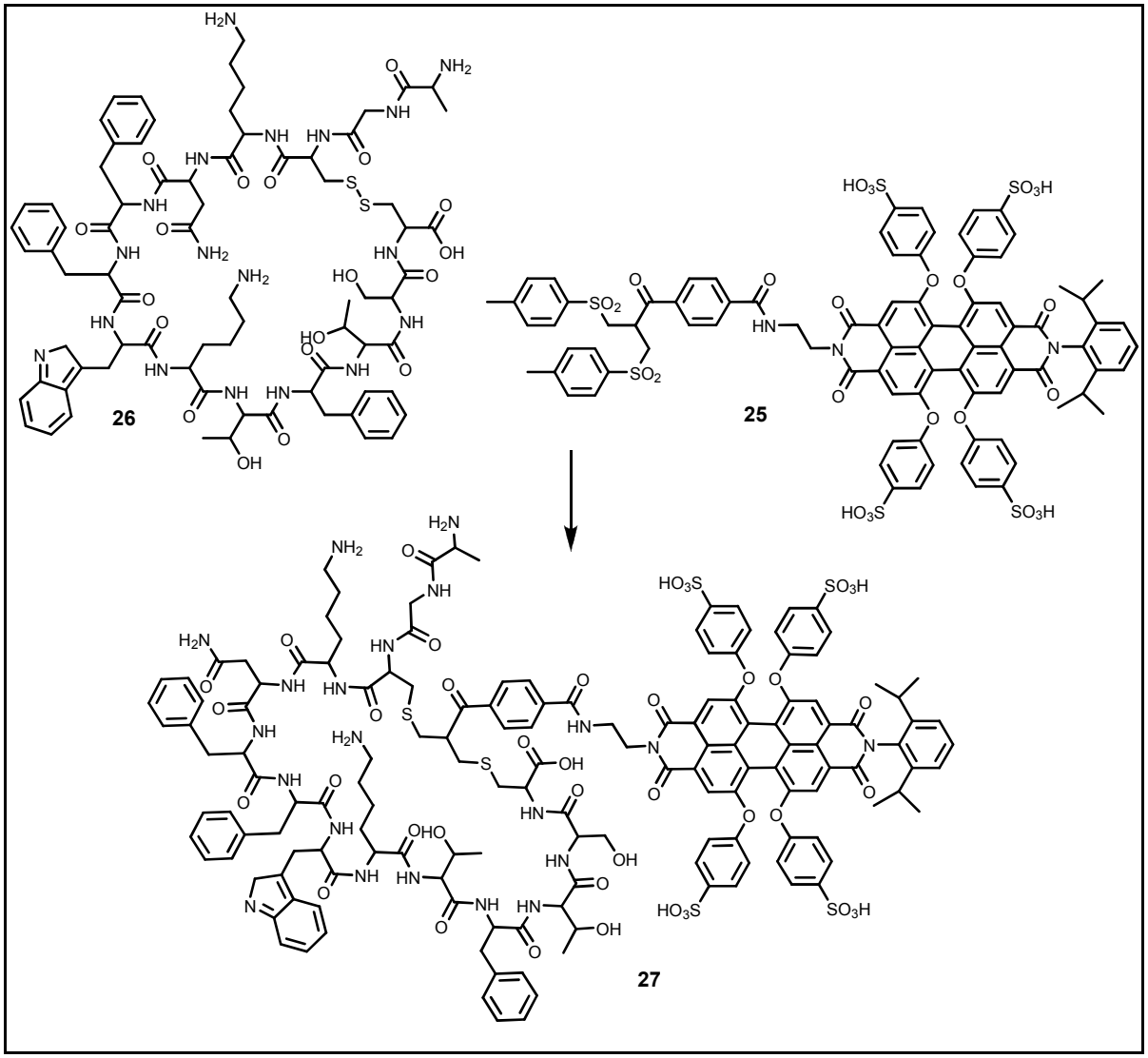


Abbildung 24: Markierung des Peptids Somatostatin **26** mit einem funktionalen PDI- Chromophor **25**

Das Verwenden eines Perylenmarkers der spezifisch für Disulfidbrücken ist ermöglicht nun eine effiziente Konjugation und liefert ein homogenes Produkt. Dies war mit den bisherigen funktionalen Perylenen, die beispielsweise mit den Aminogruppen von Lysinresten reagieren, nicht möglich, da diese aufgrund der räumlichen Nähe zweier Lysine unter Umständen nicht alle Aminogruppen des Proteins erreichen können. Wenn sich zwei Lysine in geringem Abstand zueinander befinden, ist durch die Größe des Perylenmarkers die Markierung beider Lysine durchaus sterisch behindert. Andererseits kann es sein, dass sich Lysine im inneren der Proteinstruktur befinden und somit nicht für den Marker zugänglich sind. Weiterhin haben diese Perylen-Chromophore den Nachteil, dass ihre Amin reaktive Gruppe, der NHS-Ester,

immer ein wenig Hydrolyseprodukt liefert, welches nicht mehr zu Markierungen in der Lage ist. Das Hydrolyseprodukt wird praktisch immer erhalten, da die Markierung eines Proteins in der Regel im wässrigen Medium stattfindet. Diese Begebenheiten machen natürlich einen stöchiometrischen Einsatz des Markers und das Erhalten eines einheitlichen Produktes sehr schwierig. Aber genau hier setzt die Strategie der neuen funktionalen Perylen-Marker an. Da die Zahl an zugänglichen Disulfidbrücken in Proteinen doch meist recht begrenzt ist, kann somit ein genauer stöchiometrischer Einsatz verwendet und der Erhalt eines einheitlichen Produktes gewährleistet werden.

3 Synthese und Charakterisierung der funktionalen PDI-Chromophore

3.1 Darstellung des Bissulfon-Reagenz

Die Synthese des funktionalen, wasserlöslichen PDI-Chromophors (**25**) für die selektive Markierung von Disulfidbrücken in Proteinen beziehungsweise Peptiden setzt voraus, dass die Zielverbindung eine funktionelle Gruppe trägt, die zur Reaktion mit Disulfidbindungen befähigt. Dafür wird zunächst der Michael-Akzeptor **31** mit dem NHS-Ester nach der von BROCCHINI et al. beschriebenen Weise synthetisiert und anschließend über eine Amidbindung mit dem wasserlöslichen PDI-Farbstoff verknüpft (Abbildung 25).[40]

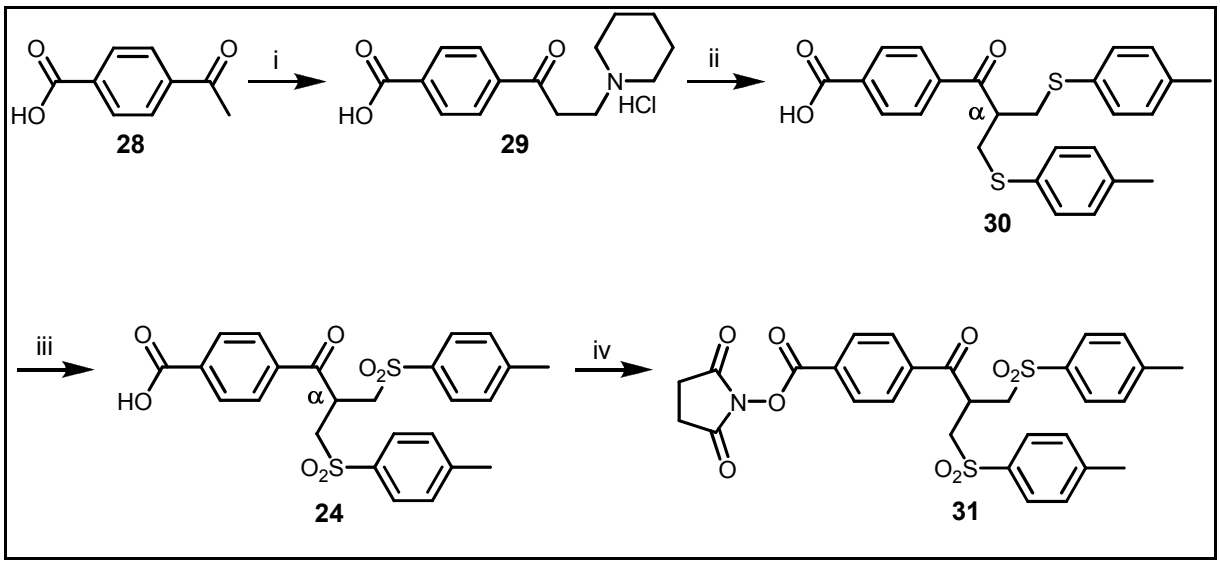


Abbildung 25: Synthese von 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-4-(3-(p-Tolylsulfonyl)-2-(p-tolylsulfonylmethyl)-propanoyl)-benzoat (**31**) i: 1 äq Piperidinhydrochlorid, 6 äq Formaldehyd, Ethanol, 78 °C, 20 h, 60 % ii: 2 äq *p*-Thiocresol, 37 %ige Formaldehydlösung, Ethanol/Methanol (1:1), 60 °C, 4 h, 52 % iii: 6 äq OXONE®, Methanol/Wasser (1:1), RT, 24 h, 94 % iv: 1 äq *N*-Hydroxysuccinimid, 1 äq DCC, Dichlormethan, RT, 6 h, 69 %

Ausgehend von *p*-Acetylbenzoesäure **28** wird in einer Mannich-Reaktion, das entsprechende Salz **29** synthetisiert. Die Mannich-Reaktion ist eine wertvolle Synthese zur Darstellung von *N*-substituierten β-Aminoketonen.[85, 86]

Dabei stellt die *p*-Acetylbenzoesäure die CH-Acide Verbindung dar, die mit dem Formaldehyd-Piperidinhydrochlorid-Kondensationsprodukt reagiert. Für die Durchführung der Reaktion ist es notwendig, dass im sauren Milieu gearbeitet wird. Das Formaldehyd-Edukt wird in der Reaktion im großen Überschuss eingesetzt und muss daher vom ausgefallenen Produkt mit Aceton mehrfach ausgewaschen werden um ein sauberes Produkt zu liefern. Das Hauptsignal des FD-Massenspektrums von **29** entspricht der Masse des Zielmoleküls ohne Hydrogenchlorid. Das ^{1}H- und ^{13}C-NMR Spektrum bestätigen die Struktur der gewünschten Zielverbindung.

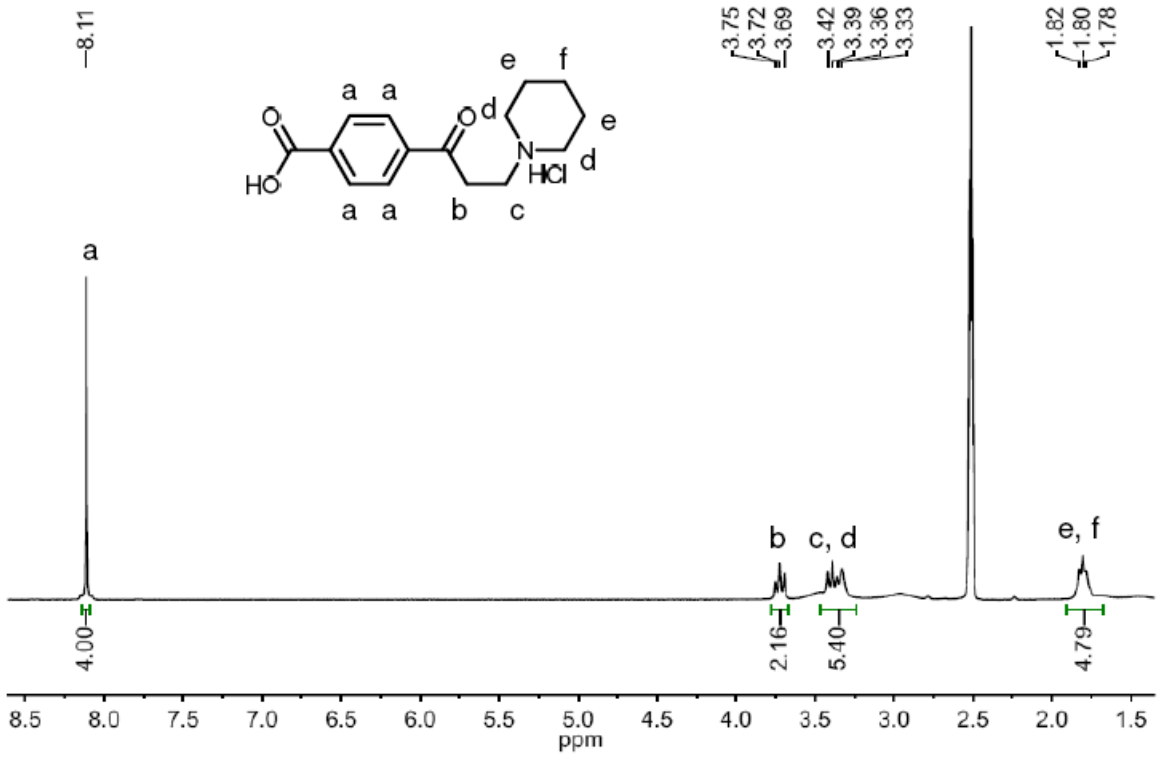


Abbildung 26: ^{1}H-NMR Spektrum (250 MHz) von **29** in DMSO-d^6 bei Raumtemperatur

Im nächsten Schritt wird das Mannich-Produkt **29** mit *p*-Thiocresol und einer Formaldehydlösung in einem Methanol/Ethanol Gemisch unter leicht basischen Bedingungen für mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der nach dem Entfernen der Lösungsmittel erhaltene Feststoff, wird durch anschließendes Umkristallisieren in Methanol als reines Produkt und kann für weitere Reaktionen verwendet werden. Die strukturelle Identität von **30** wurde mittels FD-Massenspektrometrie, ^{1}H- und ^{13}C-NMR Spektroskopie nachgewiesen.

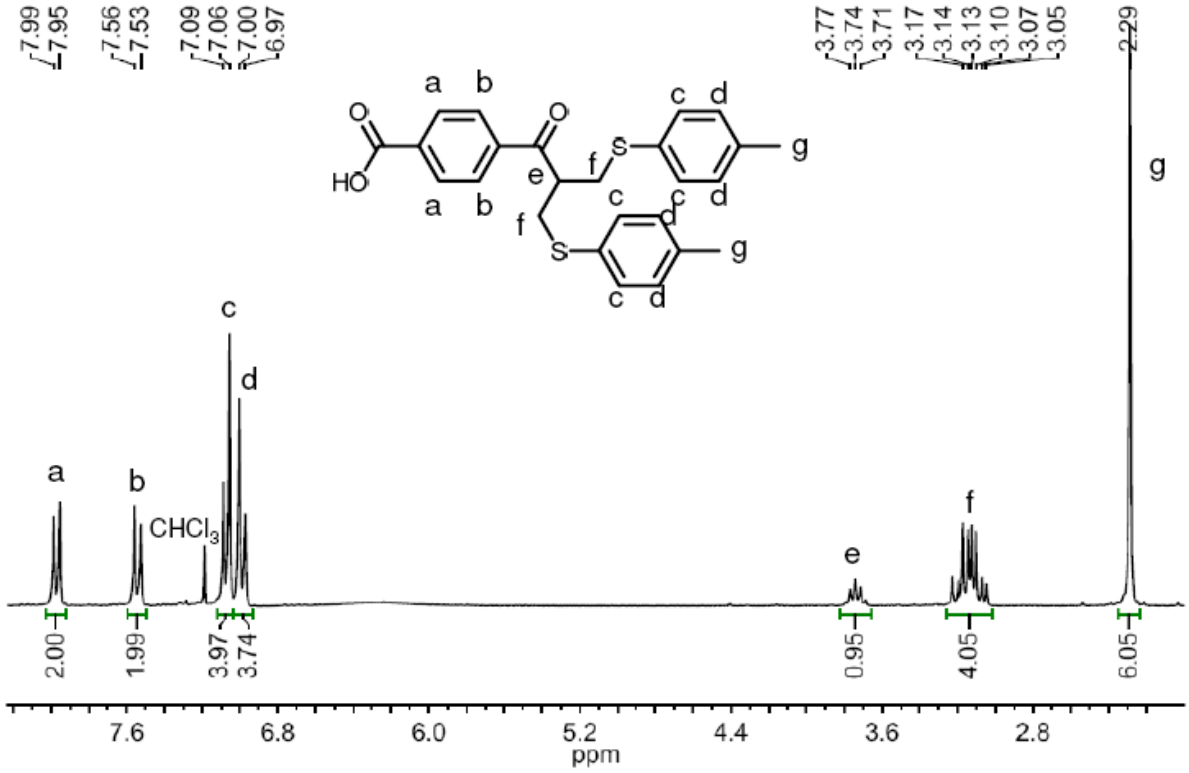


Abbildung 27: ^{1}H-NMR Spektrum (250 MHz) von **30** in $CDCl_3$ bei Raumtemperatur

Wie im ^{1}H-NMR Spektrum der Verbindung **30**, die auch als Bissulfid bezeichnet wird, zu sehen ist hat sich noch kein Eliminierungsprodukt, das sogenannte Monosulfid (**32**), gebildet (Abbildung 27). Das Monosulfid wäre eine α,β-ungesättigte Carbonylverbindung, die zur Michael Addition von Thiolen befähigen würde.

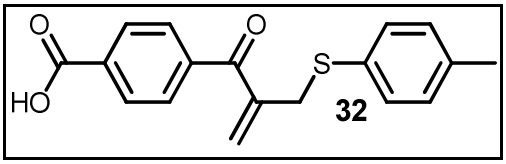


Abbildung 28: Struktur des Monosulfids, dem Eliminierungsprodukt von **30**

Dieses Ergebnis liefert auch das FD-Massenspektrum, wo kein Signal bei etwa 312 m/z, was dem Monosulfid entsprechen würde, detektiert werden kann, sondern nur das Signal des Bissulfids bei 436.2 m/z auftritt (Abbildung 29).

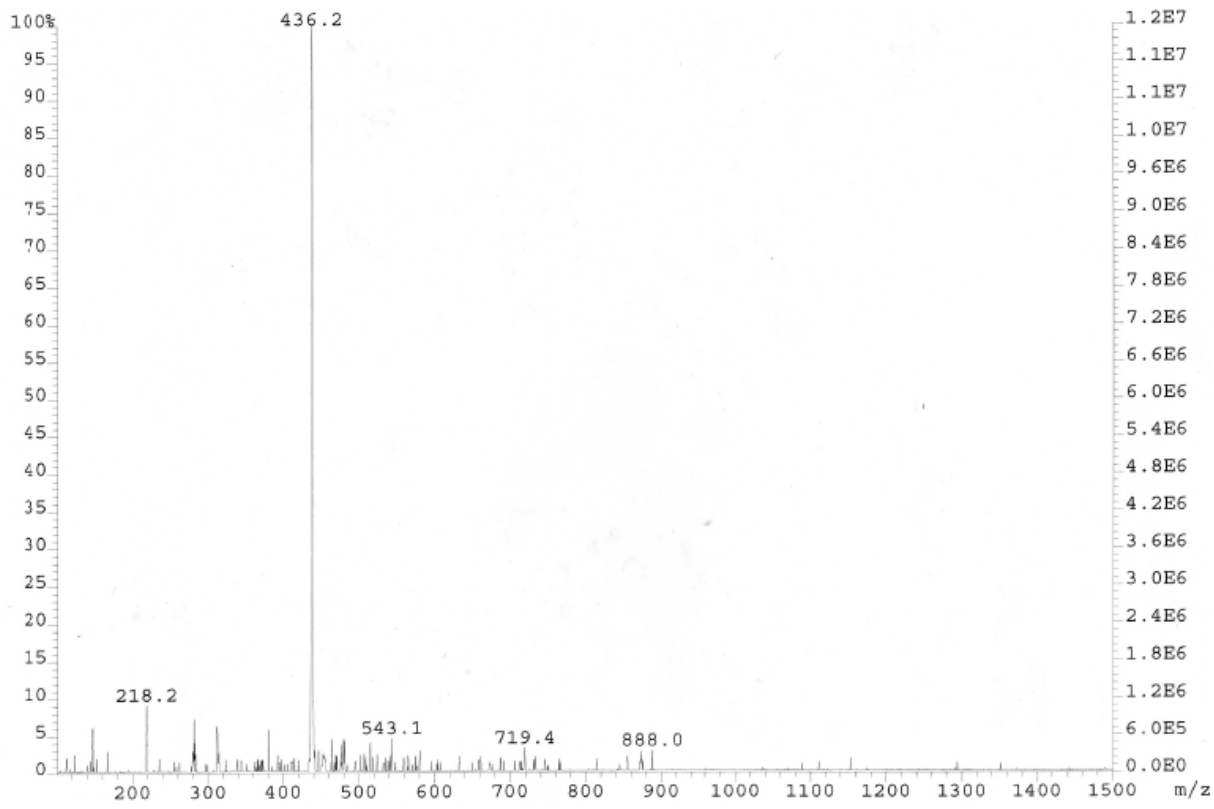


Abbildung 29: FD-Massenspektrum des Carboxy-Bissulfid (436.2 m/z) **30**

Da die Thioether-Gruppen von **30** keinen zusätzlichen Elektronenzug auf das Proton am α-Kohlenstoff des Ketons ausüben, was unter anderem auch dafür verantwortlich ist, dass keine Eliminierungsreaktion stattfindet kann, werden die beiden Schwefelatome oxidiert (Abbildung 25). Durch die Oxidation des Schwefels zum Sulfon wird der Elektronenzug auf das Proton am α-Kohlenstoff gravierend erhöht. Dies ist wichtig, damit später die beiden Moleküle *p*-Toluylsulfinsäure eliminert werden können und die Additionsreaktion an den beiden Cystein Thiolgruppen stattfinden kann. Die *p*-Toluylsulfinsäure stellt nämlich im Gegensatz zu *p*-Thiocresol eine sehr gute Abgangsgruppe dar.

Die Oxidation des Schwefels zum Bissulfon **24** wird mit Oxone® durchgeführt, Oxone® ist ein leistungsstarkes Reagenz zur Oxidation von Alkyl-Aryl Thioethern.[87] Es ist ein Gemisch anorganischer Salze, welches aus jeweils einem Äquivalent Kaliumsulfat und Kaliumhydrogensulfat und zwei Äquivalenten Kaliumperoxohydrogensulfat besteht. Dabei stellt das Peroxosulfat das eigentliche Oxidationsmittel dar. Die Oxidation mit Oxone® hat den Vorteil, dass sie unter milden Bedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann. So wird das Bissulfid **30** für 24 Stunden mit einem Überschuss an Oxone® in einem Methanol/Wasser Gemisch gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit

Dichlormethan extrahiert und mehrfach mit Wasser gewaschen, um die Salze vollständig zu entfernen. Nach dem Trocknen der organischen Phase und Entfernen des Lösungsmittels erhält man das Bissulfon **24**. Die Struktur des Bissulfons wurde durch ^{1}H- und ^{13}C-NMR Spektroskopie bestätigt.

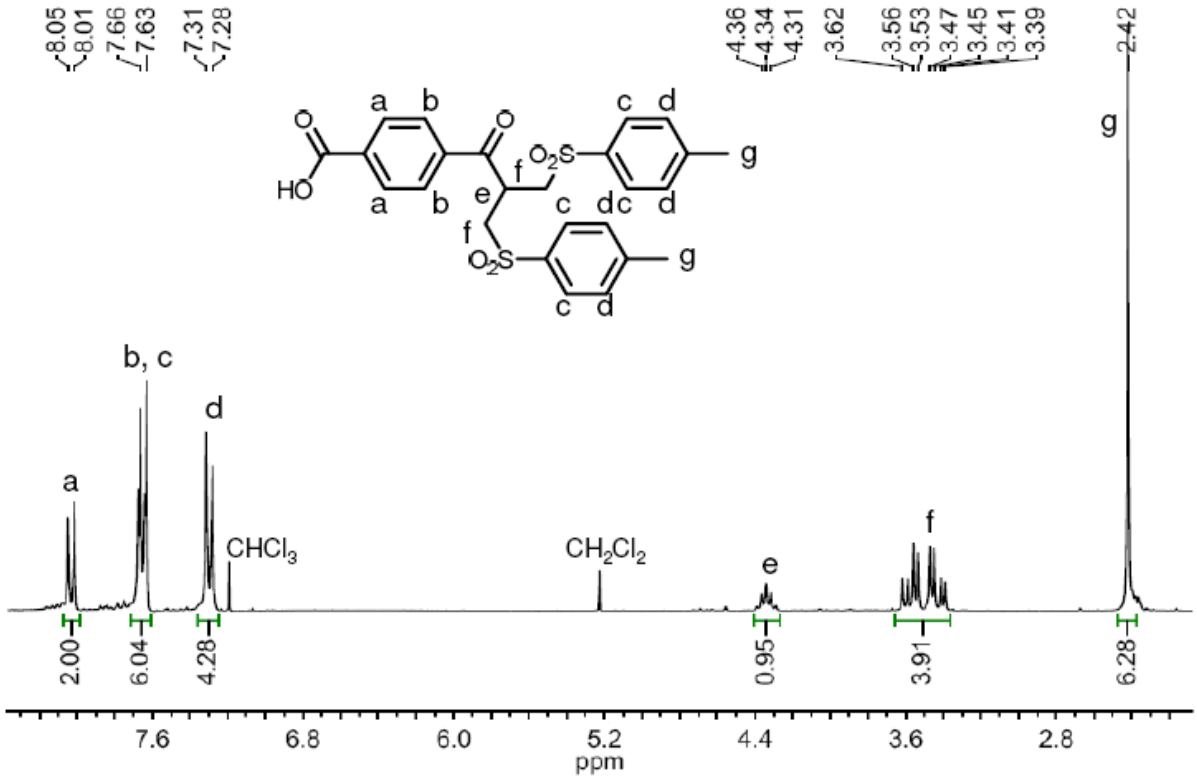


Abbildung 30: ^{1}H-NMR Spektrum (250 MHz) von **24** in $CDCl_3$ bei Raumtemperatur

Im ^{1}H-NMR Spektrum sind durch die Oxidation zum Sulfon die entsprechenden ortho-Protonen (c) wie erwartet um einen großen Betrag Tieffeld verschoben (Abbildung 30). Die enorme Tieffeldverschiebung von etwa 0.6 ppm resultiert aus der nun vorhandenen stark elektronenziehenden Wirkung des Sulfons, im Gegensatz zum Sulfid. Der gleiche Effekt wird auch beim ^{13}C-NMR Spinecho Experiment beobachtet. Hier ist das Signal der Methylengruppe des Sulfons bei 55.70 ppm zu finden, wohingegen das Signal für das Sulfid sich bei 36.41 ppm befindet. Gleiches gilt auch für den tertiären aromatischen Kohlenstoff am Sulfon dessen Signal bei 145.61 ppm liegt, im Gegensatz zum Signal des Sulfids bei 137.26 ppm.

Die Detektion der Masse des Bissulfons **24** konnte mittels FD-Massenspektroskopie nicht realisiert werden, da die Signalstärke zu gering war. Die Bestimmung durch MALDI-TOF

Massenspektrometrie erwies sich als die erfolgreichere Methode. Dadurch konnte das Bissulfon unter Verwendung von Dithranol als Matrix eindeutig bei 499.1 m/z detekiert werden, was dem Bissulfons **24** entspricht.

Um das Carboxy-Bissulfon **24** mit dem benötigten wasserlöslichen Perylendiimid zu verknüpfen kann zum einen das Amino-PDI **25** direkt mit der Säuregruppe des Bissulfons **24** in Gegenwart von Carbodiimiden umgesetzt werden oder aber der Aktivester **31** des Bissulfons wird zunächst gebildet (Abbildung 31).

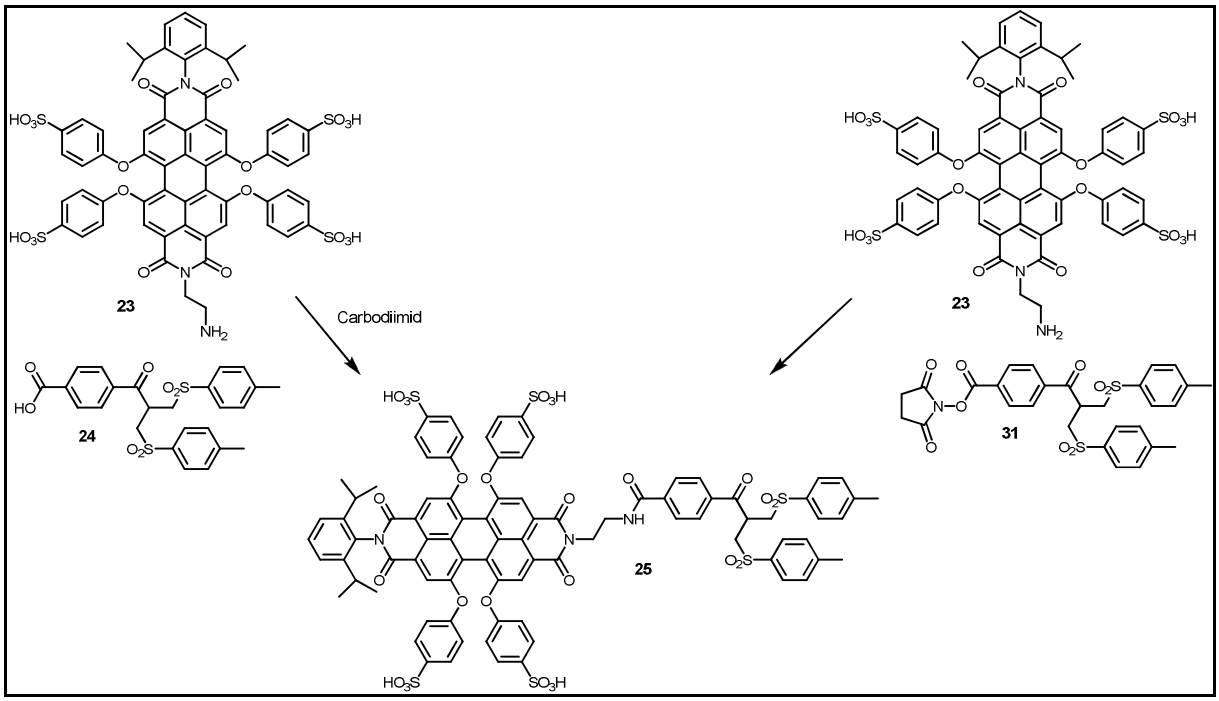


Abbildung 31: Mögliche Syntheserouten für das neuartige PDI-Chromophor **25**

Problematisch bei der direkten Umsetzung in Gegenwart von Carbodiimiden ist allerdings, dass die sulfonierten Farbstoffe oftmals noch Rückstände von Wasser beinhalten. Diese Tatsache macht das Arbeiten mit Carbodiimiden recht schwierig, da sie sofort mit Wasser zum unreaktiven Harnstoff reagieren. Somit ist die Verwendung eines NHS-Esters vorteilhafter, da diese nicht allzu hydrolyseempfindlich sind.[46] Diese Methode ist wohl eine der gängigsten zur Darstellung von Amiden.[16] Für die Darstellung des Esters müssen jedoch ebenfalls Kondensationsreagenzien, wie Carbodiimide oder Uroniumsalze, verwendet werden.[15, 88] Das daraus resultierende Amid ist aber weitestgehend hydrolysestabil.

Die Darstellung des Bissulfon-NHS-Esters **31** wird durch die Umsetzung des Carboxy-Bissulfons **24** mit äquimolaren Mengen an *N*-Hydroxysuccinimid und Diisopropylcarbodiimid

erreicht. Für eine erfolgreiche Durchführung der Reaktion ist es notwendig, dass absolut wasserfrei gearbeitet wird, um die unerwünschte Bildung des Alkylharnstoffs zu vermeiden. Dafür wird die Reaktion mit trockenem Dichlormethan in einer Argonatmosphäre durchgeführt. Die Bildung des Aktivesters gelingt dabei in wenigen Stunden und kann bei Raumtemperatur realisiert werden. Durch anschließende Extraktion mit Dichlormethan kann das Produkt isoliert werden. Dabei ist es wichtig, dass die organische Phase so lange mit Wasser gewaschen wird, bis kein Diisopropylharnstoff mehr nachgewiesen werden kann. Die strukturelle Identität wurde durch MALDI-TOF Massenspektrometrie, ^{1}H- und ^{13}C-NMR Spektroskopie bestätigt. Das MALDI-TOF Spektrum wurde unter Verwendung von Dithranol als Matrix aufgenommen. Obwohl kein Salz bei der Messung zugesetzt wurde, entsprechen die beiden Hauptsignale dem m/z von **31** mit Natrium und Kalium.

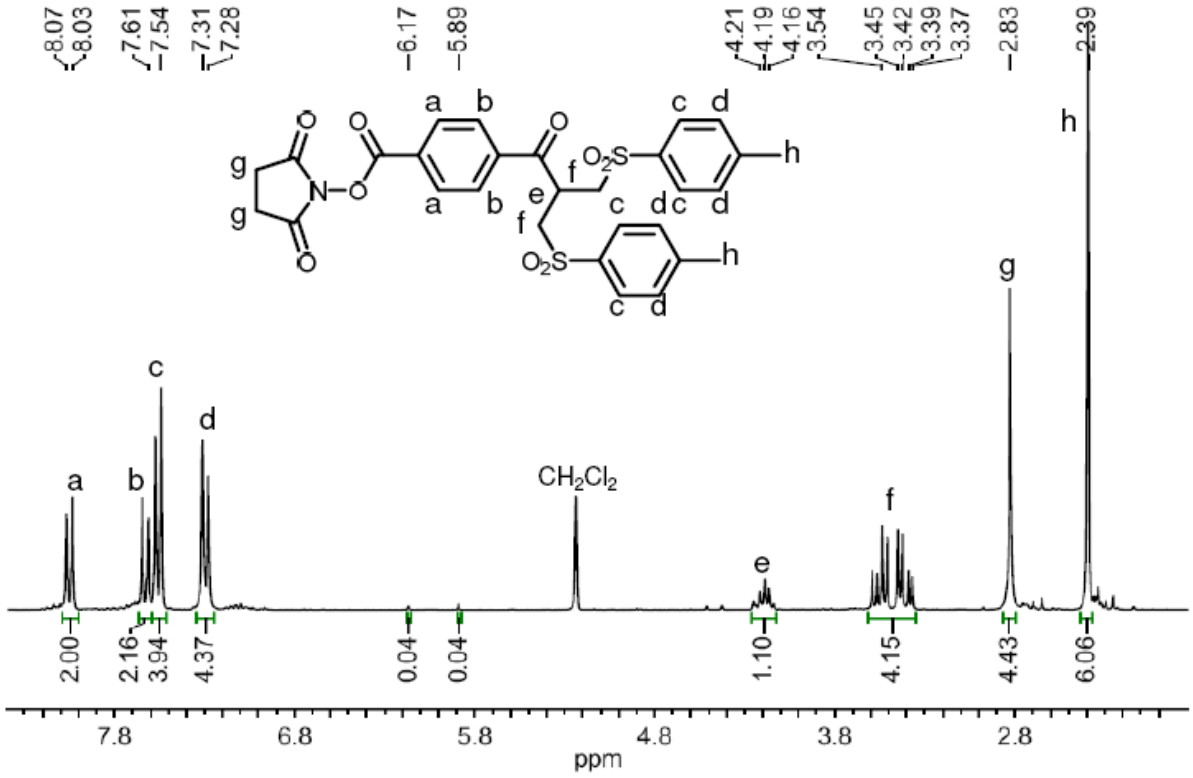


Abbildung 32: ^{1}H-NMR Spektrum (250 MHz) von **31** in CD_2Cl_2 bei Raumtemperatur

Im ^{1}H-NMR Spektrum des NHS-Ester-Bissulfons **31** ist nun ein geringer Anteil an Monosulfon zu erkennen (Abbildung 31). Dies ist durch die beiden charakteristischen Vinylprotonen bei 6.17 und 5.89 ppm gegeben, was bedeutet, dass schon ein Molekül *p*-Toluylsulfinsäure eliminiert wurde. Die Eliminierung resultiert aus den basischen

Eigenschaften des Alkylharnstoffs, welche ausreicht um das stark saure Wasserstoffatom zu abstrahieren.

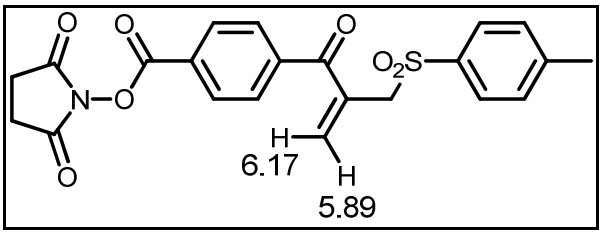


Abbildung 33: Struktur des NHS-Ester-Monosulfons, dem Eliminierungsprodukt von **31**

Für weitere Reaktionen, wie die Proteinmarkierung, ist die Bildung des Monosulfons jedoch kein Nachteil, da später das Monosulfon vor der Markierung in situ erzeugt wird (Abbildung 52). Zumal eine säulenchromatographische Auftrennung von Mono- und Bissulfon, aufgrund des geringen Polaritätsunterschiedes, nur schwer durchführbar ist. Weiterhin könnte bei der Auftrennung der NHS-Ester natürlich wieder teilweise hydrolysiert werden.
Die tertiären Kohlenstoffatome der NHS-Ester Gruppe können im ^{13}C-NMR Spektrum bei 160.95 ppm detektiert werden, sowie die Methylenkohlenstoffe bei 25.69 ppm. Da diese im Gegensatz zu *N*-Hydroxysuccinimid verschoben sind, dient dies als weitere Bestätigung, dass das gewünschte Produkt erhalten wurde und nicht etwa eine eins zu eins Mischung der Reaktanden.

3.2 Darstellung des funktionalen, wasserlöslichen PDI-Chromophors

Der zweite wesentliche Bestandteil des neuen Fluoreszenz-Interkalators **25** umfasst den wasserlöslichen, funktionalisierten Perylenfarbstoff **23** (Abbildung 34). Dieser funktionale Perylenfarbstoff sollte eine Aminogruppe tragen um mit dem Bissulfon-NHS-Ester **31** verknüpft werden zu können und gleichzeitig für spätere Reaktionen mit Peptiden und Proteinen eine ausreichende Wasserlöslichkeit aufzuweisen. Diese in Abbildung 34 dargestellte Syntheseroute ist durchaus vielversprechend, da der Bissulfon-NHS-Ester **31** schon mit zahlreichen AminoPEGs verbunden wurde. [33, 40, 43] Um das zunächst benötigte funktionale Perylen-Chromophor darzustellen wird eine von K. PENEVA in der Arbeitsgruppe von Professor MÜLLEN durchgeführte Synthese verwendet.[46]

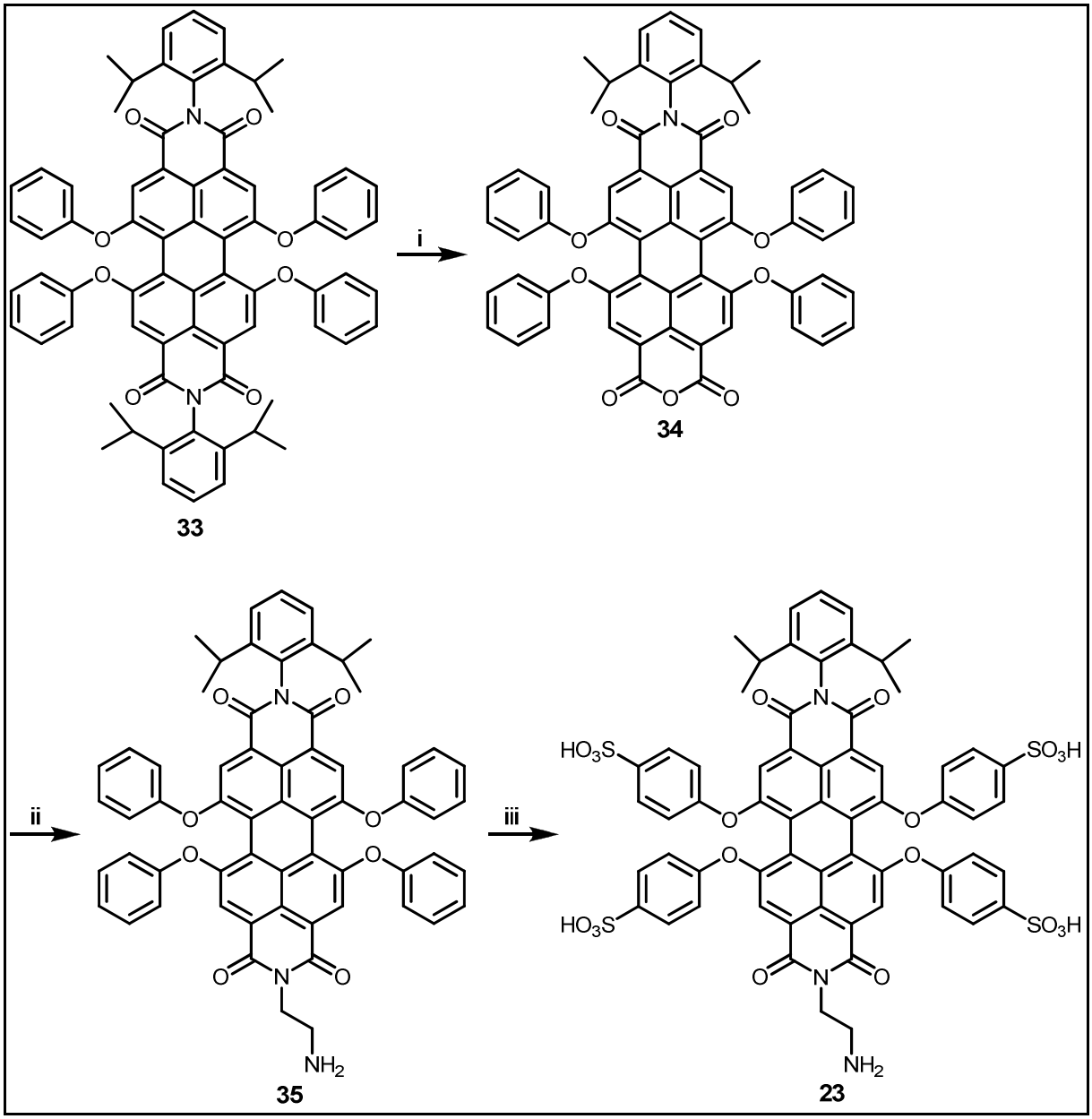


Abbildung 34: Synthese des wasserlöslichen N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-(2-aminoethyl)-1,6,7,12-tetra(4-sulfophenoxy)perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (**23**) i: KOH, Isopropanol, 82 °C,15 h, 20 % ii: 11 äq Ethylendiamin, Toluol, 60 °C, 3 h, 58 % iii: konz. H_2SO_4, RT, 18 h, 81 %

Dabei wird ausgehend vom symmetrischen PDI **33**, eine statistische Verseifung unter stark basischen Bedingungen durchgeführt. Dadurch erhält man neben dem gewünschten unsymmetrischen Monoimid-Monoanhydrid auch das Dianhydrid und das Diimid. Die Verseifung von **33** wird in einer isopropanolischen Kaliumhydroxidlösung bei Erhitzen unter Rückfluß realisiert. Aufgrund des erhaltenen Produktgemisches ist eine Aufreinigung durch

Säulenchromatographie an Kieselgel unbedingt notwendig. Das so erhaltene Monoimid-Monoanhydrid **34** wurde durch FD-Massenspektroskopie, ^{1}H-NMR und ^{13}-NMR Spektroskopie bestätigt. Im FD-Massenspektrum konnte dementsprechend kein m/z für das Diimid (1079.24) oder Dianhydrid (760.70) detektiert werden.

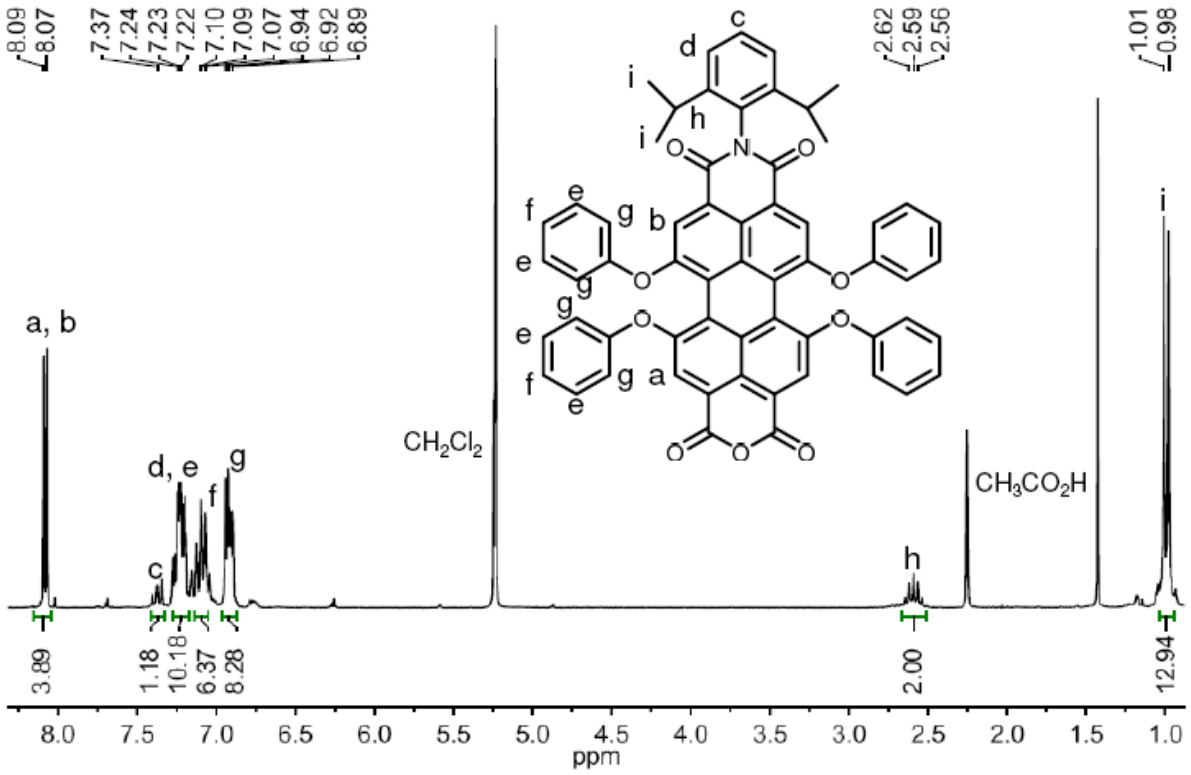


Abbildung 35: ^{1}H-NMR Spektrum (250 MHz) von **34** in CD_2Cl_2 bei Raumtemperatur

Wie man im ^{1}H-NMR Spektrum von **33** erkennen kann, erhält man durch die Monoimid-Monoanhydrid Struktur des Perylen-Chromophors, keine äquivalenten Signale für die vier Protonen des Perylen Kerns (Abbildung 35). Durch das Anhydrid werden die Protonen an Position 8 und 11 ein wenig Tieffeld verschoben.

Anschließend wird **34** ins unsymmetrische Perylendiimid **35** überführt. Dafür wird das Monoanhydrid in einem großen Überschuss an Ethylendiamin in Toluol bei 60°C umgesetzt. Die Reaktionsdauer wird mit drei Stunden recht kurz gehalten, da ansonsten bei der Reaktion ein erhebliches Maß an Kreuzkupplungsprodukt gebildet werden kann. Aufgrund der stärkeren hydrophilen Eigenschaften kann das unsymmetrische PDI gut durch Säulenchromatographie an Kieselgel isoliert werden. Die Identität des unsymmetrischen PDI **35** wurde durch FD-Massenspektrometrie, 1H- und 13C-NMR Spektroskopie sichergestellt.

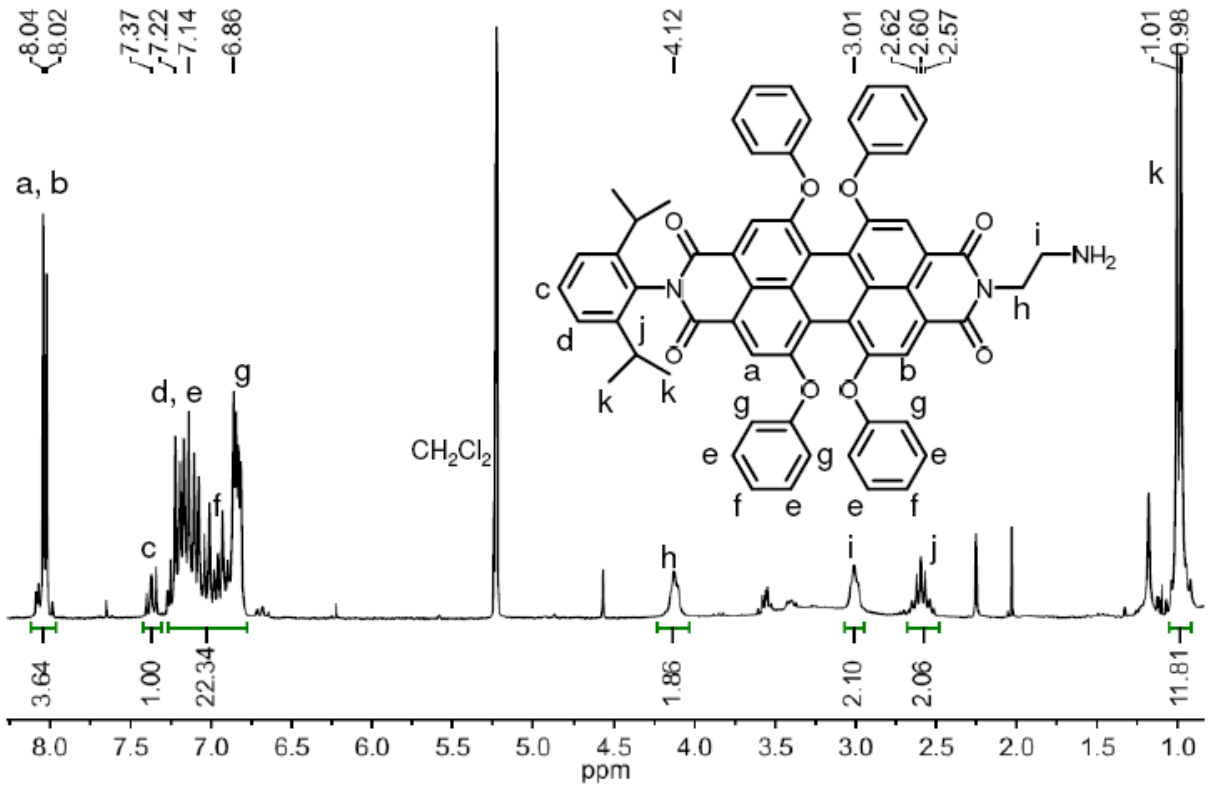


Abbildung 36: ^{1}H-NMR Spektrum (250 MHz) von **35** in CD_2Cl_2 bei Raumtemperatur

Da die Verbindung **35** nur eine sehr geringe Wasserlöslichkeit aufweist, was für die geplante Anwendung nicht von Vorteil ist, werden die Phenoxy-Substituenten sulfoniert um die Hydrophilie des Moleküls zu erhöhen. Dies wird durch Versetzen von **35** mit konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt (Abbildung 34). Dabei bildet sich eine dunkelblaue Lösung, die vor der Dialyse gegen Wasser zunächst mit Wasser verdünnt werden muss, um die Dialysemembran zu schützen. Beim Verdünnen mit Wasser ist darauf zu achten, dass dies vorsichtig unter Eiskühlung geschieht, damit eine zu starke Hitzeentwicklung vermieden wird, da wohlmöglich das Molekül zerstört werden könnte. Nach der Dialyse wird die Lösung gefriergetrocknet und liefert nahezu quantitativ das Tetrasulfophenoxy-PDI **23**. Aufgrund der im Molekül vorhandenen Sulfonsäuregruppen kann eine massenspektroskopische Analyse mittels Felddesorption nicht mehr realisiert werden. Stattdessen wurde die Masse der Zielverbindung durch MALDI-TOF Massenspektroskopie, unter Verwendung von TCNQ als Matrix, bestätigt. ^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR Spektroskopie bestätigen ebenfalls die gewünschte Struktur.

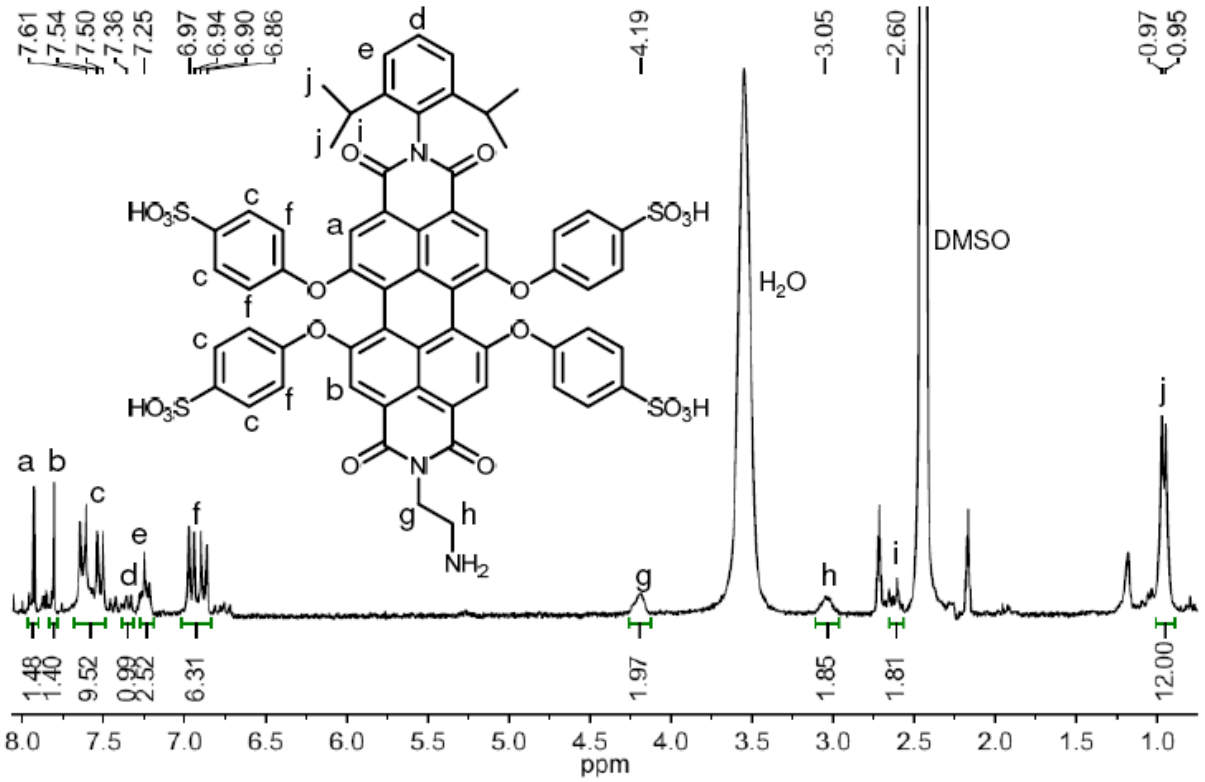


Abbildung 37: ^{1}H-NMR Spektrum (250 MHz) von **23** in DMSO-d^6 bei Raumtemperatur

Im ^{1}H-NMR Spektrum des Tetrasulfophenoxy PDI **23** lassen sich sehr gut die Tieffeldverschiebung der ortho-Protonen (c) der Sulfonsäure erkennen (Abbildung 37). Die chemische Verschiebung beträgt in etwa 7.6 ppm, im Gegensatz dazu befinden sich die äquivalenten Protonen des Tetraphenoxy PDI **35** bei 7.2 ppm. Weiterhin sind die para-Protonen des Tetraphenoxy PDI nicht mehr zu finden, was ein Indiz dafür ist, dass die Sulfonierung wie zu erwarten in 4-Position stattgefunden hat. In dem Spektrum wird auch die Problematik deutlich, dass die sulfonierten PDI-Farbstoffe eine nicht unerhebliche Menge an Wasser beinhalten, obwohl sehr lange dialysiert wurde um die stark hygroskopische Schwefelsäure zu entfernen.

Die Syntheseroute für die Darstellung des wasserlöslichen Farbstoffs **36** muss so gewählt werden, da durch ein vorheriges Sulfonieren des Monoimid-Monoanhydrids keine anschließende Imidisierung mehr durchgeführt werden kann.

3.3 Synthese des wasserlöslichen Fluoreszenz-Interkalators

Der entscheidende Schritt bei der Darstellung des wasserlöslichen PDI-Chromophors **25** für die selektive Markierung von Disulfidbrücken in Proteinen ist die Verknüpfung des Chromophors **23** mit dem Marker **31** unter Ausbildung einer Amidbindung.

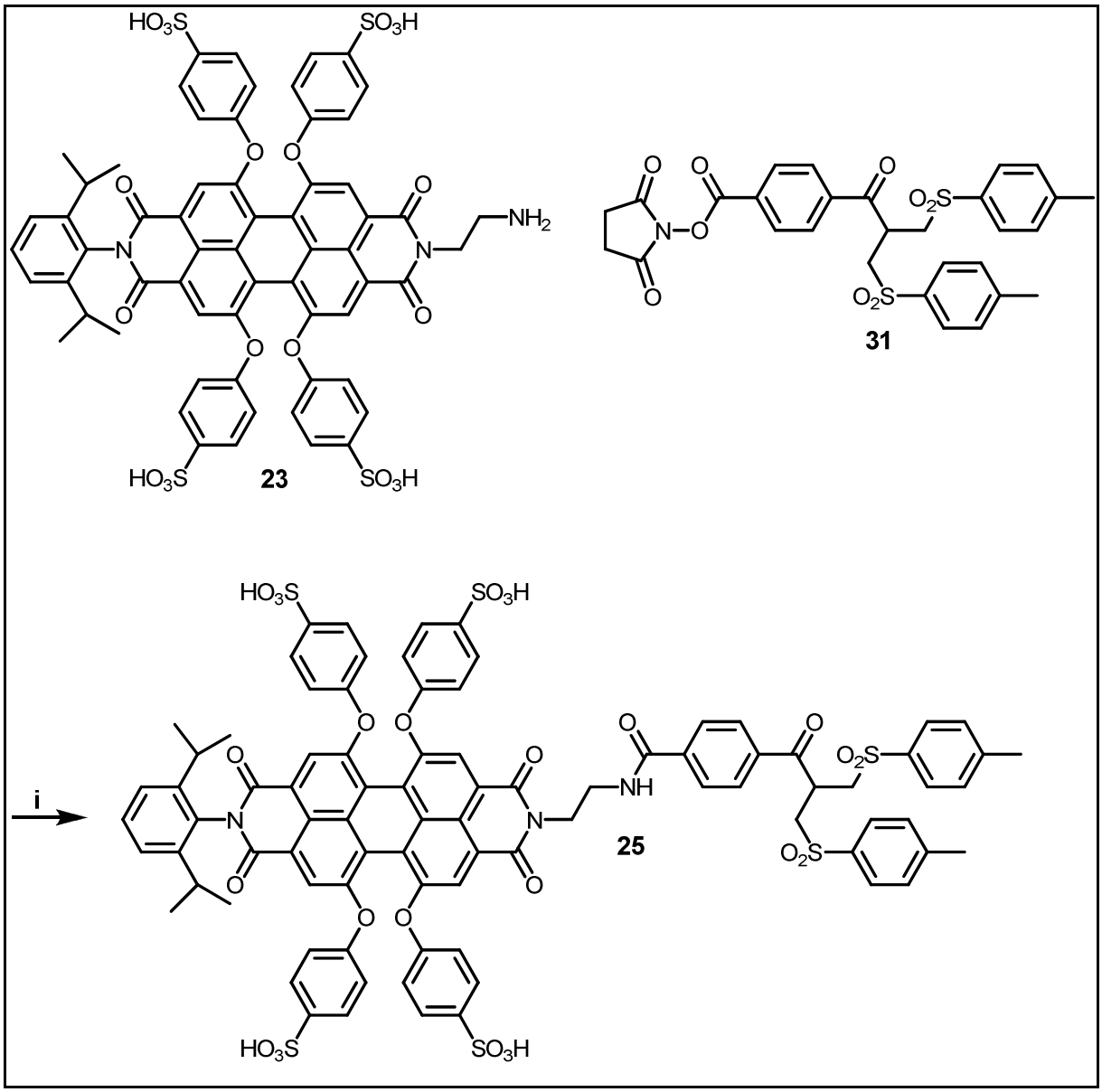


Abbildung 38: Darstellung des wasserlöslichen, funktionalen PDI-Chromophors **36**, zur selektiven Markierung von Disulfidbrücken in Proteinen beziehungsweise Peptiden i: DMF, Triethylamin, RT, 7 d, 54 %

Die Ausbildung der Amidbindung unter den von BROCCHINI et al. beschriebenen Bedingungen, ohne Zusatz einer Hilfsbase, zeigte keinen Erfolg.[40] Durch den sauren Charakter des Chromophors liegt dessen Aminogruppe protoniert vor und ist somit für die Reaktion ungeeignet. Deshalb muss die Knüpfung der Amidbindung in Gegenwart einer Hilfsbase, wie Triethylamin, durchgeführt werden.[89] Diese ist sterisch anspruchsvoll und hat gleichzeitig eine geringe Nukleophilie. Die Notwendigkeit eine Base einsetzen zu müssen erhöht natürlich dementsprechend die Wahrscheinlichkeit, dass wieder ein erheblicher Anteil des Monosulfons gebildet wird, was die Homogenität des Produktes vermindert.
Vor der Verwendung des sulfonierten PDI-Chromophors **23** wird dieser noch mehrfach mit Toluol kodestilliert, um das noch vorhandene Wasser weiter zu reduzieren. Anschließend wird dieser in wenig DMF gelöst, analog wie bei der Darstellung des Bissulfon-NHS-Esters. Das Reaktionsgemisch wird dann mit Triethylamin versetzt, bis sich die Lösung violett färbt. Die Reaktion wird unter milden Bedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt, benötigt aber mit einer Woche eine lange Reaktionsdauer.
Da nach Beendigung der Reaktion schon ein kleiner Teil des Carboxy-Bissulfons **24** und unreagiertem Farbstoff **23** gefunden werden kann, muss das Reaktionsgemisch durch umkehrphasen HPLC aufgereinigt werden. Davor wird das erhaltene Rohprodukt noch über eine Bio-Gel® Säule, deren stationäre Phase aus einem Polyacrylamidgel besteht, filtriert. Somit lässt sich schon ein erheblicher Teil an Verunreinigungen entfernen. Nach der HPLC erhält man das gewünschte wasserlösliche Perylenchromophor zur selektiven Markierung von Disulfidbrücken. Die strukturelle Identität wurde durch MALDI-TOF Massenspektrometrie, ^{1}H- und ^{13}C-NMR Spektroskopie nachgewiesen.

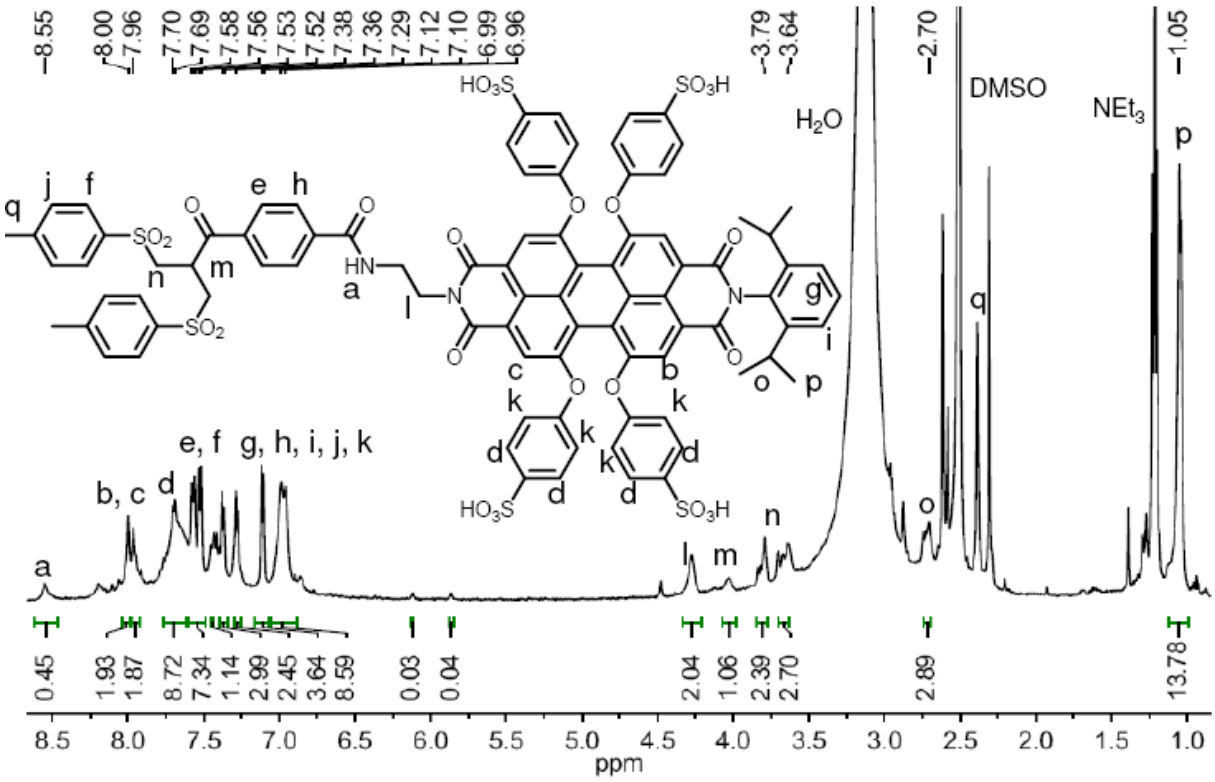


Abbildung 39: ^{1}H-NMR Spektrum (500 MHz) von **25** in DMSO-d^6 bei 353 K

Im 1H-NMR Spektrum von **25** kann man sehr gut erkennen, dass die Reaktion und anschließende Aufreinigung erfolgreich waren (Abbildung 39). Im aromatischen Bereich können keine zusätzlichen Signale für das Carboxy-Bissulfon detektiert werden. Bei 8.55 ppm ist das Amidproton zu erkennen, dessen Integralfläche geringer als der theoretisch zu erwartende Wert ausfällt. Im Gegensatz dazu entsprechen die Integrale der anderen Protonen den erwarteten Werten. Dabei wird auch wieder eine geringe Menge an Monosulfon gefunden, was für die Proteinmarkierung aber nicht von Nachteil ist. Ein weiterer Beleg für die gewünschte Struktur ist die Verschiebung der ortho-Protonen (h) des Amids ins Hochfeld zu 7.37 ppm, im Vergleich dazu befinden sich die äquivalenten Protonen des Carboxy-Bissulfons bei 8.03 ppm.

Als problematisch zeigt sich erneut der hohe Wasseranteil, was durch das Signal bei etwa 3.2 ppm gegeben ist. Dieses Problem kann auch nach wiederholtem Trocknen bei der Elementaranalyse beobachtet werden, wo immer ein zu hoher Wert für Wasserstoff gefunden wird.

Darüberhinaus stellen sich im ^{1}H-NMR Spektrum von **25** die Signale der bay-Substituenten nicht mehr so scharf dar, wie das noch für das unsymmetrische wasserlösliche PDI **23** der Fall gewesen war (Abbildung 39). Als mögliche Erklärung könnte wohl gesteigerte

Aggregation des Perylen-Chromophors dienen, die in der Regel zu einer Signalverbreiterung führt.

Die Analyse von **25** mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie verlief schwierig, da unter Verwendung der gängigen Matrices, wie TCNQ oder Dithranol kein Ergebnis erhalten werden konnte. In beiden Fällen konnte in den Spektren nur Matrixaddukte detektiert werden. Letztendlich brachte DHB als Matrix den gewünschten Erfolg. Bei der Durchführung der Messung ist es auf jeden Fall notwendig, dass die Probe negativ ionisiert wird, da ansonsten nur Matrixaddukte gefunden werden können.

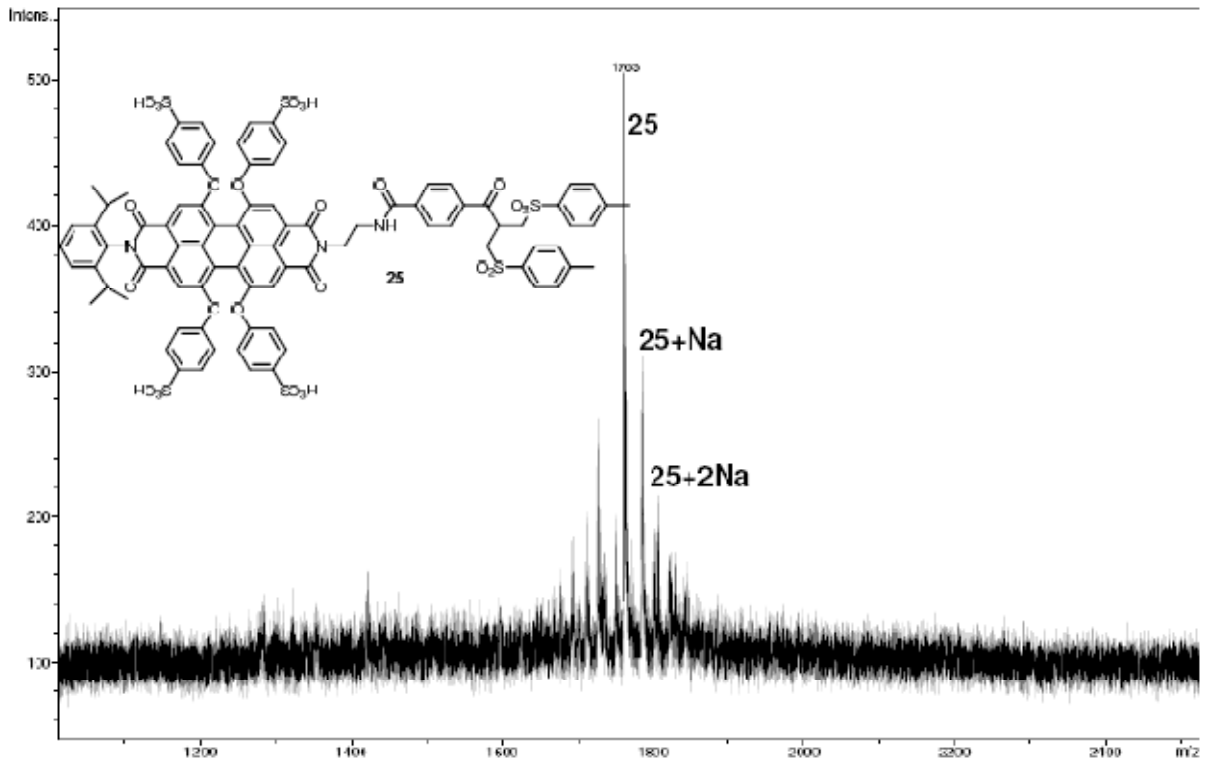


Abbildung 40: MALDI-TOF Massenspektrum des wasserlöslichen PDI (**25**) zur Markierung von Disulfidbrücken in Proteinen und Peptiden

Das MALDI-TOF Spektrum von **25** zeigt das Molekülsignal als Hauptsignal (1763 m/z), darüberhinaus ist das Mono- und Dinatriumsalz, sowie das Kaliumsalz zu finden. Die kleine Menge an Monosulfon, welche im ^{1}H-NMR zu detektieren ist, ist im MALDI-TOF Spektrum nicht erkennbar. Weiterhin liefert das Spektrum die Information, dass kein unreagiertes Chromophor **23** vorhanden ist.

Für die Charakterisierung der optischen Eigenschaften von **36** wurden die UV/vis und Fluoreszenzspektren in Methanol aufgenommen. Die Konzentration, der für die Messung angesetzten Lösung, beträgt dabei 10 mg/L.

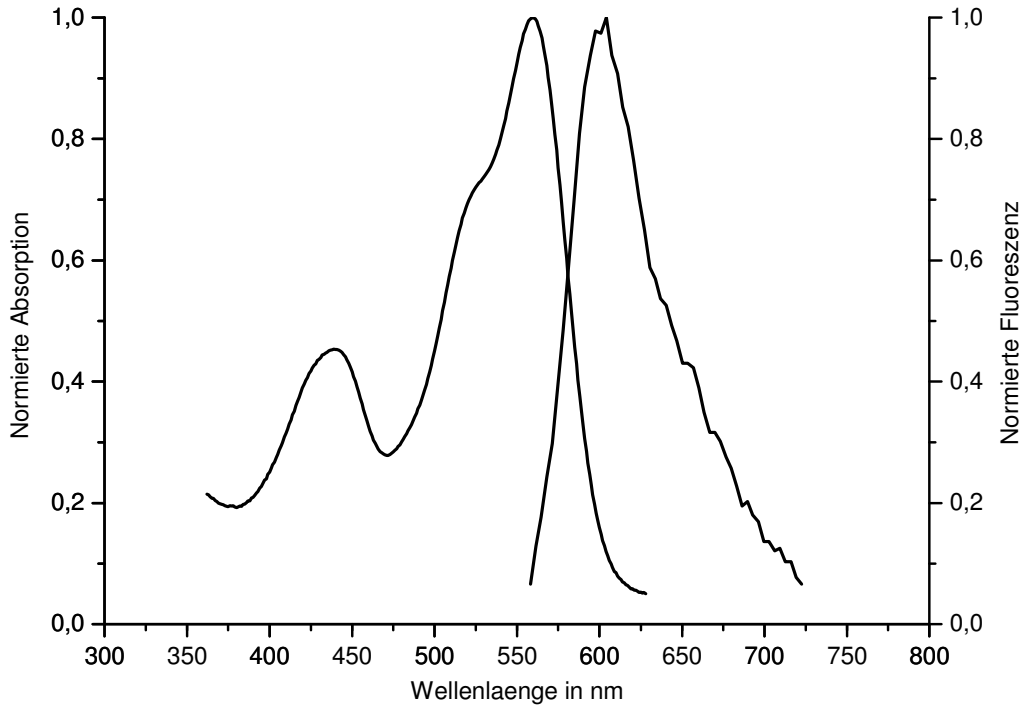


Abbildung 41: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von **25** in Methanol

Die Absorptions- und Emissionsmaxima sind wie für ein in der *bay*-Region durch Phenoxy-Gruppen substituiertes Perylendiimid zu erwarten.[81, 82] Dabei werden drei Absorptionsmaxima erhalten, die für **25** bei 439, 523 und 559 nm liegen und ein charakteristisches Emissionsmaxima, das für **25** bei 604 nm zu finden ist. Der große molare Extinktionskoeffizientvon von 27027 M^{-1} cm^{-1} ist ebenso typisch.

3.4 Synthese eines hydrophoben Fluoreszenz-Interkalators

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung eines PDI-Chromophors zur selektiven Markierung von Disulfidbrücken, sollte die folgende Syntheseroute liefern (Abbildung 42). Der Vorteil bei dieser Route ist, dass die Verbindung **37** bereits den eigentlichen Michael-Akzeptor trägt. Dadurch können Proteine und Peptide die in der Regel unter leicht sauren Bedingungen

stabiler sind als im basischen markiert werden. Für das Peptid Somatostatin sind auch hinreichend Informationen bekannt, dass die Markierung unter leicht sauren oder neutralen Bedingungen durchgeführt wurde.[33] Die Eliminierung des ersten Moleküls *p*-Toluylsulfinsäure ist somit nicht mehr nötig, da diese bereits stattgefunden hat. Dadurch ist ein basischer pH-Wert zur Abstraktion des sauren Protons am α-Kohlenstoff ebenfalls nicht notwendig (Abbildung 42).

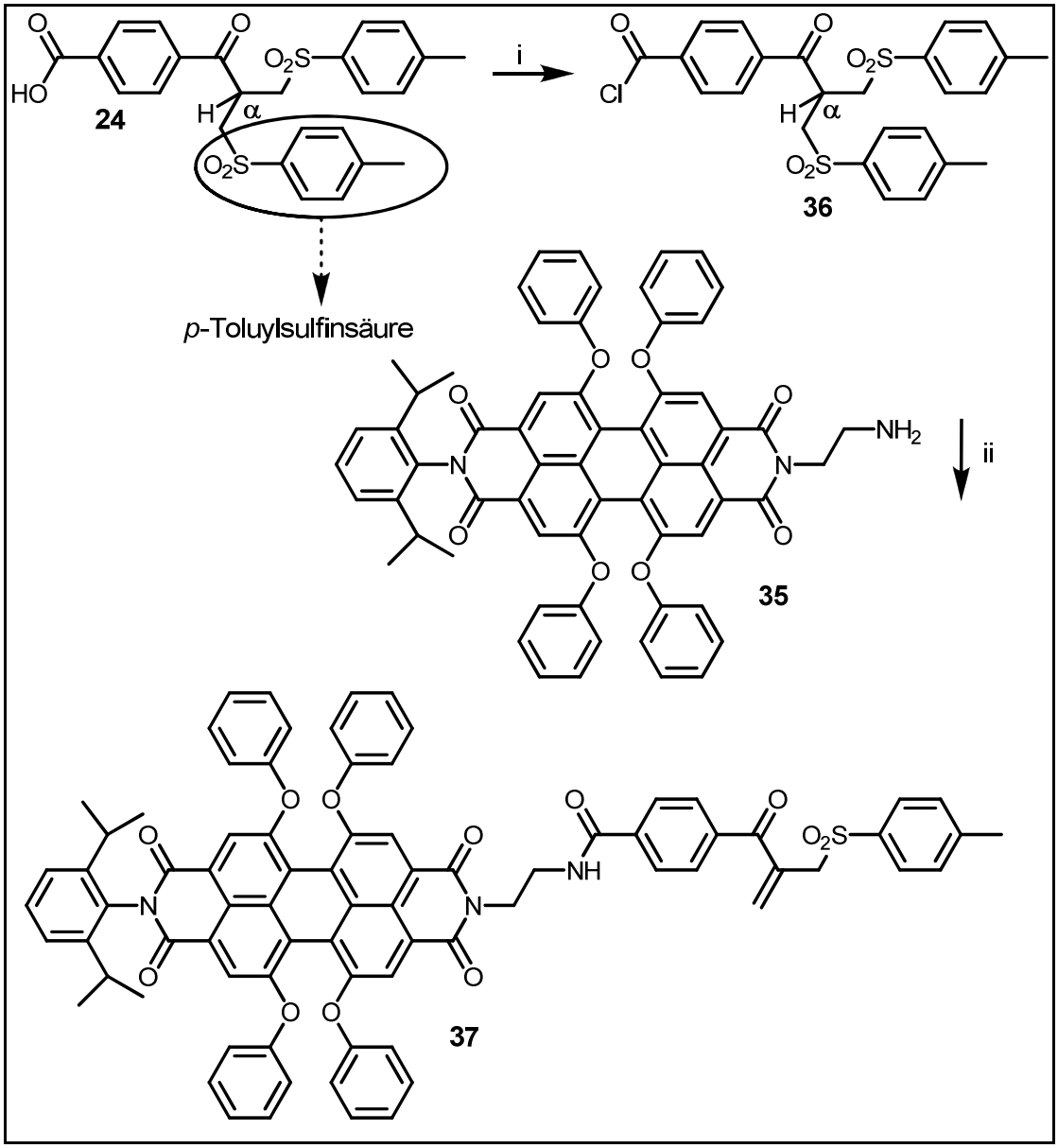


Abbildung 42: Synthese von N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-[N-((4-(2-*p*-tolylsulfonylmethyl)acryloyl)-benzoyl)2-aminoethyl]-1,6,7,12-tetraphenoxyperylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (**37**) i: Thionylchlorid, 75 °C, 20 h, 64 % ii: DCM, Triethylamin, RT, 48 h, 84 %

Für die Darstellung des Chromophors wird zunächst aus dem Carboxy-Bissulfon **24** das entsprechende Säurechlorid **36** synthetisiert. Das Säurechlorid wird verwendet, da es gegenüber dem NHS-Ester weitaus reaktiver ist.[85] Um das Säurechlorid darzustellen wird die Säure in Thionylchlorid unter Rückfluß erhitzt, wobei kein zusätzliches Lösungsmittel benötigt wird. Nach dem Entfernen des überschüssigen Thionylchlorids, wird der erhaltene Rückstand ausgiebig mit Diethylether gewaschen und liefert so das Produkt **36**. Die Struktur des Produktes wurde durch FD-Massenspektrometrie, IR-Spektroskopie, Elementaranalyse, 1H-NMR und 13C-NMR Spektroskopie bestätigt.

Im FD-Spektrum konnte das Säurechlorid gefunden werden. Allerdings ist zu beachten, dass die äquivalente Säure nicht optimal mit FD-Massenspektrometrie zu detektieren ist. Das ^{1}H-NMR Spektrum zeigt im Vergleich zur freien Säure eine leichte Verschiebung ins Tieffeld der aromatischen Protonen am Säurechlorid.

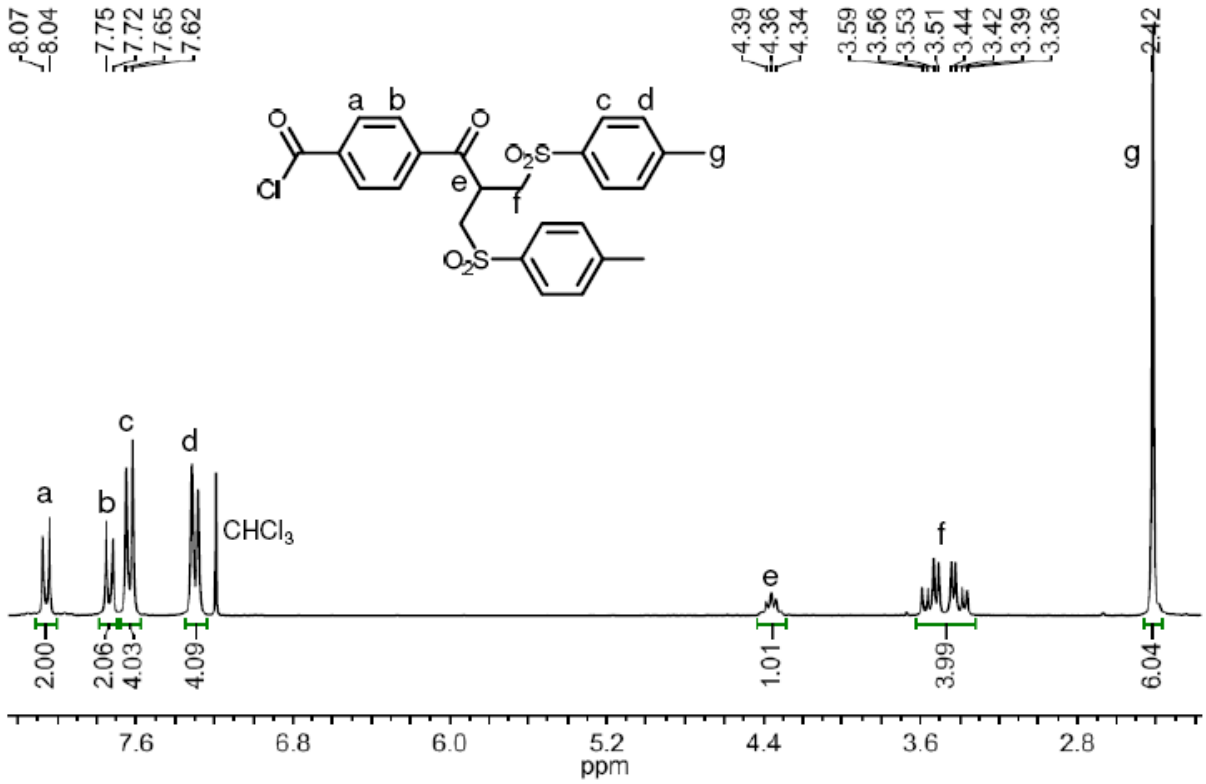


Abbildung 43: ^{1}H-NMR Spektrum (250 MHz) von **36** in $CDCl_3$ bei Raumtemperatur

Das tertiäre Kohlenstoffatom des Säurechlorids wird im ^{13}C-NMR Spektrum bei 167.67 ppm gefunden und weist im Gegensatz zur freien Säure damit eine signifikante Verschiebung im Gegensatz zur Säure bei 170.08 ppm auf.

Einen weiteren Beweis der strukturellen Identität liefern die IR-Spektren des Säurechlorids und der Säure. Für die Säure **24** (rote Kurve) ist im Bereich von 3000 Wellenzahlen die breite OH Bande zu finden. Das Säurechlorid **36** (grüne Kurve) zeigt keine äquivalente breite Bande in diesem Bereich.

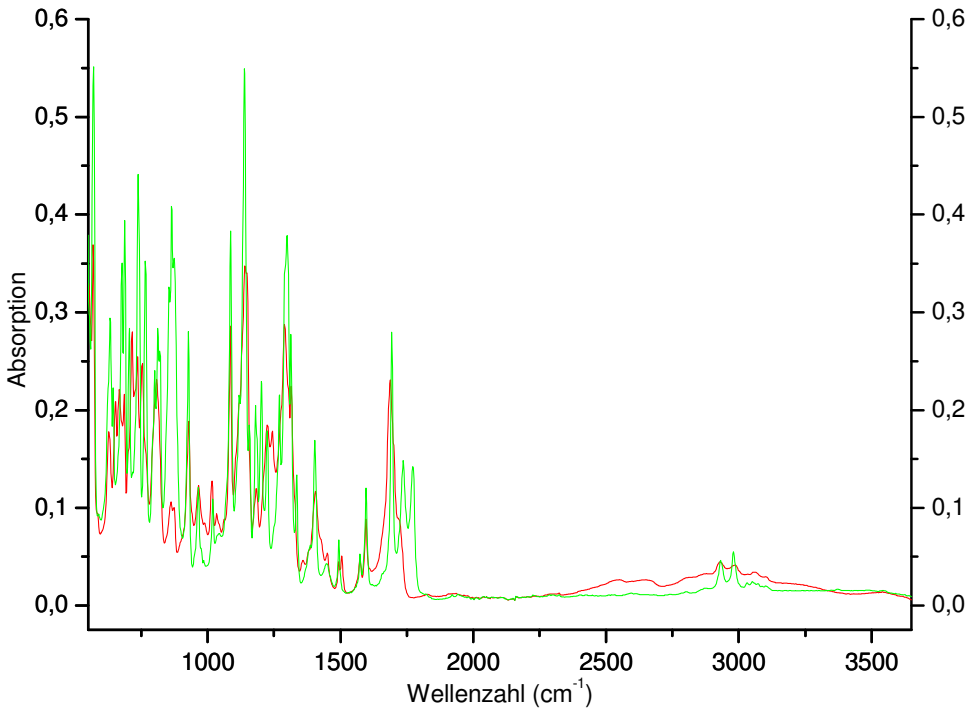


Abbildung 44: IR-Spektrum der Säure **24** (rot) und des Säurechlorid **36** (grün)

Die Elementaranalyse des Säurechlorids **36** liefert mit minimaler Abweichung die theoretisch zu erhaltenen Werte.

Das so dargestellte Säurechlorid wird nun mit dem wasserunlöslichen unsymmetrischen PDI **35** verknüpft, wobei wiederum die Ausbildung der starken Amidbindung ausgenutzt wird. Um das Säurechlorid nicht zu hydrolysieren wird die Reaktion in einer Argonatmosphäre mit trockenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die Reaktion kann bei Raumtemperatur realisiert werden, setzt aber das Verwenden einer Hilfsbase voraus, damit direkt in Lösung das entsprechende Monosulfon gebildet wird. Durch Überprüfung mittels FD-Massenspektroskopie lässt sich erkennen, dass die Bildung des Amids rasch abläuft. Die vollständige Eliminierung zum Monosulfon dauert allerdings recht lange. Durch Aufreinigung

mittels Säulenchromatographie an Kieselgel kann das Produkt isoliert werden. Die Struktur des Produktes wurde durch FD-Massenspektrometrie, Elementaranalyse, 1H-NMR und 13C-NMR Spektroskopie belegt.

Im FD-Spektrum von **37** ist sehr gut zu sehen, dass kein unreagierter Farbstoff (962.1) und ebenfalls kein Bissulfon (1444.6) mehr detektiert werden kann.

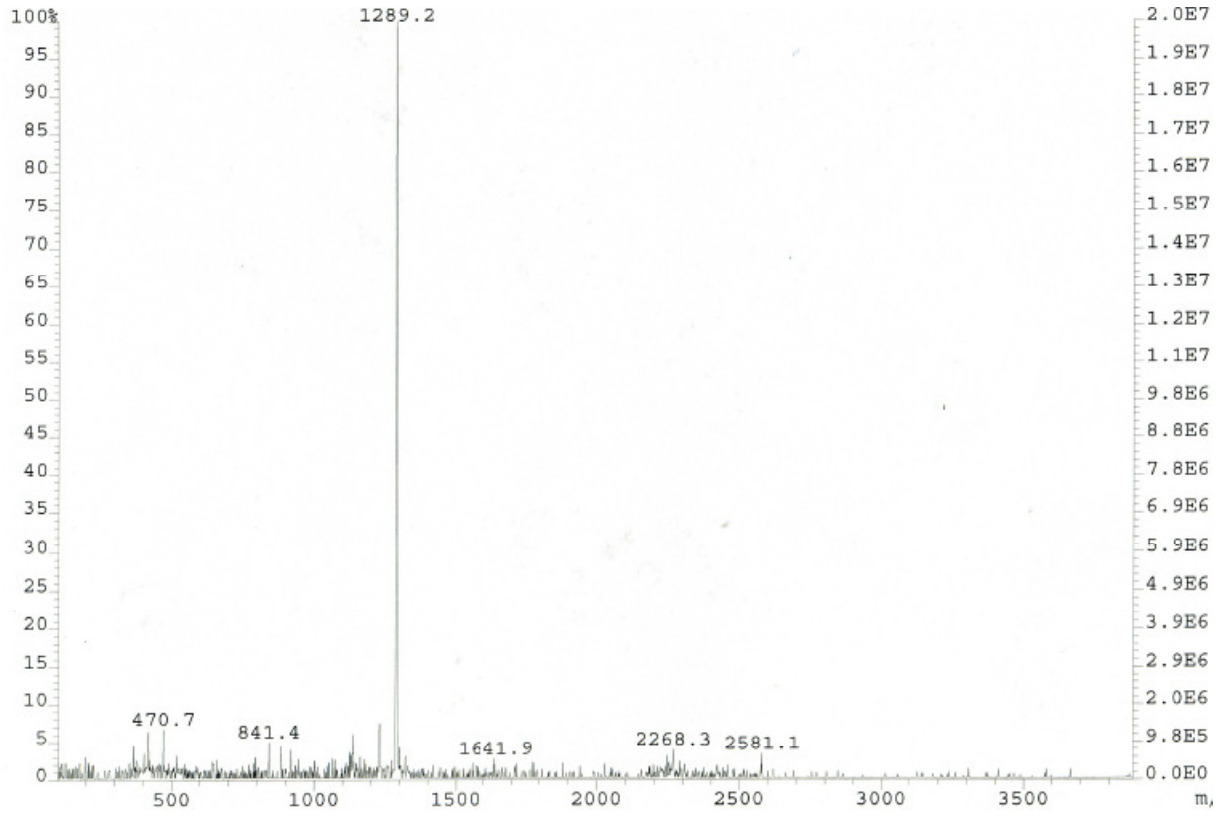


Abbildung 45: FD-Massenspektrum von **37** (1289.2 m/z)

Das ^{1}H-NMR Spektrum von **37** zeigt eine deutliche Verschiebung der ortho-Protonen des Amids ins Hochfeld im Gegensatz zum Säurechlorid, beziehungsweise zur Säure (Abbildung 46). Die erfolgreiche Darstellung kann anhand weiterer charakteristischer Signale festgemacht werden. Unter anderem durch die beiden Vinyl-Protonen bei 6.19 und 5.96 ppm. Für das Monosulfon wird dementsprechend auch nur noch ein Integral von 3.03, im Vergleich zum Bissulfon mit 6, für die Methylprotonen desToloyl-Restes erhalten. Typisch ist auch das Auftreten des Signals für das Amidproton bei 6.96 ppm.

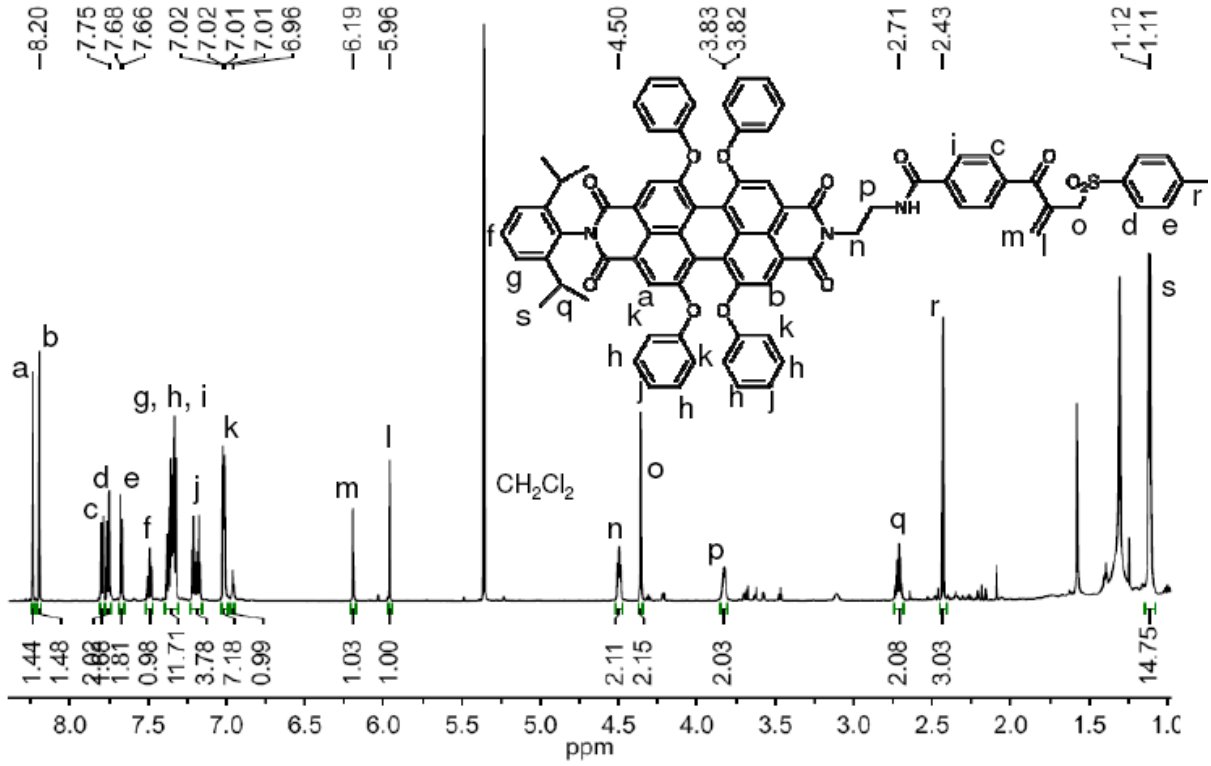


Abbildung 46: ^{1}H-NMR Spektrum (700 MHz) von **37** in CD_2Cl_2 bei Raumtemperatur

Für die Charakterisierung der optischen Eigenschaften von **37** wurden die UV/vis und Fluoreszenzspektren in Dichlormethan aufgenommen. Die Konzentration, der für die Messung angesetzten Lösung, beträgt dabei 10 mg/L.

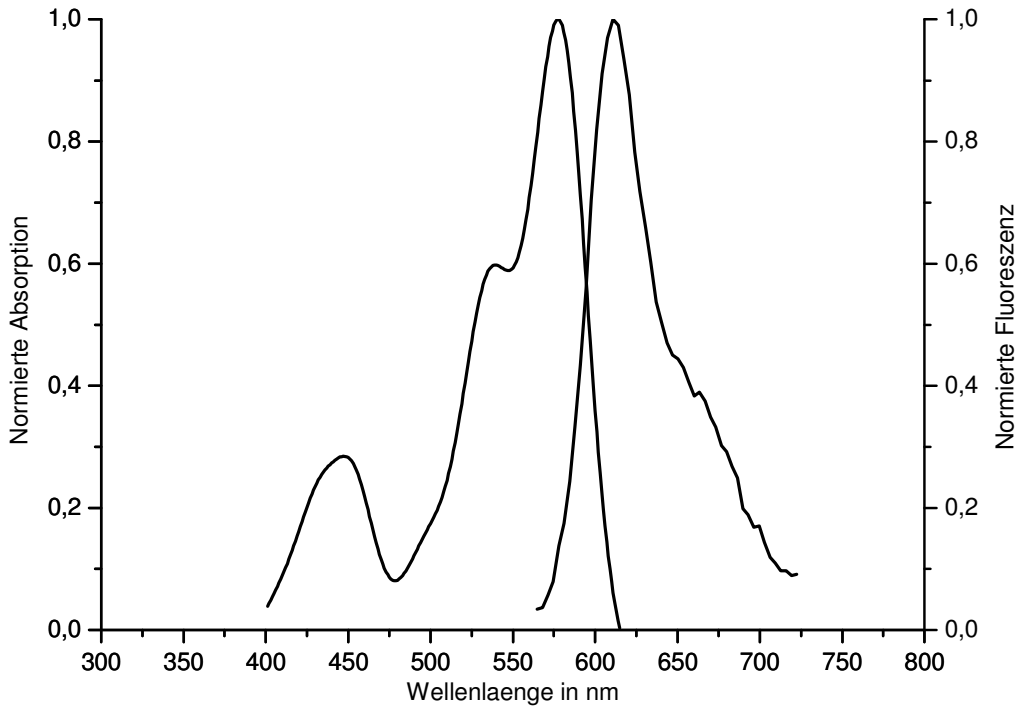


Abbildung 47: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von **38** in Dichlormethan

Wie zu erwarten erhält man wieder ein für in der *bay*-Position durch Phenoxylreste substituiertes Perylendiimid charakteristisches Spektrum, mit drei Absorptionsmaxima bei 447, 539 und 577 nm. Der molare Extinktionskoeffizient ist mit 39559 M-1 cm-1 sehr hoch und das Emissionsmaximum von **37** liegt bei 610 nm.

Die so erhaltene Verbindung **37**, wäre nun prinzipiell in der Lage, Peptide mit einem PDI-Chromophor zu markieren. Da **37** aber sehr hydrophob ist kann es bei der Markierung zu Löslichkeitsproblemen kommen. Um dies zu umgehen wird die Polarität der Verbindung erhöht, indem erneut die Phenoxy-Gruppen in der *bay*-Position sulfoniert werden (Abbildung 48). Dafür wird **37** mit konzentrierter Schwefelsäure und unter anderem mit einem Gemisch aus Oleum und konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Als problematisch könnte sich allerdings erweisen, dass die Amidbindung, die Doppelbindung oder das Carbonyl von **37**, den drastischen Bedingungen nicht standhalten.

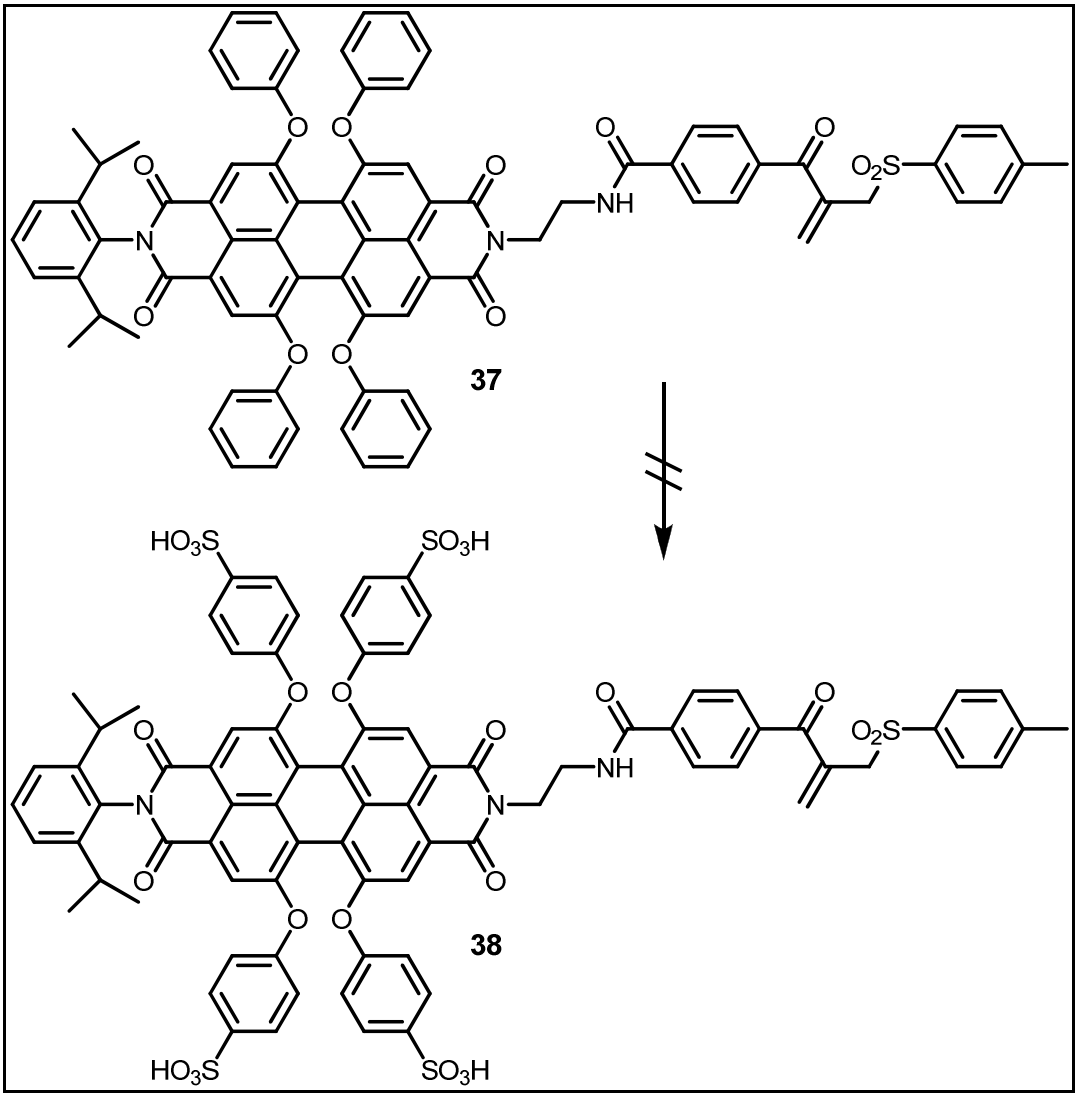


Abbildung 48: Geplante Synthese eines funktionalen, wasserlöslichen PDI-Chromophors **38** für die Markierung von Disulfidbrücken

Zunächst wurde **37** mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt und nach dem gängigen Verfahren aufgearbeitet. Nach der Dialyse gegen Wasser, mit darauffolgender Gefriertrocknung erhielt man eine gut wasserlösliche Verbindung. Das MALDI-TOF Spektrum dieser Verbindung zeigte aber, dass es sich erstaunlicherweise nur um das dreifach sulfonierte Produkt handeln sollte. Daraufhin werden die Reaktionsbedingungen noch weiter verschärft. Zu der Lösung von **37** in Schwefelsäure werden 10 und 20 % Oleum hinzugefügt, um die vierfache Sulfonierung zu erreichen. Die anschließende Analyse mit MALDI-TOF Massenspektroskopie lieferte allerdings dasselbe Ergebnis, welches wieder für eine Dreifachsulfonierung spricht.

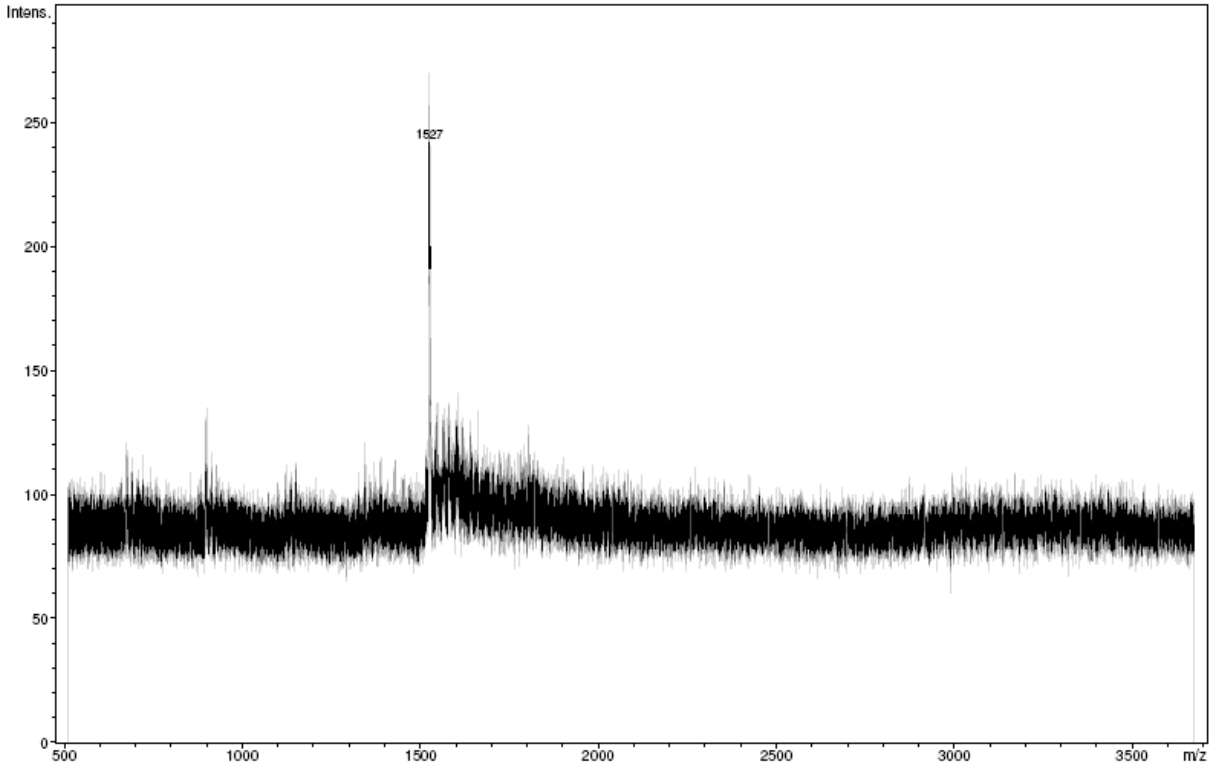


Abbildung 49: MALDI-TOF Spektrum des Sulfonierungsproduktes von **37**

Da die Verbindung gute Wasserlöslichkeit zeigte und somit für eine Proteinmarkierung nicht ungeeignet ist, sollte die strukturelle Identität mit ^{1}H- NMR Spektroskopie bewiesen werden. Das aufgenommene ^{1}H- NMR Spektrum der Verbindung, die lediglich nur mit Schwefelsäure behandelt wurde, lieferte dann jedoch das Ergebnis, dass die Struktur zerstört wurde. Dies ist durch das Fehlen einiger, für die zu erwartende Struktur, charakteristischer Signale zu erkennen.

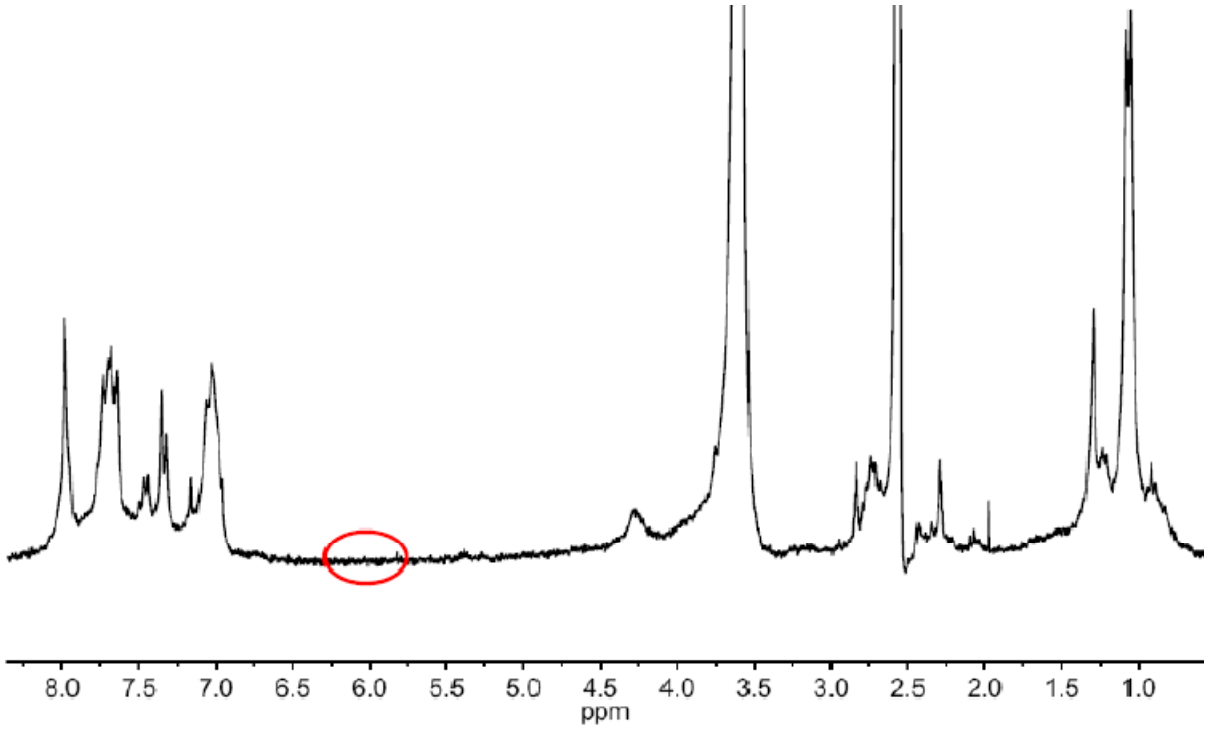


Abbildung 50: ^{1}H-NMR Spektrum des Sulfonierungsproduktes von **37**

Bei den im 1H-NMR Spektrum fehlenden Signalen, handelt es sich um die des Michael-Akzeptors für die Thiole des Disulfids. Die typischerweise bei etwa 6 ppm zu findenden Signale der Vinyl-Protonen sind nicht mehr zu erkennen (Abbildung 50). Dagegen sind die PDI Signale noch sehr gut zu sehen, was wiederum für die ausgesprochen hohe Stabilität der PDI-Chromophore spricht. Verwunderlich ist trotzdem das Resultat, der MALDI-TOF Spektroskopie, welches für ein bestehendes und intaktes Molekül spricht. Aber anscheinend hat der Marker für die Disulfidbrücken nicht die Stabilität gegenüber Schwefelsäure, was aufgrund der zahlreichen, schwefelsäuesensiblen Gruppen durchaus sein könnte. Da unter diesen Bedingungen eine Addition von Wasser an die Vinylgruppe von **37** beispielsweise denkbar wäre.

4 Markierung des Peptids Somatostatin

Das dargestellte wasserlösliche PDI-Chromophor **25** wird nun an die Disulfbrücke des Peptids Somatostatin (**26**) kovalent, unter Ausbildung einer drei Kohlenstoffatome umfassenden Brücke, geknüpft. Dafür wird vorausgesetzt, dass die Disulfidbrücke zunächst geöffnet wird. Um die Disulfidbrücke zu öffnen wird tris(2-Carboxyethyl)phosphin (TCEP) verwendet (Abbildung 51). Es hat gegenüber den geläufigen Reagenzien, wie beispielsweise Dithiothreitol, zur Reduktion von Disulfidbrücken den Vorteil, dass es geruchlos, hoch effektiv, gut wasserlöslich und überaus stabil in wässriger Lösung ist.[90]

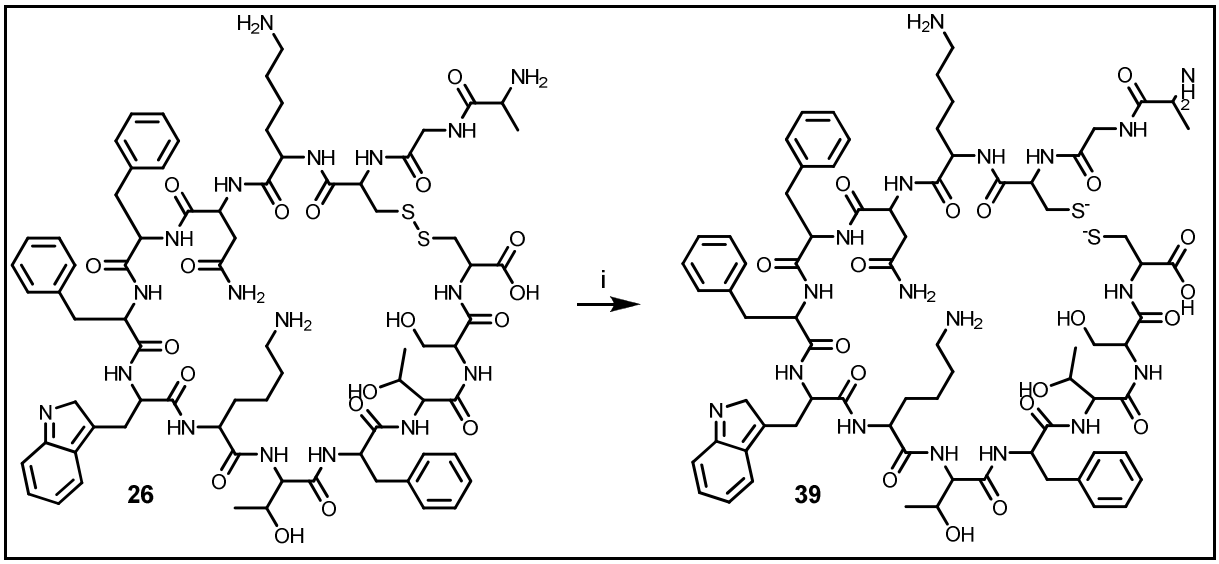


Abbildung 51: Reduktion der Disulfidbrücke von Somatostatin i: 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.8), 2 äq TCEP, 4 °C, 6 h

Die Reduktion der Disulfidbrücke wird in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.8) durchgeführt, dabei ist es wichtig, dass die Lösung nicht mit einem Magnetrührer und Rührkern gerührt wird, sondern nur kurz umgeschüttelt wird, um das Peptid nicht zu zerstören.

Das funktionale PDI-Chromophor **25** für die Markierung der Disulfidbrücke wird in einem Gemisch aus Acetonitril und 50 mM Natriumphosphatpuffer gelöst. Dabei wird gleichzeitig schon ein Teil des Monosulfons in situ generiert, das nach dem beschriebenen Mechanismus als doppelter Michael-Akzeptor mit dem Cystein-Schwefel reagiert. Dabei fungiert das Phosphation als Base zur Abstraktion des aciden Protons, mit anschließender

Eliminierung von einem Molekül *p*-Toluylsulfinsäure. Gleichzeitig kann aber das Phosphation aufgrund seiner schwachen Nukleophilie nicht an der neu gebildeten Doppelbindung angreifen.

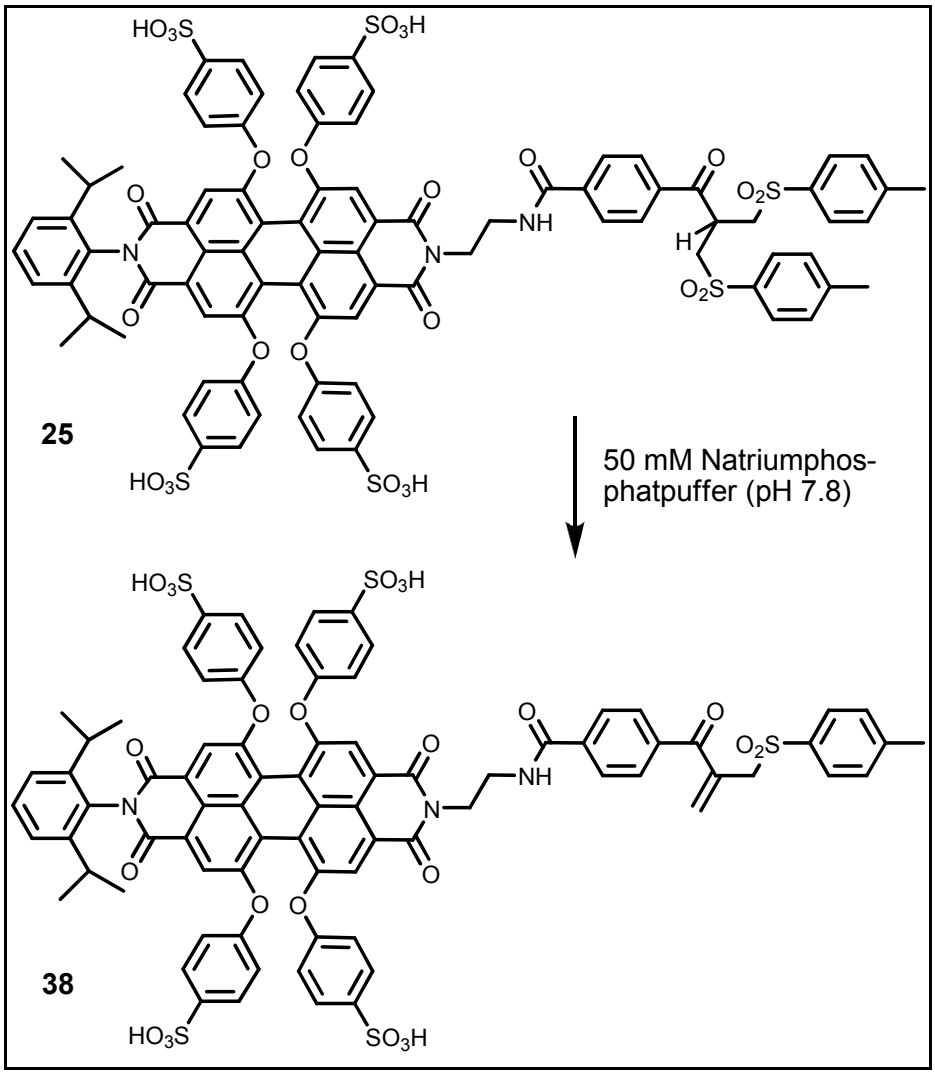


Abbildung 52: Darstellung des Monosulfons **38** aus **25**

Nach der vollständigen Reduktion der Disulfidbrücken des Peptides, werden die Somatostatin- und die PDI-Chromophorlösungen vereint und erneut kurz geschüttelt. Dabei wird auch gleichzeitig vollständig das Monosulfon **38** gebildet.

Das Monosulfon reagiert dann wie schon erwähnt in der bekannten Weise mit dem Cystein-Schwefel (Abbildung 9). Dabei addiert sich zunächst ein Thiol unter Eliminierung des zweiten

Moleküls *p*-Toluylsulfinsäure. An der nun erneut vorhandenen Doppelbindung findet die zweite Michael-Addition statt und liefert dabei die gewünschte Verbindung **27** (Abbildung 53). Die Aufreinigung des Reaktionsgemisches wird dann anschließend durch Umkehrphasen-Chromatographie mit MQ Wasser als Eluens durchgeführt. Dieser Schritt ist notwendig, um die vorliegenden Salze und Reagenzien zu entfernen. Die darauffolgende Gefriertrocknung liefert das Produkt, welches mit MALDI-TOF Massenspektrometrie charakterisiert wird.

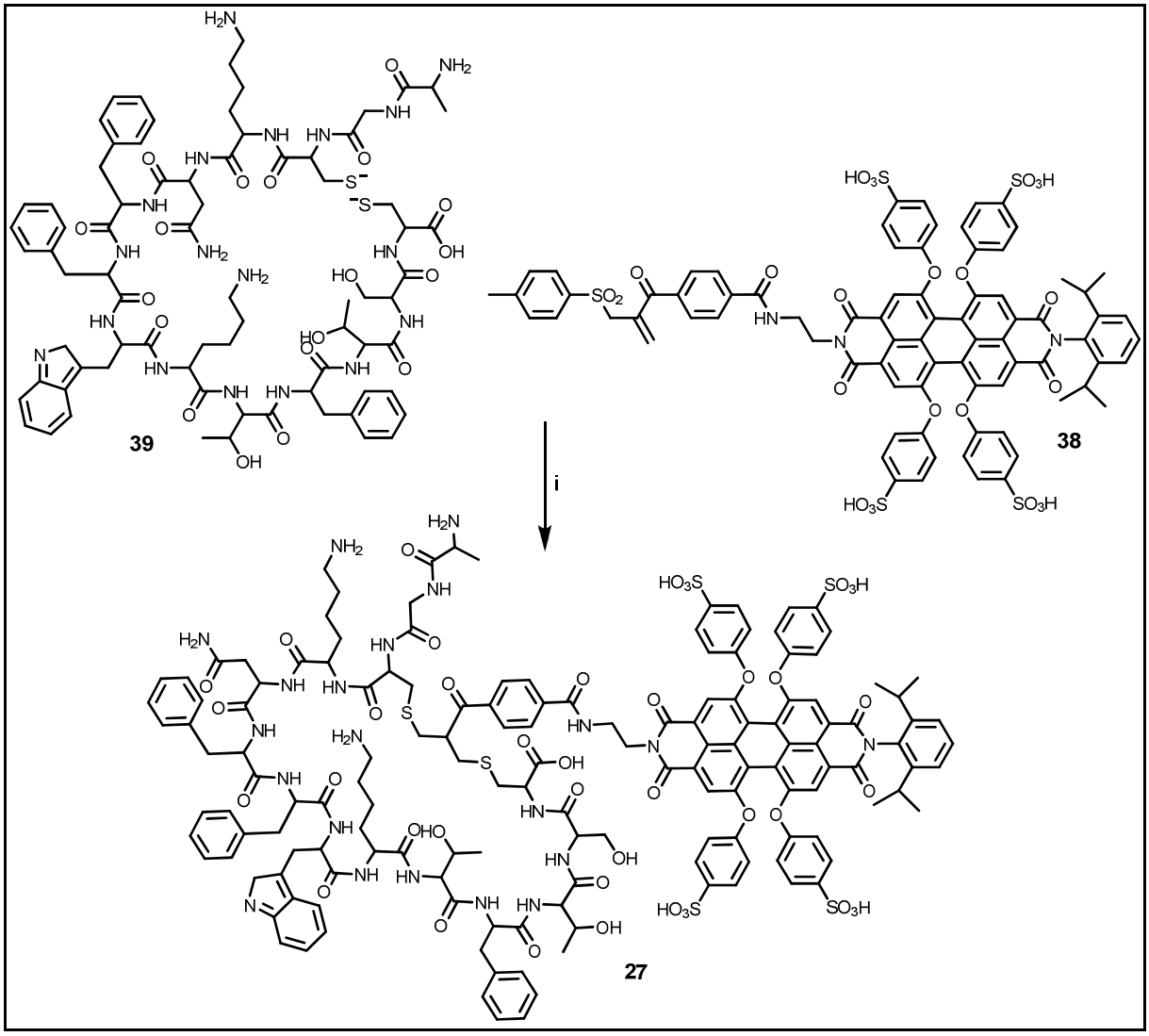


Abbildung 53: Darstellung des mit dem funktionalen PDI-Chromophor **38** markierten Somatostatin **27**
i: 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.8), 4 °C, 16 h

Für die Aufnahme des MALDI-TOF Spektrums wurde eine 0.05 molare Sinapinsäurelösung in einem Gemisch aus 40 % Acetonitril und 60 % 0.1 %ige Trifluoressigsäurelösung in

Wasser angesetzt. Sinapinsäure ist eine gängige Matrix, die für die Proteinanalytik verwendet wird.[91] Da für einen ersten Markierungsversuch von Somatostatin ein Gemisch aus dem funktionalen PDI **25** und dem Carboxy-Bissulfon **24** eingesetzt wurde, ist im erhaltenen Spektrum dementsprechend auch das sogenannte Carboxy-Somatostatin **40** zu finden (1829 m/z).

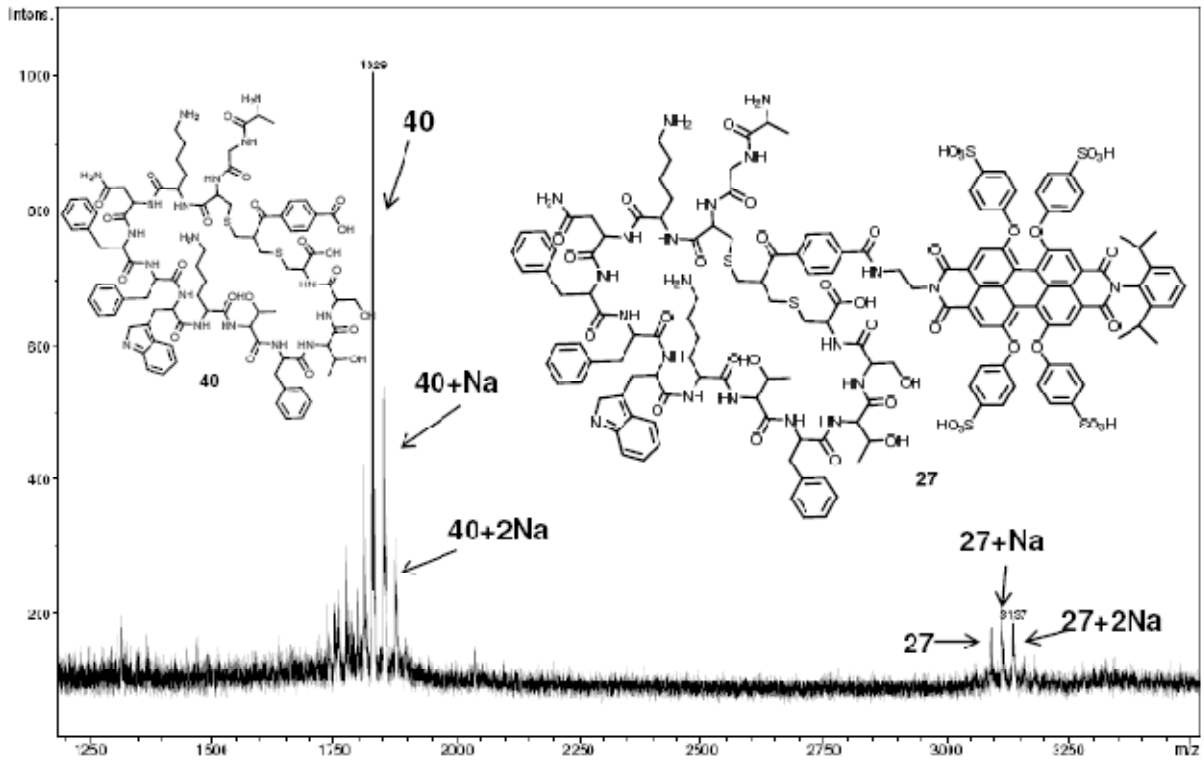


Abbildung 54: MALDI-TOF Spektrum es markierten Somatostatins (Carboxy-Somatostatin **40**, PDI-Somatostatin **27**)

Obwohl in dem Reaktandengemisch zu 80 % das funktionale PDI-Chromophor vorlag, ist das Hauptsignal durch Carboxy-Somatostatin **40** gegeben. Daneben wird auch noch das Mono- und Dinatriumsalz erhalten. Die Signale des PDI markierten Somatostatins sind bei 3092 m/z, 3114 m/z, dem Mononatriumsalz und größten Signal, und 3137 m/z, dem Dinatriumsalz zu finden. Für unreagierten Farbstoff (1608.67 g/mol) und Peptid (1637.88 g/mol) kann kein Signal detektiert werden.

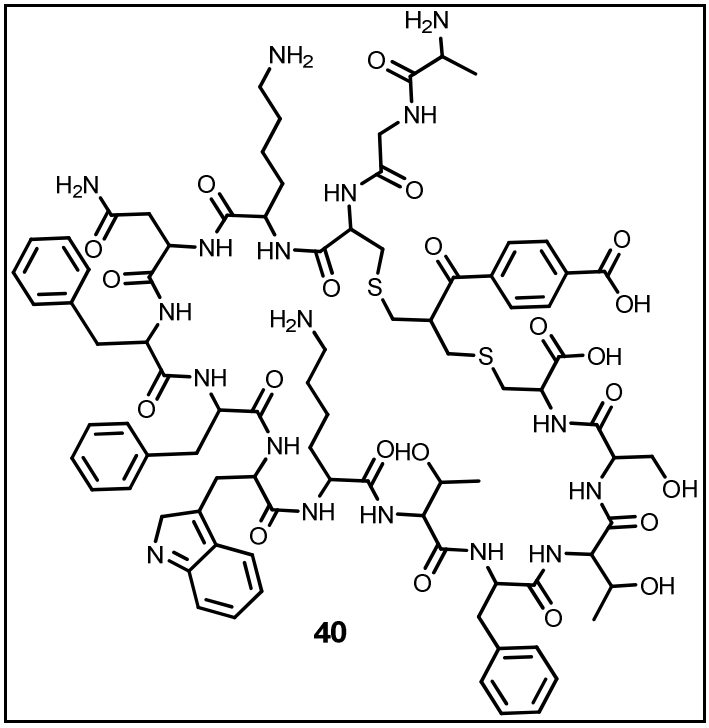


Abbildung 55: Struktur des Carboxy-Somatostatin

Dieses Ergebnis kann zwei Gründe haben, zum Einen ist das Carboxy-Bissulfon kleiner und kann dementsprechend schneller mit dem Peptid reagieren. Und zum Anderen könnte es sein, dass das Carboxy-Somatostatin **40** leichter ionisiert werden kann, wodurch ein größeres Signal erhalten wird, was das Ergebnis natürlich erheblich verfälschen könnte.

Der Versuch Somatostatin mit dem hydrophoben funktionalen PDI **37** zu markieren, war nicht möglich, da die Polaritätsunterschiede beider Verbindungen zu groß sind, so dass in den verwendeten Lösungsmitteln immer eine der beiden Verbindungen ausfällt. Bei der Verwendung von polaren Lösungsmitteln beziehungsweise Gemischen (Wasser/Acetonitril 1:1) wird der Farbstoff nicht gelöst. Ist das Lösungsmittel jedoch zu unpolar lässt sich das Peptid nicht solvatisieren. Eine Analyse der Reaktionsgemische durch MALDI-TOF Spektrometrie bestätigte das Verhalten, da absolut kein zu erwartendes Produkt gefunden werden konnte, sondern nur die jeweiligen Edukte.

5 Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit konnte durch die Markierung von Somatostatin mit einem wasserlöslichen funktionalen PDI-Chromophor erreicht werden. Daneben wurden ein universelles NHS-Ester-Reagenz **31** zur Funktionalisierung von Disulfidbrücken, ein Wasserlösliches funktionales PDI-Chromophor **23**, sowie ein hydrophiler **25** und hydrophober **37** Fluoreszenz-Interkalator dargestellt (Abbildung 56).

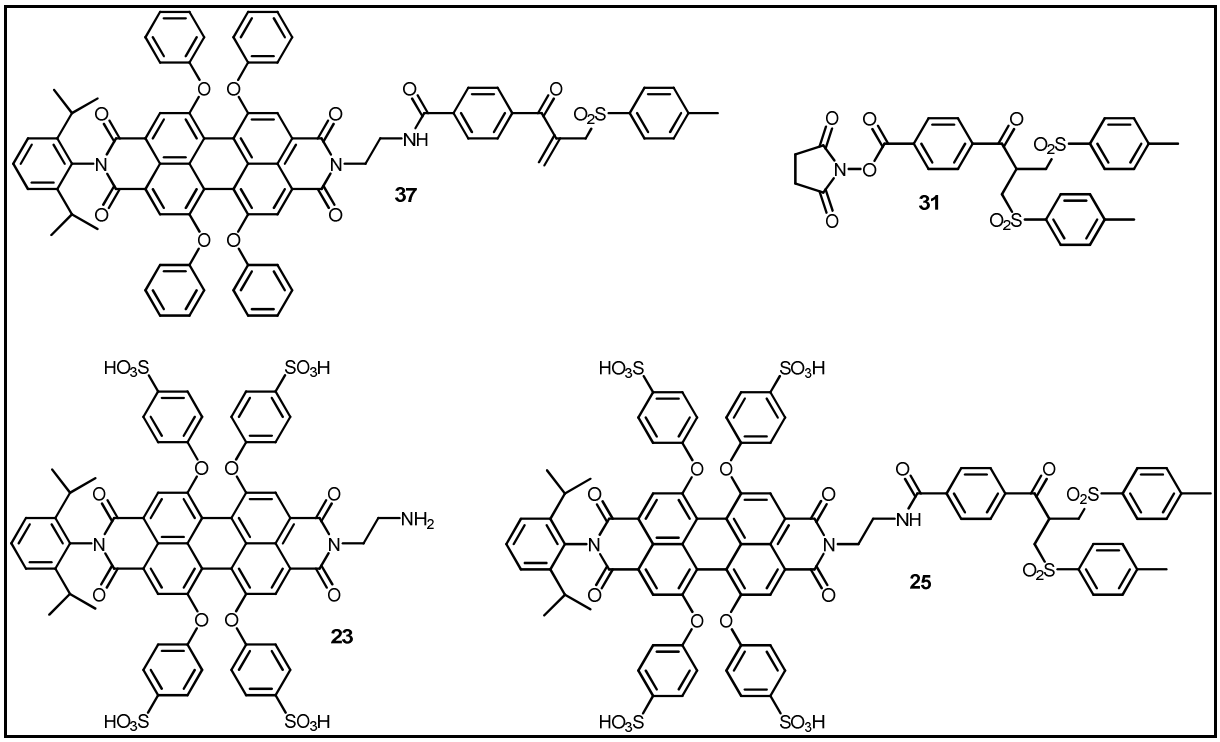


Abbildung 56: Dargestellt Zwischenprodukte

Die Synthese der eigentlichen Markerverbindung, der Bissulfon-NHS-Ester **31**, konnte gemäß der Literaturvorschrift in hohen Ausbeuten erhalten werden. Hierbei ist es für die nachfolgende Markierungsreaktion auch nicht von Nachteil, wenn eine geringe Menge an Monosulfon gebildet wird, da dieses die reaktive Spezies darstellt, beziehungsweise in situ hergestellt wird. Zumal eine Auftrennung beider Komponenten durch Chromatographie nicht möglich ist. Bei der Farbstoffdarstellung sind die Ausbeuten mitunter sehr unterschiedlich. Die Verseifung des symmetrischen PDI zum Monoimid liefert nur schlechte Ausbeuten, da

drei unterschiedliche Verbindungen erhalten werden. Demgegenüber kann die Sulfonierung des unsymmetrischen nahezu quantitativ durchgeführt werden.

Die Darstellung des PDI-Chromophors **25** gelingt nur mit großem Aufwand, da bei der Reaktion zwischen dem NHS-Ester **31** und dem wasserlöslichen, funktionalen PDI-Farbstoff **23** ein Teil des Esters zum Carboxy-Bissulfon **24** hydrolysiert wird und nicht mehr mit dem Farbstoff verknüpft werden kann. Die folgende Auftrennung von **24** und **25** kann nur durch HPLC erreicht werden, was natürlich mit einem erheblichen Aufwand verbunden ist. Der unreagierte Farbstoff kann durch Chromatographie an Bio-Gel® entfernt werden. Die Wasserlöslichkeit des funktionalen PDI **25** ist nicht so hoch wie erwartet, kann aber durch einen geringen Anteil an beispielsweise THF oder Methanol signifikant erhöht werden.

Die Markierung des Proteins funktioniert unter den beschriebenen Bedingungen aber sehr gut. Eine Auftrennung des Carboxy-Somatostatin **40** und PDI-Somatostatin **27** konnte allerdings nicht realisiert werden, da der Polaritätsunterschied erneut zu gering ist. Dies sollte aber kein Problem sein, wenn für die Markierung nur das funktionale PDI **25** eingesetzt wird.

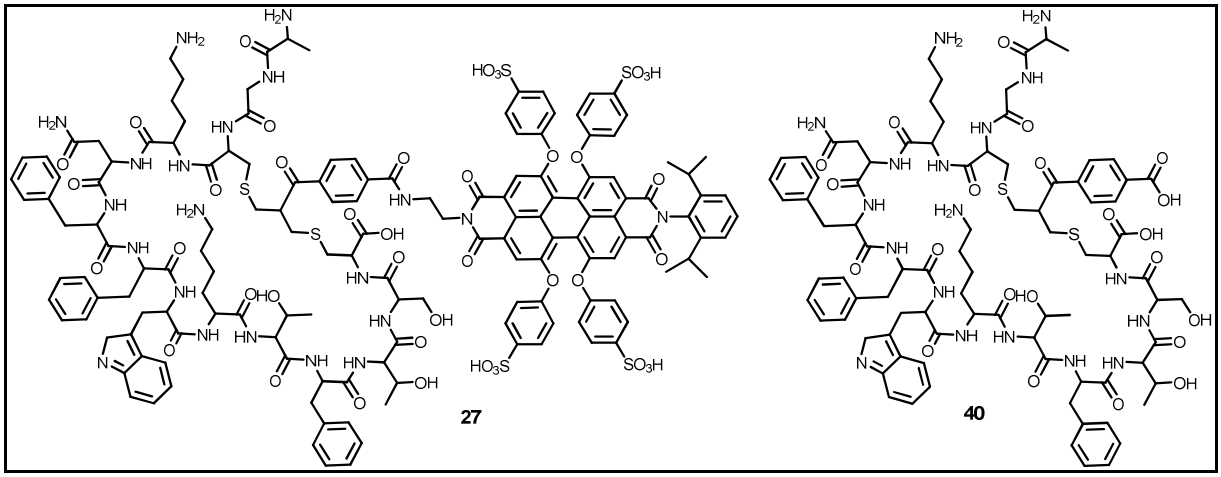


Abbildung 57: Struktur von PDI-Somatostatin **27** und Carboxy-Somatostatin **40**

6 Ausblick

Für die Problematik der Bildung des Amids zwischen dem sulfonierten PDI **23** und Bissulfon-NHS-Ester **31**, ist es durchaus eine Überlegung wert die Verknüpfung direkt mit dem Carboxy-Bissulfon und dem Farbstoff mit Hilfe von Carbodiimiden durchzuführen. So kann eine Synthesestufe eingespart werden und wenn das Kondensationsmittel im großen Überschuss eingesetzt wird, sollte ausschließlich das Amid erhalten werden, somit würde die aufwendige Abtrennung unreagierter Edukte durch HPLC wegfallen. Zumal bei einem Überschuss auch das Wasser des sulfonierten Farbstoffs kein Problem darstellen sollte. Wohlmöglich ist auch die Aufreinigung einfacher, da nur der gebildete Alkylharnstoff entfernt werden muss und nicht wie in der durchgeführten Synthese das Carboxy Bissulfon. Andere Kondensationsmittel, wie zum Beispiel TSTU, wären bei dieser Reaktion als Alternative zum Carbodiimid anzusehen.

Natürlich können auch andere PDI die vielversprechend für eine Markierung sind noch dargestellt werden. Der folgende Farbstoff **41** könnte beispielsweise zur Verknüpfung mit dem Bissulfon genutzt werden (Abbildung 58). Sein Vorteil ist, dass er positive Ladungen besitzt und für ein Protein, das eine negative Nettoladung aufweist, wohl besser zur Markierung geeignet ist, als der sulfonierte Farbstoff.

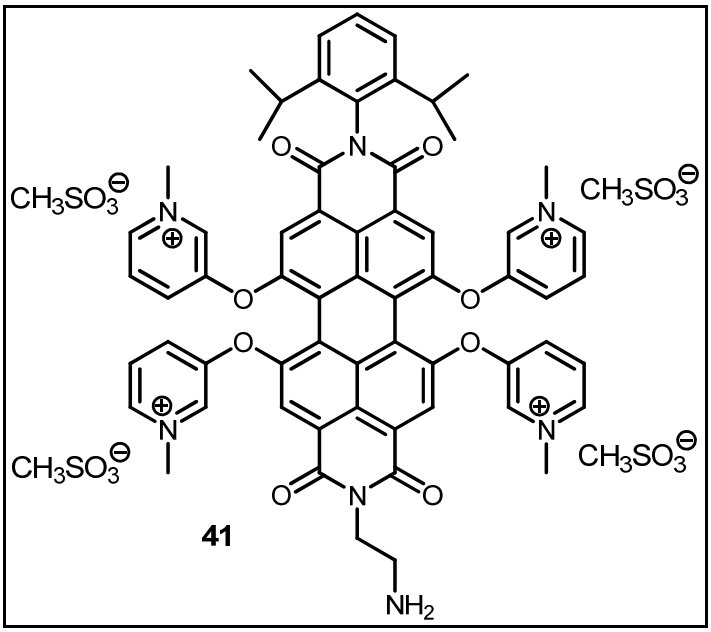


Abbildung 58: Positiv geladenes wasserlösliches PDI-Chromophor

Neben der Verwendung von anderen PDI-Chromophoren kann auch die Art der Verknüpfung von Farbstoff und Bissulfon variiert werden. Wenn zum Beispiel ein Ethinyl-Bissulfon **42** verwendet wird, kann dieses unter Ausbildung eines Triazols mit einem PDI verknüpft werden, das ein Azid trägt. Oder aber man nutzt ein Halo-Bissulfon mit Brom oder Iod und führt eine Buchwald-Kupplung zum Amino-PDI durch. Die Halogen substituierten Bissulfone **43** und **44** wurden schon von A. PFISTERER in der Arbeitsgruppe von Professor MÜLLEN erfolgreich dargestellt (Abbildung 59).

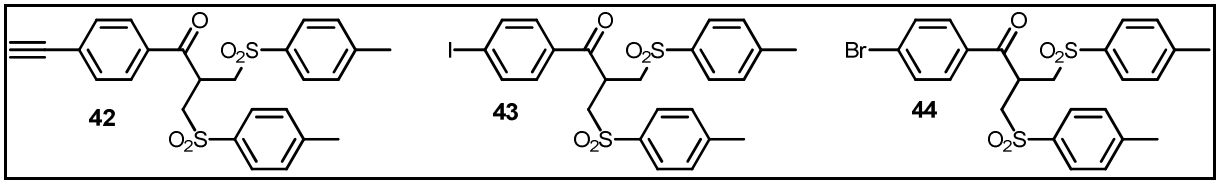


Abbildung 59: Struktur von Ethinyl-, Iod- und Brom-Bissulfon

Eine weitere Änderung der Markierungsstrategie könnte dann natürlich auch darin bestehen, den Zeitpunkt beziehungsweise den Ort der Verknüpfung zu variieren. Das heißt es wäre auch durchaus möglich zunächst ein Bissulfon an das Peptid zu hängen. Um dann anschließend das Chromophor daran anzufügen. Bei der Buchwald-Kupplung könnte sich das allerdings als problematisch erweisen, da das Peptid selbst ebenfalls Amino-Gruppen trägt.

Somit ist also festzustellen, dass dieses Gebiet noch eine Menge an Möglichkeiten für weitere Synthesen und Überlegungen offen lässt, um die Disulfidbrücken in Proteinen selektiv mit funktionalen PDI-Chromophoren zu markieren.

Darüberhinaus sollte die MALDI-TOF Spektrometrie nicht ausschließlich als Charakterisierungs-Methode für das Peptid-PDI Addukt dienen. Da mit MALDI-TOF Spektrometrie zwar eine kovalente Verknüpfung nachgewiesen, nicht aber sichergestellt werden kann, ob sich die drei kohlenstoffatomige Brücke und dementsprechend wieder das zyklische Peptid gebildet hat, soll dies mit ^{1}H-NMR Spektroskopie überprüft werden. Denn wenn im NMR Spektrum des Adduktes die Protonen für die Vinylgruppe gefunden werden können, hat die zweite Addition des Cysteinschwefels nicht stattgefunden (Abbildung 60).

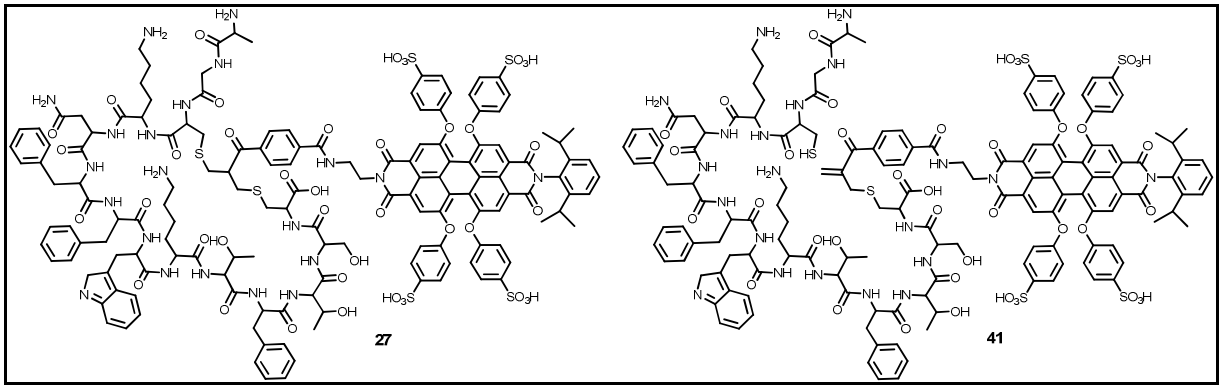


Abbildung 60: Struktur des zyklischen **27** und offenen **41** PDI-Somatostatin

Eine praktische Anwendung des markierten Somatostatins **27** stellt die Fluoreszenzspektroskopie dar, für die PDI-Chromophore schon genutzt wurden.[46, 64] Der entscheidende Vorteil ist aber nun, dass es sich um ein homogenes Produkt handelt und nicht wie in vorigen Anwendungen bei denen, Lysinreste des Proteins markiert wurden. Wenn zum Beispiel eine Zelllinie ausgewählt wird, welche den Somatostatin-Rezeptor exprimiert, kann mittels Fluoreszenzmikroskopie der Weg des Peptids verfolgt werden. Wodurch man neue Erkenntnisse zum entsprechenden Peptid gewinnen kann. Das dargestellte PDI-Chromophor würde sich für eine derartige Anwendung sehr gut eignen, da es Absorptions- und Emissionsmaxima über 500 nm besitzt, was nicht im Auto-Fluoreszenzbereich von Zellen liegt.

Bei der Durchführung einer solchen Anwendung, wäre es natürlich interessant zu sehen, wie sich das PDI-Chromophor im Vergleich zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen bezüglich der optischen Eigenschaften oder Toxizität verhält. Denn grundsätzlich handelt es sich bei den PDIs, aufgrund derer herausragenden Eigenschaften, um den perfekten Biomarker. Sie sind äußerst stabil und haben hohe Fluoreszenzquantenausbeuten, nur um ein paar äußerst überzeugende Argumente anzuführen.

Der Vorteil bei dieser Markierungsstrategie ist, dass eine Vielzahl von Proteinen selektiv markiert werden kann, da nahezu jedes Protein Disulfidbrücken besitzt und einige davon sogar leicht zugängliche. Mit dem Literaturbekannten PEG-Bissulfon wurden schon eine Reihe von Proteinen markiert, unter anderem Leptin oder auch Antikörper.[40] Somit gibt es noch ein paar Proteine die mit ziemlicher Sicherheit mit funktionalen PDI markiert werden können. Zumal mit Hilfe von Proteindatenbanken ziemlich genau vorausgesagt werden kann, ob eine Disulfidbindung zur Reaktion befähigt ist.[41]

7 Experimenteller Teil

7.1 Instrumentelle Analytik

Die Analytik der im experimentellen Teil beschriebenen Verbindungen wurde mittels folgender Geräte durchgeführt:

Hochaufgelöste ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie:
Bruker Avance 250
Bruker AMX 300
Bruker DRX 500
Bruker Avance 700

FD-Massenspektrometrie:
VG Instruments

MALDI-TOF-Massenspektrometrie:
Bruker Reflex II-TOF

IR-Spektroskopie:
Nicolet FT-IR 320

UV/vis-Spektroskopie:
Perkin-Elmer Lambda 100

Fluoreszenz-Spektroskopie:
SPEX Fluorog 2 Typ F212
Anregung: Xe-Bogenlampe Osram XBO

Elementaranalyse:
Die Elementaranalysen wurden im Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg Universität in Mainz durchgeführt.
Foss Heraeus vario EL

7.2 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Chemikalien:
Die verwendten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Aldrich, Fluka, Lancaster, Merck und Riedel de Haen bezogen und wenn nicht anders erwähnt auch so eingesetzt.

Lösungsmittel:
Die Solventien wurden in den Reinheitsgraden „zur Aalyse (p. A.)“ beziehungsweise „Chromasolv“ verwendet.

Dünnschichtchromatographie:
Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden kieselgelbeschichtete Aluminiumfolien 60F 254 der Firma Merck verwendet. Die Detektion der Chromatographiezonen erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie durch Eigenfluoreszenz bei 366 nm.

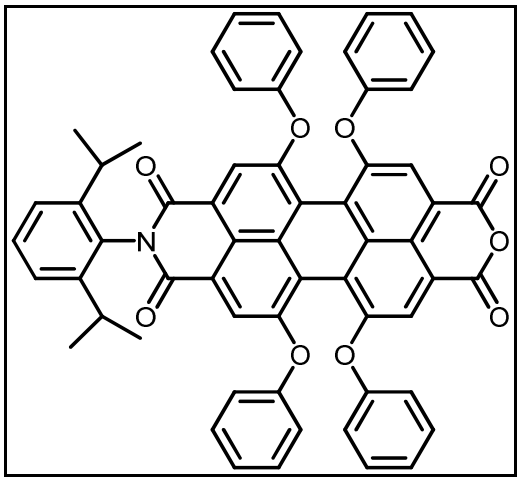
Präparative Säulenchromatographie:
Als stationäre Phase zur säulenchromatographischen Trennung wurde Kieselgel der Korngröße 0.063 mm – 0.200 mm der Firma Merck benutzt. BioGel® wurde von der Firma BioRad bezogen.
Als Eluentien dienten entweder analysenreine Solventien oder Lösungsmittlel technischer Qualität, die vor ihrer Verwendung zur Reinigung destilliert wurden. Die Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel sind für die jeweilige Chromatographie im Text angegeben.

Schutzgas:
Für arbeiten unter Inertgasatmosphäre diente Argon der Firma Linde.

7.3 Beschreibung der Synthesen

7.3.1 Synthese der funktionalen PDI-Chromophore

N-(2,6-Diisopropylphenyl)-1,6,7,12-tetraphenoxyperylen-3,4:9,10-tetracarboxy-9,10-monoanhydrid-3,4-monoimid (34):



Zu einer Lösung von N,N´bis-(2,6-Diisopropylphenyl)-1,6,7,12-tetraphenoxyperylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (**33**) (7.56 g, 7.00 mmol) in einem Liter Isopropanol wird Kaliumhydroxid (148 g, 2.64 mol) gelöst in 130 ml gegeben. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 15 h unter Rückfluss in einer Argonatmosphäre gerührt. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Reaktionsmischung wird mit zwei Liter Wasser verdünnt und danach unter starkem Rühren mit 150 ml konz. Salzsäure versetzt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und im Vakuum bei 60 °C getrocknet. Dieser wird in 100 ml Essigsäure gegeben und 30 min unter Rückfluß erhitzt. 150 ml Wasser werden hinzugefügt, der ausfallende Niederschlag abfiltriert und im Vakuum bei 60 °C getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan und Dichlormethan/Petrolether (6/4) als Eluens gereinigt. Man erhält dabei das Produkt als roten Feststoff.

Ausbeute: 1.31 g (1.42 mmol, 20 %)

MS (FD, 8 kV):
m/z (rel. Int.) = 918.1 (100%) [M^+]

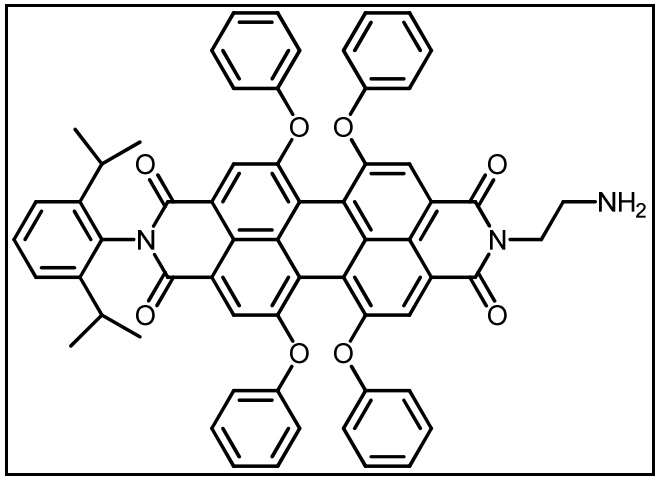
^{1}H-NMR (250 MHz, CD_2Cl_2, 297 K):

δ (ppm) = 8.09 (s, 2H, H_{arom}), 8.07 (s, 2H, H_{arom}), 7.37 (t, 1H, J = 7.50 Hz, H_{arom}), 7.28-7.18 (m, 10H, H_{arom}), 7.13-7.03 (m, 4H, H_{arom}), 6.96-6.87 (m, 8H, H_{arom}), 2.59 (sep, 2H, J = 7.50 Hz, $CH(CH_3)_2$), 1.00 (d, 12H, J = 7.50 Hz, $CH(CH_3)_2$)

^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 297 K):

δ (ppm) = 163.05, 159.80, 156.43, 155.82, 155.00, 145.58, 130.17, 130.07, 129.50, 125.06, 124.85, 123.91, 123.42, 122.09, 121.58, 120.13, 119.99, 119.93, 118.35, 29.10, 23.99

N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-(2-aminoethyl)-1,6,7,12-tetraphenoxyperylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (35):



Zu einer Lösung von N-(2,6-Diisopropylphenyl)-1,6,7,12-tetraphenoxyperylen-3,4:9,10-tetracarboxy-9,10-monoanhydrid-3,4-monoimid (**34**) (680 mg, 0.74 mmol) in 90 ml Toluol wird 1,2-Ethylendiamin (442 mg, 8.33 mol) dazugegeben und 3 h bei 60 °C in einer Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung von überschüssigem Ethylendiamin und dem Lösungsmittel im Vakuum befreit und der Rückstand durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Aceton (9/1) und Dichlormethan/Ethanol (10/3) als Eluens gereinigt, wobei man das Produkt als roten Feststoff erhält.

Ausbeute: 410 mg (0.43 mmol, 58 %)

MS (FD, 8 kV):

m/z (rel. Int.) = 961.6 (100%) [M^+]

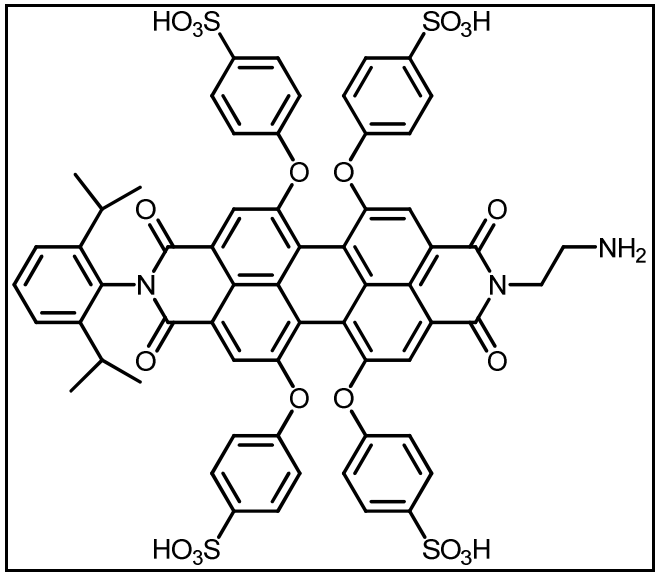
^{1}H-NMR (250 MHz, CD_2Cl_2, 297 K):

δ (ppm) = 8.04 (s, 2H, H_{arom}), 8.02 (s, 2H, H_{arom}), 7.37 (t, 1H, J = 7.50 Hz, H_{arom}), 7.27-7.08 (m, 10H, H_{arom}), 7.07-6.95 (m, 4H, H_{arom}), 6.94-6.80 (m, 8H, H_{arom}), 4.25-4.10 (m, 2H, NCH_2), 2.69-2.50 (m, 2H, $CH(CH_3)_2$), 1.00 (d, 12H, J = 7.50 Hz, $CH(CH_3)_2$)

^{13}C-NMR (300 MHz, CD_2Cl_2, 297 K):

δ (ppm) = 163.94, 163.83, 156.32, 156.14, 155.96, 146.55, 133.57, 131.62, 130.52, 129.95, 125.11, 125.08, 124.54, 123.37, 121.44, 121.16, 120.76, 120.63, 120.48, 120.44, 40.66, 31.16, 29.59, 25.34, 24.23

<u>N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-(2-aminoethyl)-1,6,7,12-tetra(4-sulfophenoxy)perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (23):</u>



Die Verbindung N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-(2-aminoethyl)-1,6,7,12-tetraphenoxyperylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (**35**) (400 mg, 0.42 mmol) wird mit 50 ml konz. Schwefelsäure versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch unter Eiskühlung mit 100 ml Wasser verdünnt und 72 h gegen Wasser dialysiert. Die erhaltene

Lösung wird gefriergetrocknet und liefert das Produkt als roten Feststoff. Dieser wird anschließend fünfmal mit je 100 ml Toluol kodestilliert.

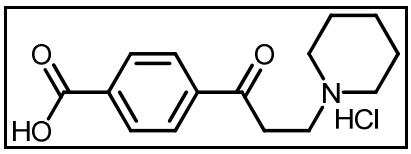
Ausbeute: 430 mg (0.34 mmol, 81 %)

MS (MALDI-TOF):
m/z (rel. Int.) = 1283.0 (100%) [M^+]

^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*^{6}, 297 K):
δ (ppm) = 7.93 (s, 2H, H_{arom}), 7.81 (s, 2H, H_{arom}), 7.63 (d, 4H, J = 7.50 Hz, H_{arom}), 7.52 (d, 4H, J = 10.00 Hz, H_{arom}), 7.36 (t, 1H, J = 7.50 Hz, H_{arom}), 7.24 (d, 2H, J = 7.50 Hz, H_{arom}), 6.96 (d, 4H, J = 7.50 Hz, H_{arom}), 6.88 (d, 4H, J = 10.00 Hz, H_{arom}), 4.27-4.13 (m, 2H, NCH_2), 3.11-2.96 (m, 2H, CH_2NH_2), 2.69-2.54 (m, 2H, $CH(CH_3)_2$), 0.97 (d, 12H, J = 2.50 Hz, $CH(CH_3)_2$)

^{13}C-NMR (250 MHz, DMSO-*d*^{6}, 297 K):
δ (ppm) = 163.61, 163.34, 157.38, 157.22, 155.42, 155.07, 146.02, 141.20, 141.10, 132.84, 123.33, 130.59, 129.38, 128.15, 128.03, 123.79, 123.42, 123.19, 121.35, 121.08, 120.89, 120.36, 119.07, 38.80, 37.92, 29.07, 23.08

<u>4-(3-(Piperidin-1-yl)propanoyl)benzoesäurehydrochlorid (29):</u>



In 30 ml trockenem Ethanol werden *p*-Acetylbenzoesäure (**28**) (5 g, 30.45 mmol), Piperidinhydrochlorid (3.7 g, 30.45 mmol), Paraformaldehyd (2.74 g, 91.35 mmol) gelöst und mit 0.3 ml konz. Salzsäure versetzt. Anschließend wird die Lösung 20 h unter Rückfluss erhitzt, nach 4 h wird erneut Paraformaldehyd (2.74 g, 92.35 mmol) dazugegeben. Zu der abgekühlten Reaktionsmischung werden 50 ml Aceton gegeben, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und dreimal mit 40 ml Aceton gewaschen. Der so erhaltene farblose Feststoff wird im Vakuum bei 60 °C getrocknet.

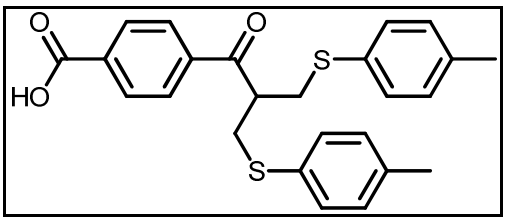
Ausbeute: 5.45 g (18.30 mmol, 60 %)

MS (FD, 8 kV):
m/z (rel. Int.) = 261.3 (100%) [M^+-HCl]

^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*^{6}, 297 K):
δ (ppm) = 10.99-9.96 (m, br, 1H, COO*H*), 8.11 (m, 4H, H_{arom}), 3.72 (t, 2H, J = 7.50 Hz, COCH_2), 3.39 (t, 2H, J = 7.50 Hz, CH_2N), 3.19-2.83 (m, 4H, NCH_2), 1.88-1.73 (m, 4H, $NCH_2CH_2CH_2$), 1.59-1.30 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2$)

^{13}C-NMR (300 MHz, DMSO-*d*^{6}, 297 K):
δ (ppm) = 196.00, 166.41, 138.77, 134.97, 129.44, 127.91, 52.35, 51.09, 33.14, 22.42, 21.28

4-(3-(*p*-Tolylthio)-2-(*p*-tolylthiomethyl)propanoyl)benzoesäure (30):



In einem Gemisch aus trockenem Ethanol und Methanol (1:1) werden 4-(3-(Piperidin-1-yl)propanoyl)benzoesäurehydrochlorid (**29**) (5.15 g, 17.30 mmol) und *p*-Thiocresol (4.29 g, 34.60 mmol) gelöst. Anschließend werden 0.75 ml Piperidin und 5.15 ml einer wässrigen 37 %igen Formaldehydlösung dazugegeben und das Reaktionsgemisch 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach 1 h werden weitere 5.15 ml der wässrigen 37 %igen Formaldehydlösung hinzugefügt. Die abgekühlte Reaktionsmischung wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand aus 15 ml Methanol umkristallisiert. Der so erhaltene farblose Feststoff wird im Vakuum bei 60 °C getrocknet.

Ausbeute: 3.96 g (9.07 mmol, 52 %)

MS (FD, 8 kV):
m/z (rel. Int.) = 436.2 (100%) [M^+]

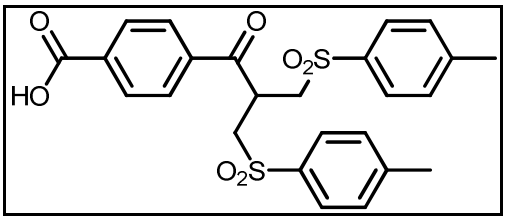
^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$, 297 K):

δ (ppm) = 7.97 (d, 2H, J = 10.00 Hz, HOOC-H_{arom}), 7.55 (d, 2H, J = 7.50 Hz, OC-H_{arom}), 7.08 (d, 4H, J = 7.50 Hz, S-H_{arom}), 6.99 (d, 4H, J = 7.50 Hz, H_3C-H_{arom}), 3.74 (quin, 1H, 7.50 Hz, COC*H*), 3.23-3.05 (m, 4H, CH_2S), 2.29 (s, 6H, CH_3)

^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 297 K):

δ (ppm) = 200.45, 170.40, 140.57, 137.26, 132.89, 131.55, 131.11, 130.28, 129.85, 128.33, 45.92, 36.41, 21.09

4-(3-(*p*-Tolylsulfonyl)-2-(*p*-tolylsulfonylmethyl)propanoyl)benzoesäure (24):



In einem Gemisch aus 130 ml Methanol und deionisiertem Wasser (1/1) werden 4-(3-(p-Tolylthio)-2-(p-tolylthiomethyl)propanoyl)benzoesäure (**30**) (3.84 g, 8.79 mmol) und Oxone® (32.44 g, 52.76 mmol) gelöst und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird danach dreimal mit 100 ml Dichlormethan extrahiert, die organische Phase zweimal mit 100 ml Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Dabei erhält man das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 4.12 g (8.23 mmol, 94 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 499.1 (100%) [M^+-H]

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$, 297 K):

δ (ppm) = 8.03 (d, 2H, J = 10.00 Hz, HOOC-H_{arom}), 7.66 (d, 2H, J = 10.00 Hz, OC-H_{arom}), 7.65 (d, 4H, J = 7.50 Hz, SO_2-H_{arom}), 7.30 (d, 4H, J = 7.50 Hz, H_3C-H_{arom}), 4.34 (quin, 1H, 7.50 Hz, COC*H*), 3.59-3.39 (m, 4H, CH_2SO_2), 2.42 (s, 6H, CH_3)

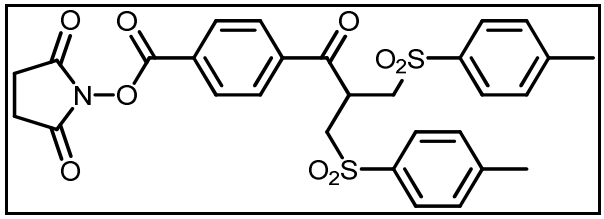
^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 297 K):

δ (ppm) = 196.41, 170.08, 145.61, 138.23, 136.33, 133.70, 130.58, 130.22, 128.58, 128.33, 55.70, 35.74, 21.72

IR (Feststoff):

v (in cm^{-1}) = 3531 (OH, br, w), 2989 (CH_{arom}, w), 2929 (CH_{arom}, w), 1687 (C=O, s), 1594 (m), 1504 (w), 1405 (m), 1290 (s), 1224 (s), 1139 (S=O, s), 1085 (s), 1016 (m), 929 (s), 862 (m), 808 (s), 754 (s), 667 (s), 626 (s)

<u>2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-4-(3-(*p*-Tolylsulfonyl)-2-(*p*-tolylsulfonylmethyl)propanoyl)-benzoat (31):</u>



In 5 ml wasserfreies Dichlormethan werden *N*-Hydroxysuccinimid (488 mg, 4.2 mmol) und 4-(3-(p-Tolylsulfonyl)-2-(p-tolylsulfonylmethyl)propanoyl)benzoesäure (**24**) (2 g, 4.2 mmol) gegeben. Anschließend wird das Reaktionsgemisch unter Eiskühlung mit Diisopropylcarbodiimid (0.65 ml, 4.2 mmol) versetzt und 6 h in einer Argonatmosphäre gerührt. Danach wird über einen Baumwollfilter filtriert, mit 30 ml Dichlormethan verdünnt und fünfmal mit 50 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Dabei erhält man das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 1.64 g (5.48 mmol, 69 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 620.0 (100%) [M^++Na]

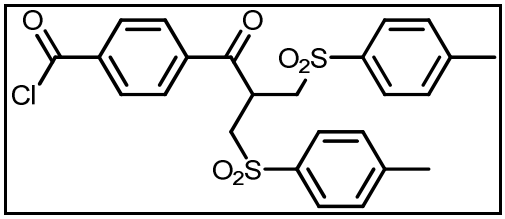
^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$, 297 K):

δ (ppm) = 8.05 (d, 2H, J = 10.00 Hz, NOOC-H_{arom}), 7.63 (d, 2H, J = 10.00 Hz, OC-H_{arom}), 7.56 (d, 4H, J = 7.50 Hz, SO_2-H_{arom}), 7.30 (d, 4H, J = 7.50 Hz, H_3C-H_{arom}), 4.19 (quin, 1H, 7.50 Hz, COC*H*), 3.59-3.37 (m, 4H, CH_2SO_2), 2.83 (s, 4H, CH_2CO), 2.39 (s, 6H, CH_3)

^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 297 K):

δ (ppm) = 195.30, 168.94, 160.95, 145.63, 139.11, 135.28, 130.92, 130.24, 129.58, 128.73, 128.28, 55.66, 35.88, 25.69, 21.70

4-(3-(*p*-Tolylsulfonyl)-2-(*p*-tolylsulfonylmethyl)propanoyl)benzoesäurechlorid (36):



In 10 ml Thionylchlorid wird 4-(3-(p-Tolylsulfonyl)-2-(p-tolylsulfonylmethyl)propanoyl)-benzoesäure (**24**) (200 mg, 0.42 mmol) für 20 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wird der Überschuss an Thionylchlorid im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 15 ml Diethylether aufgenommen, filtriert und fünfmal mit je 20 ml Diethylether gewaschen. Der hierbei erhaltene farblose Feststoff ist das Produkt.

Ausbeute: 140 mg (0.27 mmol, 64 %)

MS (FD, 8 kV):

m/z (rel. Int.) = 519.2 (100%) [M^+]

^{1}H-NMR (250 MHz, $CDCl_3$, 293 K):

δ (ppm) = 8.06 (d, 2H, J = 10.00 Hz, ClOC-H_{arom}), 7.74 (d, 2H, J = 10.00 Hz, OC-H_{arom}), 7.64 (d, 4H, J = 7.50 Hz, SO_2-H_{arom}), 7.30 (d, 4H, J = 10.00 Hz, H_3C-H_{arom}), 4.36 (quin, 1H, 7.50 Hz, COC*H*), 3.56-3.36 (m, 4H, CH_2SO_2), 2.42 (s, 6H, CH_3)

^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 297 K):

δ (ppm) = 196.46, 167.67, 145.66, 139.37, 137.12, 135.33, 131.51, 130.24, 128.93, 128.26, 55.93, 35.70, 21.71

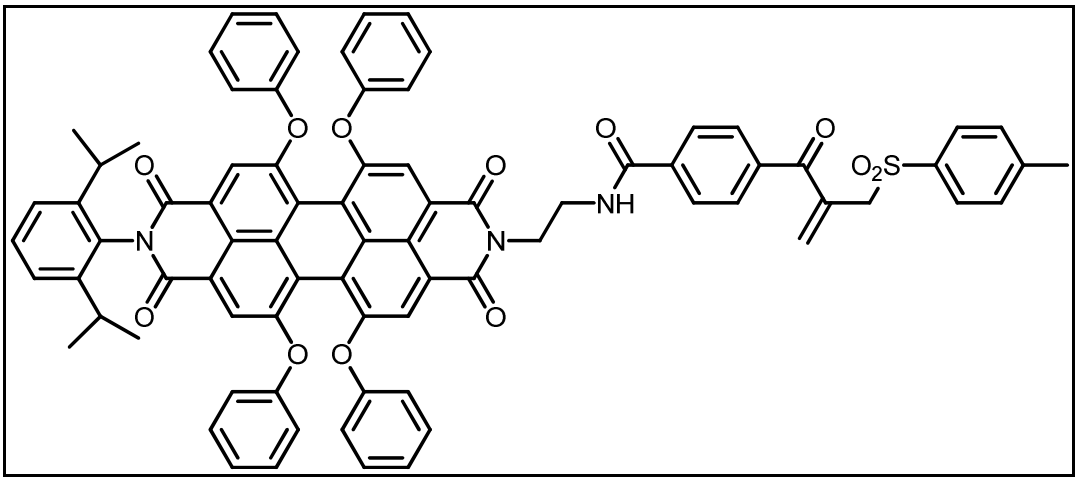
IR (Feststoff):

v (in cm^{-1}) = 2979 (CH_{arom}, w), 2929 (CH_{arom}, w), 1772 (m), 1735 (m), 1693 (C=O, s), 1596 (m), 1494 (w), 1446 (w), 1403 (m), 1297 (s), 1203 (s), 1137 (S=O, s), 1085 (m), 1018 (m), 964 (m), 927 (s), 863 (s), 765 (s), 738 (s), 632 (s), 571 (s)

Elementaranalyse:

$C_{25}H_{23}ClO_6S_2$	% C:	% H:	% S:
Berechnet:	57.85	4.47	12.36
Gefunden:	57.19	4.43	12.02

<u>N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-[N-((4-(2-*p*-tolylsulfonylmethyl)acryloyl)benzoyl)2-aminoethyl]-1,6,7,12-tetraphenoxyperylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (37):</u>



In 15 ml trockenem Dichlormethan werden N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-(2-aminoethyl)-1,6,7,12-tetraphenoxyperylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (**35**) (80 mg, 0.08 mmol) und 4-(3-(p-Tolylsulfonyl)-2-(p-tolylsulfonylmethyl)propanoyl)benzoesäurechlorid (**36**) (44 mg, 0.08 mmol) gelöst, mit 2 ml Triethylamin versetzt und anschließend 48 h bei Raumtemperatur in einer Argonatmosphäre gerührt. Danach werden das Lösungsmittel und überschüssiges Triethylamin im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Aceton (40/1) als Eluens gereinigt, wobei man das Produkt als dunkelroten Feststoff erhält.

Ausbeute: 87 mg (0.07 mmol, 84 %)

MS (FD, 8 kV):
m/z (rel. Int.) = 1288.2 (100%) [M^+]

^{1}H-NMR (700 MHz, CD_2Cl_2, 298 K):
δ (ppm) = 8.24 (s, 2H, H_{arom}), 8.20 (s, 2H, H_{arom}), 7.80 (d, 2H, J = 7.00 Hz, OC-H_{arom}), 7.76 (d, 2H, J = 7.00 Hz, SO_2-H_{arom}), 7.67 (d, 2H, J = 14.00 Hz, H_3C-H_{arom}), 7.49 (t, 1H, J = 7.00 Hz, H_{arom}), 7.39-7.31 (m, 12H, H_{arom}, NOC-H_{arom}), 7.23-7.15 (m, 4H, H_{arom}), 7.01-6.99 (m, 8H, H_{arom}), 6.96 (s, 1H, CON*H*), 6.19 (s, 1H, H_{vinyl}), 5.96 (s, 1H, H_{vinyl}), 4.50 (m, 2H, J = 7.00 Hz NCH_2), 4.36 (s, 2H, CH_2SO_2) 3.85-3.80 (m, 2H, NCH_2), 2.74-2.68 (m, 2H, C*H*$(CH_3)_2$), 2.43 (s, 3H, CH_3), 1.12 (d, 12H, J = 7.00 Hz, CH(CH_3)$_2$)

^{13}C-NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 297 K):
δ (ppm) = 166.56, 164.18, 163.12, 156.06, 155.78, 155.35, 155.15, 145.61, 137.77, 135.87, 130.07, 130.00, 129.88, 129.71, 128.34, 126.88, 124.77, 124.66, 123.88, 123.07, 122.06, 121.20, 120.44, 120.26, 119.88, 57.65, 29.69, 29.07, 23.97, 21.62

UV-Vis (CH_2Cl_2):
λ_{max} (ε) = 447 nm (11270 M^{-1} cm^{-1}), 539 nm (23648 M^{-1} cm^{-1}), 577 nm (39559 M^{-1} cm^{-1})

Fluoreszenz (CH_2Cl_2, Anregung 577 nm):
λ_{max} = 610 nm

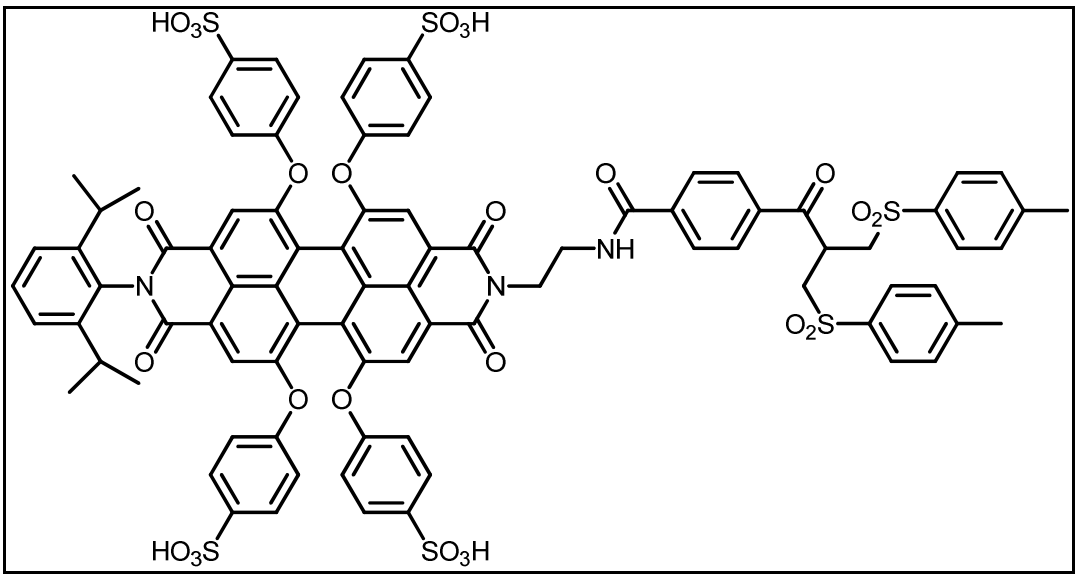
IR (Feststoff):

v (in cm^{-1}) = 3123 (NH, br, w), 2925 (CH_{arom}, m), 2856 (CH_{arom}, m), 1698 (s), 1662 (s), 1693 (C=O, s), 1585 (s), 1486 (s), 1411 (s), 1362 (s), 1282 (s), 1197 (s), 1151 (S=O, s), 1022 (m), 985 (m), 877 (s), 802 (s), 748 (s), 690 (s)

Elementaranalyse:

$C_{80}H_{61}N_3O_{12}S$	% C:	% H:	% N:	% S
Berechnet:	74.58	4.77	3.26	2.49
Gefunden:	72.91	5.89	2.64	2.16

N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-[N-(((4-(3-*p*-tolylsulfonyl)-2-p-tolylsulfonylmethyl)-propanoyl)benzoyl)2-aminoethyl]-1,6,7,12-tetra(4-sulfophenoxy)perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (25):



In 3 ml trockenem N,N-Dimethylformamid werden N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-(2-aminoethyl)-1,6,7,12-tetra(4-sulfophenoxy)perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid (**23**) (30 mg, 0.02 mmol) und 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-4-(3-(p-Tolylsulfonyl)-2-(p-tolylsulfonylmethyl)-propanoyl)-benzoat (**31**) (14 mg, 0.02 mmol) gelöst, mit 0.3 ml Triethylamin versetzt und anschließend 7 Tage bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Danach werden das Lösungsmittel und überschüssiges Triethylamin unter vermindertem Druck entfernt, der

Rückstand in wenig Wasser/Methanol 10:1 gelöst und über eine Bio-Gel® Säule mit Wasser als Eluens filtriert. Das so erhaltene Rohprodukt wird nochmals vom Lösungsmittel befreit und anschließend durch RP-HPLC (THF/Wasser 45:55 => 60:40; 15 min) aufgereinigt, wobei man das Produkt als dunkelroten Feststoff erhält.

Ausbeute: 19 mg (0.01 mmol, 54 %)

MS (MALDI-TOF):
m/z (rel. Int.) = 1763.6 (100%) [M^--H]

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*^{6}, 353 K):
δ (ppm) = 8.55 (s, 1H, CON*H*), 8.00 (s, 2H, H_{arom}), 7.96 (s, 2H, H_{arom}), 7.77-7.61 (m, 8H, H_{arom}), 7.57 (d, 2H, J = 10.00 Hz, OC-H_{arom}), 7.53 (d, 4H, J = 5.00 Hz, SO_2-H_{arom}), 7.43 (t, 1H, J = 5.00 Hz, H_{arom}), 7.37 (d, 2H, J = 10.00 Hz, NOC-H_{arom}), 7.28 (d, 2H, J = 10.00 Hz, H_{arom}), 7.11 (d, 4H, J = 10.00 Hz, H_3C-H_{arom}), 7.07-6.88 (d, 8H, H_{arom}), 4.33-4.20 (m, 2H, NCH_2), 4.07-3.98 (m, 1H, COC*H*), 3.85-3.63 (m, 4H, CH_2SO_2), 2.74-2.69 (m, 2H, C*H*$(CH_3)_2$), 2.39 (s, 6H, CH_3), 1.05 (d, 12H, J = 5.00 Hz, CH(CH_3)$_2$)

^{13}C-NMR (500 MHz, DMSO-*d*^{6}, 297 K):
δ (ppm) = 172.74, 162.67, 162.59, 155.20, 155.13, 154.94, 154.90, 145.50, 145.08, 137.58, 134.80, 130.51, 129.99, 128.02, 127.82, 125.47, 123.72, 123.36, 122.55, 119.98, 118.95, 45.74, 25.19, 23.73, 20.74

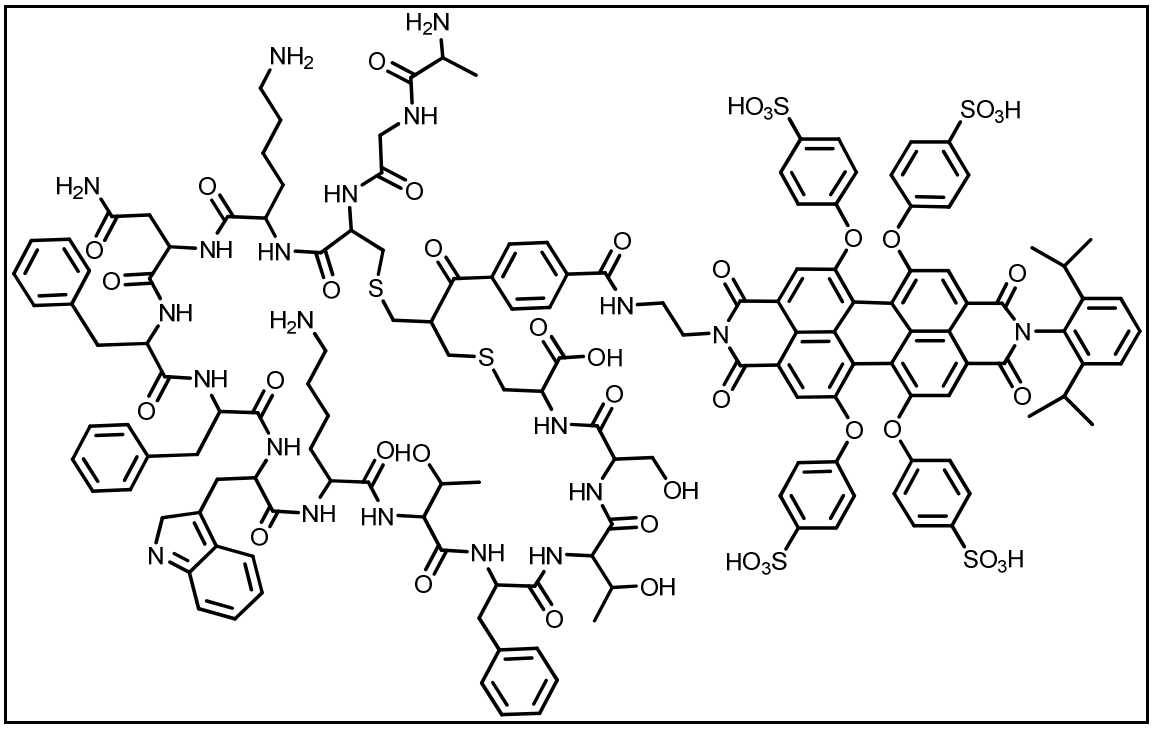
UV-Vis (MeOH):
λ_{max} (ε) = 439 nm (12259 M^{-1} cm^{-1}), 523 nm (19222 M^{-1} cm^{-1}), 559 nm (27027 M^{-1} cm^{-1})

Fluoreszenz (MeOH, Anregung 559 nm):
λ_{max} = 604 nm

IR (Feststoff):
v (in cm^{-1}) = 3380 (OH, br, w), 3068 (NH, br, w), 2960 (CH_{arom}, m), 2925 (CH_{arom}, m), 2856 (CH_{arom}, m), 1698 (C=O, s), 1585 (s), 1509 (m), 1487 (s), 1412 (s), 1342 (s), 1197 (s), 1149 (S=O, s), 1088 (m), 1022 (m), 985 (m), 956 (m), 877 (s), 802 (s), 748 (s), 690 (s), 582 (m)

7.3.2 Markierung von Somatostatin

1,6,7,12-Tetra(4-sulfophenoxy)perylen-3,4:9,10-tetracarboxydiimid-Somatostatin (27):



In 1 ml einer 20 %igen wässrigen Acetonitrillösung aus 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.8) wird N-(2,6-Diisopropylphenyl)-N´-[N-(((4-(3-*p*-tolylsulfonyl)-2-p-tolylsulfonylmethyl)-propanoyl)benzoyl)2-aminoethyl]-1,6,7,12-tetra(4-sulfophenoxy)perylen-3,4:9,10-tetra-carboxydiimid (**25**) (1 mg, 6 µmol) gelöst. Weiterhin werden in 1 ml 50 mM Natrium-phosphatpuffer (pH 7.8) Somatostatin (**26**) (0.98 mg, 6 µmol) und in 300 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer tris(2-Carboxyethyl)phosphin (0.34 mg, 12 µmol) gelöst. Anschließend gibt man die TCEP-Lösung zur Somatostatinlösung, schüttelt vorsichtig und lässt die vereinte Lösung 6 h bei 4 °C stehen. Zu dieser Lösung wird danach die PDI-Chromophor Lösung gegeben, erneut vorsichtig geschüttelt und 16 h bei 4 °C stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wird danach durch Umkehrphasen-Chromatographie mit MQ Wasser als Eluent aufgereinigt und die resultierende rote Lösung durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Dabei erhält man das Produkt als dunkelroten Feststoff.

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) =3114 (100%) [M^++Na]

8 Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. K. Müllen, der es mir ermöglicht hat mit Hilfe seiner wissenschaftlichen Unterstützung und Anregung, diese faszinierende und anspruchsvolle Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.
Bei meinen Projektleitern Dr. T. Weil und Dr. C. Li möchte ich mich für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und Lösungen von Problemen bedanken ohne die, diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
Eine großartige Unterstützung waren ebenfalls meine Laborkollegen der Rylen-Gruppe L. Puhl, H. Wonneberger, Dr. K. Peneva, M. Seifjic, T. Schnitzler, D. Nowak, G. Battagliarin, C. Lütke-Eversloh und Dr. Y. Avlasevich sowie der Biomaterial-Gruppe A. Pfisterer, A. Musante, Dr. K. Eisele und Dr. R. Gropeanu.
Für die tolle Atmosphäre in meinem Büro gilt der Dank meinen Kollegen D. Diemer, Dr. T. Duarte, D. Beckmann, Dr. A. Mavrinskiy und Dr. N. Tsao.
Für die Messung und Hilfe bei der Auswertung zahlreicher MALDI und NMR Spektren möchte ich mich herzlich bei S. Türck und Dr. M. Wagner bedanken, der weiterhin die schönen Stunden beim Fußball ermöglicht hat.

9 Literatur

[1] W. Müller-Esterl, *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, 1. Aufl., **2004**

[2] G. Chen, A. F. Palmer, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 1603, *Hemoglobin-Based Oxygen Carrier and Convection Enhanced Oxygen Transport in a Hollow Fiber Bioreactor*

[3] G. Yellen, *Nature* **2002**, *419*, 35, *The voltage-gated potassium channels and their relatives*

[4] A. Abbott, *Nature* **2002**, *418*, 268, *Ion channel structures: They said it couldn´t be done...*

[5] O. Roche, R. Kiyama, C. L. Brooks, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3592, *Ligand-Protein DataBase: Linking Protein-Ligand Complex Structures to Binding Data*

[6] C. Veigel, L. M. Coluccio, J. D. Jontes, J. C. Sparrow, R. A. Milligan, J. E. Molloy, *Nature* **1999**, *398*, 530, *The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps*

[7] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, 5. Aufl., **2003**

[8] D. A. Baker, B. Mille-Baker, S. M. Wainwright, D. Ish-Horowicz, N. J. Dibb, *Nature* **2001**, *411*, 330, *Mae mediates MAP kinase phosphorylation of Ets transcription factors in Drosophila*

[9] G. Krauss, *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, WILEY-VCH Verlag, 4. Aufl., **2008**

[10] M. A. Lochrie, M. I. Simon, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4957, *G protein multiplicity in eukaryotic signal transduction systems*

[11] D. L. Nelson, C. D. Little, G. Balian, *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80*, 446, *Distribution of Fibronectin and Laminin in Basal Cell Epitheliomas*

[12] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 2. Aufl., **2008**

[13] D. Podhradsky, L. Drobnica, P. Kristian, *Experientia* **1979**, *35*, 154, *Reactions of cysteine, its derivatives, glutathione, coenzyme A, and dihydrolipoic acid with isothiocyanates*

[14] F. Fujisaki, M. Oishi, K. Sumoto, *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 124, *A Conventional New Procedure for N-Acylation of Unprotected Amino Acids*

[15] P. Cuatrecasas, I. Parikh, *Biochemistry* **1972**, *11*, 2291, *Adsorbens for Affinity Chromatography. Use of N-Hydroxysuccinimide Esters of Agarose*

[16] N. Abello, H. A. M. Kerstjens, D. S. Postma, R. Bischoff, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 4770, *Selective Acylation of Primary Amines in Peptides and Proteins*

[17] A. Misra, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3749, *N-(3-Triethoxysilylpropyl)-4-(N'-maleimidylmethyl)cyclohexanamide (TPMC): A heterobifunctional reagent for immobilization of oligonucleotides on glass surface*

[18] G. Gorin, P. A. Matic, G. Doughty, *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, *115*, 593, *Kinetics of Reaction of N-Ethylmaleimide with Cysteine and Some Congeners*

[19] J. R. Heitz, C. D. Anderson, B. M. Anderson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *127*, 627, *Inactivation of Yeast Alcohol Dehydrogenase by N-Alkylmaleimides*

[20] M. D. Partis, D. G. Griffiths, G. C. Roberts, R. B. Beechey, *J. Protein Chem.* **1983**, *2*, 263, *Cross-Linking of Protein by Omega-Maleimido Alkanoyl N-Hydroxysuccinimido Esters*

[21] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802, *Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression*

[22] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269, *Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells*

[23] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063, *New Bisarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling in Vitro and in Vivo: Synthesis and Biological Applications*

[24] M. U. Mayer, L. Shi, T. C. Squier, *Mol. BioSyst.* **2005**, *1*, 53, *One-Step, non denaturing isolation of an RNA polymerase enzyme complex using an improved multi-use affinity probe resin*

[25] N. Soh, *Sensors* **2008**, *8*, 1004, *Selective Chemical Labeling of Proteins with Small Fluorescent Molecules on Metal-Chelation Methodology*

[26] C. C. Spagnuolo, R. J. Vermeij, E. A. Jares-Erijman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12040, *Improved Photostable FRET-Competent Bisarsenical-Tetracysteine Probes*

[27] T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 438, *Selective Recognition of Protein Tetraserine Motifs with a Cell-Permeable, Pro-fluorescent Bis-boronic Acid*

[28] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *J. Chromatogr.* **1987**, *411*, 177, *New Metal Chelate Adsorbent Selective for Proteins and Peptides Containing Neighboring Histidine-Residues*

[29] C. R. Goldsmith, J. Jaworski, M. Sheng, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 418, *Selective Labeling of Extracellular Proteins Containing Polyhistidine Sequences by a Fluorescein-Nitrilotriacetic Acid Conjugate*

[30] K. Peneva, G. Mihov, A. Herrmann, N. Zarrabi, M. Börsch, T. M. Duncan, K. Müllen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5398, *Exploiting the Nitrilotriacetic Acid Moiety for Biolabeling with Ultrastable Perylene Dyes*

[31] A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10452, *Oligo-Asp Tag/Zn(II) complex probe as a new pair for labeling and fluorescence imaging of proteins*

[32] J. P. MacManus, C. W. Hogue, B. J. Marsden, M. Sikorska, A. G. Szabo, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10358, *Terbium luminescence in synthetic peptide loops from calcium-binding proteins with different energy donors*

[33] S. Balan, J. Choi, A. Godwin, I. Teo, C. M. Laborde, S. Heidelberger, M. Zloh, S. Shaunak, S. Brocchini, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 61, *Site-Specific PEGylation of Protein Disulfide Bonds Using a Three-Carbon Bridge*

[34] L. Wang, *Science* **2003**, *302*, 584, *Expanding the Genetic Code*

[35] K. E. Beatty, F. Xie, Q. Wang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14150, *Selective Dye-Labeling of Newly Synthesized Proteins in Bacterial Cells*

[36] N. Budisa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6426, *Prolegomena to Future Experimental Efforts on Genetic Code Engineering by Expanding Its Amino Acid Repertoire*

[37] Z. Machova, R. v. Eggelkraut-Gottanka, N. Wehofsky, F. Bordusa, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5065, *Exprimierte enzymatische Ligation zur Semisynthese chemisch modifizierter Proteine*

[38] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640, *Insights into the Mechanism and Catalysis of the Native Chemical Ligation Reaction*

[39] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776, *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*

[40] S. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2241-2252, *PEGylation of native disulfide bonds in proteins*

[41] M. Zloh, S. Shaunak, S. Balan, S. Brocchini, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1070, *Identification and insertion of 3-carbon bridges in protein disulfide bonds: a computational approach*

[42] D. J. Cline, S. E. Redding, S. G. Brohawn, J. N. Psathas, J. P. Schneider, C. Thorpe, *Biochemistry* **2004**, *43*, 15195, *New Water-Soluble Phosphines as Reductants of Peptide and Protein Disulfide Bonds: Reactivity and Membrane Permeability*

[43] S. Brocchini, A. Godwin, S. Balan, J. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 3-12, *Disulfide bridge based PEGylation of Proteins*

[44] S. Shaunak, A. Godwin, J. Choi, S. Balan, E. Pedone, D. Vijayarangam, S. Heidelberger, I. Teo, M. Zloh, S. Brocchini, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 312, *Site-specific PEGylation of native disulfide bonds in therapeutic proteins*

[45] R. B. Greenwald, Y. H. Choe, J. McGuire, C. D. Conover, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 217, *Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates*

[46] K. Peneva, G. Mihov, F. Nolde, S. Rocha, J. Hotta, K. Braeckmans, J. Hofkens, H. Uji-i, A. Herrmann, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3372-3375, *Water-Soluble Monofunctional Perylene and Terrylene Dyes: Powerful Labels for Single-Enzyme Tracking*

[47] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142, *Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein*

[48] C. Hoffmann, J. Leroy-Dudal, S. Patel, O. Gallet, E. Pauthe, *Anal. Biochem.* **2008**, *372*, 62, *Fluorescein isothiocyanate labeled human plasma fibronectin in extracellular matrix remolding*

[49] M. Ormo, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, *273*, 1392, *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*

[50] G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endress, H. Buning, M. Hallek, C. Bräuchle, *Science* **2001**, *294*, 1929, *Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus*

[51] T. Weil, M. A. Abdalla, C. Jatzke, J. Hengstler, K. Müllen, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 68, *Water-Soluble Rylene Dyes as High-Performance Colorants for the Staining of Cells*

[52] W. Herbst, K. Hunger, *Industrial Organic Pigments: Production, Properties, Applications*, WILEY-VCH Verlag, 1. Aufl., **1993**

[53] H. Zollinger, *Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*, WILEY-VCH Verlag, 1. Aufl., **1987**

[54] H. Zollinger, *Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*, WILEY-VCH Verlag, 3. Aufl., **2003**

[55] J. Griffiths, *Chem. unserer Zeit* **1993**, *27*, 22, *Funktionelle Farbstoffe. Ein neuer Trend in der Farbstoffchemie*

[56] A. Rademacher, S. Märkle, H. Langhals, *Chem. Ber.* **1982**, *115*, 2927, *Lösliche Perylen-Fluoreszenzfarbstoffe mit hoher Photostabilität*

[57] Y. Nagao, T. Misono, *Dyes Pigm.* **1984**, *5*, 171, *Synthesis and properties of N-alkyl-N´-aryl-3,4:9,10-perylenebis(dicarboximide)*

[58] Y. Nagao, T. Naito, Y. Abe, T. Misono, *Dyes Pigm.* **1996**, *32*, 71, *Synthesis and Properties of Long and Branched Alkyl Chain Substitued Perylenetetracarboxylic Monoanhydride Monoimides*

[59] M. Sadrai, L. Hadel, R. R. Sauers, S. Husain, K. Krogh-Jespersen, J. D. Westbrook, G. R. Bird, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 7988, *Lasing action in a family of perylene derivatives: singlet absorption and emission spectra*

[60] C. Kufazvinei, M.Ruether, J. Wang, W. Blau, *Org. Electron.* **2009**, *10*, 674, *A blue light emitting perylene derivative with improved solubility and aggregation control: Synthesis, characterisation and optical limiting properties*

[61] J. Y. Do, B. G. Kim, J. Y. Kwon, W. S. Shin, S. Jin, Y. Kim, *Macromol. Symp.* **2007**, *249*, 461, *Soluble Asymmetric Perylene Derivatives for Organic Solar Cells*

[62] C. Piliego, D. Jarzab, G. Gigli, Z. Chen, A. Facchetti, M. A. Loi, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1573, *High Electron Mobility and Ambient Stability in Solution-Processed Perylene-Based Organic Field-Effect Transistors*

[63] Y. Zhao, X. Zhang, D. Li, D. Liu, W. Jiang, C. Han, Z. Shi, *J. Lumin.* **2009**, *24*, 140, *Water-soluble 3,4:9,10-perylene tetracarboxylic ammonium as a high-performance fluorochrome for living cells staining*

[64] J. Qu, C. Kohl, M. Pottek, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1528, *Ionic Perylenetetracarboxdiimides: Highly Fluorescent and Water-Soluble Dyes for Biolabeling*

[65] S. Mais, J. Tittel, T. Basche, C. Bräuchle, W. Goehde, H. Fuchs, G. Müller, K. Müllen, *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 8435, *Terrylenediimide: A Novel Fluorophore for Single-Molecule Spectroscopy and Microscopy from 1.4 K to Room Temperature*

[66] S. Kummer, T. Basche, C. Bräuchle, *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *229*, 309, *Terrylene in p-terphenyl: a novel single crystalline system for single molecule spectroscopy at low temperatures*

[67] H. Quante, K. Müllen, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1487, *Quaterrylentetracarbonsäurediimide*

[68] K. Peneva, Johannes Gutenberg Universität (Mainz), **2008**

[69] M. Kardos, *D. R. P. 276357* **1913**

[70] T. Sakamoto, C. Pac, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 94, *A "green" route to perylene dyes: direct coupling reactions of 1,8-naphthalimide and related compounds under mild conditions using a "new" base complex reagent, t-BuOK/DBN*

[71] G. Klebe, F. Graser, E. Hädicke, J. Berndt, *Acta Cryst.* **1989**, *B45*, 69, *Crystallochromy as a solid-state effect: correlation of molecular conformation, crystal packing and colour in perylene-3,4:9,10-bis(dicarboximide) pigments*

[72] E. Hädicke, F. Graser, *Acta Cryst.* **1986**, *C42*, 195, *Structures of three perylene-3,4:9,10-bis(dicarboximide) pigments*

[73] E. Hädicke, F. Graser, *Acta Cryst.* **1986**, *C42*, 189, *Structures of eleven perylene-3,4:9,10-bis(dicarboximide) pigments*

[74] H. Langhals, *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 4641, *Synthese von hochreinen Perylen-Fluoreszenzfarbstoffen in großer Menge - gezielte Darstellung von Atrop-Isomeren*

[75] H. Quante, Y. Geerts, K. Müllen, *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 495, *Synthesis of Soluble Perylenebisamidine Derivatives. Novel Long-Wavelength Absorbing and Fluorescent Dyes.*

[76] G. Seybold, A. Stange, *DE 3545004 A1* **1987**

[77] U. Rohr, P. Schilichting, A. Bohm, M. Gross, K. Meerholz, C. Bräuchle, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1434, *Liquid crystalline coronene derivatives with extraordinary fluorescent properties*

[78] H. Langhals, W. Jona, F. Einsiedl, S. Wohnlich, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 1022, *Self-Dispersion: Spontaneous Formation of Colloidal Dyes in Water*

[79] H. Klok, J. R. Hernandez, S. Becker, K. Müllen, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39*, 1572, *Star-Shaped Fluorescent Polypeptides*

[80] H. Quante, P. Schlichting, U. Rohr, Y. Geerts, K. Müllen, *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*, 4029, *Novel perylene-containing polymers*

[81] C. Kohl, T. Weil, J. Qu, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5297-5310, *Towards Highly Fluorescent and Water-Soluble Perylene Dyes*

[82] A. Herrmann, T. Weil, V. Sinigersky, U. Wiesler, T. Vosch, J. Hofkens, F. C. d. Schryver, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4844, *Polyphenylene Dendrimers with Perylene Diimide as a Luminescent Core*

[83] C. Kohl, Johannes Gutenberg Universität (Mainz), **2003**

[84] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 5. Aufl., **1999**

[85] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, *Organikum*, WILEY-VCH Verlag, 22. Aufl., **2004**

[86] M. Arend, B. Westermann, N. Risch, *Angew. Chem.* **1999**, *110*, 1096, *Moderne Varianten der Mannich-Reaktion*

[87] J. R. McCarthy, D. P. Matthews, J. P. Paolini, *Org. Synth., Coll. Vol.* **1998**, *9*, 446, *Reaction of Sulfoxides with Diethylaminosulfur Trifluoride: Fluoromethyl Phenyl Sulfone, a Reagent for the Synthesis of Fluoroalkenes*

[88] R. Chinchilla, D. J. Dodsworth, C. Najera, J. M. Soriano, M. Yus, *ARKIVOC* **2003**, 41, *Uronium salts from polymeric N-hydroxysuccinimide (P-HOSu) as new solid-supported peptide coupling reagents*

[89] R. B. Greenwald, H. Zhao, P. Peng, C. B. Longley, Q. Dai, J. Xia, A. Martinez, *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 798, *An unexpected amide bond cleavage: poly (ethylene glycol) transport forms of vancomycin. 2*

[90] J. C. Han, G. Y. Han, *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 5, *A Procedure for Quantitative Determination of Tris(2-carboxyethyl)phosphine, an Odorless Reducing Agent More Stable and Effective Than Dithiothreitol*

[91] F. Xiang, R. C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1424, *Growing Protein-doped Sinapic Acid Crystals for Laser Desorption: an Alternative Preparation Method for Difficult samples*