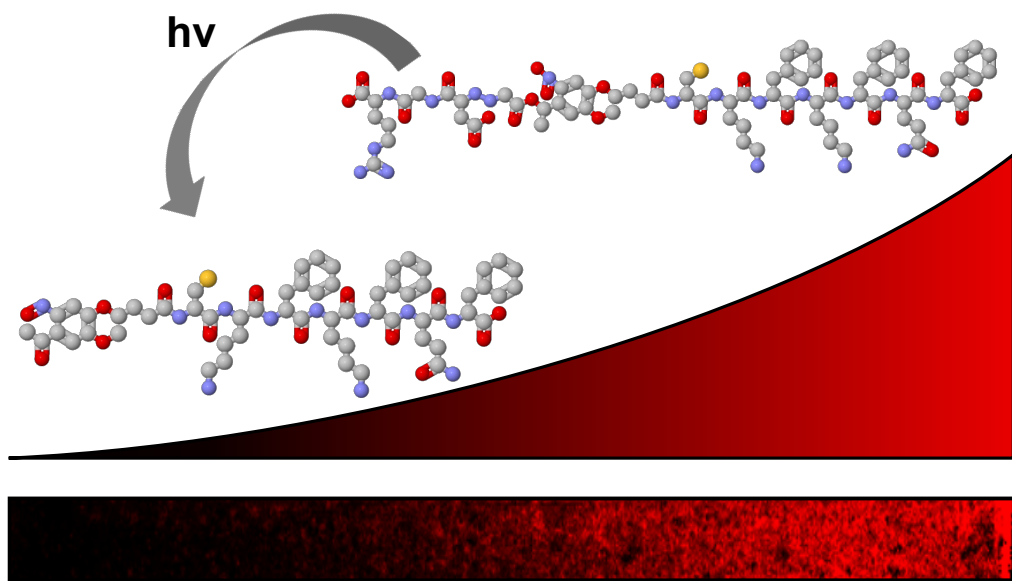




Photogesteuerte Peptidmaterialien



Masterarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades Master of Science (M.Sc.)
im Studiengang Chemie
im Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

B. Sc. Kübra Kaygisiz

Mainz, 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März bis August 2019 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tanja Weil in der Untergruppe von Dr. Christopher Synatschke im Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz angefertigt.

Kübra Kaygisiz

Photogesteuerte Peptidmaterialien

Masterarbeit

Abgabedatum: 29. August 2019

Erstgutachterin: Prof. Dr. Tanja Weil

Zweitgutachter: Prof. Dr. Pol Besenius

Synthese von Makromolekülen

AK Weil

Max-Planck-Institut für Polymerforschung

Ackermannweg 10

55021 Mainz

Titelbild: MALDI-Imaging-Messung von graduell bestrahltem RGD-PCL-CKFKFQF.

Zusammenfassung

Diese Masterarbeit behandelt die Präparation selbstassemblierender stimulusresponsiver Peptide auf Glasoberflächen zur Erzeugung bioaktiver Gradienten. Selbstassemblierende Peptide wurden basierend auf der Sequenz CKFKFQF mit einem photoresponsiven Nitrobenzyllinker kombiniert, bezüglich ihrer Responsivität und ihrer Morphologie untersucht und anschließend für die nichtkovalente Beschichtung auf Glasoberflächen optimiert. Es wurden zwei Peptidsysteme entwickelt, deren Bioaktivitätsverlauf zum einen auf der Abspaltung des bioaktiven Motivs RGD und zum anderen auf der responsiven Morphologieänderung des Peptids beruht. In Zellkulturexperimenten konnte nach vorläufigen Ergebnissen eine Verbesserung des Zellwachstums auf den RGD-haltigen Peptiden gezeigt werden.

Abstract

This master thesis describes the preparation of self-assembling stimulus responsive peptides on glass surfaces to obtain bio-active gradients. Self-assembling peptides based on the sequence CKFKFQF were combined with a photo-responsive nitrobenzyl linkers in order to investigate their responsiveness and morphological behavior. These peptides were optimized for non-covalent attachment to glass surfaces. Two peptide systems were prepared, which show bio-active gradients on surfaces due to gradual photo-cleavage of the RGD peptide-sequence and due to changes in morphology respectively. Preliminary results of improved cell growth could be obtained in culture with RGD containing peptides.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Tanja Weil für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die Möglichkeit, meine Masterarbeit am Max-Planck-Institut für Polymerforschung anzufertigen, bedanken. Ich danke Herrn Prof. Dr. Pol Besenius für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die stete Hilfsbereitschaft. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Christopher Synatschke für die interessante Themenstellung, die anregenden Diskussionen und die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit. Weiterhin bedanke ich mich bei Adriana Sobota für die fortwährende Hilfsbereitschaft, die TEM-Messungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Hans-Joachim Räder und Franz Josef Mayer für ihren tatkräftigen Einsatz bei den MALDI-Imaging-Messungen sowie die intensiven Diskussionen. Außerdem danke ich Marco Raabe für das Durchführen der Zellkultur-experimente und der Mikroskopie sowie Michaela Pieszka für das Bereitstellen der Zellkulturen. Vielen Dank an Corinna Schilling aus der Arbeitsgruppe Knöll an der Universität Ulm für die Bereitschaft, weitere Zellkulturexperimente durchzuführen. Zudem möchte ich mich bei Verona Maus aus dem Arbeitskreis Blom für die Einweisung in die Rotationsbeschichtung und Plasmaätztechnik bedanken. Weiterhin danke ich Gunnar Glasser für die REM-Messungen und Ali Rouhanipour für die LC-MS-Messungen.

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
C	L-Cystein
CD	Zirkulardichroismus
D	L-Asparaginsäure
DCM	Methylenchlorid
DIC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	Dorsalganglion
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	Elektrosprayionisation
EtOAc	Ethylacetat

F	L-Phenylalanin
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
G	L-Glycin
HBTU	3-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-3 <i>H</i> -benzotriazol-1-oxid-hexafluorosphat
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymizsäure
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
ITO	Indiumzinnoxid
K	L-Lysin
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionisation</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NPCL	Nicht photospaltbarer Linker
PAA	Polyacrylsäure
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCL*	Inaktiver photospaltbarer Linker
PCL	Photospaltbarer Linker
PEG	Polyethylenglykol
PET	Polyethylenterephthalat
Phe-PCL	Phenylalanin derivatisierter photospaltbarer Linker
PLL	Poly-L-Lysin

PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
Q	L-Glutamin
R	L-Arginin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SAM	Selbstassemblierende Monolagen
SPPS	<i>Solid phase peptide synthesis</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIC	<i>Total Ion Count</i>
ToF	<i>Time of flight</i>
UV	Ultraviolett
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Selbstassemblierende Peptide	1
1.2	Stimulusresponsive Einheit	4
1.3	Bioaktivität	5
1.3.1	RGD-Integrin-Interaktion	6
1.3.2	RGD in der Anwendung	7
1.4	Oberflächen	8
1.4.1	Graduell bioaktive Oberflächen	8
1.4.2	Oberflächenbeschichtung mit Peptiden	10
1.4.3	Analyse von Oberflächen	10
1.4.4	MALDI-Imaging	11
1.4.5	MALDI-Imaging von Gradienten	13
2	Zielsetzung	14
3	Ergebnisse und Diskussion	16
3.1	Synthese der Zielverbindungen	16
3.1.1	PCL VII, NPCL XII und Phe-PCL XIV	16
3.1.2	Peptide 1–5	23
3.1.3	Morphologie der Peptide	28
3.2	Bestrahlungsexperimente in Lösung	30
3.2.1	Spaltkinetik der Verbindungen 1-5	31
3.2.2	Morphologische Charakterisierung	42
3.3	Präparation von Oberflächen	48
3.3.1	Oberflächenbeschichtung	48
3.3.2	Beständigkeit der Peptidbeschichtung	51
3.4	Bestrahlungsexperimente auf Oberflächen	53
3.4.1	Defibrillierung von Verbindung 4	53
3.4.2	Gradient von Verbindung 1	56
3.4.3	Gradient von Verbindung 4	61
3.5	Zellkulturexperimente	63
4	Zusammenfassung und Ausblick	67
5	Supplementary Information	71

5.1	Instrumentation and methods	71
5.1.1	General considerations	71
5.1.2	NMR spectroscopy	71
5.1.3	HPLC and LC-MS	71
5.1.4	Flash chromatography (FC) and thin layer chromatography (TLC)	72
5.1.5	MALDI-ToF-MS and MALDI-Imaging	73
5.1.6	SPPS	73
5.1.7	TEM	74
5.1.8	Other instruments	74
5.1.9	Cell culture	74
5.1.10	Preparation of peptide fibrils	75
5.2	Synthesis of photo-cleavable linker	76
5.3	Synthesis of non-cleavable linker	85
5.4	Synthesis of modified photo-cleavable linker	91
5.5	Synthesis of peptides	95
6	Anhang	102
6.1	REM-Aufnahmen	102
6.2	UV-Transmission der graduell bedruckten PET-Folie	104
6.3	MALDI-Imaging	105
6.4	NMR-Spectra	110
6.5	LC-MS	124
	Literatur	135

Einleitung

Die supramolekulare Selbstassemblierung ist ein häufig auftretender Schlüsselschritt in biomolekularen Prozessen. Die Kodierung der genetischen Information durch selbstassemblierende Aptamere von Nukleinsäuren in der RNA und DNA oder die Ordnung von Aminosäuren zu Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen in Proteinen sind einige Beispiele.^[1]

Zur vereinfachten Modellierung von Proteinen eignen sich Peptide, die aufgrund ihrer Biokompatibilität gute Ausgangsmaterialien für biomedizinische Anwendungen sind. Peptide haben zudem im Gegensatz zu komplexen Proteinen den Vorteil, dass sie mittels moderner Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach MERRIFIELD leicht zugänglich sind und durch Wahl geeigneter Aminosäuresequenzen auf ihre Funktion und Überstruktur programmiert werden können.^[2,3] Die Beschichtung von Oberflächen mit selbstassemblierenden Peptiden im Kontext der regenerativen Medizin ermöglicht zum einen den besseren Zugang zu biomedizinischen Anwendungen, zum anderen das Studium der Wechselwirkung von Zellen mit Oberflächen. Die Bioaktivität von Oberflächen kann beispielsweise durch stimuli responsive Peptide eingestellt werden.

In dieser Einleitung wird ein Überblick über ausgewählte Arbeiten im Bereich der selbstassemblierenden Peptide besonders im Hinblick auf Responsivität, Bioaktivität und Oberflächenanwendung gegeben.

1.1 Selbstassemblierende Peptide

Der Begriff Selbstassemblierung bezeichnet die spontane und gerichtete Organisation einzelner Moleküle zu einer wohl definierten, supramolekularen Architektur ohne kovalente Bindungen.^[4]

Die Selbstassemblierung wird aus funktionellen Gruppen und Eigenschaften des Monomers heraus veranlasst. Wichtige Wechselwirkungen sind hierbei Wasserstoffbrückenbindungen, COULOMB Attraktion und Repulsion, Metall-Ligand Koordination, π - π und hydrophobe Wechselwirkungen. Im Unterschied zur kovalenten Bindung sind diese nichtkovalenten Bindungen reversibel und erzeugen dadurch ein dy-

namisches System.^[5] Dabei sind supramolekulare Assemblierungen abhängig von verschiedenen Gegebenheiten des Mediums und des einzelnen Moleküls wie Geometrie und Sterik sowie ionische Bindungen. Durch diese vielzähligen Möglichkeiten Architekturen im molekularen Bereich aufzubauen, hat sich die supramolekulare Chemie zu einem wichtigen Gebiet in der Nanotechnologie etabliert.^[6]

Unter bestimmten Bedingungen können sich einige Peptide zu höher geordneten Strukturen selbstständig anordnen. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, dass diese Peptide mindestens zwei unterschiedliche Funktionalitäten wie etwa negativ und positiv geladene Bereiche oder Polaritätsunterschiede in ihrer molekularen Struktur aufweisen.^[6] Gut untersuchte Peptidamphiphile von STUPP und Mitarbeitern weisen so neben einem hydrophoben Alkylrest auch einen polaren peptidischen Bereich auf, der β -Faltblatt Strukturen ausbilden kann. Dieses Amphiphil ist folglich in der Lage supramolekulare Nanofasern auszubilden.^[7] In jüngster Vergangenheit wurden zahlreiche Systeme von selbstassemblierenden Peptiden in der Wundheilung und regenerativen Medizin entwickelt und in klinischen Studien getestet. Beispiele finden sich unter anderem in Knochen-, Knorpel-, Augenhornhaut- und Nervenregenerationstherapien.^[3,5,8,9] Ein wichtiger Faktor bei diesen Anwendungen ist dabei die Stabilität der supramolekularen Struktur, die Immunantwort im Körper und Folgereaktionen des Abbaus.^[10]

Fibrilläre Strukturen sind hierbei beliebte Morphologien für neue Materialien in biomedizinischen Anwendungen, da sie zu Nanofasern vernetzt werden können und auf diese Weise steife, stabile und metabolisch resistente Strukturen bilden. Die Bezeichnung Fibrille meint hierbei eine Faser in der Mikrometergrößenordnung. Ein Musterbeispiel für steife und stabile Fibrillen ist die Amyloidüberstruktur.^[9] Amyloida Strukturen sind insbesondere aus neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer oder Parkinson Erkrankung bekannt, in denen Peptide durch eine falsche Faltung als unlösliche Aggregate, sogenannten *plaques*, auftreten.^[6] In Abb. 1.1 ist eine schematische Darstellung der komplexen β -Faltblattstruktur des Amyloids gezeigt. Typischerweise wird die Überstruktur durch Wasserstoffbrückenbindungen und π - π Wechselwirkungen stabilisiert. Ein hoher Anteil von aromatischen Seitenketten und alternierende hydrophile und hydrophobe Aminosäuren begünstigen damit eine amyloida Überstruktur.^[6] Amyloidfibrillen erhalten ihre besonderen mechanischen Eigenschaften primär durch ihre supramolekulare Struktur und nicht durch das einzelne Molekül. Das YOUNGSche Modul einer Amyloidfibrille kann bis zu 1 GPa betragen. Die Amyloidfibrille ähnelt somit bezüglich ihrer Elastizität Seide oder Stahl.^[11]

Die besonderen Eigenschaften einer Amyloidfibrille unter extremer Temperatur und physikalischen Kräften stabil zu bleiben, zeichnen sie in der Anwendung für Beschichtungen von Metallen und leitfähigen Polymeren sowie für die Erzeugung

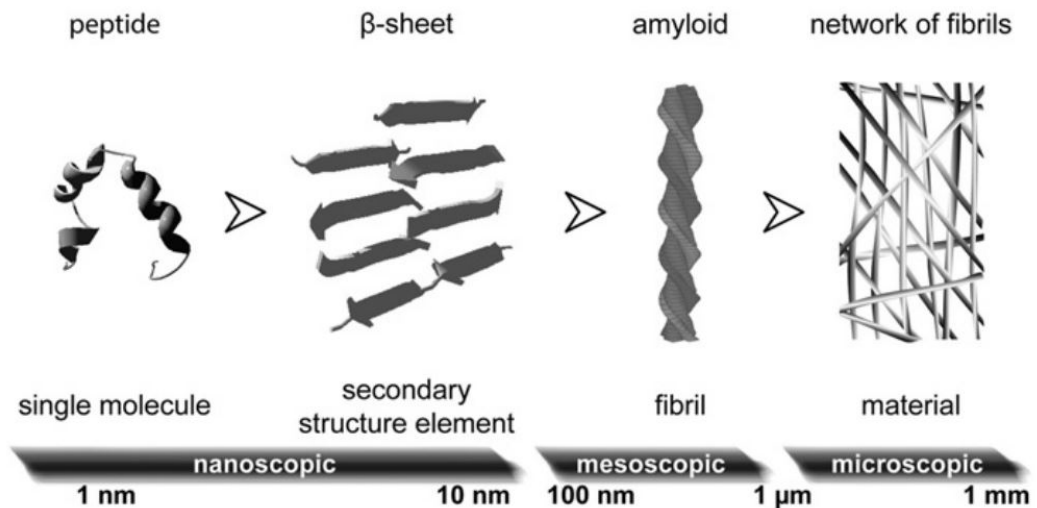
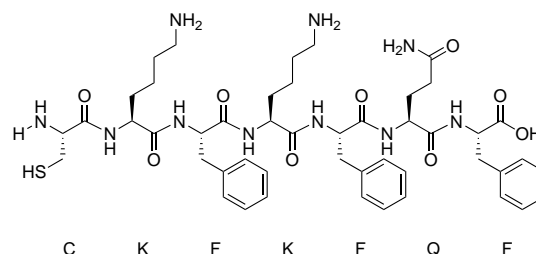


Abb. 1.1: Einzelne Peptidstränge zeigen eine β -Faltblattstruktur. Lagern sich mehrere dieser verdrehten β -Faltblatt Stränge aneinander, ergibt sich eine Amyloidfibrille, die eine Länge von 100 nm bis 1 μ m und eine Breite von typischerweise 10 nm hat. Amyloidalen Fibrillen neigen dazu Netzwerke auszubilden.^[11]

leitfähiger Nanofasern aus. Vielversprechende weitere Anwendungen sind aufgrund der biokompatiblen Eigenschaften in der Galenik und in der künstlichen Gewebekonstruktion zu finden.^[11] Positiv geladene Netzwerke amyloider Fibrillen haben zudem die Eigenschaft mit der negativ geladenen Virusmembran und der negativ geladenen Zellmembran zu interagieren, sodass sie die Effizienz des retroviralen Gentransfer in eine Wirtszelle (Transduktion) steigern können.^[12] Um ein genaues Verständnis von der Bildung und Kontrolle von β -Faltblattstrukturen zu erlangen, wurden von SCHILLING und Mitarbeitern verschiedenen Peptidsequenzen untersucht. Die Peptidsequenz CKFKFQF in Schema 1.1 weist dabei alternierende hydrophobe (L-Phenylalanin, F) und hydrophile (L-Glutamin, Q und L-Lysin, K) Aminosäuren auf. Dieses Peptid zeigt bei physiologischen Bedingungen amyloide Überstrukturen und unterstützt das neuronale Wachstum von Dorsalganglionen.^[13]



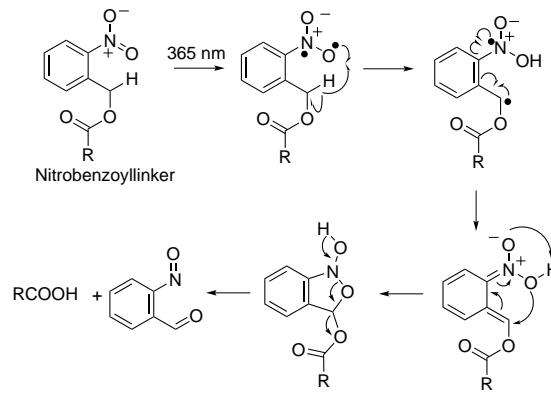
Schema 1.1: Die Strukturformel des Peptids CKFKFQF. Dieses Peptid bildet bei physiologischen Bedingungen amyloide Fibrillen aus, die neuronales Wachstum unterstützen.^[13]

1.2 Stimulusresponsive Einheit

Aufgrund ihrer biomedizinischen Relevanz ist die Programmierung von funktionalen Materialien zur gezielten Manipulation von besonderem Interesse. Durch die nichtkovalente Wechselwirkung selbstassemblierender Peptide eignen sich diese hervorragend, um auf externe Stimuli zu reagieren und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften zu ändern.^[6] Überstrukturen können so beispielsweise nur bei bestimmten pH-Werten, Konzentrationen, Solventien oder Temperaturen gebildet oder aufgelöst werden.^[6] Eine Änderung im pH-Wert oder Solvens könnte den Protonierungsgrad des Peptids ändern und damit die Wasserstoffbrückenbindungen oder ionischen Wechselwirkungen und somit letztlich die Morphologie beeinflussen.^[6] Die pH-Abhängigkeit der Selbstassemblierung wurde beispielsweise anhand der reversiblen Fibrillierung von Peptiddendrimeren gezeigt.^[14] Weitere externe Stimuli können Temperatur^[15], pH-Änderung,^[16] Änderung des elektrochemischen Potentials,^[17] Enzyme^[18,19] oder Photoneneinwirkung^[20] sein.

Im Fokus dieser Arbeit stehen lichtgetriebene Prozesse. Die Nutzung von Licht ist aus Gründen der Steuerbarkeit und der hohen zeitlichen und räumlichen Präzision sehr vorteilhaft.^[21] Photoresponsive Linker wurden bereits ausführlich in der Literatur beschrieben.^[22,23] Voraussetzungen für einen geeigneten Linker sind eine hohe Quanteneffizienz und gezielte, schnelle Spaltungsreaktion in einem definierten Wellenlängenbereich.^[24] Die am häufigsten genutzten photoreponsiven Einheiten reagieren dabei im nahen UV-Bereich (300–380 nm) und sind folglich einfach handzuhaben, da sie unter Laborbedingungen nicht vor Licht geschützt werden müssen.^[25] Der Nachteil ist jedoch, dass diese hochenergetische Strahlung zellschädigend wirkt.^[21]

Unter den photoresponsiven Linkern, die im nahen UV-Bereich abgespalten werden, sind Nitrobenzylverbindungen für die SPPS erprobte und genutzte Linker.^[26,27] Diese Linkerkategorie wurde ursprünglich von PATCHORNIK, AMIT und WOODWARD 1970 eingeführt.^[28] Nitrobenzoyl-Linker absorbieren bei etwa 365 nm und reagieren über eine radikalische NORRISH TYP II Reaktion zu Spaltfragmenten.^[29] In Schema 1.2 ist ein vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für diese Linkerkategorie gezeigt.^[29] Durch die Einstrahlung bei 365 nm wird eine N-O Bindung homolytisch gespalten. Das Radikal des Sauerstoffatoms wird anschließend auf den ortho-ständigen Methylrest übertragen. Eine darauf folgende Rekombination der beiden Radikale unter Bildung eines Fünfrings führt schließlich zur Reduktion der Nitro- zur Nitrosogruppe und Spaltung des Esters. Das Spaltfragment liegt nach der Photoreaktion als Carbonsäure vor.



Schema 1.2: Mechanismus der Photospaltung des Nitrobenzyllinkers.^[29]

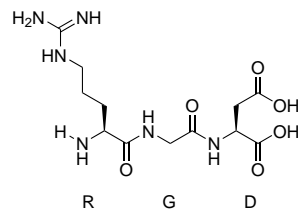
Für einige Vertreter dieser Linkerkategorie wurden Quantenausbeuten zwischen 3% und 15% nachgewiesen und schnelle Reaktionszeiten.^[29] Diese Linkerkategorie bietet damit ideale Voraussetzungen für die Synthese funktionalisierter photoresponsiver Peptide.^[21] Kombinationen von photoaktiven Linkern und selbstassemblierenden Peptiden wurden in der Literatur bereits auf Morphologie- und Bioaktivitätsänderungen in Lösung sowie auf Oberflächen untersucht.^[21,27,30–32] Durch Bildung von Fibrillen nach der Bestrahlung einer photospaltbaren Schutzgruppe konnte so beispielsweise die Bioaktivität gegenüber Fibroblasten erhöht werden.^[33] Eine analoge Untersuchung, welche die Bioaktivitätsänderung bei responsiver Defibrillierung zeigt, wurde noch nicht berichtet.

1.3 Bioaktivität

Um sowohl die Grundlagen für die Interaktion biologischer mit synthetischen Materialien besser zu verstehen als auch die Biokompatibilität geläufiger Materialien in der Medizin zu erhöhen, ist die bioaktive Funktionalisierung neuer Materialien wichtig.^[34] Mit erhöhter Bioaktivität kann beispielsweise Zelladhäsion erzielt werden, währenddessen mit biologisch inerten Materialeigenschaften Abstoßungsreaktionen des Immunsystems vermieden werden können.^[34] Die Zellmigration kann zudem auf Modelloberflächen besser studiert werden als in komplexen biologischen Proben.^[17] Eine genaue Kontrolle der Bioaktivität neuer Materialien ist daher essentiell. Bioaktivität kann beispielsweise durch bestimmte Morphologien erreicht werden. So wirken fibrilläre Strukturen bestimmter Peptidsequenzen beispielsweise unterstützend auf die Zellwachstumseigenschaft.^[13,33] Durch spezielle Signalpeptide wie RGD oder IKVAV kann das einfache und effiziente Nachahmen der Fähigkeit von Zellen an der extrazellulären Matrix zu adhären erreicht werden. Diese Signalpeptide binden an die zellulären Adhäsionsrezeptoren, den Integrinen.^[35]

1.3.1 RGD-Integrin-Interaktion

Das Motiv RGDS (L-Arginin, L-Glycin, L-Asparaginsäure, L-Serin) ist 1984 von PIERSCHBACHER und RUOSLAHTI als eine der verantwortlichen bioaktiven Sequenzen im Bindungsprotein Fibronectin ermittelt worden.^[36] Später hat sich herausgestellt, dass die RGD-Sequenz in Schema 1.3 als Motiv bereits ausreicht, um Integrinaktivität hervorzurufen.^[37]



Schema 1.3: Die Strukturformel des RGD-Motivs.

Die Aktivität des RGD-Motivs beruht auf der Aktivierung von Bindungsrezeptoren auf der Zelloberfläche bei mehr als 12 bekannten Integrinen.^[37] Bei dem Bindungsvorgang der Zellmembran an die RGD-Sequenz durchläuft die Zelle vier verschiedene Stadien, die in Abb. 1.2 dargestellt sind.^[38]

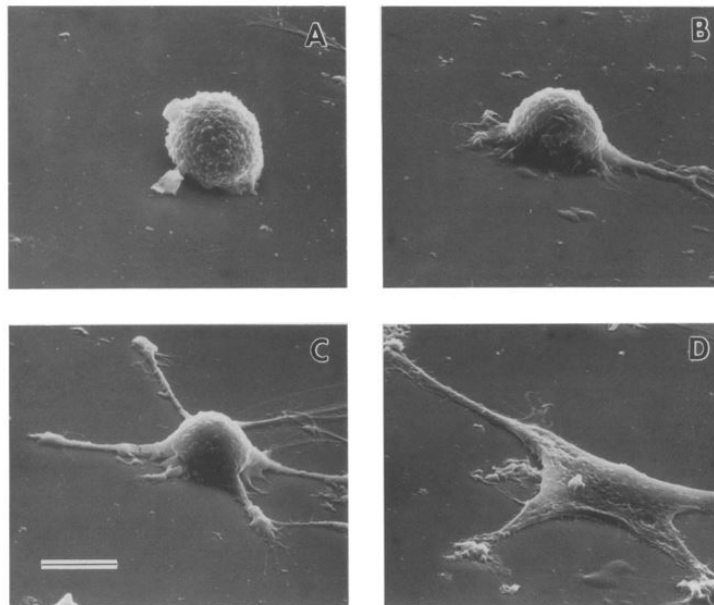


Abb. 1.2: Elektronenmikroskopie des Bindungsvorgangs einer Zelle: A) Zelladhäsion, B) Zellspreiten, C) Ausbilden des Aktin-Cytoskelett und D) fokale Adhäsion. Der Maßstab beträgt 10 μm .^[38]

Das Motiv RGD hat dabei auf den initialen Schritt der Zelladhäsion und des Zellspreitens einen großen Einfluss.^[37] Die genauen Mechanismen der RGD-Integrin-Interaktion sind noch nicht vollständig geklärt. Anhand von Kristallstrukturanalysen und stereochemischen Berechnungen wird davon ausgegangen, dass die Seitenketten des

Arginin und der Asparaginsäure mittels Wasserstoffbrückenbindung und Metall-Koordination mit der Integrinoberfläche wechselwirken. Die schwachen Wasserstoffbrückenwechselwirkungen zwischen C_{α} -H C=O des Glycins beeinflussen dabei die stereochemische Anordnung des RGD-Motivs und tragen so zu der Integrin-Interaktion bei.^[39]

1.3.2 RGD in der Anwendung

Seit der Entdeckung des Motivs RGD wurde intensiv an der Etablierung dieses Motivs im akademischen sowie medizinischen Bereich geforscht.^[37]

Eine besondere Art der reversiblen stimuliresponsiven Zelladhäsion ist mittels Azobenzollinkern gelungen. Durch die kontrollierte lichtgesteuerte *E/Z* Isomerisierung und der damit einhergehenden Abschirmung der RGD-Sequenz konnten Zellen reversibel adhärirt werden.^[20,40] Eine weitere Möglichkeit stimuliresponsive RGD-Aktivität hervorzurufen ist der *Photocaging* Ansatz von DEL CAMPO und Mitarbeitern. Hierbei wird die RGD-Sequenz in einen Peptidmakrozyklus eingebaut und die integrinbindungsaktive Seitenkette der Asparaginsäure durch eine photoaktive Gruppe blockiert. Unter Bestrahlung wird die Gruppe gespalten und die RGD-Sequenz für eine Integrinbindung aktiviert.^[22,30,41] Verglichen mit der linearen Sequenz wurden verbesserte Eigenschaften in der Zelladhäsion für das RGD-Motiv in einem Peptidmakrozyklus festgestellt.^[37] Durch die RGD-Funktionalisierung einer metabolisch inerten Oberfläche, wie etwa PEG, kann eine adhäsive Oberfläche generiert werden.^[42] ULIJN und Mitarbeiter zeigten so die Erzeugung bioaktiver Oberflächen auf ursprünglich inertem PEG-funktionalisiertem Glas durch SPPS von Peptiden mit terminalen RGD-Gruppen direkt auf der Oberfläche.^[43] Weiterhin wurde durch den Einbau der RGD-Sequenz in PEG-Hydrogele Zelladhäsion von Osteoblasten an einem sonst biologisch inerten Gel erreicht.^[44] Auf reiner Agarose findet keine Zelladhäsion statt, da Säugetierzellen keine Rezeptoren für die Agarosebindung haben. Daher eignet sie sich als zellinaktives Medium. Nach Funktionalisierung der Agarose mit RGD konnte jedoch eine Zelladhäsion beobachtet werden.^[37,45]

1.4 Oberflächen

Interaktionen zwischen Zellen und Oberflächen sind nicht zuletzt wegen ihrer Anwendung in Form von Kontaktlinsen, Zahnprothesen, Implantaten und in der Galenik ein wichtiges Forschungsfeld.^[42] Die Adsorption von Peptiden oder Zellen auf Oberflächen ist entropisch begünstigt, da so höher geordnete Lösungsmittelmoleküle wie beispielsweise Wasser verdrängt werden. Die Adsorption des Peptids oder der Zelle erniedrigt damit die Grenzfläche und die freie Energie des Systems.^[46]

Zelladhäsion auf Oberflächen spielen eine entscheidende Rolle für die Aufnahme von körperfremden Materialien. Erste Anwendungen von zellwachstumsfördernden Oberflächen finden sich beispielsweise beim Einsatz von künstlichen Implantaten und Prothesen.^[37] Eine gezielte Oberflächenmodifikation ermöglicht die Kontrolle der Zelladhäsion. Auch die unerwünschte Zelladhäsion bei bestimmten Implantaten wie etwa Abstoßungsreaktionen könnten durch ein besseres Verständnis von der kontrollierten Zelladhäsion vermieden werden.^[42] Die Präparation von definierten synthetischen Oberflächenbeschichtungen ist jedoch herausfordernd und stark abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit.^[47]

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf graduell bioaktiven Glasoberflächen. Graduelle Oberflächen können auf verschiedene Arten erreicht werden wie etwa über die chemische Zusammensetzung, die Benetzbarkeit, die Schichtdicke oder die dielektrische Konstante. Bei der Gestaltung bioaktiver Oberflächen wird die graduelle chemische Zusammensetzung bevorzugt, um gezielte Adsorption zu erreichen.^[48] Die Erzeugung eines Gradienten mit funktionalen Beschichtungen wurde bisher auf verschiedenen chemischen Wegen wie etwa elektrochemisch,^[49] reduktiv,^[50] temperaturgesteuert,^[51] photogesteuert^[52,53] und über die Nanolithographie^[54] erreicht. Einige weitere Beispiele sind das graduell beschleunigte Eintauchen in eine Lösung, welche die Oberflächenchemie ändert.^[50,55] Durch graduelle Plasmabehandlung^[56] oder auch durch Anlegen einer Hochspannung (Koronabehandlung)^[57] können Oberflächen physikalisch vorbehandelt werden, sodass beim Auftragen der Beschichtung ein Gradient erzeugt wird.

1.4.1 Graduell bioaktive Oberflächen

Graduell bioaktive Oberflächen haben in der Anwendung einen besonderen Stellenwert, da hier konzentrationsabhängige Zell-Oberfläche-Wechselwirkungen beobachtet werden können.

Stammzellen zeigen besonderes Adhäsions- und Spreitverhalten in der Gegenwart von bioaktiven Gradienten auf Oberflächen. Durch die Entwicklung der Stammzelltherapien in den letzten Jahren ist daher auch der Bedarf an maßgeschneiderten künstlichen Medien für diese gestiegen.^[48,58] Weiterhin werden viele Prozesse auf molekularer Ebene im Körper über Gradienten zwischen extra- und intrazellulären Bereichen bestimmt. Bereits in der frühesten embryologischen Entwicklung lenken Vitamin E und pH-Gradienten das Zellwachstum.^[48,59] Ein bioaktiver Gradient auf Oberflächen kann also zellspezifisch die Richtung und Geschwindigkeit des Wachstums sowie das Adhäsionsvermögen kontrollieren.^[60]

Die Präparation definierter bioaktiver Gradienten von kovalent auf Oberflächen gebundenen Peptiden ist mittels selbstassemblierender Monolagen (SAM) in der Forschung gut etabliert. Mittels RGD-funktionalisierter SAM wurde bereits gradientabhängige Zelladhäsion berichtet.^[61,62] In Abb. 1.3 ist exemplarisch die gradientabhängige Zelladhäsion auf RGD-funktionalisierten SAM aus einer Veröffentlichung von METTERS und Mitarbeitern zu sehen.^[62]

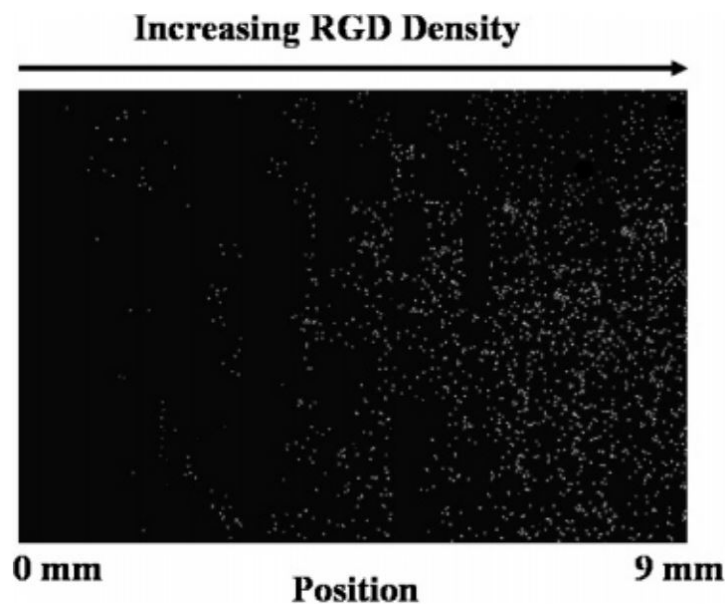


Abb. 1.3: Zusammengesetzte Mikroskopieaufnahmen von 3T3 Maus Fibroblasten nach 24 h Zellkultur auf einer graduell mit Polymethacrylsäure-RGD-funktionalisierten Siliziumplatte. Die Zelldichte nimmt mit steigender RGD-Dichte zu.^[62]

YEO und Mitarbeiter haben Gradienten mit mehreren biofunktionellen Gruppen an SAM und darauf gegenläufige Zellgradienten erzeugt.^[50] Eine weitere geläufige Zelloberflächen-Interaktion mit Oberflächen basiert auf dem Biotin-Streptavidin-Paar. Besondere Relevanz hat dieses Paar dabei im Hinblick auf die DNA-Chip Technologie, die in einer Variation auf der Wechselwirkung zwischen Streptavidin derivatisierten Oberflächenbeschichtungen mit Biotin basiert.^[63,64]

1.4.2 Oberflächenbeschichtung mit Peptiden

Zwei Verfahren haben sich bei der Präparation von Peptiden auf Oberflächen etabliert. Zum einen die Immobilisierung von Peptiden mittels kovalenter Bindung an die zumeist präfunktionalisierte Oberfläche, zum anderen die Beschichtung von Peptiden auf Oberflächen durch nichtkovalente Wechselwirkungen.

Bei der Präparation selbstassemblierender Monolagen (SAM) sind bisher Alkanthiole auf Goldoberflächen ausgiebig untersucht worden.^[6,42] Peptid-Peptid und Peptid-Oberflächen-Interaktionen spielen bei der Herstellung von peptidischen SAM eine große Rolle und beeinflussen das Beschichtungsergebnis. Gezielte Einstellung der Beschichtungsbedingungen und Wahl der Peptidsequenzen können bestimmte Interaktionen steuern und verschiedene Beschichtungsmorphologien erzeugen.^[6] Eine weitere Art der Immobilisierung ist es, das Peptid kovalent an eine Polymerschicht zu binden. Meist wird dabei PEG funktionalisiert, welches den Vorteil hat, dass so nichtselektive Adhäsion verhindert wird.^[37]

Eine der einfachsten und kostengünstigsten Methoden der Beschichtung von anorganischen Oberflächen, ist die nichtkovalente Adhäsion. Je nach Beschaffenheit der molekularen Struktur des Peptids und der Oberfläche können VAN DER WAALS-Wechselwirkungen oder auch elektrostatische Interaktionen auftreten. Über diese Art der Beschichtung sind jedoch molekular homogene Monolagen nicht zugänglich.^[65]

In dieser Arbeit wird die nichtkovalente Adhäsion genutzt, um Glasoberflächen mit positiv-geladenen Peptiden über elektrostatische Wechselwirkung zu beschichten.

1.4.3 Analyse von Oberflächen

Die Untersuchung von beschichteten Oberflächen ist ein wichtiger Schritt bei der Charakterisierung und Auswertung von Beschichtungsexperimenten. Eine schnelle und unkomplizierte Analysemethode für Oberflächenbeschichtungen ist die Wasserkontaktwinkelmessung. Sind beispielsweise mehr zwitterionische RGD-Sequenzen an der Oberfläche vorhanden, steigt die Hydrophilie. Der Wassertropfen hat dann eine geringere Oberflächenspannung und ändert seinen Kontaktwinkel zur Oberfläche.^[37] Eine Methode zur Berechnung der Schichtdicke stellt die Ellipsometrie dar, welche auf Polarisationsänderung des Lichts bei der Streuung an Oberflächen basiert.^[37] Um die elementare Zusammensetzung der Oberfläche zu erhalten ist die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) geeignet.^[37,62] Die Ermittlung von Gesamtladungen auf Oberflächen lässt sich über Zeta-Potentialmessungen durchführen. Diese Methode eignet sich auch für die Verfolgung der Beschichtungsbeständigkeit bei Spülvorgängen.

gen, da sich beim Abtragen der Beschichtung auch die Oberflächenladung ändert.^[66] Über die Fluoreszenzmikroskopie kann die Verteilung von fluoreszenzmarkierten Molekülen auf einer Oberfläche ermittelt werden. Bei dieser Methode geht jedoch eine Änderung der molekularen Struktur der beobachteten Moleküle durch die Fluoreszenzmarkierung einher.^[66]

Die oben genannten Methoden eignen sich nicht für die lokale Ermittlung der chemischen Oberflächenzusammensetzung ohne gesonderte chemische Markierung. Werden ortsspezifische Informationen über die Konzentration bestimmter Moleküle benötigt, wie etwa bei Gradienten auf Oberflächen, ist MALDI-Imaging geeignet.

1.4.4 MALDI-Imaging

Seit den ersten Versuchen zur Matrix assistierten LASER Desorption Ionisation (MALDI) 1987 wurden große Fortschritte gemacht, weshalb diese Methode heutzutage standardmäßig zur Charakterisierung von Molekülen mit hohen Molekularmassen eingesetzt wird. Eine neue Entwicklung der letzten Jahre ist MALDI-Imaging, welche sich zu einer vielversprechenden Methode für die Untersuchung von Oberflächen herausgestellt hat.^[67] MALDI-Imaging ist ein markierungsfreies, bildgebendes Verfahren zum Darstellen von Molekülmassen auf Oberflächen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass tausende von MALDI-ToF-MS Spektren übersichtlich zusammengefasst werden.

Typischerweise wird MALDI-Imaging genutzt, um orts aufgelöste Informationen in biologischen Proben zu erhalten. An einem Messpunkt werden dabei probenabhängig 200–10000 MALDI-ToF-MS gemessen und in einer gemittelten Gesamtmessung für diesen Messpunkt zusammengefasst. Der gewünschte m/z -Wert aus dem gemittelten Spektrum kann anschließend ausgewählt werden. Die Intensität des m/z -Wertes wird über die gesamte Fläche bei verschiedenen unabhängigen Messpunkten typischerweise über einen Gradienten der Farbtintensität dargestellt. Im optimalen Fall kann so eine Aussage über die lokale Konzentration des gewünschten m/z -Wertes über die Fläche angegeben werden. In einem Bild können auch mehrere m/z -Werte mit verschiedenen Farbkodierungen dargestellt werden und eine Fotografie der Probenoberfläche kann hinterlegt werden. Die Auflösung kann hierbei bis auf $10\ \mu\text{m}$ genau erfolgen. Voraussetzung für MALDI-Imaging Messungen sind leitfähige Oberflächen.^[68] In Abb. 1.4 ist schematisch der Vorgang bei einer MALDI-Imaging Messung gezeigt.

MALDI-ToF-MS Messungen eignen sich im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Methoden wie ESI-MS auch für hohe Molekülmassen, da hier aufgrund der Desorption der verwendeten Matrix große Moleküle schonend ionisiert werden

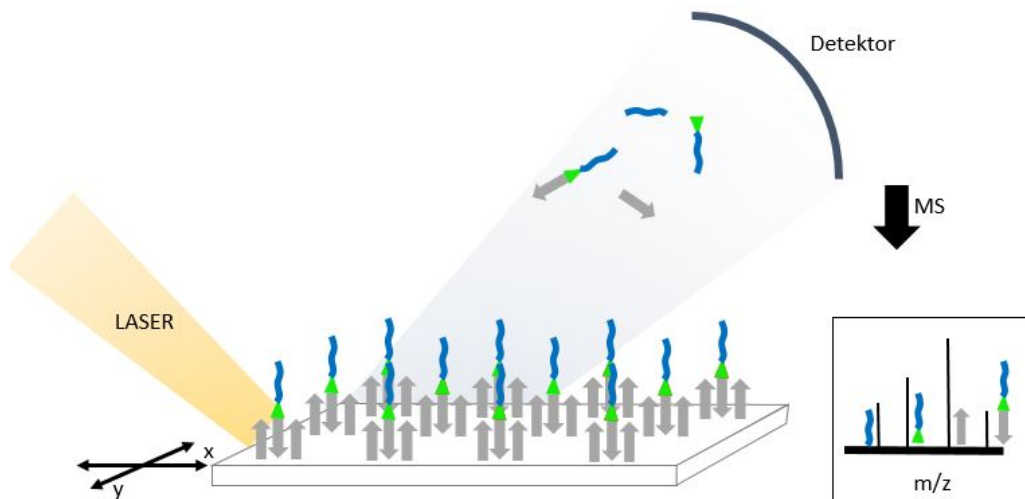


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des MALDI-Imaging Messprinzips. Der Laser und ein Piezoelement unterhalb des Trägers rastern die Oberfläche in x - und y - Richtung ab. Wie bei MALDI-ToF-MS Messungen werden die Moleküle auf der Oberfläche durch die Energie des Lasers desorbiert, ionisiert und vom Detektor nach ihrer Flugzeit registriert. Schließlich wird ein Graph mit den m/z Werten und der gemessenen Intensität der Moleküle erhalten. Schema inspiriert von YEO et al.^[69]

können. Für kurze Peptide wird HCCA (α -Cyano-4-hydroxycimtsäure) häufig als Matrix genutzt.^[68] Es können N_2 (337 nm) oder frequenzvervielfachte Nd:YAG (355 nm) LASER verwendet werden.

Durch die Unterdrückung von Ionensignalen durch Moleküle, die besser ionisiert werden und detektiert werden können, können typische Fehler beim Interpretieren von MALDI-Imaging Messungen auftreten. Dadurch kann abhängig von der chemischen Umgebung des Messpunktes ein falsches Bild entstehen.^[67] Eine weitere mögliche Fehlerquelle bei Messungen entsteht durch eine inhomogene Auftragung der Matrix. Die Intensitäten des Messsignals können ortsgebunden durch Kristallmorphologien, Schichtdicken und Konzentration der Matrix variieren.^[67]

Die korrekte Normierung von Messdaten spielt daher bei der Interpretation eine entscheidende Rolle.^[70] Bei der Normierung können oben genannte Unregelmäßigkeiten ausgeglichen werden. Eine häufig genutzte und in vielen Fällen legitime Normierungsmethode ist die Normierung auf den *Total Ion Count* (TIC). Dabei werden alle Massenspektren durch die Gesamtionenzahl ins Verhältnis gesetzt, sodass alle Spektren in einem Datensatz dieselbe integrierte Fläche im Spektrum haben. Eine mögliche lokal erhöhte Gesamtionenzahl, die beispielsweise durch eine dickere Matrixschicht resultieren kann, wird so ausgeglichen und eine Vergleichbarkeit über die gesamte Probe ermöglicht.^[70] Voraussetzung für die Anwendung der TIC-Normierung ist, eine homogene Probe, in der sich lediglich einige beobachtete

m/z -Werte in einem ansonsten konstant bleibendem Hintergrund ändern.^[70] Dies ist zum Beispiel bei Gewebeproben mit unterschiedlichen Zelltypen nicht gegeben, bei chemisch einheitlich beschichteten Oberflächen hingegen schon. Es besteht das Risiko bei der Normierung auch tatsächlich existierende Unterschiede in der Probenzusammensetzung zu entfernen. Im Allgemeinen können daher MALDI-Imaging Messungen nur qualitativ ausgewertet werden. Bei gleich bleibenden Messbedingungen kann eine semi-quantitative Auswertung vorgenommen werden, wenn eine interne Normierung auf eine Referenz stattfindet.^[70]

1.4.5 MALDI-Imaging von Gradienten

MALDI-Imaging-Messungen nicht-biologischer Proben wurden bisher nur selten in der Literatur beschrieben. Die einzige Veröffentlichung zur Untersuchung von graduellen Oberflächenbeschichtungen stammt von YEO und Mitarbeitern aus dem Jahr 2013. Über die graduelle Reduktion eines Chinonderivats an einer kovalent gebundenen SAM auf einer Goldoberfläche konnte eine graduelle Konzentration von der freien Aminfunktionalität der SAM in Abb. 1.5 erzeugt werden. Das Amin wurde anschließend mit den bioaktiven Sequenzen RGD und PHSRN funktionalisiert. Es konnte eine graduelle Verteilung von Fibroblastenwachstum beobachtet werden.^[50]

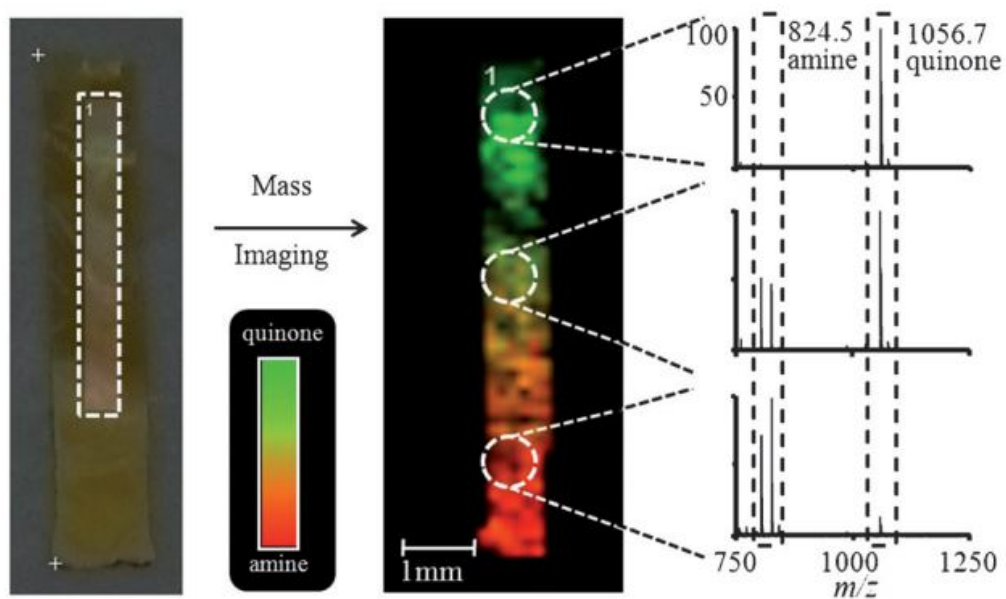
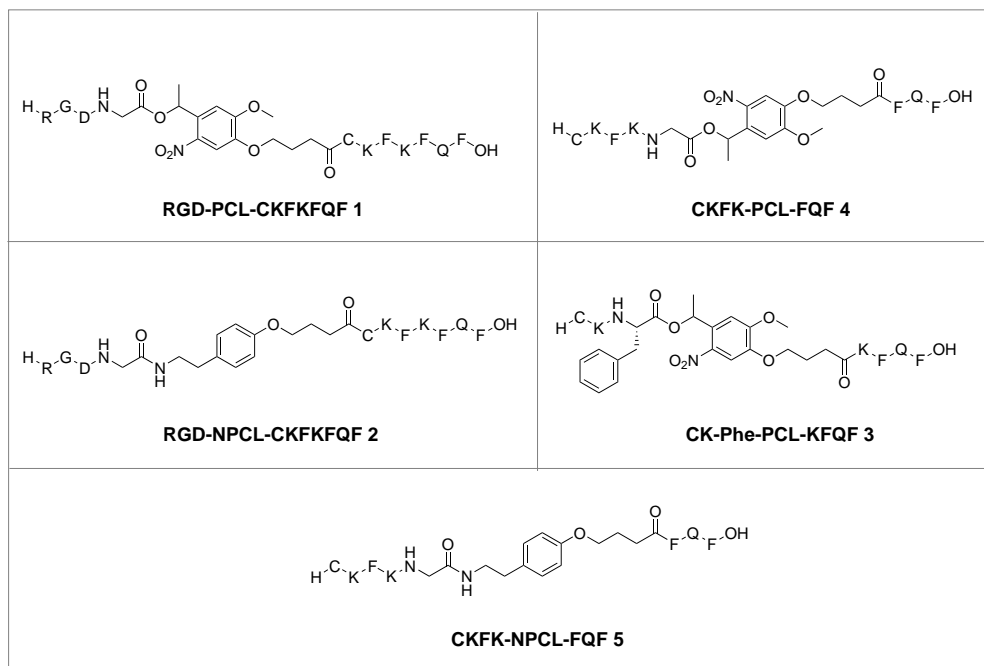


Abb. 1.5: MALDI-Imaging-Messung der graduellen Verteilung eines Chinonderivates auf einer Goldoberfläche.^[50]

Zielsetzung

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden noch keine Gradienten von bioaktiven, selbstassemblierenden Peptiden beschrieben, die nichtkovalent auf Oberflächen gebunden sind. Diese Gradienten ermöglichen unter sonst gleich bleibenden Bedingungen das Studium von Zellverhalten in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen einer bioaktiven Sequenz.

In dieser Arbeit werden stimulusresponsive Peptide basierend auf der Sequenz CKFKFQF synthetisiert, charakterisiert und untersucht. Die Funktion der Peptide soll zum einen über die Abspaltung der bioaktiven Sequenz RGD gegeben sein, zum anderen über die Morphologieänderung bei Bestrahlung mit UV-Licht. Mittels dieser Peptide werden nichtkovalente Beschichtungsmethoden auf Oberflächen optimiert. Anschließend soll durch graduelle Bestrahlung der beschichteten Oberflächen eine graduelle Abspaltung der bioaktiven Sequenz beziehungsweise eine graduelle Morphologieänderung induziert werden. Der Einfluss auf die Bioaktivität soll in ersten Versuchen *in vitro* gezeigt werden. Die Zielverbindungen 1–5 sind in Schema 2.1 gezeigt.



Schema 2.1: Zielverbindungen dieser Arbeit: RGD-PCL-CKFKFQF 1, RGD-NPCL-CKFKFQF 2, CK-Phe-PCL-KFQF 3, CKFK-PCL-FQF 4 und CKFK-NPCL-FQF 5.

Bei den Zielverbindungen RGD-PCL-CKFKFQF **1** und RGD-NPCL-CKFKFQF **2** wird das bioaktive Peptidmotiv RGD durch den photospaltbaren Linker (PCL) **VII** bzw. den nicht-photospaltbaren Linker (NPCL) **XII** mit der Peptidsequenz CKFKFQF verbunden. Das Peptid CKFKFQF kann unter physiologischen Bedingungen zu Fibrillen assemblieren.^[13] Analog dazu wird für Verbindung **1** und **2** ebenfalls Assemblierungsverhalten erwartet. Verbindung **1** soll anschließend nichtkovalent auf einer Glasoberfläche beschichtet werden. Die graduelle Abspaltung des RGD Motivs bei Bestrahlung (Abb. 2.1) soll über MALDI-Imaging beobachtet werden.

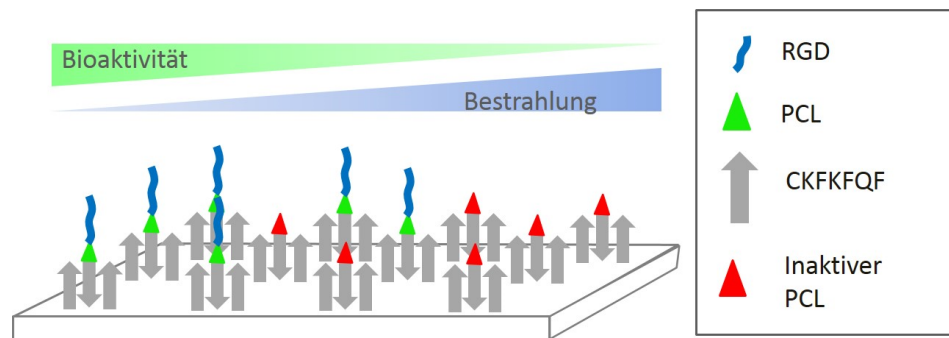


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Bioaktivitätsverlaufs durch graduelle Bestrahlung der Zielverbindung **1** auf einer Glasoberfläche. Aus Übersichtsgründen sind nicht alle Peptide mit PCL und RGD funktionalisiert dargestellt.

Die Zielverbindungen CK-Phe-PCL-KFQF **3**, CKFK-PCL-FQF **4** und CKFK-NPCL-FQF **5** werden durch die Linkerverbindungen in zwei Hälften geteilt. Durch dieses Moleküldesign soll geprüft werden, ob eine photoinitierte Defibrillierung durch das Erzeugen kurzer Spaltfragmente (Abb. 2.2) erzielt werden kann. Diese sollten aufgrund ihrer geringen Anzahl alternierender hydrophiler und hydrophober Aminosäuren nicht fähig sein, amyloide Fibrillen zu bilden.^[13] Ein unterschiedliches Fibrillierungsverhalten wird bei verschiedenen Längen der Spaltfragmente erwartet. Durch den Vergleich von Verbindung CK-Phe-PCL-KFQF **3**, welcher längere Fragmente bei Bestrahlung durch den Phenylalanin-derivatisierten photospaltbaren Linker (Phe-PCL) **XIV** bildet, mit Verbindung **4** sollen mögliche Unterschiede herausgestellt werden. Verbindung **5** soll als Kontrollgruppe fungieren und keine Photoresponsivität zeigen. Bei erfolgreicher photoresponsiver Morphologieänderung sollen erste Versuche zum Erzeugen eines Fibrillengradienten der Verbindung **4** auf einer Oberfläche durchgeführt und mittels MALDI-Imaging untersucht werden.

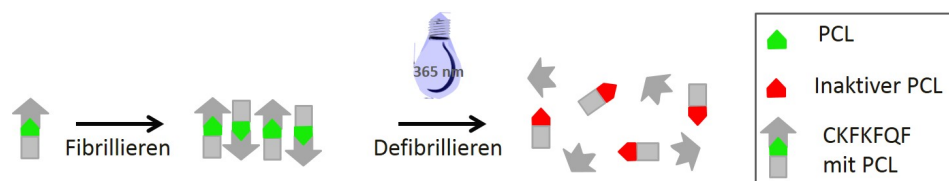


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der erwarteten Morphologieänderung des photoresponsiven fibrillierten Peptids **4** durch UV-Bestrahlung und Fragmentierung.

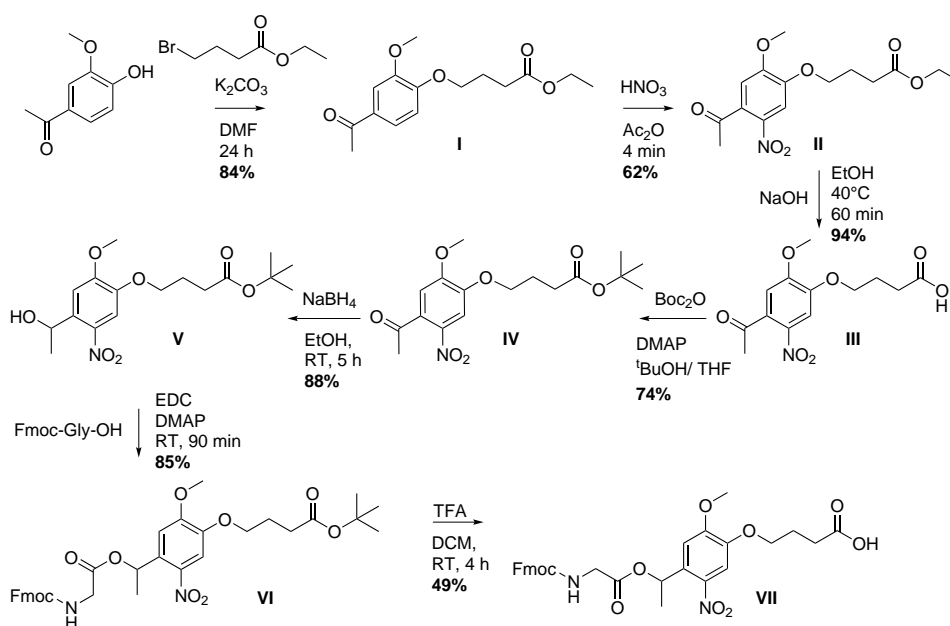
Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese der Zielverbindungen

In diesem Abschnitt wird ein Überblick über die Synthese der Linker PCL **VII**, NPCL **XII**, Phe-PCL **XIV** und Peptide **1–5** gegeben. Eine detaillierte Beschreibung der Synthese und Charakterisierung aller dargestellten Verbindungen ist im Experimentalteil in Kapitel 5 festgehalten.

3.1.1 PCL **VII**, NPCL **XII** und Phe-PCL **XIV**

Für die Synthese der Zielverbindungen **1–5** wurden zunächst ein photospaltbarer Linker (PCL) **VII**, ein nicht-photospaltbarer Linker (NPCL) **XII** und ein mit Phenylalanin modifizierter photospaltbarer Linker (Phe-PCL) **XIV** synthetisiert. Die Synthesen von PCL und des NPCL erfolgten nach den in Schema 3.1 und Schema 3.2 gezeigten literaturbekannten Syntheserouten.^[27] Die Verbindungen wurden über ¹H-NMR-, ¹³C-NMR-Spektroskopie und LC-MS Messungen charakterisiert.



Schema 3.1: Syntheseroute für PCL **VII** nach SUR et al.^[27]

Für die Synthese der Verbindung PCL **VII** wurde im ersten Schritt von Acetovanillon ausgegangen und eine nucleophile Substitution zweiter Ordnung mit 4-Brombutter-säureethylester in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) durchgeführt. Das resultierende Produkt **I** wurde anschließend mit konzentrierter Salpetersäure in Essigsäureanhydrid über eine nucleophile aromatischen Substitution zu **II** umgesetzt. Um die Estergruppe durch eine säurelabile Schutzgruppe zu ersetzen, wurde diese zunächst ein basisch gespalten und die Carbonsäurefunktion in **III** durch eine *Tert*-Butyl-Gruppe geschützt. Die Ketogruppe des Produkts **IV** wurde unter milden reduktiven Bedingungen zum Alkohol umgesetzt. **V** wurde unter Verwendung der Kupplungsreagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) mit Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-Glycin (Fmoc-*L*-Gly-OH) gekuppelt. Die *Tert*-Butyl Schutzgruppe in **VI** wurde durch Trifluoressigsäure (TFA) in Methylenchlorid (DCM) abgespalten und Verbindung **VII** (PCL) erhalten. Der PCL **VII** ist aufgrund der Fmoc-Schutzgruppe am *N*-Terminus und dem ungeschützten *C*-Terminus direkt in der SPPS nach Fmoc-Protokoll einsetzbar. Die Verbindungen **I**, **III**, **IV**, **V** und **VII** wurden säulenchromatografisch aufgereinigt. Die Gesamtausbeute über 7 Stufen betrug 13%. In Abb. 3.1 ist das ¹H-NMR-Spektrum und in Abb. 3.2 das LC-MS des PCL **VII** gezeigt.

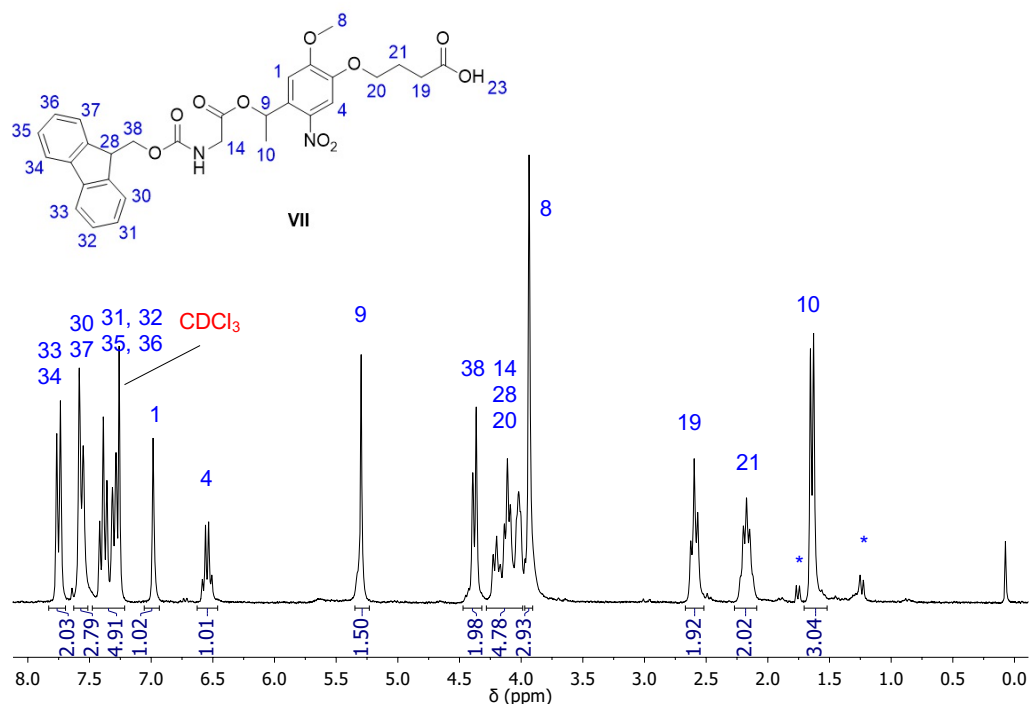


Abb. 3.1: ¹H-NMR-Spektrum (250 MHz) von **VII** (PCL) in CDCl₃. δ / ppm = 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H³³, H³⁴), 7.55 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, H³⁰, H³⁷), 7.42 – 7.26 (m, 4H, H³¹, H³², H³⁵, H³⁶), 6.98 (s, 1H, H¹), 6.53 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, H⁴), 5.30 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, H⁹), 4.39 – 4.23 (m, 2H, H³⁸), 4.17 – 4.00 (m, 5H, H²⁸, H²⁰, H¹⁴), 3.94 (s, 3H, H⁸), 2.60 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H¹⁹), 2.17 (h, *J* = 7.1, 5.7 Hz, 2H, H²¹), 1.64 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H¹⁰).

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum stimmt mit dem Literaturspektrum^[27] überein und zeigt geringe Spuren von Verunreinigungen (*), die nicht weiter zugeordnet wurden. Aromatische Protonenverschiebungen sind der Erwartung entsprechend bei etwa 6.5 bis 7.8 ppm zu finden. Stark abgeschirmte Protonen wie die der Methylgruppen (H^8 und H^{10}) sind hochfeldverschoben.

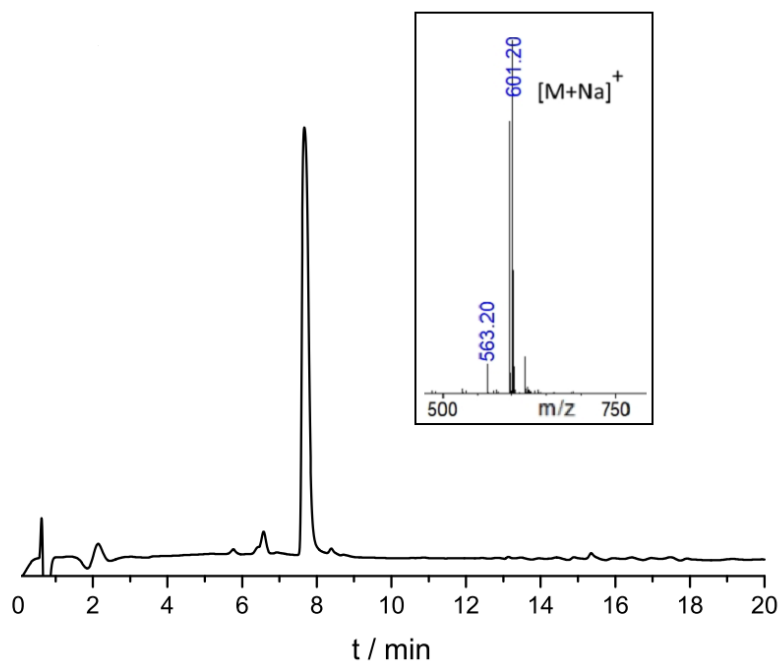
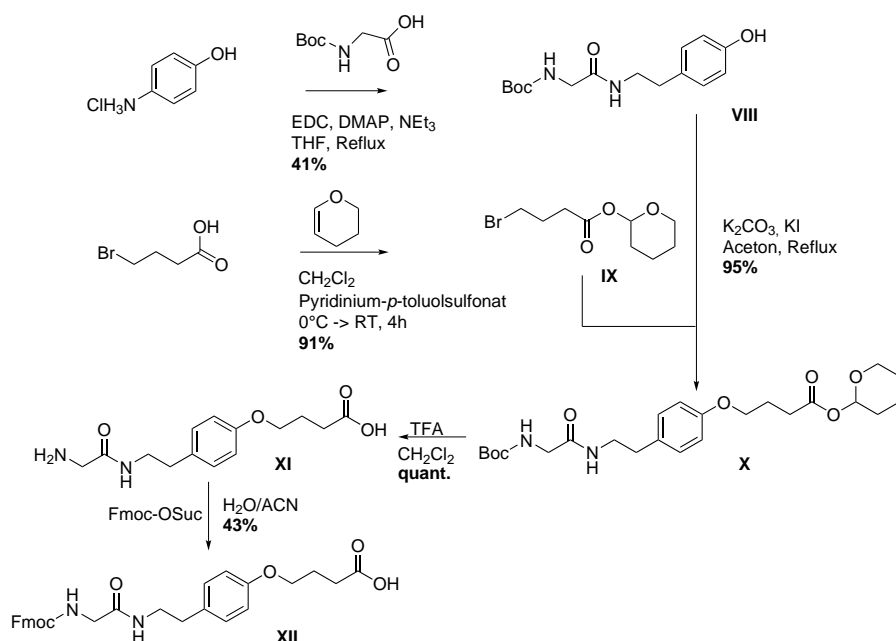


Abb. 3.2: LC-MS-Messung (Detektor 214 nm) der Verbindung PCL **VII** mit Ausschnitt des Massenspektrums der Fraktion bei einer Retentionszeit 7,7 min. Für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnete Masse: 601,17
gefundene Masse: 601,20.

Im LC-Spektrum in Abb. 3.2 ist bis zu einer Retentionszeit von 2 min das Lösungsmittelsignal zu erkennen, welches auch nach Subtraktion der Basislinie verbleibt. Das schmale Signal bei einer Retentionszeit von 7,7 min wurde anhand des Massenspektrums der Zielverbindung **VII** zugeordnet. Die Zielverbindung wird dabei mit einem Natriumion detektiert. Das Massensignal bei 563.20 m/z ist der Zielverbindung nach Verlust eines Sauerstoffatoms (für $[\text{M}-\text{O}+\text{H}]^+$ berechnet 563.20 m/z) zuzuordnen. Es wird vermutet, dass das Sauerstoffatom während der Ionisation von der Nitrogruppe abgegeben wird. Die Peptide **1**, **3** und **4** zeigen während der Elektrosprayionisation (ESI) ein analoges Verhalten. In der LC-Messung sind zudem bei einer Retentionszeit von 5,8 und 6,9 min weitere kleinere Signale erkennbar. Diese Signale zeigen ein sehr ähnliches Massenspektrum und werden daher Nebenprodukten der Reaktion zugeordnet. Die Reinheit für Verbindung **VII** wird durch Integration der Banden auf mindestens 85% geschätzt.



Schema 3.2: Syntheseroute für den NPCL **XII** nach SUR et al.^[27]

Die Synthese des NPCL **XII** erfolgte nach literaturbekannter Syntheseroute ausgehend von kommerziell erhältlichem Tyramin-hydrochlorid, dessen Aminogruppe mit *Tert*-butyldicarbonat-L-Glycin (Boc-Gly-OH) gekuppelt wurde, um Verbindung **VIII** darzustellen. 4-Brombuttersäure wurde mit Dihydropyran geschützt und Verbindung **IX** erhalten. Durch Erhitzen unter Rückfluss in Aceton wurden die Verbindungen **VIII** und **IX** in einer nucleophilen Substitution zweiter Ordnung zu Verbindung **X** umgesetzt. Die *Tert*-butyloxycarbonyl- und Dihydropyran-Schutzgruppe wurden mit TFA in DCM abgespalten und das resultierende freie Amin der Verbindung **XI** mit einer Fmoc-Gruppe geschützt (NPCL **XII**). Die Gesamtausbeute über 5 Stufen betrug 15%. In Abb. 3.3 ist das ¹H-NMR Spektrum und in Abb. 3.4 das LC-Massenspektrum der Verbindung **XII** (NPCL) gezeigt.

Das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **XII** stimmt mit dem Literaturspektrum^[27] überein und zeigt geringe Spuren von Verunreinigungen (*), die nicht weiter zugeordnet werden konnten. Im ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **XII** ist im Tieffeld bei 12.1 ppm das Protonensignalverschiebung der Carbonsäure zu finden. Die aromatische Protonenverschiebungen sind der Erwartung entsprechend bei etwa 6.8 bis 7.9 ppm zu finden. Das Spektrum wurde in DMSO-d₆ gemessen, wodurch einige Signale bei 3.3 ppm und 2.5 ppm nicht klar vom Lösungsmittel zu trennen sind.

In der LC-Messung in Abb. 3.4 ist bis zu einer Retentionszeit von 2 min das Lösungsmittelsignal zu erkennen, welches auch nach Subtraktion der Basislinie verbleibt. Das schmale Signal bei einer Retentionszeit von 6,7 min wurde anhand des Massenspektrums der Zielverbindung **XII** zugeordnet. Die Zielverbindung wird dabei sowohl mit einem Natriumion als auch mit einem Wasserstoffion detektiert. Im

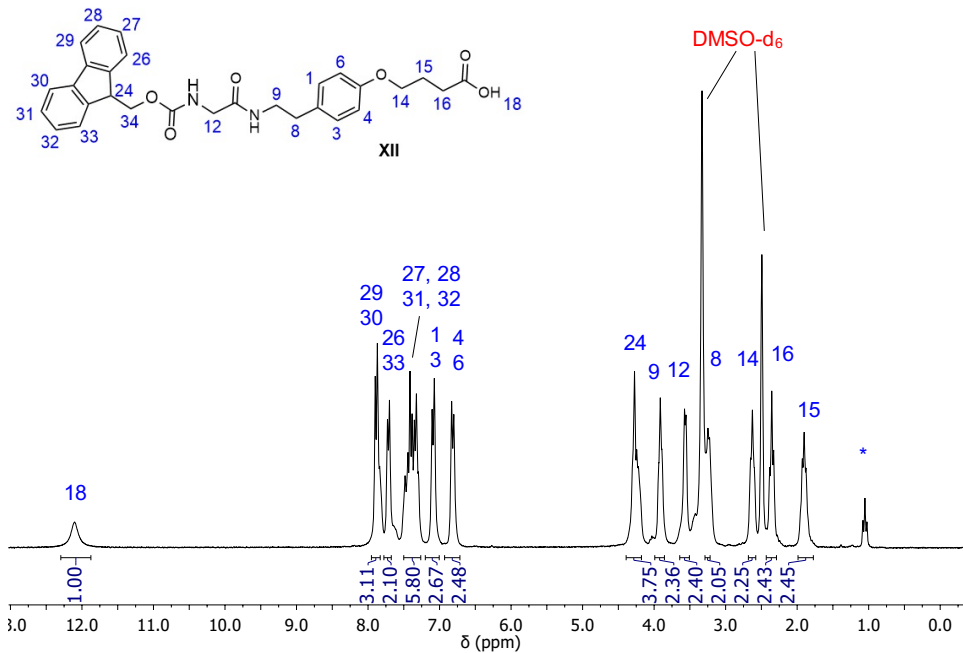


Abb. 3.3: ^1H -NMR-Spektrum (250 MHz) von **XII** (NPCL) in $\text{DMSO}-d_6$ δ / ppm = 12.10 (s, 1H, H^{18}), 7.87 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, H^{29} , H^{30}), 7.71 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, H^{26} , H^{33}), 7.54-7.26 (m, 4H, H^{27} , H^{28} , H^{31} , H^{32}), 7.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H^1 , H^3), 6.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H^4 , H^6), 4.29 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, H^{34}), 4.20 (d, $J = 7.5$, 1H, H^{24}), 3.91 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H^9), 3.56 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H^{11}), 3.23 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H^8), 2.63 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H^{14}), 2.36 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H^{16}), 1.90 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, H^{15}).

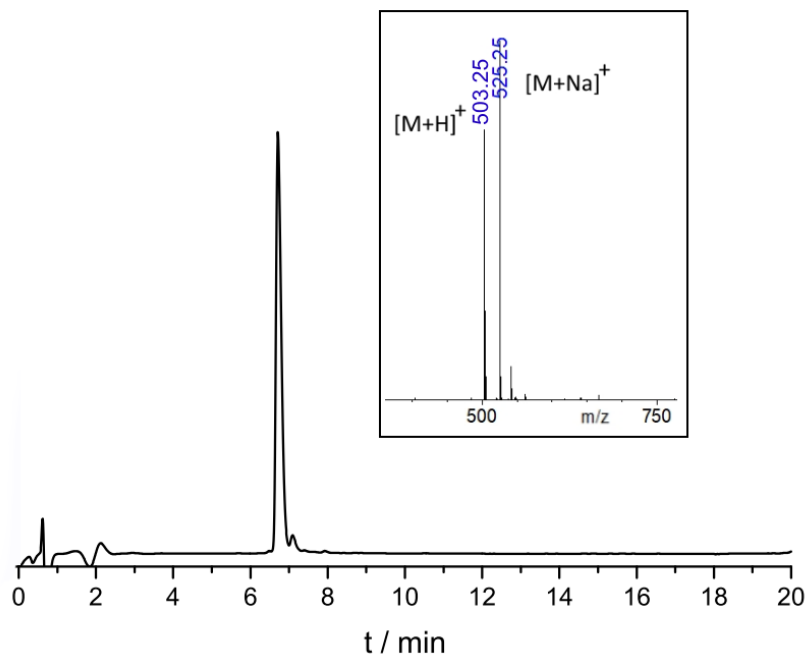
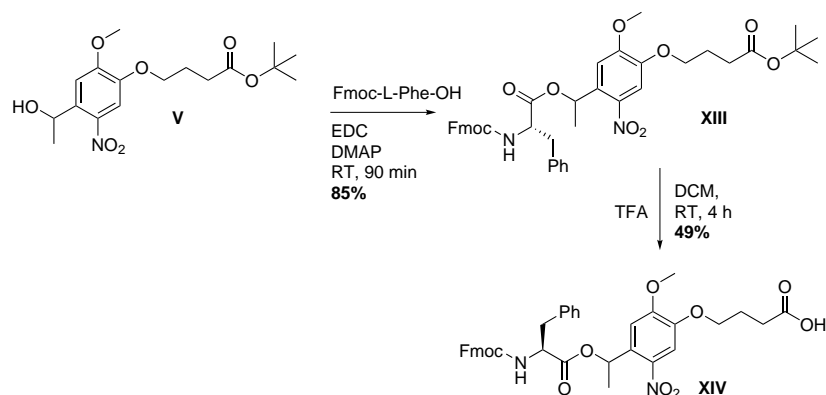


Abb. 3.4: LC-MS-Messung (Detektor 214 nm) der Verbindung NPCL **XII** mit Ausschnitt des Massenspektrum bei der Retentionszeit 6,75 min.
Für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnete Masse: 525,20; gefundene Masse: 525,25.
Für $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnete Masse: 503,21; gefundene Masse: 503,25.

LC-Spektrum ist zudem bei einer Retentionszeit 7,0 min ein weiteres kleines Signal zu erkennen. Dieses Signale hat ein sehr ähnliches Massenspektrum zur Verbindung **XII** und kann nicht weiter zugeordnet werden. Die Reinheit für Verbindung **XII** wird durch Integration der Banden auf mindestens 93% geschätzt.



Schema 3.3: Syntheschema für den Phe-PCL **XIV**.

Die Synthese des Phe-PCL **XIV** erfolgte ausgehend von Verbindung **V**. Es wurde, wie in Schema 3.3 gezeigt, nach einer leicht modifizierten Vorschrift der selben Literaturquelle vorgegangen.^[27] Im vorletzten Schritt wurde anstelle des Fmoc-Gly-OH Fmoc-Phe-OH eingesetzt, um Verbindung **XIII** über eine anschließende Behandlung mit TFA in DCM den Phe-PCL **XIV** darzustellen. In Abb. 3.5 ist das ¹H-NMR Spektrum und in Abb. 3.6 das LC-Massenspektrum der Verbindung Phe-PCL **XIV** gezeigt.

Das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **XIV** entspricht der Erwartung, zeigt aber Spuren von Verunreinigungen, die nicht weiter zugeordnet werden konnten. Die Integrale entsprechen daher nicht in allen Fällen der theoretischen Erwartung. Dies wird auf Verunreinigungen zurückgeführt, die ähnliche chemischen Verschiebungen haben. Bei 1.2, 1.6 und 6.6 ppm (*) sind beispielsweise Verunreinigungssignale zu sehen, die nicht mit den Signalen von **XIV** überlagern.

Bei einer Retentionszeit von 8,8 min wurde im Chromatogramm in Abb. 3.6 anhand des Massenspektrums die Zielverbindung **XIV** zugeordnet, die mit einem Natriumion detektiert wird. In der LC-Messung ist zudem bei einer Retentionszeit von 7,4 min ein weiteres kleines Signal zu erkennen. Dieses Signale kann nicht weiter zugeordnet werden. Die Reinheit für Verbindung **XIV** wird durch Integration der Banden auf mindestens 80% geschätzt.

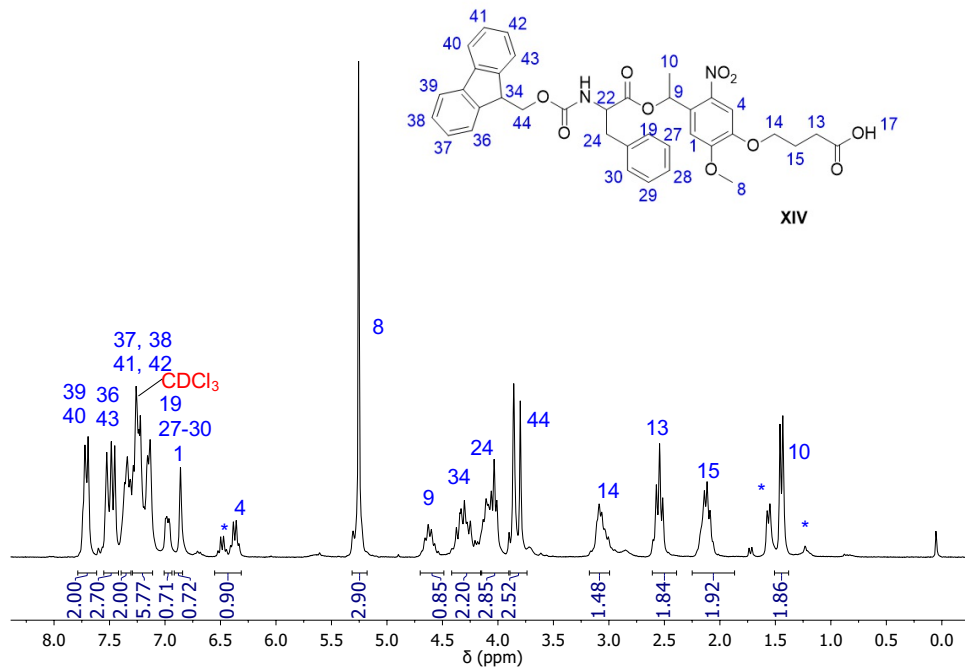


Abb. 3.5: ^1H -NMR-Spektrum (250 MHz) der Verbindung **XIV** Phe-PCL in CDCl_3 . δ / ppm: 7.81 - 7.63 (m, 2H, H^{39} , H^{40}), 7.60 - 7.40 (m, 2 H, H^{36} , H^{43}), 7.40 - 7.08 (m, 4H, H^{38} , H^{37} , H^{41} , H^{42}), 6.98 (dd, $J = 6.8, 3.1$ Hz, 1H, H^{28}), 6.86 (s, 1H, H^1), 6.50 - 6.18 (m, 1 H, H^4) 5.26 (s, 3H, H^8), 4.60 (dt, $J = 14.6, 7.6$ Hz, 1 H, H^9), 4.41 - 4.19 (m, 1H, H^{34}) 4.11 - 4.08 (m, 2 H, H^{24}), , 3.83 (d, $J = 14.7$ Hz, 2H, H^{44}), 3.09 - 3.00 (m, 2 H, H^{14}) 2.56 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H, H^{13}), 2.13 (q, $J = 6.8$, 2H, H^{15}), 1.53 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H^{10}).

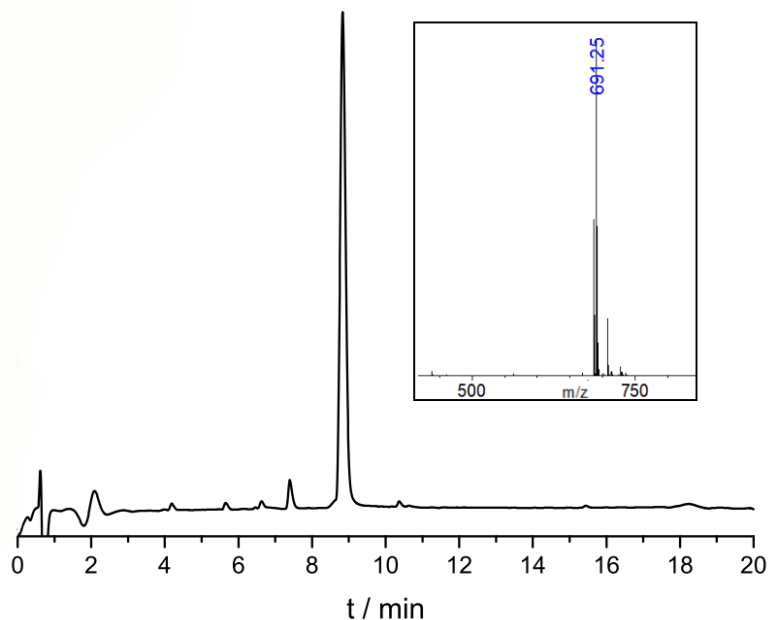
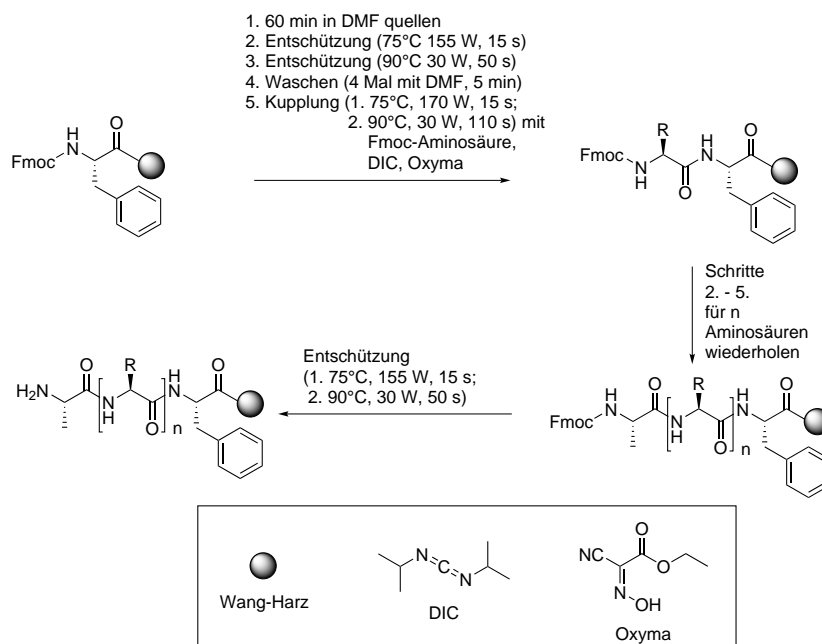


Abb. 3.6: Aus LC-MS erhaltenes Chromatogramm (Detektor 214 nm) und Massenspektrum der Fraktion bei 8,8 min der Verbindung Phe-PCL **XIV** . Für $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnete Masse: 691,22
gefundene Masse: 691,25.

3.1.2 Peptide 1–5

Die Zielverbindungen RGD-PCL-CKFKFQF **1**, RGD-NPCL-CKFKFQF **2**, CK-Phe-PCL-KFQF **3**, CKFK-PCL-FQF **4** und CKFK-NPCL-FQF **5** wurden mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach Fmoc-Protokoll (Schema 3.4) hergestellt.^[71]



Schema 3.4: Allgemeine mikrowellenassistierte Festphasenpeptidsynthese. Deblockierung mit 20% Vol. Piperidin in DMF, Kupplung mit Fmoc-Aminosäuren unter Zusatz von DIC und Oxyma.

Dabei wird das mit Fmoc-geschütztem Phenylalanin vorbeladene WANG-Harz im ersten Schritt in DMF gequollen. Darauf folgt die Kupplungssequenz, in der zunächst die Fmoc-Schutzgruppe mit 20% Vol. Piperidin in DMF entschützt und das Harz anschließend gewaschen wird. Im darauf folgenden Kupplungsschritt die jeweiligen Aminosäure unter Zusatz von DIC und Oxyma für etwa 2 min bei 30 W gekuppelt. Die Kupplungssequenzen 2. bis 5. werden für jede Kupplung wiederholt. Die Kupplungsreagenzien haben den Zweck den C-Terminus für eine Kupplung mit dem Amin zu aktivieren. Dabei verläuft die Aktivierung der Carbonsäure zunächst über eine nucleophile Reaktion mit dem elektronenarmen Diimidkohlenstoffatom des DIC zu einem stark aktivierten *O*-Acylisoharnstoff. Darauf folgend der Acyltransfer mit Oxyma zur Oximaktivesterverbindung. Eine anschließende Aminolyse des *N*-Terminus der zu kuppelnden Aminosäure führt dann zur gewünschten Peptidbindung.^[72] Die Charakterisierung der Zielverbindungen erfolgte nach Aufreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC durch MALDI-ToF-MS (3.7a–3.7e) und LC-MS-Messungen (3.8a–3.8e). Die vollständigen MALDI-ToF-MS Spektren und die Massenspektren der LC-MS-Messungen befinden sich im Experimentalteil in Abschnitt 5.5 und im Anhang ab Seite 124.

Die Verbindungen 1–5 konnten erfolgreich dargestellt werden. Die Ausbeuten und die Reinheit der jeweiligen Peptide sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1: Übersicht über die dargestellten Zielverbindungen 1–5 mit Retentionszeit t_{Ret} in der LC-MS-Messung. Die Angaben zur Ausbeute sind ungefähre Angaben, da die Masse der Peptide nicht genauer eingewogen werden konnte. Es ist jeweils die Mindestreinheit angegeben, die anhand der Integrale der LCMS-Signale ermittelt wurde, da aufgrund von Dimerbildung und überlappender Signale keine genauere Angabe gemacht werden kann.

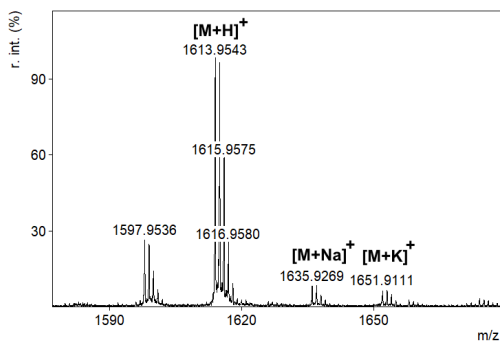
Verbindung	t_{Ret} / min	Ausbeute / % d. Th.	Reinheit / %
1	3,74	ca. 5	> 76
2	3,56	ca. 5	> 88
3	4,54	ca. 3	> 81
4	4,09	ca. 10	> 72
5	3,70	ca. 7	> 81

Die niedrigen Ausbeuten werden auf die Kupplung mit unnatürlichen Aminosäuren und Verluste beim Trennen des Peptids vom Harz zurückgeführt. Die Reinheit wurde anhand von Integralverhältnissen aus den LC-MS-Spektren berechnet und dient als Orientierungswert. Es kann keine Aussage über die genaue prozentuale Reinheit der Peptide getroffen werden, da aufgrund von Dimerbildung und sich überlappenden Signalen keine genauere Angabe gemacht werden kann.

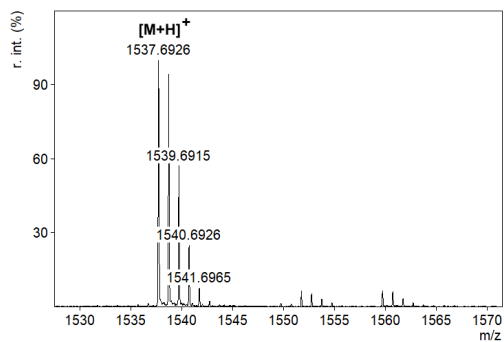
In den MALDI-ToF-MS Messungen in Abb. 3.7 sind bei Verbindungen 1, 3 und 4 jeweils zusätzlich um 16 geringe m/z Verhältnisse gemessen worden. Diese Signale werden auf die Abspaltung eines Sauerstoffatoms in der Nitrogruppe des PCL zurückgeführt. Es wird vermutet, dass die Nitrogruppe im Massenspektrometer zur Nitrosogruppe reduziert wurde. Dies wird durch analoge Beobachtungen bei der Verbindung PCL VII und das Ausbleiben derselben bei Verbindungen 2 und 5, die keine Nitrogruppe besitzen, unterstützt. Die Bildung von Spaltfragmenten, die in vollständigen MALDI-ToF-MS Spektren im Experimentalteil in Abschnitt 5.5 zu sehen sind, wird auf die Desorption der LASER Energie bei 355 nm und der damit einhergehenden Photospaltung des PCL zurückgeführt. Vergleichbare Spaltprodukte werden nicht für die Verbindungen mit NPCL beobachtet. Diese Beobachtung ist im Hinblick auf die MALDI-Imaging-Messungen in Abschnitt 3.4.2 für die Interpretation der Daten relevant.

Die LC-MS-Messungen in Abb. 3.8 sind von einer Retentionszeit ab 2 min dargestellt, um die Lösungsmittelsignale abzutrennen. In 3.8e ist ein breites Signal bei einer Retentionszeit t_{Ret} von 5–9 min zu sehen. Dieses Signal wird auf Lösungsmittelverunreinigungen bei der Probenvorbereitung zurückgeführt, da dies im HPLC Spektrum in Abb. 3.19 nicht beobachtet werden kann. Die LC-MS Messung konnte aus Zeit-

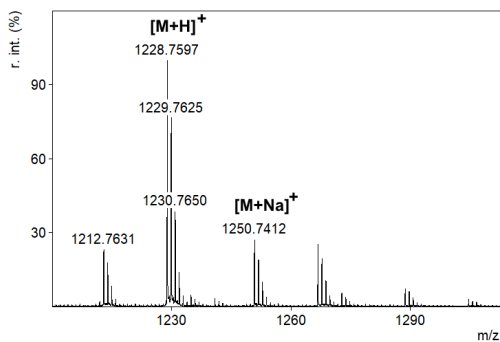
gründen nicht wiederholt werden. Ab einer t_{Ret} von 10 min treten in allen LC-MS Spektren Signalschwankungen auf, die von der Subtraktion der Basislinie stammen. Zudem wurde beobachtet, dass alle Verbindungen dazu neigen, bei längerer Lagerung in DMSO Dimere zu bilden (3.8d). Der zweite Peak, der in 3.8d bei einer Retentionszeit von 4,52 min auftritt, ist dem Dimer der Verbindung 4 zuzuschreiben. Das Auftreten des Dimers wird auf Seite 31 näher erläutert.



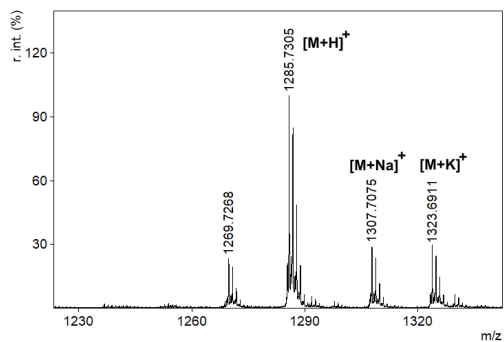
(a) RGD-PCL-CKFKFQF 1. Für $[M+H]^+$
berechnete Masse: 1613,7417
gefundene Masse: 1613,9543.



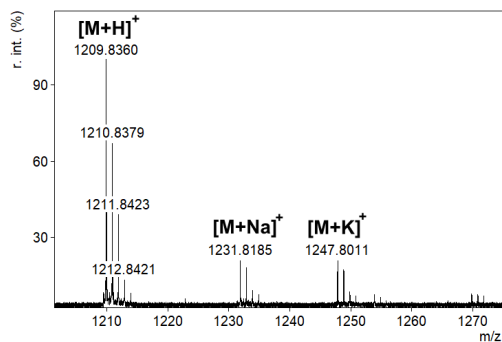
(b) RGD-NPCL-CKFKFQF 2. Für $[M+H]^+$
berechnete Masse: 1537,7620
gefundene Masse: 1537,6926.



(c) CK-Phe-PCL-KFQF 3. Für $[M+H]^+$
berechnete Masse: 1228,5707
gefundene Masse: 1228,7597.

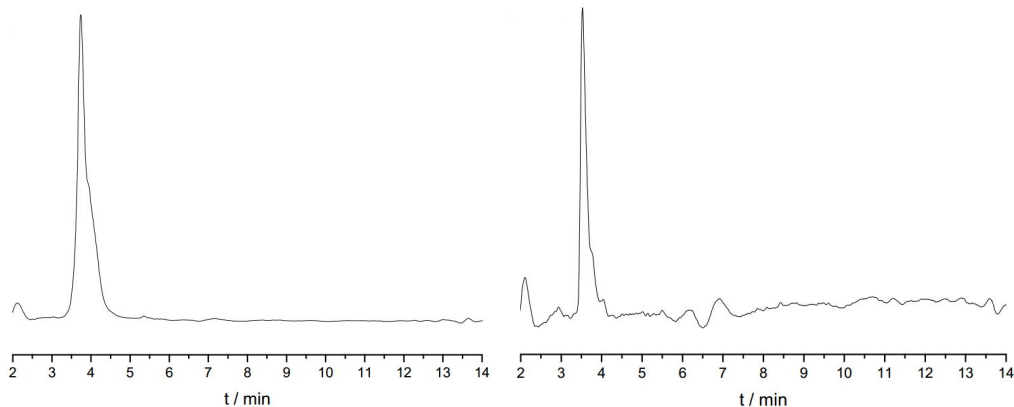


(d) CKFK-PCL-FQF 4. Für $[M+H]^+$
berechnete Masse: 1285,5922
gefundene Masse: 1285,7305.



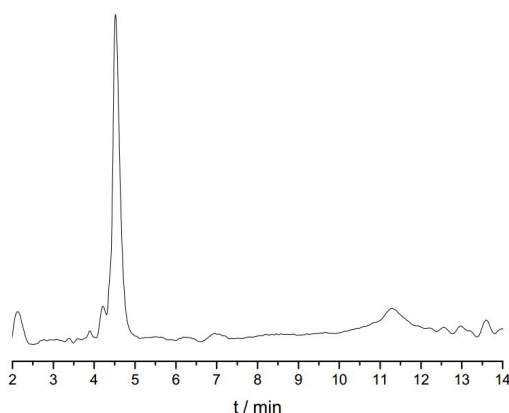
(e) CKFK-NPCL-FQF 5. Für $[M+H]^+$
berechnete Masse: 1209,6125
gefundene Masse: 1209,8360.

Abb. 3.7: MALDI-ToF-MS-Messungen der Zielverbindungen 1–5. Die vollständige Spektren befinden sich im Experimentalteil in Abschnitt 5.5.

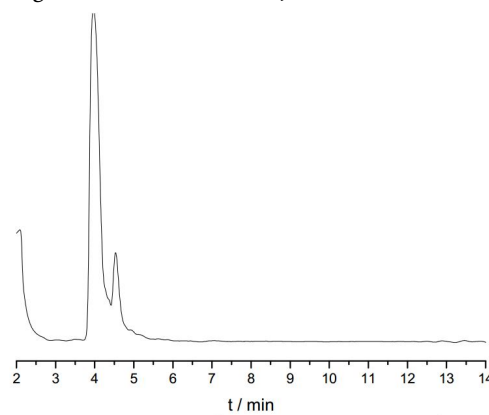


(a) RGD-PCL-CKFKFQF 1.
 $t_{\text{Ret}} = 3,74$ min. Für $[\text{M-H}]^-$
 berechnete Masse: 1612,73
 gefundene Masse: 1612,20.

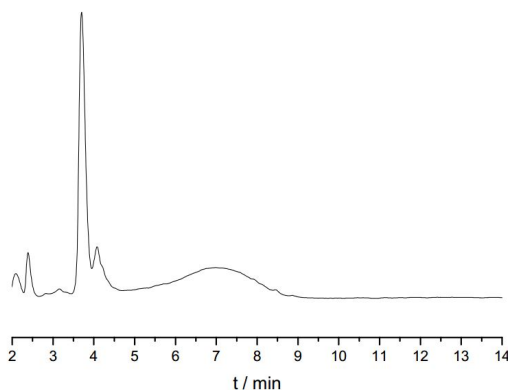
(b) RGD-NPCL-CKFKFQF 2.
 $t_{\text{Ret}} = 3,56$ min. Für $[\text{M-H}]^-$
 berechnete Masse: 1536,75
 gefundene Masse: 1536,40.



(c) CK-Phe-PCL-KFQF 3.
 $t_{\text{Ret}} = 4,54$ min. Für $[\text{M+H}]^+$
 berechnete Masse: 1228,57
 gefundene Masse: 1228,25.



(d) CKFK-PCL-FQF 4.
 $t_{\text{Ret}} = 4,09$ min. Für $[\text{M-H}]^-$
 berechnete Masse: 1282,57
 gefundene Masse: 1282,90.



(e) CKFK-NPCL-FQF 5.
 $t_{\text{Ret}} = 3,70$ min. Für $[\text{M-H}]^-$
 berechnete Masse: 1208,60
 gefundene Masse: 1208,05.

Abb. 3.8: LC-MS-Messungen (Detektor bei 214 nm) der Zielverbindungen 1–5. Die Spektren sind ab Retentionszeit von 2 min dargestellt, um das Lösungsmittelsignal abzutrennen. Die vollständigen Massenspektren befinden sich im Anhang ab Seite 124.

3.1.3 Morphologie der Peptide

Das Peptid CKFKFQF bildet bei physiologischen Bedingungen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und auch in MilliQ-Wasser bei pH 7,4 Fibrillen.^[13] Analoges Verhalten wird daher auch für die Zielverbindungen 1–5 erwartet und ist essentiell wichtig für spätere Anwendungsziele. Störfaktoren für die Fibrillierung könnten jedoch der PCL und NPCL sein. Um die Morphologie der Zielverbindungen genauer zu untersuchen, wurden Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) Messungen durchgeführt. In Abb. 3.9 sind die TEM Bilder der Zielverbindungen RGD-PCL-CKFKFQF **1**, RGD-NPCL-CKFKFQF **2**, CK-Phe-PCL-KFQF **3**, CKFK-PCL-FQF **4** und CKFK-NPCL-FQF **5** zusammengefasst. Alle TEM-Messungen wurden von ADRIANA SOBOTA durchgeführt. Die Präparierung der Fibrillierungsansätze und TEM Netzchen folgte dem allgemeinen Protokoll, welches im Experimententeil beschrieben ist.

Bei allen Verbindungen 1–5 konnten Fibrillen nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 und eintägigem Inkubieren in MilliQ-Wasser mit 10% DMSO beobachtet werden. In dieser Arbeit wurden die Fibrillierungsbedingungen in MilliQ Wasser optimiert und nicht in PBS, da Salzablagerungen spätere Anwendung auf Oberflächen stören könnten. Ohne Einstellung liegt der pH Wert der Peptidlösungen bei etwa 3,8 und es werden auch nach einem Tag Inkubation keine Fibrillen beobachtet (Abb. 3.9 f). Bei diesem pH Wert liegt die Seitenkette des Lysins protoniert vor und das Peptid kann sich aufgrund der COULOMB-Abstoßung nicht assemblieren. Bei pH 7,4 überwiegen die intermolekularen hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen und führen zur Fibrillierung.

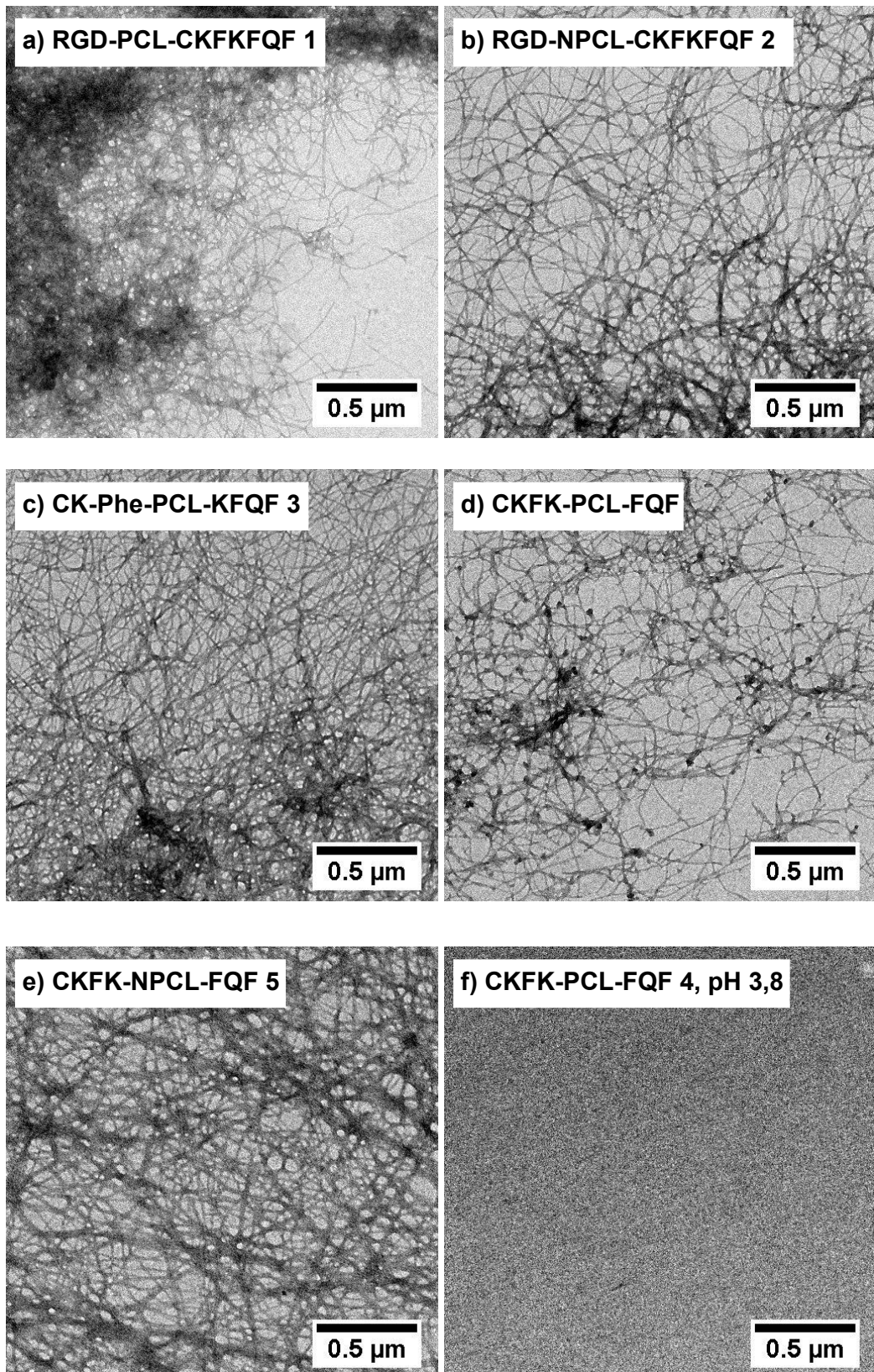
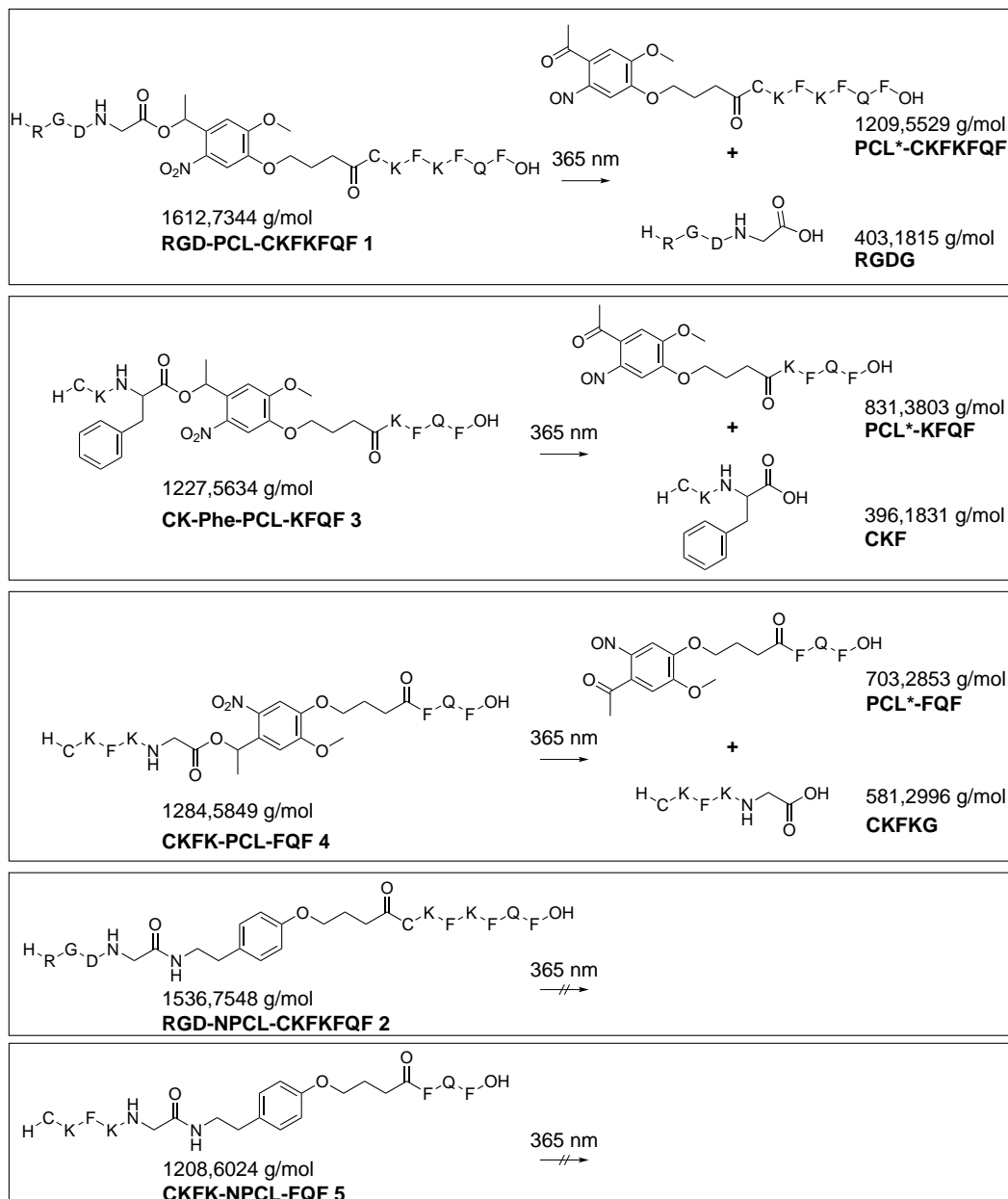


Abb. 3.9: TEM-Aufnahmen der Zielverbindungen 1–5. Die Fibrillierung wurde in a) bis e) bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Konzentration von 1 mg/mL in MilliQ Wasser mit 10% DMSO angesetzt. Die TEM-Netzchen wurden im letzten Schritt mit Uranylacetat als Kontrastmittel behandelt. In f) wurde dieselbe Vorgehensweise für Verbindung 4 ohne Einstellung des pH-Wertes durchgeführt. Der Maßstab beträgt 500 nm.

3.2 Bestrahlungsexperimente in Lösung

Die Bestrahlung mittels UV-Licht bei 365 nm führt zur Spaltung des PCL nach radikalischen Mechanismus (Schema 1.2).^[29] Die dazu analogen erwarteten Reaktionen für **1**, **3** und **4** sind in Schema 3.5 dargestellt. Der PCL reagiert nach der Bestrahlung durch eine formale Bindungsspaltung an der Esterfunktionalität zu PCL*.



Schema 3.5: Erwartete Reaktionen der Verbindungen 1–5.

Um die Kinetik der photoinitierten Spaltung und die Auswirkungen auf die Morphologie der Peptide vor und nach der Fibrillierung zu untersuchen, wurden Bestrahlungsexperimente mit den Zielverbindungen **1–5** bei 365 nm durchgeführt. Die

Spaltkinetik wurde über analytische HPLC und LC-MS-Messungen, die Morphologieänderung über TEM-Messungen untersucht.

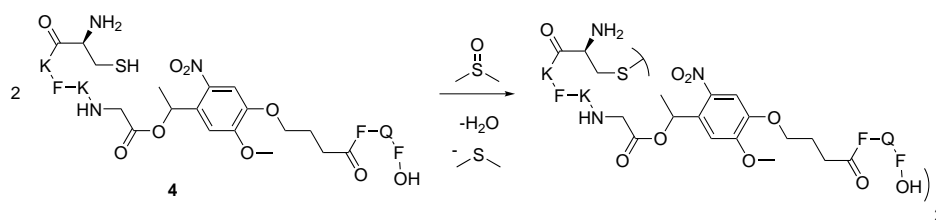
3.2.1 Spaltkinetik der Verbindungen 1-5

Die Spaltkinetik des PCL in den Zielverbindungen 1–5 wurde über analytische HPLC und LC-MS nach verschiedenen Bestrahlungszeiten ohne vorherige Fibrillierung ermittelt. Aufgrund der besseren Trennleistung der analytischen Säule wurden analytische HPLC-Messungen zusätzlich zu den LC-MS-Messungen durchgeführt. LC-MS Messungen wurden von ALI ROUHANIPOUR durchgeführt.

Für die Bestrahlungsexperimente wurden die jeweiligen Peptide zunächst in DMSO gelöst (10 mg/mL). 10 µl dieser Lösung wurden mit einem Abstand von 1 cm zu der 365 nm LED für die entsprechende Zeit bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die Lösung mit MilliQ Wasser zu 1 mg/mL verdünnt und chromatografisch mittels eines Gradienten aus Wasser und Acetonitril mit 0.1% Vol. TFA aufgetrennt. Dabei wurde die selbe Menge an Peptidlösung verwendet, damit die Signalintensitäten in einer Messreihe vergleichbar sind. Die genauen Bedingungen bei den HPLC- und LC-MS-Messungen sind im Experimentalteil beschrieben.

Bei der Auswertung der Chromatogramme ist zu beachten, dass die Signalintensitäten des UV-Detektors nicht nur von der Konzentration, sondern auch vom molekülspezifischen Absorptionskoeffizienten abhängen. Beispielsweise absorbieren Aromaten im Vergleich zu Amiden besonders stark bei einer Wellenlänge von 190 nm. Dies gilt insbesondere bei Spaltreaktionen, bei denen ein Molekül mit vielen aromatischen Gruppen in zwei Molekülfragmente mit ungleicher Verteilung derselben zerfällt.

Bildung von Dimeren Die Verbindungen 1–5 bilden nach längerem Inkubieren in DMSO haltigen Lösungen Dimere. Die Dimerisierung findet durch die Oxidation des Cysteins in Gegenwart von DMSO und die anschließende Bildung von Disulfidbindungen statt.^[73] In Schema 3.6 wird die Dimerisierung anhand des Beispiels der Verbindung 4 dargestellt.



Schema 3.6: Dimerisierung von 4 durch Oxidation mit DMSO nach PAPANYAN et al.^[73]

In Abb. 3.10 ist die zeitliche Entwicklung der Dimerbildung von Verbindung 4 anhand von HPLC-Messungen gezeigt. Es ist zu sehen, dass neben dem Ausgangssignal (T_0 , t_{Ret} 10,1 min) nach eintägigem Inkubieren der Verbindung 4 ein zweites Signal mit einer längeren Retentionszeit (10,4 min) auftritt. Dieses Signal wird auf die Dimerisierung zurückgeführt.^[73]

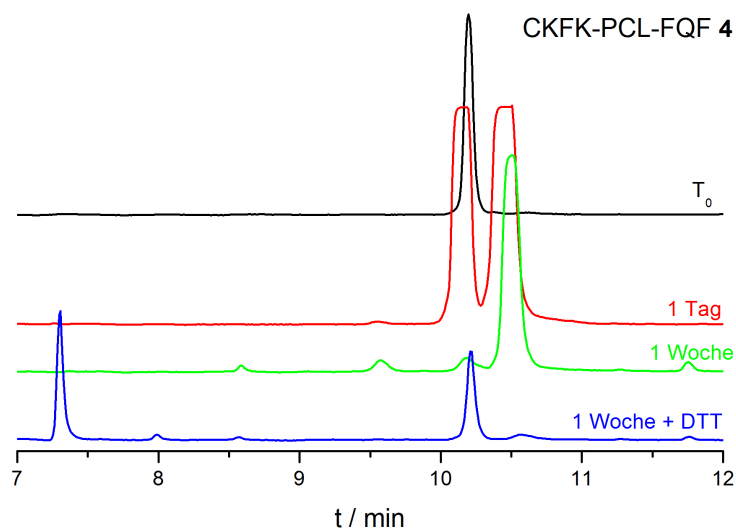


Abb. 3.10: HPLC-Messungen (Detektor: 190 nm) der Verbindungen 4 in wässriger 10% DMSO Lösung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lösen (T_0) und nach Zusatz von DTT. Die monomere Ausgangsverbindung 4 hat eine Retentionszeit von 10,2 min, das Dimer eine Retentionszeit von 10,5 min und DTT eine Retentionszeit von 7,3 min.

Nach einer Woche Inkubationszeit in Wasser mit 10% DMSO ist ein nahezu vollständiger Umsatz zum Dimer der Verbindung 4 zu erkennen. Die Disulfidbindung kann durch Zugabe von 2 Äquivalenten 10 mM Dithiothreitol (DTT) reduziert und die monomere Verbindung 4 zurückerhalten werden. Monomere und Dimere der Verbindung 4 wurden über MALDI-ToF-MS-Messungen (Abb. 3.11, Tab. 3.2) nachgewiesen. Aufgrund der doppelten Ladung des Dimers sind die Isotopensignale um jeweils etwa 0,5 Da zum Monomer verschoben. Bei der Isotopenverteilung von Monomer und Dimer weichen die experimentell ermittelten Werte systematisch um 0,2 Da von den theoretisch berechneten Werte ab. Diese Differenz wird auf einen Kalibrierungsfehler des MALDI-ToF Geräts zurückgeführt.

Intensivere Dimersignale nach 1 Woche bei Verbindung 4 im Vergleich zu Verbindung 1 (Abb. 3.12) oder 2 (Abb. 3.14) könnten dem terminalem Cystein, welches schneller Disulfidbindungen aufbauen kann als das nicht-terminale Cystein, geschuldet sein. Diese Vermutung Bedarf jedoch näherer Untersuchung. Zudem wird vermutet, dass DMSO für die Bildung von Dimeren in kurzer Zeit notwendig ist, da anhand von Verbindung 5 (Abb. 3.19) ohne DMSO-Zugabe keine Dimerisierung beobachtet wurde.

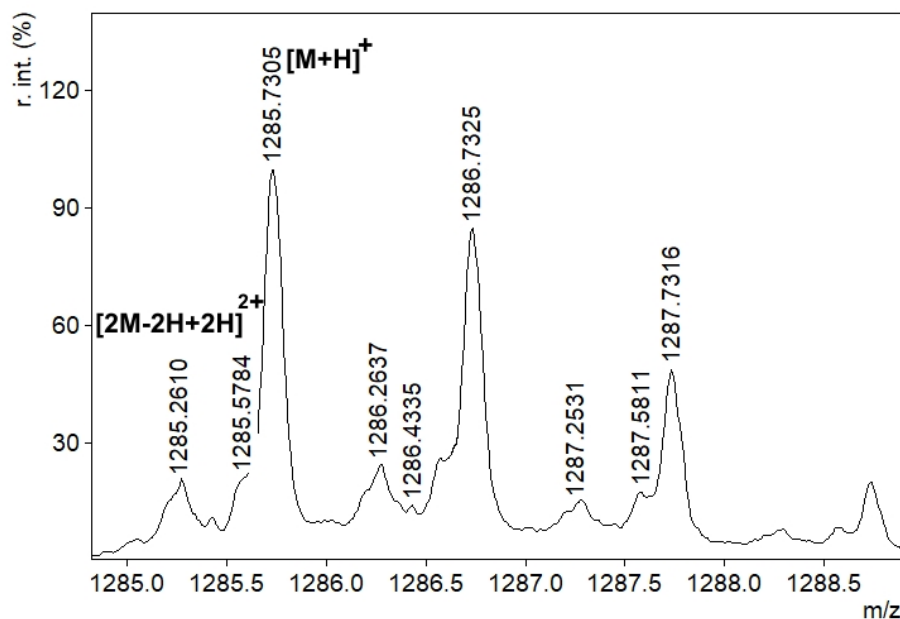


Abb. 3.11: MALDI-ToF-MS-Messung von Verbindung 4 nach einem Tag in wässriger 10% DMSO Lösung. Die Signale des Monomers CKFK-PCL-FQF $[M+H]^+$ und zweifach geladenen Dimers $[2M-2H+2H]^{2+}$ sind etwa 0,5 Da gegeneinander verschoben.

Tab. 3.2: Experimentell $m/z_{\text{exp.}}$ ermittelte und theoretisch $m/z_{\text{th.}}$ berechnete MALDI-ToF-MS Isotopenverteilung des Monomers $[M+H]^+$ und des Dimers $[2M-2H+2H]^{2+}$ der Verbindung 4 mit relativen berechneten Intensitätsangaben I der Software mMass. Die Isotopensignale des Dimers sind wie erwartet um etwa 0,5 Da zum Monomer verschoben. Die experimentellen und theoretischen Werte $\Delta m/z$ weichen durch einen Kalibrierungsfehler des MALDI-ToF-MS Geräts um etwa 0,2 Da systematisch ab.

$I / \%$	$m/z_{\text{exp.}}$	$m/z_{\text{th.}}$	Zuordnung	$\Delta m/z$
100	1285.2610	1285.0899	$[2M-2H+2H]^{2+}$	0.1711
100	1285.7305	1285.5922	$[M+H]^+$	0.1383
66	1286.2637	1286.0916	$[2M-2H+2H]^{2+}$	0.1721
22	1286.4335	1286.2832	$[2M-2H+2H]^{2+}$	0.1503
66	1286.7325	1286.5955	$[M+H]^+$	0.1370
9	1287.2531	1287.0895	$[2M-2H+2H]^{2+}$	0.1636
29	1287.7316	1287.5989	$[M+H]^+$	0.1327
5	1288.7303	1288.6022	$[M+H]^+$	0.1281

RGD-PCL-CKFKFQF 1 In Abb. 3.12 sind HPLC-Messungen der Verbindung RGD-PCL-CKFKFQF 1 nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer bei 365 nm gezeigt.

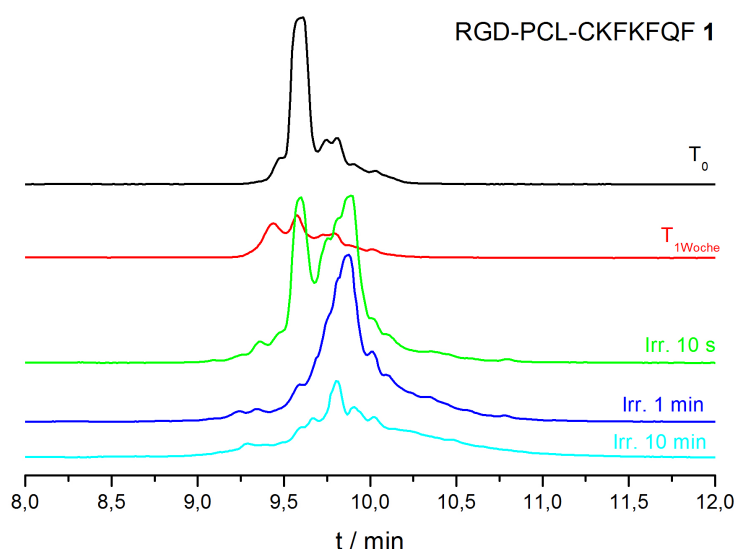


Abb. 3.12: HPLC Messung (Detektor: 190 nm) der Verbindung RGD-PCL-CKFKFQF 1 bei verschiedenen Bestrahlungszeiten (Irr.). In roter Farbe ist das HPLC Spektrum der Verbindung ohne Bestrahlung eine Woche nach Inkubieren in Lösung $T_{1\text{Woche}}$ gezeigt.

Vor der Bestrahlung bei T_0 wird Verbindung 1 bei einer Retentionszeit von 9,6 min detektiert. Es wurden Spuren von Verunreinigungen beobachtet, die möglicherweise auf eine Überladung der Säule, auf vorherige Spaltung von 1 oder Dimerisierung von 1 zurückgeführt werden. Nach einwöchigem Inkubieren in Lösung ist neben dem Ausgangsmaterial in ähnlicher Intensität bei einer Retentionszeit von 9,4 min ein weiteres Signal zu erkennen. Dieses Signal wird auf die Dimerisierung (siehe Seite 31) der Verbindung zurückgeführt und ist bereits in niedrigerer Intensität bei T_0 zu erkennen. Bei einer Bestrahlungsdauer von 10 s wurde ein Großteil der Ausgangsverbindung zu mehreren Spaltprodukten mit Retentionszeiten von 9,7–9,9 min umgesetzt. Bei einer Minute Bestrahlungsdauer konnte nahezu keine Ausgangsverbindung detektiert werden. Bei Bestrahlung über 10 min verändert sich die Verteilung und Intensität der Spaltfragmente. Es wird vermutet, dass die Signale zu Zwischenprodukten der photoinitierten Spaltreaktion gehören. Da die Spaltprodukte der Verbindung 1 eine ähnliche Retentionzeit wie das Ausgangsmaterial haben, ist die genauere Untersuchung der verschiedenen Spaltprodukte nicht möglich. Die ähnlichen Retentionszeiten deuten auf eine ähnliche Polarität der Spaltprodukte hin.

Um die intensivsten Signale der Spaltprodukte zuordnen zu können, wurde parallel LC-MS (Abb. 3.13) gemessen.

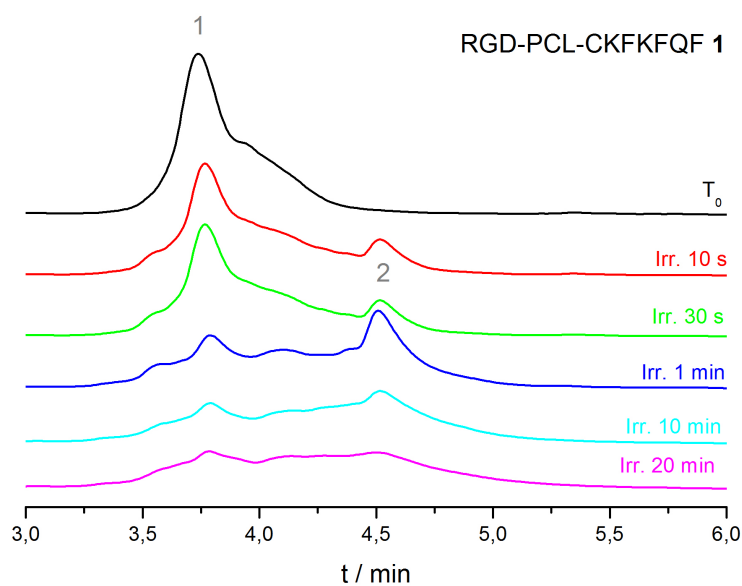


Abb. 3.13: LC-MS-Messung (Detektor: 214 nm) der Verbindung RGD-PCL-CKFKFQF 1 bei verschiedenen Bestrahlungsdauern (Irr.). T_0 wurde nicht bestrahlt.

Auch in den LC-MS-Messungen sind bei Bestrahlung verschiedene breit verteilte Signale zu erkennen. Dies deutet auf das Auftreten mehrerer Zwischenstufen bei der Photospaltung hin. Die Ausgangsverbindung **1** tritt bei einer Retentionszeit von 3,7 min auf, während ein Spaltprodukt eine Retentionszeit von 4,5 min hat (Abb. 3.13). Nach einer Bestrahlung von 20 min wurden nur noch sehr breite Signale erhalten. Dies wird auf weitere komplexe Nebenreaktionen des inaktiven photospaltbaren Linkers (PCL*) bei Bestrahlung zurückgeführt. Die nummerierten Ergebnisse aus Abb. 3.13 sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

Tab. 3.3: Zuordnung der nummerierten LC-MS Signale aus Abb. 3.13 anhand der Massenspektren der jeweiligen Signale. Es sind die Retentionszeiten t_{Ret} , die experimentellen und theoretischen gefundenen m/z Verhältnisse sowie weiterhin ein Strukturvorschlag zu der Zuordnung angegeben. M bezieht sich dabei auf die Zielverbindung **1**.

N ^o	t_{Ret} min	$\frac{m}{z}$ (exp.)	$\frac{m}{z}$ (th.)	Zuordnung	Strukturvorschlag
1	3.73	1611	1611.7	$[M-H]^-$	
2	4.52	1226	1226.6	$[C_{60}H_{79}N_{11}O_{15}S+H]^+$	

Es konnte gezeigt werden, dass die Ausgangsverbindung **1** in der Photospaltreaktion innerhalb von 1 min umgesetzt wird und eine Vielzahl von Nebenprodukten neben

den erwarteten aus Schema 3.5 gebildet werden. Für ein Spaltprodukt konnte ein plausibler Strukturvorschlag gemacht werden.

Kontrollexperiment mit RGD-NPCL-CKFKFQF 2 Im vorherigen Abschnitt konnte die Photospaltung der Verbindung **1** gezeigt werden. Zur Kontrolle wurde das strukturell ähnliche aber nicht photoaktive Peptid **2** ebenfalls bestrahlt und chromatografisch aufgetrennt. In Abb. 3.14 sind HPLC-Messungen der Verbindung RGD-NPCL-CKFKFQF **2** nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer bei 365 nm gezeigt.

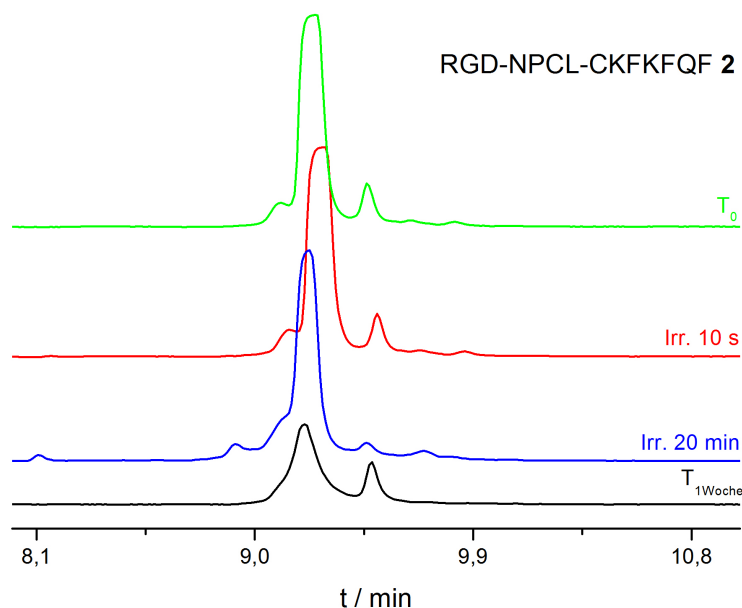


Abb. 3.14: HPLC-Messung (Detektor: 190 nm) der Verbindung RGD-NPCL-CKFKFQF **2** bei verschiedenen Bestrahlungsdauern. T₀ wurde nicht bestrahlt, T_{1Woche} wurde unbestrahlt eine Woche in wässriger 10% DMSO Lösung inkubiert.

Erwartungsgemäß findet durch die Bestrahlung keine signifikante Änderung im Chromatogramm statt. Das Peptid und der NPCL sind bis 20 min stabil gegen UV-Licht. Die Verbindung **2** hat eine Retentionszeit von etwa 9,2 min. Bei Inkubieren der Peptidlösung hatte nach einer Woche die Intensität abgenommen und ein weiteres Signal bei einer Retentionszeit von 9,5 min zugenommen. Daher wird dieses Signal dem Dimer der Verbindung **2** zugeordnet. Diese Zuordnung könnte durch Zugabe von Reduktionsmitteln überprüft werden. Analoge Experimente mit Dithiothreitol (DTT) wurden mit **4** auf Seite 31 durchgeführt.

CK-Phe-PCL-KFQF 3 Zur Untersuchung der Fragmentierung und Kinetik der Spaltreaktion der Verbindung **3** wurde analog zu den vorigen chromatografischen Trennungen verfahren. In Abb. 3.15 sind die HPLC Messungen der Verbindung CK-Phe-PCL-KFQF **3** nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer bei 365 nm gezeigt.

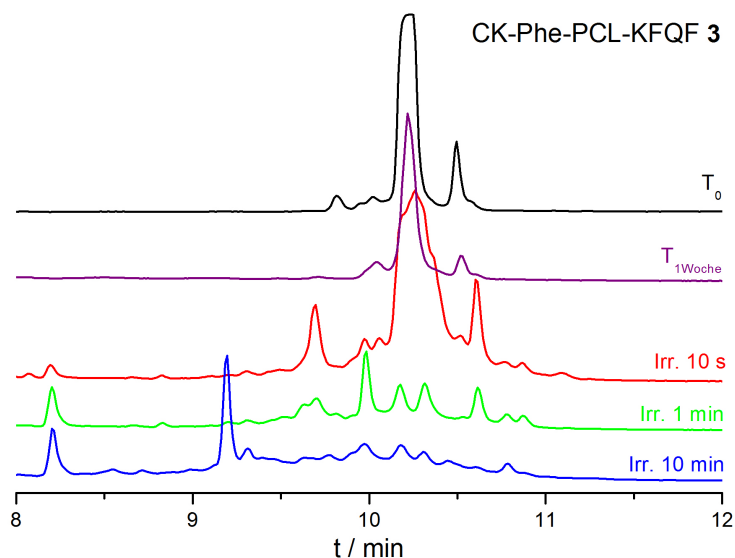


Abb. 3.15: HPLC Messung (Detektor: 190 nm) der Verbindung CK-Phe-PCL-KFQF **3** bei verschiedenen Bestrahlungszeiten. T_0 wurde nicht bestrahlt, $T_{1\text{Woche}}$ wurde 1 Woche in Lösung inkubiert.

Verbindung **3** hat bei T_0 in der HPLC-Messung eine Retentionszeit von etwa 10,2 min. Das Signal bei 10,5 min bei T_0 wird analog zu **4** (Abb. 3.10) dem Dimer zugeordnet. Es sind weitere Signale bei T_0 zu erkennen, die Verunreinigungen der Verbindung **3** zugeordnet werden. Auch **3** ist nach 1 min Bestrahlung nahezu vollständig umgesetzt worden. Im Vergleich zu Verbindung **1** sind in diesen Chromatogrammen klare Unterschiede in den Retentionszeiten der Fragmentierungsprodukte zu erkennen. Die verschiedenen Retentionszeiten deuten auf unterschiedliche Polaritäten der Zwischenprodukte hin. Die Fragmentierungsprodukte mit den höchsten Intensitäten bei 10 min Bestrahlung haben eine Retentionszeit von 8,2 und 9,2 min. Für die Zuordnung der Spaltprodukte, wurden parallel LC-MS Messungen durchgeführt, die in Abb. 3.16 gezeigt sind.

Bei T_0 hat Verbindung **3** eine Retentionszeit von 4,6 min. Dieses Signal ist mit der Nummer 1 versehen. Neben dem Signal der Ausgangsverbindung sind bei T_0 auch einige weitere Signale bei kürzeren Retentionszeiten zu erkennen. Diese Signale werden Verunreinigungen zugeordnet, die auch mittels Massenspektrum nicht zugeordnet werden konnten. Beispielsweise hat ein Signal eine Retentionszeit von 3,4 min und ist damit zeitgleich mit dem Spaltprodukt bei 10 min Bestrahlung, nummeriert als 2. Dieses Signal ist, wie anhand des Massenspektrums erkannt wurde, nicht das Spaltprodukt und konnte nicht weiter zugeordnet werden. Weiterhin sind

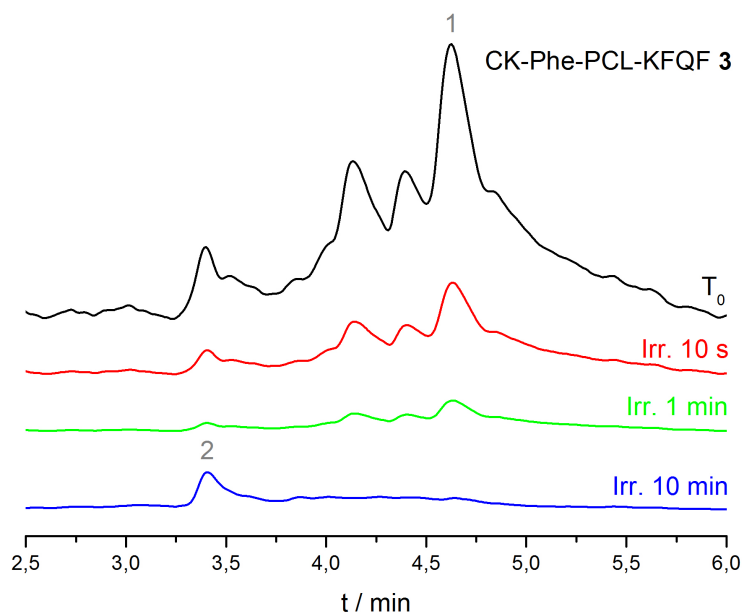


Abb. 3.16: LC-MS Messung (Detektor: 214 nm) der Verbindung CK-Phe-PCL-KFQF **3** bei verschiedenen Bestrahlungszeiten. In das Spektrum sind Nummerierungen eingezeichnet, die anhand des Massenspektrums erschlossen werden konnte.

bei 10 min Bestrahlung nicht zwei verschiedenen Spaltproduktsignale, wie aus der HPLC Messung in Abb. 3.15 zu erwarten wäre, erkennbar. Zum einen könnte die Absorption des zweiten Spaltfragmentes bei 214 nm sich anders verhalten, zum anderen aber auch die Trennleistung der LC nicht ausreichend sein, damit das zweite Spaltfragment aufgelöst wird. Zudem ist die Konzentration der Peptid-Lösung und damit die Signalintensitäten bei der LC-MS geringer als in der HPLC Messung. Die zugeordneten Signale sind mit Strukturvorschlägen aus in Tab. 3.4 zusammengefasst. Im LC-MS Spektrum konnten damit die Zielverbindung **3** sowie ein theoretisch erwartetes Spaltprodukt aus Schema 3.5 identifiziert werden.

Tab. 3.4: Zuordnung der nummerierten LC-MS Signale aus Abb. 3.16 anhand der Massenspektren der jeweiligen Signale. Es sind die Retentionszeiten t_{Ret} , die experimentellen und theoretischen gefundenen m/z Verhältnisse sowie weiterhin ein Strukturvorschlag angegeben. M bezieht sich dabei auf die Zielverbindung **3**.

Nº	$\frac{t_{Ret}}{min}$	$\frac{m}{z}$ (exp.)	$\frac{m}{z}$ (th.)	Zuordnung	Strukturvorschlag
1	4.61	1228.3	1228.6	$[M+H]^+$	
2	3.40	653.3	653.3	$[C_{33}H_{45}N_6O_8-H]^-$	

CKFK-PCL-FQF 4 Verbindung 4 wurde auf analog Weise hinsichtlich seiner Spaltkinetik untersucht. In Abb. 3.17 sind HPLC Messungen der Verbindung CKFK-PCL-FQF 4 nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauern bei 365 nm gezeigt.

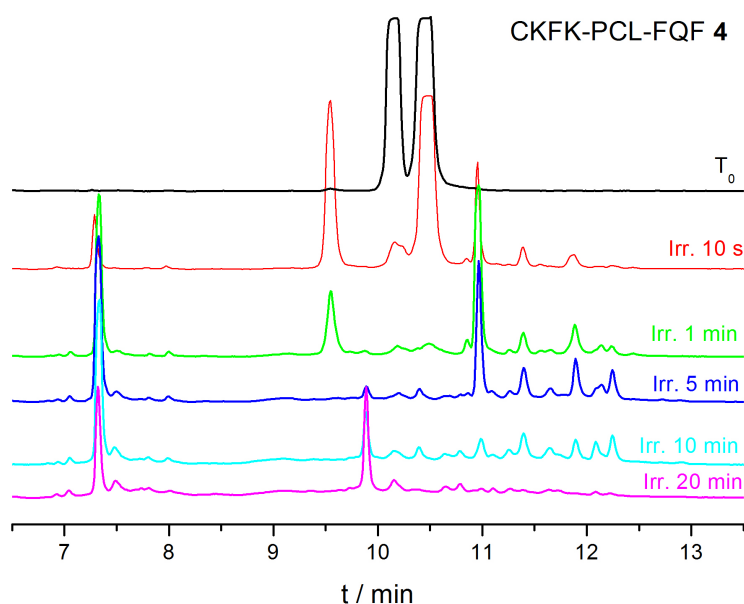


Abb. 3.17: HPLC-Messung (Detektor: 190 nm) der Verbindung CKFK-PCL-FQF 4 bei verschiedenen Bestrahlungszeiten (Irr.). T_0 ist die unbestrahlte Probe nach Lösen des Peptids und eintägigem Inkubieren in DMSO.

Die Ausgangsverbindung 4 hat eine Retentionszeit (t_{Ret}) von 10,1 min. Eine weitere Verbindung mit hoher Absorptionsintensität tritt bei einer t_{Ret} von 10,4 min auf. Dieses Signal ist das Dimerprodukt der Verbindung 4 und besonders ausgeprägt, da das Peptid einen Tag vor der Messung in DMSO gelöst wurde. Dies ist in Abb. 3.10 auf Seite 31 näher erläutert. Die Spaltprodukte von Verbindung 4 haben deutlich unterscheidbare Retentionszeiten. Auch hier ist das Auftreten von kurzlebigen Zwischenprodukten, beispielsweise bei einer t_{Ret} von 9,5 min nach 1 min Bestrahlung zu beobachten. Auch bei Verbindung 4 ist nach einer min Bestrahlung die Umsetzung nahezu vollständig. Nach 20 min Bestrahlung wurden die Spaltprodukte mit den intensivsten Absorptionssignalen bei einer t_{Ret} von 7,3 und 9,8 min detektiert. Durch LC-MS-Messungen (Abb. 3.18) wurde eine Zuordnung zu den Fragmentierungsprodukten in Tab. 3.5 zusammengefasst.

Bei T_0 treten in der LC-MS-Messung zwei Signale auf. Bei einer Retentionszeit von 4,0 min ist das Monomer und bei 4,5 min ist das Dimer zu finden. Es sind analog wie bei den vorherigen Spaltreaktionen ebenfalls viele verschiedene Spaltfragmente zu erkennen. Im Gegensatz zur HPLC-Messung tritt bei einer Bestrahlung von 20 min ein finales Spaltprodukt bei einer Retentionszeit von 4,4 min auf.

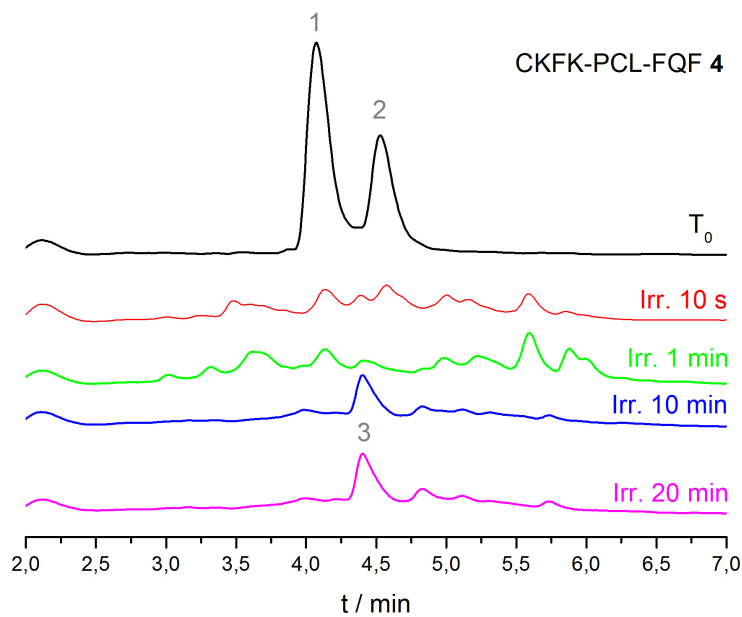


Abb. 3.18: LC-MS-Messungen (Detektor 214 nm) der Verbindung CKFK-PCL-FQF 4 bei verschiedenen Bestrahlungszeiten mit Nummerierung für die Zuordnung. Bei T_0 fand keine Bestrahlung statt.

Tab. 3.5: Zuordnung der nummerierten LC-MS Signale aus Abb. 3.18 anhand der Massenspektren der jeweiligen Signale. Es sind die Retentionszeiten t_{Ret} , die experimentellen und theoretischen gefundenen m/z Verhältnisse sowie weiterhin ein Strukturvorschlag zu jeder Zuordnung angegeben. M bezieht sich dabei auf die Zielverbindung 4.

Nº	t_{Ret} min	$\frac{m}{z}$ (exp.)	$\frac{m}{z}$ (th.)	Zuordnung	Strukturvorschlag
1	4.06	1285.35	1285.59	$[M+H]^+$	
2	4.53	1283.85	1283.07	$[2M-2H+2H]^{2+}$	
3	4.41	525.10	525.23	$[C_{27}H_{34}N_4O_7-H]^-$	

Kontrollexperiment: CKFK-NPCL-FQF 5 Als Kontrolle zu den Bestrahlungsexperimenten der Verbindungen **3** und **4**, wurde Verbindung **5** bestrahlt und chromatografisch aufgetrennt. In Abb. 3.19 sind HPLC-Messungen der Verbindung CKFK-NPCL-FQF **5** nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer bei 365 nm gezeigt. Diese Probe wurde nicht vorher in DMSO gelöst, sondern nur in Wasser zu einer 1 mg/mL Lösung vorbereitet.

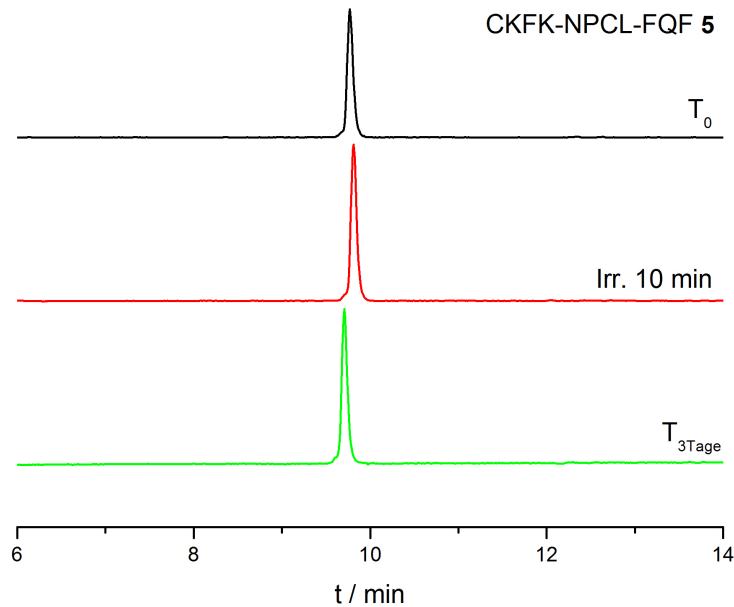


Abb. 3.19: HPLC Messung (Detektor: 214 nm) der Verbindung RGD-NPCL-CKFKFQF **5** (T_0), nach 10 min Bestrahlung bei 365 nm (Irr. 10 min) und ohne Bestrahlung nach drei Tagen Inkubationszeit in Wasser ohne DMSO ($T_{3\text{Tage}}$).

Erwartungsgemäß findet keine Änderung im Chromatogramm nach Bestrahlung statt. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass das Peptid und der NPCL stabil bei Bestrahlung mit UV-Licht sind. Verbindung **4** hat eine Retentionszeit von 9,7 min. Zudem ist auch kein weiterer Peak nach drei Tagen Inkubationszeit in Wasser zu erkennen. Eine Dimerisierung in Abwesenheit von DMSO findet demnach innerhalb von drei Tagen nicht statt.

3.2.2 Morphologische Charakterisierung

Da die Verbindungen **1**, **3** und **4** als responsive Materialien eingesetzt werden sollen, wurde die Änderung des Fibrillierungsvermögens nach Bestrahlung mittels TEM-Messungen untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss der Bestrahlung auf bereits gebildete Fibrillen in Lösung von **4** beobachtet. Dabei ist zu beachten, dass bei TEM-Messungen nur einzelne Bereiche der Probe betrachtet werden und somit keine sicheren Aussagen über das Ensemble getroffen werden können. Das Auftreten bestimmter Morphologien kann folglich nachgewiesen werden, jedoch nicht widerlegt.

Alle TEM-Messungen wurden von ADRIANA SOBOTA durchgeführt. Die Peptide wurden in DMSO gelöst (10 mg/mL) und 10 μ l dieser Lösung bei einem Abstand von 1 cm zur LED für eine bestimmte Zeit bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die Lösung mit MilliQ-Wasser zu einer 1 mg/mL Lösung verdünnt nach dem im Experimentaltail beschriebenen Protokoll zur Fibrillierung in Lösung und Präparation von TEM-Netzchen vorgegangen.

RGD-PCL-CKFKFQF 1 In Abb. 3.20 sind die TEM Messungen der Verbindung RGD-PCL-CKFKFQF **1** nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer bei 365 nm dargestellt. Die maximale Bestrahlungsdauer von 10 min wurde in Anlehnung an die Kinetik-Studie (Abb. 3.12) gewählt, da so die vollständige Spaltung des PCL gewährleistet ist.

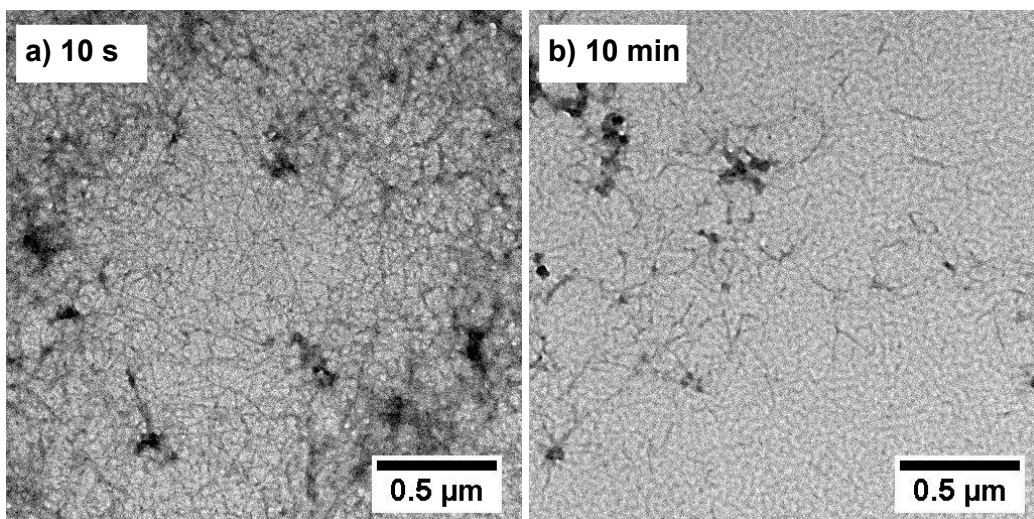


Abb. 3.20: TEM-Messungen der Verbindung RGD-PCL-CKFKFQF **1** nach a) 10 s und b) 10 min Bestrahlungsdauer bei 365 nm. Die Peptidlösungen wurden in DMSO bestrahlt und anschließend zur Fibrillierung angesetzt. Der Maßstab beträgt 500 nm.

Nach vollständiger Spaltung des PCL sind kürzere fibrilläre Strukturen neben Aggregaten in Abb. 3.20 b) zu erkennen. Das Spaltprodukt PCL*-CKFKFQF kann demnach in derselben Inkubationszeit nicht ähnlich lange Fibrillen wie beim unbestrahlten Peptid bilden. Die Fibrillierung des Peptids PCL*-CKFKFQF könnte durch den PCL* gestört werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass das terminale Cystein eine entscheidende Rolle im Fibrillierungsverhalten besitzt und ohne dieses eher Aggregate beobachtet werden.^[13] Zudem könnte das Fragment RGDG, welches sich ebenfalls nach Bestrahlung in Lösung befindet, das Fibrillierungs- und Aggregationsverhalten beeinflussen.

Bei nicht vollständiger Photoreaktion ist ein Teil der Peptide noch nicht gespalten. Es wird daher vermutet, dass es dem Umsatz entsprechend kürzere Fibrillen gibt, da sich die Selbstassemblierung statistisch auf die geringere Anzahl an Peptidmonomeren verteilt. Um dies zu überprüfen könnte eine unbestrahlte niedrig konzentrierte Peptidlösung zu Fibrillierung angesetzt werden und die resultierende Fibrillenlänge mit der für 10 Sekunden bestrahlten Probe verglichen werden. Weitere Experimente und längere Inkubationszeiten könnten einen Aufschluss über Fibrillierungskinetik von kürzeren, bestrahlten Peptidsequenzen geben. Eine genauere Untersuchung der Prozesse im Ensemble wäre über die Messung des Zirkulardichroismus (CD) der Fibrillen möglich.

CK-Phe-PCL-KFQF 3 In Abb. 3.21 sind die TEM-Messungen der Verbindung CK-Phe-PCL-KFQF 3 nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer bei 365 nm gezeigt.

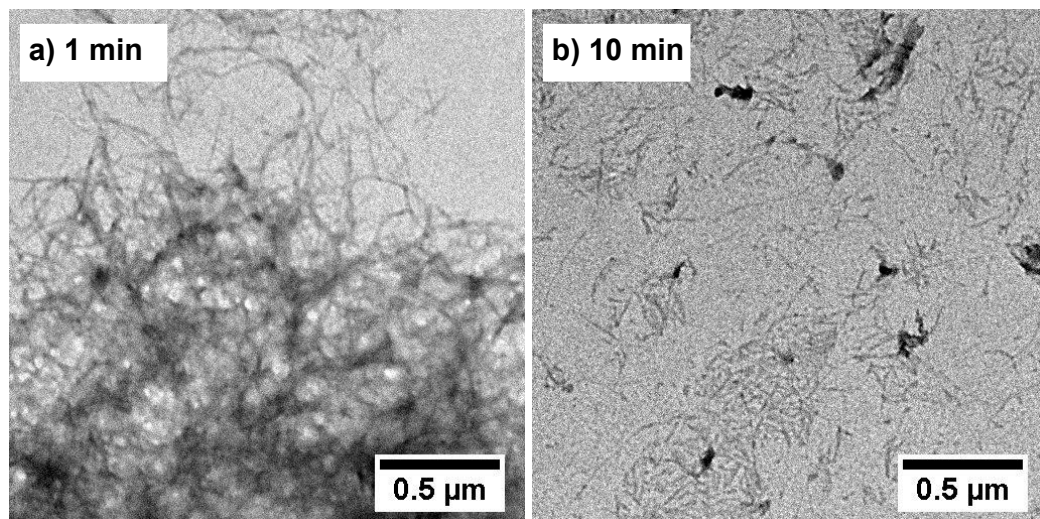


Abb. 3.21: TEM-Messungen der Verbindung CK-Phe-PCL-KFQF 3 nach einer Bestrahlung von a) 1 min und b) 10 min bei 365 nm. Die Peptidlösungen wurden in DMSO bestrahlt und anschließend zur Fibrillierung angesetzt. Der Maßstab beträgt 500 nm.

Verbindung 3 zeigt nach vollständiger Spaltung durch Bestrahlung über 10 min (Abb. 3.15) Fibrillen und Aggregate nach eintägiger Inkubation. Folglich müssen

die Spaltprodukte der Verbindung **3** eine ausreichende Länge besitzen, sodass die Fibrillierung mit den kürzeren Peptidfragmenten Phe-PCL*-KFQF noch beobachtet werden kann. Die Länge der Fibrillen nimmt qualitativ mit Bestrahlungsdauer ab, was angesichts der kürzeren Spaltprodukte plausibel ist. Zusätzlich könnte der Phe-PCL* die Fibrillierung stören. Um weiteres Verständnis über die Fibrillierungseigenschaften der gebildeten Spaltfragmente zu erhalten, könnte eine längere Inkubationsdauer nach Bestrahlung zu neuen Erkenntnissen führen.

Das Fibrillierungsverhalten kurzer und langer Spaltfragmente mit unterschiedlichen Sequenzfolgen könnte zudem die Erweiterung der Verbindung **3** mit einem Cystein am C-Terminus erfolgen. Die zeitlich verzögerte Dimerisierung des Cysteins sollte nach einer Bestrahlung zu einer Peptidsequenz mit ausreichend alternierenden hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren führen, sodass längere Fibrillenbildung zeitlich verzögert beobachtet und reversibel mittels DTT zurückgeführt werden sollte. Durch diese Untersuchung könnten zudem Erkenntnisse über die Assemblierungskinetik mit zunehmender Sequenzlänge gewonnen werden.

CKFK-PCL-FQF 4 In Abb. 3.22 sind die TEM Messungen der Verbindung CKFK-PCL-FQF **4** nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer bei 365 nm gezeigt. Die Fibrillierungseigenschaften nach Bestrahlung dieses Peptid ist im Hinblick auf die Fibrillierungseigenschaften nach Bestrahlung des strukturell ähnlichen Peptid CK-Phe-PCL-KFQF **3** sehr interessant.

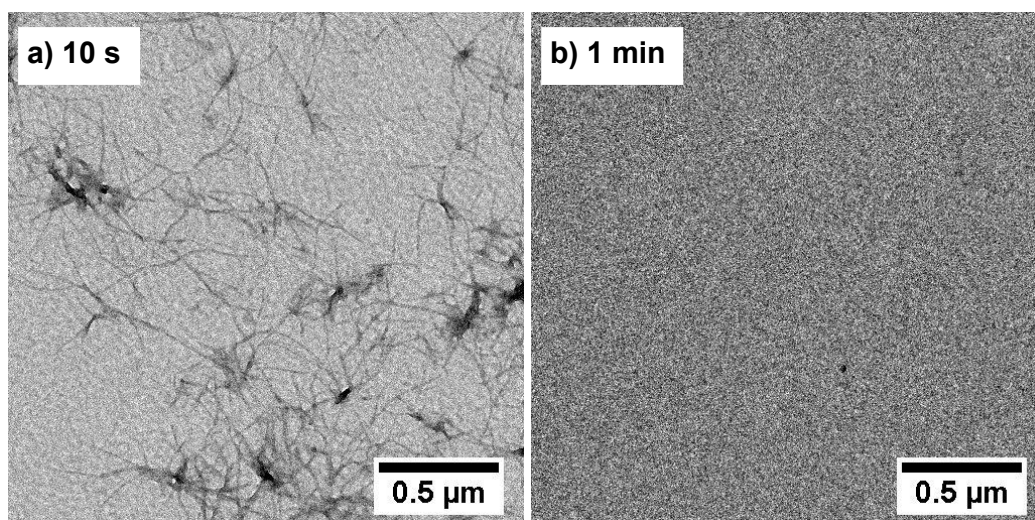


Abb. 3.22: TEM-Messungen der Verbindung CKFK-PCL-FQF **4** nach Bestrahlung bei a) 10 s und b) 1 min bei 365 nm. Die Peptidlösungen wurde in DMSO bestrahlt und anschließend zur Fibrillierung angesetzt. Der Maßstab beträgt 500 nm.

Es ist zu erkennen, dass sich bei einer Bestrahlungsdauer von 10 s noch Fibrillen in Lösung bilden können, also die Photoreaktion des PCL noch nicht vollständig stattgefunden hat. Diese Schlussfolgerung deckt sich mit den Ergebnissen aus der

HPLC-Studie (Abb. 3.10). Es werden bei den TEM Messungen bei 1 min, 10 min und 20 min Bestrahlungszeit keine Fibrillen oder Aggregate auf den gesamten TEM-Netzchen beobachtet. Es wird daher vermutet, dass bei 1 min Bestrahlungszeit ein vollständiger Umsatz der Spaltungsreaktion des PCL stattgefunden und daher keine Fibrillierung mehr zu beobachten ist. Dieses Verhalten kann darauf zurückgeführt werden, dass die Spaltprodukte PCL*-FQF und CKFKG aufgrund ihrer kurzen Länge und ihrer Sequenzfolge keine Fibrillierungseigenschaften besitzen. Im Vergleich zur Verbindung **3**, bei der auch nach langer Bestrahlungszeit Fibrillen beobachtet werden konnten, haben beide längeren Spaltprodukte CKFKG und Phe-FQF aus Verbindung **4** und Phe-PCL*-KFQF aus Verbindung **3** zwar dieselbe Anzahl an Aminosäuren, doch unterscheidet sich Phe-PCL*-KFQF wesentlich durch die anderen beiden Spaltfragmente dadurch, dass eine alternierende hydrophobe (F) und hydrophile (K und Q) Aminosäurereihenfolge, wie schematisch in Abb. 3.23 gezeigt, gegeben ist. Es ist festzuhalten, dass die Bestrahlung von Verbindung **4** zum Verlust der Fibrillierungsfähigkeit führt.

Spaltfragmente

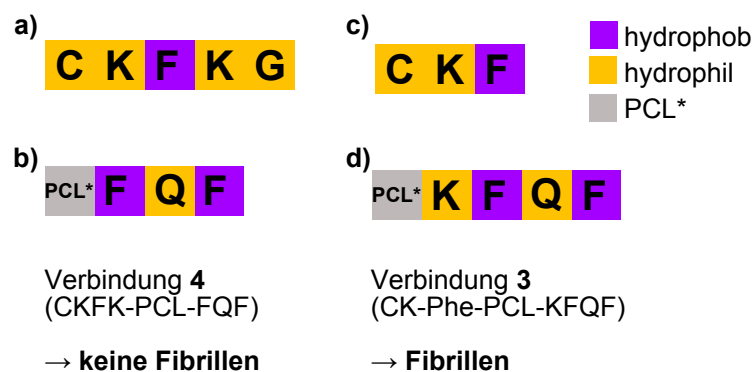


Abb. 3.23: Schematische Darstellung der Spaltfragmente von Verbindung **3** und **4** mit Kennzeichnung der Polarität. Der Einfluss des PCL* auf die Fibrillierung ist noch nicht bekannt und wird daher in der Betrachtung ausgelassen. In d) ist eine Abfolge von 4 alternierenden Aminosäuresequenzen zu erkennen, welche für die Fibrillierungseigenschaft verantwortlich ist. Es wird vermutet, dass in den anderen Fällen a)–c) die Fibrillierung ausbleibt, da diese keine hinreichende Länge an alternierenden Polaritäten haben.

Defibrillierung von 4 Um das Verhalten von bereits gebildeten Fibrillen bei Bestrahlung in Lösung zu untersuchen, wurde eine nach Standardprotokoll vorbereitete fibrillierte Lösung von Verbindung **4** über eine Zeit von 10 min bei 365 nm bestrahlt und im Anschluss mittels TEM-Messung untersucht (Abb. 3.24).

Unmittelbar nach Bestrahlung der fibrillierten Verbindung **4** in Lösung sind nicht alle Strukturen deassembliert worden. Auf dem gesamten TEM-Netzchen waren keine Fibrillen zu erkennen, dafür große Aggregate. Bemerkenswerterweise bilden diese Aggregate teilweise sphärische Strukturen aus. An der Peripherie dieser Aggregate sind diese sphärischen Strukturen besser sichtbar als in dichteren Gebieten. Die Be-

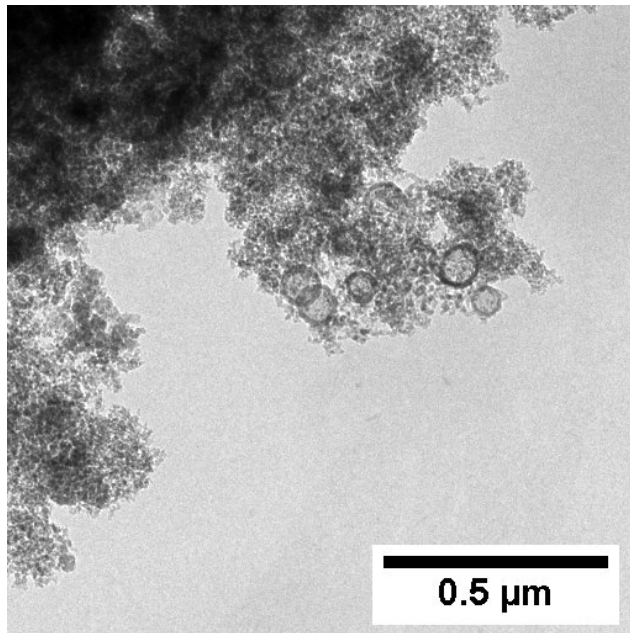


Abb. 3.24: TEM-Messung der Verbindung CKFK-PCL-FQF 4 nach Bestrahlung über 10 min in fibrilliertem Zustand in Lösung. Das TEM-Netzchen wurde unmittelbar nach der Bestrahlung vorbereitet. Der Maßstab beträgt 500 nm.

strahlung von Verbindung 4 wurde auf dieselbe Weise wiederholt und anschließend für 1 Stunde sowie einen Tag in Lösung inkubiert. Nach einer Stunde und auch nach einem Tag in Lösung waren keine Aggregate, keine Fibrillen und auch keine sphärischen Strukturen auf dem gesamten TEM-Netzchen mehr zu beobachten. Es wird daher vermutet, dass eine zeitlich verzögerte Deassemblierung der fibrillären Struktur auftritt. Diese Defibrillierung könnte über die Zwischenschritte der Bildung von Aggregaten und sphärischen Strukturen verlaufen. Möglicherweise stehen durch die Photospaltung in kürzere Peptidfragmente weniger Wasserstoffbrückenbindungen pro Peptidstrang zur intermolekularen Wechselwirkung in der Fibrille zur Verfügung. Dadurch könnte die Interaktion mit dem Lösungsmittel bevorzugt sein und zur Defibrillierung führen. Die verzögerte Deassemblierung der Fibrillen könnte aufgrund des langsamen Austauschs der Peptidstränge mit dem Lösungsmittel kinetisch gehindert sein. Diese Vermutung könnte durch Untersuchung analog aufgebauter Peptidsequenzen mit unterschiedlicher Länge gestützt werden.

Wie am Anfang des Abschnitts diskutiert, lassen sich über TEM-Messungen jedoch nicht die Abwesenheit bestimmte Strukturen nachweisen und weitere Untersuchungen, wie beispielsweise CD-Messungen zur Verfolgung der Defibrillierung und dynamische Lichtstreuungsmessungen zur Beobachtung sphärische Zwischenstufen, sind erforderlich, um diese Vermutungen zu stützen. Weitere *in situ* Messungen der Defibrillierung zur zeitlichen Verfolgung könnten in Lösung über Kleinwinkel-Röntgenstreuung oder AFM Messungen gegeben sein.^[74]

Kontrollexperiment: CKFK-NPCL-FQF 5 Als Kontrollmessung zu den Peptiden, mit photoaktiven Linkern, wurde Verbindung **5** auf die gleiche Art und Weise vor dem Fibrillierungsansatz bestrahlt und mittels TEM-Messungen analysiert. Verbindung **5** sollte sich während der Bestahlung chemisch nicht verändern und sein Fibrillierungsvermögen und die Morphologie beibehalten. In Abb. 3.25 b) ist die TEM Messung nach 10 min Bestahlungsdauer bei 365 nm in DMSO (10 mg/mL) gezeigt. Nach der Bestahlung wurde die Probe zur Fibrillierung nach üblichem Protokoll angesetzt.

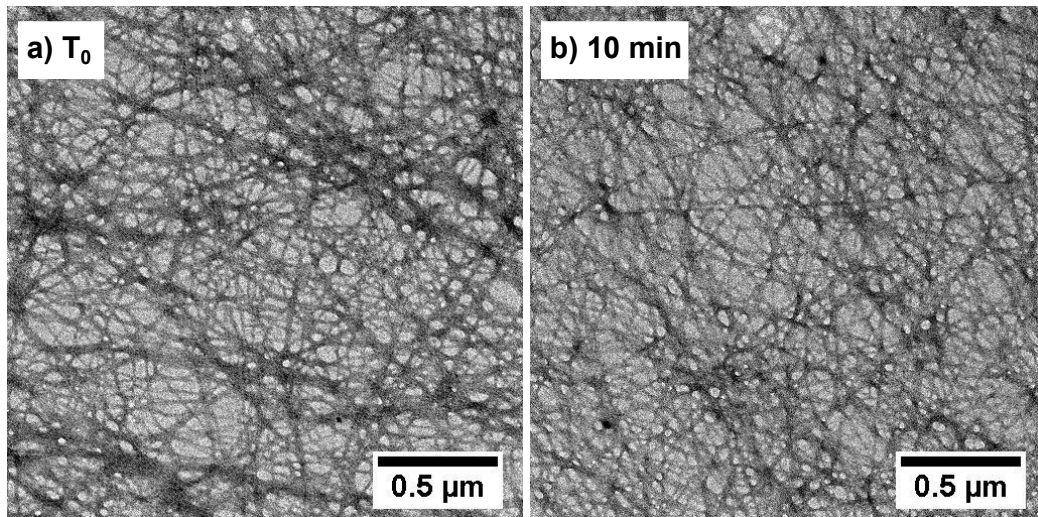


Abb. 3.25: TEM-Messungen der Verbindung CKFK-NPCL-FQF **5** a) ohne Bestahlung und b) nach 10 min Bestahlung bei 365 nm. Die Peptidlösungen wurde in DMSO bestrahlt und anschließend zur Fibrillierung angesetzt. Der Maßstab ist 500 nm.

Erwartungsgemäß sind keine Änderung der fibrilläre Strukturen im Vergleich zur unbestrahlten Probe zu erkennen. Das Peptid mit dem NPCL ist demnach stabil gegenüber Bestahlung bei 365 nm. Diese Kontrollmessung bestätigt die Beobachtungen, dass die Morphologieänderungen der Verbindungen **1**, **3** und **4** aufgrund der Reaktion des PCL bei Bestahlung auftreten. Zudem decken sich diese Beobachtungen mit den HPLC-Messungen aus Kapitel 3.2.1.

3.3 Präparation von Oberflächen

In den vorigen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Zielverbindungen **1**, **3** und **4** in Lösung gezielt mittels UV-Licht manipuliert werden können. Als weiteren Schritt zum Erreichen des Ziels eines bioaktiven Gradienten wurde die nichtkovalente Beschichtung von Oberflächen mit Verbindung CKFKFQF optimiert. Die Verbindungen **1–5** sind positiv-geladene Peptide, die zur elektrostatischen Wechselwirkung mit negativ geladenen Oberflächen wie Glas fähig sind. Da jedoch die Rasterelektronenmikroskopie (REM) und MALDI-ToF-MS Messungen nicht auf elektrisch isolierendem Glas möglich sind, werden für diese Untersuchungen und Optimierungsversuche leitfähiges und transparentes Indium-Zinn-Oxid beschichtetes Glas (ITO-Glas) verwendet.

3.3.1 Oberflächenbeschichtung

Eine möglichst homogene Oberflächenbeschichtung ist wichtig, um einheitliche Peptidkonzentrationen und damit einhergehend reproduzierbare Bestrahlungs- und Zellkulturergebnisse zu erzielen. Um eine solche auf ITO-Glas zu erreichen, wurden verschiedene Techniken zur Präparation getestet und die Verteilung der Peptide mittels REM ausgewertet. Vor jedem Beschichtungsansatz wurden die Substrate 1 min mit 100% Sauerstoff unter UV-Bestrahlung (*plasma etching*) behandelt. Die REM-Aufnahmen wurden von GUNNAR GLASSER aufgenommen.

In Abb. 3.26 ist eine REM Aufnahme der ITO-Glas Oberfläche ohne Peptidbeschichtung gezeigt. Es ist zu erkennen, dass das ITO-Glas keine ebene Oberfläche, sondern Unebenheiten in einer Größenordnung von etwa 50 - 100 nm besitzt. Diese Inhomogenität könnte Einfluss auf die Selbstassemblierung der Peptide und die Wechselwirkung mit der Oberfläche haben. Da es nicht möglich ist mit reinem Glas hohe Auflösungen mittels REM zu erzielen, wurden als Vergleichsoberflächen Siliziumplatten, mit einer Oberflächeninhomogenität unterhalb der REM Auflösung haben, verwendet.

Optimierungsversuche In diesem Abschnitt werden verschiedene Techniken, die zur Präparation homogener Oberflächen getestet wurden, zusammengefasst. Im Anhang auf Seite 102 sind Aufnahmen der Optimierungsversuche gezeigt. Für die folgenden Optimierungsversuche wurden bereits vorbereitete Fibrillenlösungen verwendet.

Die einfachste Technik ist dabei das Eintrocknen der Peptidlösung bei Atmosphäre (*Drop-Casting*). Durch diese Behandlung entstehen jedoch makroskopische Trock-

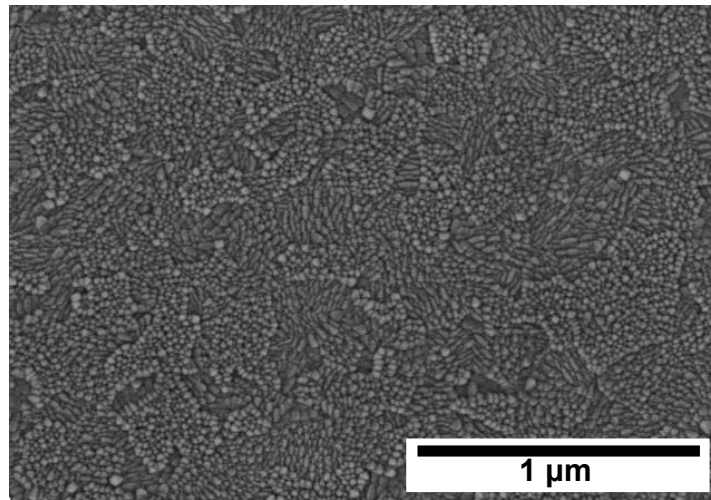


Abb. 3.26: REM-Messungen (0,1 kV) der ITO-Glas Oberfläche. Es ist die raue Oberflächenbeschaffenheit des ITO-Glases zu erkennen. Der Maßstab beträgt 1 μm .

nungsspuren und in den REM-Messungen sind Unebenheiten durch Peptidknäule (Abb. 6.1) zu erkennen. Wenn das Peptid in PBS Lösung auf die Oberfläche gegeben wurde, wurden in den REM-Messungen große Salzkristalle beobachtet (Abb. 6.1), die maßgeblich zur Heterogenität der Beschichtung beitrugen.

Über die Rotationsbeschichtung (*Spin-Coating*) konnten ebenfalls keine homogenen Oberflächen präpariert werden, da sich große Peptidansammlungen neben unbedeckten Oberflächenstellen gebildet haben. Durch die Nutzung von Rotationstellern kommt es auf der rauen ITO-Glasoberfläche zu keiner homogenen Beschichtung, während auf der Siliziumplatten bessere Ergebnisse erzielt werden konnten (Abb. 6.1). Diese unterschiedlichen Ergebnisse bei derselben Präparationstechnik werden auf die Interaktion der Oberflächenrauigkeit mit den Fibrillen zurückgeführt.

Atmosphärenkammer Möglichst homogene Oberflächen nichtkovalent gebundener Peptide konnten durch das Inkubieren der Peptidlösung auf ITO-Glas in einer Atmosphärenkammer präpariert werden (Abb. 3.27). Dazu wurde die Peptidlösung einen Tag lang auf dem ITO-Glas in einer gesättigten wässrigen Atmosphäre unmittelbar nach dem Fibrillierungsansatz inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die überschüssige Peptidlösung durch Druckluft getrocknet, sodass keine makroskopischen Trocknungsspuren zu erkennen waren.

Durch dieses Vorgehen können die Peptide sich homogen und dicht auf der Oberfläche anordnen. Zur Kontrolle wurde diese Beschichtungsmethode erfolgreich auch auf einer Siliziumplatte wiederholt (siehe Seite 102).

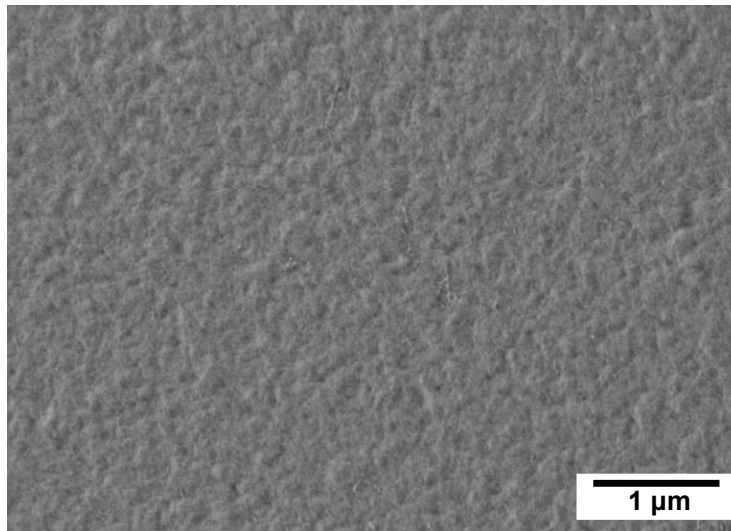


Abb. 3.27: REM-Messung (0,1 kV) der ITO-Glas Oberfläche mit Peptidbeschichtung. Die Präparation erfolgte durch das Inkubieren von CKFKFQF in mit Wasser gesättigter Atmosphäre auf ITO-Glas. Der Maßstab beträgt 1 µm.

Agarose Bei Oberflächenbeschichtungen, die eine spezifische Funktion wie beispielsweise Zelladhäsion, erfüllen sollen, muss darauf geachtet werden, dass von der unbeschichteten Oberfläche keine unspezifische Aktivität ausgeht. Eine unspezifische Aktivität könnte beispielsweise gute Zelladhäsion auf unbeschichtetem, peptidfreiem ITO-Glas oder Glas sein. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden für bei kovalent gebundenen Oberflächenfunktionalisierungen auf Glas typischerweise im Vorfeld PEG-Beschichtungen vorbereitet. Da diese Methode stark abweisend gegenüber Peptiden ist, kann dies nicht für die nichtkovalente Beschichtungsmethode genutzt werden. Daher wurde ein dünner Agarosefilm auf ITO-Glas als biologisch inerte Oberflächenbeschichtung genutzt. Diese Beschichtung verhindert die Zelladhäsion und kann leicht durch schnelles Rakeln einer heißen 1% wässrigen Agaroselösung erzielt werden. Makroskopisch wirkt diese Beschichtungsart homogen und eben. Eine genaue Untersuchung der Agarosefilmdicke und Homogenität konnte aus Zeitgründen nicht stattfinden.

3.3.2 Beständigkeit der Peptidbeschichtung

Für die Anwendung der Peptide RGD-PCL-CKFKFQF **1** und CKFK-PCL-FQF **4** als Oberflächenbeschichtung mit gradueller Bioaktivität ist eine hohe Beständigkeit der Beschichtung in wässriger Lösung vorteilhaft. Das durch Bestrahlung entstandene kurze Spaltfragment RGDG von Verbindung **1** hingegen sollte schnell in Lösung gehen und nicht auf der Oberfläche haften. Für die Beständigkeitsversuche wurde aufgrund von Materialknappheit Verbindung RGD-NPCL-CKFKFQF **2** verwendet, die sich in ihrem Beschichtungsverhalten auf der Oberfläche jedoch nicht von den übrigen Zielverbindungen unterscheiden sollte. Um zu bestimmen, inwiefern Peptidfibrillen der Verbindung **2** auf ITO-Glas und auf Agarose beschichtetem ITO-Glas in wässriger Umgebung beständig sind, wurden Tauchexperimente bei pH 3 und pH 7 in MilliQ Wasser für verschiedene Zeitspannen und anschließend REM-Messungen durchgeführt. Die Peptidbeschichtungen wurden nach dem Standardprotokoll im Experimentalteil hergestellt.

Beschichtete Substrate wurden für jeweils 1 min und 1 Stunde bei pH 3 und pH 7 in einer Tauchlösung aus MilliQ Wasser inkubiert. Ein mit Agarose beschichtetes Substrat wurde über 10 min bei pH 7 inkubiert. Im Anschluss wurden die Oberflächen mit Druckluft getrocknet. In Abbildungen Abb. 3.28 a)–e) sind die REM-Aufnahmen dieser Substrate nach den Tauchvorgängen gezeigt.

Nach 1 h auf ITO-Glas bleiben bei pH 7 die Fibrillen auf der Oberfläche haften, während bei pH 3 nach 1 h Inkubation keine Fibrillen auf der Oberfläche verblieben sind. Auch auf Agarose beschichtetem ITO-Glas ist das Peptid bei pH 7 nach einer Inkubationszeit von 10 min beständig. Wahrscheinlich wird im saurem Milieu die Seitenkette des Lysins im Peptid protoniert, wodurch die Löslichkeit des Peptids in Wasser erhöht wird. Dies könnte zum Ablösen der Fibrille von der Oberfläche führen. Die Peptidbeschichtung ist demnach bei neutralem pH in Wasser mindestens eine Stunde lang beständig.

Quantitative Untersuchungen der Beschichtungsbeständigkeit könnten über Zeta-Potential Messungen ermittelt werden. Dabei würde das Ablösen der Fibrille anhand von Veränderung der Oberflächengesamtladung zu erkennen sein. Anhand dieser Methode könnte auch das selektive Herauslösen des Spaltprodukts RGDG von der bestrahlten Verbindung **1** ermittelt werden.

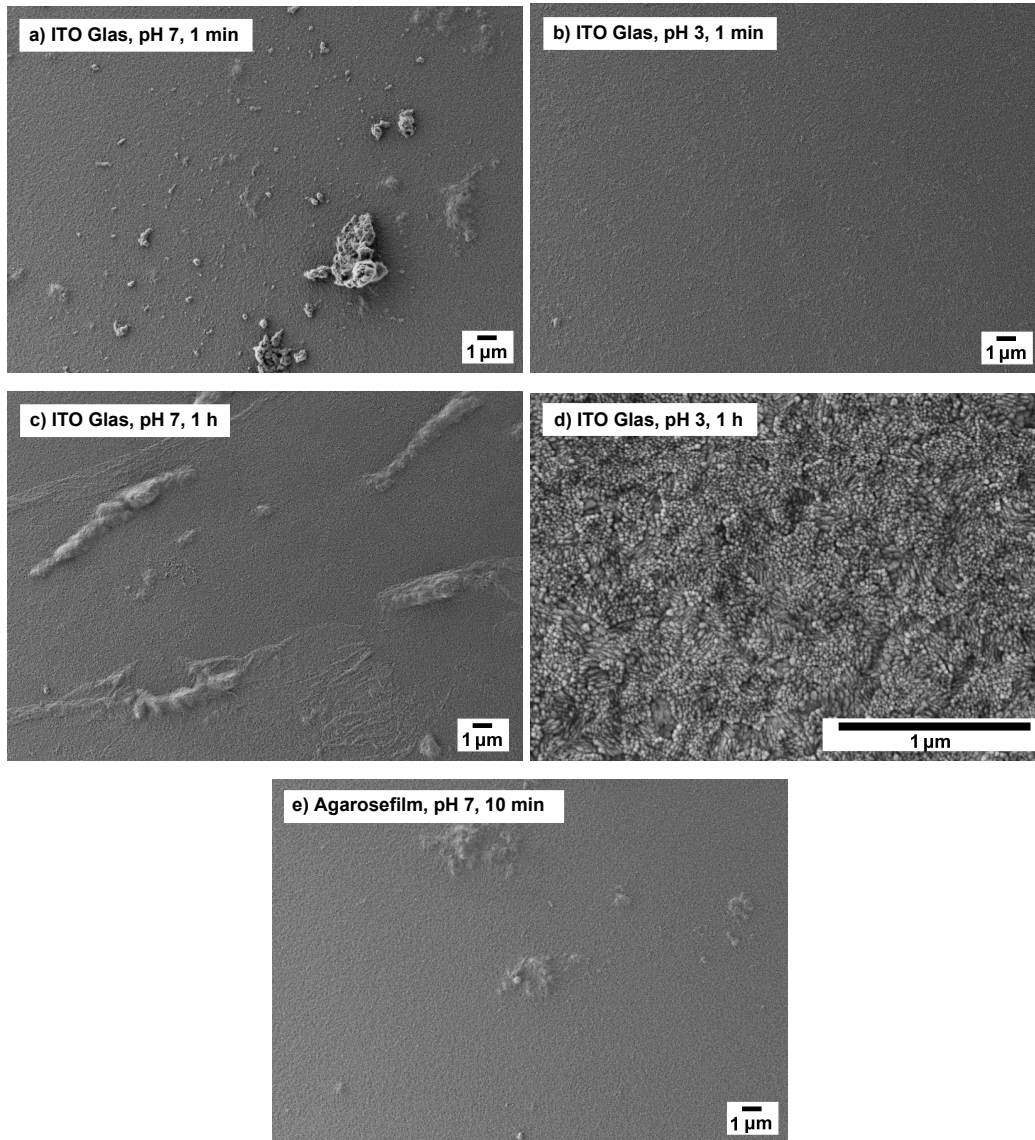


Abb. 3.28: REM-Messungen (0,1 kV) des mit Peptid 2 beschichteten ITO-Glas nach Inkubation in MilliQ Wasser unter verschiedenen Bedingungen: a) pH 7, 1 min, b) pH 3, 1 min, c) pH 7, 1 Stunde, d) pH 3, 1 Stunde, Messung bei 0,7 kV und e) Peptid beschichtet auf dünnem Agarosefilm mit anschließender Inkubation über 10 min in MilliQ Wasser bei pH 7. Der Maßstab beträgt 1 μm .

3.4 Bestrahlungsexperimente auf Oberflächen

In Kapitel 3.2 wurde bereits gezeigt, dass die UV-Bestrahlung der Zielverbindungen mit PCL zu kurzen Spaltprodukten führt. Da sich jedoch die Kinetik und die Morphologieänderung der Peptidfibrillen bei der Bestrahlung auf einer Oberfläche wesentlich von der Bestrahlung in Lösung unterscheiden könnte, wurden die Peptide **1** und **4** nach der Beschichtung einer Oberfläche bestrahlt.

Die Bestrahlungsexperimente auf Oberfläche konzentrieren sich zum einen auf die Defibrillierung von Verbindung **4**, zum anderen auf die Erzeugung eines Gradienten von Verbindung **1**.

3.4.1 Defibrillierung von Verbindung **4**

Es wurde in Kapitel 3.2.2 bereits gezeigt, dass die Bestrahlung von **4** zu kurzen Spaltprodukten führt, die keine Fibrillen bilden. Für eine künftige Anwendung von **4** als Fibrillengradient auf einer Oberfläche ist es notwendig die Defibrillierung von bereits gebildeten Fibrillen durch Bestrahlung auf einer Oberfläche zu untersuchen. Dabei ist es wichtig die Defibrillierung der bestrahlten Peptide selektiv von unbestrahlten Peptiden auf derselben Oberfläche zu erreichen. Es wird anhand der Beobachtungen in Kapitel 3.2.2 vermutet, dass einzelnen Spaltprodukte der Verbindung **4** auch nach der Bestrahlung kinetisch durch Wasserstoffbrückenbindungen in der amyloidalen Struktur stabilisiert sein werden. Die Stabilisierung in der fibrillären Struktur ist dabei umso höher, umso mehr intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen pro Peptidstrang vorhanden sind. Über diese kinetische Hinderung wird versucht einen Zugang zur selektiven Defibrillierung bestrahlter, kurzkettiger Peptide zu finden. Um die Deassemblierung einzuleiten, müsste die Fibrille nach der Bestrahlung die Möglichkeit haben in Austausch mit einem Lösungsmittel zu sein. Dies könnte beispielsweise durch das kurzzeitige Inkubieren der bestrahlten Fibrille in einem geeigneten Medium geschehen.

Für die Untersuchung der Defibrillierung wurde Verbindung **4** nach Standardprotokoll fibrilliert und auf einem TEM-Netzchen vorbereitet. Bevor die Probe mit Uranylacetat behandelt wurde, wurde das TEM-Netzchen 10 min lang bestrahlt und anschließend mit dem jeweiligen Lösungsmittel ($6\ \mu\text{l}$) inkubiert. Mit Kontrollproben der Verbindung **4** ohne Bestrahlung, die somit keine Defibrillierung zeigen sollten, wurde analog verfahren.

In MilliQ Wasser bei pH 7 mit 10% Vol. DMSO sind auch nach 5 min Inkubieren Fibrillen zu beobachten (Abb. 3.29 e)). Es wird vermutet, dass der Lösungsmittelaustausch

des Peptids in Wasser in dem betrachteten Zeitraum nicht die fibrilläre Struktur der bestrahlten Probe stark genug destabilisiert. MilliQ Wasser bei pH 3 könnte durch das Protonieren der Seitenketten des Lysins im Peptid zu einer Defibrillierung führen. Dieses Medium wurde nicht getestet, da aus vorherigen Versuchen (Abschnitt 3.3.2) bekannt ist, dass sich das Peptid in diesem Milieu von der Oberfläche löst.

Eine erfolgreiche und gezielte Defibrillierung konnte bei der Inkubation in DMSO nach der Bestrahlung der Fibrillen erreicht werden (Abb. 3.29 a)–d)) Beim Vergleich zwischen bestrahlter Probe b) und d) und unbestrahlter Probe a) und c) ist deutlich zu erkennen, dass die bestrahlte Probe nach Inkubation in DMSO keine fibrilläre Struktur mehr zeigt, sondern Aggregate bildet. Bei der unbestrahlten Probe hingegen bleiben fibrilläre Strukturen bis zu einer getesteten Inkubationsdauer von 10 min erhalten. Bei längerer Inkubationszeit sind jedoch auch bei der unbestrahlten Probe kürzere Fibrillen zu erkennen.

Diese Beobachtungen entsprechen der Erwartung und decken sich mit dem Erklärungsansatz, dass DMSO als hochpolares Lösungsmittel die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen schwächt und damit die supramolekulare Assemblierung der amyloidalen Fibrille stört, was zu einer Morphologieänderung führt.^[75] Es lässt sich aus den Messungen schließen, dass die Defibrillierung bei einem längeren Peptid (unbestrahlte Probe) langsamer verläuft verglichen mit einem kurzen Peptid (bestrahlte Probe), da hier mehr Wasserstoffbrückenbindungen pro Peptidstrang ausgebildet werden können. Mit längerer Inkubationszeit in DMSO werden die Fibrillen bei dem unbestrahlten Peptids kürzer. Es kann daher von einem stufenweise verlaufenden Defibrillierungsprozess ausgegangen werden.

Die bestrahlte Probe hat nach einer Minute Inkubation in DMSO keine Fibrillen gezeigt. Hier findet eine teilweise Umstrukturierung zu Aggregaten statt. Da verhältnismäßig eine geringe Anzahl von Aggregaten auf dem TEM-Netzchen zu beobachten werden konnten, kann vermutet werden, dass eine vollständige Deassemblierung ebenfalls stattfindet. Diese Vermutung könnte durch CD-Messungen überprüft werden. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass eine Ausrichtung der Fibrillen auf dem TEM-Netzchen durch Aufsaugen von DMSO nach der Inkubation möglich war. Eine selektive Morphologieänderung von bestrahlten Fibrillen unter Erhalt der unbestrahlten Fibrillen ist auf einem TEM-Netzchen ist demnach möglich. Es ist jedoch noch nicht geklärt, welchen Effekt die Behandlung einer beschichteten ITO-Glas- oder Glasoberfläche mit DMSO auf die elektrostatische Wechselwirkung der Peptide hat. Mildere Bedingungen zur Defibrillierung könnte über die Inkubation in MilliQ Wasser mit 10 Vol.% DMSO bei pH 7 gegeben sein. In Kapitel 3.2.2 wurde die Defibrillierung bestrahlter Peptide in diesem Medium bei einer Stunde Inkubation bereits gezeigt und müsste in Oberflächenversuchen wiederholt werden.

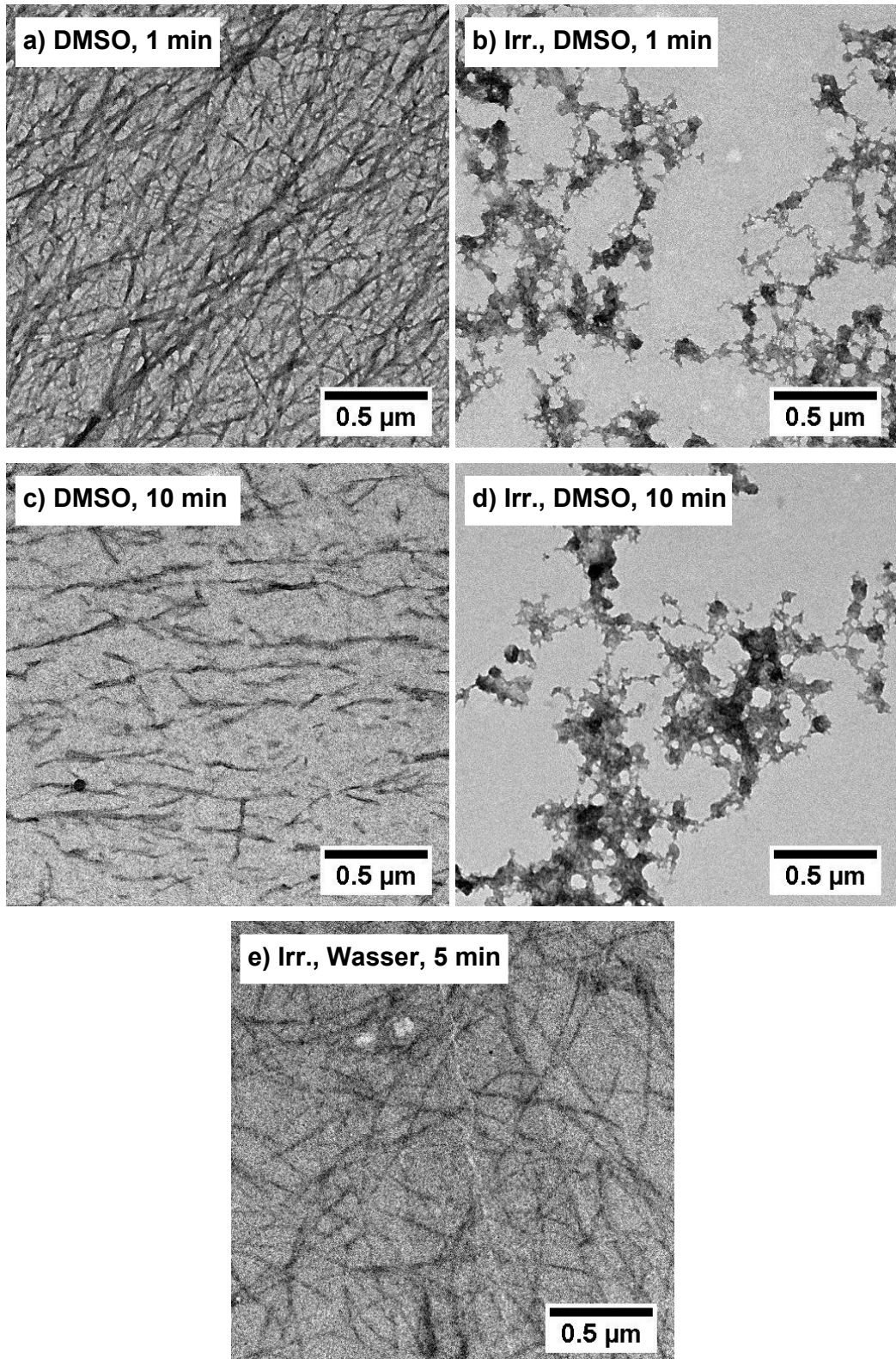


Abb. 3.29: TEM-Messungen von unbestrahlten und bestrahlten (Irr.) CKFK-PCL-FQF 4 Fibrillen auf TEM-Netzchen mit anschließender Inkubation in DMSO oder MilliQ Wasser: a) 1 min in DMSO, b) Bestrahlt, 1 min in DMSO, c) 10 min in DMSO, d) Bestrahlt, 10 min in DMSO, e) Bestrahlt und 5 min in MilliQ Wasser mit 10% DMSO, pH 7. Die bestrahlten Proben wurden 10 min bei 365 nm und 2 cm Abstand behandelt. Der Maßstab beträgt 500 nm.

3.4.2 Gradient von Verbindung 1

In Kapitel 3.2 wurde bereits gezeigt, dass die Photospaltung von Verbindung 1 gezielt möglich ist. Durch graduelle Bestrahlung auf einer mit Verbindung 1 beschichteten ITO-Glasoberfläche sollten demnach gezielt Spaltfragmente durch die Dauer der Bestrahlung erzeugt werden können. Die graduelle Bestrahlung wurde über MALDI-Imaging untersucht, um eine räumliche Auflösung der Molekülmassenverteilung auf der Oberflächen zu erhalten.

MALDI-ToF-MS Bevor die mit Verbindung 1 beschichtete Oberfläche graduell bestrahlt wurde, wurden erst die optimalen Bestrahlungsbedingungen auf einer ITO-Glasoberfläche ermittelt.

Dazu wurde eine ITO-Glasoberfläche mit Verbindung 1 nach Standardprotokoll beschichtet und verschiedene Stellen anschließend jeweils für 10 s, 1 min, 10 min, 30 min und 60 min bei 365 nm und 2 cm Abstand bestrahlt. Die Proben wurden mittels MALDI-ToF-MS analysiert, um die Abspaltkinetik auf dieser Oberfläche zu ermitteln. Die MALDI-ToF-MS Messung auf ITO-Glas wurde von HANS-JOACHIM RÄDER durchgeführt. Das Ergebnis der MALDI-ToF-MS Messungen von diesem Experiment ist in Abb. 3.30 zusammengefasst.

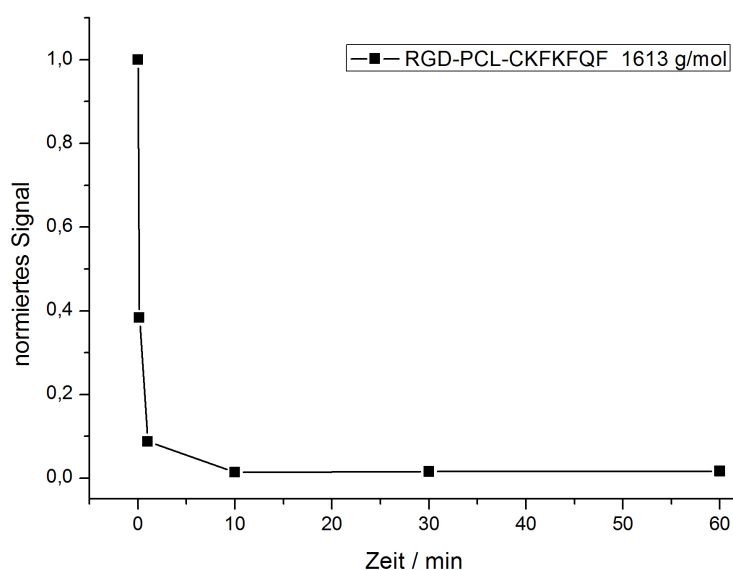


Abb. 3.30: MALDI-ToF-MS Messung: Normiertes Signal des Peptids 1 ($m/z = 1613$ Da) auf ITO-Glas aufgetragen gegen die Bestrahlungszeit.

Aussagen über den Umsatz der Photoreaktion durch das Auftragen der MALDI-ToF-MS Intensität für die Ausgangsverbindung 1 abhängig von der Bestrahlungsdauer können lediglich qualitative Informationen geben, da diese Messgröße stark von der Matrixumgebung und der Peptidkonzentration abhängt. Es können daher keine Fehler für die Messpunkte angegeben werden und auch keine Halbwertszeit, da nicht

genügend Daten vorliegen. Bei der Messung wurden die gleiche Anzahl gleich starker Laserpulse verwendet. Unter Beachtung dieser Einschränkungen ist zu erkennen, dass die photoinitierte Reaktion des Peptids auch auf der ITO-Glas Oberfläche innerhalb einer Bestrahlungsdauer von 10 min vollständig abgelaufen ist.

MALDI-Imaging Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass innerhalb einer Bestrahlungsdauer von 10 min die Photospaltung des Peptids **1** auf ITO-Glas Oberfläche vollständig ist. Über MALDI-Imaging Messungen kann eine räumliche Auflösung der Massenintensität von Verbindung **1** und seiner Spaltprodukte in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer ermittelt werden. Die MALDI-Imaging Messungen wurden in Kollaboration mit HANS-JOACHIM RÄDER und FRANZ JOSEF MAYER durchgeführt. Im Folgenden werden die Optimierungen der Messmethode und Probenpräparation auf ITO-Glas erläutert. Die zu den Optimierungsschritten gehörigen Abbildungen befinden sich im Anhang (S. 105 ff).

Die Proben wurden nach dem Standardprotkoll auf ITO-Glas präpariert und anschließend mit einer 365 nm LED im Abstand von 2 cm bestrahlt. Alle Proben wurden nach der Bestrahlung mit einer Matrix-Lösung (10 mg/mL HCCA in 70% Vol. ACN/ 30% Vol. H₂O mit 0.1% Vol. TFA) in einer automatischen Sprühanlage behandelt. Die Spektren wurden von FRANZ JOSEF MAYER mittels der Software *FlexImaging* (Bruker) ausgewertet und auf den *Total Ion Count* (TIC) normierten Intensitäten für ausgewählte *m/z* (**1**: 1613 Da, Fragment: 404 Da) grafisch über einen Farbgradienten dargestellt. Die Messungen wurden, falls nicht anders vermerkt, mit jeweils 4000 Laserpulsen bei 30% der Laserleistung und Rasterschritten von 100 μ m durchgeführt. Nach jedem einzelnen Laserpuls wurde ein MALDI-ToF-Spektrum aufgenommen, dessen Intensitäten für den Messpunkt in einem Raster zusammengerechnet wurden.

Das Fragmentsignal bei 404 Da trat in der MALDI-ToF-MS Messung auch bei nicht bestrahlter Probe auf. Dies kann auf die Photospaltung des Peptids durch den MALDI-Laser zurückgeführt werden, da dieser eine Wellenlänge von 355 nm besitzt. Des Weiteren könnte die Fragmentierung durch das Ablichten der Probe durch einen Scanner in der Vorbereitung ausgelöst worden sein. Aus diesem Grund sind die nachfolgenden Ergebnisse qualitativer Natur, in denen die Zunahme des Fragment-Signals durch Bestrahlung und die Abnahme des Ausgangspeptids gezeigt werden sollen.

Ein Problem bei der Verwendung von MALDI-Imaging ist, dass das Signal des Ausgangspeptids bei 1613 Da stark unterdrückt wird und im Gegensatz zum Fragment bei 404 Da schlecht ionisiert und damit mit einer schwachen Intensität detektiert wird. Die Intensität kann unter einem Schwellwert grafisch nur noch schlecht darge-

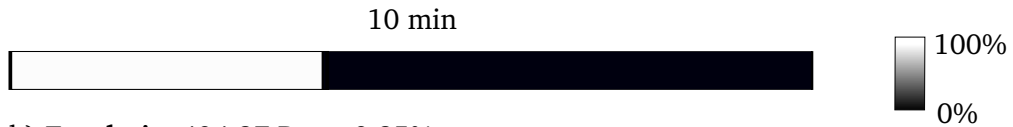
stellt werden. Daher wurde für die Darstellung des Ausgangspeptids der Farbgradienten auf eine Intensität von 30% normiert.

Optimierung der Abdeckung Wenn nicht anders vermerkt wurden die Oberflächenbeschichtung für die MALDI-Imaging Messung nach Standardprotokoll hergestellt. In den ersten Messversuchen wurden die Peptid beschichteten Oberflächen mittels einer Photomaske, die aus einer bedruckten PET-Folie bestand, abgedeckt. Diese Methode hatte sich bereits in der Literatur bewährt.^[52] Die PET Folie zeigte bei 365 nm eine hohe Transmission an den wenig bedruckten und geringe Transmission an den stark bedruckten Stellen (Abb.6.2). In den MALDI-Imaging Messungen Abb. 6.4 und Abb. 6.5 im Anhang ab Seite 105 sind an den Stellen besonders intensive Signale zu erkennen, an denen durch die Präparation Inhomogenitäten entstanden sind (Trocknungsringe). Die erwartete Tendenz in den Signalintensitäten ist jedoch in groben Zügen bereits bei diesen Proben zu erkennen. Die bedruckten PET-Folie zeigt jedoch nicht die gewünschte Trennschärfe (siehe linke Probe in Abb. 6.4). Es wird vermutet, dass Lücken im Aufdruck an diesen Stellen keine vollständige Absorption der UV-Strahlung gewährleisten.

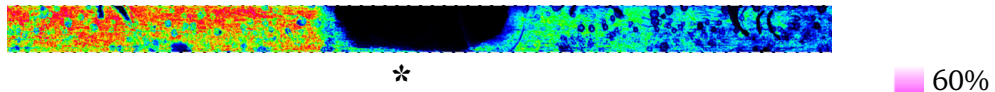
Als alternative Abdeckung wurde Aluminiumfolie genutzt (Abb. 6.6). Dabei wurde jeweils die Hälfte einer Probe mit Aluminiumfolie eingewickelt, die andere Hälfte unbedeckt gelassen und bestrahlt. Die Präparation und Messparameter sind analog zu der vorigen Messung. Hier wurde ebenfalls keine gute Trennschärfe erreicht. Dies wird auf die Eigenschaft der Aluminiumfolie UV-Lichts zu streuen zurückgeführt. Zudem ist die Fläche der Probe klein und damit fallen etwaige Streueffekte an der Glasoberfläche und Aluminiumfolie stärker ins Gewicht.

Eine klare Bestrahlungsgrenze zwischen unbestrahlten und bestrahlten Stellen konnte bei Abdeckung mit dicker Pappe, die einseitig mit Gewebeklebeband verstärkt wurde, beobachtet werden. Diese Probe wurde auf einer größeren Oberfläche (Objektträger) präpariert. Eine sparsame Beschichtung mit wenig Peptidmaterial wurde durch Rakeln von 30 μ l der vorbereiteten Peptidlösung mittels eines Drigalskispatels zu einem dünnem Film erreicht. Die Probe wurde anschließend in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre über Nacht inkubiert und anschließend mittels Druckluft getrocknet. Die rechte Hälfte wurde abgedeckt und die Probe 10 min lang bestrahlt. In Abb. 3.31 ist eine klare Grenze zwischen bestrahlter und unbestrahlter Probe zu erkennen. Ein Teil der Probe wurde bei der Präparation der Matrixbeschichtung beschädigt und konnte daher nicht gemessen werden. Aus diesem Grund wurde die Messung dieser Probe an einer anderen Position wiederholt (Abb. 3.31).

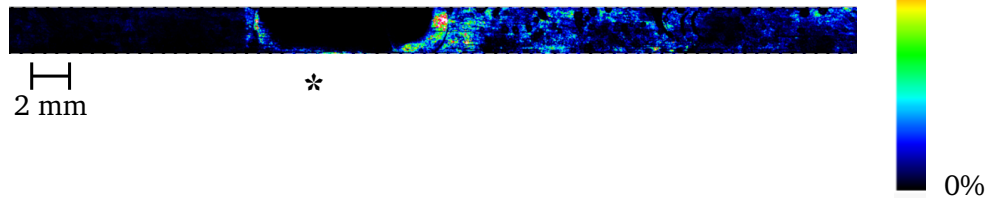
a) Bestrahlungsintensität



b) Ergebnis: 404.27 Da \pm 0.25%



c) Ergebnis: 1613.91 Da \pm 0.25%



d) Ergebnis: 1613.91 Da \pm 0.25%, nach einem Monat

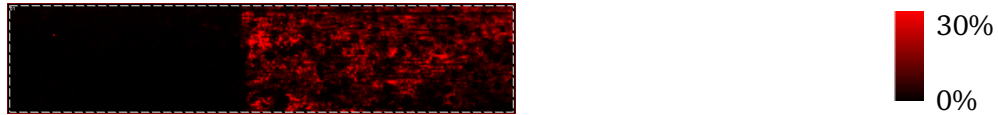


Abb. 3.31: MALDI-Imaging Messung:

a) Die rechte Hälfte der Proben wurde mit einer dicken Pappe bedeckt, die linke Hälfte unbedeckt und für 10 min bestrahlt.

b) In der Regenbogenfarbverteilung ist die Intensität des Abspaltfragments RGDG bei 404 Da gezeigt.

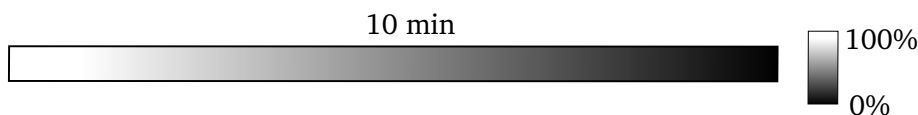
* Der dunkle Bereich in der Abbildung ist auf einen Präparationsfehler beim Auftragen der Matrix zurückzuführen. An dieser Stelle wurde Probe und Matrix abgetragen weshalb dort keine Messung möglich war.

c) In der Regenbogenfarbverteilung ist die Intensität des Ausgangspeptids 1 bei 1613 Da gezeigt.

d) In der roten Farbskalierung ist die Intensität des Ausgangspeptids 1 bei 1613 Da gezeigt, die einen Monat später an einer anderen Position derselben Probe gemessen wurde, die keinen Präparationsfehler aufwies. Es ist eine klare Bestrahlungsgrenze zu erkennen.

Graduelle Bestrahlung Graduelle Bestrahlung wurde mittels einer Spritzenpumpe erreicht, die eine Abdeckung aus Pappe gleichmäßig über der Oberfläche durch Wegschieben abdeckt während die Probe bestrahlt wird. Die 6 cm lange Probe wurde dabei innerhalb von 10 min abgedeckt. Um Inhomogenitäten durch die Präparation nach Standardprotokoll oder Rakeln auszuschließen, wurde das Peptid dieses Mal mit Hilfe einer Sprühanlage auf die ITO-Oberfläche verteilt. Dabei wurden 2.5 mL einer 0.016 mg / mL auf eine etwa 9 cm² große Fläche gesprüht. In Abb. 3.32 ist das Ergebnis dieser MALDI-Imaging-Messungen zu sehen. Eine graduelle Abnahme der Intensität des Ausgangsmaterials **1** und eine graduelle Zunahme des Abspaltfragments sind klar zu erkennen. Die Ergebnisse konnten durch Messung an verschiedenen Positionen der Probe reproduziert werden (Abb. 6.7). Eine beispielhafte Darstellung der MALDI-ToF-MS Spektren hinter den Farbgradienten ist in Abb. 6.8 im Anhang auf Seite 109 dargestellt.

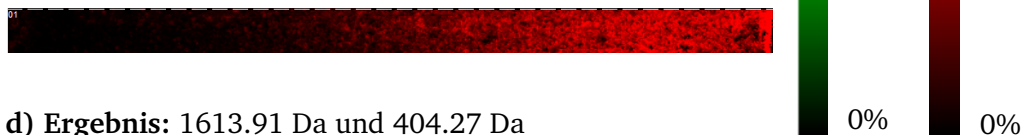
a) Bestrahlungsintensität



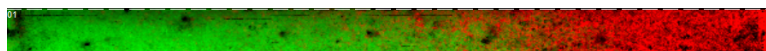
b) Ergebnis: 404.27 Da ± 0.25%



c) Ergebnis: 1613.91 Da ± 0.25%



d) Ergebnis: 1613.91 Da und 404.27 Da



5 mm

Abb. 3.32: MALDI-Imaging Messung:

- a) Von links nach rechts wurde die Abdeckung aus Pappe über 10 min entfernt. Dabei wurde der erste Abschnitt (ca. 0,5 cm) 5 min länger bestrahlt als die restliche Probe und der rechte äußere Abschnitt (ca. 0,5 cm) nicht bestrahlt.
- b) In grüner Farbskalierung ist die Intensität des Abspaltfragments RGDG bei 404 Dal gezeigt.
- c) In roter Farbskalierung ist die Intensität des Ausgangspeptids **1** bei 1613 Da gezeigt.
- d) Abspaltfragment RGDG bei 404 Da und Ausgangspeptid **1** bei 1613 Da in einem Bild zusammengelegt.

In den Abb. 3.33 sind die Intensitäten der Farbgradienten aus Abb. 3.32 gegen Position in x -Richtung mit der Software *ImageJ* über die *Plot Profile* Funktion aufgetragen. In dieser Darstellung kann die gegenläufige Abnahme des Ausgangspeptids und die Zunahme des Fragmentes klar erkannt werden. Das Rauschen der Signale kann zum einen auf eine inhomogen beschichtete Oberfläche mit schwankenden Peptidkonzentrationen und zum anderen auf unterschiedliche Desorption des Peptids zurückgeführt werden.

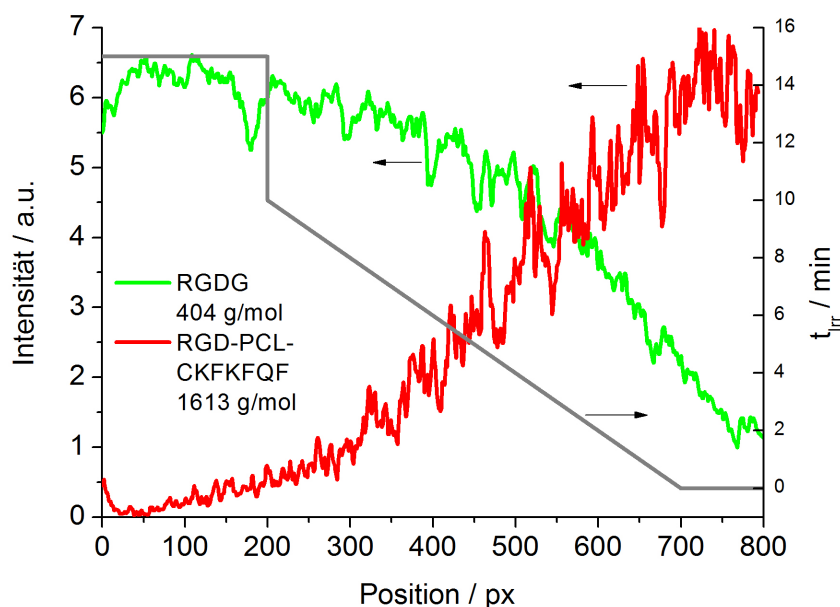


Abb. 3.33: Plot des Profils aus Abb. 3.32. Die Intensitätswerte von Peptid 1 (rot) und Fragment RGDG (grün) wurden gegen die Position in x -Richtung aufgetragen. In grauer Farbe ist der Bestrahlungsgradient über die Zeit (rechte Achse) gezeigt.

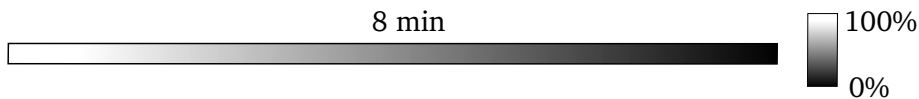
Zusammenfassend konnte ein Gradient der bioaktiven Sequenz RGD von Verbindung 1 auf einer ITO-Glasoberfläche hergestellt werden.

3.4.3 Gradient von Verbindung 4

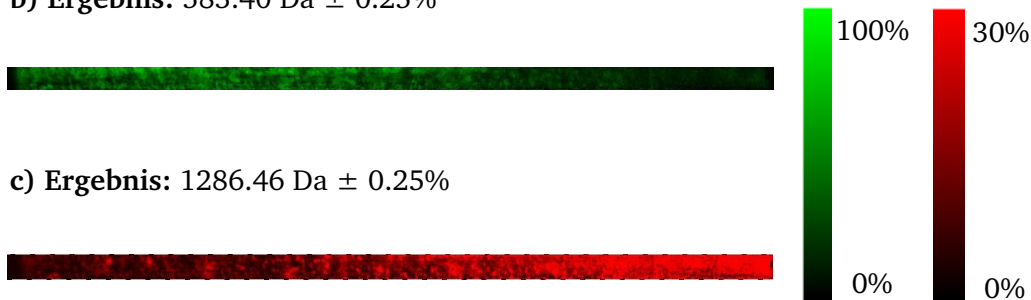
In Abschnitt 3.4.1 ist gezeigt worden, dass gezielte Defibrillierung durch die Bestrahlung der fibrillären Verbindung 4 möglich ist. Im Folgenden soll Verbindung 4 analog zu 1 graduell auf einer Oberfläche gespalten werden. Dazu wurde in diesem Versuch zur Beschichtung der Peptidlösung das Standardprotokoll genutzt und nicht aufgesprüht. Alle weiteren Parameter der Vorbereitung und Messung blieben bis auf die Nutzung der Verbindung 4 und die Bestrahlung über 8 statt 10 min gleich. Die Ergebnisse der MALDI-Imaging-Messung der graduell bestrahlten fibrillären Oberfläche sind in Abb. 3.34 zusammengefasst.

Demnach ist für Verbindung 4 auch in fibrillärem Zustand die graduelle Photospaltung durch Bestrahlung möglich. Im Vergleich zu Abb. 3.32 sind hier jedoch

a) Bestrahlungsintensität



b) Ergebnis: 583.40 Da \pm 0.25%



c) Ergebnis: 1286.46 Da \pm 0.25%



5 mm

Abb. 3.34: MALDI-Imaging Messung:

- Von links nach rechts wurde die Abdeckung aus Pappe über 8 min entfernt. Dabei wurde der erste Abschnitt (ca. 0,5 cm) 5 min länger bestrahlt als die restliche Probe und der rechte äußere Abschnitt (ca. 0,5 cm) nicht bestrahlt.
- In grüner Farbskalierung ist die Intensität des Spaltfragments CKFKG bei 583 Da gezeigt.
- In roter Farbskalierung ist die Intensität des Ausgangspeptids 4 bei 1286 Da gezeigt.

größere Inhomogenitäten im Farbgradienten zu erkennen, was auf eine inhomogenere Verteilung der Peptide auf der Oberfläche oder der Matrix hindeuten kann. Da die Vorbereitung der Matrix analog zu der vorigen Messung erfolgte, wird die Unregelmäßigkeit in der Messintensität auf die Präparationsmethode zurückgeführt. Zudem wurden bei dieser Messung intensive Signale des dimerisierten Ausgangspeptids und des dimerisierten Spaltfragments (CKFKG)₂ detektiert (Abb. 6.9 auf Seite 110). Das Profil des Farbgradienten der monomeren Verbindung entlang der *x*-Achse (Abb. 3.35) ist mittels der Software *ImageJ* über die *Plot Profile* Funktion erstellt worden.

Die Intensitäten beider Verläufe nehmen gegenläufig zu beziehungsweise ab. Die sichtbaren Inhomogenitäten aus Abb. 3.34 zeigen sich in dieser Auftragung als große Schwankungen. Die Präparation von graduellen Oberflächen der Verbindung 4 ist demnach auch in fibrillärem Zustand möglich. Eine homogenere Oberfläche könnte über das Aufsprühen der fibrillierten Peptidlösung erreicht werden.

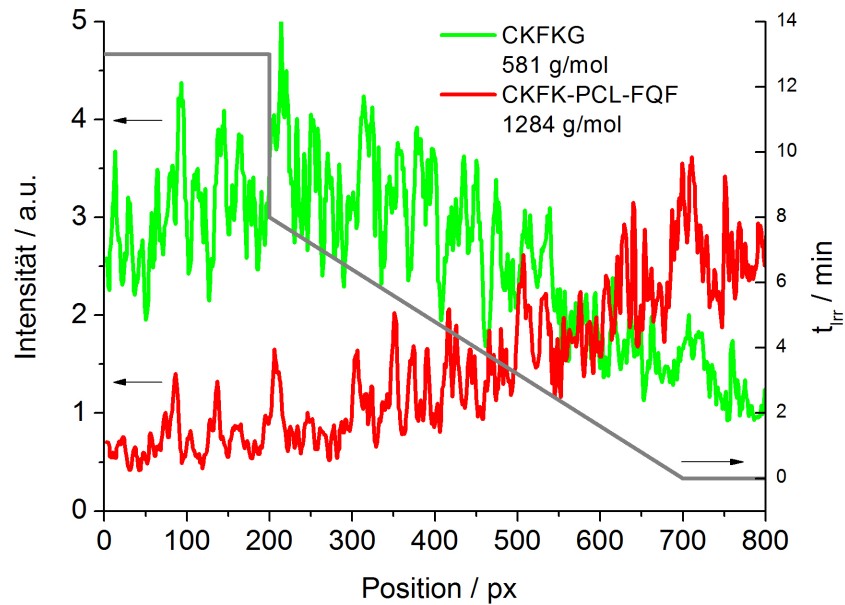


Abb. 3.35: Plot des Profils aus Abb. 3.34. Die Intensitätswerte des Farbgradienten von Peptid 4 (rot) und Fragment CKFKG (grün) wurden gegen die Position in x -Richtung aufgetragen. In grauer Farbe ist der Bestrahlungsgradient gezeigt.

3.5 Zellkulturexperimente

Die kontrollierte Photospaltung der bioaktiven Sequenz RGD ist auf einer Oberfläche, wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt ist, möglich. Diese Eigenschaft des Peptids 1 ist jedoch nicht ausreichend für die Präparation von tatsächlich bioaktiven graduellen Oberflächen. Dafür ist ein hinreichender Unterschied in der Zelladhäsion auf mit RGD-PCL-CKFKFQF 1 oder RGD-NPCL-CKFKFQF 2 beschichteten und unbeschichteten Oberflächen notwendig. Die Zellwachstumseigenschaften sollten sich jedoch bei der Beschichtung mit CKFKFQF oder PCL*-CKFKFQF, die keine RGD-Sequenz tragen, im Vergleich zu 2 oder 1 unterscheiden. Um eine geeignete Beschichtung und Trägermaterialien für die selektive Zelladhäsion zu finden, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

Die Zellkulturexperimente und Mikroskopie wurden in Zusammenarbeit mit MARCO RAABE durchgeführt. Zunächst wurde für diverse Oberflächen geprüft, ob selektives Wachstum von A549 Krebszellen ausschließlich auf den peptidbeschichteten Oberflächen stattfindet. Dazu wurden frisch vereinzelte A549 Krebszellen aus DMEM entnommen und jeweils 2 mL (10^5 Zellen/mL) in 6 Mikrotiterplatten gegeben. In je einen Schacht der Mikrotiterplatte wurde eine nach Standardprotokoll präparierte Oberfläche gegeben. Es wurden dabei unterschiedliche Peptide und Trägermaterialien getestet. Für die Präparation der Agarosegele wurde eine kochende Agaroselösung (1%, wässrig) entweder zu einem dünnen Film auf ITO-Glas gerakelt (Agarosefilm) oder in eine Silikonform zu einem Gel (Agarosegel) gegossen. Die Oberflächen wur-

den mit den Zellen bei 37 °C, 5% CO₂ und Wasser für 5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen mit PBS-Lösung gewaschen, auf einen Objekträger gelegt und unter einem Durchlicht-Mikroskop betrachtet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.6 festgehalten. Dabei wurde als RGD-tragende Testgruppe immer Verbindung **2** und als Testgruppe ohne RGD immer CKFKFQF verwendet. Die Kontrollgruppe wurde immer ohne Peptidbeschichtung bei denselben Bedingungen getestet. Es wurde aufgrund von Materialknappheit nicht Verbindung RGD-PCL-CKFKFQF **1** sondern RGD-NPCL-CKFKFQF **2** für diese Vorversuche gewählt. Beide Peptide haben eine sehr ähnliche Struktur und sollten demnach auch ähnliche Bioaktivität zeigen.

Tab. 3.6: Übersicht der Adhäsions- und Wachstumsversuche mit A549 Zellen auf verschiedenen Oberflächen. Die Kontrollgruppe bezieht sich immer auf die jeweilige getestete Oberfläche ohne Peptidbeschichtung. Dabei steht + für die Beobachtung von Zellen auf der Oberfläche, ++ für das deutliche Auftreten von Morphologieänderungen der Zellen, – für schlechte bis keine Adhäsion. Wünschenswert für die Erzeugung eines Zell-Gradienten auf Oberfläche ist ein –/+ Ergebnis.

Oberfläche	Zellwachstum und Adhäsion Kontrollgruppe / Testgruppe
Deckglas mit 2	+ / ++
Deckglas mit 1	+ / ++
Deckglas mit CKFKFQF	+ / ++
ITO-Glas mit 2	+ / +
ITO-Glas mit CKFKFQF	+ / +
Agarosefilm auf ITO-Glas mit 2	- / ++
Agarosefilm auf ITO-Glas mit CKFKFQF	- / +
Agarosegel mit 2	- / -
Agarosegel mit CKFKFQF	- / -
PLL-PAA auf Deckglas mit 2	+ / +
PLL-PAA auf Deckglas mit CKFKFQF	+ / +

In den Abb. 3.36 sind exemplarisch die wichtigsten Mikroskopieaufnahmen zu sehen. Dabei werden nur Messungen mit Peptidbeschichtung gezeigt, bei denen ein Unterschied zwischen Kontrolloberfläche und peptidbeschichteter Oberfläche gemessen wurde.

Reine Glasoberflächen sowie ITO-Glasoberflächen sind als Trägermaterial für die selektive Kultivierung von A549 Zellen ungeeignet, da auf diesen Oberflächen kein signifikanter Unterschied in der Zelladhäsion und dem Zellspreiten zwischen Kontrollgruppe (ohne Peptid) und Testgruppe (mit Peptid) erkannt werden konnte. Auf beiden Oberflächen findet auch ohne Peptidbeschichtung gute Zelladhäsion statt. Eine poly-L-Lysin (PLL) mit anschließender poly-Acrylsäure (PAA) Beschichtung auf Glas ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Testgruppe. Zur Sicherstellung der erfolgreichen Beschichtung mit PLL-PAA wurde das Zeta-Potential der beschichteten Glasoberfläche mit und ohne Peptid gemessen. Das Verwenden von reinem Agarosegel als Trägermedium ist ebenso ungeeignet, da hier ebenfalls kein

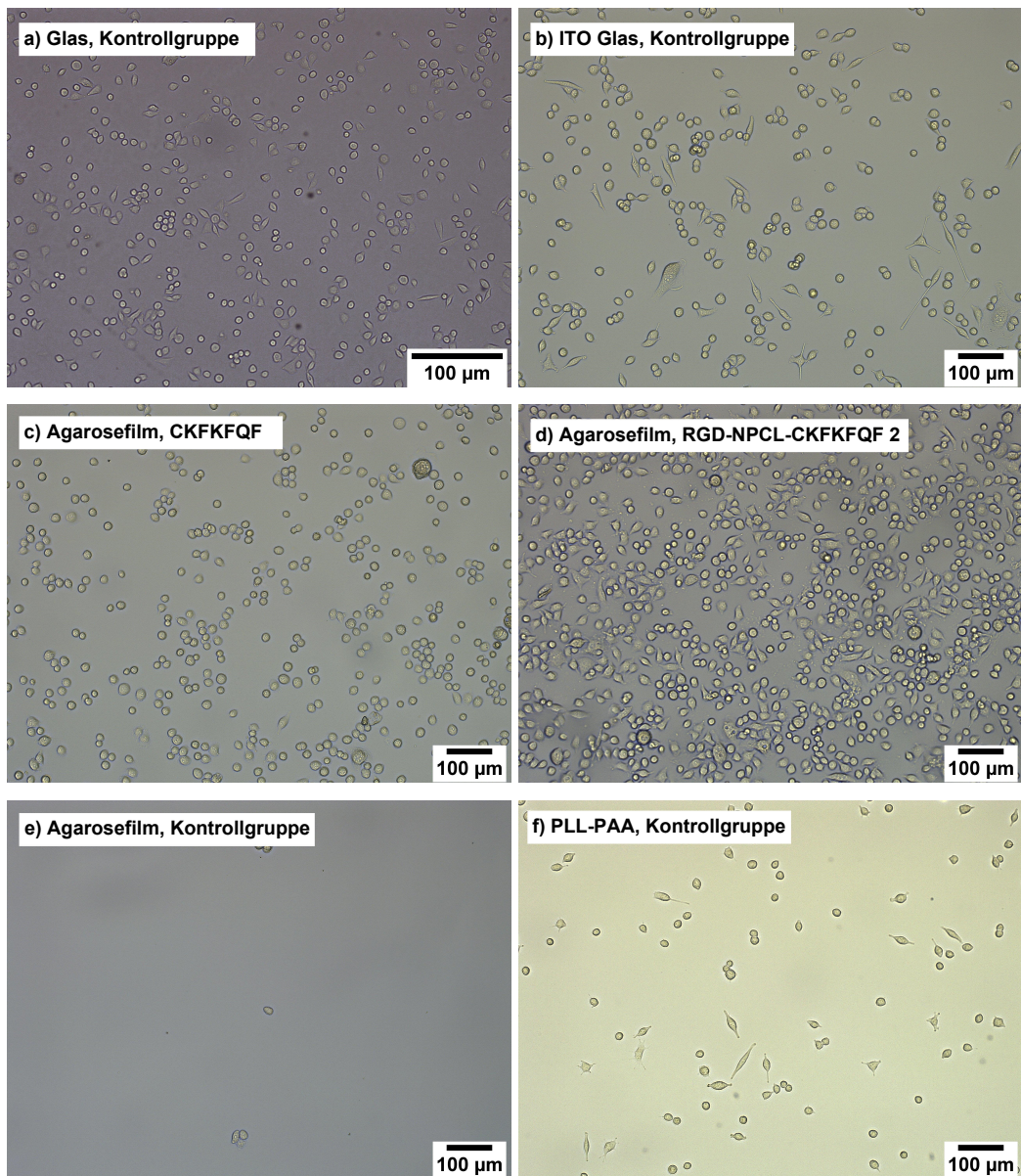


Abb. 3.36: A549 Krebszell-Linie (10^5 Zellen / mL) auf verschiedenen Oberflächen inkubiert für 5h bei 37 °C und 5% CO₂ in DMEM beobachtet unter einem Durchlicht-Mikroskop. a) Glas Kontrollgruppe mit ca. 190 Zellen, b) ITO-Glas Kontrollgruppe mit ca. 180 Zellen, c) CKFKFQF auf Agarosefilm mit ca. 260 Zellen, d) RGD-NPCL-CKFKFQF 2 auf Agarosefilm mit ca. 400 Zellen, e) Agarosefilm Kontrollgruppe mit ca. 8 Zellen und f) PLL-PAA beschichtetes Glas Kontrollgruppe mit ca. 60 Zellen.

Unterschied festgestellt werden konnte. Hier findet auch mit Peptidbeschichtung keine Zelladhäsion statt. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Peptidbeschichtung auf dem Gel nicht erfolgreich war, möglicherweise durch Diffusion der Peptide in das Gel, zum anderen aber auch daran, dass das massive Gel eine zu ungeeigneten Umgebung für die Zellen darstellt, die nicht durch die Beschichtung ausgeglichen werden kann. Es ist somit klar zu erkennen, dass agarosebeschichtete Oberflächen Adhäsion und Wachstum von A549 Zellen verhindern. Wird Agarose jedoch als dünner Film auf eine ITO-Glasoberfläche gerakelt, zeigen A549 Zellen auf mit Verbindung **2** beschichteten Oberflächen Zelladhäsion und Zellspreiten. Im Vergleich zu CKFKFQF, welches keine RGD-Sequenz trägt, ist das Adhäsionsvermögen und vor allem das Spreitvermögen von A549 Zellen auf **2** viel ausgeprägter, wie anhand des direkten Vergleichs in Abb. 3.36 von c) und d) deutlich wird.

Es konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass RGD-haltige im Gegensatz zu RGD-freien Peptiden innerhalb von 5 h auf dünnen Agarosefilmen verstärktes Zellspreiten hervorrufen. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, sind jedoch Wiederholungsexperimente notwendig.

Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Oberflächenbeschichtung und graduelle Bestrahlung zweier photoresponsiver Peptide optimiert. Die erfolgreiche Abspaltung des bioaktiven Motivs RGD der Verbindungen **1** und die Photospaltung der Verbindung **4** auf ITO-Glas konnten mittels MALDI-Imaging gezeigt werden.

Die photospaltbaren Linker PCL **VII** und Phe-PCL **XIV**, der nicht-photospaltbare Linker NPCL **XII**, sowie die Peptide RGD-PCL-CKFKFQF **1**, RGD-NPCL-CKFKFQF **2**, CK-Phe-PCL-KFQF **3**, CKFK-PCL-FQF **4** und CKFK-NPCL-FQF **5** wurden erfolgreich dargestellt und charakterisiert. Alle Peptide bilden während eintägiger Inkubation in MilliQ Wasser bei pH 7,4 Fibrillen. Kinetikstudien der Photoreaktion der Peptide **1**, **3** und **4** mittels HPLC und LC-MS ergaben fast vollständigen Umsatz nach Bestrahlung über eine Minute. Dabei konnten **1** und **3** sowie die nichtresponsiven Kontrollpeptide **2** und **5** im Gegensatz zu **4** auch nach Bestrahlung über 10 min noch Fibrillen ausbilden. Dies wird auf die unterschiedliche Abfolge hydrophiler und hydrophober Aminosäuren in den Spaltfragmenten zurückgeführt. Bei der Bestrahlung bereits gebildeter Fibrillen von **4** konnten in Lösung und auf einem Kohlefilm Morphologieänderungen beobachtet werden. Es wird vermutet, dass die Defibrillierung kinetisch gehemmt ist und in Lösung über Aggregate als Zwischenstufen verläuft.

Die Präparation der Beschichtungen von ITO-Glas mit den Peptiden wurde optimiert. Die besten Ergebnisse wurden durch eine eintägige Inkubation der Peptide in einer Atmosphärenkammer erzielt. Über REM-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Beschichtungen in Wasser bei neutralem pH-Wert für mindestens eine Stunde beständig sind. Um die Dicke der Beschichtung zu ermitteln, könnten profilometrische Messungen oder die Ellipsometrie genutzt werden. Die Homogenität derselben könnte zudem auch über eine Kontaktwinkelmessung an Wassertropfen untersucht werden. Nach ersten Zellkulturexperimenten mit **2** konnte im Vergleich zu CKFKFQF verbesserte Adhäsion von A549-Zellen auf agarosebeschichtetem ITO-Glas beobachtet werden. Eine homogenere Beschichtung mit Agarose könnte über *Dip-Coating* erreicht werden.

Um zukünftig eine graduelle Zelladhäsion zu erreichen, sind weitere Experimente notwendig. Dazu müsste bei Verbindung **1** zunächst sicher gestellt werden, dass sich die Bioaktivität des Ausgangspeptids von der der Spaltprodukte unterscheidet.

det. Gegebenenfalls müssten die abgespaltenen RGD-Fragmente selektiv von der Beschichtung entfernt werden. Dies könnte mittels Zeta-Potentialmessungen oder direkt in der Zellkultur bestätigt werden. Dabei sollte ebenfalls die Zellviabilität auf der Oberfläche mittels Fluoreszenz-Doppelfärbung überprüft werden.

Da Dorsalganglionen (DRG) auf fibrillären Strukturen, jedoch nicht auf Glasoberflächen adhären,^[13] könnte ein Fibrillengradient von Verbindung **4** zu einer graduellen Zelladhäsion führen. Dazu müsste ein geeignetes Medium zur selektiven Defibrillierung auf einer Glasoberfläche gefunden werden. Ein bioaktiver Fibrillengradient wurde auf diese Weise noch nicht auf Oberflächen erzeugt. Möglicherweise muss der Bestrahlungsgradient variiert oder der Gradient auf der Oberfläche verlängert werden, um klare Auswirkungen auf die Zelladhäsion feststellen zu können.

Neben den bereits durchgeführten TEM-Messungen der Verbindung **4** zur Defibrillierung muss die Morphologieänderung zusätzlich im Ensemble beispielsweise über CD-Spektroskopie untersucht werden. Die responsive Defibrillierung von Verbindung **4** könnte im retroviralen Gentransfer genutzt werden. MÜNCH und Mitarbeiter haben bereits gezeigt, dass positiv geladene Peptidfibrillen durch Bildung eines Netzwerks mit Viren die Transduktionseffizienz erhöhen.^[12] Durch photoinitierte Zerstörung eines Fibrillennetzwerks von **4** könnte die Transduktion beeinflusst werden.

Insgesamt bieten bioaktive Peptide als Fibrillen in Lösung oder im Gradienten auf Oberflächen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten und eine große Relevanz in der Biomedizin. Eine gezielte Kontrolle der zugrunde liegenden Selbstassemblierungsprozesse wie beispielsweise in dieser Arbeit durch Licht eröffnet neue Zugänge zu maßgeschneiderten Materialien.

Supplementary Information

5.1 Instrumentation and methods

5.1.1 General considerations

If not stated otherwise all reagents and chemicals were obtained from commercial sources at the highest purity available and used without further purification. Air- and moisture-sensitive reactions were carried out under a nitrogen atmosphere with common SCHLENK techniques and dry solvents. For this purpose all glassware was previously dried via heat gun in vacuo. In addition, all necessary solvents and liquid starting materials were added via septum and with syringes.

5.1.2 NMR spectroscopy

NMR measurements were performed either on a Avance 300 or Avance III 250 spectrometer (Bruker) (300 MHz for ^1H -NMR and 75 MHz for ^{13}C -NMR or 250 MHz for ^1H -NMR and 63 MHz for ^{13}C -NMR) using tetramethylsilane (TMS) as the internal standard). The chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) relating to the solvent peak of CD_3Cl or DMSO-d_6 for ^1H -NMRs. The signal splittings are listed as s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet of doublet), m (multiplet), br (broad singlet). The coupling constant (J) is stated in Hz. All spectra were analyzed using MestReNova 14.0.0-23239.

5.1.3 HPLC and LC-MS

HPLC runs were conducted in preparative scale using a Shimadzu system with the following modules: DGU-20A_{5R}, LC-20AP, CBM-20A, SPD-M20A, SIL-10AP, FRC-18A. If not mentioned otherwise the column Gemini NX-C18-110Å, Phenomenex, 150 mm x 30 mm, 5 μm pore size and a flow rate of 25 mL/min was used. The eluent was a stepwise gradient from water with 0.1% TFA to ACN with 0.1% TFA in 35 min. The peptides were dissolved in MilliQ water with 0.1% TFA to a concentration of approx. 0.1–0.01 mg/mL and filtered via a PES syringe filter with a pore size of 0.45 μm before injecting approx. 10 mL per run in HPLC. In analytical scale HPLC

were performed using a Shimadzu system with following modules: DGU-20A_{5R}, LC-20AT, CBM-20A, SPD-M20A, SIL-10ACHT, CTO-20AC. In analytical scale the column Zorbax XDB-C18, 9.4 x 250 mm, 5 μ m pore size was used. The eluent was a gradient from water to ACN in 22 min. The peptides were dissolved in MilliQ water with 0.1% TFA to a concentration of 1 mg/mL and filtered via a PES syringe filter with a pore size of 0.45 μ m before injecting approx. 50 μ l per run in HPLC. Analytical and preparative scale HPLC solvent gradients are shown in Fig. 5.1.

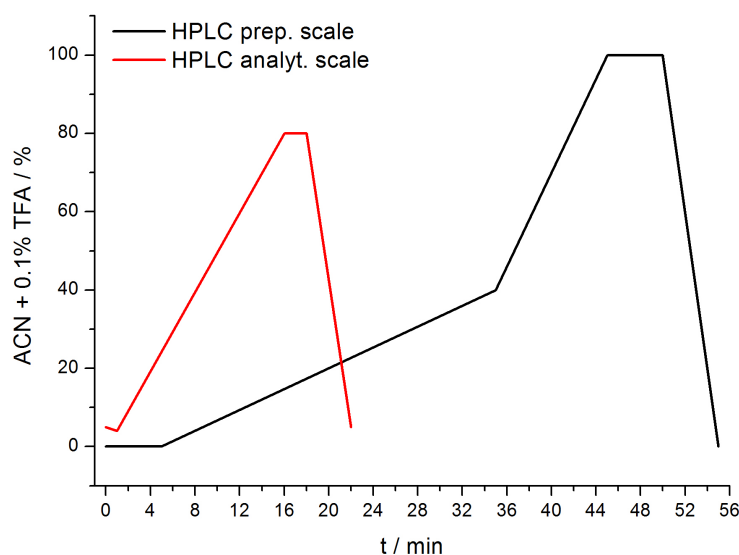


Fig. 5.1: HPLC solvent gradients for preparative scale and analytical scale HPLC runs.

The m/z of the peptides were measured by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), which were performed using a Shimadzu LC-2020 Single Quadrupole MS instrument equipped with the modules LC-20AD, SIL-20AC-HT, SPD-20A, CTO-10ASVP and the column Kinetex EVO C18 100Å with 2.6 μ m pore size. The eluent was a stepwise gradient from 5% water with 0.1% formic acid to 95% ACN with 0.1% formic acid in 20 min. The measurements were performed by ALI ROUHANIPOUR. For analysis molecules were dissolved in MeOH to a concentration of 0.1 mg/mL and the peptides were dissolved in MilliQ water to a concentration of 0.1 mg/mL.

5.1.4 Flash chromatography (FC) and thin layer chromatography (TLC)

For purification via FC silica gel an average grain size of 0.063 - 0.2 mm (Silica Gel 60M) from Macherey-Nagel GmbH was used together with HPLC grade solvents. The collected fractions were analyzed by TLC on 0.2 mm silica coated alumina plates ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄) from Macherey-Nagel GmbH with a fluorescence indicator. The resulting spots were visualized by UV-light at 254 nm.

5.1.5 MALDI-ToF-MS and MALDI-Imaging

MALDI-ToF measurements were performed on MALDI SYNAPT G2-Si HDMS (Waters) by STEFAN TÜRK and JUTTA SCHNEE. The samples were prepared with the matrix HCCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) previous to measurement. MALDI-ToF-MS measurements were evaluated with mMass (V.5.5.0).

MALDI Imaging was performed on Rapiflex MALDI-ToF/ToF (Bruker) by HANS-JOACHIM RÄDER and FRANZ JOSEF MAYER. Previous to the MALDI-Imaging measurement the prepared sample on ITO-glass surface was coated with a matrix solution (30% water in ACN with 10 mg/mL HCCA and 0.1% TFA) by spraying via HTX TM sprayer Model M3 (Rapifle MALDI Tissuetyper Starter Kit) at 70 °C. MALDI Imaging measurements were evaluated with the software FlexImaging (Bruker).

5.1.6 SPPS

Unless explicitly stated, solid phase peptide synthesis was performed on the microwave assisted automated peptide synthesizer Liberty Blue (CEM) using the following protocol.

SPPS-grade solvents were utilized together with Fmoc-L-Phe-Wang resin for Fmoc amino acid loading (0.65 mmol/g). The beads were swollen in DMF while shaking the reaction vessel for 1h. After draining the DMF a piperidine solution (20% in DMF) was added to the vessel, which was microwaved at 155 W, 75 °C for 15 s and at 30 W, 90 °C for 50 s. Afterwards the piperidine solution was sucked off and the beads were washed four times with DMF. After the addition of the Fmoc-protected amino-acid (5 eq relative to the resin loading capacity) in DMF, DIC (5 eq) in DMF and Oxyma Pure (10 eq) in DMF were added to the reaction vessel. After microwaving at 170 W, 75 °C for 15 s and at 30 W, 90 °C for 110 s the solution was removed and the beads washed with DMF. This procedure was repeated for each amino acid. The coupling step for the PC and NPC linker was done analogue but were microwaved at 30 W, 90 °C for 10 minutes. In the final step the Fmoc-cleavage was performed by microwaving at 155 W, 75 °C for 15 s and at 30 W, 90 °C for 50 s with piperidine solution (20% in DMF). The resin was washed manually with DCM after Fmoc-cleavage. To cleave the resin-bound peptide the beads were dried and then shaken in a mixture of 1mL TFA/TIPS/H₂O (95%:2.5%:2.5%) for 4 hours. The solution was precipitated in diethylether (40 mL cooled to -20 °C) and centrifuged at 4000 rpm for 20 min at 4 °C. The solvent was decanted and the peptide dried under vacuum.

5.1.7 TEM

TEM measurements were performed by ADRIANA SOBOTA on a JEOL 1400 instrument with 120 kV. Various spots on the whole TEM-grid were evaluated while measuring one sample. The samples were prepared according to the following procedure.

Peptides were dissolved in DMSO to obtain a 10 mg/mL stock solution, which was further diluted in MilliQ water to 1 mg/mL. The pH value of this solution was adjusted to pH 7.4 with 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl. The solution was allowed to incubate at ambient temperature at least 24 h in order to obtain fibrils.

4 μ l of this solution was incubated on a freshly plasma etched TEM-grid (plano GmbH) for 5 min. Afterwards the solution was carefully blotted with a filter-paper. The grid was inverted on a drop of 10 μ l of a 1% aq. uranylacetat solution and incubated for 2.5 min. The grid was then washed three times with MilliQ and dried. TEM images were evaluated with the software ImageJ 1.52a.

5.1.8 Other instruments

Scanning electron measurements (REM) were performed by Gunnar Glasser on a LEO Gemini 1530 instrument. Various spots on the whole sample were evaluated while measuring. Unless stated otherwise the acceleration voltage was 0.1 kV.

Bright field microscopy images for cell culture were recorded using a Leica LAS X DMI8 manual instrument.

Spin coating experiments with surfaces were conducted on SUSS SMTL Labspin6 instrument.

Plasma etching of surfaces were performed on a Flecto prototype from plasma technologies. The standard etching time was 1 minute UV irradiation at 100% oxygen concentration.

5.1.9 Cell culture

Cell culture experiments were conducted under sterile conditions in a flow hood with A549 cancer cell line in modified Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). DMEM was modified with 1% penicillin and streptavidin, 10% fetal calf serum, 1% non essential amino acids and 4.5 g/l glucose glutamin. After incubating cells (10^5 cells/mL) for 3 h at 37 °C with 5% CO₂ in atmosphere on prepared surfaces with 2 mL cell solution in each 6-well plate the medium was soaked and surfaces were washed with PBS solution. Further incubation for 2 h and microscopy of the surfaces were done in DMEM.

5.1.10 Preparation of peptide fibrils

In solution Standard protocol to prepare fibrils was as follows. 10 mg mL⁻¹ solution of peptide was prepared in DMSO. This solution was diluted in MilliQ water to give a 1 mg mL⁻¹ solution. After adjusting the pH to 7.4 with NaOH (0.1 M) or HCl (0.1 M) the solution was allowed to incubate for 24 h at ambient temperature to form fibrils.

On ITO-surface Fibril-covered ITO glass-surface was prepared by incubating a freshly prepared 1 mg mL⁻¹ peptide solution at pH 7.4 in MilliQ as described above on a plasma-etched ITO glass-surface for 24 h. By placing wet cotton balls during incubation in the same sealed petri dish, inhomogenous drying spots were inhibited. After incubation, the residual solvent was carefully removed with a tissue paper and the solvent on the surface was dried with an argon air stream.

Irradiation Irradiation of samples were conducted with LED purchased from Opu-
lent Americas (Starboard Luminus SST-10-UV-A130) with a peak wave length at 365 nm and a current of 1 A. The emission spectrum of the LED was measured by Sarah Backfisch via a Ulbrichtkugel as shown in Fig. 5.2.

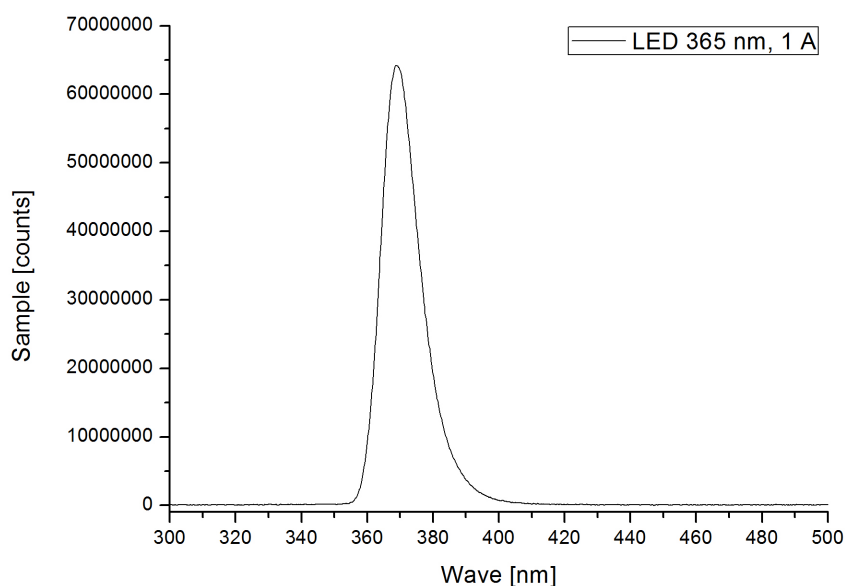
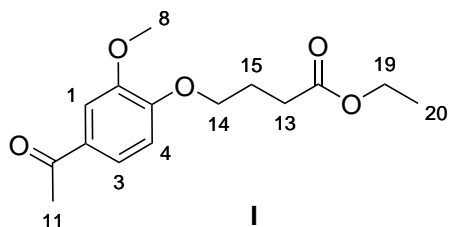


Fig. 5.2: Emission spectrum of LED (Opulent Americas) at 365 nm, 1 A, measured by S. Backfisch.

5.2 Synthesis of photo-cleavable linker

I: Ethyl 4-(4-acetyl-2-methoxyphenoxy)butanoate^[27]

Code: KK001



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
Acetovanillone	166.17	1	8.03	48.36
Ethyl 4-bromobutyrate	195.05	0.81	7.65	39.23
K ₂ CO ₃	138.20	1.87	12.55	90.88
DMF, abs.	73.10		50	

To a solution of ethyl 4-bromobutyrate (5.60 mL, 39.23 mmol) in DMF (50 mL) was added acetovanillone (8.03 g, 48.36 mmol) and K₂CO₃ (12.55 g, 90.88 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and was diluted with water (50 mL) and EtOAc (50 mL). The aqueous phase was extracted three times with EtOAc (50 mL). The combined organic phase was washed three times with water (25 mL) and with brine (25 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvent was removed under reduced pressure to yield a white solid (11.40 g, 40.70 mmol, 84% yield).

Chemical formula C₁₅H₂₀O₅, $M = 280.32 \text{ g mol}^{-1}$

R_F (*n*-hexane/ EtOAc, 5/3) = 0.5

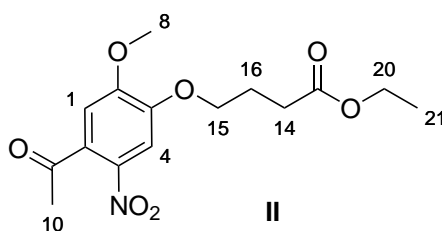
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 7.57 – 7.50 (m, 2H, H¹, H³), 6.88 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H⁴), 4.18 - 4.09 (m, 4H, H¹⁴, H¹⁹), 3.90 (s, 3H, H⁸), 2.55 (s, 3H, H¹¹), 2.53 (s, 2H, H¹⁵), 2.18 (q, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 2H, H¹³), 1.25 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, H²⁰). See Fig. 6.10.

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 196.97, 173.15, 152.72, 149.35, 130.58, 123.34, 111.30, 110.49, 67.89, 60.63, 56.10, 30.68, 26.36, 24.38, 14.34. See Fig. 6.11.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for C₁₅H₂₀O₅ [M+H]⁺, 281.32 g mol⁻¹; found 281.15 g mol⁻¹. See 6.38a.

II: Ethyl-4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate^[27]

Code: KK002



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
I	280.32	1	10.35		36.92
Ac ₂ O				175	
HNO ₃ , 65%				6.13	

To a solution of ethyl 4-(4-acetyl-2-methoxyphenoxy)butanoate I (10.35 g, 36.92 mmol) in 175 mL acetic anhydride at 0 °C was added 65% HNO₃ (6 mL) dropwise over 2 min. The brownish-yellow solution was added to ice-water (1500 mL) 4 min. after starting to add HNO₃. The reaction mixture was stirred for further 30 min. The yellow solid was filtered and dissolved in dichloromethane (DCM). The organic phase was washed three times with sat. aq. NaHCO₃ (150 mL) and with water (150 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product showed 30% of side product due to side reactions of nitration and was purified via column chromatography eluting with 1.5% MeOH in DCM to yield a yellow solid (7.52 g, 23.1 mmol, 63% yield).

Chemical formula C₁₅H₁₉N₅O₇. $M = 325.11 \text{ g mol}^{-1}$.

R_F (DCM with 1.5% MeOH) = 0.20

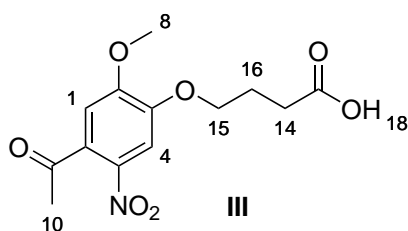
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 7.61 (s, 1H, H¹), 6.74 (s, 1H, H⁴), 4.22 – 4.10 (m, 4H, H¹⁴, H¹⁹), 3.96 (s, 3H, H⁸), 2.55 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, H¹³), 2.49 (s, 3H, H¹⁰), 2.20 (q, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁵), 1.27 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, H²⁰). See Fig. 6.12.

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 200.17, 172.82, 154.30, 148.85, 132.87, 108.72, 107.95, 68.46, 60.63, 56.61, 30.51, 30.44, 24.17, 14.24. See Fig. 6.13.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for C₁₅H₁₉N₅O₇ [M+H]⁺, 326.12 g mol⁻¹; found 326.15 g mol⁻¹. See 6.38b.

III: 4-(4-Acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid^[27]

Code: KK003



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
II	325.32	1	3.69		11.34
EtOH	46.07			49.7	
NaOH, 1M	40.00			16.91	

To a suspension of ethyl-4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate **II** (3.65 g, 11.22 mmol) in EtOH (50 mL) was given 1M aq. NaOH (20 mL). The reaction mixture was stirred at 40 °C for 1.5h. The solvent was removed under reduced pressure and the aqueous residue was taken up in sat. aq. NaHCO₃. The aqueous layer was washed three times with DCM (50 mL) and acidified with conc. HCl until pH 1. A brown-yellow precipitation was observed. The aqueous layer was extracted three times with DCM (150 mL) and the organic layer was washed two times with 0.5 N HCl (100 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure to obtain a yellow solid (3.19 g, 10.75 mmol, 94% yield).

Chemical formula C₁₃H₁₅NO₇. $M = 297.08 \text{ g mol}^{-1}$.

R_F (DCM with 10% MeOH) = 0.62.

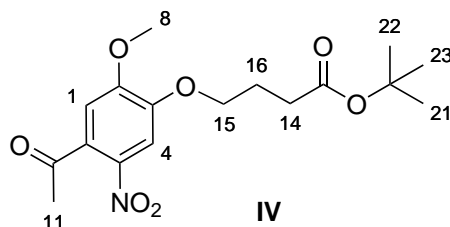
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 7.62 (s, 1H, H¹), 6.75 (s, 1H, H⁴), 4.18 (t, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁴), 3.95 (s, 3H, H⁸), 2.63 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, H¹³), 2.50 (s, 3H, H¹⁰), 2.22 (p, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁵). See Fig. 6.14.

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 201.05, 175.23, 154.28, 148.85, 138.09, 132.51, 108.53, 107.90, 77.67, 77.16, 76.65, 68.34, 56.41, 30.16, 30.01, 23.97. See Fig. 6.15.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for C₁₃H₁₅NO₇ [M+Na]⁺, 320.07 g mol⁻¹; found 320.10 g mol⁻¹. See 6.38c.

IV: Tert-Butyl-4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate^[27]

Code: KK005



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
III	297.26	1	3.10		10.34
Boc ₂ O	218.25	3.0		6.69	31.29
DMAP	122.17	0.3	0.382		3.13
<i>tert</i> -Butanol	74.12			60	
THF	71.10			20	

To a suspension of 4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid **III** (3.00 g, 10.43 mmol) in 80 mL *t*BuOH/THF solution (3:1 v/v) was added DMAP (382 mg, 3.13 mmol). Boc₂O (6.83 g, 31.29 mmol) was added portionwise over 1.5 h. Bubbling was observed and the flask was equipped with a balloon. After stirring for 21 h, TLC (10% MeOH in DCM) showed complete conversion. The solvent was removed under reduced pressure to obtain an orange oil. The residue was taken up in DCM (100 mL) then washed twice with 0.2 N HCl (50 mL) and three times with sat. aq. NaHCO₃ (50 mL). The organic layer was then dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to afford an orange oil, which was further purified through column chromatography eluting with 2% MeOH in DCM to afford a yellow viscous oil (2.76g, 7.81 mmol, 74% yield).

Chemical formula C₁₇H₂₃NO₇. $M = 353.17 \text{ g mol}^{-1}$.

R_F (DCM with 2% MeOH) = 0.56.

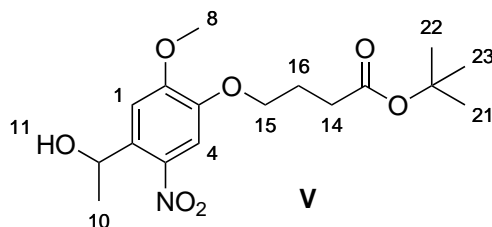
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 7.61 (s, 1H, H¹), 6.74 (s, 1H, H⁴), 4.14 (t, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁴), 3.96 (s, 3H, H¹¹), 2.47 (d, $J = 9.6 \text{ Hz}$, 5H, H¹⁵, H⁸), 2.15 (p, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁶), 1.45 (s, 9H, H²¹–H²³). See Fig. 6.16.

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 200.18, 172.12, 154.30, 148.92, 138.37, 132.83, 108.73, 107.99, 80.68, 77.54, 77.04, 76.53, 68.63, 56.62, 31.69, 30.44, 28.12, 24.31. See Fig. 6.17.

LC-MS: (ESI-) m/z calc. for C₁₇H₂₃NO₇ [M]⁻, 353.14 g mol⁻¹; found 353.15 g mol⁻¹. See 6.38d.

V: Tert-Butyl 4-(4-(1-hydroxyethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)-butanoate^[27]

Code: KK006



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
IV	353.37	1	2.76		7.81
NaBH ₄	37.83	2.0	0.72		15.61
EtOH	46.07			43	

NaBH₄ (1.03 g, 27.2 mmol) was added to a suspension of *tert*-Butyl-4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate **IV** (2.76 g, 7.81 mmol) in EtOH (45 mL). After 5 h the reaction was quenched by addition of citric acid solution (600 mg/mL) until pH 4 reached. The solution was then diluted with DCM (100 mL) and water (50 mL). The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to yield a viscous orange oil (2.46 g, 6.98 mmol, 88%).

Chemical formula C₁₇H₂₅NO₇. $M = 355.16 \text{ g mol}^{-1}$.

R_F (DCM with 2% MeOH) = 0.32.

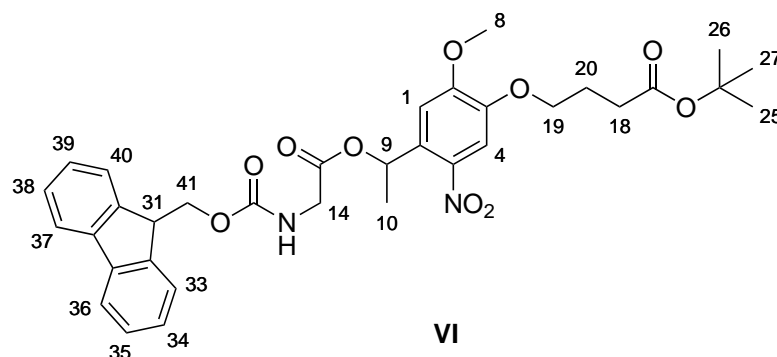
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 7.55 (s, 1H, H¹), 7.28 (s, 1H, H⁴), 5.54 (q, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 1H, H⁹), 4.08 (t, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁵), 3.96 (s, 3H, H⁸), 2.46 (dt, $J = 14.5, 7.3 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁴), 2.13 (q, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁶), 1.53 (d, $J = 6.2 \text{ Hz}$, 3H, H¹⁰), 1.44 (s, 9H, H²¹–H²³). See Fig. 6.18.

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 172.27, 154.12, 146.96, 139.51, 136.94, 109.05, 108.65, 80.60, 77.56, 77.05, 76.54, 68.42, 65.75, 56.36, 31.82, 28.11, 24.42, 24.29, 21.85. See Fig. 6.19.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for C₁₇H₂₅NO₇ [M+Na]⁺, 378.15 g mol⁻¹; found 378.15 g mol⁻¹. See 6.38e.

VI: *Tert*-butyl 4-(4-(1-(2-(fmoc-amino)acetoxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate^[27]

Code: KK007



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
V	355.16	1	2.40		6.75
Fmoc-Gly-OH	297.31	1.55	3.11		10.47
EDC x HCl	191.70	1.81	2.34		12.24
DMAP	122.17	0.094	0.0776		0.635
DCM				33	

To Fmoc-Gly-OH (3.18 g, 10.5 mmol), EDC x HCl (2.38 g, 12.3 mmol) and DMAP (90 mg, 0.7 mmol) was added dry DCM (20 mL). The suspension becomes clear solution after stirring for 5 min and *tert*-Butyl 4-(4-(1-hydroxyethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate **V** (2.40 g, 6.75 mmol) in DCM (13 mL) was added. After stirring for 4 h at room temperature, the reaction mixture was washed twice with water (50 mL) and twice with sat. aq. NaHCO₃ (100 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to afford a yellow powder that was further purified via column chromatography, eluting with 2% MeOH in DCM, yielding a light yellow solid with small amount of impurities (3.65 g, 5.76 mmol, 85%).

Chemical formula C₃₄H₃₈N₂O₁₀. $M = 634.24 \text{ g mol}^{-1}$.

R_F (DCM with 2% MeOH) = 0.54, R_F (Cyclohexane/ EtOAc, 5/3) = 0.52.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H³⁶, H³⁷), 7.57 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H³³, H⁴⁰), 7.44 – 7.20 (m, 4H, H³⁴, H³⁵, H³⁸, H³⁹), 6.98 (s, 1H, H¹), 6.55 (q, $J = 6.2$ Hz, 1H, H⁴), 5.30 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H⁹), 4.47 – 4.27 (m, 2H, H⁴¹), 4.23 – 3.95 (m, 5H, H³¹, H¹⁴, H¹⁹), 3.94 (s, 3H, H¹⁰), 2.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H¹⁸), 2.13 (h, $J = 7.1, 5.7$ Hz, 2H, H²⁰), 1.64 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H⁸), 1.45 (s, 9H, H²⁵–H²⁷). See Fig. 6.20.

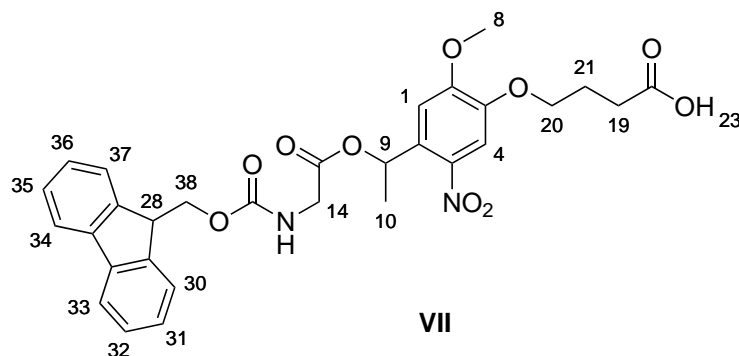
¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 172.21, 169.03, 156.30, 154.18, 147.44, 143.72, 143.69, 141.31, 141.27, 139.64, 132.41, 127.77, 127.09, 125.04, 120.03,

108.94, 108.01, 80.61, 69.79, 68.41, 67.27, 56.42, 47.03, 42.95, 31.79, 28.13, 24.39, 21.98. See Fig. 6.21.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for $C_{34}H_{38}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$, $657.24 \text{ g mol}^{-1}$; found $657.25 \text{ g mol}^{-1}$. See 6.38f.

VII: 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)acetoxylethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid^[27]

Code: **KK012**



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
VI	634.68	1	0.500		0.787
TFA	98.02	1		0.75	0.787
DCM				5.0	

To a solution of *tert*-Butyl 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)acetoxylethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate **VI** (500 mg, 0.787 mmol) in DCM (5 mL) was added TFA (0.75 mL). The light yellow suspension becomes a deep yellow clear solution. After stirring for 5 h at room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up with DCM and was washed twice with 0.5 N HCl (40 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to afford a yellow powder that was further purified via column chromatography, eluting with 4% MeOH in DCM, yielding a light yellow solid (224 mg, 0.387 mmol, 49%).

Chemical formula C₃₀H₃₀N₂O₁₀. $M = 578.57 \text{ g mol}^{-1}$.

R_F (DCM with 4% MeOH) = 0.33.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H³³, H³⁴), 7.55 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, H³⁰, H³⁷), 7.42 – 7.26 (m, 4H, H³¹, H³², H³⁵, H³⁶), 6.98 (s, 1H, H¹), 6.53 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, H⁴), 5.30 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, H⁹), 4.39 – 4.23 (m, 2H, H³⁸), 4.17 – 4.00 (m, 5H, H²⁸, H²⁰, H¹⁴), 3.94 (s, 3H, H⁸), 2.60 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H¹⁹), 2.17 (h, $J = 7.1, 5.7$ Hz, 2H, H²¹), 1.64 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, H¹⁰). See Fig. 6.22.

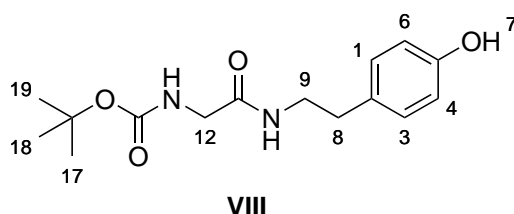
¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 178.02, 169.08, 156.36, 154.20, 147.30, 143.68, 141.27, 139.63, 132.55, 127.77, 127.09, 125.03, 120.01, 109.03, 108.09, 69.79, 68.03, 67.30, 56.39, 47.03, 42.96, 30.16, 23.94, 21.96. See Fig. 6.23.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for $C_{30}H_{30}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$, $601.17 \text{ g mol}^{-1}$; found $601.20 \text{ g mol}^{-1}$. See 6.40a.

5.3 Synthesis of non-cleavable linker

VIII: *Tert*-butylcarbamoyl-2-oxoethyl-2-(4-hydroxyphenethyl)-amine^[27]

Code: **KK004**



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
Tyramine hydrochloride	173.06	1	2.0		11.5
Boc-Gly-OH	175.08	1.12	2.26		12.9
EDC x HCl	191.12	1.10	2.43		12.7
DMAP	122.08	0.1	0.140		1.15
NEt ₃	101.12			5.0	
THF, abs.	71.10			20	

Tyramine-hydrochloride (2.00 g, 11.5 mmol) was added to dry THF (20 mL) and NEt₃ (5 mL). To this suspension was added Boc-Gly-OH (2.26 g, 12.9 mmol), followed by EDC (2.47 g, 12.7 mmol) and DMAP (140 mg, 1.15 mmol). The white suspension was heated at reflux for 6 h, and then the solvent was removed under reduced pressure. The yellow residue was dissolved in DCM (40 mL) and washed three times with water (40 mL) then dried over Na₂SO₄. The solvent was removed to yield a viscous yellow oil that was purified via column chromatography, eluting with 20% MeOH in DCM. The combined organic fractions were evaporated to yield a colorless solid with small impurities. The solid was recrystallized from chloroform and small amount of MeOH. The white crystals were washed with *n*-hexane. A colorless solid was obtained (1.39 g, 4.74 mmol, 41%).

Chemical formula C₁₆H₂₃NO₄. $M = 293.16 \text{ g mol}^{-1}$.

R_F (DCM with 20% MeOH) = 0.72.

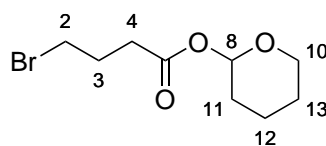
¹H NMR (250 MHz, Chloroform-*d* with 10% CD₃OD) δ 6.95 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H¹, H³), 6.68 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H⁴, H⁶), 3.60 (s, 2H, H¹²), 3.38 – 3.24 (m, 2H, H⁹), 2.64 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H⁸), 1.36 (s, 9H, H¹⁷–H¹⁹). See Fig. 6.24.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃ with 10% CD₃OD) δ 170.11, 156.47, 155.34, 129.67, 115.40, 77.67, 77.16, 76.65, 43.76, 40.97, 34.55, 28.19. See Fig. 6.25.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for $C_{16}H_{23}NO_4$ $[M+Na]^+$, $317.14 \text{ g mol}^{-1}$; found $317.15 \text{ g mol}^{-1}$. See 6.39a.

IX: 2-Tetrahydropyranyl-4-bromobutanate^[76]

Code: KK008



IX

Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
4-Bromobutyric acid	167.00	1	2.50		15.00
3,4-dihydro-2H-pyran	84.12	1.01		1.5	15.12
pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate	251.30	0.1	0.376		1.50
DCM	84.93			16	

4-Bromobutyric acid (2.50 g, 15.00 mmol) and 3,4-dihydro-2H-pyran (1.5 mL, 15.12 mmol) were dissolved in DCM and cooled down to 0 °C. To this solution was added pyridinium *p*-toluenesulfonate (0.376 g, 1.50 mmol) and stirred at 0 °C for 30 min and at ambient temperature for 4 h. The solution was washed three times with 4 % aq. Na₂CO₃ (100 mL) and three times with water (100 mL). The organic layer was then dried over Na₂SO₄. The solvent was removed to yield a viscous colorless oil (3.42 g, 13.68 mmol, 91%).

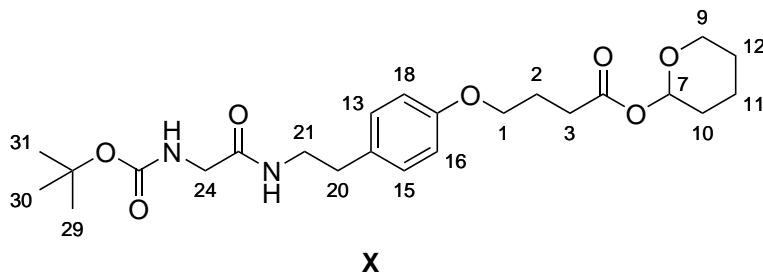
Chemical formula C₉H₁₅BrO₃. $M = 251.12 \text{ g mol}^{-1}$.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 5.99 (d, $J = 3.3 \text{ Hz}$, 1H, H⁸), 3.95 – 3.62 (m, 2H, 10), 3.48 (t, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 2H, H²), 2.56 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, H⁴), 2.19 (p, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 2H, H³), 1.88 – 1.51 (m, 6H, 11 - H¹³). See Fig. 6.26.

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 171.49, 92.86, 63.43, 32.87, 32.71, 29.26, 27.70, 25.01, 18.72. See Fig. 6.27.

X: Tetrahydropyranyl 4-(4-(2-(2-((tert-butylcarbamoyl)-amino)acetamido)ethyl)phenoxy)butanoate^[27]

Code: KK009



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
VIII	294.35	1	1.39		4.72
IX	251.12	1.50	1.90		7.08
K ₂ CO ₃	138.20	1.80	1.17		8.50
KI	166.0	0.19	0.148		0.897
acetone	58.08			15.0	

Tert-Butylcarbamoyl-2-oxoethyl-2-(4-hydroxyphenethyl)-amine **VIII** (1.39 g, 4.72 mmol) and 2-tetrahydropyranyl-4-bromobutanate **IX** (1.90, 7.08 mmol) were dissolved in acetone (15 mL) in an two necked flask with air condenser and a stirrer. K₂CO₃ and KI were added to the solution and stirred at 80 °C for three days. The solution was dissolved in EtOAc (50 mL), washed three times with water (50 mL) and one time with brine (50 mL) then dried over Na₂SO₄. The solvent was removed to yield a viscous yellow oil that was purified via column chromatography, eluting with 4% MeOH in DCM to obtain a yellow oil (2.09 g, 4.51 mmol, 95%).

Chemical formula C₂₄H₃₆N₂O₇. $M = 464.56 \text{ g mol}^{-1}$.

R_F (DCM with 4% MeOH) = 0.65.

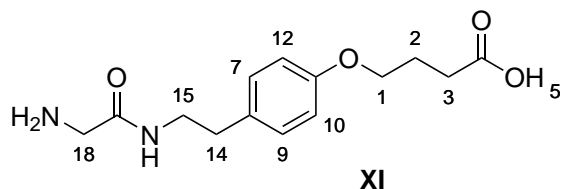
¹H NMR (250 MHz, Chloroform-d) δ 7.08 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H¹³, H¹⁵), 6.81 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁶, H¹⁸), 6.14 (s, 1H, H²⁶), 5.99 (d, $J = 3.9 \text{ Hz}$, 1H, H⁷), 5.13 (s, 1H, H²²), 4.04 - 3.80 (m, 2H, H⁹), 3.73 (d, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 2H, H²⁰), 3.47 (q, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, H²¹), 2.73 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H¹), 2.56 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H, H³), 2.12 (p, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, H²), 1.84 - 1.51 (m, 6H, 10 - H¹²), 1.43 (s, 9H, 29 - H³¹). See Fig. 6.28.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 172.00, 169.30, 157.53, 130.70, 129.67, 114.64, 92.63, 66.64, 63.31, 40.76, 34.73, 30.99, 29.19, 28.30, 24.92, 24.53, 18.66. See Fig. 6.29.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for C₂₄H₃₆N₂O₇ [M+Na]⁺, 487.24 g mol⁻¹; found 487.25 g mol⁻¹. See 6.39b.

XI: 4-(4-(2-(2-Aminoacetamido)ethyl)phenoxy)butanoic acid^[27]

Code: KK011



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
X	464,56	1	2.09		4.50
TFA	98.02			7.87	
DCM	84.93		31.00		

Tetrahydropyranyl 4-(4-(2-(2-((tert-butylcarbamoyl)amino)acetamido)ethyl)phenoxy)-butanoate **X** (2.09 g, 4.50 mmol) was dissolved in a mixture of TFA (7.87 mL) and DCM (31.00 mL) and stirred at ambient temperature for 120 min. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in Et₂O (100 mL) by sonicating for 10 min. A white precipitation was observed. The product was recovered by filtration. The solids were taken up in DCM with 20% MeOH and dried over Na₂SO₄. After removing the solvent under reduced pressure a white powder was obtained (1.25 g, 4.45 mmol, quant.).

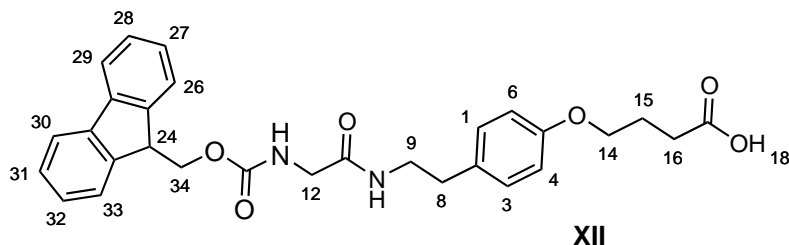
Chemical formula C₁₄H₂₀N₂O₄. $M = 280.32 \text{ g mol}^{-1}$.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ 6.95 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H⁷, H⁹), 6.68 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁰, H¹²), 3.84 (t, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁵), 3.42 (s, 2H, H¹⁸), 3.36 – 3.18 (m, 2H, H¹⁴), 2.60 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H¹), 2.35 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H, H³), 1.93 (p, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 2H, H²). See Fig. 6.30.

¹³C NMR (63 MHz, DMSO-d₆) δ 175.83, 165.69, 157.40, 130.57, 129.47, 114.44, 66.68, 49.73, 41.07, 40.18, 34.30, 30.41, 24.46. See Fig. 6.31.

XII: 4-(4-(2-(2-Fmoc-aminoacetamido)ethyl)phenoxy)butanoic acid^[27]

Code: KK013



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
XI	280,32	1	1,53		5,46
Fmoc-OSu	337,33		2,26		6,71
NEt ₃	101,19			1,87	5,46
H ₂ O				12,4	
ACN	101,19			12,4	

4-(4-(2-(2-Aminoacetamido)ethyl)phenoxy)butanoic acid **XI** (1.53 g, 5.46 mmol) was dissolved in a mixture of H₂O (12.4 mL) and NEt₃ (1.86 mL). Fmoc-OSu (2.26 g, 6.71 mmol) was dissolved by gentle heating in ACN (12.4 mL) and added to the aqueous solution. After stirring the reaction mixture at ambient temperature for 4 h the reaction mixture was concentrated to 10 mL. To the remaining solution 5% aq. citric acid (60 mL) was added. The mixture was extracted 4 times with 10 % MeOH in DCM (50 mL) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by recrystallization from EtOH (200 mL) to yield a white solid (1.08 g, 2.16 mmol, 40%).

Chemical formula C₂₉H₃₀N₂O₆. $M = 502.557 \text{ g mol}^{-1}$.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ 12.10 (s, 1H, H¹⁸) 7.87 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H, H²⁹, H³⁰), 7.71 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, H²⁶, H³³), 7.54-7.26 (m, 4H, H²⁷, H²⁸, H³¹, H³²), 7.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H¹, H³), 6.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H⁴, H⁶), 4.29 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, H³⁴), 4.20 (d, $J = 7.5$, 1H, H²⁴), 3.91 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H⁹) 3.56 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H¹¹), 3.23 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H⁸), 2.63 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H¹⁴), 2.36 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H¹⁶), 1.90 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, H¹⁵). See Fig. 6.32.

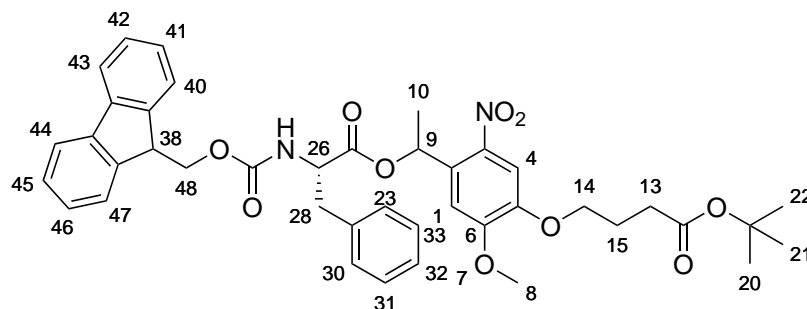
¹³C NMR (63 MHz, DMSO-d₆) δ 174.54, 169.31, 157.38, 156.90, 144.31, 141.18, 131.74, 130.01, 128.09, 127.52, 125.71, 120.56, 114.78, 66.93, 66.17, 47.12, 43.97, 40.92, 34.76, 30.59, 24.75. See Fig. 6.33.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for C₂₉H₃₀N₂O₆ [M+Na]⁺, 525.20 g mol⁻¹; found 525.25 g mol⁻¹. See 6.41a.

5.4 Synthesis of modified photo-cleavable linker

XIII: *Tert*-butyl-4-(4-(1-(2-(fmoc-amino)phenylalanyloxy)ethyl)-2-methoxy-5nitrophenoxy)butanoate

Code: KK024



XIII

Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
V	355.16	1	0.20		0.562
Fmoc-L-Phe-OH	387.44	1.55	0.337		0.872
EDC x HCl	191.70	1.81	0.195		1.01
DMAP	122.17	0.094	0.0064		0.0529
DCM				2	

To Fmoc-L-Phe-OH (0.337 g, 0.872 mmol), EDC x HCl (0.195 g, 1.01 mmol) and DMAP (6.4 mg, 0.0529 mmol) was added dry DCM (1.3 mL). The suspension becomes clear solution after stirring for 5 min and *tert*-Butyl 4-(4-(1-hydroxyethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate V (0.20 g, 0.562 mmol) in DCM (0.7 mL) was added. After stirring for 2 d at room temperature, the reaction mixture was washed twice with water (50 mL) and twice with sat. aq. NaHCO₃ (20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to afford a yellow powder that was further purified via column chromatography, eluting with 1% MeOH in DCM, yielding a light yellow powder (0.205 g, 0.282 mmol, 50%).

Chemical formula C₄₁H₄₄N₂O₁₀. $M = 724.81 \text{ g mol}^{-1}$.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 7.76 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H, H⁴³, H⁴⁴), 7.62 - 7.48 (m, 3H, H⁴⁰, H⁴⁷, H²⁷), 7.38 - 7.29 (m, 4H, H⁴¹, H⁴², H⁴⁵, H⁴⁶), 7.18 (d, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 2 H, H²³, H³⁰), 7.07 - 6.94 (m, 1 H, H¹), 6.89 (s, 1H, H³²), 6.40 (q, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 1H, H⁴), 5.30-5.18 (m, 1H, H⁹), 4.64 (q, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H, H³⁸) 4.45 - 4.24 (m, 2H, H²⁸), 4.23 - 3.95 (m, 2H, H⁴⁸), 3.87 (d, $J = 13.9 \text{ Hz}$, 3H, H⁸), 3.10 (dt, $J = 14.1, 6.6 \text{ Hz}$, 2H, H¹⁴), 2.43 (m, 2H, H¹³), 2.13 (h, $J = 7.1, 2\text{H}$, H¹⁵), 1.64 - 1.54

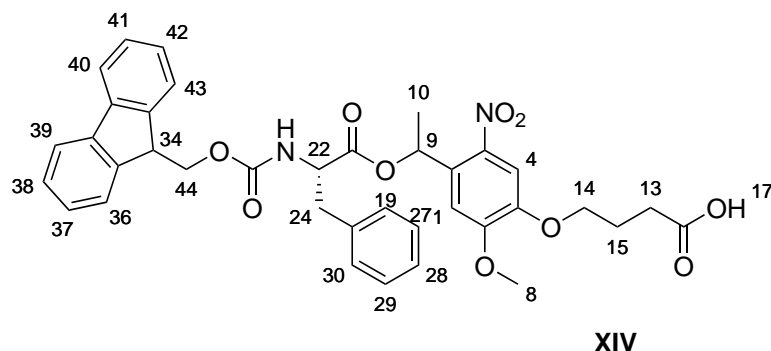
(m, 3H, H¹⁰), 1.45 (s, 9H, H²⁰–H²²). See Fig. 6.34.

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 172.14, 143.70, 129.28, 128.69, 127.73, 127.27, 127.05, 120.00, 80.55, 56.34, 31.80, 28.12, 24.43, 21.87. See Fig. 6.35.

LC-MS: (ESI+) *m/z* calc. for C₄₁H₄₄N₂O₁₀ [M+Na]⁺, 747.28 g mol⁻¹; found 747.30 g mol⁻¹.

XIV: 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)phenylalanyloxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid

Code: KK026



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
XIII	724.81	1	0.200		0.275
TFA	97.02	1		0.3	0.275
DCM				2.0	

To a solution of *tert*-Butyl-4-(4-(1-(2-(fmocamino)phenylalanyloxy)ethyl)-2-methoxy-5nitrophenoxy)butanoate **XIII** (200 mg, 0.275 mmol) in DCM (2 mL) was added TFA (0.30 mL). The light yellow suspension becomes a deep yellow clear solution. After stirring for 7 h at room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up with DCM and was washed twice with 0.5 N HCl (50 mL) and water (50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to afford a yellow powder that was further purified via column chromatography, eluting with 2% MeOH in DCM, yielding a light yellow solid (150 mg, 0.224 mmol, 81%).

Chemical formula C₃₇H₃₆N₂O₁₀. $M = 668.70 \text{ g mol}^{-1}$.

R_F (DCM with 2% MeOH) = 0.20.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 7.81 - 7.63 (m, 2H, H³⁹, H⁴⁰), 7.60 - 7.40 (m, 3 H, H³⁶, H⁴³, H²³), 7.40 - 7.08 (m, 4H, H³⁸, H³⁷, H⁴¹, H⁴²), 6.98 (dd, $J = 6.8$, 3.1 Hz, 1H, H²⁸), 6.86 (s, 1H, H¹), 6.50 - 6.18 (m, 1 H, H⁴) 5.26 (s, 3H, H⁸), 4.60 (dt, $J = 14.6$, 7.6 Hz, 1 H, H⁹), 4.41 - 4.19 (m, 1H, H³⁴) 4.11 - 4.08 (m, 2 H, H²⁴), , 3.83 (d, $J = 14.7$ Hz, 2H, H⁴⁴), 3.09 - 3.00 (m, 2 H, H¹⁴) 2.56 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H, H¹³), 2.13 (q, $J = 6.8$, 2H, H¹⁵), 1.53 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H¹⁰). See Fig. 6.36.

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ /ppm: 178.49, 171.26, 170.67, 155.73, 154.28, 154.05, 147.33, 147.21, 143.72, 141.28, 139.76, 139.37, 135.67, 135.49, 132.80, 132.10, 129.31, 129.14, 128.71, 128.62, 127.76, 127.29, 127.08, 125.00, 120.02, 117.49, 109.03, 108.52, 108.12, 69.95, 68.01, 67.13, 56.33, 55.27, 54.99, 53.48,

47.06, 38.44, 30.92, 30.27, 23.99, 22.07, 21.85. See Fig. 6.37.

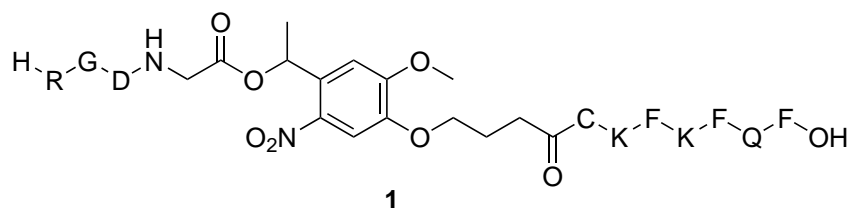
LC-MS: (ESI+) m/z calc. for $C_{37}H_{36}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$, $691.22 \text{ g mol}^{-1}$; found $691.25 \text{ g mol}^{-1}$. See 6.42a.

5.5 Synthesis of peptides

If not stated otherwise the synthesis procedures were according to the general protocol described in section 5.1.6.

1: RGD-PCL-CKFKFQF

Code: **KK038**



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
Fmoc-L-Phe-Wang-Resin (0.65 mmol/g)		1	0.74		0.05
VII	578.57	4	0.12	2	0.20
Fmoc-L-Phe-OH	387.44	5	0.24	3	0.25
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.54	5	0.290	3	0.25
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	610.70	5	0.250	1	0.25
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	585.71	5	0.240	2	0.25
Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	5	0.170	2	0.25
Fmoc-Gly-OH	297.31	5	0.120	2	0.25
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648.77	5	0.390	3	0.25
DIC	126.20	5	1.2	16	0.25
Oxyma	142.11	10	0.639	9	0.50
DMF				162	
20% piperidine in DMF				43	

Light Yellow solid. Chemical formula $\text{C}_{74}\text{H}_{104}\text{N}_{18}\text{O}_{21}\text{S}$. $M = 1613.81 \text{ g mol}^{-1}$.

Yield: 4 mg (0.0024 mmol, 0.05 %).

T_{ret} on preparative scale HPLC: 32.4 min.

LC-MS: (ESI-) m/z calc. for $\text{C}_{74}\text{H}_{104}\text{N}_{18}\text{O}_{21}\text{S} [\text{M}]^{-}$, $1612.73 \text{ g mol}^{-1}$; found $1612.20 \text{ g mol}^{-1}$. See 6.43a.

MALDI-TOF: $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ calc mass: 1613.7417, found mass: 1613.8237. See Fig. 5.6.

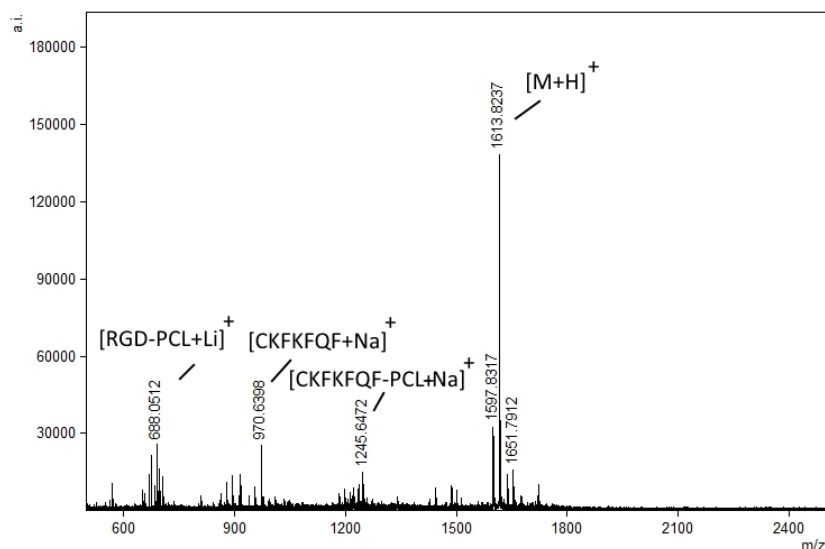
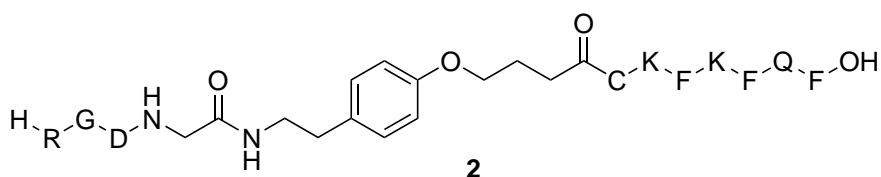


Fig. 5.3: MALDI-ToF-MS measurement of **1**.

2: RGD-NPCL-CKFKFQF

Code: **KK019**



The synthesis of **2** was divided in three parts. After preparing the sequence CKFKFQF on resin as described in general procedures, **XII** was coupled in an external glass vial by shaking in DMF (1 mL), HBTU (4 eq.) and DIPEA (5 eq.) at ambient temperature for 2 days. In the automated microwave assisted synthesizer the amino acids Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH were coupled as described in the general procedures.

Colorless solid. Chemical formula C₇₃H₁₀₄N₁₈O₁₈S. *M* = 1552.72 g mol⁻¹.

Yield: 3.2 mg (0.002 mmol, 4 %).

T_{ret} on preparative scale HPLC: 30.7 minutes.

LC-MS: (ESI-) *m/z* calc. for C₇₃H₁₀₄N₁₈O₁₈S. [M]⁻, 1536.75 g mol⁻¹; found 1536.40 g mol⁻¹. See 6.44a.

MALDI-TOF: [M+H]⁺ calc mass: 1537.7620, found mass: 1537.7080. See Fig. 5.4.

Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
Fmoc-Wang-Resin-L-Phe (0.65 mmol/g)		1	0.74		0.05
XII	578.57	4	0.12	2	0.20
Fmoc-L-Phe-OH	387.44	5	0.24	3	0.25
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.54	5	0.290	3	0.25
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	610.70	5	0.250	1	0.25
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	585.71	5	0.240	2	0.25
Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	411.45	5	0.170	2	0.25
Fmoc-Gly-OH	297.31	5	0.120	2	0.25
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	648.77	5	0.390	3	0.25
HBTU	379.24	4	0.08		0.20
DIPEA	129.25	5	0.425		0.25
DIC	126.20	5	1.2	16	0.25
Oxyma	142.11	10	0.639	9	0.50
DMF				162	
20% piperidine in DMF				43	

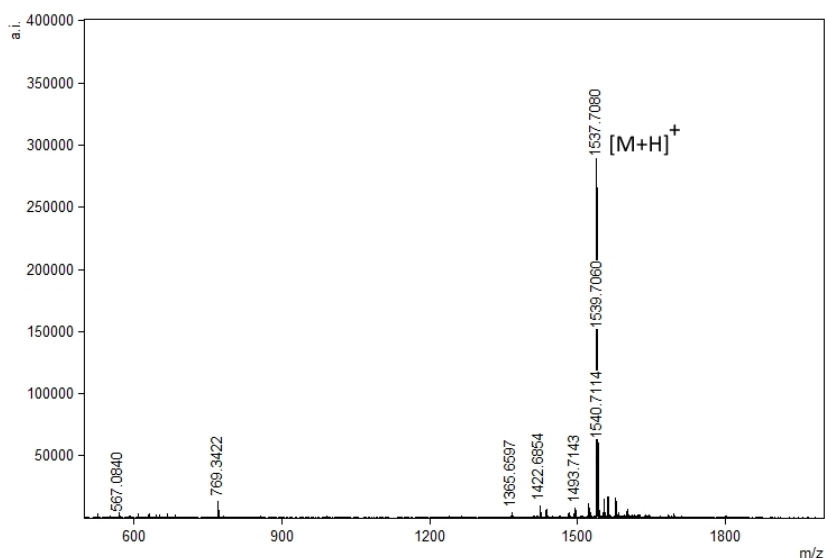
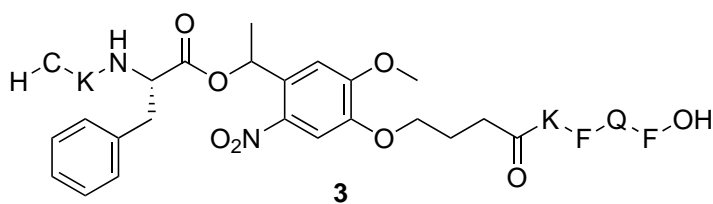


Fig. 5.4: MALDI-ToF-MS measurement of 2.

3: CK-Phe-PCL-FKFQF

Code: **KK036**



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
Fmoc-Wang-Resin-L-Phe (0.65 mmol/g)		1	0.74		0.05
XIV	668.70	4	0.16	2	0.20
Fmoc-L-Phe-OH	387.44	5	0.16	3	0.25
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.54	5	0.290	3	0.25
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	610.70	5	0.250	1	0.25
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	585.71	5	0.240	2	0.25
DIC	126.20	5	1.2	16	0.25
Oxyma	142.11	10	0.355	5	0.50
DMF				89	
20% piperidine in DMF				20	

Light yellow solid. Chemical formula $\text{C}_{60}\text{H}_{81}\text{N}_{11}\text{O}_{15}\text{S}$. $M = 1227.56 \text{ g mol}^{-1}$.

Yield: 2 mg (0.002 mmol, 3 %)..

T_{ret} on preparative scale HPLC: 35.5 minutes.

LC-MS: (ESI+) m/z calc. for $\text{C}_{60}\text{H}_{81}\text{N}_{11}\text{O}_{15}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $1228.57 \text{ g mol}^{-1}$; found $1228.25 \text{ g mol}^{-1}$. See 6.46a.

MALDI-TOF: $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc. mass: 1228.5707, found mass: 1228.7535. See Fig. 5.5.

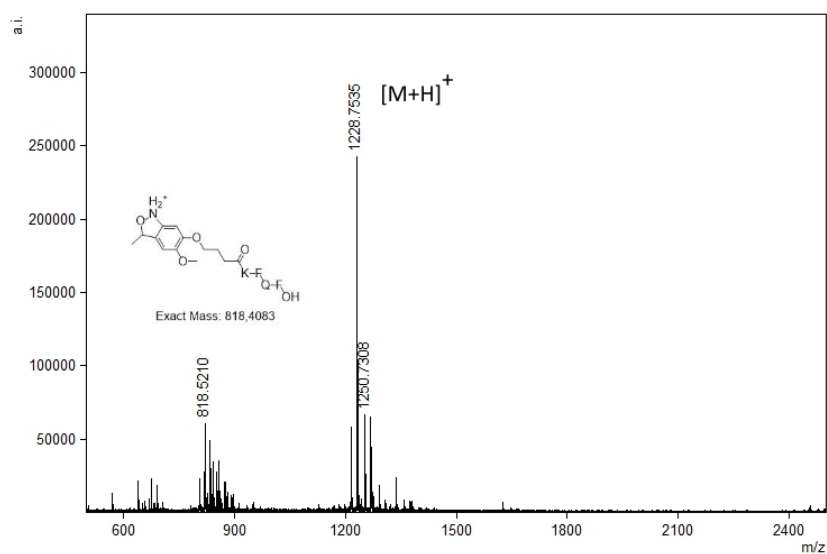
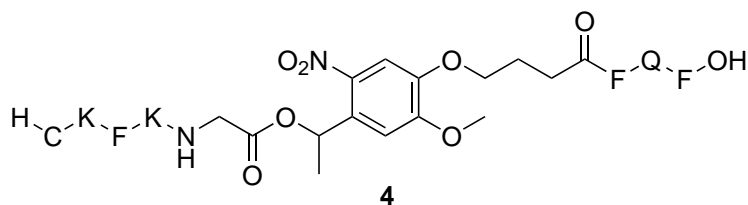


Fig. 5.5: MALDI-ToF-MS measurement of **3**.

4: CKFK-PCL-FQF

Code: KK037



Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
Fmoc-Wang-Resin-L-Phe (0.65 mmol/g)		1	0.74		0.05
VII	578.57	4	0.12	2	0.20
Fmoc-L-Phe-OH	387.44	5	0.16	3	0.25
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.54	5	0.290	3	0.25
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	610.70	5	0.250	1	0.25
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	585.71	5	0.240	2	0.25
DIC	126.20	5	1.2	16	0.25
Oxyma	142.11	10	0.355	5	0.50
DMF				89	
20% piperidine in DMF				20	

Light yellow solid. Chemical formula $\text{C}_{62}\text{H}_{84}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{S}$. $M = 1284.58 \text{ g mol}^{-1}$

Yield: 7 mg (0.005 mmol, 10 %).

T_{ret} on preparative scale HPLC: 35.0 minutes.

LC-MS: (ESI-) m/z calc. for $\text{C}_{62}\text{H}_{84}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^{-}$, $1282.57 \text{ g mol}^{-1}$; found 1282.90 g mol^{-1} . See 6.45a.

MALDI-TOF: $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ calc mass: 1285.5922, found mass: 1285.7297. See Fig. 5.6.

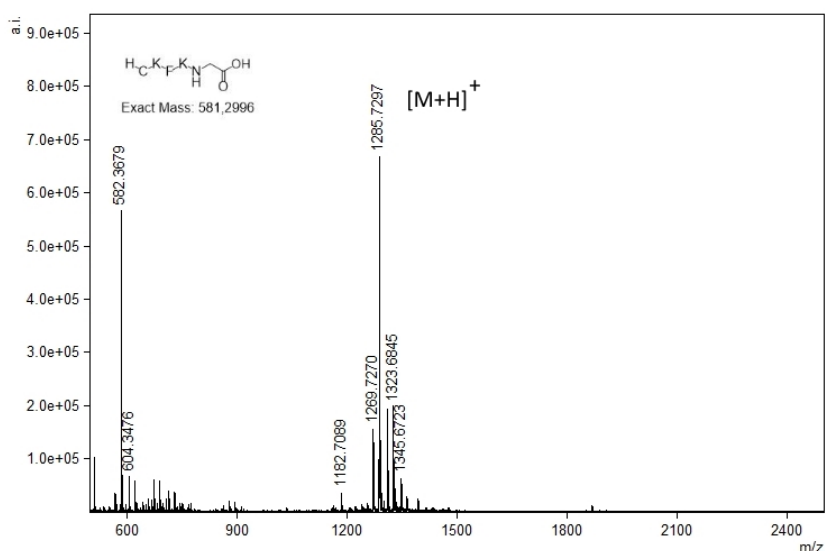
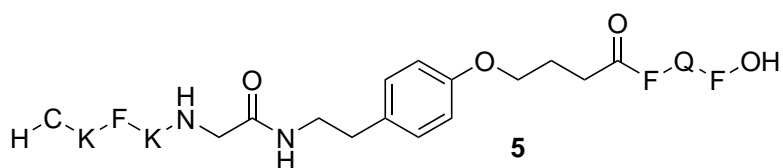


Fig. 5.6: MALDI-ToF-MS measurement of 4.

5: CKFK-NPCL-FQF

Code: **KK046**



The synthesis of **7** was divided in three parts. After preparing the sequence FQF on resin as described in general procedures, **XII** was coupled in a external glass vial by shaking in DMF (1 mL), HBTU (4 eq.) and DIPEA (5 eq.) at ambient temperature for 2 days. In the automated microwave assisted synthesizer the amino acids Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH were coupled as described in general procedures to the resin.

Colorless solid. Chemical formula $C_{61}H_{84}N_{12}O_{12}S$. $M = 1208.60 \text{ g mol}^{-1}$.

LC-MS: (ESI-) m/z calc. for $C_{61}H_{84}N_{12}O_{12}S$ $[M]^{-}$, $1208.60 \text{ g mol}^{-1}$; found $1208.05 \text{ g mol}^{-1}$. See 6.47a.

MALDI-TOF: $[M+H]^{+}$ calc mass: 1209.6125 , found mass: 1209.8360 . See Fig. 5.7.

Compound	$\frac{M}{\text{g mol}^{-1}}$	eq.	$\frac{m}{\text{g}}$	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{n}{\text{mmol}}$
Fmoc-Wang-Resin-L-Phe (0.65 mmol/g)		1	0.74		0.05
XII	502.57	4	0.12	2	0.20
Fmoc-L-Phe-OH	387.44	5	0.24	3	0.25
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	468.54	5	0.290	3	0.25
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	610.70	5	0.250	1	0.25
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	585.71	5	0.240	2	0.25
HBTU	379.24	4	0.08		0.20
DIPEA	129.25	5	0.425		0.25
DIC	126.20	5	1.2	16	0.25
Oxyma	142.11	10	0.639	9	0.50
DMF				162	
20% piperidine in DMF				43	

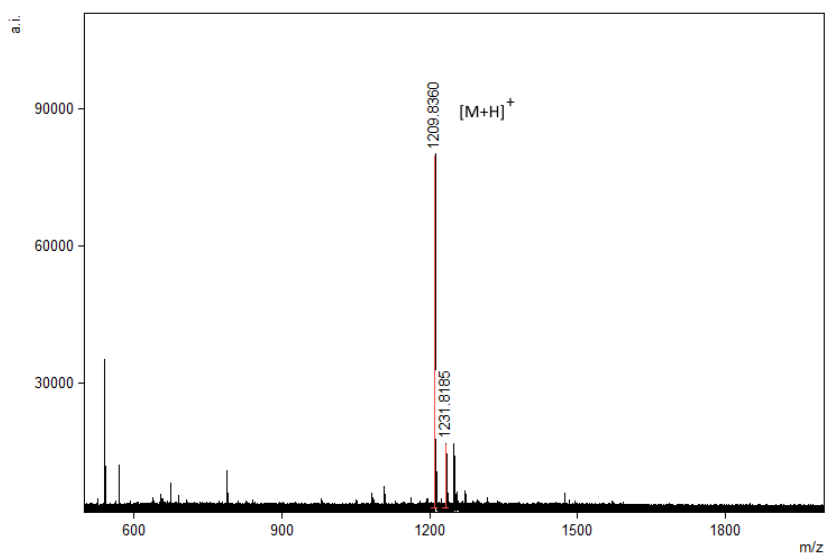
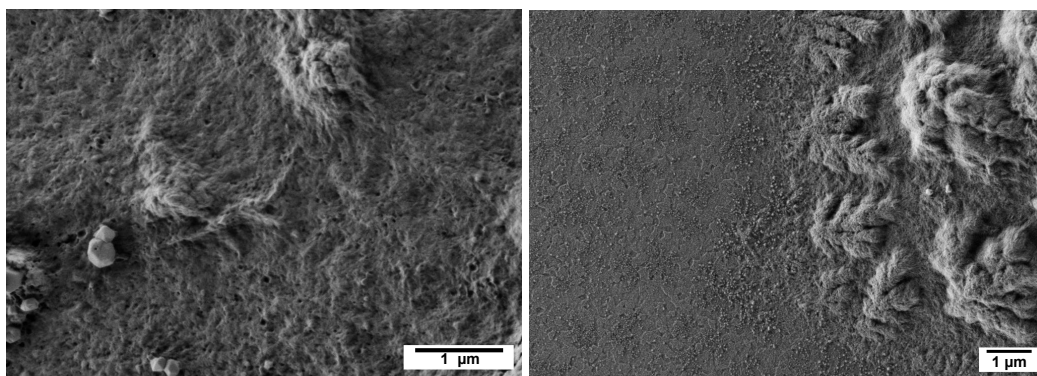


Fig. 5.7: MALDI-ToF-MS measurement of 5.

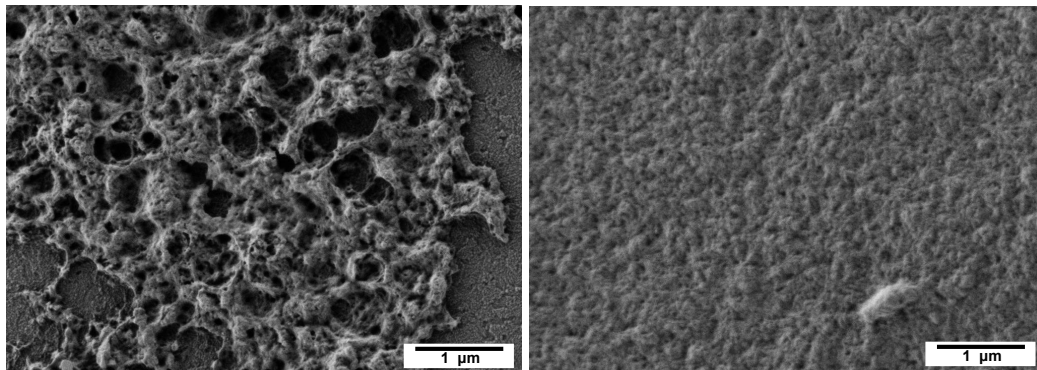
Anhang

6.1 REM-Aufnahmen

In Abb. 6.1 und Abb. 6.2 sind REM-Aufnahmen der Beschichtungsergebnisse verschiedener Techniken gezeigt. Die Diskussion befindet sich auf Seite 48.

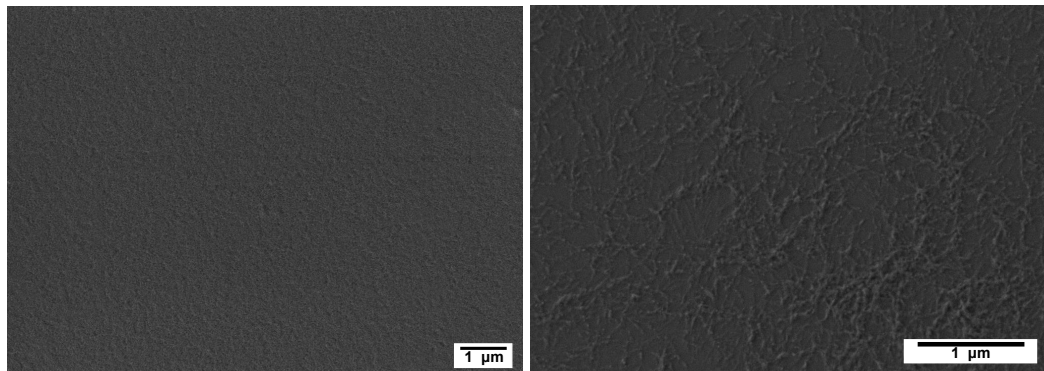


(a) *Drop-Casting* und anschließendes Trocknen. (b) *Spin-Coating* (1 Min. bei 2000 U/min).

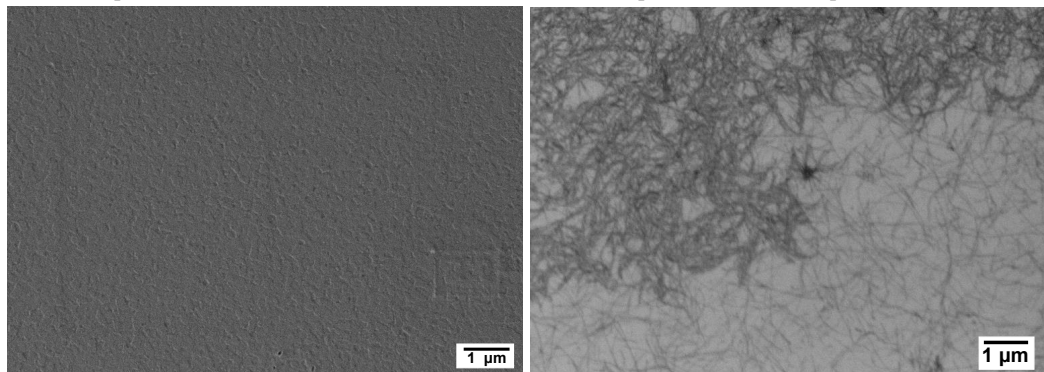


(c) *Drop-Casting* des Peptids in PBS Lösung anstelle MilliQ Wasser und anschließendes Trocknen. (d) *Spin-Coating* auf Siliziumplatte (1 Min. bei 2000 U/min).

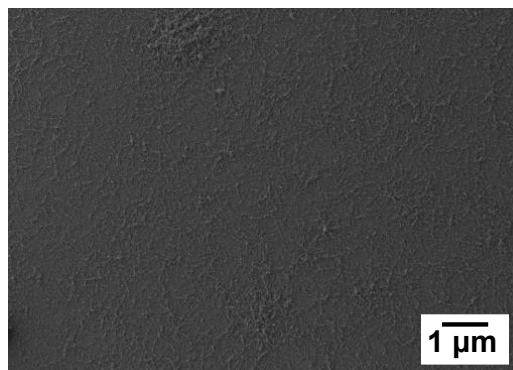
Abb. 6.1: REM-Messungen des fibrillierten Peptids CKFKFQF unter verschiedenen Beschichtungsbedingungen.



(a) Inkubieren über 2 Tage in gesättigter wässriger Atmosphäre auf ITO Glas. (b) Inkubieren über 2 Tage in gesättigter wässriger Atmosphäre auf Siliziumplatte.



(c) 0.1 mg / mL Peptidlösung inkubiert in gesättigter wässriger Atmosphäre über 2 Tage auf ITO Glas. (d) 0.1 mg / mL Peptidlösung inkubiert in gesättigter wässriger Atmosphäre über 2 Tage auf Siliziumplatte.



(e) *Drop-Casting* einer 0.1 mg/ mL Peptidlösung auf Siliziumplatte.

Abb. 6.2: REM-Messungen des fibrillierten Peptids CKFKFQF unter verschiedenen Bedingungen. Die Präparation auf ITO Glas wurden auf Siliziumplatte wiederholt um die Messung gegenüber stellen zu können, da auf der Siliziumplatte aufgrund der niedrigeren Oberflächenrauigkeit Peptidfibrillen im REM besser dargestellt werden können.

6.2 UV-Transmission der graduell bedruckten PET-Folie

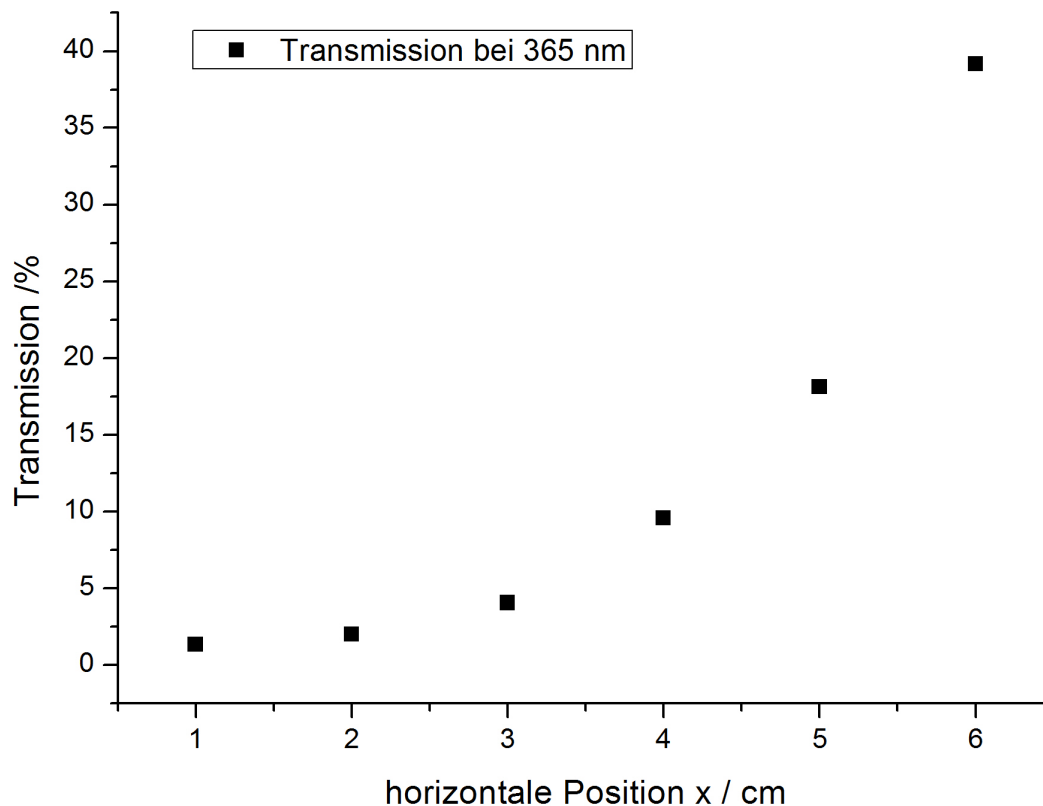


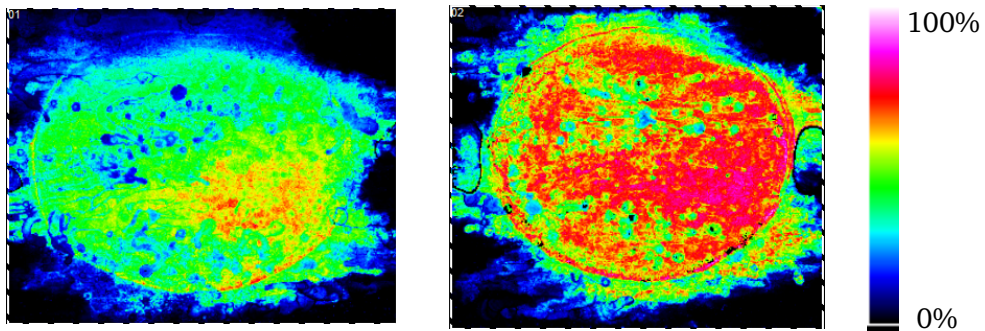
Abb. 6.3: Transmission der graduell bedruckten PET Folie bei 365 nm. Diese Folie wurde an verschiedenen Positionen in x -Richtung des Bedruckungsgradienten gemessen und als Photomaske für die Optimierungsversuche der graduellen Bestrahlung genutzt. Die Spektren wurde mittels eines UV-VIS Spektrometers von 300 - 500 nm gemessen, indem die Folie in den Strahlengang gestellt wurden. Es wurden dann die Transmissionswerte bei 365 nm gegen die Position aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass bei vollständiger Bedruckung (Position x : 1 cm) lediglich eine Transmission von 1% und bei keiner Bedruckung (6cm) eine Transmission von etwa 40% zu erkennen ist. Diese Folie wurde jedoch nicht unter optimierten Bedingungen genutzt, da keine klare Trennschärfe zu erkennen war. Siehe Diskussion auf Seite 58 ff.

6.3 MALDI-Imaging

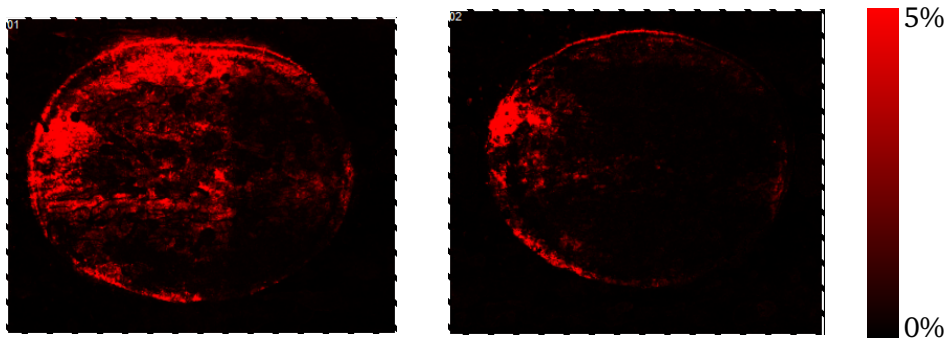
a) Bestrahlungsintensität



b) Ergebnis: 404.27 Da \pm 0.25%



c) Ergebnis: 1613.91 Da \pm 0.25%



5 mm

Abb. 6.4: MALDI-Imaging Messung.

a) Die rechte Probe wurde mit einer mit schwarzer Tinte halb bedruckten PET-Folie (linke Seite bedruckt, rechte Seite unbedruckt) mit Kontakt bedeckt und für 1,5 Minuten bestrahlt. Die linke Probe wurde mit einer mit schwarzer Tinte graduell bedruckten PET-Folie (Gradient von links nach rechts) bedeckt und für 1,5 Minuten bestrahlt.

b) In der bunten Farbskalierung ist die Intensität des Fragments bei 404 g/mol gezeigt.

c) In der roten Farbskalierung ist die Intensität des Ausgangspeptids bei 1613 g/mol gezeigt.

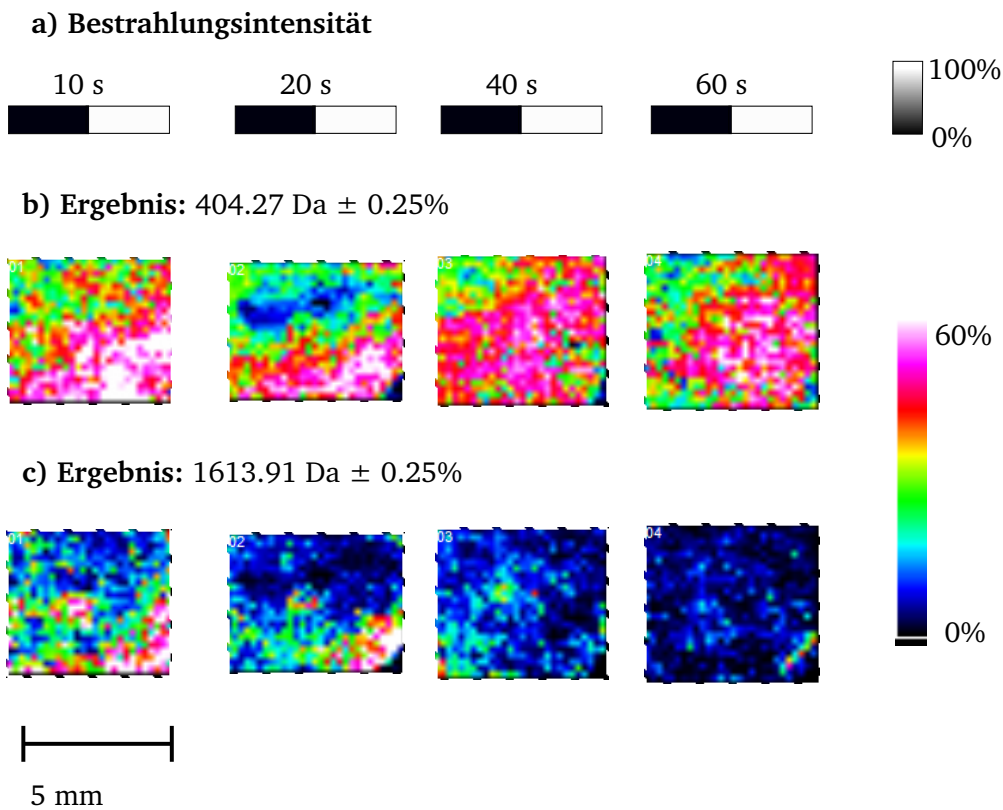


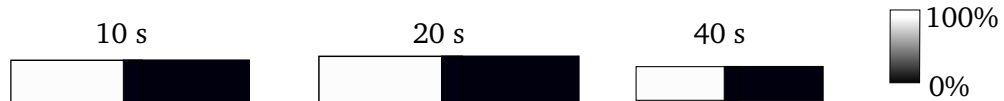
Abb. 6.5: MALDI-Imaging Messung.

a) Die linke Hälfte der Proben wurde mit einer mit schwarzer Tinte halb bedruckten PET-Folie, die rechte Hälfte mit einer unbedruckten PET-Folie bedeckt und von links nach rechts für 10 s, 20 s, 40 s und 60 s bestrahlt.

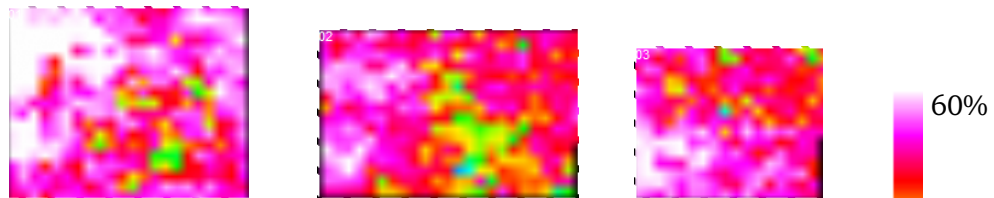
b) In der bunten Farbskalierung ist die Intensität des Abspaltfragments RGDG bei 404 g/ mol gezeigt.

c) In der bunten Farbskalierung ist die Intensität des Ausgangspeptids 1 bei 1613 g/ mol gezeigt.

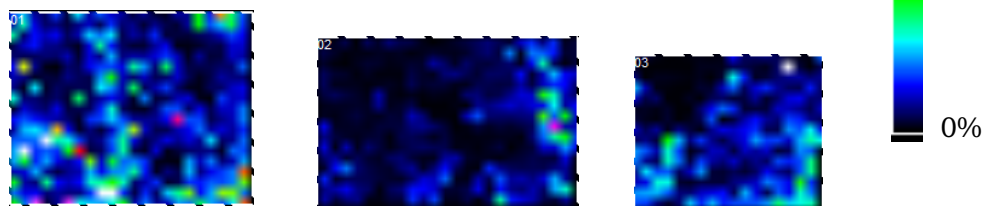
a) Bestrahlungsintensität



b) Ergebnis: 404.27 Da \pm 0.25%



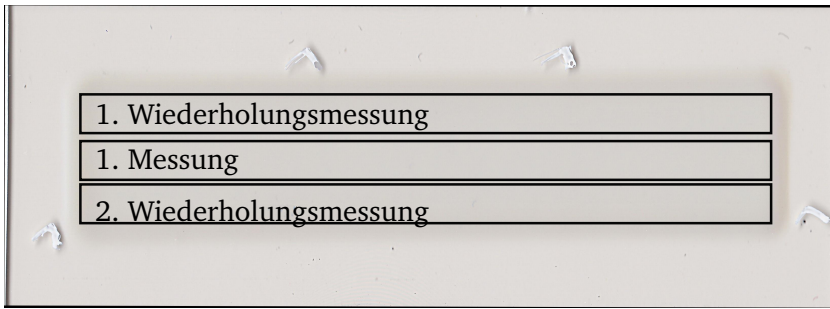
c) Ergebnis: 1613.91 Da \pm 0.25%



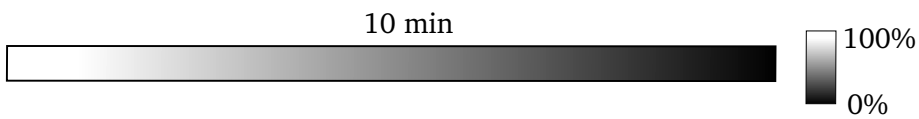
2 mm

Abb. 6.6: MALDI-Imaging Messung.

- Die rechte Hälfte der Proben wurde mit einer mit Aluminium-Folie bedeckt, die linke Hälfte unbedeckt und von links nach rechts für 10 s, 20 s, 40 s bestrahlt.
- In der bunten Farbskalierung ist die Intensität des Abspaltfragments RGDG bei 404 g/ mol gezeigt.
- In der bunten Farbskalierung ist die Intensität des Ausgangs-peptids 1 bei 1613 g/ mol gezeigt.



a) Bestrahlungsintensität

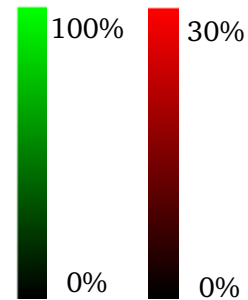
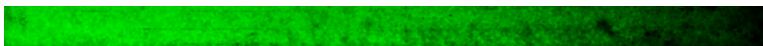


b) Ergebnis: 404.27 Da ± 0.25%

1. Wiederholungsmessung



2. Wiederholungsmessung



c) Ergebnis: 1613.91 Da ± 0.25%

1. Wiederholungsmessung



2. Wiederholungsmessung



5 mm

Abb. 6.7: MALDI-Imaging Messung.

Oben: Es sind die verschiedenen Bereiche in ihrer Messreihenfolge gezeigt.

a) Von links nach rechts wurde die Abdeckung aus Pappe über 10 Minuten geöffnet. Dabei wurde der erste Abschnitt (ca. 0,5 cm) 5 Minuten länger bestrahlt als die restliche Probe und der rechte äußere Abschnitt (ca. 0,5 cm) nicht bestrahlt.

b) In grüner Farbskalierung ist die Intensität des Abspaltfragments RGDG bei 404 g/mol gezeigt. c) In roter Farbskalierung ist die Intensität des Ausgangspeptids 1 bei 1613 g/mol gezeigt.

Ergebnis: 1613.91 Da und 404.27 Da

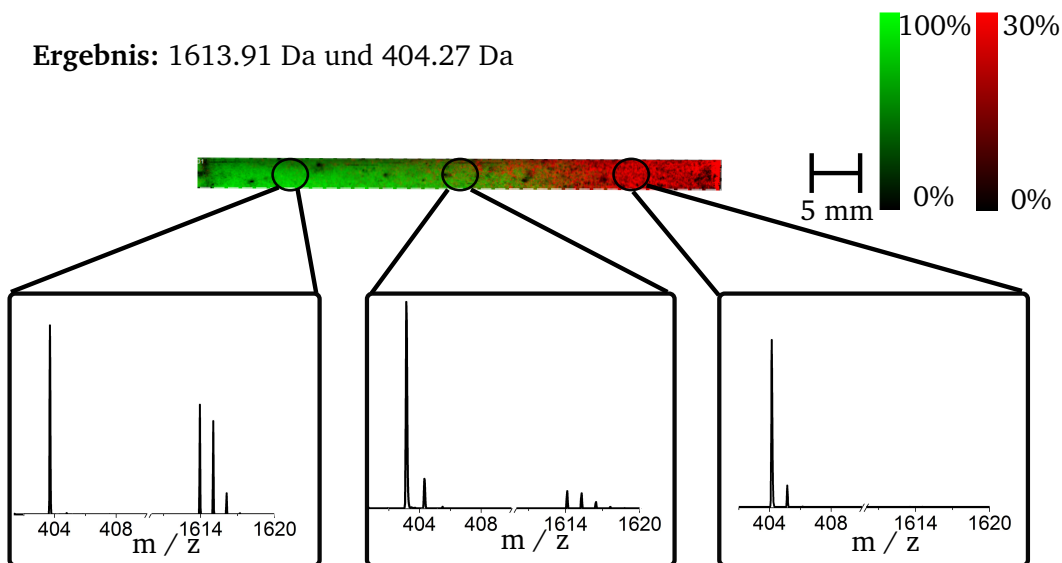
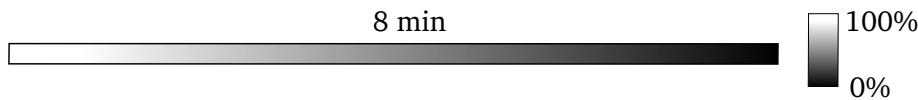
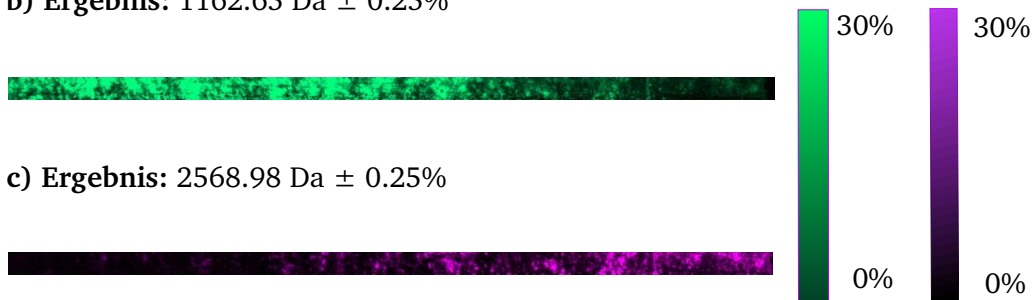


Abb. 6.8: MALDI-Imaging Messung mit beispielhaften Spektren zu den gemessenen Bereichen. Von links nach rechts wurde die Abdeckung aus Pappe über 10 Minuten geöffnet. Dabei wurde der erste Abschnitt (ca. 0,5 cm) 5 Minuten länger bestrahlt als die restliche Probe und der rechte äußere Abschnitt (ca. 0,5 cm) nicht bestrahlt. Es sind die Messungen des Spaltfragments RGDG (grün) bei 404 g/mol und des Ausgangspeptids 1 (rot) bei 1613 g/mol in einem Bild zusammengelegt.

a) Bestrahlungsintensität



b) Ergebnis: 1162.65 Da ± 0.25%



c) Ergebnis: 2568.98 Da ± 0.25%



Abb. 6.9: MALDI-Imaging Messung:

- a) Von links nach rechts wurde die Abdeckung aus Pappe über 8 Minuten geöffnet. Dabei wurde der erste Abschnitt (ca. 0,5 cm) 5 Minuten länger bestrahlt als die restliche Probe und der rechte äußere Abschnitt (ca. 0,5 cm) nicht bestrahlt.
- b) In hellgrüner Farbskalierung ist die Intensität des dimeren Abspaltfragments GKFCKCKFKG bei 1162 g/mol gezeigt.
- c) In violetter Farbskalierung ist die Intensität des dimeren Ausgangspeptids 4 bei 2568 g/mol gezeigt.

6.4 NMR-Spectra

¹H-NMR, KK001, CDCl₃, 250 MHz

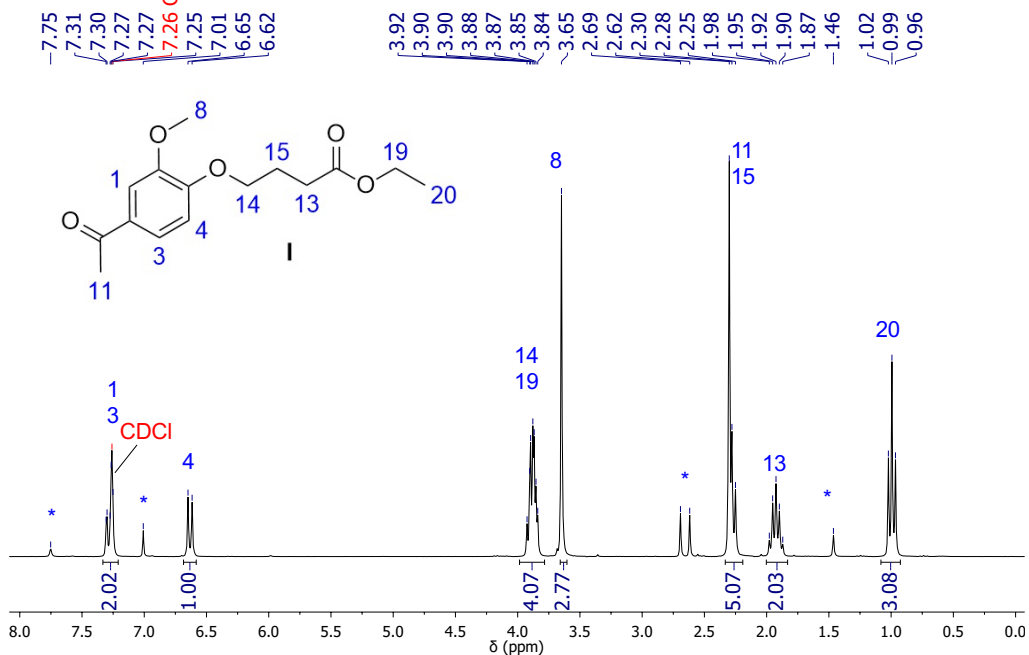


Fig. 6.10: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of I, Ethyl 4-(4-acetyl-2-methoxyphenoxy)butanoate.

¹³C-NMR, KK001, CDCl₃, 63 MHz

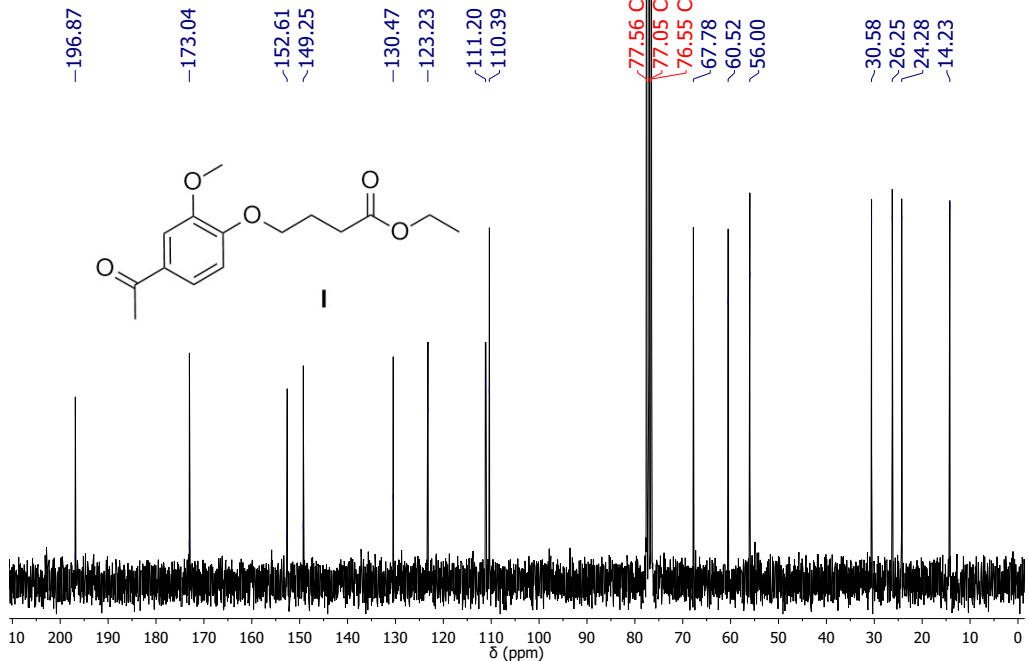


Fig. 6.11: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of I, Ethyl 4-(4-acetyl-2-methoxyphenoxy)butanoate.

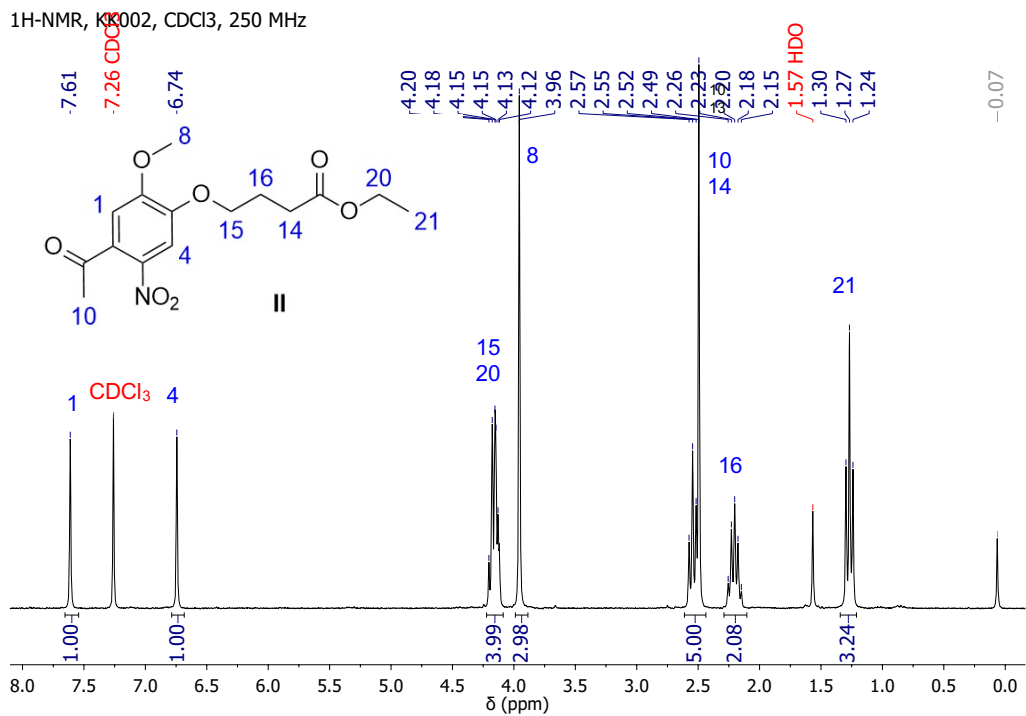


Fig. 6.12: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of II, Ethyl 4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

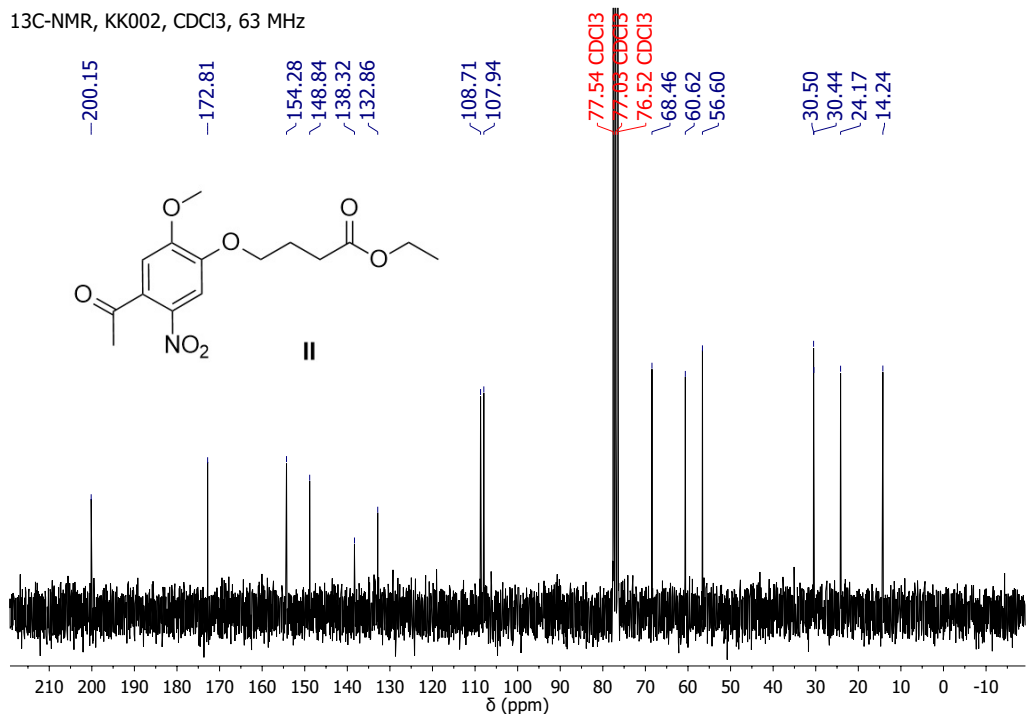


Fig. 6.13: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of II, Ethyl 4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

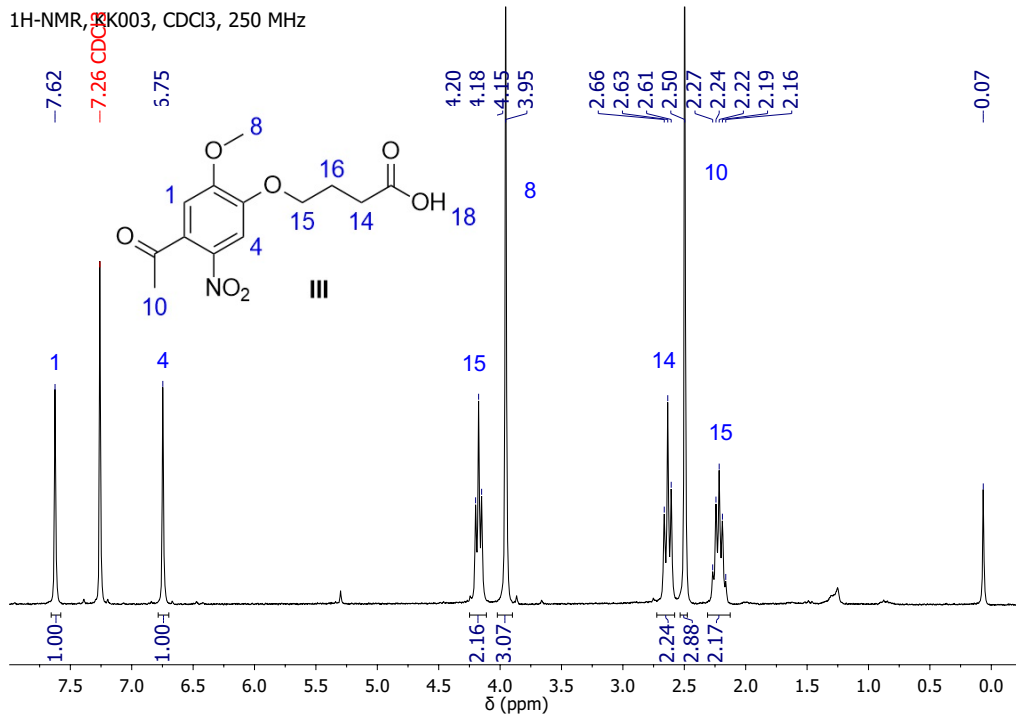


Fig. 6.14: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **III**, 4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid.

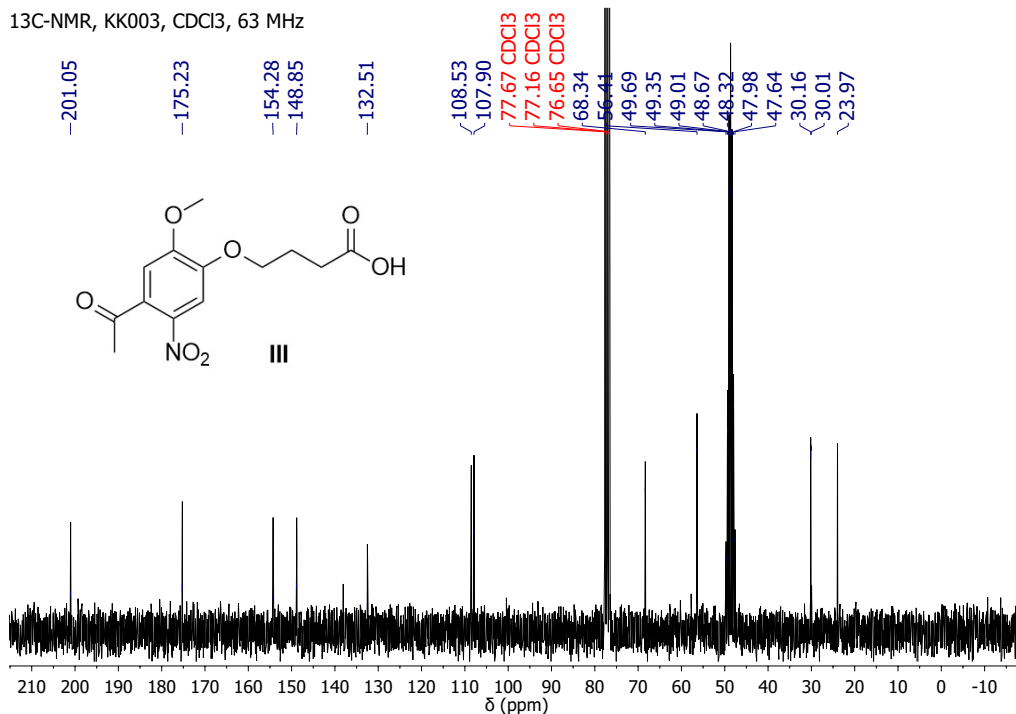


Fig. 6.15: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **III**, 4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid.

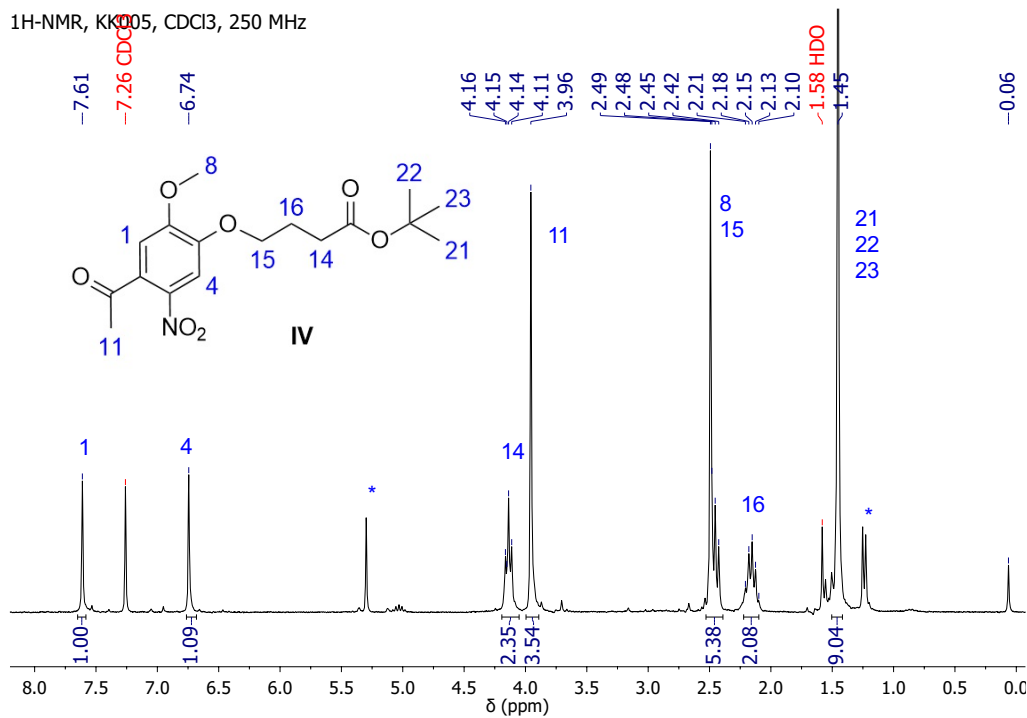


Fig. 6.16: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **IV**, *tert*-Butyl 4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

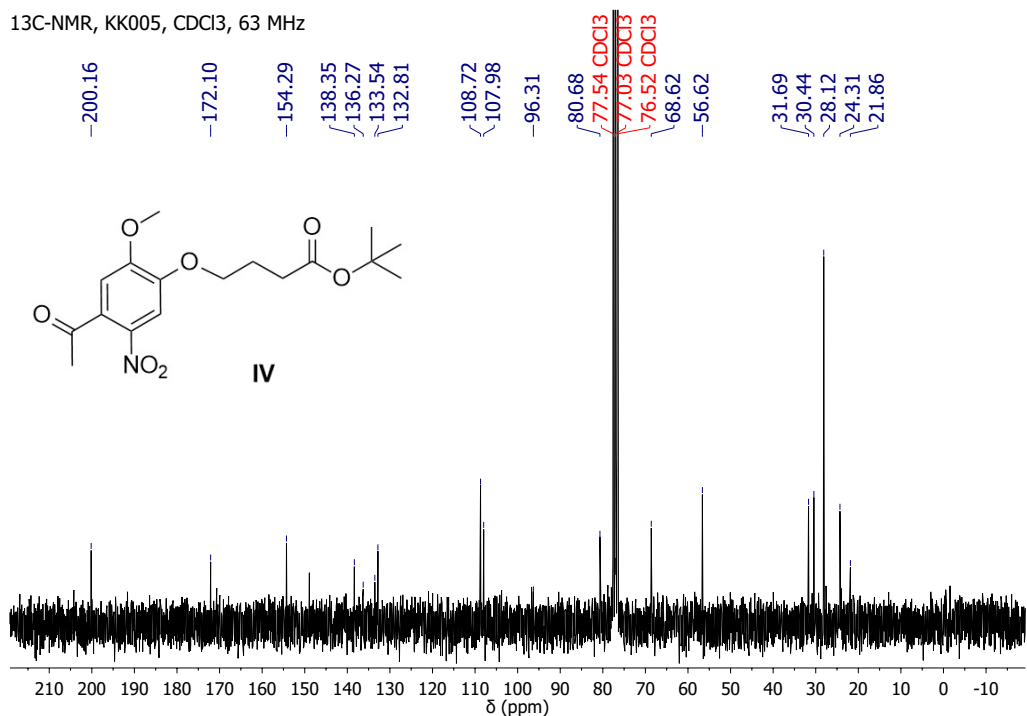


Fig. 6.17: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **IV**, *tert*-Butyl 4-(4-acetyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

¹H-NMR, KK006, CDCl₃, 250 MHz

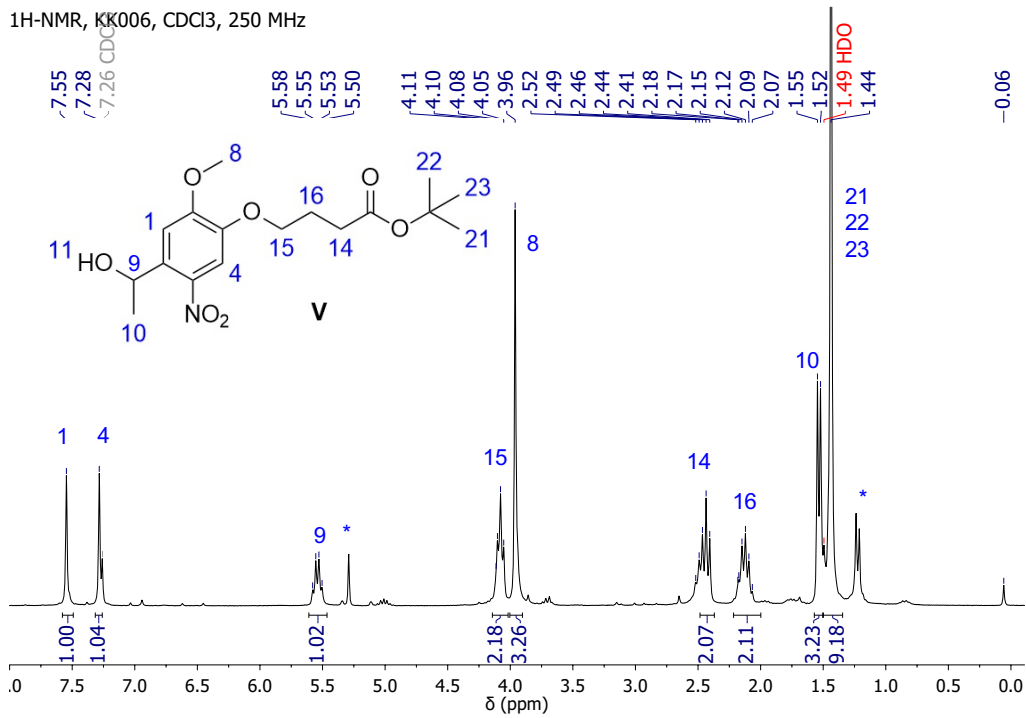


Fig. 6.18: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **V**, *tert*-Butyl 4-(4-(1-hydroxyethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

¹³C-NMR, KK006, CDCl₃, 63 MHz

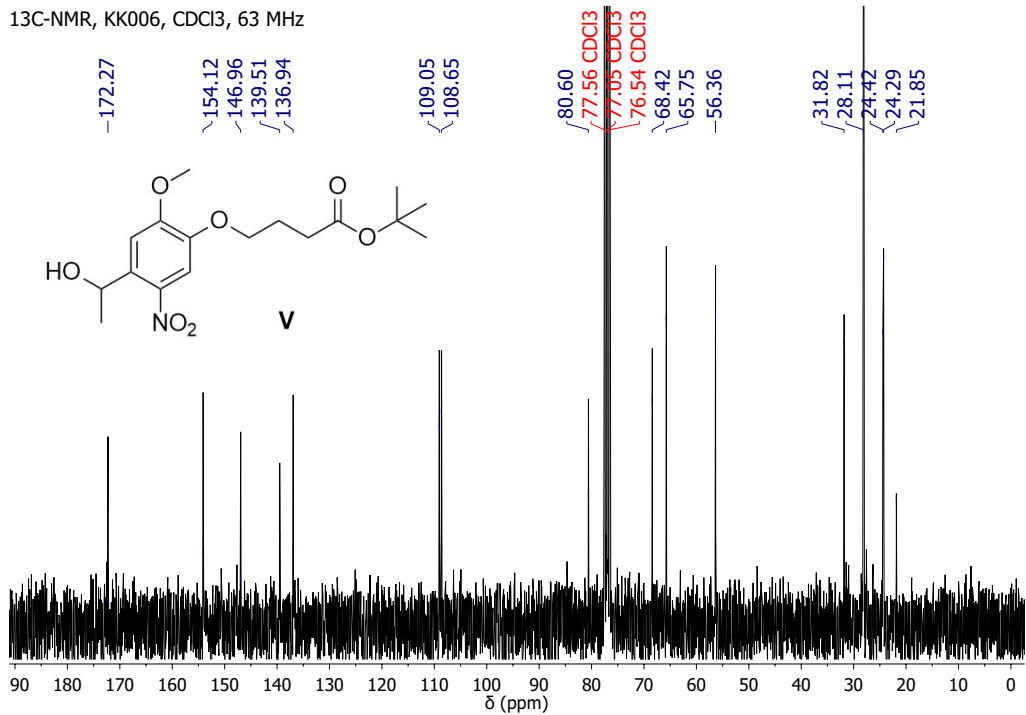


Fig. 6.19: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **V**, *tert*-Butyl 4-(4-(1-hydroxyethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

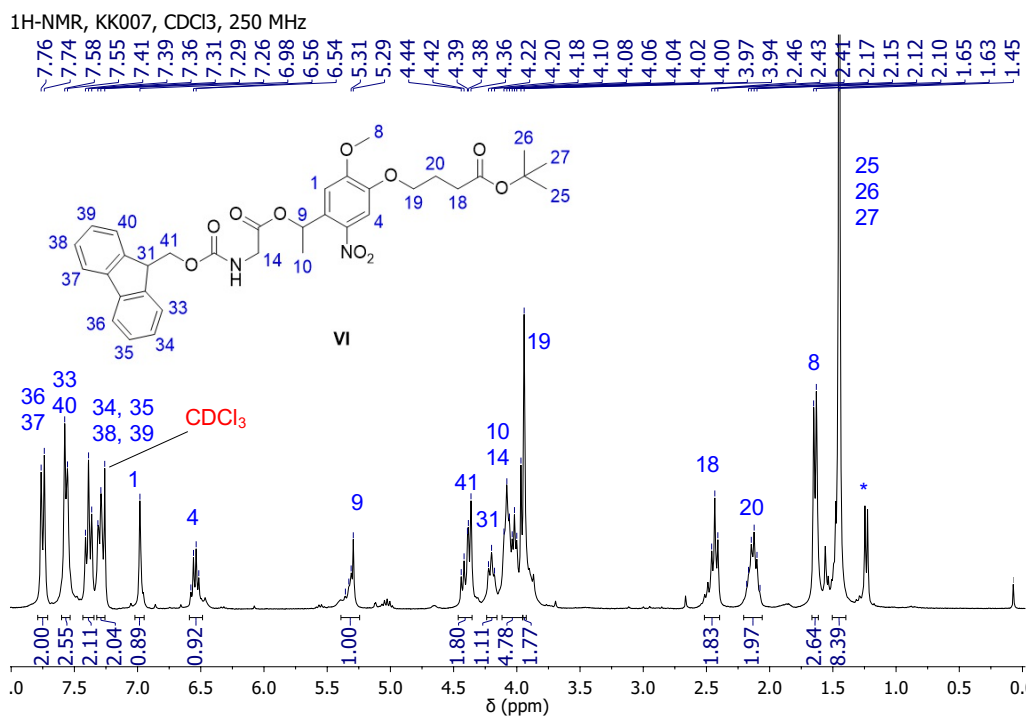


Fig. 6.20: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of VI, *tert*-Butyl 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)acetoxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

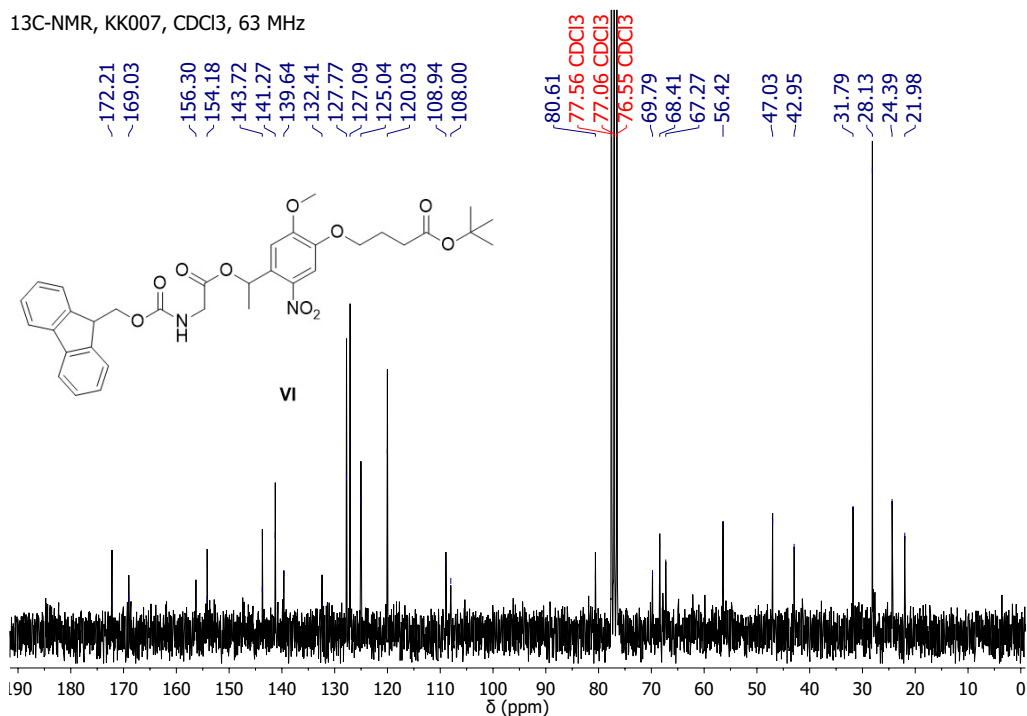


Fig. 6.21: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of VI, *tert*-Butyl 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)acetoxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

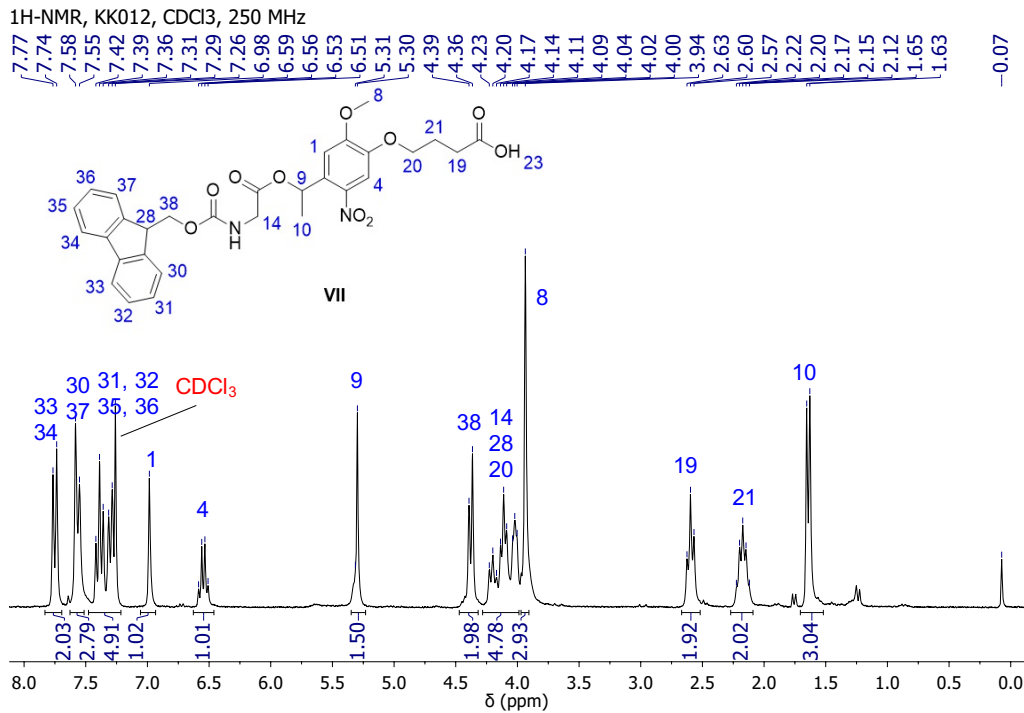


Fig. 6.22: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **VII**, 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)acetoxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid.

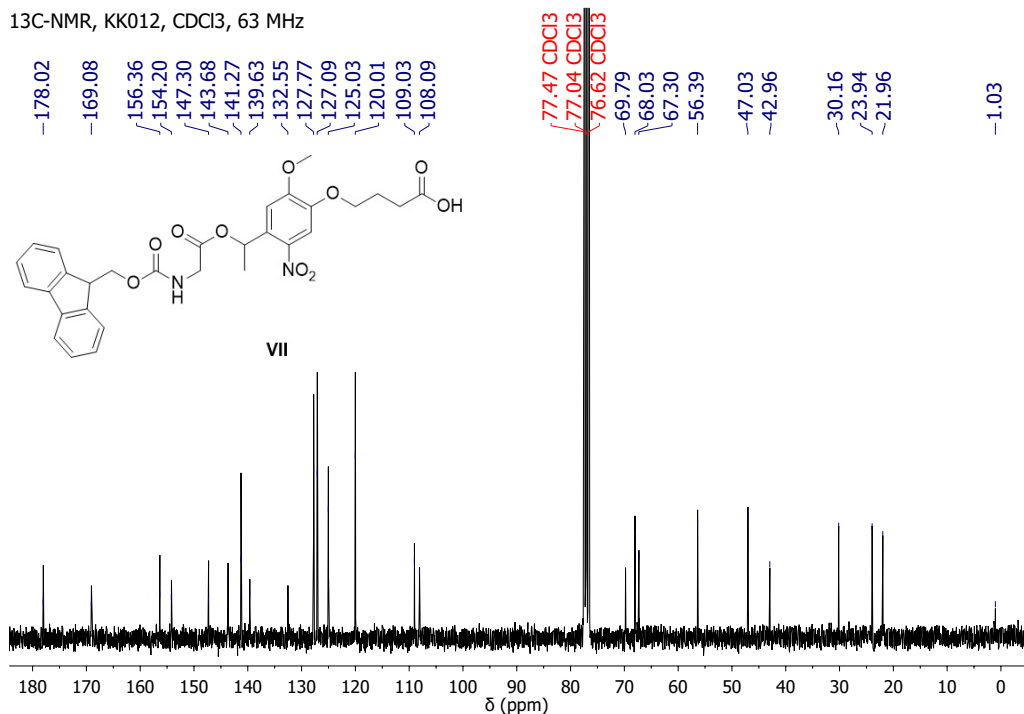


Fig. 6.23: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **VII**, 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)acetoxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid.

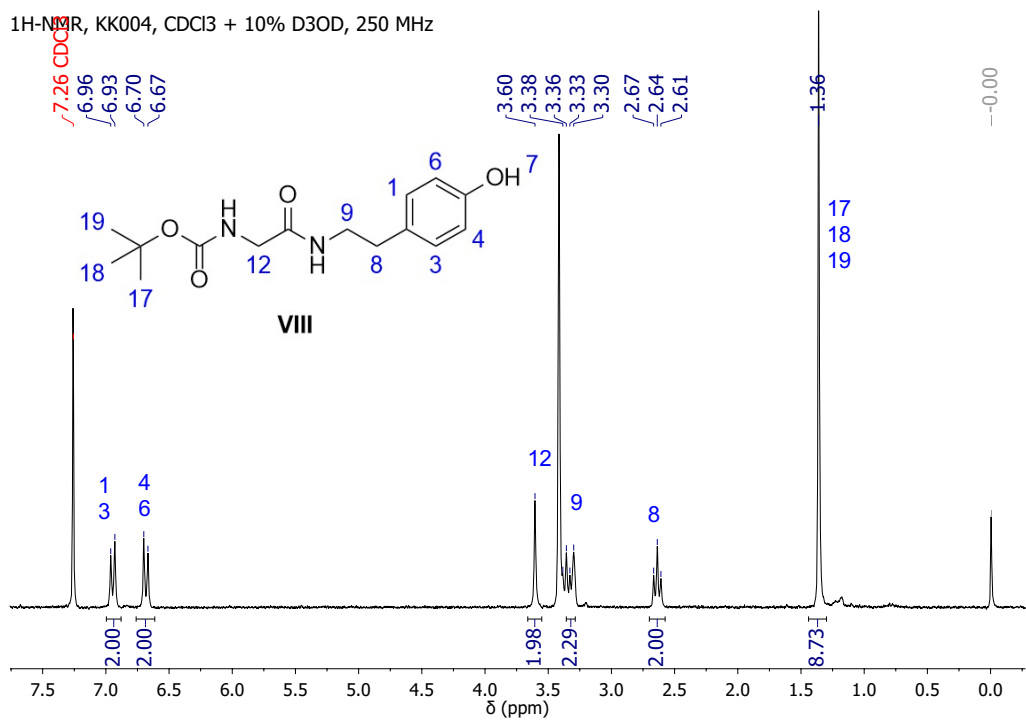


Fig. 6.24: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃ with 10% D₃OD, 25 °C) spectrum of **VIII**, *tert*-Butylcarbamoyl-2-oxoethyl-2-(4-hydroxyphenethyl)-amine.

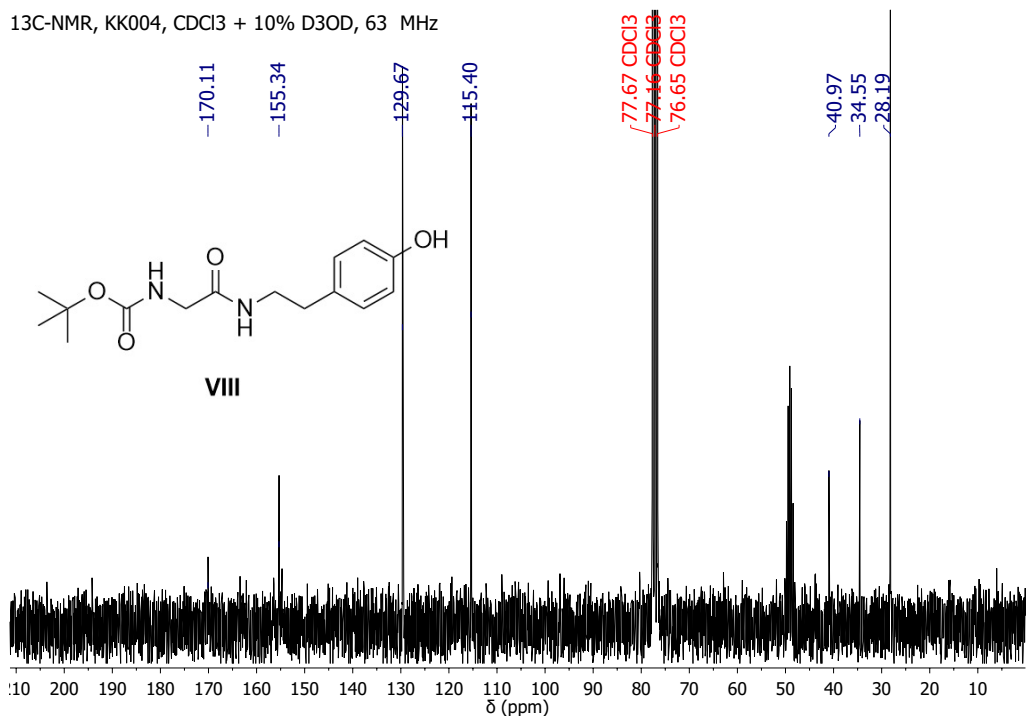


Fig. 6.25: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃ with 10% D₃OD, 25 °C) spectrum of **VIII**, *tert*-Butylcarbamoyl-2-oxoethyl-2-(4-hydroxyphenethyl)-amine.

¹H-NMR, KK008, CDCl₃, 250 MHz

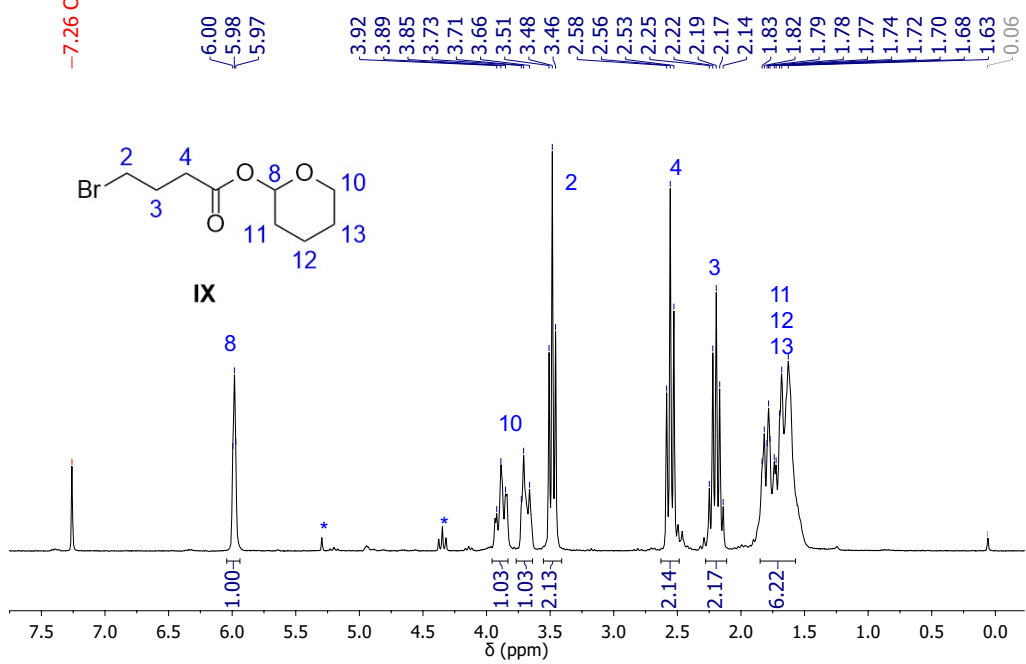


Fig. 6.26: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of IX, 2-Tetrahydropyranyl-4-bromobutanoate.

¹³C-NMR, KK008, CDCl₃, 63 MHz

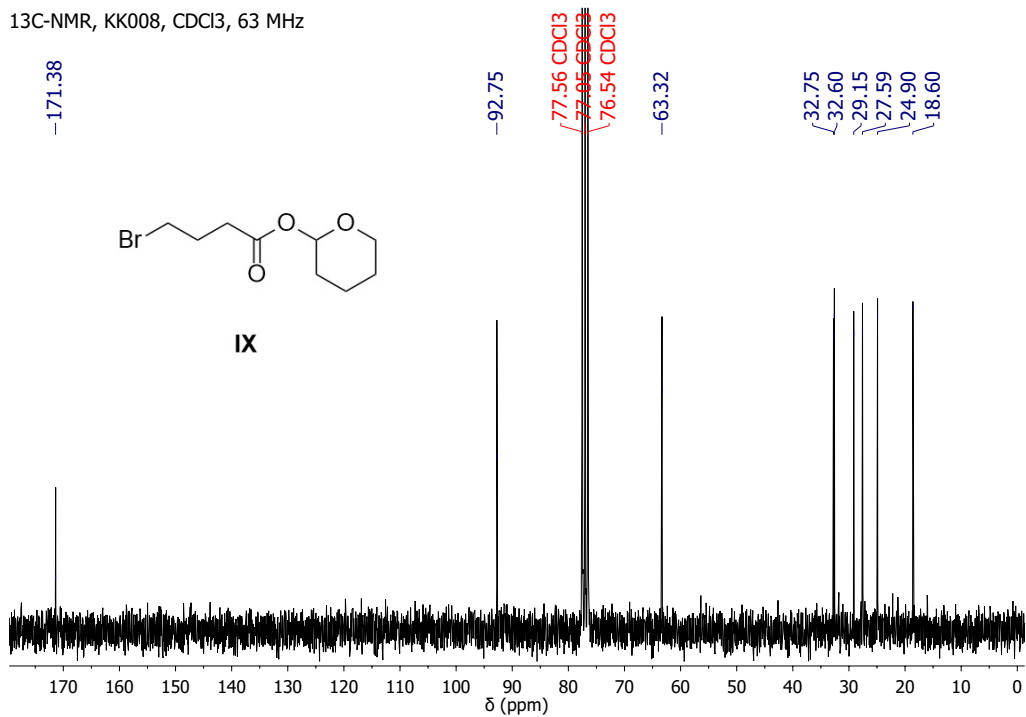


Fig. 6.27: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of IX, 2-Tetrahydropyranyl-4-bromobutanoate.

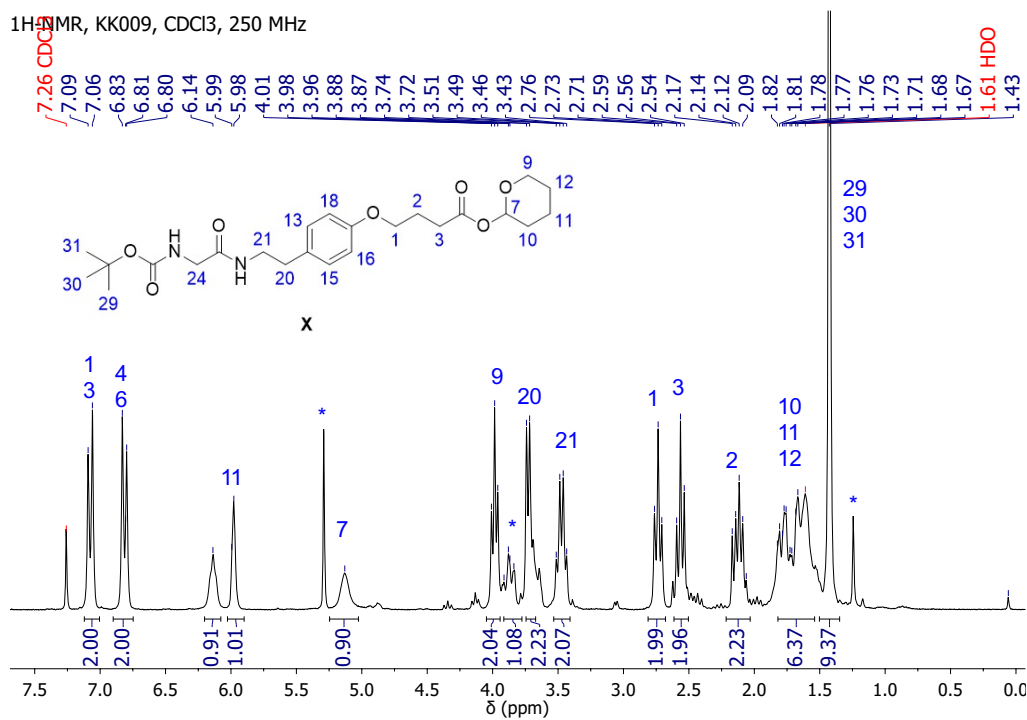


Fig. 6.28: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of X, Tetrahydropyranyl 4-(4-(2-(2-((tert-butylcarbamoyl)amino)acetamido)ethyl)phenoxy)butanoate.

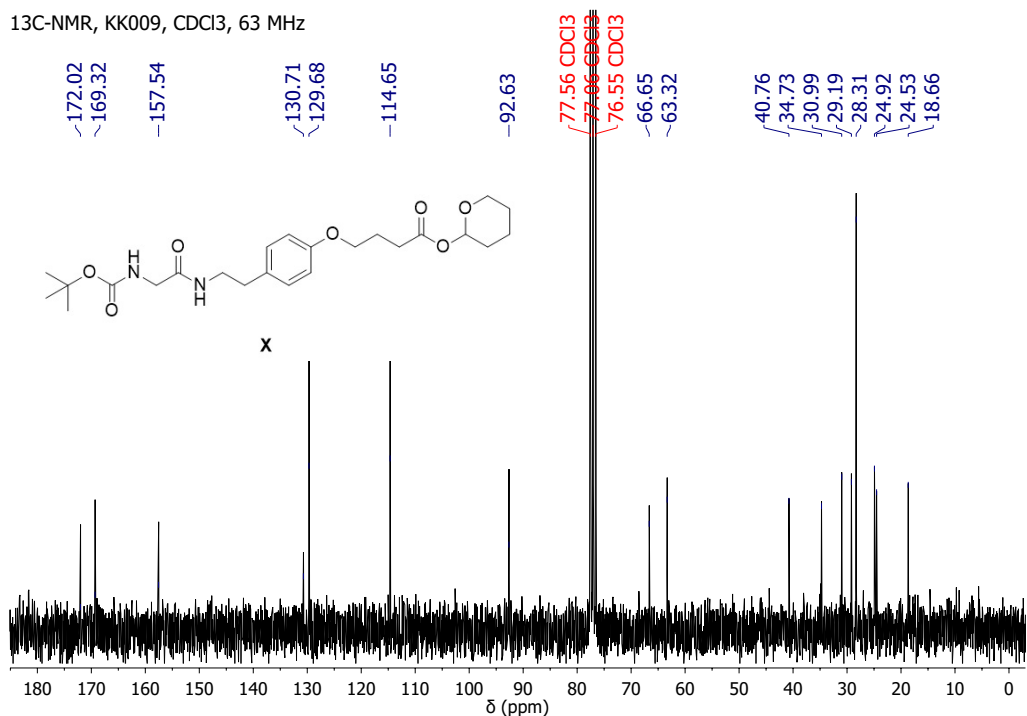


Fig. 6.29: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of X, Tetrahydropyranyl 4-(4-(2-(2-((tert-butylcarbamoyl)amino)acetamido)ethyl)phenoxy)butanoate.

¹H-NMR, KK011, CDCl₃ + 10% D₃OD, 250 MHz

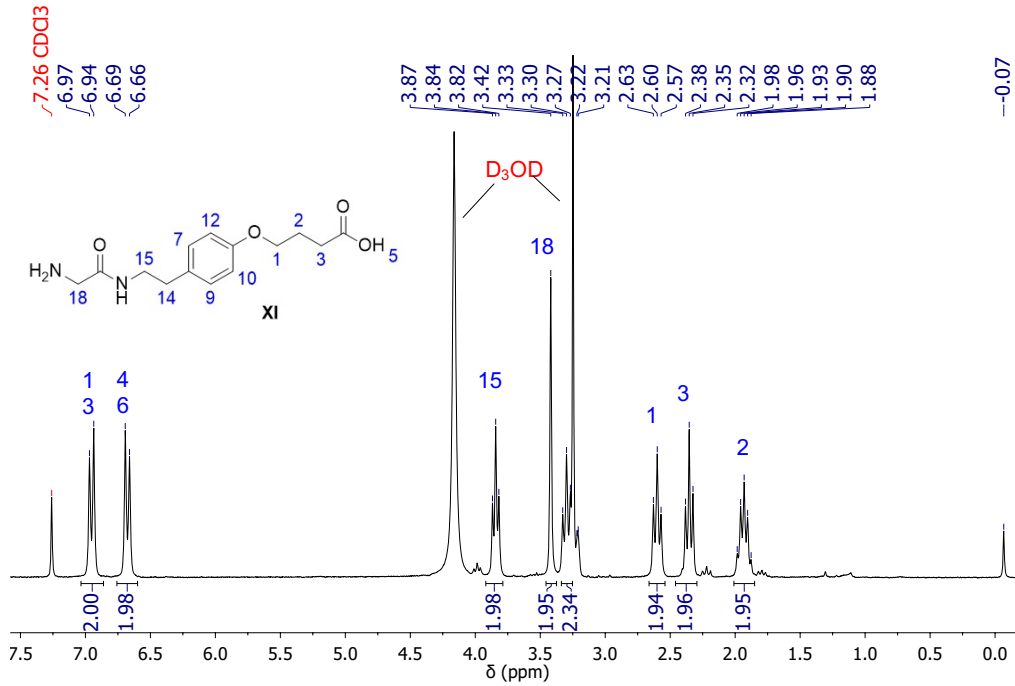


Fig. 6.30: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃ with 10% D₃OD, 25 °C) spectrum of **XI**, 4-(4-(2-(2-Aminoacetamido)ethyl)phenoxy)butanoic acid.

¹³C-NMR, KK011, CDCl₃ + 10% D₃OD, 63 MHz

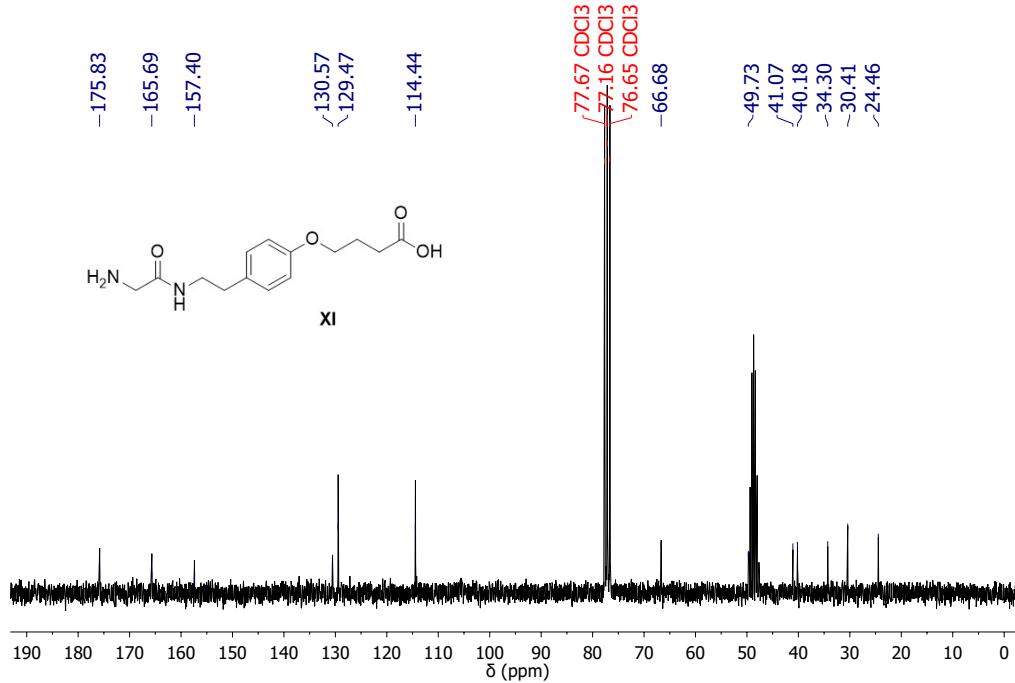


Fig. 6.31: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃ with 10% D₃OD, 25 °C) spectrum of **XI**, 4-(4-(2-(2-Aminoacetamido)ethyl)phenoxy)butanoic acid.

¹H-NMR, KK013, DMSO-d₆, 250 MHz

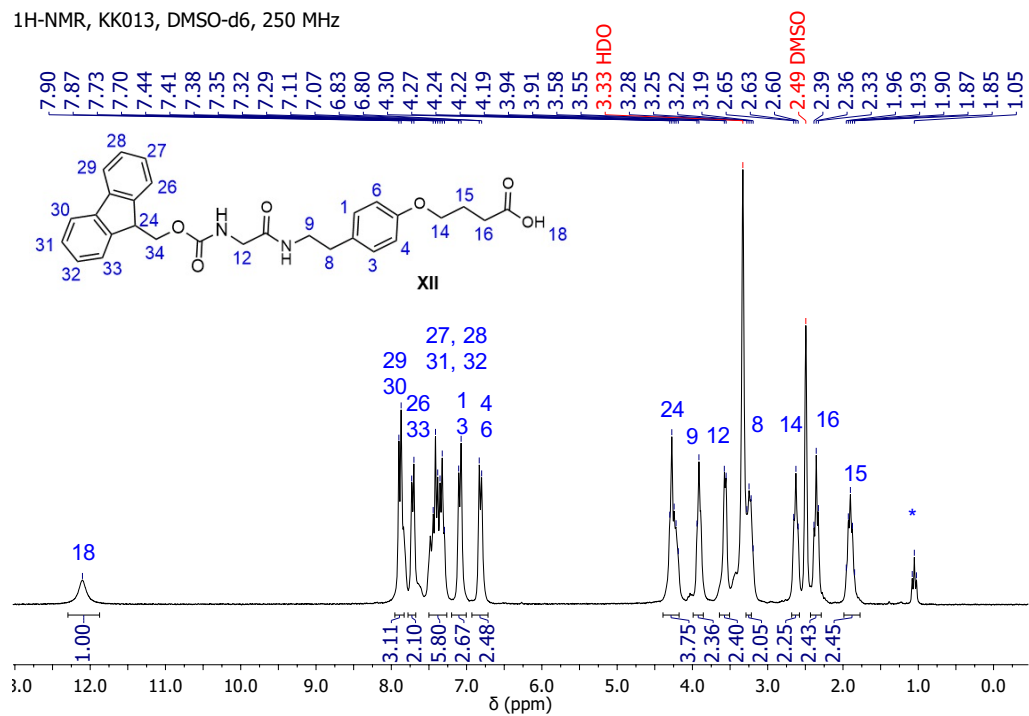


Fig. 6.32: ¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) spectrum of XII, 4-(4-(2-(2-Fmoc-aminoacetamido)ethyl)phenoxy)butanoic acid.

¹³C-NMR, KK013, DMSO-d₆, 63 MHz

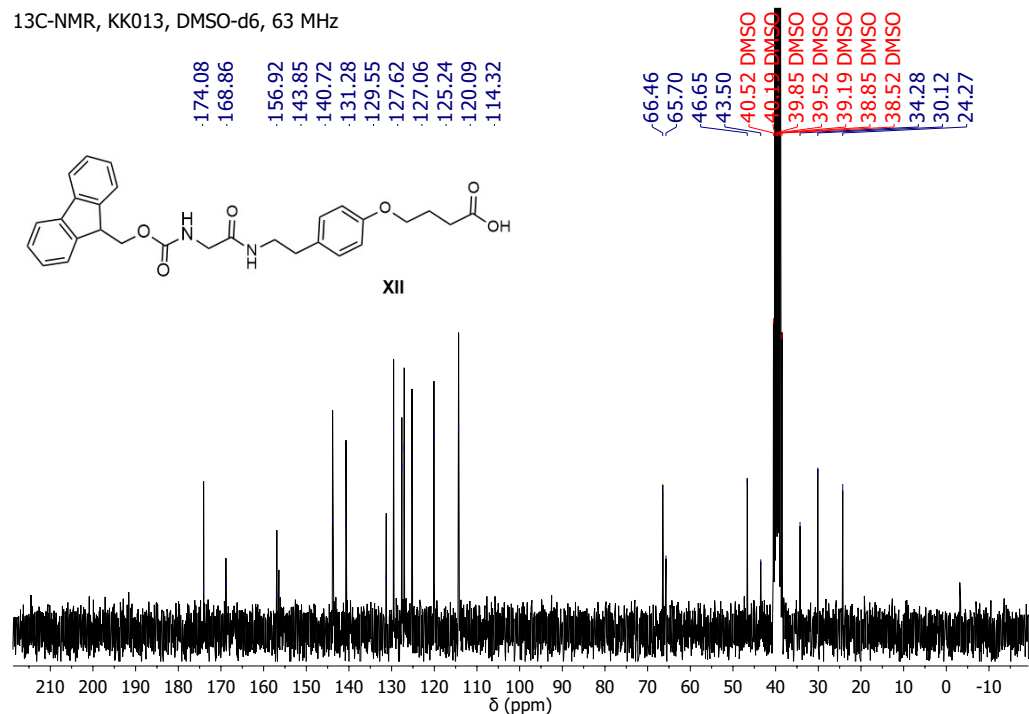


Fig. 6.33: ¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) spectrum of XII, 4-(4-(2-(2-Fmoc-aminoacetamido)ethyl)phenoxy)butanoic acid.

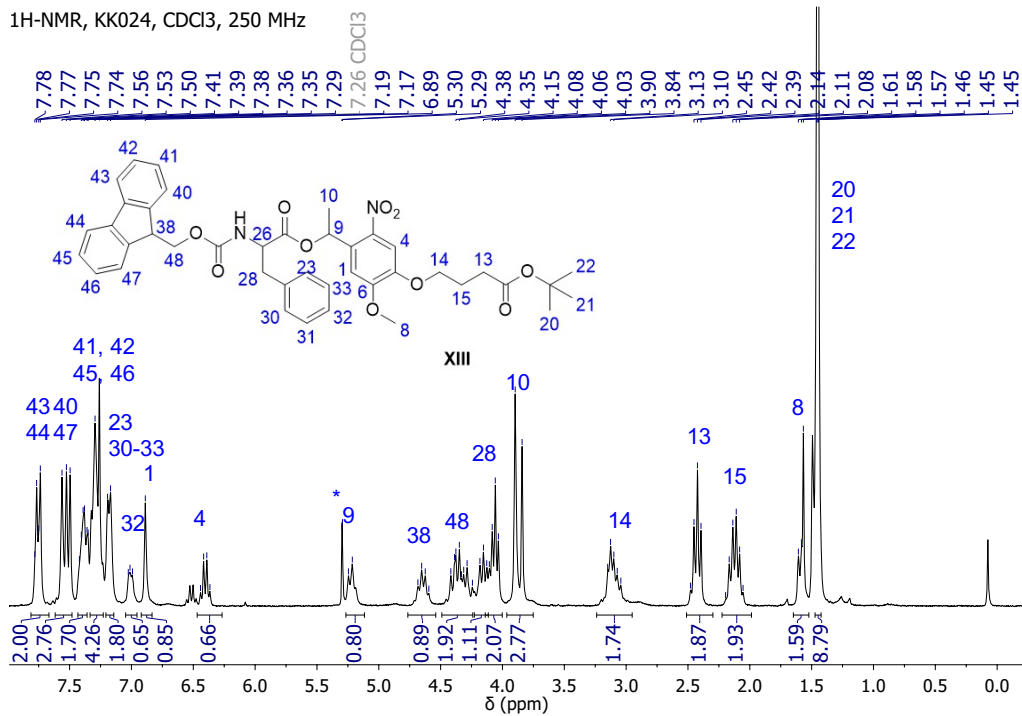


Fig. 6.34: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **XIII**, *tert*-Butyl 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)phenylalanyloxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

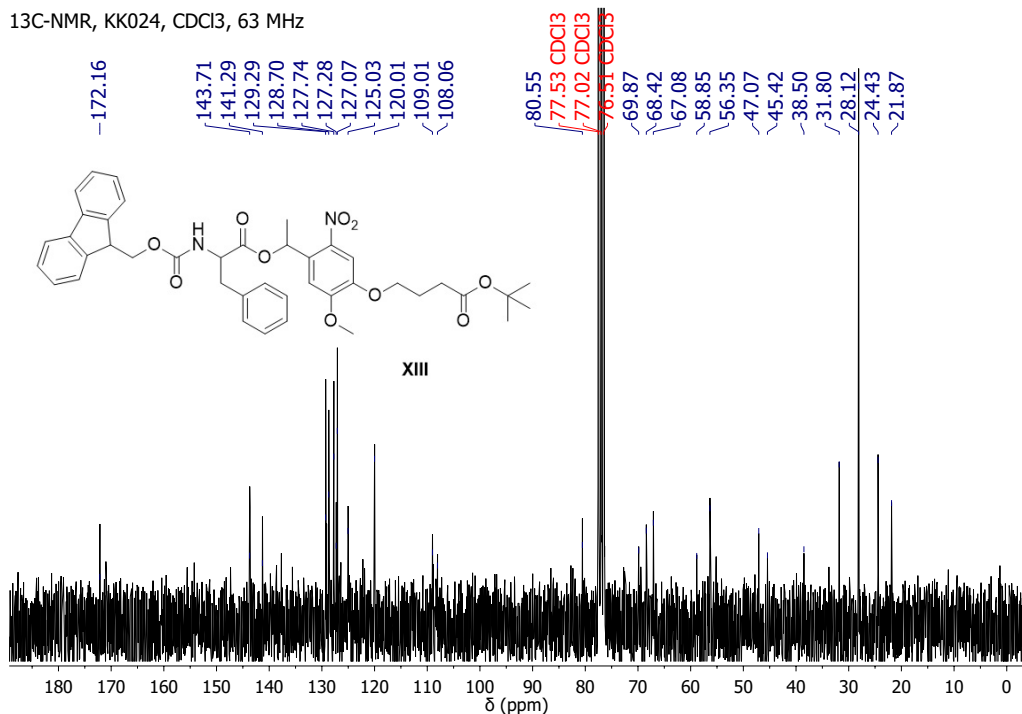


Fig. 6.35: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of **XIII**, *tert*-Butyl 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)phenylalanyloxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoate.

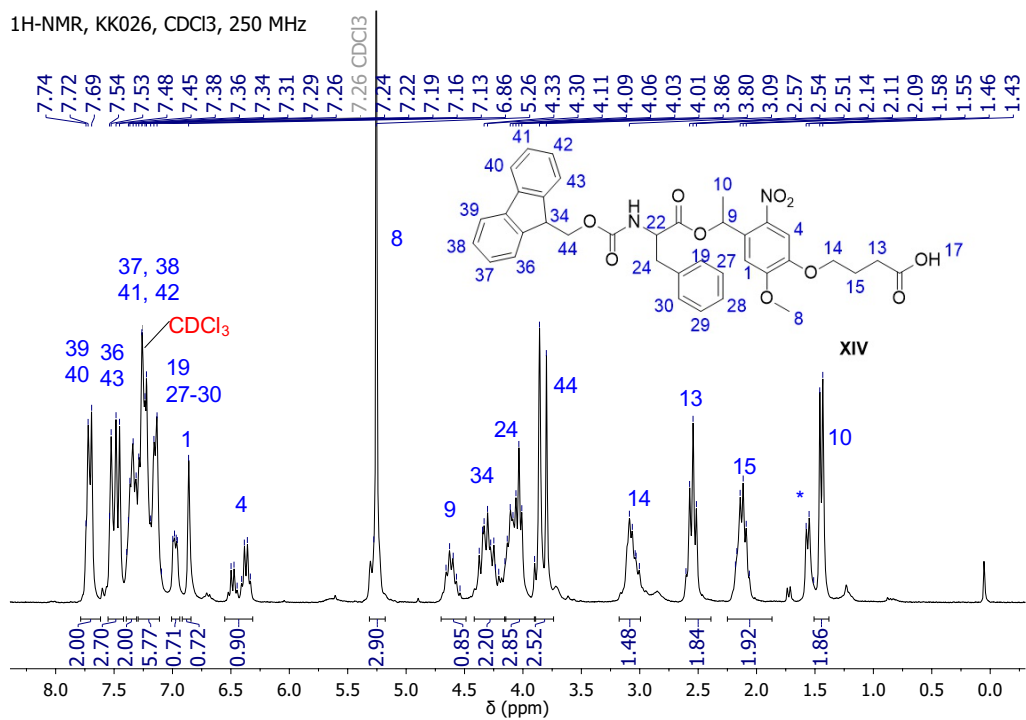


Fig. 6.36: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of XIV, 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)phenylalanyloxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid

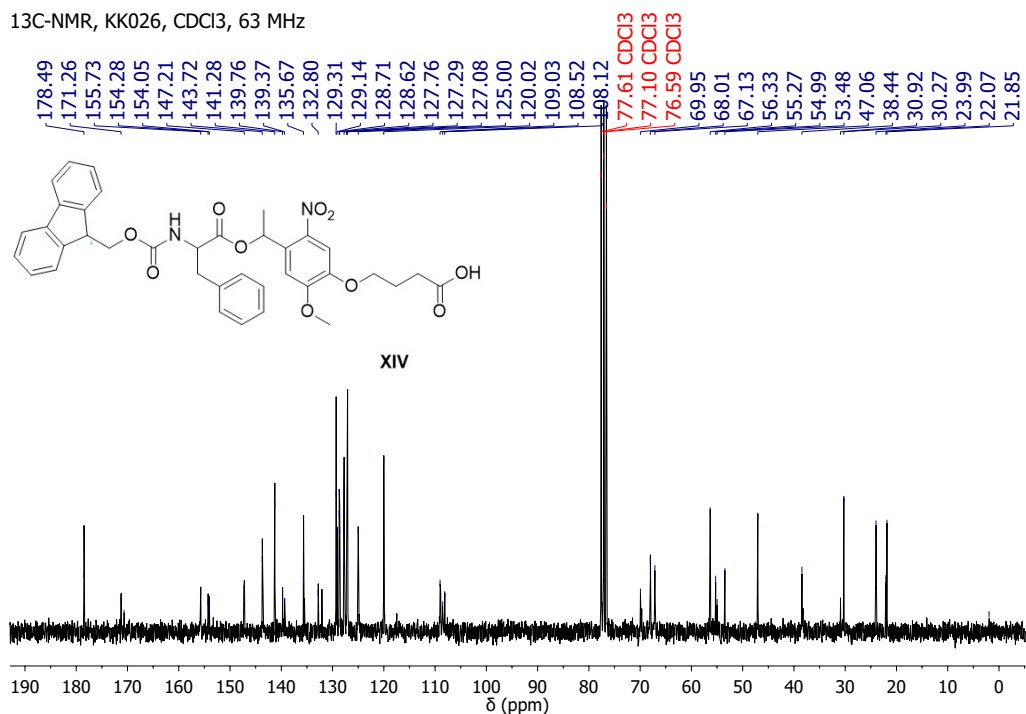
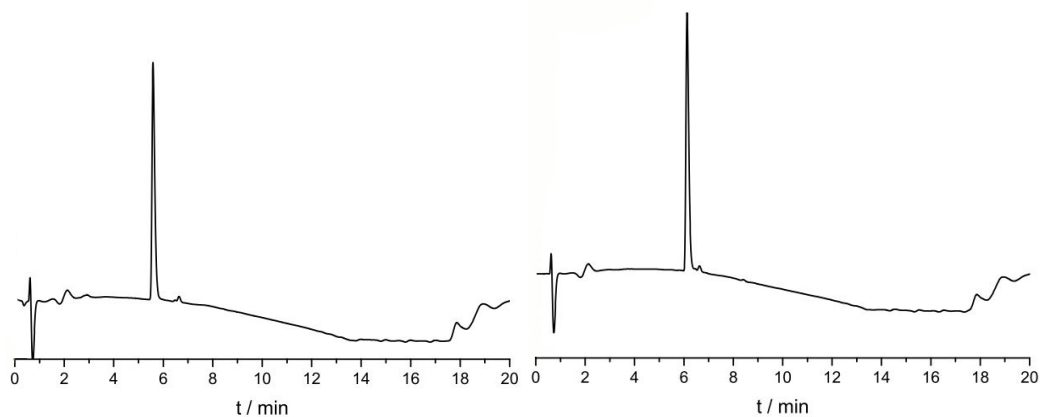


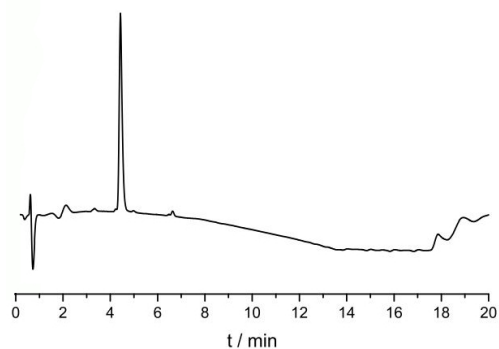
Fig. 6.37: ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃, 25 °C) spectrum of XIV, 4-(4-(1-(2-(Fmoc-amino)phenylalanyloxy)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoic acid.

6.5 LC-MS

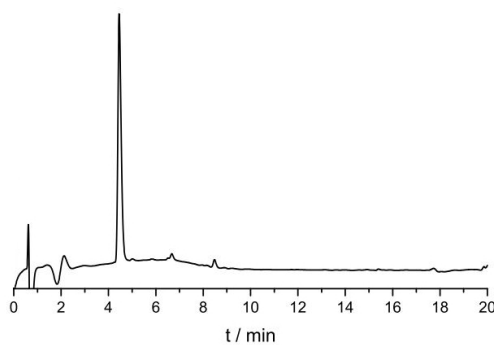


(a) Compound I. MS (ESI+): m/z
 calc. $C_{15}H_{20}O_5$ $[M+H]^+$, $281.32 \text{ g mol}^{-1}$;
 found $281.15 \text{ g mol}^{-1}$.

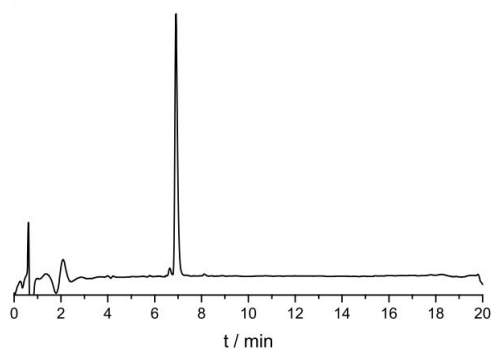
(b) Compound II. MS (ESI+): m/z
 calc. $C_{15}H_{19}N_5O_7$ $[M+H]^+$, $326.12 \text{ g mol}^{-1}$;
 found $326.15 \text{ g mol}^{-1}$.



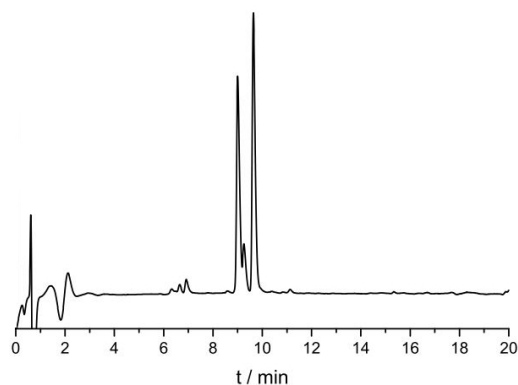
(c) Compound III. MS (ESI+) m/z
 calc. $C_{13}H_{15}NO_7$ $[M+Na]^+$, $320.07 \text{ g mol}^{-1}$;
 found $320.10 \text{ g mol}^{-1}$.



(d) Compound IV. MS (ESI-) m/z
 calc. $C_{17}H_{23}NO_7$ $[M]^-$, $353.14 \text{ g mol}^{-1}$;
 found $353.15 \text{ g mol}^{-1}$.

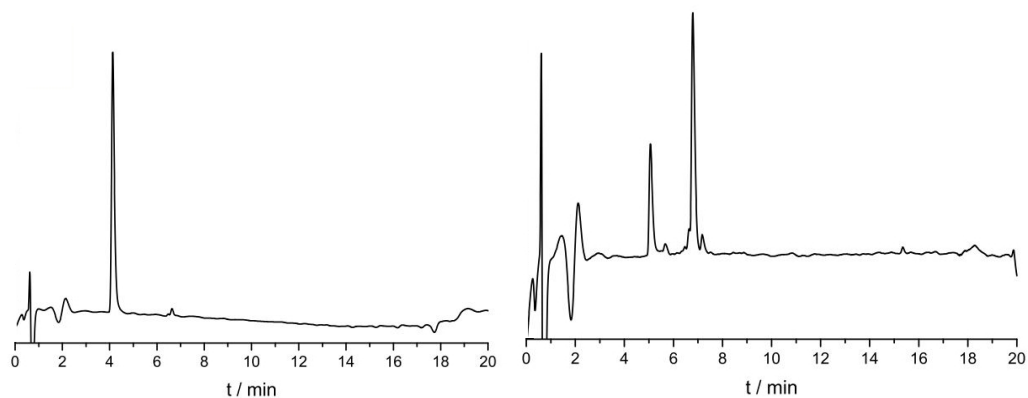


(e) Compound V. MS (ESI+) m/z
 calc. $C_{17}H_{25}NO_7$ $[M+Na]^+$, $378.15 \text{ g mol}^{-1}$;
 found $378.15 \text{ g mol}^{-1}$.



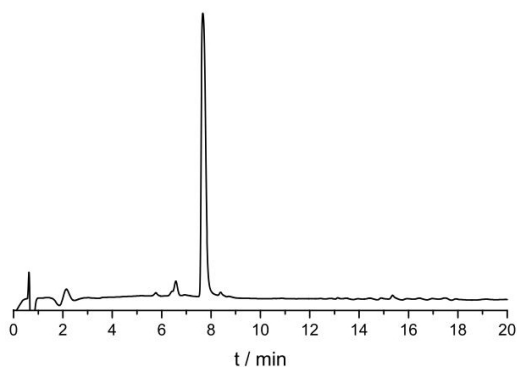
(f) Compound VI. MS (ESI+) m/z
 calc. $C_{34}H_{38}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$, $657.24 \text{ g mol}^{-1}$;
 found $657.25 \text{ g mol}^{-1}$.

Fig. 6.38: LC-MS measurement (detector: 214 nm) results.

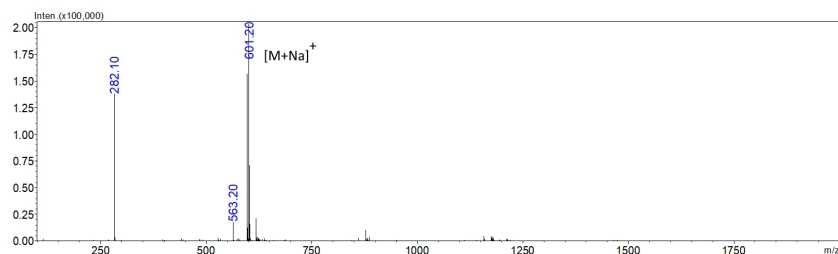


- (a) Compound VIII. MS (ESI+) m/z
 calc. $C_{16}H_{23}NO_4$ $[M+Na]^+$, $317.14 \text{ g mol}^{-1}$;
 found $317.15 \text{ g mol}^{-1}$.
- (b) Compound X. MS (ESI+) m/z
 calc. $C_{24}H_{36}N_2O_7$ $[M+Na]^+$, $487.24 \text{ g mol}^{-1}$;
 found $487.25 \text{ g mol}^{-1}$.

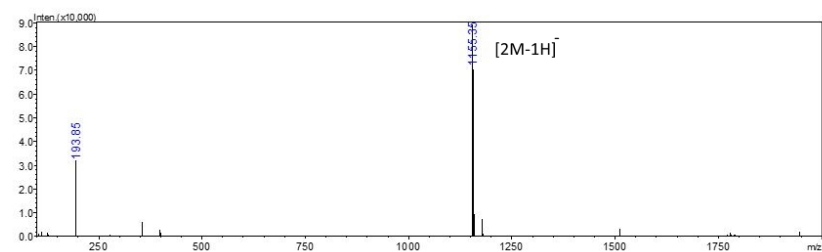
Fig. 6.39: LC-MS measurement (detector: 214 nm) results.



- (a) LC measurement of compound VII.

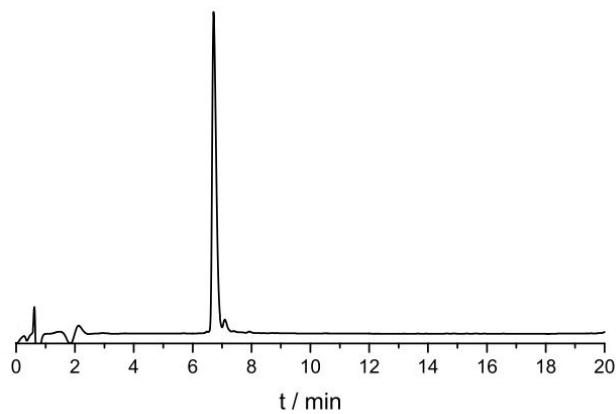


- (b) MS (ESI+) m/z , calc. for $C_{30}H_{30}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$, $601.17 \text{ g mol}^{-1}$; found $601.20 \text{ g mol}^{-1}$.

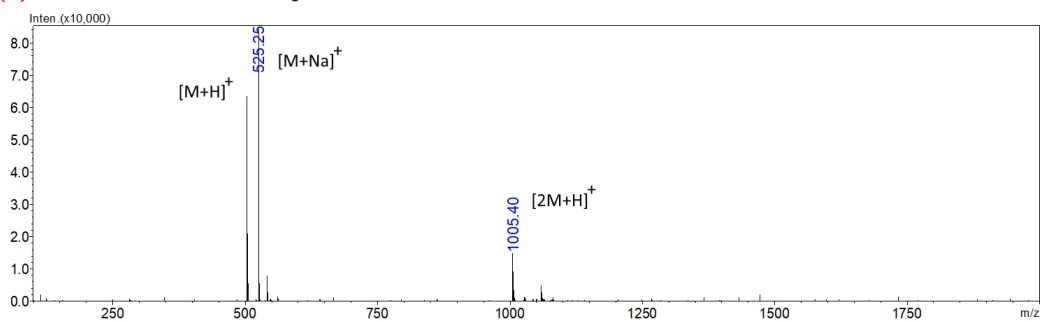


- (c) MS (ESI-) m/z , calc. for $C_{30}H_{30}N_2O_{10}$ $[2M-1H]^-$, $1155.32 \text{ g mol}^{-1}$; found $1155.35 \text{ g mol}^{-1}$.

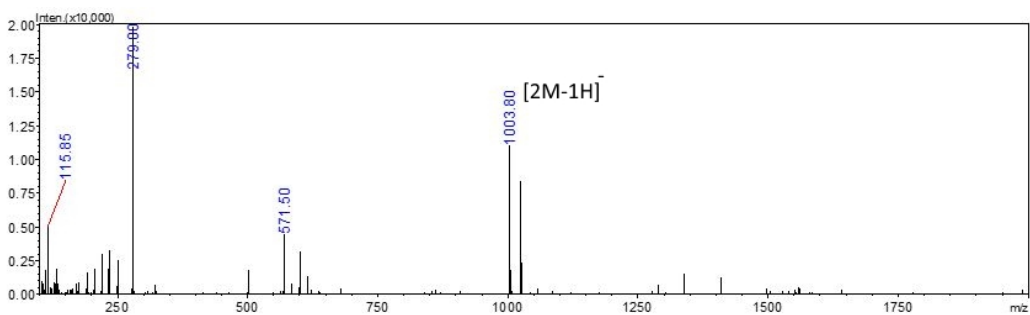
Fig. 6.40: LC-MS measurement (detector:214 nm) results for Compound VII.



(a) LC measurement of compound XII.

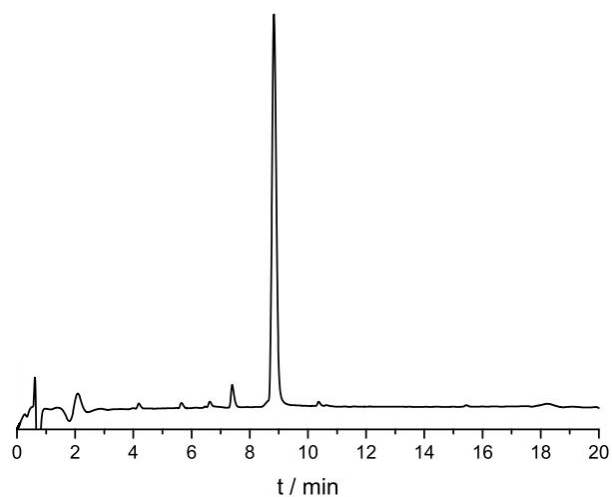


(b) MS (ESI+) m/z calc. for $C_{29}H_{30}N_2O_6$ $[M+Na]^+$, $525.20 \text{ g mol}^{-1}$; found $525.25 \text{ g mol}^{-1}$.

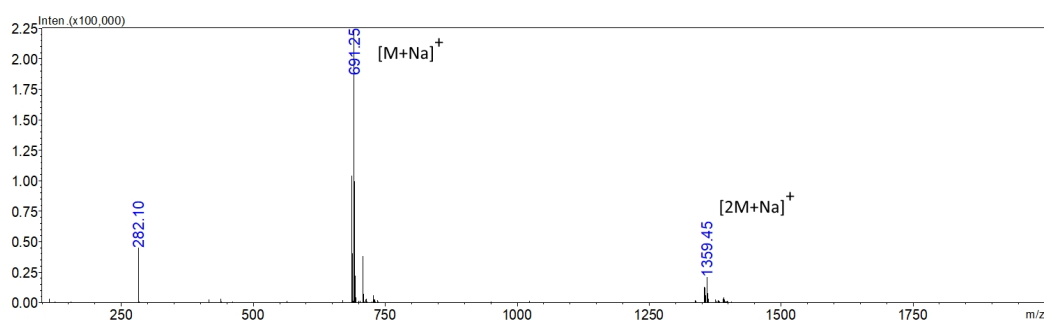


(c) MS (ESI-) m/z calc. for $C_{29}H_{30}N_2O_6$ $[2M-H]^-$, $1003.53 \text{ g mol}^{-1}$; found $1003.80 \text{ g mol}^{-1}$.

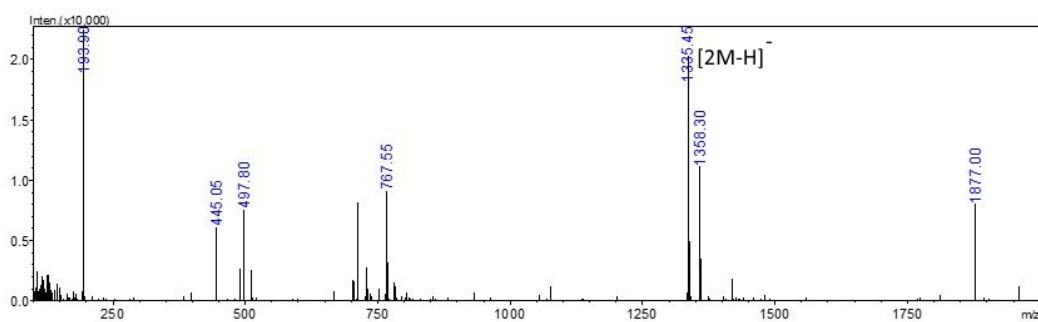
Fig. 6.41: LC-MS measurement (detector: 214 nm) results for XII.



(a) LC measurement of compound: XIV.

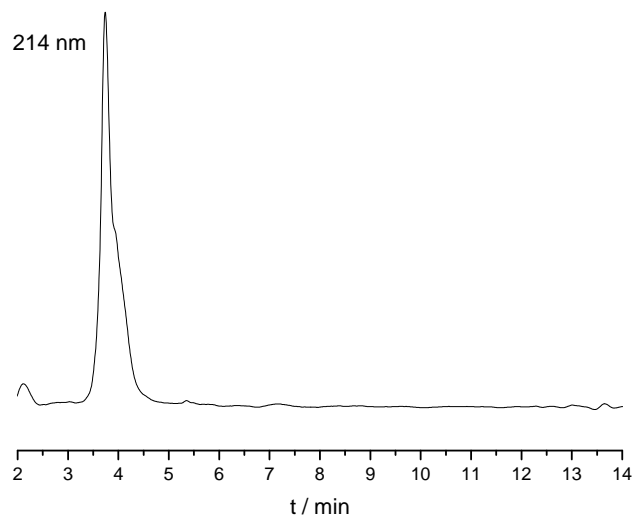


(b) MS (ESI+) m/z calc. for $C_{37}H_{36}N_2O_{10}$ $[M+Na]^+$, $691.22 \text{ g mol}^{-1}$; found $691.25 \text{ g mol}^{-1}$.

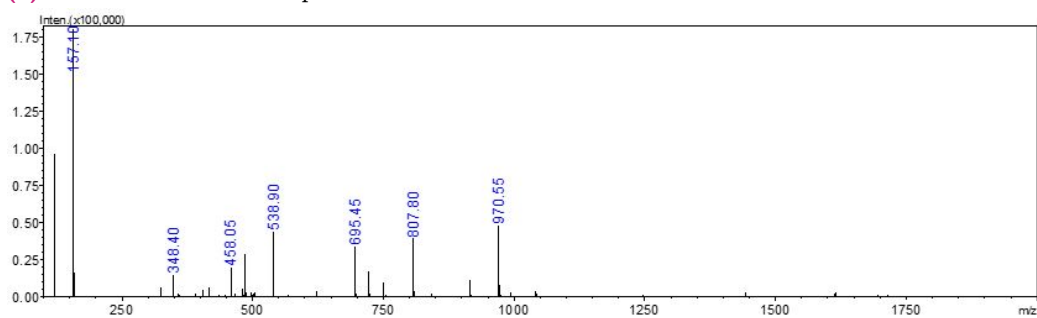


(c) MS (ESI-) m/z calc. for $C_{37}H_{36}N_2O_{10}$ $[2M-H]^-$, $1335.20 \text{ g mol}^{-1}$; found $1335.45 \text{ g mol}^{-1}$.

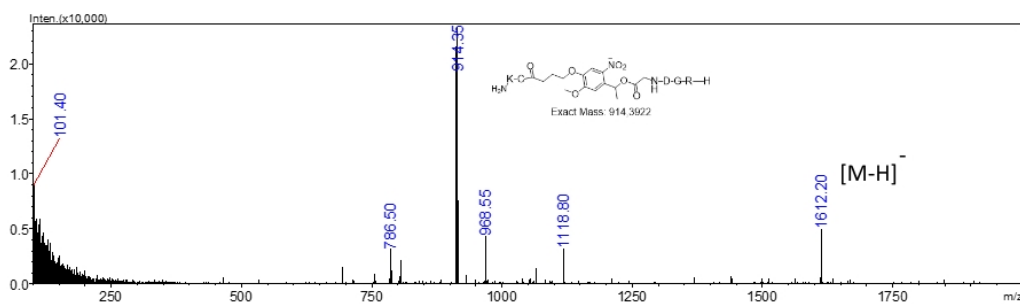
Fig. 6.42: LC-MS measurement (detector: 214 nm) results for XIV.



(a) LC measurement of compound 1.

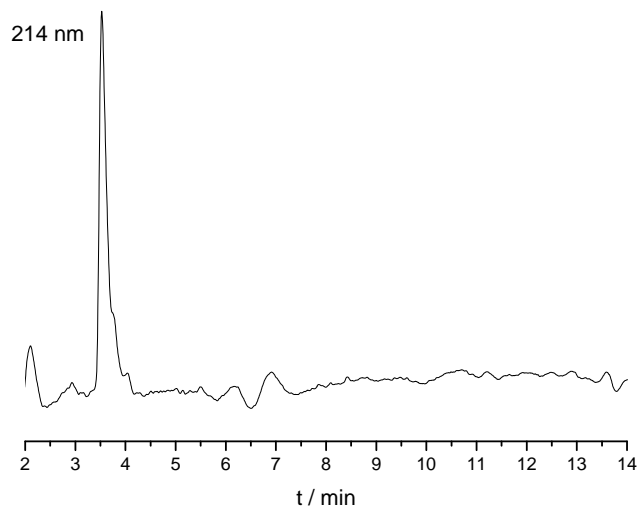


(b) MS (ESI+) m/z calc. for $C_{74}H_{104}N_{18}O_{21}S$ $[M+H]^+$, $1614.74 \text{ g mol}^{-1}$.

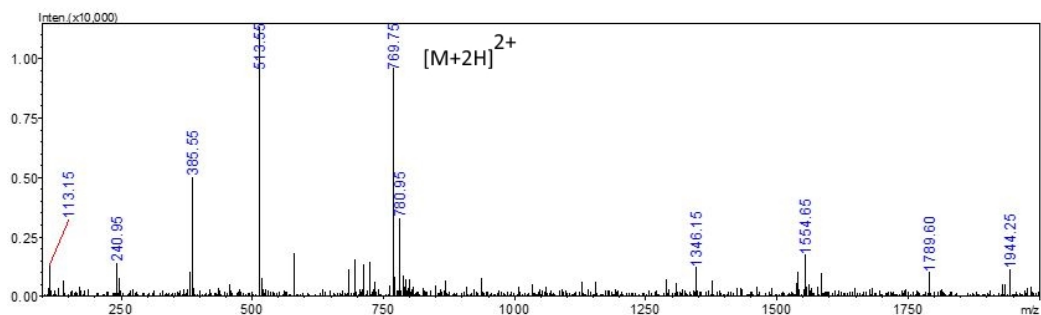


(c) MS (ESI-) m/z calc. for $C_{74}H_{104}N_{18}O_{21}S$ $[M-H]^-$, $1612.73 \text{ g mol}^{-1}$; found $1612.20 \text{ g mol}^{-1}$.

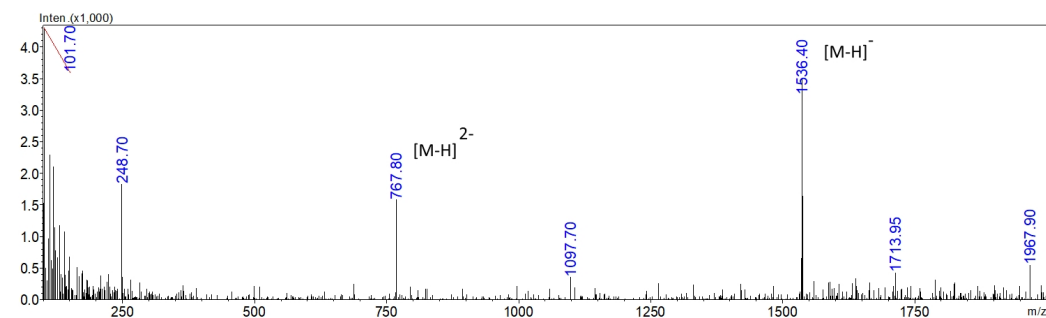
Fig. 6.43: LC-MS measurement (detector: 214 nm) results for 1.



(a) LC measurement of compound 2.

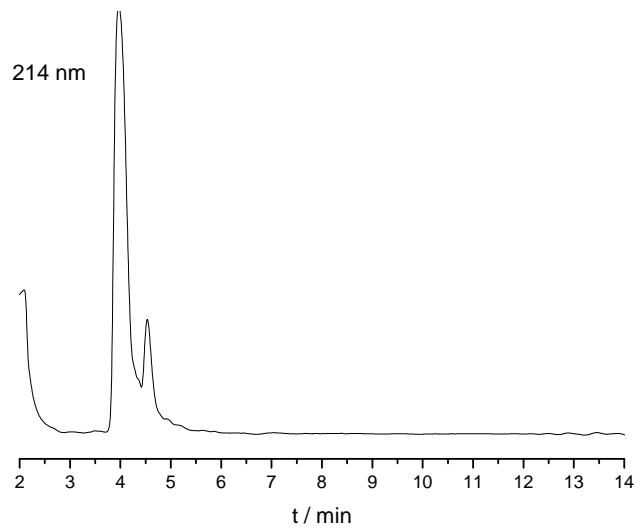


(b) (ESI+) m/z calc. for $C_{73}H_{104}N_{18}O_{18}S$. $[M+2H]^{2+}$, $769.65 \text{ g mol}^{-1}$; found $769.75 \text{ g mol}^{-1}$.

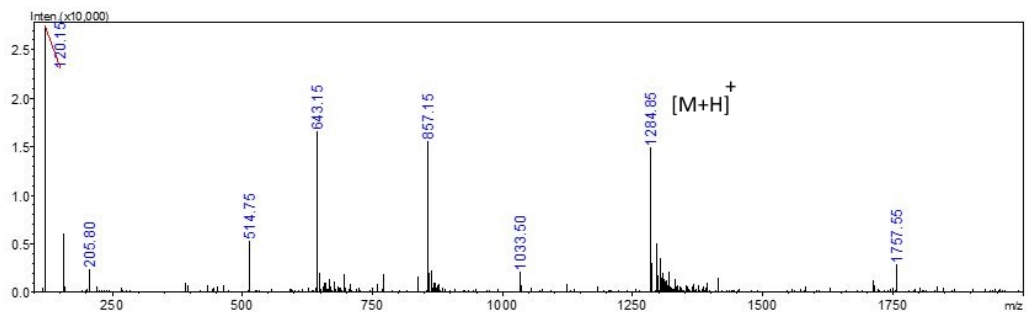


(c) (ESI-) m/z calc. for $C_{73}H_{104}N_{18}O_{18}S$. $[M-H]^{-}$, $1536.75 \text{ g mol}^{-1}$; found $1536.40 \text{ g mol}^{-1}$.

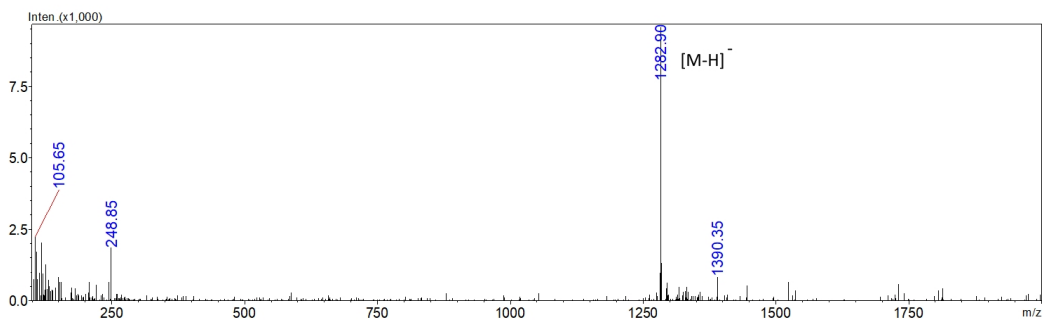
Fig. 6.44: LC-MS measurement (detector: 214 nm) result of 2.



(a) LC measurement of compound 4.

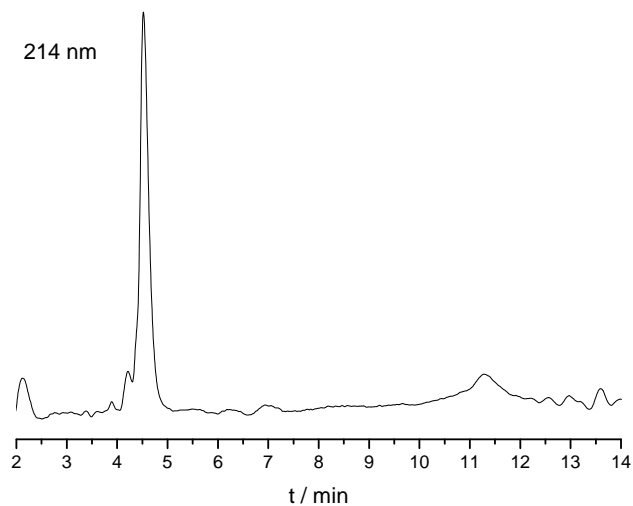


(b) MS (ESI+) m/z calc. for C₆₂H₈₄N₁₂O₁₆S [M+H]⁺, 1284.59 g mol⁻¹; found 1284.85 g mol⁻¹.

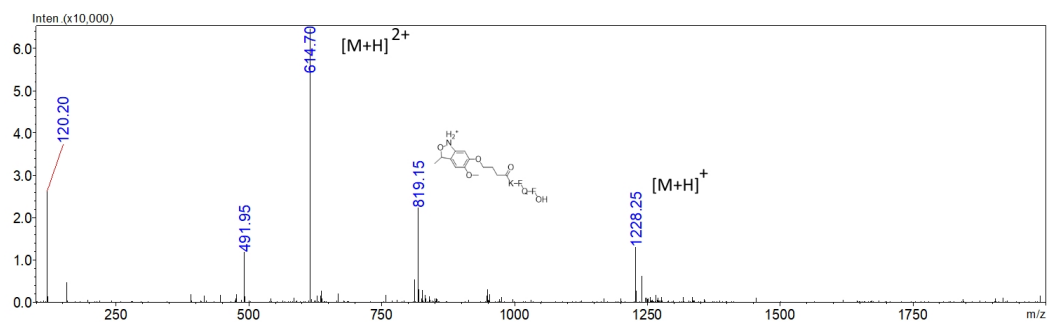


(c) MS (ESI-) m/z calc. for C₆₂H₈₄N₁₂O₁₆S [M-H]⁻, 1282.57 g mol⁻¹; found 1282.90 g mol⁻¹.

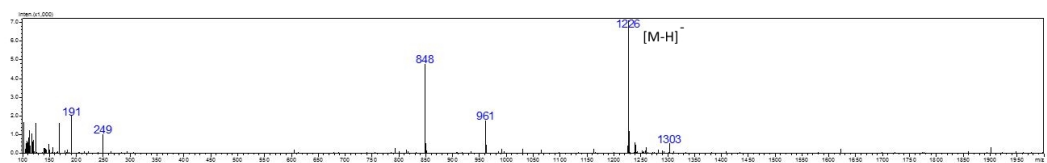
Fig. 6.45: LC-MS measurement (detector: 214 nm) result of 4.



(a) LC measurement of compound **3**.

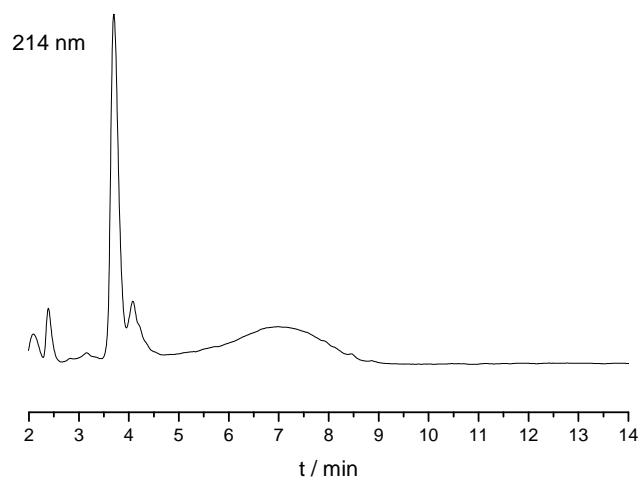


(b) MS (ESI+) m/z calc. for $C_{60}H_{81}N_{11}O_{15}S$ $[M+H]^+$, $1228.57 \text{ g mol}^{-1}$; found $1228.25 \text{ g mol}^{-1}$.

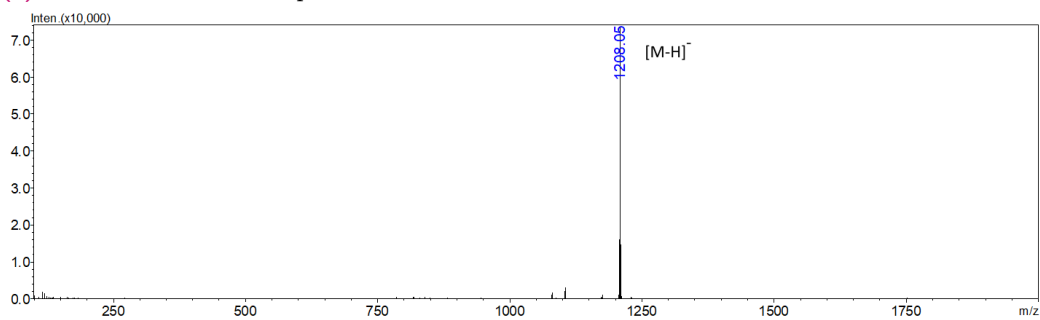


(c) MS (ESI-) m/z calc. for $C_{60}H_{81}N_{11}O_{15}S$ $[M-H]^-$, $1226.58 \text{ g mol}^{-1}$; found 1226 g mol^{-1} .

Fig. 6.46: LC-MS measurement (detector: 214 nm) result of **3**.



(a) LC measurement of compound 5.



(b) MS (ESI-) m/z calc. for $C_{61}H_{84}N_{12}O_{12}S$ $[M]^-$, $1208.60 \text{ g mol}^{-1}$; found $1208.05 \text{ g mol}^{-1}$.

Fig. 6.47: LC-MS measurement (detector: 214 nm) result of 5

Literatur

- [1]C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 4128–4158.
- [2]S. Koutsopoulos, *J. Bio. Mater. Res. A.* **2016**, 1001–1016.
- [3]J. B. Matson, R. H. Zha, S. I. Stupp, *Curr. Opin. Solid. St. M.* **2011**, 225–235.
- [4]J. M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 1304–1319.
- [5]R. Freeman, J. Boekhoven, M. B. Dickerson, R. R. Naik, S. I. Stupp, *MRS bulletin* **2015**, *40*, 1089–1101.
- [6]*Peptides and Peptide-based Biomaterials and their Biomedical Applications*, (Hrsg.: A. Sunna, A. Care, P. L. Bergquist), Springer International Publishing, **2017**.
- [7]J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science* **2001**, 1684–1688.
- [8]R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, 487–492.
- [9]W. Zhang, X. Yu, Y. Li, Z. Su, K. D. Jandt, Wei G., *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *80*, 94–124.
- [10]J. Chen, X. Zou, *Bioact. Mater.* **2019**, *4*, 120–131.
- [11]M. Schleegeer, C. C. vandenAkker, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, K. P. Velikov, G. Koenderink, M. Bonn, *Polymer* **2013**, *54*, 2473–2488.
- [12]M. Yolamanova, C. Meier, A. K. Shaytan, V. Vas, C. W. Bertoncini, F. Arnold, O. Zirafi, S. M. Usmani, J. A. Müller, D. Sauter, C. Goffinet, D. Palesch, P. Walther, N. R. Roan, H. Geiger, O. Lunov, T. Simmet, J. Bohne, H. Schrezenmeier, K. Schwarz, L. Ständker, W. G. Forssmann, X. Salvatella, P. G. Khalatur, A. R. Khokhlov, T. P. J. Knowles, T. Weil, F. Kirchoff, J. Münch, *Nature Nanotech.* **2013**, *8*, 130–136.
- [13]C. Schilling, T. Mack, S. Lickfett, S. Sieste, F. S. Ruggeri, T. Sneideris, A. Dutta, T. Bereau, R. Naraghi, D. Sinske, T. P. J. Knowles, V. C. Synatschke, T. Weil, B. Knöll, *Adv. Funct. Mater.* **2019**, 1809112.
- [14]H. Frisch, J. P. Unsleber, D. Lüdeker, M. Peterlechner, G. Brunklus, M. Waller, P. Besenius, *Angew. Chem.* **2013**, 10282–10287.
- [15]M. Yamamoto, C. Konno, M. Utsumi, A. Kikuchi, T. Okano, *Biomaterials* **2002**, *23*, 561–567.
- [16]C. Siebler, R. S. Erdmann, H. Wennemers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 10340–10344.
- [17]M. N. Yousaf, B. T. Houseman, M. Mrksich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 1093–1096.

- [18]R. V. Ulijn, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2217.
- [19]M. P. Lutolf, G. P. Raeber, A. H. Zisch, N. Tirelli, J. A. Hubbell, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 888–892.
- [20]D. Liu, Y. Xie, H. Shao, X. Jiang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 4406–4408.
- [21]S. V. Wegner, *Sci. Rep.* **2015**, 18309.
- [22]J. Cui, S. V. Miguel, A. del Campo, *Macromol. Rapid. Commun.* **2013**, 310–329.
- [23]Y. Venkatesh, Y. Rajesh, S. Karthik, A. C. Chetan, M. Mandal, A. Jana, N. D. P. Singh, *J. Org. Chem.* **2016**, 11168–11175.
- [24]H. Görner, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 822–828.
- [25]P. Wang, *Asian J. Org. Chem.* **2013**, 452–464.
- [26]J. Kim, S. Kyeong, D. S. Shin, S. Yeo, J. Yim, Y. S. Lee, *Synlett* **2013**, 733–736.
- [27]S. Sur, Matson J. B., J. W. Webber, C. J. Newcomb, S. I. Stupp, *ACS Nano* **2012**, *6*, 10776–10785.
- [28]Patchornik, B., Amit A., R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 6333.
- [29]G. C. Bochet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. J.* **2002**, 125–142.
- [30]A. Farrukh, W. Fan, S. Zhao, M. Salierno, J. I. Paez, A. Del Campo, *ChemBiochem* **2018**, *19*, 1271–1279.
- [31]S. N. Nishimura, Hirata A., Y. Taki, Morita Y., Higashi N., T. Koga, *Chem. Lett.* **2018**, 555–568.
- [32]J. Ricken, R. Medda, S. V. Wegner, *Adv. Biosys.* **2019**, *15*, 1800302.
- [33]T. Muraoka, C.-Y. Koh, H. Cui, S. I. Stupp, *Angew. Chem.* **2009**, 6060–6063.
- [34]M. Zelzer, L. E. McNamara, D. J. Scurr, M. R. Alexander, M. J. Dalby, R. V. Ulijn, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 12229.
- [35]E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1996**, 697–715.
- [36]M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, 30–33.
- [37]U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.
- [38]S. P. Massia, J. A. Hubbell, *J. Cell. Biol.* **1991**, *114*, 1089–1100.
- [39]J. Bella, M. J. Humphries, *BMC struc. biol.* **2005**, *5*, 4.
- [40]J. Auernheimer, C. Dahmen, U. Hersel, A. Bausch, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16107–16110.
- [41]S. Petersen, J. M. Alonso, A. Specht, P. Duodu, M. Goeldner, A. del Campo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 3192–3195.
- [42]M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, 55–78.
- [43]S. J. Todd, D. J. Scurr, J. E. Gough, M. R. Alexander, R. V. Ulijn, *Langmuir* **2009**, *25*, 7533–7539.
- [44]J. A. Burdick, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2002**, 4315–4323.

- [45]J. A. Rowley, G. Madlambayan, D. J. Mooney, *Biomaterials* **1999**, 45–53.
- [46]J. A. Hubell, *Biotechn.* **1995**, 565–576.
- [47]A. Ohl, K. Schröder, *Surf. Coat. Tech.* **1999**, 116-119, 820–830.
- [48]G. Khang, *Biosurface and Biotribology* **2015**, 1, 202–213.
- [49]G. Fioravanti, F. Lugli, D. Gentili, V. Mucciante, F. Leonardi, L. Pasquali, A. Liscio, M. Murgia, F. Zerbetto, M. Cavallini, *Langmuir* **2014**, 30, 11591–11598.
- [50]J. Lee, I. Choi, W. S. Yeo, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 5609–5616.
- [51]L. Ionov, M. Stamm, S. Diez, *Nano lett.* **2005**, 5, 1910–1914.
- [52]E. Lee, E. W. L. Chan, W. Luo, M. N. Yousaf, *RSC Adv.* **2014**, 4, 31581–31588.
- [53]M. J. Hynes, J. A. Maurer, *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 559–564.
- [54]V. C. Hirschfeld-Warneken, M. Arnold, A. Cavalcanti-Adam, M. López-García, H. Kessler, J. P. Spatz, *Eur. J. Cell Biol.* **2008**, 87, 743–750.
- [55]H. Elwing, S. Welin, A. Askendal, U. Nilsson, I. Lundström, *J. Coll. Int. Sci.* **1987**, 119, 203–210.
- [56]W. G. Pitt, *J. Coll. Int. Sci.* **1989**, 133, 223–227.
- [57]J. H. Lee, H. G. Kim, G. S. Khang, H. B. Lee, M. S. Jhon, *J. Colloid. Interf. Sci.* **1992**, 151, 563–570.
- [58]F. J. Harding, L. R. Clements, R. D. Short, H. Thissen, N. H. Voelcker, *Act. Biomat.* **2012**, 8, 1739–1748.
- [59]J. B. Gurdon, P.-Y. Bourillot, *Nature* **2001**, 413, 797–803.
- [60]H. Zhang, X. Zheng, W. Ahmed, Y. Yao, J. Bai, Y. Chen, C. Gao, *Biomacromolecules* **2018**, 19, 1746–1763.
- [61]R. T. Petty, H.-W. Li, J. H. Maduram, R. Ismagilov, M. Mrksich, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8966–8967.
- [62]B. P. Harris, J. K. Kutty, E. W. Fritz, C. K. Webb, K. J. Burg, A. T. Metters, *Macromolecules* **2006**, 39, 2764–2772.
- [63]A. Lagunas, E. Martínez, J. Samitier, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, 3, 132.
- [64]C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Nucleic. Acids Res.* **1994**, 22, 5530–5538.
- [65]K. Kristensen, J. R. Henriksen, T. L. Andresen, *PloS one* **2015**, 10, e0122419.
- [66]J. M. Goddard, J. H. Hotchkiss, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 698–725.
- [67]R. M. A. Heeren, D. F. Smith, J. Stauber, B. Kükrer-Kaletas, L. MacAleese, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2009**, 20, 1006–1014.
- [68]L. A. McDonell, R. M. A. Heeren, *Mass Spec. Rev.* **2007**, 26, 606–643.
- [69]M. Mrksich, *ACS Nano* **2008**, 2, 7–18.
- [70]S.-O. Deininger, D. S. Cornett, R. Paape, M. Becker, C. Pineau, S. Rauser, A. Walch, E. Wolski, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401, 167–181.

- [71]D. M. M. Jaradat, *Amino acids* **2018**, *50*, 39–68.
- [72]R. Subiros-Funosas, S. N. Khattab, L. Nieto-Rodriguez, A. El-Faham, F. Albericio, *Aldrichimica Act.* **2013**, *46*, 21–41.
- [73]Z. Papanyan, S. Markarian, *J. Appl. Spect.* **2013**, *80*, 775–778.
- [74]H. Cui, E. T. Pashuck, Y. S. Velichko, S. J. Weigand, A. G. Cheetham, C. J. Newcomb, S. I. Stupp, *Science* **2010**, *327*, 552–555.
- [75]N. Hirota-Nakaoka, K. Hasegawa, Naiki, H. Goto, Y., *J. Bio. Chem.* **2003**, *134*, 159–164.
- [76]T. Kobayashi, T. Seki, *Langmuir* **2003**, *19*, 9297–9304.

Eigenständigkeitserklärung

Masterarbeit im Studiengang Chemie
an der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Ich, Kübra Kaygisiz, Matrikelnummer 2718915, versichere, dass ich meine Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen schriftlichen und elektronischen Quellen sowie andere Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, habe ich kenntlich gemacht.

Mainz, 29. August 2019

Kübra Kaygisiz