



**Optische Kontrolle von Biomolekülen:  
Postsynthetische Markierung von RNA mit  
Spiropyranen und OmpG mit Cumarinen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt dem Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität Frankfurt am Main**

**Von**

**Josefine Kahlstatt**

**aus**

**Frankfurt am Main**

**Frankfurt am Main 2018**

**(D 30)**







Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. Alexander Heckel angefertigt und vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel
2. Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Datum der Disputation: 01.11.2018









Meiner Familie



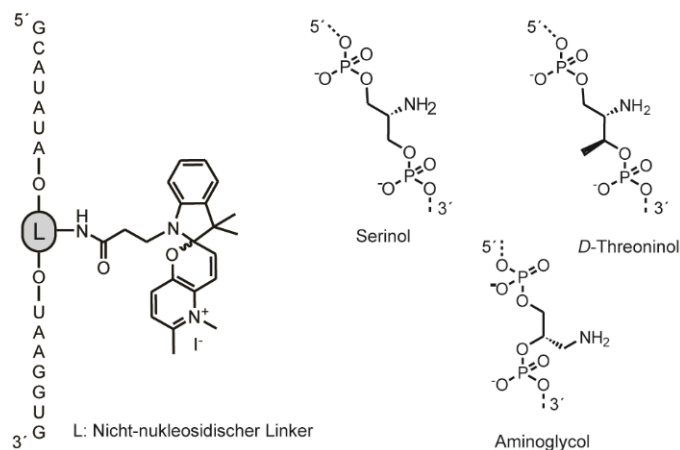




## Zusammenfassung

Biologischen Systemen liegen Mechanismen zugrunde, die bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind. Für die Untersuchung eignen sich externe Trigger, die eine Regulation von außen auf das System erlauben und Prozesse gezielt steuerbar machen. Eine Möglichkeit ist das System unter optische Kontrolle zu bringen, d.h. durch Licht eine externe Steuerung zu implementieren, was von einem internen Chromophor aufgenommen wird. In der vorliegenden Dissertation werden drei individuelle Projekte vorgestellt, die alle dieses Prinzip auf unterschiedliche Weise anwenden.

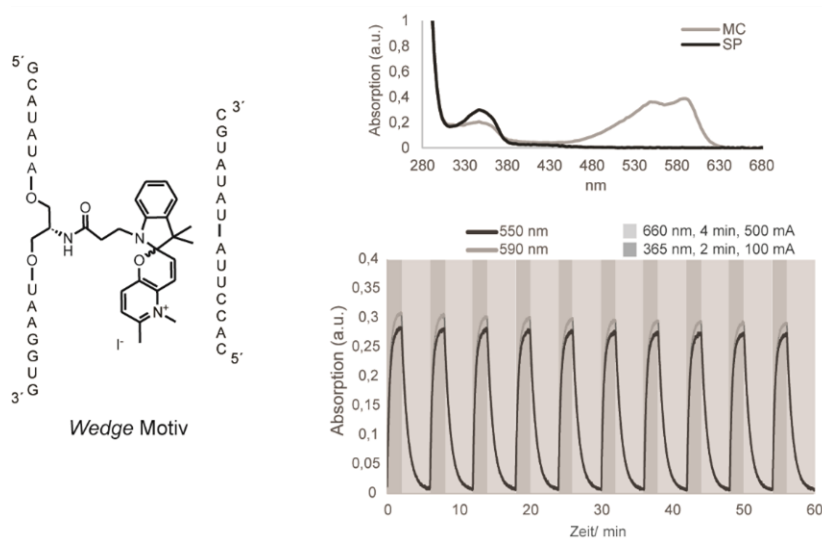
RNAs haben eine Vielzahl an verschiedenen Funktionen in der Zelle, die von der Proteinsynthese bis zur Genregulation variieren. Im ersten Projekt wurde der Photoschalter Spiropyran im Kontext von RNA eingesetzt. Mit dem Ziel das Derivat PyBIPS kovalent an ein Oligonukleotid zu binden und damit die Hybridisierung eines Duplexes zu steuern, wurden Struktur motive gesucht, an die der Photoschalter postsynthetisch gebunden werden kann. Dabei soll die sterisch anspruchsvolle Spiropyran-Form die Watson-Crick-Basenpaarung stören und die planare, konjugierte Merocyanin-Form in den Duplex, zur zusätzlichen Stabilisierung, interkalieren. In Vorarbeiten von Clara Brieke wurde festgestellt, dass erstens nur PyBIPS, nach kovalenter Verknüpfung, noch vollständig photochemisch aktiv ist und zweitens eine Herstellung über Festphasensynthese nur in schlechter Ausbeute realisierbar ist. Ausgehend davon wurde PyBIPS an die drei nicht-nukleosidischen Linker, Aminoglykol, *D*-Threoninol und Serinol, postsynthetisch über eine Amidbindung angebracht, die zuvor über Oligonukleotidfestphasensynthese in 2'-OMe-RNA eingebaut wurden.



In der photochemischen Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass PyBIPS, gebunden an alle drei Motive, noch photochemisch aktiv ist und im Vergleich zu ungebundenem PyBIPS stabiler ist gegenüber Photolyse. In Untersuchungen im Doppelstrang im *Wedge* Motiv, d.h. im Gegenstrang befindet sich kein Nukleotid gegenüber dem Photoschalter, wurde ein ähnliches Verhalten festgestellt. Zusätzlich zur charakteristischen Merocyanin-Bande bei 550 nm ist ein zweites, rotverschobenes Absorptionsmaximum entstanden, das die gleichen Eigenschaften besitzt. In

## Zusammenfassung

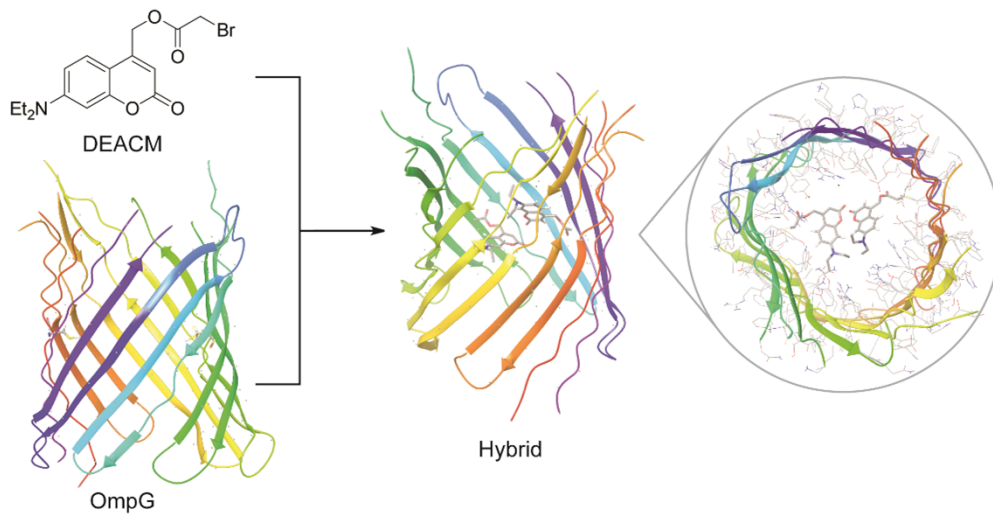
Schaltzyklen wurde festgestellt, dass eine Isomerisierung bis 660 nm möglich ist, was eine Anwendung im therapeutischen Fenster zwischen ca. 600 und 1000 nm von Blut ermöglichen würde. Das Auftreten der zweiten Bande hängt stark vom Linker und dem Baustein im gegenüberliegenden Strang ab. Es wird vermutet, dass sich das, sonst nicht-bevorzugte, TTT-Isomer der Merocyanin-Form, durch Stabilisierung durch die Umgebung im Oligonukleotid ausbildet.



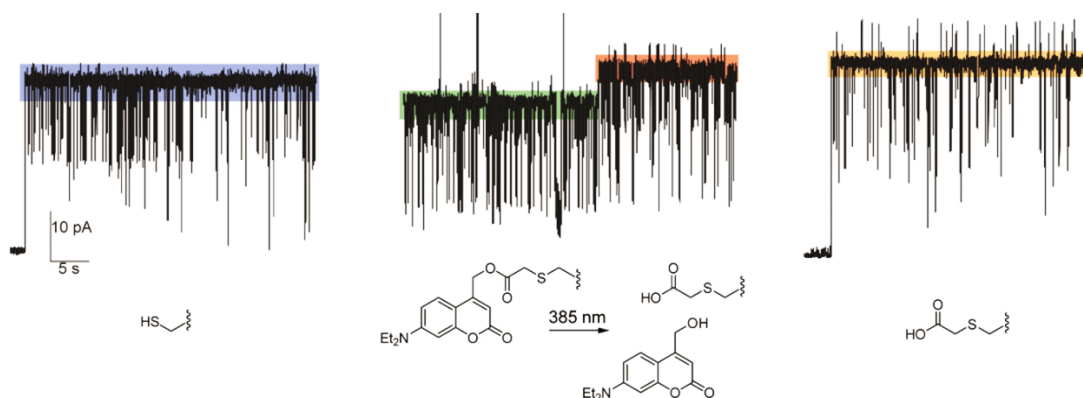
Zur Untersuchung, inwiefern die Isomerisierung des Photoschalters die Duplexstruktur beeinflusst, wurden Schmelzpunktstudien und Fluoreszenzmessungen zur  $K_D$ -Bestimmung durchgeführt, ohne dass eine Veränderung zu erkennen war. In einer größeren NMR-Studie, in Kooperation mit Tom Landgraf (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Harald Schwalbe) wurde der Fokus darauf-gelegt mehr Informationen über die strukturelle Integrität zu erhalten. Es findet eine Störung der benachbarten Basenpaarungen durch den Photoschalter statt, jedoch kann die Kraft der Isomerisierung des Photoschalters nicht übertragen werden. Der Einfluss war zunächst geringer als erwartet, was in anderen Anwendungen überprüft werden muss.

Im zweiten Projekt steht das Membranprotein OmpG aus *E. Coli* K12 im Fokus. Proteine besitzen viele verschiedene funktionelle Gruppen, die für selektive Biokonjugation genutzt werden können in einer Reihe von Anwendungen. OmpG gehört zur Gruppe der Porine, die in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien sitzen und die seltene  $\beta$ -Fassstruktur ausbilden. Die Pore besitzt einen großen Innendurchmesser ohne Selektivität. Das Molekül wurde bereits intensiv auf seine Struktur, insbesondere Loop 6, der pH-abhängig die Pore verschließt, untersucht. In Vorarbeiten von Grosse *et al.* wurde der Loop entfernt, sodass ein ruhiger Kanal entstanden ist, der ein optimales Modellsystem darstellt. Außerdem wurden in der Pore zwei Cysteine, die auf gegenüberliegenden Seiten auf halber Höhe des Kanals sitzen, eingeführt. An die Thiolgruppen wurden photolabile Schutzgruppen angebracht, die erst den Kanal blockieren und nach Abspaltung

durch Licht wieder freigeben. Dazu wurde jeweils ein 7-Diethylaminocumarin (DEACM) postsynthetisch angebracht.



Der Linker am Cumarin-Alkohol stellt dabei einen Kompromiss dar, da er zum einen selektiv mit der Thiolgruppe des Cysteins reagieren soll, gleichzeitig aber noch photo-induziert wieder abspalten muss. Durch Belichtung findet eine Hydrolyse des Esters unter Abspaltung des Alkohols statt, der einen Carbonsäurerest am Thiol in der Pore zurück lässt. In spannungsabhängigen Einzelkanalmessungen, durchgeführt von Dr. Philipp Reiß (Universität Marburg), konnte gezeigt werden, dass die zwei DEACM Modifikationen eine Reduktion der Leitfähigkeit bewirkten und durch Licht abgespalten und aus dem Kanal entfernt werden konnten. Dabei war außerdem zu erkennen, dass die Leitfähigkeit aufgrund der Carboxylreste über das Niveau von unmodifiziertem OmpG steigt.



Um den Effekt der Blockade zu erhöhen, wurden weiterhin Derivate von DEACM eingesetzt, die durch Substitution an der C3'-Position ein zusätzliches stereogenes Zentrum erhielten. Es wurden ein *n*-Butyl-, ein Adamantan- und ein Alkin-Rest eingeführt. In weiteren spannungsabhängigen Leitfähigkeitsmessungen wurde festgestellt, dass durch die Einführung des stereogenen Zentrums der effektive Durchmesser der Pore deutlich reduziert wird, die Art und Größe des eingeführten Restes nur eine untergeordnete Rolle spielen. In einem weiteren Versuch, zur kompletten Blockade

des Kanals, wurden an die Alkin-Funktion des DEACM-Derivats zunächst Fluorophore über eine Alkin-Azid-Click-Reaktion angebracht, die jedoch nicht mehr photochemisch entfernt werden konnten. Aus diesem Grund wurde anschließend Biotin über einen PEG-Linker über Click-Reaktion an das OmpG-Alkin-DEACM Hybrid gebunden, sodass es gerade aus der Kanalöffnung ragt. Im nächsten Schritt wurde Streptavidin an Biotin gebunden, was in spannungsabhängigen Einzelkanalmessungen zu einer fast vollständigen Blockade des Kanals geführt hat. Auch wenn eine photochemisch induzierte Abspaltung nicht möglich war, konnte gezeigt werden, dass durch Austausch des Chromophors die Leitfähigkeit reversibel auf ein Minimum reduziert werden kann.

In einem dritten Projekt wurde eine RNA-Sonde hergestellt zur Untersuchung der Dicer-Aktivität in Neuronen des Hippocampus von Ratten. Synaptische Plastizität beschreibt die Grundlage der Gedächtnisbildung. Durch neuronale Aktivität wird über eine Reaktionskaskade eine strukturelle Verstärkung der Synapsen initiiert. *miRNA* ist ein post-transkriptionelles, regulatorisches Element in der Zelle, welches Ziel *mRNAs* inhibiert. Im Fokus steht *miRNA-181a* aus *Rattus Norvegicus*, die zum einen die *mRNA* von *GLuA2*, einer Untereinheit des AMPA-Rezeptors, sowie die *mRNA* der Calmodulin-abhängigen Kinase *CamKII* bindet. Beide sind involviert in die Signalweiterleitung und –verstärkung in Synapsen. In Vorarbeiten wurde eine vollsynthetische Sonde in Haarnadelstruktur, basierend auf *pre-miRNA-181a*, von Dr. Jennifer Rinne etabliert. Der Fluorophor TAMRA wurde am Ende der Sequenz der *miRNA* und der Quencher BHQ2 am Ansatz des Loops angebracht. Beide Chromophore werden durch Prozessierung von Dicer räumlich getrennt und es kommt zum Fluoreszenzanstieg.

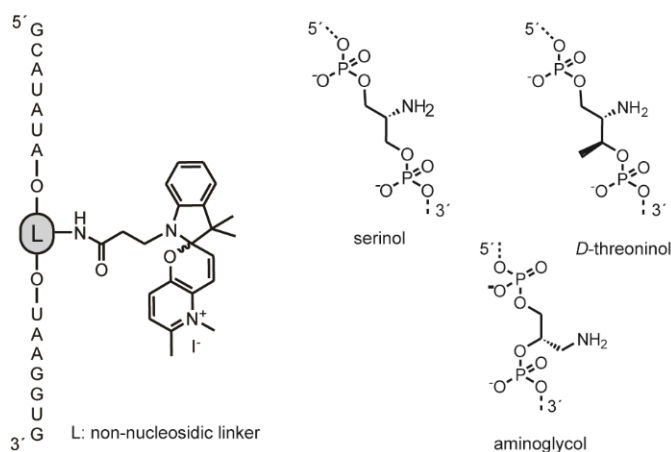
Die Hauptaufgabe bestand in der Synthese des RNA-63mers über Oligonukleotid-festphasensynthese. Im Anschluss wurden verschiedene Varianten der Aufreinigung getestet und ein *in vitro* Test des Fluoreszenzanstiegs durchgeführt. Am Max-Planck-Institut für Hirnforschung wurden von Dr. Güney Akbalik und Dr. Sivakumar Sambandan hoch-auflösende Mikroskopie-experimente in Neuronen durchgeführt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass nach Injektion keinerlei Fluoreszenz durch Abbau zu erkennen war. Ein Anstieg der Fluoreszenz konnte erst nach Stimulation der neuronalen Aktivität erkannt werden, verteilt im gesamten Neuron. Nach lokaler Freisetzung von Glutamat in den Dendriten durch Zweiphotonenentschüttung, wurde ein lokaler Anstieg der Fluoreszenz erkannt, der nach einigen Sekunden durch Diffusion verschwand, was für eine lokale Aktivierung von Dicer spricht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die lokale Proteinsynthese von *CamKII* reduziert wurde.



## Summary

Biological systems are under the control of mechanisms that are not completely decoded yet. In order to specifically control processes and regulate a system from the outside, an external trigger is necessary. One way of doing this, is to put the system under optical control, i.e. to implement light as an external tool of regulation and a chromophore as an internal modification. There are three main projects that will be presented in this thesis that are all based on that approach, but are executed in different ways.

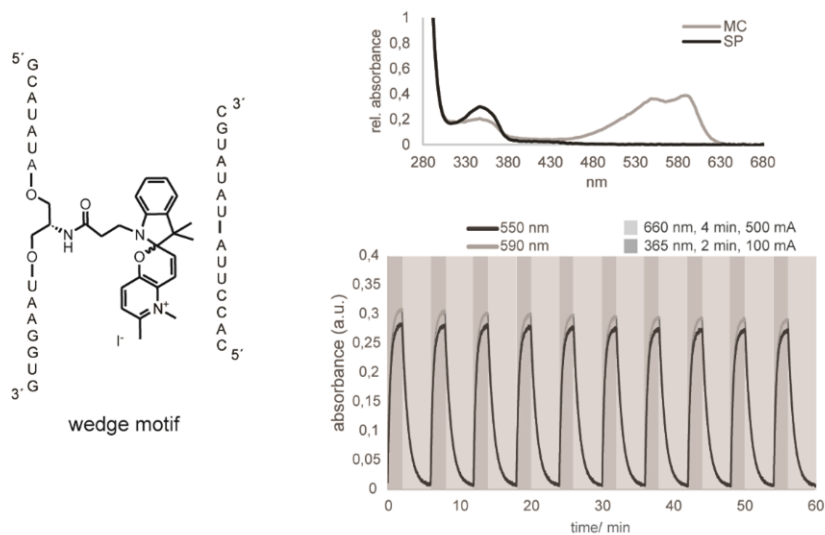
RNA plays a role in many different functions of the cell like protein synthesis or gene regulation. In the first project, the photoswitch spiropyran was used in the context of RNA. The major aim was to covalently attach the spiropyran PyBIPS to an oligonucleotide in order to regulate the hybridization of a duplex structure. Therefore, structural motifs for the post-synthetic labeling of RNA with the photoswitch were screened. The sterically demanding spiropyran-form was supposed to disturb the duplex structure, while the flat and conjugated merocyanin-form is supposed to stabilize the hybridization by intercalation in the base stack. In the preliminary results by Clara Brieke, PyBIPS turned out to be the only Spiropyran staying photochemically active post covalent attachment. Additionally, the implementation via oligonucleotide solid phase synthesis was only achieved in low yields. Following this, PyBIPS was attached to the three non-nucleosidic linker aminoglycol, *D*-threoninol and serinol via an amide-bond post-synthetically after integration of the linker by solid phase synthesis.



In a photochemical characterization PyBIPS, bound to all three linkers, appeared to be photochemically active and was in comparison to the non-attached PyBIPS more stable against photobleaching. Investigation of the duplex structure in the wedge motif, i.e. there is no nucleotide on the opposite site of the photoswitch, revealed a similar behavior as in the single strand, except for the appearance of a second bathochromic absorption maximum of the merocyanin-form around 590 nm with the same properties. In the switching cycles it was demonstrated that an

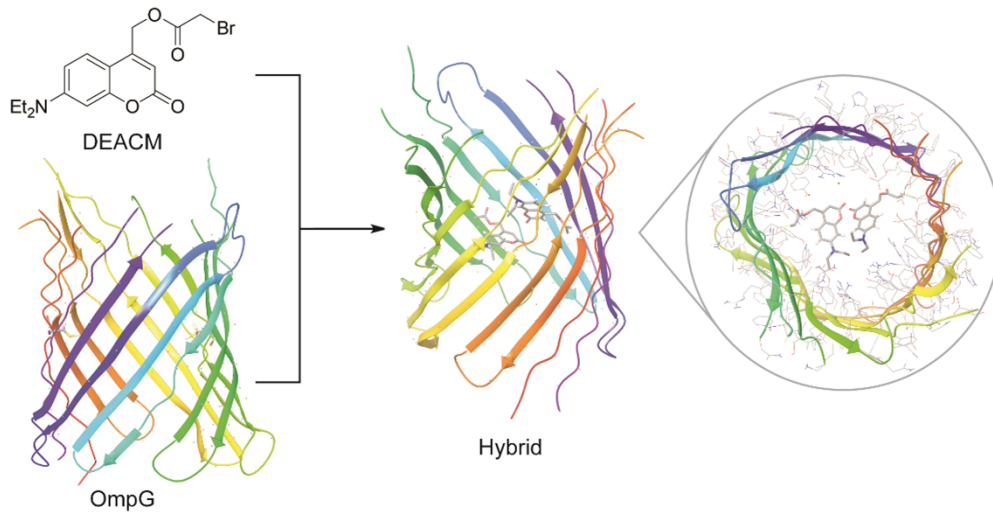
## Zusammenfassung

isomerization was possible by the usage of 660 nm light which enables an application in the therapeutic window of blood. The appearance of the new band is strongly dependent from the linker as well as the motif opposite to PyBIPS in the counter strand. A reason can be that the usually non-favored TTT-merocyanin-form is now stabilized by the environment in the oligonucleotide cavity.

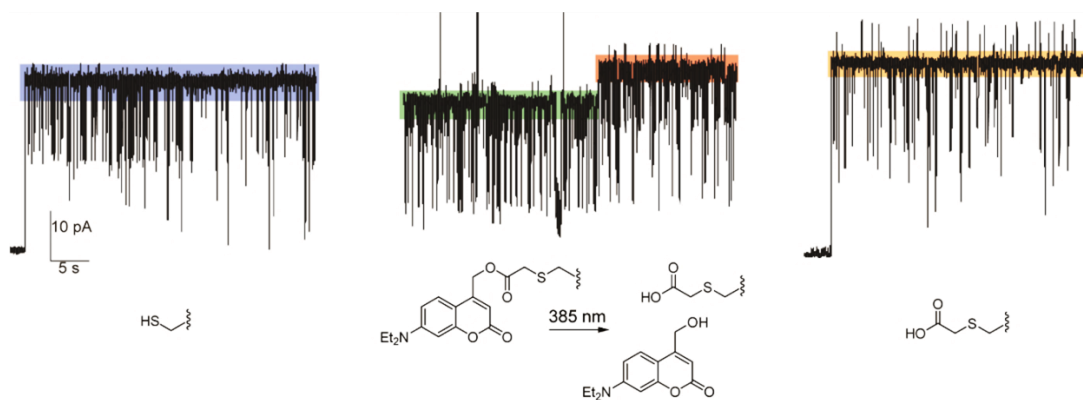


In order to quantify, how isomerizing the photoswitch actually affects the structure of the duplex, melting point studies and fluorescence studies for  $K_D$ -determination were performed without any result. An NMR-study by Tom Landgraf (group of Prof. Dr. Harald Schwalbe) was supposed to reveal more information about the structural integrity, showing that PyBIPS disturbs the neighboring base pairs at all time. The energy of the isomerization was not sufficient to transfer it on the rigid duplex structure which did not meet the expectations and should be applied in other systems in the future.

The focus of the second project was on the membrane protein OmpG from *E. Coli K12*. Proteins offer a number of different functional groups that qualify for selective bioconjugation in a number of applications. OmpG is a porin from the outer membrane of gram-negative bacteria and has a rare  $\beta$ -barrel structure. The pore has a wide diameter and no selectivity at all. The macromolecule has been intensively investigated on its structure, especially loop 6 which closes the pore pH-dependently. In preliminary results, Grosse *et al.* removed loop 6 resulting in a quiet pore that serves as an excellent model system. Furthermore, two cysteine residues were installed at half height of the barrel on opposite sides. The thiol functional groups were then utilized for the installation of two photolabile protecting groups that were supposed to block the channel in the first place and be released by irradiation with light. 7-Diethylaminocoumarin (DEACM) was attached to both cysteines post-synthetically.



The linker bound to DEACM is a compromise, as it has to react with the thiol moiety of cysteine selectively and should still be able to cleave off photoinduced. DEACM-alcohol is released after irradiation and subsequent hydrolysis of the ester, leaving a carboxylic resin on the thiol in the pore behind. In voltage-dependent single molecule measurements (Dr. Philipp Reiß, Marburg University) it was demonstrated that the two DEACM modifications reduced conductivity. After irradiation and cleavage, the blockage was removed resulting in a higher conductivity. The new level above the native unmodified state of OmpG is due to the carboxylic groups left behind.



In order to increase the impact of the blockage, DEACM derivatives were implemented that were further substituted at the C3' position inserting a new stereogenic center. Substituents used were *n*-butyl, adamantane and alkin residues. The introduction of the residues showed in voltage-dependent single molecule measurements that the effective diameter of the pore was significantly reduced. It turned out that the kind and size of the residue are of minor impact compared to the position of the substitution. In another approach to completely reduce conductivity through the pore, the alkin function was exploited for the attachment of fluorophores by alkin-azide-click-reaction. As these constructs were not removable with light anymore, biotin was connected via a PEG-linkage by Click-reaction to the alkin-DEACM hybrid. In the next step, streptavidin was bound

to biotin resulting in an almost complete blockage of OmpG in voltage-dependent single molecule measurements. Although the resin was not photocleavable anymore, it demonstrated that a reversible reduction to minimal conductance should be possible by an exchange of the chromophore.

In a third project a RNA probe was synthesized for the investigation of Dicer activity in neurons of the hippocampus from rats. Synaptic plasticity describes the basic processes involved in memory formation. Neuronal activity initiates a cascade of reactions resulting in the strengthening of synapses. *miRNA* is a post-transcriptional, regulatory element in cells with the aim to silence target *mRNAs*. In this study *miRNA-181a* from *rattus norvegicus* was investigated which targets the *mRNA* of GluA2, a subunit of the AMPA receptor as well as the *mRNA* of calmodulin-dependent kinase CamKII. Both are crucial in the process of neuronal signal transduction and enhancement. In preliminary studies, Dr. Jennifer Rinne established a fully synthetic probe with a hairpin structure, mimicking pre-*miRNA-181a*. The fluorophore TAMRA was positioned at the end of the *miRNA*-sequence and the quencher BHQ2 at the loop in close proximity. Fluorophore and quencher were spatially separated by Dicer processing, resulting in an increase of fluorescence.

The principal task in this project was the synthesis of the RNA 63mer via oligonucleotide solid phase synthesis and the subsequent improvement of the purification strategy. Prior to handing the probe over for *in vivo* experiments, *in vitro* tests of the fluorescence increase were performed. At the Max-Planck-Institute for Brain Research Dr. Güney Akbalik and Dr. Sivakumar Sambandan applied the probe in high-resolution microscopy experiments of neurons. They were able to demonstrate that there is now fluorescence increase due to degradation after injection. Stimulation of neuronal activity triggered fluorescence appearance all over the cell. By local two-photon uncaging of caged glutamate in dendrites, fluorescence appeared locally at the uncaging spot, vanishing after some seconds due to diffusion, proofing the activation of dicer. Furthermore, a decrease of the synthesized amount of CamKII was detected.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen erschienen:

Kahlstatt J., Reiss P., Halbritter T., Essen L.-O., Koert U., Heckel A. *A light-triggered transmembrane porin* - *Chem. Commun.* **2018**, 54, 9623-9626.

Sambandan S., Akbalik G., Kochen L., Rinne J., Kahlstatt J., Glock C., Tushev G., Alvarez-Castelao B., Heckel A., Schuman EM. *Activity-dependent spatially localized miRNA maturation in neuronal dendrites* - *Science* **2017**, 355,634-637.

Posterpräsentationen:

Sommerschule Goethe Universität – ENS Lyon 10. - 12.06.2014, Lyon.

DNG-Doktorandenseminar 29. - 30.09.2014, Bad Herrenalb.

Nukleinsäurechemietreffen 17. - 18.09.2015, Berlin.

LOEWE SynChemBio Symposium 16.02.2016, Rauischholzhausen.

DNG-Doktorandenseminar 22. - 23.09.2016, Bad Herrenalb.

Konferenz „Design and Light Control“ 30.08. - 01.09.2017 Niedernberg.

Nukleinsäurechemietreffen 21. - 22.09.2017, Mainz.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Licht als Werkzeug .....	1
1.2	Photoschalter .....	2
1.2.1	Vorstellung verschiedener Photoschalter .....	2
1.2.2	Spiropyrane .....	3
1.2.3	Spiropyran-Derivate .....	8
1.2.4	Anwendungen von Spiropyranen .....	9
1.3	Photolabile Schutzgruppen .....	12
1.3.1	Verschiedene Arten von photolabilen Schutzgruppen .....	13
1.3.2	Cumarine .....	15
1.3.3	Photolabile Schutzgruppen in Anwendung auf Proteinen .....	17
1.3.4	Cumarine an Thiolen .....	19
1.4	Biokonjugation .....	21
1.4.1	Selektive Reaktionen ausgewählter funktioneller Gruppen.....	22
1.4.2	Click-Chemie.....	23
1.5	Proteine der äußeren Membran ( <i>Outer Membrane Proteins</i> – Omps).....	25
1.5.1	Membranen und Membranproteine .....	25
1.5.2	Integrale Membranproteine in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien .....	27
1.5.3	Outer Membrane Protein G (OmpG).....	30
1.5.4	Ionenkanal-Engineering von OmpG.....	32
1.6	RNA .....	37
1.6.1	miRNA Prozessierung .....	39
1.6.2	Das AntimiR-Prinzip .....	41
1.6.3	Regulation von synaptischer Plastizität durch miRNA.....	42
<b>2</b>	<b>Postsynthetische Markierung von RNA mit Spiropyranen zur Steuerung der Duplex- hybridisierung</b> .....	<b>47</b>
2.1	Motivation und Zielsetzung .....	47
2.2	Ergebnisse und Diskussion .....	49
2.2.1	<i>In silico</i> -gestützte Evaluation der Möglichkeiten zum postsynthetischen, kovalenten Einbau von Spiropyranen in Nukleinsäuren.....	49
2.2.2	Synthese der nicht-nukleosidischen Linker für die Festphasensynthese .....	55

---

2.2.3 Festphasensynthese von 2'-OMe-RNA mit nicht-nukleosidischen Linkern .....	57
2.2.4 Chemische Synthese von Spiropyranen mit Carbonsäure.....	59
2.2.5 Postsynthetische Markierung der 2'-OMe-RNA-Stränge mit PyBIPS .....	63
2.2.6 Photochemische Charakterisierung von PyBIPS in 2'-OMe-RNA .....	68
2.2.7 Quantifizierung des Einfluss von PyBIPS auf die Stabilität des Duplex.....	78
2.3 Zusammenfassung und Ausblick .....	89
<b>3 Protein-Engineering von OmpG.....</b>	<b>91</b>
3.1 Motivation und Zielsetzung.....	91
3.2 Ergebnisse und Diskussion .....	94
3.2.1 Herstellung der OmpG-Cystein-Varianten .....	94
3.2.2 Herstellung von OmpG-DEACM Hybriden .....	96
3.2.3 Charakterisierung der OmpG-DEACM-Hybride mittels Black Lipid Membran-Messungen	100
3.2.4 Charakterisierung von OmpG-Hybriden mit DEACM Derivaten.....	106
3.2.5 Click-Reaktionen mit AlkinDEACM-OmpG-Hybriden .....	113
3.3 Zusammenfassung und Ausblick .....	121
<b>4 Synthese von Fluorophor-/Quencher-markierter pre-miRNA-181a zur Lokalisation in Neuronen .....</b>	<b>123</b>
4.1 Motivation und Zielsetzung.....	123
4.2 Ergebnisse und Diskussion .....	125
4.2.1 Synthese der Fluorophor-/Quencher-gelabelten pre-miRNA-181a.....	125
4.2.2 In Vitro Test des Fluoreszenzanstiegs der miRNA-Sonde .....	128
4.2.3 Reifung von miRNA-181a in Neuronen des Hippocampus.....	129
4.3 Zusammenfassung und Ausblick .....	130
<b>5 Experimenteller Teil.....</b>	<b>133</b>
5.1 Geräte und Materialien .....	133
5.2 Chemische Synthesen.....	135
5.3 Methoden .....	156
5.3.1 Oligonukleotid Methoden .....	156
5.3.2 Photochemische Methoden.....	160
5.3.3 Molekularbiologische Methoden .....	163
5.3.4 Proteinchemische Methoden .....	166



---

5.3.5 <i>Black Lipid</i> Membran Messungen.....	171
5.3.6 Elektrophoretische Trennverfahren .....	171
5.3.7 MD-Simulation .....	173
5.3.8 Puffer.....	173
<b>6 Anhang</b> .....	<b>177</b>
6.1 Abkürzungsverzeichnis .....	177
6.2 Abbildungsverzeichnis .....	181
6.3 Literaturverzeichnis .....	190
<b>7 Lebenslauf</b> .....	<b>197</b>



# 1 Einleitung

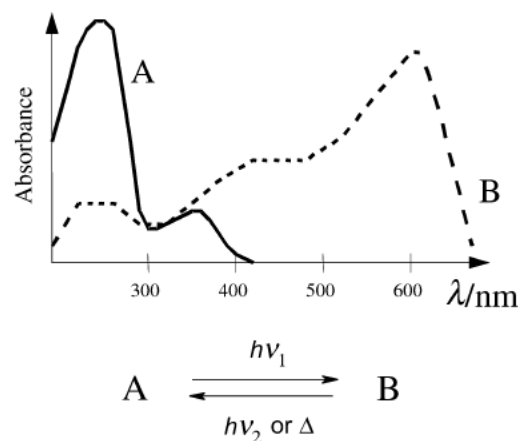
## 1.1 Licht als Werkzeug

In den letzten 50 Jahren hat sich Licht als wertvolles Werkzeug in der Erforschung von biologischen Systemen in vielerlei Hinsicht etabliert.<sup>[1]</sup> Über die Jahre haben sich mit neuen Anwendungsgebieten auch neue Anforderungen für den Einsatz von Licht ergeben. Um Licht nutzbar zu machen, benötigt man ein Molekül das responsiv auf Photonen ist, einen Chromophor. Dieser kann zum einen das Licht wieder abgeben (z.B. über Fluoreszenz), was im Gebiet der hochauflösenden Mikroskopie genutzt wird, zum anderen kann die aufgenommene Energie, die das Licht überträgt, molekülinterne Prozesse einleiten, wie Umlagerungen, Bindungsbrüche oder Isomerisierung. Klassisch gilt Licht als externer Stimulus, der orthogonal zu vielen anderen Stimuli wie Temperatur, Konzentration oder pH-Wert verwendet werden kann und dazu noch orts- und zeitaufgelöst einsetzbar ist. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, musste sich die Technik der lichtgebenden Quelle ebenfalls weiterentwickeln.<sup>[2]</sup> Nicht ohne Grund wurde mittlerweile eine Reihe an Nobelpreisen verliehen, bei denen Licht als Werkzeug eine zentrale Rolle spielt, wie im Jahr 2014 für den Fortschritt in der Auflösungsgrenze der Fluoreszenzmikroskopie.<sup>[3]</sup>

Die verschiedenen Einsatzgebiete von Licht haben die Gemeinsamkeit, dass das verwendete System unter optische Kontrolle gebracht wird, jedoch ist die Art der Ausführung und das Ziel der Anwendung individuell angepasst. Im Gebiet der Optogenetik werden natürlich vorkommende Licht-emittierende Systeme weiterentwickelt und dann für andere Systeme nutzbar gemacht.<sup>[4]</sup> Um über synthetische Chromophore Zugang zu biologischen Systemen zu finden, gibt es mehrere Ansätze. Die klassische Nutzung von photolabilen Schutzgruppen (engl. *Caging*), die sich irreversibel durch Licht abspalten lassen, ist seit Jahrzehnten ein prominentes Anwendungsgebiet. Dabei stellen Anwendungen in Gewebe aufgrund von Eigenabsorption neue Herausforderungen dar<sup>[5]</sup>, die durch Rot-Verschiebung der Anregungswellenlänge versucht wird zu umgehen.<sup>[6]</sup> Das Pendant dazu ist der Photoschalter, der sich reversibel zwischen zwei Zuständen isomerisieren lässt und deshalb stets im angewendeten System vorhanden ist. Prominente Anwendungen wurden im Bereich der Pharmakologie durch Kombination des Photoschalters mit dem Wirkstoff und zu Steuerung von Ionenkanälen erreicht.<sup>[6-8]</sup> Eine weitere Klasse von Chromophoren sind Fluorophore, deren Entwicklung einen großen Anteil am Fortschritt in der Mikroskopie hat.

## 1.2 Photoschalter

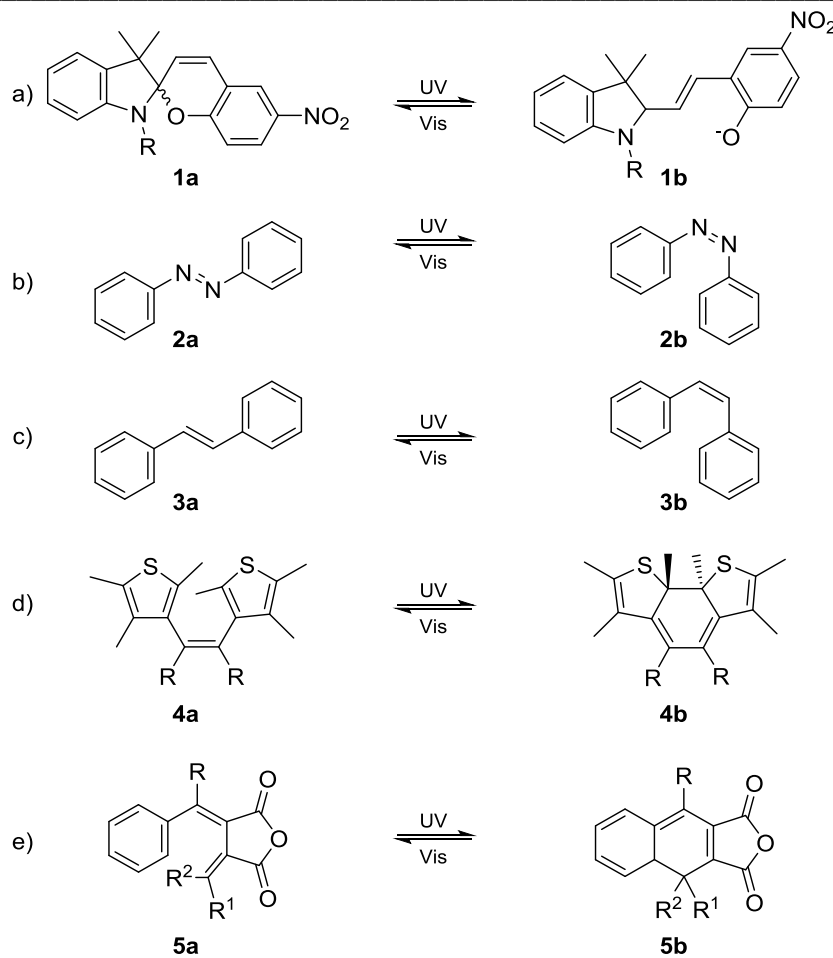
Photochromie beschreibt klassisch die „Licht-induzierte, reversible Änderung der Farbe“ eines Moleküls. Genauer gesagt beschreibt es einen Prozess, bei dem ein Isomer A durch Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs in einer Reaktion in ein Isomer B umgewandelt wird. Dieser Prozess ist reversibel, denn durch Belichtung von Isomer B mit Licht einer anderen Wellenlänge erfolgt eine Rückreaktion zu Isomer A. Damit ein Molekül dieses bistabile Verhalten zeigt, sollten die Isomere A und B möglichst unterschiedliche Absorptionsspektren besitzen (siehe Abb. 1, Beispiele für A und B) und sind aus diesem Grund normalerweise unterschiedlich gefärbt. Ein Isomer ist dabei oftmals die thermodynamisch stabile Form. Außer durch Bestrahlung mit Licht (photochemisch, Typ-P) kann eine Isomerisierung vom labileren zum thermodynamisch stabileren Isomer auch durch Wärme ausgelöst werden (thermisch, Typ-T).<sup>[9]</sup>



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Absorptionsspektren des Beispiels A und B. Isomer A lässt sich durch Belichtung im UV Bereich zu Isomer B isomerisieren. Die Rückisomerisierung zu Isomer A kann außer durch Anregung mit Licht im sichtbaren Bereich auch thermisch erfolgen.<sup>[9]</sup>

### 1.2.1 Vorstellung verschiedener Photoschalter

Photoschalter werden im Allgemeinen in zwei Klassen unterschieden. Während Azobenzole und Stilbene (b, c in Abb. 2) über die zentrale Doppelbindung im Molekül isomerisieren, findet im Fall von Spiropyranen, Diarylethenen und Fulgiden (a, d und e) eine perizyklische Ringschlussreaktion statt. Dabei findet bei Spiropyranen und Diarylethenen vor allem eine Änderung des sterischen Anspruchs statt. Fulgide hingegen gewinnen an Flexibilität.<sup>[2]</sup>



**Abb. 2:** Übersicht über verschiedene, bekannte Photoschalter mit Photoisomeren – a) Spiropyran, b) Azobenzol, c) Stilben, d) Diarylethen und e) Fulgid.

Der prominenteste und am häufigsten genutzte Photoschalter ist das Azobenzol (2).<sup>[10]</sup> Dennoch hat es den Nachteil, dass aufgrund der Überlagerung der Absorptionsspektren von *cis* und *trans* (2 a/b) keine Spezies zu 100% entstehen kann. In der Literatur sind einige Ansätze zu finden, in denen durch Donor-Akzeptor-Substituenten versucht wird, den Grad der Isomerisierung zu erhöhen sowie Azobenzole auf Anwendungen maßzuschneidern.<sup>[10-12]</sup> Trauner *et al.*<sup>[6,7]</sup> prägten den Begriff der „Azalogisierung“. Durch die Einführung von Azobenzolen in pharmakologische Wirkstoffe wird damit die Zugänglichkeit unter Photokontrolle gebracht.

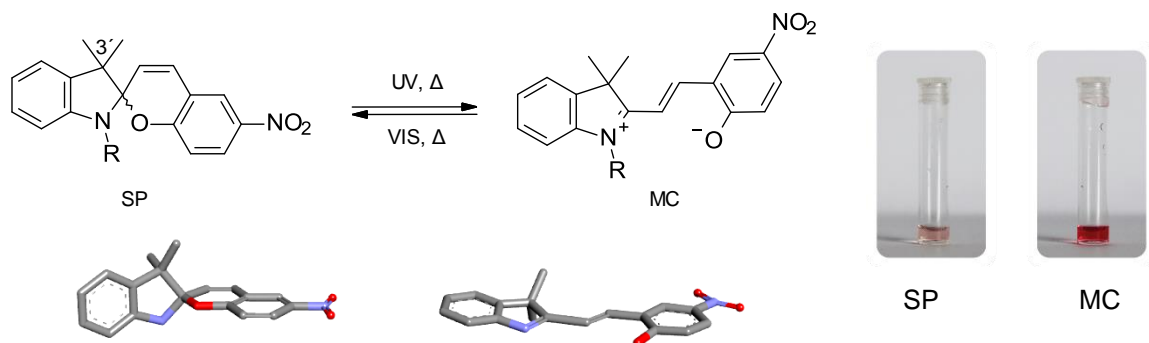
Im folgenden Kapitel wird gesondert auf Spiropyrane eingegangen, die eine zentrale Rolle in dieser Arbeit spielen.

### 1.2.2 Spiropyrane

Die Alleinstellungsmerkmale der Spiropyrane (1) unter den Photoschaltern sind die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Isomere. Die meisten Spiropyran-Derivate liegen im

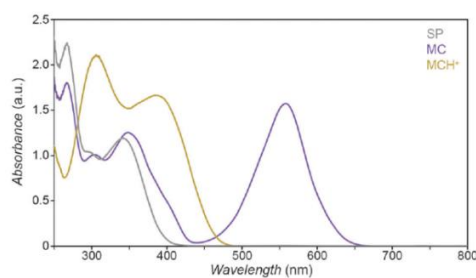
## 1 - Einleitung

thermodynamischen Gleichgewicht bevorzugt in der Spiropyran-Form (SP, **1a**) vor, welche sich durch ein sterisch anspruchsvolles, orthogonales Ringsystem mit Spirozentrum auszeichnet. Der linke Teil wird Indolin, der rechte Chromen genannt (vgl. Abb. 3). Durch Belichtung mit UV-Licht öffnet sich das Spirozentrum unter Bildung des Merocyanins. Die offene Merocyanin-Form (MC, **1b**) besteht aus einem planaren, konjugierten Elektronensystem, was auch der Grund für die intensive Färbung ist (siehe Abb. 3 gezeigt am 6-Nitrospiropbenzopyran „NitroBIPS“). Durch Belichtung mit sichtbarem Licht schließt sich das Ringsystem wieder unter Rückgewinnung der Spiropyran-Form.<sup>[13]</sup>



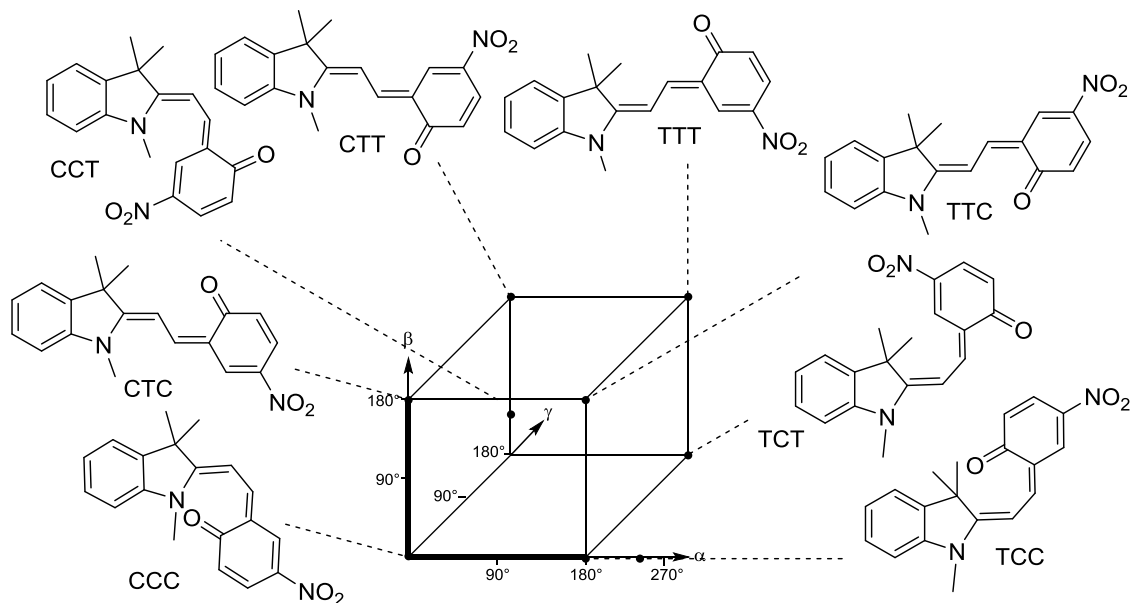
**Abb. 3:** Linke Seite – Darstellung von Spiropyran- und Merocyanin-Form, oben schematisch mit Bedingungen der Isomerisierung, unten mit Verbildlichung des räumlichen Anspruchs von SP und MC. Rechte Seite – Foto von SP- und MC-Form gelöst in Wasser. Die MC-Form zeigt die charakteristische rote Farbe.

Die Unterschiede in den Eigenschaften gehen über die räumliche Komponente hinaus. Während die SP-Form unpolar mit einem geringen Dipolmoment von 4-6 D ist, ist die MC-Form polar, ein Zwitterion und hat ein Dipolmoment von 18 D.<sup>[14]</sup> Das Absorptionsspektrum der SP-Form zeigt typischerweise zwei Maxima, eins im Bereich unter 300 nm, das den  $\pi-\pi^*$  Übergang des Indolins wiedergibt und ein zweites bei ca. 350 nm des Chromenteils, durch welches bei Bestrahlung die Ringöffnung initialisiert wird. Dabei handelt es sich um einen Prozess erster Ordnung, der auch mit 2-Photonen-Anregung erzielt werden kann. Die MC-Form besitzt ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum im Bereich um 550 nm je nach Substituenten, welches durch die Delokalisierung über das komplette Molekül zustande kommt (siehe Abb. 4).<sup>[13]</sup>



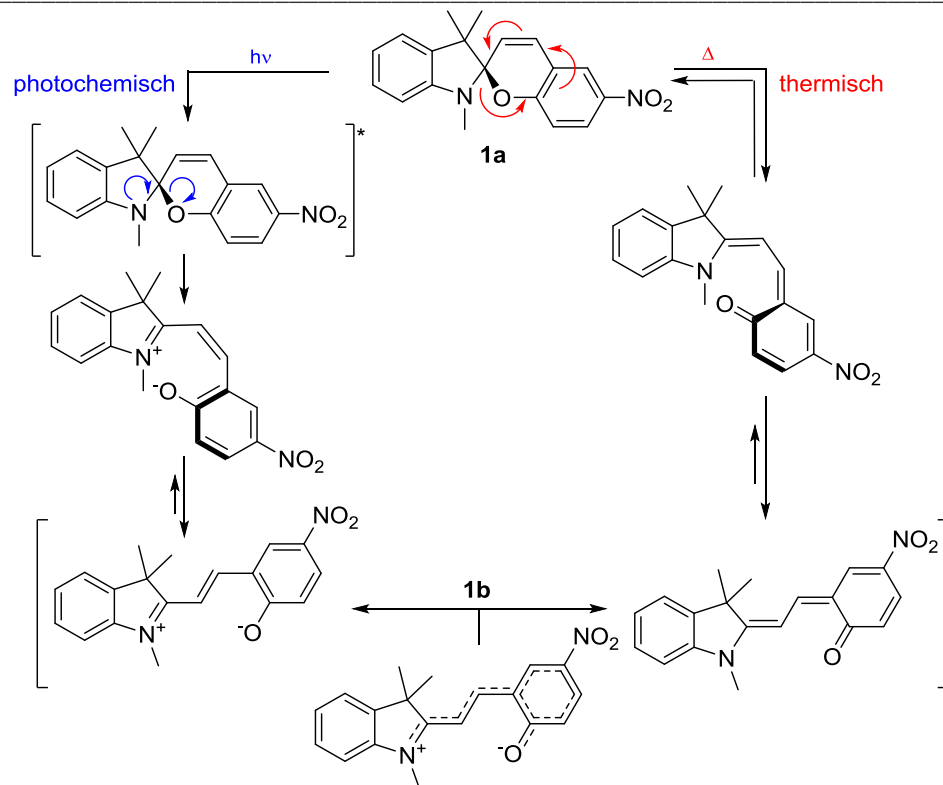
**Abb. 4:** Charakteristische Absorptionsspektren der SP-Form (grau), der MC-Form (violett) und der protonierten MC-Form, MCH<sup>+</sup> (gelb) am Beispiel von NitroBIPS **1** in MeCN. Entnommen aus Klajn *et al.*<sup>[13]</sup>

Beim Öffnen der SP-Form in die MC-Form entstehen drei konjugierte Doppelbindungen an der Methinbrücke. In Abb. 5 sind alle möglichen Konformationen der MC-Form gezeigt, die durch die Ringöffnung und freie Drehbarkeit der Bindungen zwischen Indolin- und Chromenteil entstehen können. Dabei werden *cis*-Doppelbindungen mit C und *trans*- mit T abgekürzt. Mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  sind die Diederwinkel der einzelnen Bindungen beschreiben, die sich je nach Isomer anhand der Bindungswinkel in ein Koordinatensystem einordnen lassen.<sup>[15]</sup> Von den gezeigten Isomeren sind jedoch nur das bevorzugte TTC und TTT Isomer stabil. Die anderen Konformationen werden zum Teil bei der Ringöffnung/-schließung zur SP-Form gebildet, isomerisieren dann aber in die stabilste Form.<sup>[13]</sup>



**Abb. 5:** Darstellung der möglichen Isomere durch Rotation der zentralen Bindungen der Methinbrücke.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  beschreiben den Diederwinkel der *cis*- und *trans*-Orientierung der einzelnen Bindungen von Merocyanin **1b**.<sup>[12,14]</sup>

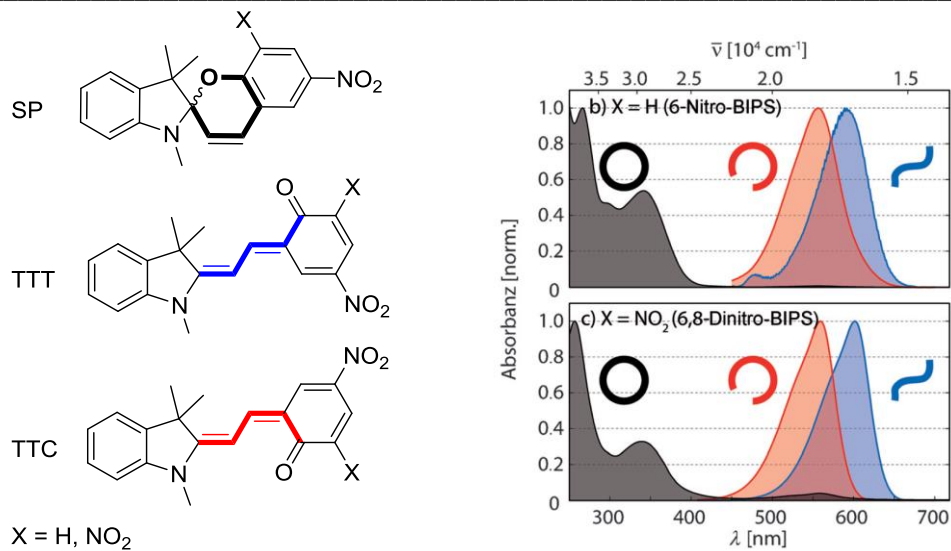
In Abb. 6 ist der Mechanismus der photochemischen und der thermischen Isomerisierung anhand von NitroBIPS gezeigt, der sich nur in der Initialisierungsart unterscheidet. Beim photochemischen Prozess (Abb. 6 links) kommt es durch Bestrahlung zum C-O-Bindungsbruch gefolgt von einer Öffnung zum CCC-Isomer. Der thermische Weg beginnt mit einer  $6\pi$ -zyklische Ringöffnung, wodurch kein Zwitterion entsteht, gefolgt von einer Rotation zu CCC.<sup>[13]</sup> Aufgrund von Instabilität erfolgt in beiden Fällen anschließend eine Rotation in die stabile Form TTC, in der das Merocyanin bevorzugt vorliegt.<sup>[16]</sup> Dieser Prozess wird im Fall eines Elektronen-ziehenden Substituenten am Chromenteil beschleunigt, da die Aktivierungsenergie des Bindungsbruchs sinkt und damit die Rotation in das TTC-Isomer. Ein elektronenschiebender Substituent hat einen entgegengesetzten Einfluss auf die Isomerisierung.<sup>[16]</sup>



**Abb. 6:** Darstellung des Isomerisierungsmechanismus photochemisch oder thermisch initialisiert. Beide Wege gehen über ähnliche Zwischenstufen von der Spiropyran-Form **1a** in die Merocyanin-Form **1b** über. Angelehnt an Klajn.<sup>[13,15]</sup>

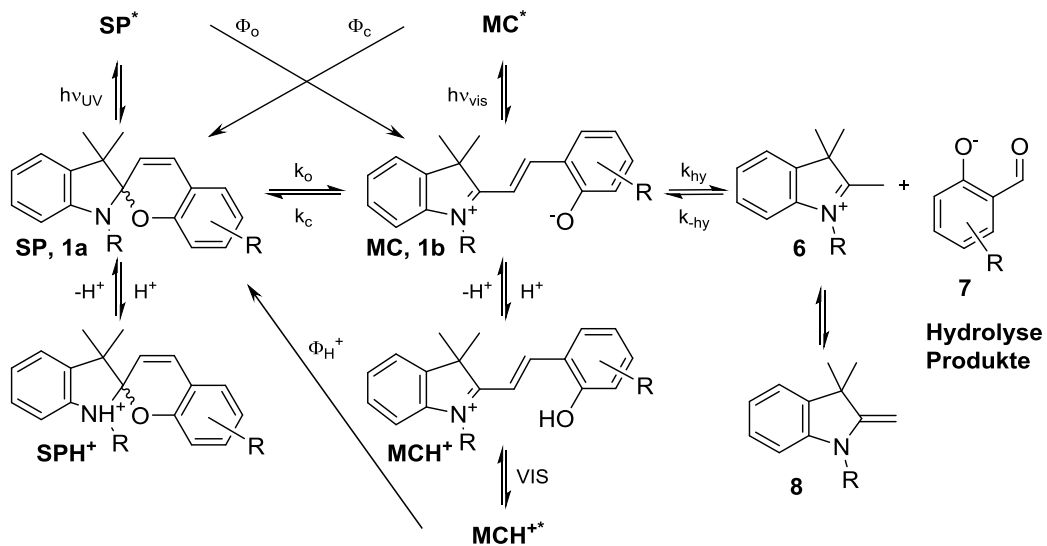
Die Isomerisierung der Spiropyrane ist stark abhängig von ihrer Umgebung in Bezug auf Lösungsmittel und pH-Wert. Je nach Lösungsmittel werden unterschiedliche Isomere stabilisiert, was zu einer Änderung des Abstands der Energieniveaus führt und damit zu einer Änderung des Absorptionsspektrums („Solvatochromie“ genannt).<sup>[9,17]</sup> Ein Beispiel ist die Stabilisierung der chinoiden MC-Form durch unpolare Lösungsmittel, was zu einer Energieminimierung und einer bathochromen Verschiebung führt.<sup>[18]</sup> Brixner und Mitarbeiter<sup>[19]</sup> haben untersucht, welchen Einfluss die Umgebung auf das Verhältnis der TTC/TTT-Isomere ausübt. Über Ultrakurzzeitspektroskopie konnten sie zeigen, dass die beiden MC-Isomere unterschiedliche Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich haben und normalerweise im Verhältnis 10:1 (TTC/TTT) vorliegen. Am Beispiel von NitroBIPS (**1**) in MeCN und DinitroBIPS (**11**) in CHCl<sub>3</sub> ist zu erkennen, dass das Absorptionsmaximum der TTT-Form eine bathochrome Verschiebung von ca. 50 nm hat (siehe Abb. 7). Für DinitroBIPS wurde außerdem gezeigt, dass die beiden Isomere in die SP-Form mit vergleichbarer Quantenausbeute (35-40%) übergehen können. Einzig die Lebensdauer der TTT-Form ist im angeregten Zustand mit 900 ps im Vergleich zu 95 ps deutlich länger.<sup>[20]</sup> In einer weiteren Studie an NitroBIPS (**1**) wurde außerdem gezeigt, dass sich 18% von TTC innerhalb von 200 fs in TTT umwandeln, in die andere Richtung jedoch nicht. Der Übergang in den Grundzustand erfolgt durch Abgabe der selben Energie aus den angeregten Zuständen von TTC und TTT.<sup>[21]</sup>





**Abb. 7:** Vergleich der MC-Isomere TTC und TTT. Links - Darstellung der Struktur der Isomere mit Markierung der entscheidenden Bereiche für TTT blau und TTC rot. Rechts – Absorptionsspektren der Spiropyran-Derivate NitroBIPS (X=H) oben und DinitroBIPS (X=NO<sub>2</sub>) unten. Das Absorptionsmaximum der TTT-Form ist im Vergleich zu TTC Rotverschoben. Entnommen aus Nuernberger *et al.*<sup>[19]</sup>

In Abb. 8 ist eine allgemeine Übersicht der möglichen Isomerisierungen, Protonierungen und Reaktionspfade der SP- und MC-Form gezeigt. Photochemisch lassen sich SP- und MC-Form durch Bestrahlung im Bereich ihrer charakteristischen Absorptionsmaxima (350 nm/550 nm) isomerisieren, aber auch thermisch ist eine Isomerisierung mit der Reaktionsrate  $k$  möglich.



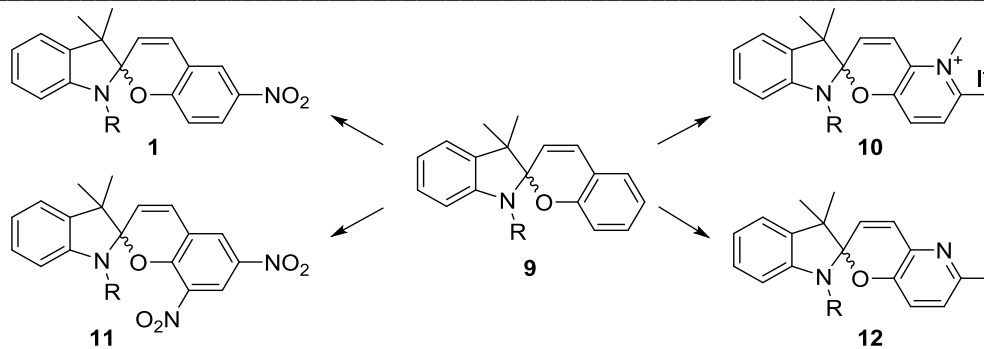
**Abb. 8:** Schematische Übersicht von möglichen Isomerisierungs- und Protonierungszustände der SP- und MC-Form. Außer der photochemisch induzierten Isomerisierung lassen sich SP- und MC-Form pH-Wert-abhängig protonieren, einhergehend mit einer Änderung des Absorptionsspektrums. Ausgehend von der MC-Form ist Hydrolyse in Anwesenheit von Wasser möglich. Angelehnt an Kaiser *et al.*<sup>[22]</sup>

Beide Formen können protoniert werden, was im Fall der SP-Form (SPH<sup>+</sup>) zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 300 nm führt, sich aber nicht photochemisch isomerisieren lässt. Die protonierte MC-Form (MCH<sup>+</sup>) lässt sich dagegen durch Bestrahlung mit blauverschobenen, sichtbarem Licht bei 400 nm in die SP-Form umwandeln. Ausgehend von der offenen MC-Form kann durch Wasseranlagerung eine Retro-Aldolreaktion eingeleitet werden, die zur Hydrolyse in die Produkte Indolin und Hydroxybenzaldehyd führt.<sup>[22,23]</sup>

### 1.2.3 Spiropyran-Derivate

In der Literatur ist eine Vielzahl an Spiropyran-Derivaten bekannt, was darauf zurückzuführen ist, dass sie synthetisch leicht zugänglich sind. Die allgemeine Synthese wurde 2010 von Beyer und Wagenknecht<sup>[24]</sup> veröffentlicht. Sie haben gleichzeitig gezeigt, welchen Einfluss verschiedene Substituenten am Chromenteil auf den spektroskopischen Charakter des Photoschalters haben. Der Indolinteil wird dagegen häufig nur am Stickstoffatom modifiziert, um z.B. wasserlösliche Reste einzuführen.<sup>[25]</sup>

In Abb. 9 sind ausgehend vom unsubstituierten BIPS (Spirobenzopyran) verschiedene Derivate gezeigt. Dabei ist NitroBIPS **1**, das am häufigsten verwendete in der Literatur.<sup>[13]</sup> Neben dem einfach-substituierten ist auch ein doppelt-substituiertes DinitroBIPS (**11**) bekannt, welches durch seine bevorzugte Isomerisierung in die MC-Form hervorsticht. Jedoch ist es dadurch sehr anfällig für Hydrolyse durch Retroaldolreaktion und nur für kurze Zeit in wässrigem Medium stabil.<sup>[22]</sup> Ein Derivat, das eine sehr gute Löslichkeit in Wasser zeigt und dazu noch resistent gegen Hydrolyse scheint, ist das Spirobenzopyridopyran (PyBIPS, **10**). Kaiser *et al.*<sup>[22]</sup> haben die drei genannten Derivate miteinander verglichen (siehe Abb. 9). PyBIPS **10** zeichnet sich dadurch aus, dass die Reaktionspfade nur über Singulett-Zustände ablaufen und dadurch schneller sind als Reaktionen über Triplett-Pfade. Dazu ist es noch thermisch stabil und liegt bevorzugt zu 100% in der SP-Form vor. Ein Nachteil ist, dass es anfällig für Photolyse ist.<sup>[22,26,27]</sup> Die Reaktionspfade der Nitro-Derivate laufen über Triplett-Zustände ab und gehen häufig in mehrere MC-Formen über, was ihre Isomerisierung stark verlangsamt. Sie sind anfällig für Hydrolyse, aber gegen Photolyse weitgehend stabil. Ein Nachteil ist, dass eine gute Schaltamplitude nur bei Belichtung mit 260 nm möglich ist aufgrund überlagernder Banden bei 350 nm. Dies hat für eine biologische Anwendung große Nachteile, da es unter anderem DNA-schädigend ist.<sup>[22]</sup>



**Abb. 9:** Spiropyran-Derivate ausgehend von BIPS **9**. Linke Seite - Nitroderivate NitroBIPS **1** und DinitroBIPS **11**. Rechte Seite - Pyridinderivate PyBIPS **10** und PyBIPS-Derivat ohne Methylgruppe **12**.

Ein weiteres interessantes Derivat ist ein erst kürzlich präsentiertes PyBIPS-Derivat ohne Methylgruppe am Pyridin-Stickstoff (siehe Abb. 9 - **12**). Im Gegensatz zur bisher bekannten Variante liegt der Photoschalter zu 48% in der MC-Form vor und lässt sich durch sichtbares Licht zu 100% in die SP-Form isomerisieren. Durch UV-Licht oder thermisch findet eine Rückreaktion statt. Dennoch zeigt es sich in einem pH-Bereich zwischen 1-12 stabil gegen Hydrolyse. Eine sehr interessante Eigenschaft ist, dass der  $pK_a$  des Pyridin-Stickstoffs in SP- und MC-Form unterschiedlich ist und die funktionelle Gruppe daher eine Photosäure darstellt. In Bezug auf pH-abhängige, wässrige Systeme lässt sich die Photosäure als reversibles regulatorisches Element einsetzen.<sup>[28]</sup>

#### 1.2.4 Anwendungen von Spiropyranen

Spiropyrane haben in vielen Bereichen Anwendung gefunden. Darunter zählen die Modifikation von Polymeren<sup>[29,30]</sup>, Mizellen<sup>[31,32]</sup>, Oberflächen<sup>[33,34]</sup>, Biomakromolekülen<sup>[35]</sup>, Enzymen<sup>[36,37]</sup>, Nanopartikeln<sup>[38-40]</sup> und elektrochemischen Eigenschaften<sup>[41]</sup>. Dabei dient nicht nur Licht als Stimulus für die Isomerisierung des Photoschalters, sondern auch Temperatur<sup>[42]</sup>, pH-Wert<sup>[43]</sup>, Lösungsmittelpolarität<sup>[44]</sup>, Redoxpotential<sup>[42]</sup>, Metallionen<sup>[45]</sup> und mechanischer Druck<sup>[46]</sup>. In HEK293 Zellexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich die SP-Form in Zellen einschleusen lässt. Erst bei Isomerisierung in die MC-Form wirkt der Photoschalter toxisch auf seine biologische Umgebung.<sup>[47]</sup>

In Bezug auf Nukleinsäuren wurden erste Versuche von Andersson *et al.*<sup>[25]</sup> gezeigt. Sie zeigten, dass ein nicht kovalent gebundenes NitroBIPS in der MC-Form in den Basenstapel interkalieren kann und eine  $\pi$ -Stapelung macht. Durch Belichtung isomerisiert der Photoschalter in die SP-Form und verlässt den Basenstapel wieder. Durch die Interkalation und die Wechselwirkung mit den

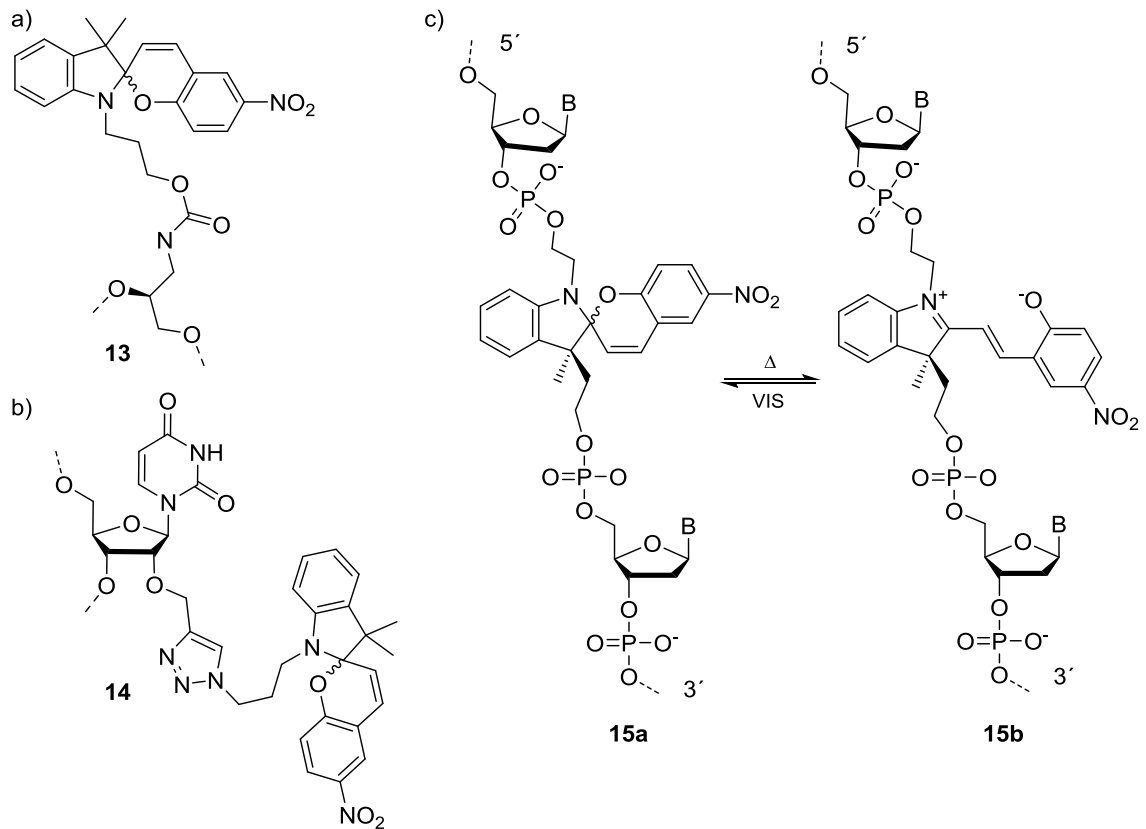
## 1 - Einleitung

---

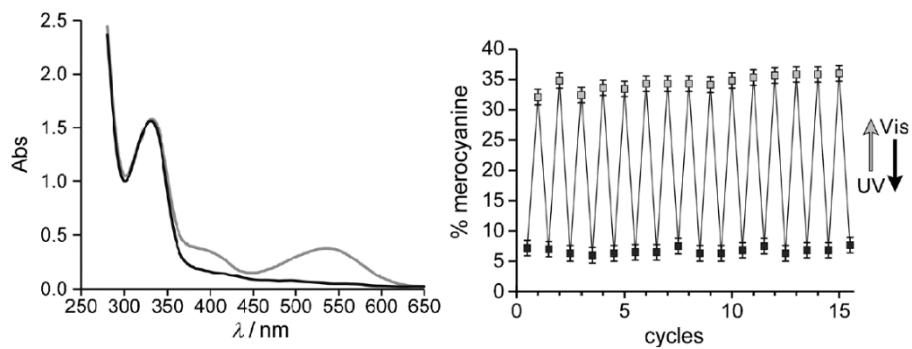
benachbarten Basen wird das Absorptionsspektrum der MC-Form hypsochrom verschoben. In einer weiteren Studie haben Young und Deiters gezeigt, dass ein RNA-Aptamer selektiv mit nur einem Spiropyran-Isomer wechselwirkt.<sup>[48]</sup>

Erste Versuche ein Spiropyran kovalent an DNA zu binden wurden von Asanuma *et al.*<sup>[49]</sup> durchgeführt. NitroBIPS wurde über einen Linker an ein T<sub>8</sub>-mer am 5'-Ende angebracht, wodurch der Schmelzpunkt des Oligonukleotids erhöhte wurde. Jedoch war keine Isomerisierung von SP- in die MC-Form mit Licht mehr möglich. Dasselbe Problem hatten Beyer und Wagenknecht<sup>[50]</sup>, nachdem sie NitroBIPS durch einen nicht-nukleosidischen Linker im Rückgrat der DNA angebracht hatten (**13**). Auch der Versuch den Photoschalter an der 2'-Hydroxygruppe einer Ribose über Clickreaktion (**14**) anzubringen hatte keinen positiven Einfluss auf das Schaltverhalten (siehe Abb. 10 a und b). Brieke und Heckel<sup>[51]</sup> haben den Ansatz gewählt das Spiropyran als Nukleotidanalogen in das Rückgrat von DNA einzubauen. In Abb. 10 c) ist der synthetisch modifizierte Photoschalter gezeigt, der die stufenartige Struktur des Oligonukleotids nachahmen soll (**15**). Die beiden Linker sind so konzipiert, dass sich das Spiropyran nicht aus dem Basenstapel herausdrehen kann. Mit den entsprechenden Schutzgruppen wurde NitroBIPS über Festphasensynthese in einen DNA-Strang eingebaut. Die photochemischen Eigenschaften von NitroBIPS zeigten jedoch keinen Unterschied, sodass eine Isomerisierung mit Licht nur in eine Richtung möglich ist.

Der Durchbruch wurde von Brieke und Heckel<sup>[51]</sup> mit dem Austausch des Chromenteils erzielt. Zuvor hatten Stafforst und Hilbert<sup>[52]</sup> gezeigt, dass die Spiropyran-bildende Aldolreaktion reversibel ist. Dadurch lässt sich über die Zugabe des gewünschten Derivats im Überschuss ein Austausch im DNA-Strang durchführen. Darauf basierend wurden von Brieke verschiedene Derivate getestet mit dem Ergebnis, dass PyBIPS ein vielversprechender Kandidat für den Einbau in Oligonukleotide ist. Auch nach kovalentem Einbau lässt sich der Photoschalter in beide Richtungen mit Licht über viele Zyklen schalten (siehe Abb. 11). Der Vorteil von PyBIPS **10** gegenüber vielen anderen Spiropyranen ist, dass die Isomerisierung über einen Singulett-Zustand abläuft und nicht über Triplett-Zustände, die von den umgebenden Basen gequencht werden.<sup>[26,51]</sup>



**Abb. 10:** Literaturbeispiele zum kovalenten Einbau von NitroBIPS in DNA. a) Anknüpfung an einen nicht-nukleosidischen Linker **13** b) über Click-Reaktion an der 2'-OH-Gruppe eines RNA-Bausteins. a) und b) von Beyer und Wagenknecht<sup>[50]</sup>. c) Nucleotidanalogue als Mimik des DNA-Rückgrats von Brieke und Heckel<sup>[51]</sup>.



**Abb. 11:** Photochemische Charakterisierung von PyBIPS in DNA. Links – Absorptionsspektrum der SP- (schwarz) und MC-Form (grau). Rechts – Schaltzyklus durch Belichtung mit UV und sichtbarem Licht. Entnommen aus Brieke *et al.*<sup>[51]</sup>

### 1.3 Photolabile Schutzgruppen

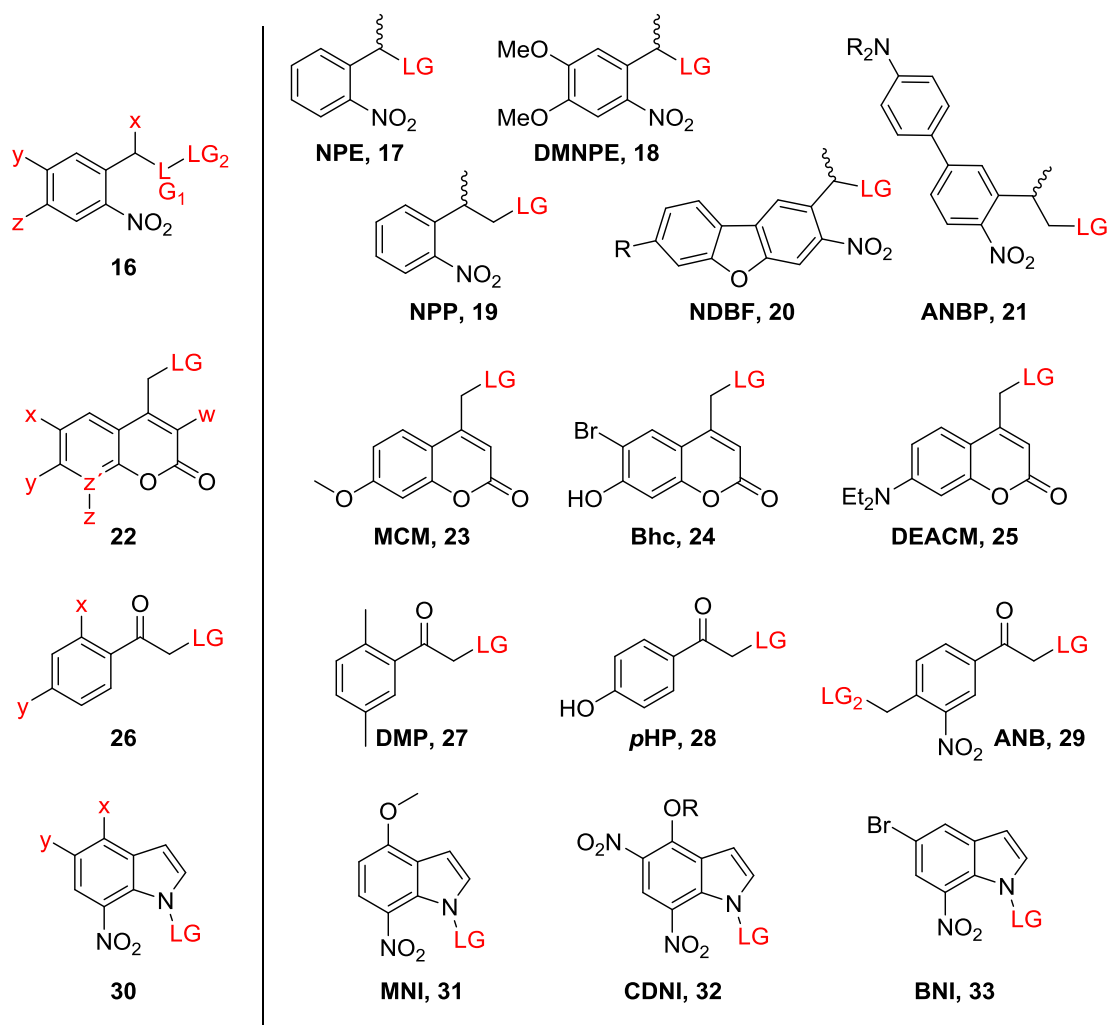
Im Gegensatz zu den bisher behandelten, reversiblen Photoschaltern werden photolabile Schutzgruppen (PPG) mit Licht irreversibel abgespalten. Sie haben seit ihrer ersten Erwähnung von Barltrop und Schofield<sup>[1]</sup> und der ersten Anwendung auf ein biologisch relevantes Molekül von Engels *et al.*<sup>[53]</sup> eine rasante Entwicklung durchlaufen und sind in einem immensen Anwendungsfeld ein präzises Werkzeug.<sup>[8]</sup> Dabei beruht das Prinzip darauf, eine ausgewählte funktionelle Gruppe chemisch mit einer photolabilen Schutzgruppe zu versehen und damit das Zielmolekül in seiner Funktion zu inhibieren. Durch Bestrahlung im Bereich des Absorptionsmaximum wird die Schutzgruppe in einen angeregten Zustand versetzt und kann aus diesem den Reaktionsweg der Abspaltung eingehen, was aus dem Grundzustand nicht möglich wäre.<sup>[2,54]</sup>

Um einen möglichst großen Effekt mit nur einer photolabilen Schutzgruppe zu erzielen, müssen eine ganze Reihe von Anforderungen erfüllt werden. Für ein hundertprozentiges An/Aus-Verhalten muss die richtige Stelle am zu schützenden Zielmolekül gefunden werden. Ein Vorteil ist dabei, wenn die photolabile Schutzgruppe mit vielen verschiedenen funktionellen Gruppen kompatibel ist. Sie sollte sich leicht einführen lassen und nach dem Anbringen stabil gegenüber den Bedingungen der gewünschten Anwendung sein (pH-Wert, Wasserlöslichkeit, Redoxpotential, etc.) sowie eine minimale intrinsische Aktivität aufweisen. Aus spektroskopischer Sicht ist es wünschenswert, dass die photolabile Schutzgruppe ein möglichst rot-verschobenes, schmalbandiges Absorptionsmaximum aufweist, um keine biologischen Schäden durch UV-Licht zu verursachen. Dazu kommen ein hoher Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ), d.h. die Fähigkeit, Photonen aufzunehmen, sowie eine hohe Quantenausbeute ( $\Phi$ ), um durch die aufgenommene Energie der Photonen den gewünschten Reaktionsweg einzuleiten. Der Reaktionsweg sollte schnell ablaufen und nicht durch konkurrierende Pfade gestört werden. Das entstehende Abspaltungsprodukt sollte nicht toxisch auf die Umgebung wirken, das Anregungslicht nicht absorbieren, löslich im Zielmedium sein und keine Reste durch den Abspaltmechanismus am Zielmolekül zurücklassen (engl. *traceless uncaging*).<sup>[2,54]</sup>

Neue Herausforderungen des Gebiets der photolabilen Schutzgruppen stellen die Anpassung auf immer komplexere Systeme dar. Dies kann z.B. durch den Einsatz von mehreren, verschiedenen photolabilen Schutzgruppen realisiert werden, die wellenlängenselektiv angesteuert werden können.<sup>[55]</sup> Eine weitere Schwierigkeit ist die Penetration von Gewebe oder Blut mit Licht. Dies verlangt nach einer photolabilen Schutzgruppe, die im nah-IR Bereich absorbieren kann oder nach Techniken wie der 2-Photonen-Anregung (2PE), um diese spektrale Grenze zu überwinden.<sup>[56,57]</sup>

## 1.3.1 Verschiedene Arten von photolabilen Schutzgruppen

Seit der ersten Anwendung einer photolabilen Schutzgruppe haben sich viele Derivate basierend auf unterschiedlichen Chromophoren etabliert. Die größte Gruppe basiert auf dem Gerüst des *ortho*-Nitrobenzyls **16**, welches in vielen Versuchen zur Verbesserung von Wasserlöslichkeit, verminderter Toxizität der Abspaltprodukte und der photochemischen Eigenschaften derivatisiert wurde.<sup>[54]</sup> In Abb. 12 sind einige ausgewählte Beispiele gezeigt. *O*-Nitrophenylethyl (NPE, **17**) und *o*-Nitrophenylpropyl (NPP, **19**) sind aufgrund ihrer einfachen Handhabung, die mit am meisten verwendeten photolabilen Schutzgruppen in der Literatur.<sup>[58]</sup> Dimethoxy-NPE (DMNPE, **18**), *p*-Dialkylaminonitrobiphenyl (ANBP, **21**) und *o*-Nitrodibenzofuran (NDBF, **20**) sind Weiterentwicklungen die ihre Vorzüge in der 2-Photonenanregung haben.<sup>[59–61]</sup>



**Abb. 12:** Darstellung der verschiedenen Grundgerüste von Nitrobenzyl **16**, Cumarin **22**, Arylcarbonylmethyl **26** und Nitroindolin **30** mit den Möglichkeiten für Substitution und Positionen der möglichen Abspaltung. Auf der rechten Seite prominente Vertreter der einzelnen Klassen. Nitrobenzyl-derivate Nitrophenylethyl (NPE, **17**), Nitrophenylpropyl (NPP, **19**), Dimethoxynitrophenylethyl (DMNPE, **18**), Nitrodibenzofuran (NDBF, **20**) und Dialkylaminonitrobiphenyl (ANBP, **21**). Cumarin-derivate: Methoxycumarin (MCM, **23**), Bromhydroxycumarin (Bhc, **24**) und Diethylaminocumarin (DEACM, **25**). Phenacyl-derivate: Dimethylphenacyl (DMP, **27**), *p*-Hydroxyphenacyl (*p*HP, **28**) und Acetylnitrobenzyl (ANB, **29**). Nitroindolinderivate: Methoxynitroindolin (MNI, **31**), Carboxymethoxydinitroindolin (CDNI, **32**) und Bromnitroindolin (BNI, **33**).

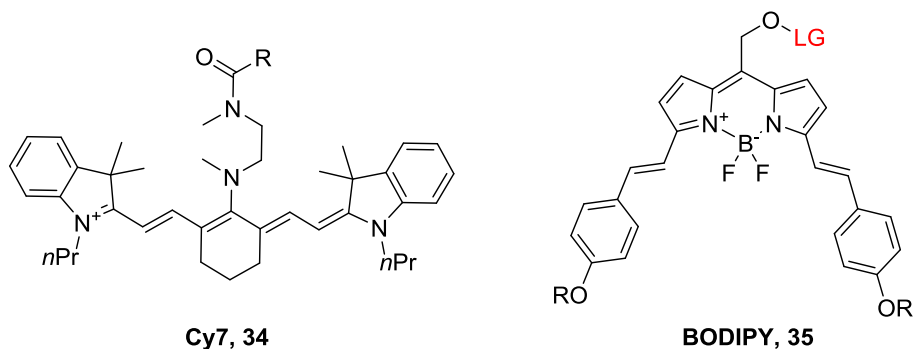
## 1 - Einleitung

Cumarine sind wie einige der Nitrobenzyl-derivate sensitiv gegenüber 2-Photonenanregung. Auf dem Cumaringerüst basierend haben sich einige Derivate entwickelt, auf die im nächsten Kapitel gesondert eingegangen wird.

Photolabile Schutzgruppen basierend auf dem Gerüst von Arylcarbonylmethylgruppen sind in der Regel sehr stabil und ihre spektroskopischen Eigenschaften intensiv untersucht.<sup>[54]</sup> Sie sind außerordentlich sensitiv gegenüber ihrer Umgebung und dem Substitutionsmuster. Elektronenschiebende Substituenten bewirken eine bathochrome Verschiebung. Dennoch ist das Absorptionsmaximum für gewöhnlich unter 300 nm, was sie für Anwendungen in biologischen System uninteressant macht.

Nitroindoline sind eine kleine Gruppe verglichen mit den bisher genannten photolabilen Schutzgruppen. Dennoch wird MNI-Glutamat als Standardreagenz für 2-Photonenentschützung in Nervenzellen verwendet.<sup>[62]</sup> Der eigentlich relativ niedrige 2-Photoneneinfangquerschnitt von MNI wurde von Ellis-Davies *et al.*<sup>[63]</sup> durch Einführung einer zweiten Nitrogruppe in *meta*-Position vervielfacht.

Neueste Entwicklungen von photolabilen Schutzgruppen, die im therapeutischen Fenster<sup>[5]</sup> zwischen 600 und 1000 nm absorbieren, beruhen auf den Strukturen von etablierten Fluorophoren. Das Potential von BODIPY, in Anwendung als photolabile Schutzgruppe, haben Winter<sup>[64]</sup> und Weinstain<sup>[65]</sup> fast gleichzeitig erkannt. Durch Einführung einer *meso*-Methylhydroxygruppe lässt sich eine funktionelle Gruppe ähnlich dem Cumarinmechanismus abspalten, über einen ionischen Zustand, der von einem Nukleophil abgefangen wird. Die dem Farbstoff Cy7 nachgeahmte, photolabile Heptamethincyanin-Schutzgruppe wurde von Gorka *et al.*<sup>[57]</sup> präsentiert. Die Abspaltung wird durch eine Photooxidation der Cyanindoppelbindung initiiert, gefolgt von einem Bindungsbruch durch Hydrolyse. Aufgrund der starken Fluoreszenz bietet es sich zum gleichzeitigen photoinduzierten Entschützen und zur *in vivo* Verfolgung an.<sup>[66,67]</sup>



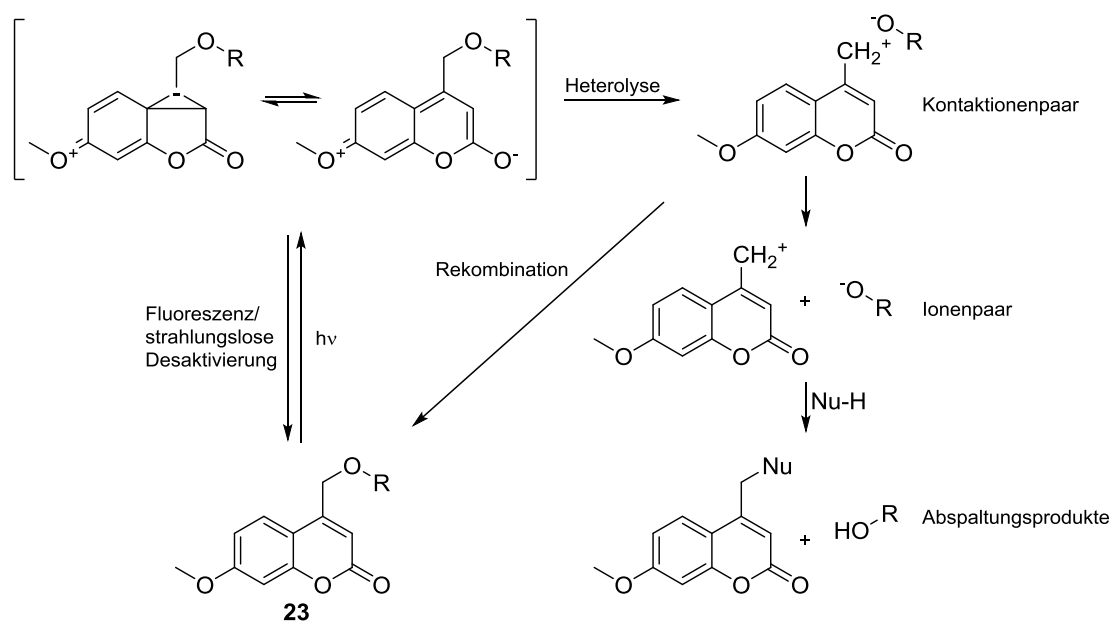
**Abb. 13:** Neuartige photolabile Schutzgruppen für die Anwendung im therapeutischen Fenster zwischen 600 und 1000 nm basierend auf den Chromophoren Heptamethincyanin (Cy7, **34**, links) und BODIPY (**35**, rechts).<sup>[57,68]</sup>



## 1.3.2 Cumarine

Neben den nitrobenzylbasierten photolabilen Schutzgruppen stellen Cumarine eine weitverbreitete Substanzklasse in der Verwendung als photosensitive Schutzgruppe oder auch als Fluorophore dar. Ein Grund dafür ist, dass sie synthetisch leicht zugänglich sind und einfach derivatisiert werden können. Die erste Erwähnung eines photospaltbaren Cumarins von Givens *et al.*<sup>[69]</sup> 1984 beschreibt ein 7-Methoxy-Cumarin (MCM) photolabil geschütztes Phosphat.

In Abb. 14 ist der Mechanismus der photoinduzierten Abspaltung von Cumarinen anhand von MCM **23** gezeigt. Durch Bestrahlung in die  $\pi\text{-}\pi^*$ -Bande erfolgt eine Anregung des  $\pi\text{-}\pi^*$  Übergangs. Der angeregte Singulett-Zustand ist Mesomerie-stabilisiert zwischen zwei Isomeren. Von dort gehen drei mögliche, konkurrierende Reaktionswege aus. Zwei Wege gehen zurück in den Grundzustand, zum einen die charakteristische Fluoreszenz der Cumarine oder zum anderen ein strahlungsloser Übergang. Der dritte Weg ist die gewünschte Abspaltung, die über einen C-O Bindungsbruch stattfindet. Zunächst bildet sich ein Kontaktionenpaar auf einer Zeitskala von 200 fs, gefolgt von einem Angriff eines Nucleophils, häufig des Lösungsmittels. Jedoch ist die Rekombination des Kontaktionenpaars zehnmals schneller als der Angriff des Nucleophils. Elektronen-schiebende Substituenten stabilisieren das Ion sowie eine Abgangsgruppe mit niedrigem  $\text{pK}_a$ .<sup>[54,70,71]</sup>



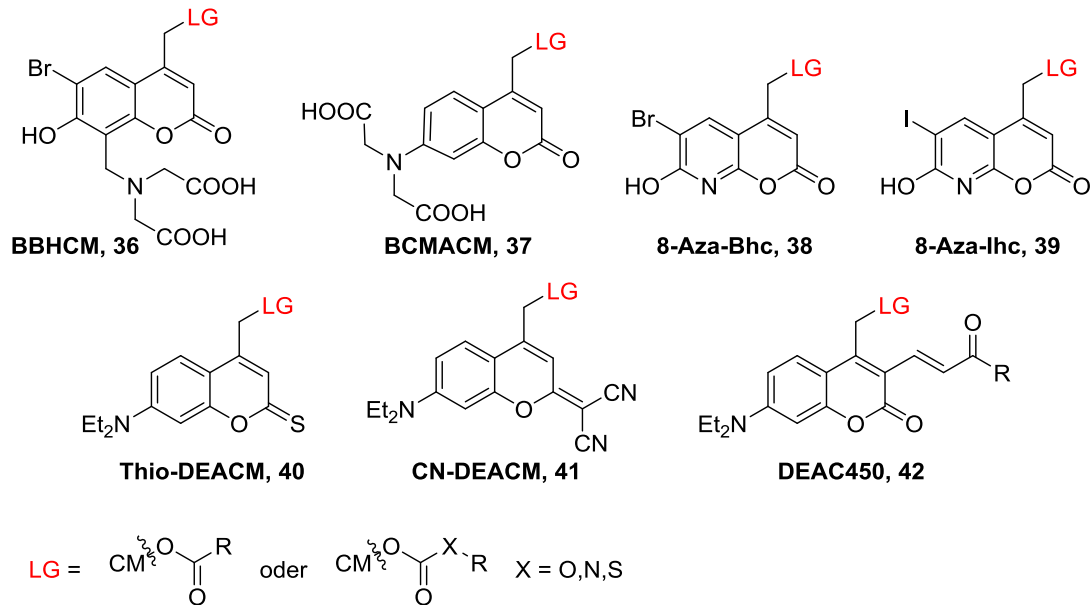
**Abb. 14:** Mechanismus der Photolyse von Cumarinen: vom angeregten Zustand kann ein Übergang zurück in den Grundzustand strahlungslos oder über Emission von Fluoreszenz erfolgen oder der C-O Bindungsbruch wird initialisiert. Das entstandene Kontaktionenpaar kann rekombinieren und zurück in den Grundzustand übergehen oder durch Angriff eines Nucleophils das reaktive Cumarinkation abgefangen werden.<sup>[54,70,71]</sup>

## 1 - Einleitung

---

Ausgehend von MCM **23** wurde weiterhin versucht den Chromophor zu verbessern mit dem Ziel, zum einen die Wasserlöslichkeit zu steigern, zum anderen das Absorptionsmaximum in einen höheren Wellenlängenbereich zu verschieben. Dazu wurde die Methoxygruppe in eine Hydroxygruppe umgewandelt und an der 6-Position ein Bromsubstituent eingeführt (Bhc **24**). Dies hatte zur Folge, dass durch die Einführung des Halogens der  $pK_a$  des phenolischen OH herabgesetzt wurde. Bei pH 7 liegt das Cumarin deprotoniert vor und das Absorptionsmaximum ist um 60 nm verschoben (**23**  $Abs_{max} = 325 \text{ nm}$ ; **24**  $Abs_{max} = 380 \text{ nm}$ <sup>[72]</sup>), was bereits 1998 von Furuta *et al.*<sup>[72]</sup> zur Entschützung von Bhc-Glutamat im Hippocampus genutzt wurde. Die photolabile Schutzgruppe wurde an die Carbonsäure und das Amin über einen Carbonat/Carbamat-Linker angebracht, der nach Abspaltung in einem zweiten Reaktionsschritt decarboxylierte und die Freisetzung des Produkts deshalb stark verlangsamte. Dore *et al.*<sup>[73]</sup> zeigten danach, dass auch Aldehyde und Ketone über eine Acetalbildung rückstandslos photolabil mit Cumarinen geschützt werden können. Ein weiteres Derivat, das in vielen Studien Anwendung findet, ist das 7-Diethylaminocumarin (DEACM, **25**), welches im Vergleich zu den Bhc-Derivaten ein rotverschobenes Absorptionsmaximum ( $\sim 400 \text{ nm}$ ) und eine höhere Quantenausbeute hat.<sup>[54]</sup> Durch die Einführung von Carbonsäuren versuchten Hagen und Mitarbeiter an verschiedenen Derivaten die Wasserlöslichkeit zu steigern (siehe Abb. 15, **36** und **37**).<sup>[74,75]</sup> Neuere Ansätze der Derivatisierung beschäftigen sich mit der Substitution eines elektronenziehenden Rests der 2- und 3-Position als Pendant zur elektronenziehenden 7-Position. Jullien *et al.*<sup>[76]</sup> substituierten die Carbonylfunktion des Lactons mit einem Thiol (**40**) und einem Dicyanoalken (**41**). Dies führte zu einer bathochromen Verschiebung von 70 bis 90 nm. Durch den Austausch des stark elektronegativen Sauerstoffs, mit einem weichen Substituenten wird die Polarisierbarkeit erhöht.<sup>[55]</sup> Ellis-Davies und Mitarbeiter konzentrierten sich vor allem auf die Substitution der 3-Position mit einem elektronenziehenden Rest, was einen immensen Einfluss auf das Absorptionverhalten hat. Zum einen findet eine bathochrome Verschiebung statt, zum anderen wird die Absorptionsbande schmaler mit verminderter Absorption im blauen Bereich, was für wellenlängen-selektive Prozesse von Vorteil ist. Dies funktioniert jedoch nur mit einem kleinen oder schmalen Substituenten, der die 4-Methylfunktion sterisch nicht tangiert (**42**).<sup>[55,77]</sup>

Eine neue Klasse an Cumarinen stellen die von Furuta *et al.* entwickelten 8-Azacumarine auf Bhc-Basis dar (siehe Abb. 15, **38**).<sup>[78,79]</sup> Durch Substitution eines Stickstoffatoms in das Grundgerüst wird die Löslichkeit sowie der Extinktionskoeffizient erhöht. Eine dramatische Verbesserung bewirkte der Austausch des 6-Bromsubstituenten durch ein Iodid. Durch den Schwereatomeffekt steigt die Quantenausbeute von 8-Aza-Ihc (**39**) auf  $\Phi = 0,52$ .<sup>[80]</sup>



**Abb. 15:** Cumarinderivate mit verbesserter Wasserlöslichkeit BBHCM **36** und BCMACM **37** von Hagen *et al.*<sup>[74,75]</sup> 8-Aza-basierendes lhc **39** und Bhc **38** für verbesserte Wasserlöslichkeit und Quantenausbeuten von Furuta *et al.*<sup>[80]</sup> Rot-verschobene Cumarine von Jullien *et al.*<sup>[76]</sup> Thio-DEACM **40**, CN-DEACM **41** und DEAC 450 **42** von Ellis-Davies.<sup>[77]</sup>

### 1.3.3 Photolabile Schutzgruppen in Anwendung auf Proteine

Proteine stellen neben Nukleinsäuren und Polysacchariden eines der großen Polymere in der Natur dar. Dabei stechen Proteine durch eine hohe Komplexität hervor in Bezug auf die Möglichkeit der Variation zwischen 21 natürlichen Aminosäuren. Auf der einen Seite bietet diese Vielfalt viele Ansatzpunkte für die Einführung von photolabilen Schutzgruppen an Schlüsselstellen, auf der anderen Seite muss die Reaktion selektiv auf eine funktionelle Gruppe zugeschnitten sein. Grundsätzlich gibt es zwei Strategien um Proteine photolabil zu schützen. Entweder wird das Polymer direkt, z.B. an einer Seitenkette, mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen (siehe Abb. 16 A) oder ein Molekül, dass mit einem Protein reagiert, wird durch eine photolabile Schutzgruppe in seiner Funktion inhibiert (siehe Abb. 16 B).<sup>[81]</sup>

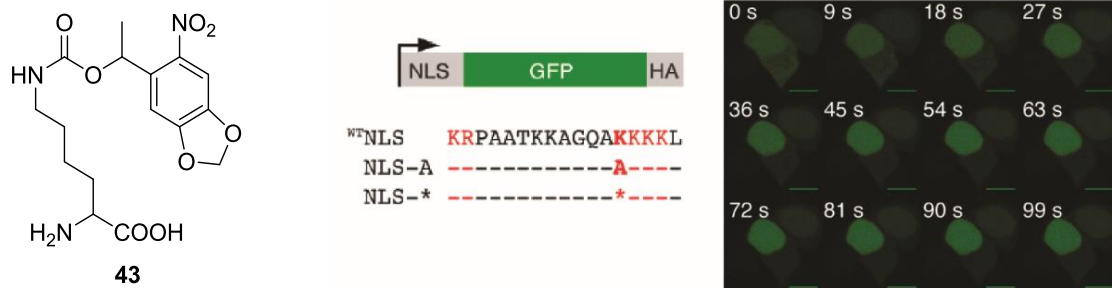


**Abb. 16:** Möglichkeiten photolabile Schutzgruppen im Kontext von Proteinen einzusetzen. A – Das Protein wird z.B. an einer funktionellen Gruppe einer Aminosäureseitenkette geschützt. B – Die Interaktion zwischen einem Molekül und dem Protein wird photochemisch durch Schützung des Effektormoleküls inhibiert. Angelehnt an Baker und Deiters.<sup>[81]</sup>

## 1 - Einleitung

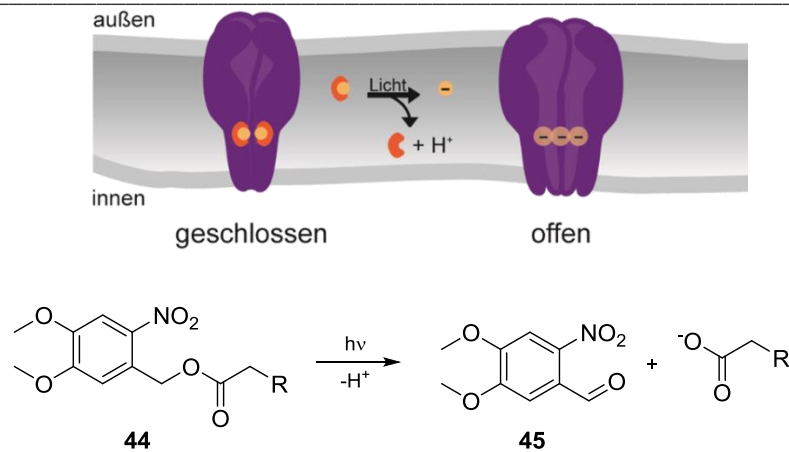
Aus synthetischer Sicht lagen die Grenzen bis vor ca. 15 Jahren in der Länge des photolabil zu schützenden Peptids, durch Limitierung in der Peptidfestphasensynthese. Durch Ligation ließ sich diese Grenze erweitern, jedoch stellten Zellpermeabilität und Faltung weitere Limitierungen dar. Eine weitere Möglichkeit stellt das postsynthetische Anbringen von photolabilen Schutzgruppen dar, welches aufgrund der vielen funktionellen Gruppen in einem Protein eher einem statistischen Schützen gleicht.<sup>[81,82]</sup>

Eine Revolution stellte die Expansion des genetischen Codes durch veränderte *tRNA* Synthetasen dar, was die Einführung von unnatürlichen oder photolabil geschützten Aminosäuren in große Konstrukte ermöglichte.<sup>[83]</sup> Schultz *et al.*<sup>[84]</sup> haben die Technik der *Amber Codon Suppression* etabliert, in welcher das Stopcodon UAG aus *E. coli* als Codon für eine *tRNA*, beladen mit einer unnatürlichen Aminosäure, dient. Mit dieser Weiterentwicklung wurden mittlerweile viele photolabil geschützte und anders modifizierte Aminosäuren in Proteine eingeführt.<sup>[83,85,86]</sup> Deiters und Chin *et al.*<sup>[87]</sup> haben eine Peptidkette, die zum Eindringen in den Nukleus dient (NLS – *Nuclear Localisation Sequence*) mit einem GFP-Reporter und einem *o*-Nitrobenzyl photolabil geschützten Lysin (**43**) versehen (siehe Abb. 17) und in *HEK293* Zellen exprimiert. Die geschützte Variante ist erst nach Belichtung und Abspaltung der Schutzgruppe in der Lage, in den Nukleus zu diffundieren (siehe Abb. 17 rechts, grüne Fluoreszenz von GFP sichtbar).



**Abb. 17:** Expression eines photolabil geschützten NLS-Faktors mit GFP-Reporter über *Amber-Codon-Suppression*. Der Einbau eines photolabil geschützten Lysins (**43**, links) in die NLS-Sequenz (Mitte) verhindert das Eindringen in den Nukleus. Nach Belichtung ist über 100 Sekunden eine Diffusion des NLS-GFP-Komplexes in den Nukleus sichtbar (rechts). Entnommen aus Deiters *et al.*<sup>[87]</sup> und modifiziert.

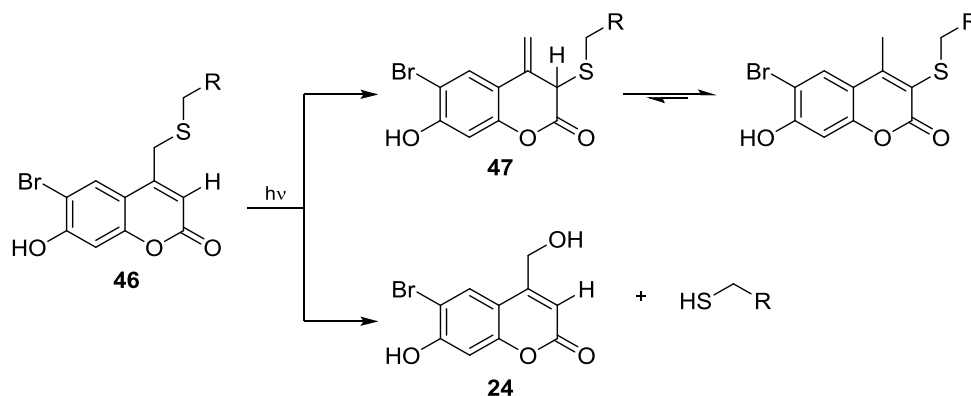
Anwendung finden photolabil geschützte Proteine und Peptide außerdem in der Lokalisation<sup>[88]</sup>, Transkription<sup>[89]</sup>, Intein-Splicing<sup>[90]</sup>, Proteaseaktivität<sup>[91]</sup>, Phosphorylierung<sup>[92]</sup>, Ionenkanälen<sup>[93]</sup> und vielen weiteren. Szymański *et al.*<sup>[93]</sup> haben einen Ionenkanal durch Installation einer photolabilen Schutzgruppe an der Innenseite verschlossen. Das Membranprotein aus der Cytoplasmamembran von *E. coli* ist mechanosensitiv und schließt durch die Hydrophobizität des Chromophors. Nach Abspaltung durch Belichtung und Deprotonierung des zurückbleibenden Rests öffnet sich der Kanal wieder (siehe Abb. 18).



**Abb. 18:** Postsynthetisches Schützen einer Cysteinseitenkette mit DMNPE **44** über einen Acetatlinker an der Innenseite eines Ionenkanals. Durch die Bindung des hydrophoben Chromophors schließt sich der Ionenkanal. Durch Belichtung wird die photolabile Schutzgruppe (**45**) abgespalten und hinterlässt eine Carboxylfunktion am Thiol. Durch Deprotonierung wird die Hydrophilie wiederhergestellt und der Ionenkanal öffnet sich. Angelehnt an Szymanski *et al.*<sup>[93]</sup>

### 1.3.4 Cumarine an Thiolen

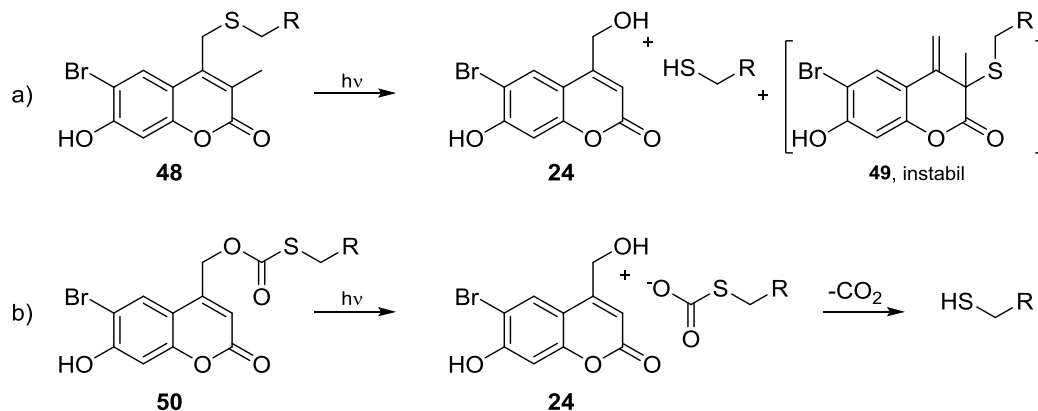
Die lichtinduzierte Entschützung von Cumarinen auf Aminen und Hydroxylgruppen funktioniert deutlich schlechter als mit anderen funktionellen Gruppen, da beide eine schlechte Abgangsgruppe darstellen.<sup>[94]</sup> Auch Thiofunktionen lassen sich nur schlecht von Cumarinen entschützen, was vor allem daran liegt, dass mehr als ein Photoprodukt entsteht. In Abb. 19 ist zu sehen, dass bevorzugt, neben dem gewünschten Produkt (**24**), noch ein zweites Molekül durch Migration der Thiofunktion entsteht (**47**). Nach Absorption eines Photons und einem Bindungsbruch zwischen der C-S Bindung entsteht ein reaktives Carbokation, welches normalerweise mit einem Nukleophil, meistens dem Lösungsmittel, reagiert (vgl. Abb. 14). Im Falle von Thiolen findet eine Umlagerung zu einem Intermediat mit elektrophiler Stelle am C3 statt, an die das Thiolanion wieder angreift. Nach Rearomatisierung entsteht eine stabile Verbindung, die durch Licht nicht mehr abgespalten werden kann und die Thiofunktion nicht wieder zugänglich macht.<sup>[95]</sup>



**Abb. 19:** Belichtung eines Cumarins **46** auf einer Thiofunktion (Thioether). Es entstehen zwei Photoprodukte: A – das Migrationsprodukt mit kovalenter Bindung am C3 (**47**). B – das gewünschte, freigesetzte Produkt Alkohol **24**.<sup>[95]</sup>

## 1 - Einleitung

Da Thiole in biologischen Systemen wichtige Schlüsselfunktionen einnehmen sowie häufig in *Bioengineering*-Anwendungen genutzt werden, ist es von Vorteil Wege zu finden, Cumarine verlässlich einzusetzen. Mahmoodi *et al.*<sup>[95]</sup> haben aufgrund ihrer mechanistischen Untersuchungen an Bhc (**24**) einen Lösungsansatz gewählt, der die Nebenproduktbildung durch Vergrößerung des sterischen Anspruchs reduziert. Durch Einführung einer Methylgruppe an der C3-Position (**48**) ist ein Angriff des Thiols unwahrscheinlicher und das gebildete Intermediat (**49**) ist nicht mehr in der Lage zu rearomatisieren. Photochemisch hat die Methylgruppe keinen Einfluss auf die Eigenschaften des Chromophors (siehe Abb. 20 a)).<sup>[96]</sup> Ein weiterer Ansatz wurde von Kotzur *et al.* präsentiert. Angelehnt an die Schützung über Carbonate und Carbamate wurde ein Thiocarbonat als Verbindungsglied gewählt (**50**). Im ersten Schritt findet die Abspaltung des Cumarins statt und im zweiten Schritt die Decarboxylierung (siehe Abb. 20 b)).<sup>[97,98]</sup>



**Abb. 20:** Lösungsansätze zur Verhinderung der Migration des Thiolrestes an C3. A) Blockade des C3 durch eine Methylgruppe, die destabilisierend auf das Migrationsprodukt **49** wirkt. B) Verwendung eines Thiocarbonatlinkers **50**, der erst im zweiten Schritt das Thiol freisetzt.<sup>[96–98]</sup>

## 1.4 Biokonjugation

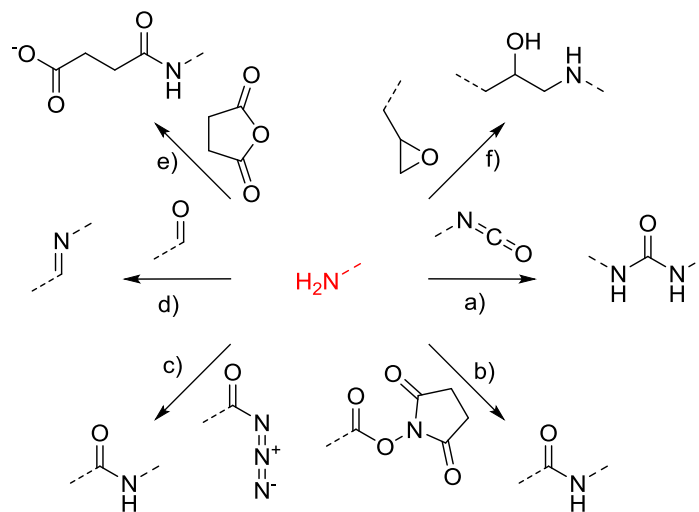
Zur Untersuchung komplexer, biologischer Systeme ist es von Vorteil, Moleküle von extern einzubringen um Zielkomponenten zu markieren. Dabei ist das Ziel, eine selektive Bindung zwischen der Zielkomponente und dem Molekül zu bilden. Meistens handelt es sich bei der Zielkomponente um ein Makromolekül und/ oder Fragment biologischer Herkunft und die Reaktion der beiden Komponenten wird Biokonjugation genannt. Die Methode der Biokonjugation findet vor allem in den Lebenswissenschaften ein breites Anwendungsgebiet. Die Verknüpfung der Komponenten kann entweder so gewählt werden, dass spezifisch nur ein Molekül A mit einem Molekül B reagiert oder ein Molekül A mit vielen B und umgekehrt. Je nach Anwendung und Wahl von Reagenzien, Reaktionen und Bedingungen lassen sich Konjugationen steuern.<sup>[99]</sup>

In der Anwendung der Biokonjugation auf Makromoleküle haben sich einige Felder in der Wissenschaft hervorgetan, die besonders davon profitieren. Affinitäts-*Tags* wie Streptavidin-Biotin, His-*Tags* oder SNAP-*Tags* bilden zum Teil keine kovalenten, dennoch sehr starke Bindungen aus, die zur Aufreinigung oder Immobilisierung genutzt werden. Das gleiche gilt für eine Bindung zwischen einem Enzym und dem passenden Antikörper. Immobilisierung kann auf Partikeln oder größeren Oberflächen durchgeführt werden, um Biomoleküle zugänglicher zu machen. Besonders das Anbringen von Fluorophoren an Makromolekülen hilft bei der Detektion, der Auflösung und Verfolgung in Zellen und zur Quantifizierung durch Markierung mit Antikörpern.<sup>[99]</sup>

Um zwei Moleküle komplexer Natur miteinander zu verbinden, ist ein reaktives Reagenz zum Verknüpfen nötig. Dabei kann es sich um eine selektive, funktionelle Gruppe handeln oder ein Reagenz, das die funktionelle Gruppe *in situ* reaktiv macht. Die reaktive Gruppe reagiert dann mit einer weiteren funktionellen Gruppe zum Konjugat. Das Ziel ist es, in der großen Vielfalt an Funktionen, die ein Makromolekül bietet, selektiv nur eine anzusteuern. Dazu müssen als erstes die Eigenschaften des gewünschten Konjugats definiert werden. Daraufhin werden die Einzelteile untersucht und passende Komponenten gewählt. Einen weiteren Punkt stellt die Strategie des Zusammenbaus dar, die oftmals Optimierung bedarf wie zum Beispiel die Wahl der Äquivalente oder den Einsatz eines Platzhalters. Wichtig ist es, die richtigen funktionellen Gruppen zu kombinieren, um die beste Variante zu finden. Besonders schwierig ist die Einführung von verschiedenen Konjugaten an einem Molekül, da die Reaktionen in hohem Maße orthogonal zueinander sein müssen. Es sind eine große Anzahl an verschiedenen Funktionen zur Modifikation/Konjugation verfügbar. Diese beruhen dennoch oft auf derselben Art von Reaktion.<sup>[99]</sup>

### 1.4.1 Selektive Reaktionen ausgewählter funktioneller Gruppen

Im Fokus der Biokonjugation stehen funktionelle Gruppen, die in Biomolekülen vorkommen und dazu noch reaktiv sind. Darunter zählen Heteroatome wie z.B. an Aminosäureseitenketten, aber auch C-C-Mehrfachbindungen. Die am meisten verwendete funktionelle Gruppe ist ein terminales Amin wie an der Aminosäure Lysin. Durch Alkylierung oder Acylierung desamins lassen sich schnell stabile Bindungen mit hoher Ausbeute aufbauen. In Abb. 21 sind einige beispielhafte Reaktionen, die Amine eingehen können, aufgezeigt. Isocyanate, Cyanate und Thiocyanate lassen sich durch einen nukleophilen Angriff in Harnstoffderivate umwandeln (siehe a). Stabile Amide lassen sich aus Carbonsäuren, Säurechloriden, Carbamaten und Estern herstellen. Besonders prominent ist hier die Verwendung eines NHS-Esters, was bereits 1975 von Bragg und Hou<sup>[100]</sup> beschrieben wurde (b). Die Reaktion von Aziden (c) und Anhydriden (e) unterscheidet sich dabei weder mechanistisch noch im Produkt zu den vorher genannten Reaktionstypen von b). Die Reaktion mit einem Aldehyd führt zur Bildung eines Imins (d), was durch Reduktion in ein sekundäres Amin überführt werden kann. Durch hohe Ringspannung lassen sich Epoxide durch Amine öffnen und damit  $\beta$ -Hydroxyamine herstellen (f).<sup>[94]</sup>

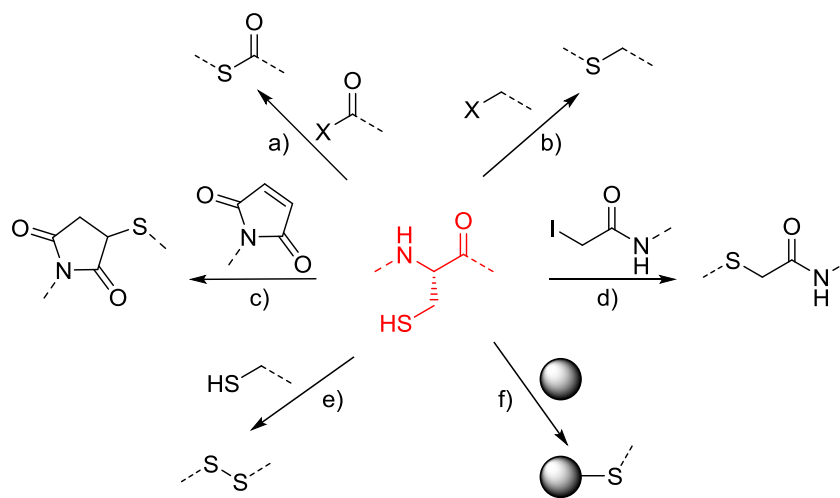


**Abb. 21:** Übersicht gängiger Reaktionen von terminalen Aminen. a) Nucleophile Addition an Isocyanat, b) Amidbildung durch Substitution eines NHS-Esters, c) Amidbildung durch Substitution eines Azids, d) Bildung von Iminen aus Aldehyden, e) Öffnung von Anhydriden und f) Öffnung von Epoxiden.

Eine weitere funktionelle Gruppe, die weitaus seltener in der Natur vorkommt, aber durch ihr hohes Maß an Bioorthogonalität heraussticht, sind Thiole. Besonders die Sulfhydrylseitenkette von Cystein bietet viele Möglichkeiten zur Modifizierung von Proteinen. Durch seine Reaktivität wird z.B. ein terminaler Phenylthioester zur nativen chemischen Ligation eingesetzt. Über den Mechanismus der Ligation der Peptide wird ein Cystein freigesetzt. Alkylierung oder Acylierung lassen sich durch Substitution von Halogenalkanen oder Säurechloriden unter Bildung von



Thioestern oder Thioethern erreichen (siehe Abb. 22 a und b). Zwei prominente Reaktionen, die selektiv von Thiolen eingegangen werden und deshalb orthogonal zu allen anderen Reaktionen sind, sind in c) und d) gezeigt. Die Sulfhydrylgruppe addiert an die Doppelbindung eines Maleimids unter Bildung einer kovalenten Bindung (siehe c). In d) lässt sich durch Substitution eines Iodacetamids ein Thioether in  $\alpha$ -Position einführen. Eine natürlich vorkommende Reaktion ist die Dimerisierung von zwei primären Thiolen (siehe e). Um die Thiolfunktion für eine Reaktion zugänglich zu machen, muss deshalb häufig ein Reduktionsmittel eingesetzt werden. Eine weitere Besonderheit ist die Affinität von Thiolen zu Gold, die zueinander eine dative Bindung ausbilden, die z.B. zur Immobilisierung auf Oberflächen oder Nanopartikeln genutzt werden kann (siehe f).<sup>[94]</sup>



**Abb. 22:** Übersicht über gängige Reaktionen von Sulfhydrylen mit anderen funktionellen Gruppen am Beispiel als Cysteinseitenkette. a) Acyl, b) Alkyl, c) Maleimid, d) Iodacetamid, e) Metall-Thiol dative Bindung und f) Disulfid.

### 1.4.2 Click-Chemie

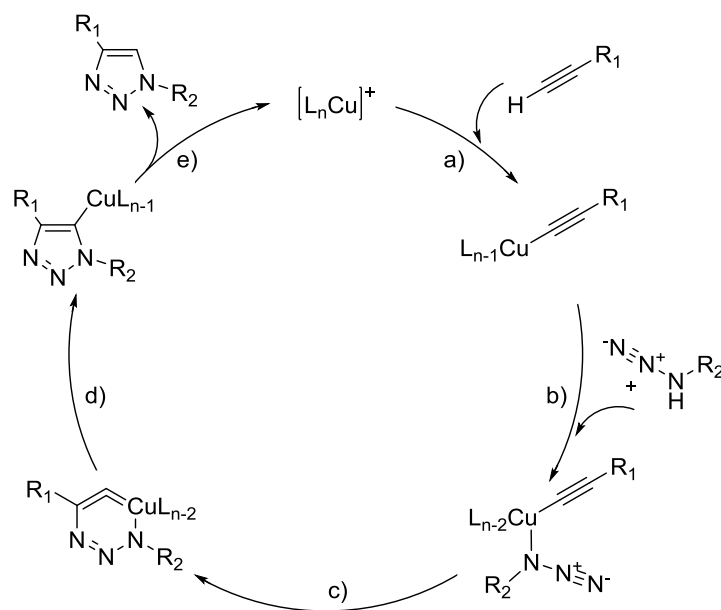
Click-Chemie beschreibt nach Sharpless<sup>[101]</sup> die Kombination verschiedener Module, die miteinander verknüpft werden können. Die Anforderungen an die Verknüpfungsreaktion sind hoch. Die Synthese soll in hohen Ausbeuten mit wenigen Nebenprodukten stereospezifisch ablaufen und einfach handhabbar sein. Dazu sollen die Edukte leicht zugänglich und die Reaktion in wässrigem und organischem Medium möglich sein. Das Produkt soll leicht zu isolieren und stabil in z.B. biologischen Medien sein. Diese Anforderungen werden von einigen Reaktionstypen erfüllt, jedoch ist die bekannteste die Cycloaddition.

Auch wenn der Begriff Click-Reaktion ein allgemeines Feld beschreibt, ist damit meistens die [2+3]-Cycloaddition eines Azids mit einem Alkin unter Bildung eines Triazols gemeint. Die von Huisgen 1964 beschriebene Reaktion<sup>[102]</sup> wurde zunächst bei hohem Druck und Temperatur mit geringer Selektivität durchgeführt. Fast gleichzeitig veröffentlichten Sharpless<sup>[103]</sup> und Meldal<sup>[104]</sup> den Einsatz

## 1 - Einleitung

von Cu(I)-Salzen, wodurch die Reaktion bei Raumtemperatur, selektiv und in kürzerer Zeit abläuft. In der heutigen Click-Reaktion nach Huisgen (auch *CuAAC* für Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition) wird außerdem ein Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin-Ligand (TBTA) verwendet, der die Cu(I)-Spezies stabilisiert.

Der postulierte Mechanismus von Sharpless<sup>[103]</sup> fängt mit der Bindung des Alkins an den Kupferkomplex an (siehe Abb. 23 a)). Durch die Bindung des Azids kommen die Komponenten in räumliche Nähe (b)) und es kommt durch zyklische Elektronenübertragung (c)) zum intermediären Sechsring. Im letzten Schritt (d)) bildet sich ein stabiler Fünfring, welcher sich als Produkt (1,2,3-Triazol) vom Katalysator löst (e)).



**Abb. 23:** Reaktionszyklus der Click-Reaktion nach Sharpless *et al.*<sup>[103]</sup> Das Alkin bindet im ersten Schritt an den Kupferkomplex. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung des Azids, welches anschließend die Alkinfunktion angreift. Es entsteht ein intermediärer Sechsring, der sich in einen stabileren Fünfring umlagert, bevor er sich vom Katalysator löst.

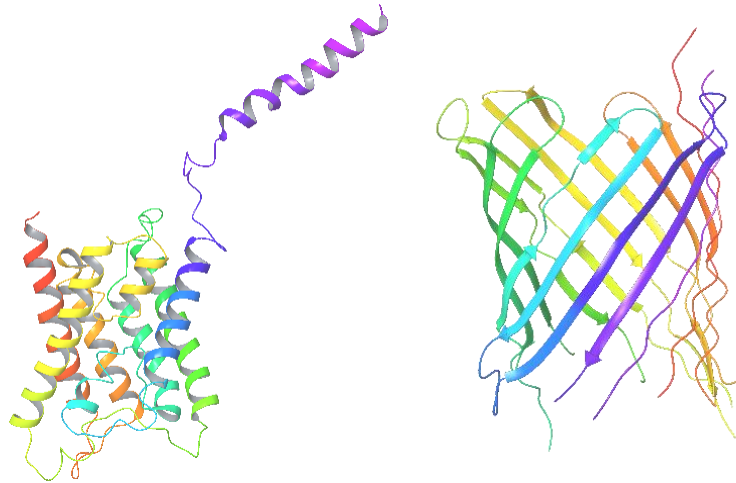
## 1.5 Proteine der äußeren Membran (*Outer Membrane Proteins – Omps*)

### 1.5.1 Membranen und Membranproteine

Zellen definieren sich über einen abgegrenzten Bereich, der von einer Membran umschlossen wird. Gleichzeitig sind Membranen auch das Medium, welches den Verkehr zwischen Zellen und extrazellulärem Raum steuert und sie unterteilt. Dabei geht es um Vorgänge wie die Kommunikation zwischen Zellen, metabolische Prozesse oder Energieübertragung. Sie bestehen aus einer asymmetrischen Doppelschicht aus Lipiden mit einer polaren, phosphathaltigen Kopfgruppe und einem apolaren, aliphatischen Schwanz und haben in der Regel eine Dicke von 50-80 Å.<sup>[105]</sup>

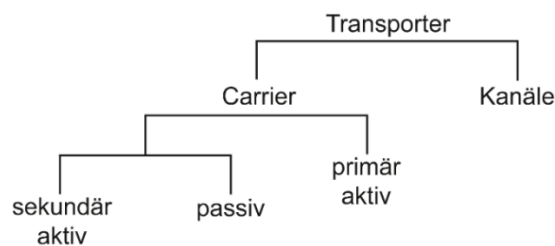
Der Verkehr zwischen inner- und extrazellulärem Raum wird von Membranproteinen gesteuert, die Öffnungen in der Membran darstellen. Man unterscheidet zwischen drei Klassen, den integralen, peripheralen und amphitropen Membranproteinen. Integrale Membranproteine werden durch schwache Wechselwirkungen in der Membran gehalten und lassen sich leicht herauslösen. Peripherale Membranproteine werden zusätzlich durch elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zu den Lipidköpfen gestützt. Amphitrophe Membranproteine befinden sich im Zytosol und binden an eine Interaktionsdomäne, die in der Membran verankert ist.<sup>[105]</sup>

Integrale Membranproteine bestehen häufig aus einer Transmembranhelix. In seltenen Fällen handelt es sich um eine einzelne  $\alpha$ -Helix, meistens jedoch um eine Transmembrandomäne bestehend aus sechs bis sieben  $\alpha$ -Helices. Eine weitere Struktur ist das  $\beta$ -Faltblatt, das in Membranen als  $\beta$ -Fasstruktur vorkommt. Eine Mischung aus beiden Typen kommt in Membranproteinen nur selten vor. In beiden Fällen ist das Ziel, durch Faltung eine möglichst stabile Struktur in der hydrophoben Umgebung der Lipide zu bilden, die durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung gestärkt wird. Transmembranhelices lassen sich durch ca. 20 hydrophobe Aminosäuren hintereinander in einer Sequenz erkennen. An der Grenzfläche zwischen Lipid und Wasser sind sie häufig mit aromatischen Aminosäuren versehen wie Tyrosin oder Tryptophan. Das gleiche gilt für  $\beta$ -Fasstrukturen, die vor allem in den Membranen von Bakterien vorkommen. Um die Membran zu durchqueren brauchen sie 7-9 Aminosäuren, die abwechselnd aus einer hydrophoben Aminosäure, die nach außen gewandt ist und einer hydrophilen, die nach innen gerichtet ist, zusammengesetzt sind.<sup>[105]</sup>



**Abb. 24:** Links - Transmembranprotein aus  $\alpha$ -Helices am Beispiel von Aquaporin (PDB:4W05), rechts -  $\beta$ -Fasstruktur am Beispiel von OmpG (PDB: 4CTD).

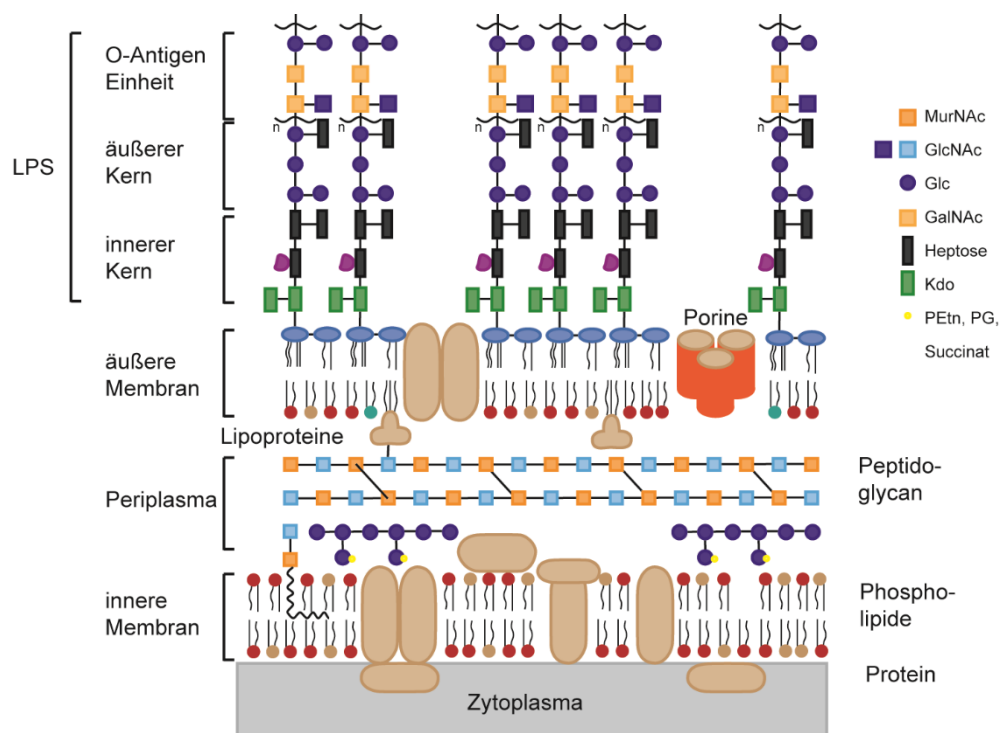
Der Transport durch eine Membran kann entlang oder entgegen eines Gradienten stattfinden, um z.B. ein anliegendes Potential auszugleichen. Damit ein Molekül die Membran durchdringen kann, muss eine hohe Aktivierungsenergie aufgebracht werden, um etwa die Hydrathülle abzustreifen. Diese wird beim Einsatz eines Membranproteins heruntergesetzt. Die sogenannten Transporter beschleunigen die Diffusion, indem sie durch nicht-kovalente Wechselwirkungen entlang einer hydrophilen Kette von Aminosäuren Moleküle durch die Öffnung leiten. Dabei werden *Carrier* von Kanälen unterschieden. Carrier binden Substrate stereospezifisch, katalysieren den Transport, aber erreichen ab einer bestimmten Konzentration ein Sättigungslimit. Der Transport kann passiv erfolgen, aber auch aktiv unter Verbrauch von Energie gegen einen Gradienten. Im Fall von Kanälen findet eine fast ungehinderte Diffusion statt und damit fast kein Limit erreichen kann. Ein Beispiel sind ionenselektive Kanäle, die für Ionenkonzentrationen in der Zelle verantwortlich sind. Sie müssen auf schnelle Änderungen in der Konzentration reagieren und haben deshalb eine hohe Flussrate ohne Maximum. Ihre Öffnung/Schließung kann durch die Bindung eines Liganden mit der Folge einer allosterischen Konformationsänderung erfolgen oder durch die Änderung des Transmembran-potentials.<sup>[105]</sup>



**Abb. 25:** Übersicht verschiedener Transportmechanismen von Membranproteinen. Carrier unterliegen einer begrenzten Transportrate und werden weiter in aktiv und passiv unterschieden, während Kanäle einen unlimitierten Durchfluss zulassen, bezogen auf die Menge.

## 1.5.2 Integrale Membranproteine in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien

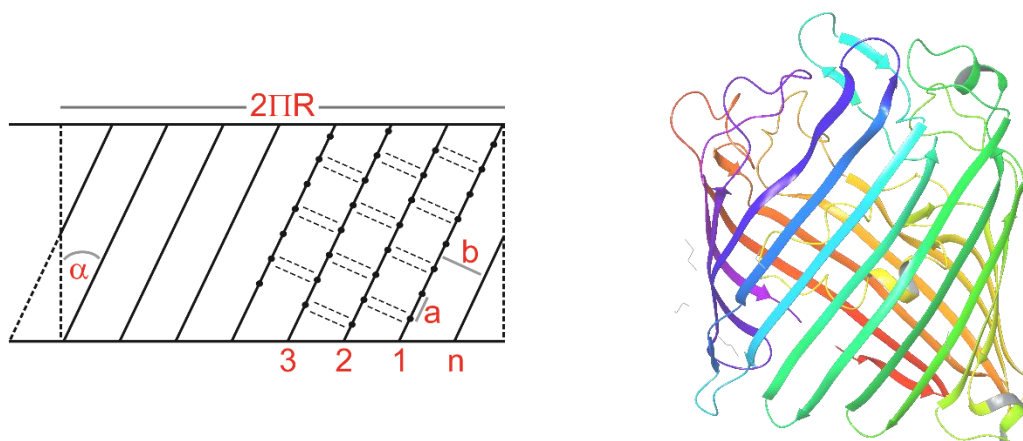
Bakterien unterscheiden sich im Aufbau ihrer Zellwand. Dies stellte 1884 schon Hans Christian Gram fest, der einen Farbstoff auf Bakterien gab, welcher sich nur von manchen wieder abwaschen ließ, woraus er die Unterteilung in Gram-positive und Gram-negative Bakterien ableitete.<sup>[106]</sup> Gram-negative Bakterien besitzen eine innere und äußere Zellwand. Die innere Membran ist symmetrisch aus Phospholipiden aufgebaut, welche auf der Außenseite vom Periplasma umschlossen ist (Abb. 26). Das Periplasma besteht aus Peptidoglycanen, d.h. Polysacchariden, die durch kurze Peptide miteinander verknüpft sind.<sup>[107]</sup> Die äußere Membran ist unsymmetrisch aufgebaut, da sie auf der Innenseite Phospholipide analog der inneren Membran trägt und auf der Außenseite Lipopolysaccharide (LPS).<sup>[108]</sup> Diese Schicht wird in drei Teile, innerer Kern, äußerer Kern und O-Antigen-Einheit unterschieden und besteht im Wesentlichen aus Polysacchariden, die zur Unterscheidung von Bakterien dienen. Die äußere Membran besteht weiterhin zu 50% aus Porenformenden Proteinen (Porinen), die einen Transport durch die Membran ermöglichen.



**Abb. 26:** Schematische Darstellung der Hülle von Gram-negativen Bakterien. Das Zytoplasma ist von einer inneren Membran, einer Phospholipid-Doppelschicht umgeben. Darum befindet sich ein Netzwerk aus verknüpften Polysacchariden, auch Periplasma. Die äußere Membran ist zur Hälfte aus Phospholipiden und nach außen mit Lipopolysacchariden versehen, die charakteristisch für verschiedene Zelltypen sind. Porine sitzen in der äußeren Membran. Angelehnt an Varki *et al.*<sup>[107]</sup>

## 1 - Einleitung

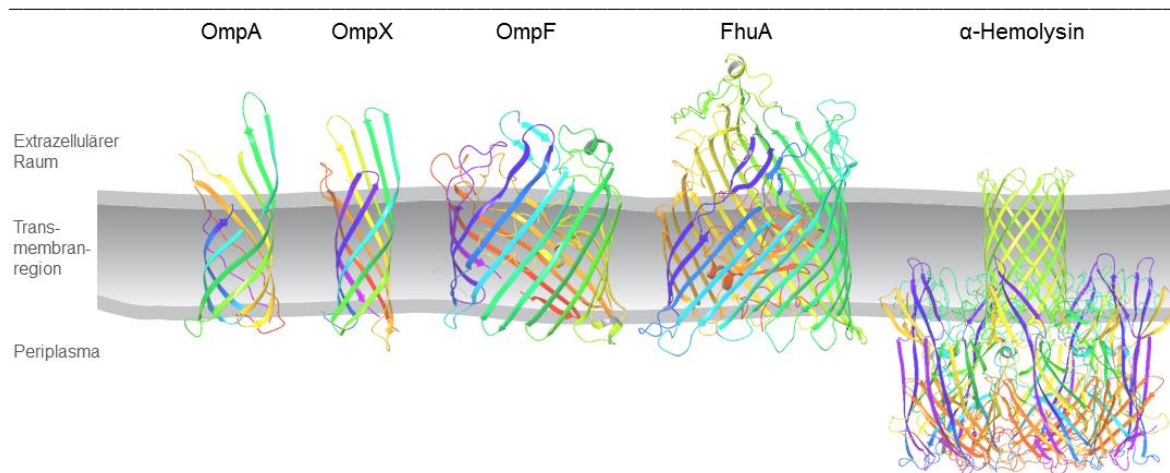
Porine der äußeren Membran zeichnen sich durch eine  $\beta$ -Fasstruktur aus, die einzigartig unter membranständigen Proteinen ist.<sup>[109]</sup> Dabei wird grundsätzlich anhand der Kristallstrukturen in verschiedenen Familien unterschieden, die alle auf dem gleichen Strukturmerkmal basieren und später im Detail besprochen werden. Durch genaue strukturelle Untersuchungen von bestehenden Kristallstrukturdaten hat Georg Schulz ein paar grundlegende Eigenschaften aller Porine festgelegt.<sup>[109]</sup> In Abb. 27 ist auf der linken Seite die schematische Darstellung einer aufgeschnittenen Fasstruktur zu sehen. Der Abstand zwischen zwei Strängen ist in der Regel 4,4 Å (b) und der Abstand zwischen den  $C_{\alpha}$ -Atomen von zwei benachbarten Aminosäuren 3,3 Å (a). Der Neigungswinkel  $\alpha$  beschreibt die Neigung zur vertikalen Achse und liegt bevorzugt zwischen 30-60°. N- und C-Terminus liegen bevorzugt im Periplasma vor, was durch eine gerade Anzahl an Strängen zustande kommt. Die Stränge liegen antiparallel zueinander und bilden Verbindungen zu ihren direkten Nachbarn aus. Die dünn-gestrichelten Linien repräsentieren Wasserstoffbrückenbindungen, die abwechselnd zu beiden benachbarten Strängen ausgebildet werden für maximale Stabilität. Die einzelnen Stränge sind auf der extrazellulären Seite mit langen *Loops* und auf der Innenseite zum Periplasma mit kurzen *Turns* verbunden. Die Außenseite ist mit hydrophoben Aminosäuren bedeckt, die mit den Lipiden interagieren. An den Rändern sitzen aromatische Aminosäuren auf Höhe der Lipidköpfe. Durch ihre hydrophile, oft mit Wasser gefüllte Innenseite stellen sie eine inverse Mizelle dar.<sup>[109]</sup> Die Transmembranregion ist dabei konserviert, während die Loopregionen großer Variabilität in Sequenz und Länge unterliegen.<sup>[108]</sup> Am Beispiel *Outer Membrane Protein F* (OmpF, Abb. 27, rechte Seite), welches natürlich als Trimer vorliegt, lassen sich die aufgezählten Eigenschaften wiedererkennen. Die großen *Loops*, vor allem L3 (Abb. 27 rechts; auf der Innenseite in Gelb dargestellt), sind in der Lage die Pore zu verschließen bzw. eine Selektion gegenüber kleinen Molekülen oder Ionen einzuführen.<sup>[110]</sup>



**Abb. 27:** Genereller Aufbau von  $\beta$ -Fasstrukturen. Linke Seite – struktureller Aufbau mit wichtigen Kennziffern zur Beschreibung einer  $\beta$ -Fasstruktur dargestellt. Rechte Seite – Beispiel einer  $\beta$ -Fasstruktur am Beispiel einer Einheit des Trimers OmpF (PDB:2OMF).

Trotz gleicher Architektur haben die verschiedenen Porine unterschiedliche Funktionen. Im Folgenden werden Beispiele aus den verschiedenen Familien der Porine vorgestellt (vgl. Abb. 28). Das *Outer Membrane Protein A* (OmpA) wird mit hoher Expressionsrate zu 100.000 pro Zelle hergestellt. Die Transmembrandomäne besteht aus 170 Aminosäuren in nur 8 Strängen und ist außergewöhnlich thermostabil aufgrund von Salzbrücken zwischen polaren Aminosäuren.<sup>[111]</sup> Der C-Terminus, bestehend aus 155 Aminosäuren, ragt in das Periplasma und interagiert dort mit der Peptidoglykanschicht.<sup>[112]</sup> OmpX ist ähnlich klein wie OmpA mit dem Unterschied, dass es nur in Stresssituationen in großen Mengen exprimiert wird. Es besitzt ein externes  $\beta$ -Faltblatt, das an fremde Proteine binden kann und damit zum Abwehrmechanismus der Zelle gehört.<sup>[113]</sup> Die Gruppe der generellen Porine beschreibt Poren, die aus 16 Strängen bestehen und über Diffusion hydrophile Moleküle einer Masse bis 600 Da den Kanal passieren lassen, im allgemeinen aber eine geringe Selektivität besitzen. Ein Vertreter ist das zuvor erwähnte OmpF. Die erste Kristallstruktur des Trimers wurde 1980 von Garavito *et al.* publiziert.<sup>[114]</sup> Das Protein liegt als Homotrimer vor mit einem großen Loop L3, der in die Pore zeigt und dadurch Substratspezifität einführt. Saure Seitenketten im Loop und basische Seitenketten in der Membranwand stabilisieren die Konformation.<sup>[115]</sup> Generell sitzen häufig gegensätzlich geladene Aminosäuren gegenüber, die ein elektrisches Potential aufbauen und damit hydrophobe Moleküle abhalten die Pore zu durchdringen.<sup>[116]</sup> Sehr große Poren mit 40 Å Durchmesser werden von den Transportern FhuA und FepA gebildet. Sie haben die gleiche Topologie und unterliegen demselben Mechanismus. Die N-terminale Domäne bildet eine Art Stöpsel, der über Salzbrücken stabilisiert ist. Durch eine eisenabhängige, allosterische Bindestelle, kann eine Konformationsänderung herbeigeführt werden, wodurch sich der Kanal öffnet und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen entlang eines Gradienten eindringen können.<sup>[117,118]</sup> Ein weiteres interessantes Beispiel ist das Toxin  $\alpha$ -Hemolysin, welches einen Komplex bestehend aus 7 wasserlöslichen Oligomeren bildet. Die Assemblierung findet auf der Membranoberfläche statt.<sup>[119]</sup> Jedes Monomer liefert eine  $\beta$ -Faltblatt-Schleife, aus denen die Transmembrandomäne, ein 14-strängiges Fass mit einer Höhe von 50 Å, entsteht. Dieselbe Höhe hat auch die intrazelluläre Domäne, deren Durchmesser 100 Å ist.<sup>[120]</sup>

## 1 - Einleitung



**Abb. 28:** Übersicht über die vorgestellten Porine der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. Kleine Porine OmpA und OmpX bestehend aus 8 Strängen. Das allgemeine Porin OmpF, hier zu Übersicht als Monomer dargestellt. Eisenabhängiges, großes Porin FhuA und Toxin  $\alpha$ -Hemolysin mit großer intrazellulärer Domäne.

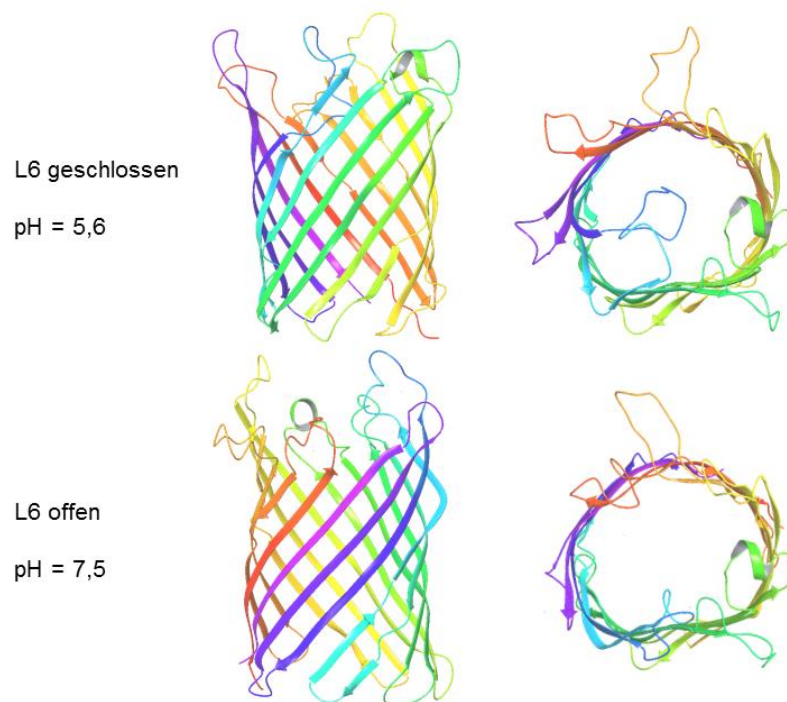
### 1.5.3 Outer Membrane Protein G (OmpG)

Ein Porin mit Alleinstellungsmerkmal ist das aus 14  $\beta$ -Faltblattsträngen bestehende, monomere OmpG. Seine Existenz wurde zum ersten Mal von Misra und Benson<sup>[121]</sup> erwähnt, die das Maltodextrin-spezifische Protein LamB aus *E. coli* unterdrückten. Dennoch gelangte weiterhin Maltodextrin in die Zellen, was dann auf OmpG rückgeführt werden konnte. Model *et al.*<sup>[122]</sup> stellten anschließend fest, dass das Porin erst bei hohem Stresslevel der Zelle unter basischen Bedingungen exprimiert wird und vom Phage-Schock-Protein (PspA) herunterreguliert wird. Durch Deletion des PspA-Gens aus *E. coli* K-12 Bakterien fanden Fajardo *et al.*<sup>[123]</sup> heraus, dass das OmpG-Gen hinter dem PspA-Genlocus liegt und sich mit dem PspA-Promotor exprimieren lässt. Das selten beobachtete Porin ist genetisch in *E. coli* vorgesehen, wird aber nicht produziert. Es wurde außerdem festgestellt, dass das Protein nicht den für Porine typischen langen Loop 3 besitzt, sondern einen großen Loop 6 und einen großen Innendurchmesser hat. Während die Trimere OmpF und OmpC Monosaccharide in das Periplasma einschleusen, ist OmpG auch in der Lage Di- und Trimere aufzunehmen.<sup>[123]</sup>

Conlan und Bayley zeigten in ersten spannungsabhängigen Membranmessungen, dass es sich um ein Monomer handeln muss.<sup>[124]</sup> Weiterhin demonstrierten sie, dass sich das Porin in detergenzhaltiger Lösung innerhalb von Minuten falten lässt und dazu noch stabil gegenüber Hitze und Proteasen ist. Einen großen Beitrag zur Charakterisierung von OmpG lieferten die Kristallstrukturen von Yildiz *et al.*<sup>[125]</sup>, die zwei Kristallstrukturen bei unterschiedlichen pH-Werten präsentierten, die im sauren in einer orthorhombischen und im neutralen in einer triklinischen Raumgruppe kristallisieren. In Abb. 29 ist zu sehen, dass bei neutralem pH-Wert eine offene Pore mit sieben Loops auf der extrazellulären Seite vorliegt. Bei saurem pH-Wert (unter pH 6) wird der

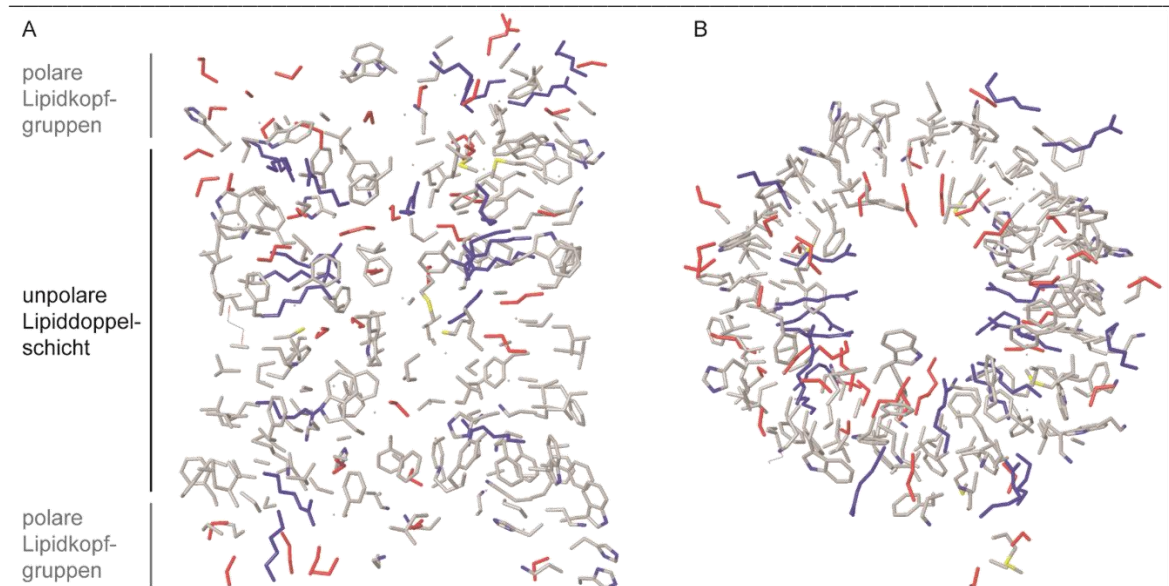


Kanal durch Loop 6 verschlossen. Dies bestätigt ein in spannungsabhängigen Membranmessungen zuvor beobachtetes *Flickering*<sup>[124]</sup> des Loops bei pH 6 und die Annahme, dass es sich um ein Notfallprotein handelt. Bei basischem pH-Wert können so große Mengen an Substraten durch die äußere Membran befördert werden. Bei niedrigem pH-Wert wird jedoch ein Protoneneinstrom in das Periplasma verhindert.<sup>[125]</sup> Die Blockade des Kanals wird durch zwei Histidine (H231/H261) auf benachbarten Strängen ausgelöst. Bei Erniedrigung des pH-Wertes findet eine Protonierung der Seitenketten statt, was zur Abstoßung führt. Dadurch werden Wasserstoffbrücken wie bei einem Reisverschluss gebrochen mit der Folge, dass eine Verlängerung des Loops von 10 auf 17 Aminosäuren am C-terminalen Ende stattfindet unter Vergrößerung der Flexibilität.



**Abb. 29:** Geschlossene und offene Form von OmpG abhängig vom pH-Wert, dargestellt von der Seite und von oben. Loop 6 wird bei niedrigem pH-Wert verlängert und kann die Pore verschließen. Kristallstrukturen von Yildiz *et al.*<sup>[125]</sup> (geschlossene Form: 2IWW, offene Form: 2IWV).

Die allgemeine Struktur des  $\beta$ -Fasses ist elliptisch mit einem Neigungswinkel von  $60^\circ$  der Stränge und einem Durchmesser von ca.  $25 \text{ \AA}$ .<sup>[125,126]</sup> Die Verteilung der Art der Aminosäuren in einzelnen Bereichen ist vergleichbar mit der von anderen Porinen. Die Außenseite ist mit hydrophilen Aminosäuren bedeckt, die mit Lipiden interagieren und die wassergefüllte Innenseite mit polaren und geladenen. Dabei handelt es sich um viele Glutamate und Arginine, die bevorzugt in Gruppen auftreten. Aromatische Aminosäuren sitzen wie zuvor erwähnt an den Öffnungen, außerdem bilden sie eine Kette, die sich durch die Pore zieht, zum Geleit von Zuckermolekülen (siehe Abb. 30).<sup>[125]</sup>



**Abb. 30:** Verteilung der Aminosäuren dargestellt anhand der Seitenketten in der Kristallstruktur (PDB: 2WVP) von OmpG, grau - neutrale, rot – positiv und blau – negativ geladene Seitenketten. A- Darstellung von der Seite, im mittleren Teil, der mit der Lipiddoppelschicht interagiert, sind auf der Außenseite nur unpolare Seitenketten, an den Rändern zur Wechselwirkung mit den Lipidkopfgruppen auch polare, bevorzugt positiv. B – Blick von oben in den Kanal von der Loop-Richtung. Die Innenseite ist bedeckt von polaren Aminosäureseitenketten, die in Gruppen gleicher Polarität auftreten.

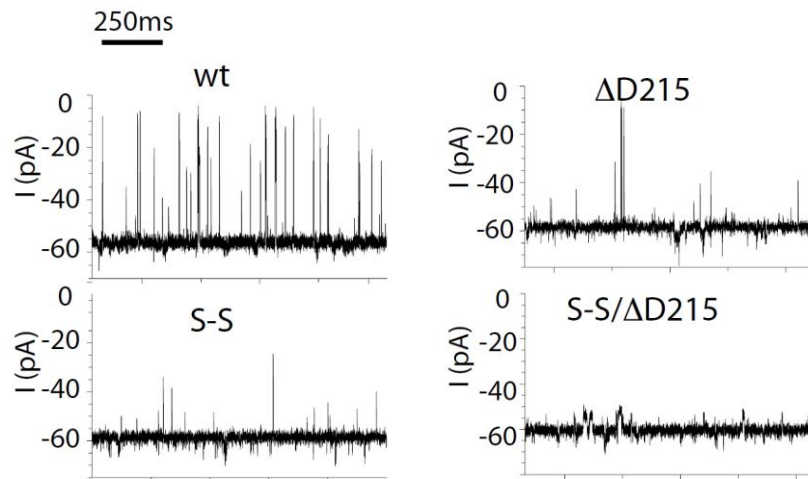
## 1.5.4 Ionenkanal-Engineering von OmpG

In den vergangenen Jahrzehnten haben sich eine Vielzahl an Möglichkeiten entwickelt, mit denen Proteine in ihrer Struktur verändert werden können, um z.B. Markierungen einzuführen. Das grundlegende Konzept nennt sich *Protein-Engineering* und wird in zwei Typen, das *Re-* und das *de novo*-Design unterschieden. Das *Redesign* findet häufiger Anwendung, denn es basiert auf bereits existierenden Strukturdaten wie z.B. von Kristallstrukturen. Es eignet sich besonders für  $\beta$ -Fasstrukturen, die aus einem sehr sensiblen Wasserstoffbrückennetzwerk aufgebaut sind. Änderungen können große Auswirkungen auf die Gesamtstabilität und die Rückfaltung haben, die im Allgemeinen langsam ist.<sup>[127]</sup> Davon losgelöst ist die Natur der Aminosäureseitenketten, da die elektrostatischen Interaktionen untereinander im Vergleich vernachlässigbar sind, was Punktmutationen ermöglicht.<sup>[128]</sup> Im zweiten Ansatz, dem *de novo* Design, werden Strukturen neu aufgebaut, was sich für  $\alpha$ -Helices mit großen Interaktionsdomänen eignet. Der Vorteil von membranständigen Proteinen gegenüber löslichen Proteinen ist im *Protein-Engineering*, dass durch einzelne Mutationen nicht die Gesamtkonstitution des Proteins verändert wird.<sup>[127]</sup> Vor allem  $\beta$ -Fasstrukturen sind auf der Innenseite der wassergefüllten Pore sehr variabel durch ihre geringen Interaktionen an der Seitenkette. Desweiteren lassen sie sich als *Inclusion Bodies* in Massenproduktion herstellen.<sup>[116]</sup>

Zur Umsetzung des Protein-Engineerings stehen mehrere Werkzeuge, synthetische Strategien, zur Verfügung. Wie in Kapitel 1.3.4 und 1.4.1 bereits besprochen, eignen sich Cysteinseitenketten besonders für die kovalente Modifikation mit kleinen Molekülen. Cysteine lassen sich mit geringem Aufwand durch Austausch einer Aminosäure in die Peptidsequenz einbauen (*Site-directed Mutagenesis*). Ein semi-synthetischer Ansatz ist die native chemische Ligation. Ein synthetisch hergestelltes Peptid wird mit einem rekombinant hergestellten verknüpft. Dafür muss das *N*-Peptid einen Thioester am *C*-Terminus tragen und das *C*-Peptid mit einem Cystein am *N*-Terminus versehen sein. Ein weiterer semi-synthetischer Ansatz ist das Protein-*Transsplicing*, bei dem Teile, Inteine, aus der Sequenz entnommen werden. Diese Methode eignet sich vor allem für mehrfache Cystein-Modifikation. In Kapitel 1.3.3 wurde bereits die fortschrittlichste Methode, eine *Nonsense Suppression*, vorgestellt. Die von Schultz *et al.*<sup>[84]</sup> entwickelte Methode der *Amber-Codon-Suppression* bietet eine immense Plattform zur Einführung jeglicher nicht-natürlicher Aminosäuren in Proteine. Mit dieser Methode wurde die Zugänglichkeit zur Modifikation von großen Proteinen revolutioniert.<sup>[129]</sup>

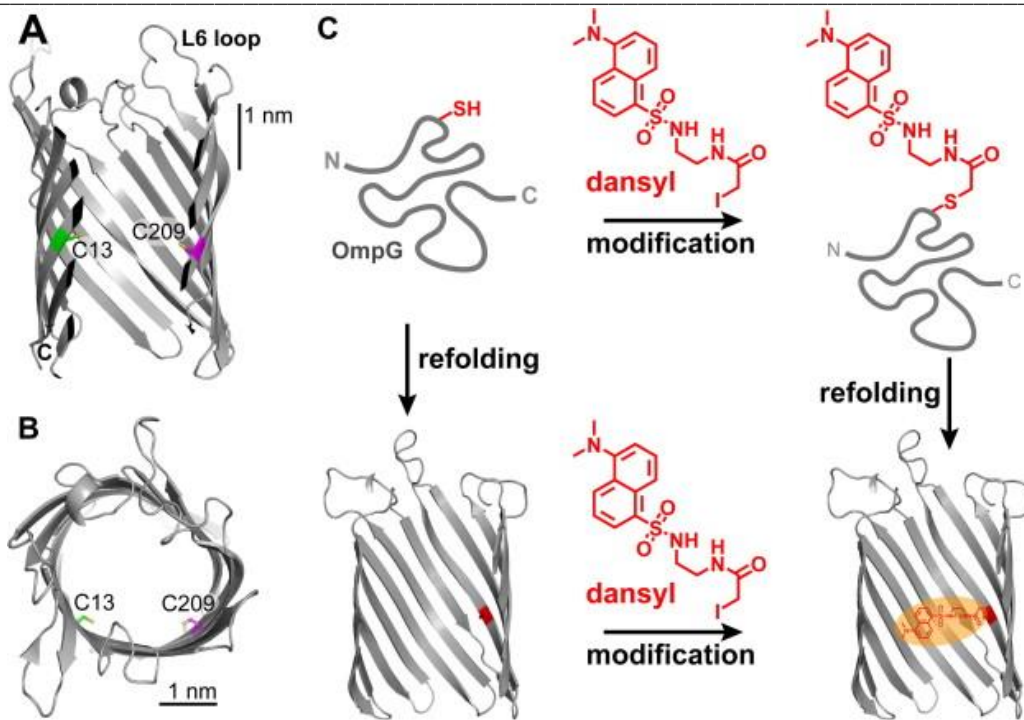
OmpG wurde in mehreren Studien als Templat für Protein-*Engineering*, in diesem Fall Ionenkanal-*Engineering*, genutzt, da das Porin als Monomer vorliegt, bestehend aus einer Aminosäurekette. Die Struktur bietet mehrere Ansatzpunkte zu Veränderung, zum einen die Loopregion mit dem pH-abhängigen Loop 6, zum anderen die Innenseite des Kanals.

Bayley und Mitarbeiter<sup>[130]</sup> analysierten 2008 die von Yildiz *et al.*<sup>[125]</sup> publizierte Kristallstruktur in einer Computersimulation auf die Auswirkung des *Flickerings* von Loop 6 auf den Porendurchmesser, mit dem Ergebnis, dass eine Reduktion bis zu 4 Å an der engsten Stelle stattfindet. In einem ersten Ansatz zur Stabilisierung von Loop 6 führten sie eine Disulfidbrücke (S-S) zwischen den Strängen 12 und 13 ein, um das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zu verhindern. Dies zeigte in *Black Lipid Membran*-Messungen (BLM), einer Methode zur Charakterisierung eines Einzelkanals, bereits deutlich ruhigere spannungsabhängige Kurven im Vergleich zum Wildtyp mit kurzen Schließungen (siehe Abb. 31 links). In einem zweiten Ansatz wurde Aminosäure D215 aus der Sequenz entfernt, da festgestellt wurde, dass die Anzahl der ausgebildeten Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen 11, 12 und 13 gesteigert werden konnte, was ebenfalls die Stabilität erhöhte. In Abb. 31 links ist in der BLM-Messung minimale Schließung zu sehen ( $\Delta D215$ ). Eine Kombination aus beiden Motiven zeigte letztlich den größten Erfolg und führte zu minimalem *Flickering*, weshalb das Konstrukt *quietOmpG* (qOmpG) genannt wurde.



**Abb. 31:** Untersuchungen verschiedener OmpG-Varianten von Chen *et al.*<sup>[130]</sup> mittels *Black Lipid Membran*-Messungen. Linke Seite – Leitfähigkeitsmessung des Wildtyps und der OmpG-Varianten mit Disulfidbrücke zur Stabilisierung im Vergleich. Rechte Seite – OmpG-Variante mit Deletion von D215, was zur Erhöhung der Anzahl an ausgebildeten Wasserstoffbrücken führt und den Stromfluss ruhiger. Die ruhigste Stromkurve zeigt die OmpG-Variante mit Disulfidbrücke und D215-Deletion. Entnommen aus Chen *et al.*<sup>[130]</sup>

Angelehnt an die Vorarbeiten von Reitz *et al.*<sup>[131]</sup> haben Grosse *et al.*<sup>[132,133]</sup> verschiedene andere Ansätze zur Veränderung von OmpG vorgestellt. Einer davon ist die Einführung von einem Cystein auf der Innenseite auf halber Höhe des Kanals zur S-Alkylierung (siehe Abb. 32, A und B). An die Mutationen C13 oder C209 sollte dann postsynthetisch ein Dansyliodacetamid angebracht werden zur Bildung eines Hybrids. Die Herstellung des Hybrids erfolgte über zwei Arbeitsschritte, die Markierung sowie die Rückfaltung in die native Form. Es wurde evaluiert, welche Reihenfolge vorzuziehen ist (Abb. 32 C), mit dem Ergebnis, dass beide Varianten ohne Probleme durchgeführt werden konnten. In der Charakterisierung durch BLM-Messungen des Hybrids wurde außerdem eine leichte Reduktion der Leitfähigkeit festgestellt, die auf das gebundene Molekül zurückzuführen ist. In einer Kristallstruktur war außerdem zu erkennen, dass sich der Dansylrest an die Wand des Kanals legt. Der Linker interagiert mit den benachbarten Aminosäuren T207, F239 und E253. Beim hydrophoben Dansylrest ist auffällig, dass er in der Nähe von Tyrosin 35 sitzt.<sup>[132]</sup>

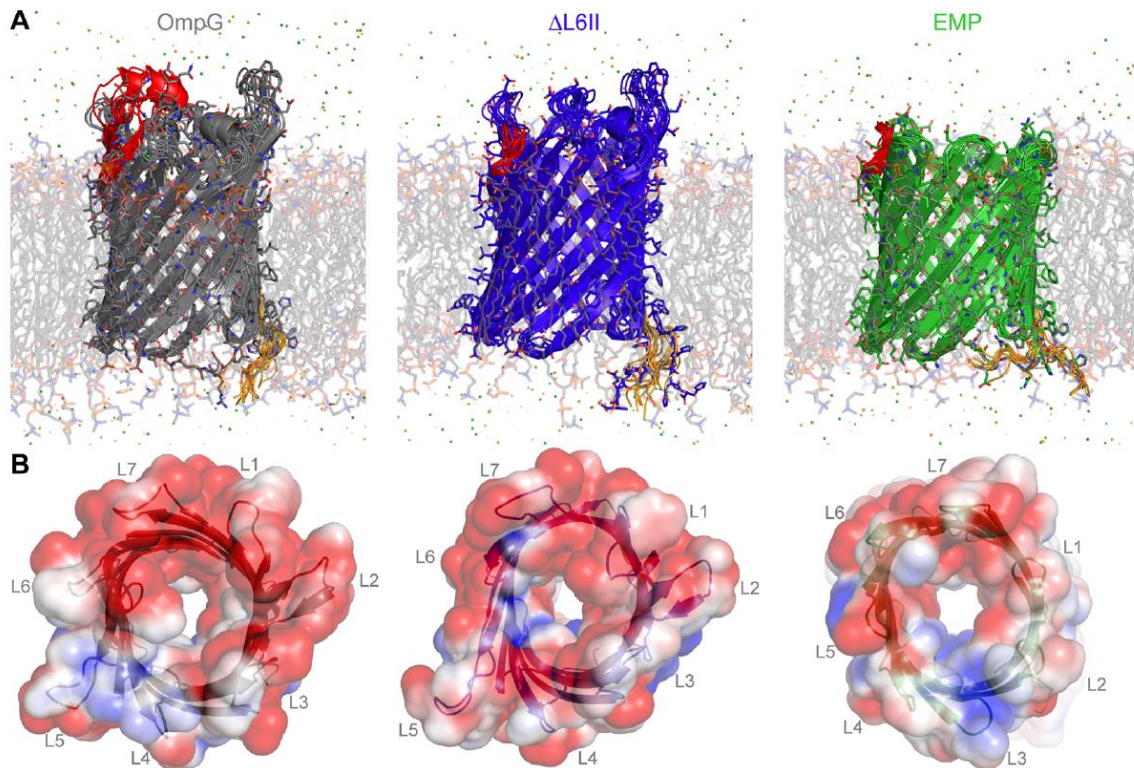


**Abb. 32:** Schematische Darstellung der S-Alkylierung von OmpG. In A und B sind die Cysteinpunktmutationen C13 (grün) und C209 (pink) in die Kristallstruktur eingezeichnet zur Visualisierung der Position im Kanal. In C sind die beiden Arbeitsschritte, Rückfaltung in die native Form und Markierung mit Dansyliodacetamid, zu sehen. Unabhängig von der Reihenfolge lässt sich das OmpG-Hybrid darstellen. Entnommen aus Grosse *et al.*<sup>[132]</sup>

Das zentrale Thema einer weiteren Studie von Grosse *et al.*<sup>[133]</sup> ist die Reduktion des *Flickering* von Loop 6. In einem ersten Ansatz wurde versucht das *Flickering* zu reduzieren, indem Loop 6 durch Entfernung von Aminosäuren gekürzt (OmpG/ $\Delta$ L6I) oder ganz entfernt wurde (OmpG/ $\Delta$ L6II). Es wurde daraufhin festgestellt, dass der fehlende Loop leicht negative Auswirkungen auf die Faltung sowie die Stabilität des Porins hat. Im Fall von OmpG/ $\Delta$ L6I wurde außerdem eine Verminderung der Leitfähigkeit in BLM-Messungen festgestellt, während OmpG/ $\Delta$ L6II die Leitfähigkeit des Wildtyps besitzt. Doch obwohl OmpG/ $\Delta$ L6II keinen Loop 6 mehr besitzt, kommt es immer noch zu kurzen Schließungen des Kanals und Dynamik bei angelegter Spannung.<sup>[133]</sup> In einem zweiten Versuch wurde wie schon bei Chen *et al.*<sup>[130]</sup> eine Evaluierung anhand der Kristallstruktur von Yildiz *et al.*<sup>[125]</sup> durchgeführt. Basierend auf dem Wasserstoffbrückennetzwerk und der gut aufgelösten Loopregion wurde ein *Engineered Minimal Porin* (EMP) geschaffen, welches verkürzte Loops und Turns besitzt. Außerdem wurden auf der Innenseite teilweise geladene Aminosäuren entfernt, in dem Versuch eine robuste Pore mit minimalen Wechselwirkungen zu schaffen. In Abb. 33 ist anhand von Modellstrukturen ein Vergleich von EMP mit dem Wildtyp OmpG und der Loop 6-mangelnden Variante OmpG/ $\Delta$ L6II zu sehen. Durch Kürzung der Loop-Bereiche verkleinert sich die Menge an potentiellen Strukturen, die eingenommen werden können. EMP ist im Vergleich zu den anderen beiden gestauchter, besitzt aber mit 1,06 nS eine 20% höhere Leitfähigkeit als der Wildtyp OmpG

## 1 - Einleitung

(0,86 nS). Dennoch zeigt auch EMP eine Loop-unabhängige Verschließung des Kanals in BLM-Messungen abhängig von pH-Wert und der Art des verwendeten Lipids. Es wird vermutet, dass die Faszstruktur auf die mechanischen Eigenschaften der Membran reagieren kann und in der Lage ist sich zusammenzuziehen. Bei der Dynamik handelt es sich um einen Twist, der kurzzeitig den Porendurchmesser verkleinert.<sup>[133]</sup>



**Abb. 33:** Vergleich des Wildtyps OmpG mit den Varianten OmpG  $\Delta L6 II$  und EMP. Oben – Strukturmodelle der drei Varianten in einer Membran. Durch Reduktion der Loopregionen wird die Pore kleiner und weniger flexibel. Unten – Darstellung der Polarität der Proteinoberfläche. In Blau/Rot sind geladene Aminosäuren dargestellt. Weiße Flächen zeigen neutrale Regionen an, die gezielt in EMP eingeführt wurden. Entnommen aus Grosse *et al.*<sup>[133]</sup>

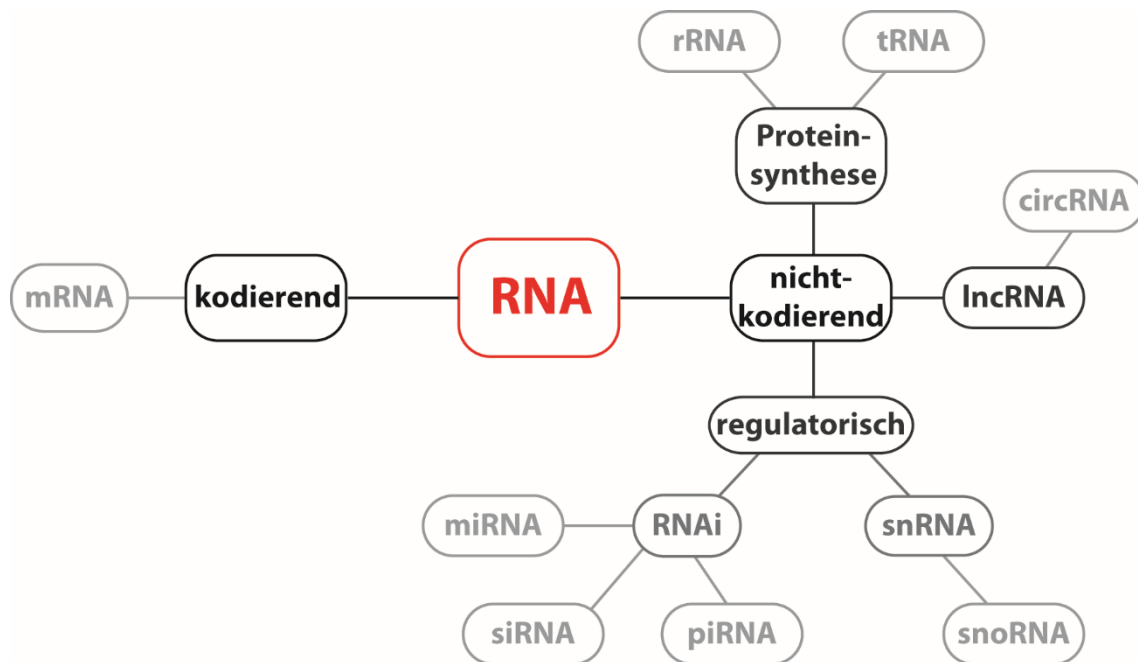
## 1.6 RNA

Im zentralen Dogma der Mikrobiologie wird RNA neben DNA und Proteinen als einer der drei großen Pfeiler beschrieben. Das von Francis Crick 1970 postulierte Dogma<sup>[134]</sup> beschreibt den Informationsfluss zwischen den drei Makromolekülklassen und ist bis heute anerkannt. Es besagt, dass DNA und RNA in der Lage sind, sich selbst zu replizieren, RNA von DNA transkribiert und weiter in Proteine translatiert werden kann. Jedoch kann keine sequentielle Information aus Proteinen in Form von DNA oder RNA rückgewonnen werden. Diese Hypothese schließt ein, dass zu keiner Zeit eine der drei Spezies vorherrschend existiert hat. Dem entgegen steht die *RNA World* Hypothese von Walter Gilbert<sup>[135]</sup> über den Ursprung des Lebens. Seit bekannt ist, dass RNA eine eigene katalytische Aktivität wie ein Enzym besitzt und in vielen regulatorischen Prozessen beteiligt ist, ist es nach Gilbert möglich, dass es eine Zeit gab, in der nur RNA als Grundbaustein des Lebens existiert hat.

Bis vor einigen Jahren wurde RNA die Rolle des Boten zugesprochen, der für die Maschinerie hinter der Übertragung der genetischen Information zwischen DNA und Proteinen zuständig ist in Form von Messenger RNA (*mRNA*), Transfer RNA (*tRNA*) und Ribosomaler RNA (*rRNA*). Heute ist bekannt, dass nur ca. 2% der DNA<sup>[136]</sup> für Proteine kodieren und ca. 62% der transkribierten RNA<sup>[137,138]</sup> nicht-kodierende RNAs sind. Dabei beruhen Komplexität und Vielfältigkeit auf der dreidimensionalen Struktur, die von RNA eingenommen werden kann. In Abb. 34 ist eine Landkarte ausgewählter RNA-Klassen zu sehen. In erster Linie wird zwischen kodierender (*coding*) und nicht-kodierender (*non-coding*) RNA unterschieden. Dabei reduziert sich der kodierende Teil auf Messenger-RNA (*mRNA*), die am Ribosom in eine Aminosäuresequenz übersetzt wird, d.h. einen *Origin of Reading Frame* (ORF – Startpunkt der Translation) besitzt. Nicht-kodierende RNAs sind die dominante Population, haben keinen ORF und können sehr unterschiedlich in Länge, Sequenz und dem Ort ihres Vorkommens sein.<sup>[139]</sup> Alle nicht-kodierenden RNAs über 200 Nukleotide werden als *long non-coding* RNAs (*lncRNA*) bezeichnet und ihre Sequenz ist schwach konserviert.<sup>[140]</sup> Darunter fallen auch circular RNAs (*circRNA*), die durch einen Ringschluss erhöhte Stabilität gegen Exonukleasen aufweisen. Außerdem wird vermutet, dass sie *miRNA* regulieren können.<sup>[141]</sup> Die zuvor erwähnte transfer RNA (*tRNA*) und ribosomale RNA (*rRNA*) sind im Prozess der Translation beteiligt. Während *tRNA* für die Übertragung der Aminosäuren zuständig ist, ist *rRNA* ein Teil des Ribosoms, was ein Komplex aus mehreren Komponenten ist.<sup>[105]</sup> Regulatorische RNAs sind kleine RNAs aus ca. 20-30 Nukleotiden. Ihre Transkription erfolgt orts- und zeitabhängig je nach Bedarf.<sup>[142]</sup> Im Gegensatz zu *lncRNA* ist ihre Sequenz hochkonserviert, da ihre Wirkung auf der komplementären Basenpaarung

## 1 - Einleitung

zu *mRNA* basiert. *Small nuclear RNAs (snRNA)* befinden sich im Nukleus, wo sie am Prozess des Spleißens von *pre-mRNA* zu *mRNA* beteiligt sind. *Small Nukleolar RNAs (snoRNA)* helfen bei der Prozessierung von *rRNA* im Nukleolus.<sup>[143]</sup> Die RNA Interferenz (RNAi) beschreibt die post-transkriptionelle Regulation von *mRNA* durch kleine RNAs wie *microRNA (miRNA)*, *small interfering RNA (siRNA)* und *PIWI interacting RNA (piRNA)*. *piRNAs* wurden 2006 in Geschlechtszellen gefunden und sind mit 26-31 Nukleotiden etwas länger. Sie binden an PIWI Proteine, die zur Argonaut-Familie gehören.<sup>[144]</sup> *miRNAs* binden an *mRNA* und leiten damit den Degradationsprozess ein oder legen das Oligomer still. Oft haben sie keine perfekte Basenpaarung zum Zielmolekül und Störungen in der Kaskade sind verantwortlich für eine Vielzahl an Erkrankungen.<sup>[145,146]</sup> *siRNA* durchläuft einen ähnlichen Prozess wie *miRNA*, liegt jedoch doppelsträngig vor und stellt einen Abwehrmechanismus gegen fremde RNA dar.<sup>[143]</sup>



**Abb. 34:** Übersicht über verschiedene Klassen von RNA. Die Hauptunterteilung findet zwischen kodierender und nicht-kodierender RNA statt. Während kodierende RNA nur die Funktion der *mRNA* ausübt, ist nicht-kodierende RNA in den verschieden Aufgaben und der Regulation von Transkription und Translation in unterschiedlichster Form beteiligt.

Weitere regulatorische Elemente, die auf RNA basieren sind Ribozyme. Sie sind katalytische RNAs, die enzymatische Fähigkeiten besitzen. Beispiele dafür sind, dass sie in der Lage sind, sich selbst zu spleißen und dass sie bei der *mRNA* Prozessierung beteiligt sind.<sup>[147]</sup> *Riboswitches (Ribozyme switches)* sind Sensoren auf der *mRNA*, die auf Änderungen in der Umgebung reagieren wie Temperatur oder auch kleine Liganden. Daraufhin wird eine konformationelle Änderung eingeleitet, wodurch Prozesse abgebrochen oder wichtige Sequenzen freigelegt werden. Damit kann die Genexpression gesteuert werden. *Riboswitches* kommen bevorzugt in der Transkription und Translation von *mRNA* in Prokaryoten vor und haben so ein hohes Maß an Selbstregulation.<sup>[148]</sup>



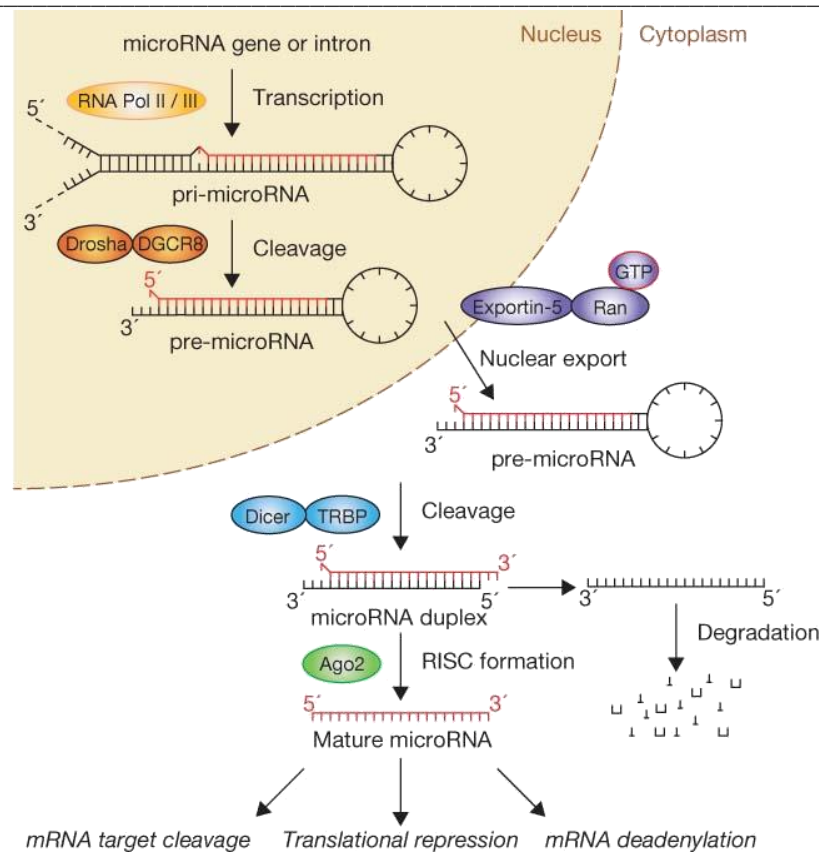
### 1.6.1 *miRNA* Prozessierung

Ein wichtiger Kontrollmechanismus in Zellen beruht auf der post-transkriptionellen Genstilllegung durch *miRNAs*. Durch Bindung an eine Ziel-*mRNA* im *RNA-induced Silencing* Komplex (RISC), wird diese abgebaut, inhibiert oder destabilisiert.<sup>[149,150]</sup> Eine *miRNA* hat oft hunderte Ziel-*mRNAs*, die zum Teil sehr wichtige Funktionen, wie die Entwicklung zu steuern. Manche *miRNAs* haben eine onkogene Wirkung.<sup>[151,152]</sup>

Die Transkription einzelner *miRNAs* findet im Nukleus statt und ist individuell ansteuerbar. Die primäre *miRNA* (*pri-miRNA*) ist das Transkript eines *miRNA* codierenden Gens oder Teil eines Intron, was durch eine RNA Polymerase des Typs II oder III abgeschrieben wird (siehe Abb. 35). Die *pri-miRNA* kann bis zu einigen Kilobasen groß sein, bildet eine Haarnadelstruktur, trägt am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz und am 5'-Ende ein Cap.<sup>[153,154]</sup> Der erste Prozessierungsschritt findet im Nukleus durch einen Mikroprozessorkomplex aus dem Enzym Drosha, einer RNase III Endonuklease, und dem Partnerprotein DGCR8 statt, welches zwei Bindedomänen für doppelsträngige RNA besitzt. DGCR8 liegt wie ein Lineal am 33-Nukleotid langen Stamm der Haarnadelstruktur an.<sup>[155]</sup> Drosha schneidet mit seinen zwei Domänen am 3'- und 5'-Ende der Haarnadelstruktur exakt elf Basenpaare von den Strangenden entfernt sequenzunabhängig die Enden ab. Es entsteht die ca. 70 Nukleotid-lange Precursor-*miRNA* (*pre-miRNA*). Drosha ist außerdem in der Lage, die *mRNA* seines essentiellen Partnerproteins DGCR8 zu schneiden und damit sich selbst zu regulieren.<sup>[156]</sup> Im Fall, dass eine *miRNA* aus einem Intron entsteht, kann es sein, dass der Prozessierungsschritt von der *pri-miRNA* zur *pre-miRNA* nicht nötig ist. *Pre-miRNAs*, die aus dem Spleißprozess entstehen, d.h. nicht von Drosha geschnitten werden und trotzdem dasselbe Produkt ergeben, heißen *mirtrons*.<sup>[157]</sup>

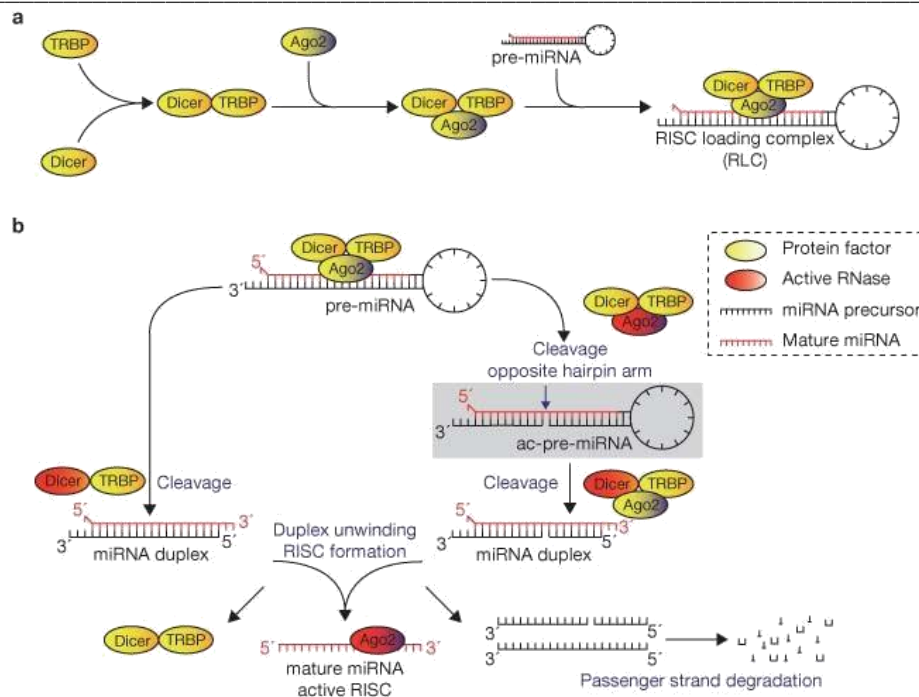
Ein weiterer Prozess, der in allen Stufen vorkommen kann, ist das *miRNA-Editing*. Die *Adenosin Deaminase acting on RNA* (ADAR) deaminiert Adenosin, sodass Inosin entsteht. Da Inosin eine ähnliche Basenpaarung wie Guanosin eingeht, wird die komplette Struktur durch neue Basenpaarungssequenzen verändert. Dies hat nicht nur Einfluss auf die weitere Prozessierung, sondern kann auch andere *mRNA*-Zielsequenzen ansteuern oder Abbau einleiten.<sup>[157]</sup>

Im nächsten Schritt der Prozessierung wird die *pre-miRNA* aus dem Nukleus in das Zytoplasma exportiert. Dies wird von einem Proteinkomplex aus Exportin-5 und RanGTP durchgeführt, der nach Bindung der RNA durch die Membran diffundiert. Der Komplex ist nicht nur für den Transport zuständig, sondern schützt die *pre-miRNA* vor Abbau. Außerdem ist eine Bindung nur dann möglich, wenn die Länge des Stamms der Haarnadelstruktur stimmt sowie ein Überhang von zwei Nukleotiden am 3'-Ende vorhanden ist. Nur korrekt prozessierte *miRNA* wird aus dem Nukleus exportiert.<sup>[158,159]</sup>



**Abb. 35:** Prozessierung der *miRNA* von der Transkription über *pri-* und *pre-miRNA* bis zur reifen *miRNA*. Das Primärtranskript *pri-miRNA* wird vom Enzym Drosha geschnitten. Die erhaltene *pre-miRNA* wird über das Transportprotein Exportin-5 aus dem Nucleus in das Zytoplasma überführt, wo es von Dicer zur reifen *miRNA* prozessiert und in den RISC-Komplex geladen wird. Entnommen aus Winter *et al.*<sup>[160]</sup> mit der Zustimmung von Springer Nature.

Zur weiteren Prozessierung der *pre-miRNA* im Zytoplasma muss sich als erstes der *RISC Loading* Komplex (RLC) bilden. Die RNase III Dicer bindet den Faktor TRBP, der doppelsträngige RNA bindet und gleichzeitig Dicer stabilisiert. Durch die Bindung findet eine konformationelle Änderung statt, die Dicer in einen aktiven Zustand versetzt. Dazu kommt das Protein Argonaut 2 (Ago2), welches die Regulation koordiniert, selbst katalytische Eigenschaften besitzt und hier als Interaktionsdomäne fungiert. An diesen Komplex kann nun die *pre-miRNA* binden zum fertigen RLC (siehe Abb. 36 a). Für den Fall, dass die Haarnadelstruktur eine perfekte Basenpaarung besitzt, schneidet Ago2 den Strang mit Überhang zur *ac-pre-miRNA* (Abb. 36 b rechts).<sup>[161]</sup> In Abb. 36b ist zu sehen, dass beide *pre-miRNA* von Dicer geschnitten werden und anschließend alle Faktoren bis auf Ago2 dissoziieren. Das Produkt ist eine doppelsträngige RNA aus 22 Nukleotiden mit jeweils zwei Nukleotiden Überhang am 3'-Ende. Die reife *miRNA* (*guide strand*) wird in den RISC-Komplex geladen, der Gegenstrang (*passenger strand*) wird abgebaut. Dabei entscheidet die thermodynamische Stabilität, welcher Strang als reife *miRNA* erkannt wird. Der Strang mit dem weniger stabilen 5'-Ende bleibt im RISC-Komplex zur Bindung an die *Seedregion* der *mRNA*.<sup>[162]</sup>



**Abb. 36:** A – Formierung des *RISC Loading* Komplexes. Dicer wird durch die Bindung von TRBP aktiviert. Ago2 koordiniert die Bindung der *pre-miRNA* zum fertigen Komplex. B – Prozessierung der *pre-miRNA*. Im Fall einer perfekten Basenpaarung schneidet Ago2 den Gegenstrang in der *pre-miRNA* zur *ac-pre-miRNA*. In beiden Fällen schneidet Dicer die Schleife der Haarnadelstruktur ab. Die reife *miRNA* kann dann in den *RISC* geladen werden, während der Gegenstrang abgebaut wird. Entnommen aus Winter *et al.*<sup>[160]</sup> mit der Zustimmung von Springer Nature.

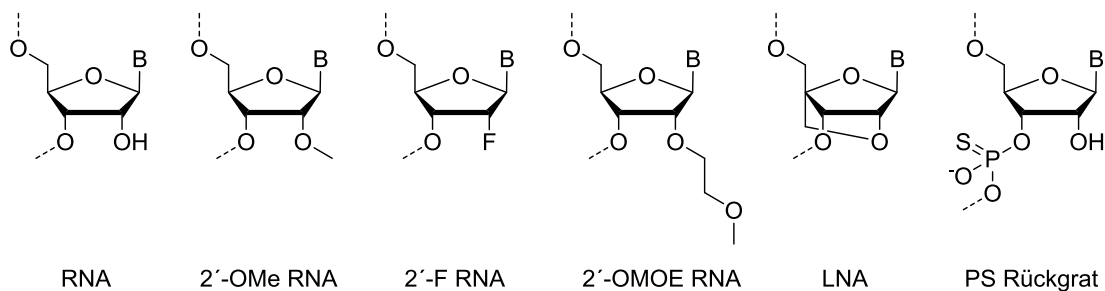
### 1.6.2 Das *AntimiR*-Prinzip

Im vorherigen Abschnitt wurde die Reifung von *miRNA* im Detail besprochen. In diesem komplexen Reaktionsweg können einige Fehler auftreten. Zum einen können die Enzyme, die an der Reaktionskaskade beteiligt sind, ihre Funktion nicht richtig ausführen, was zum Fehlen der *miRNA* und Überexpression des entsprechenden Proteins führt. Es kann aber auch das Gegenteil eintreten, eine Überproduktion der *miRNA*, mit der Folge eines erhöhten *mRNA*-Abbaus. Aus diesem Grund spielen *miRNAs* bei vielen Krankheiten eine tragende Rolle und sind deshalb ein attraktives Ziel für therapeutische Ansätze.<sup>[163]</sup>

Eine hochentwickelte Strategie ist der Einsatz von sogenannten Anti-micro-RNAs (*AntimiRs*), um das *miRNA*-Level in der Zelle zu reduzieren. Einige Studien befinden sich in fortgeschrittenen klinischen Phasen in der Entwicklung.<sup>[163]</sup> Dabei müssen die *AntimiRs* bestimmte Anforderungen erfüllen, um effektiv gegen eine *miRNA* zu binden. Erstens muss das *AntimiR* eine gute Zellgängigkeit besitzen, zweitens eine hohe Bindeaffinität zum komplementären Strang und drittens stabil gegenüber Nukleasen sein.<sup>[145]</sup> Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurden einige Strategien entwickelt basierend auf Modifikationen am RNA Strang. In Abb. 37 sind Derivate der Ribose dargestellt, die entwickelt wurden, um den Abbau durch Nukleasen zu

## 1 - Einleitung

reduzieren. 2'-OMe-RNA, 2'-F-RNA und 2'-OMOE-RNA besitzen eine Blockade an der 2'-OH Gruppe, die von RNasen beim Strangbruch angegriffen wird. Dazu zeigen sie noch eine erhöhte Bindeaffinität im Vergleich zu RNA.<sup>[145]</sup> Ein besonders großes Potential haben die von Wengel *et al.*<sup>[164]</sup> entwickelten *Locked Nucleic Acids* (LNA). Durch die Methylbrücke in der Ribose wird eine C3'-endo-Konformation erzwungen, die in einem A-Formduplex vorkommt und damit einen sehr guten RNA-mimic darstellt. Dies verdeutlicht sich in Schmelzpunktstudien von RNA. Durch Austausch eines Nucleotids durch einen LNA-Baustein findet eine Erhöhung von bis zu ( $\Delta T_m =$ ) 10 °C statt.<sup>[164]</sup> Ausgehend von der hohen Bindeaffinität wurden *tiny* LNAs entwickelt, die aus nur 8 Nucleotiden bestehen und an die Seedregion der mRNA binden.<sup>[165]</sup> Ein weiteres Mittel zur Erhöhung der Stabilität im Bereich des Rückgrats ist der Austausch eines Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom an der Phosphatgruppe. Das Phosphothioat lässt sich einfach synthetisch über Festphasensynthese einführen, führt aber ein neues stereogenes Zentrum in den Strang ein.<sup>[163]</sup> *AntimiRs* bestehend aus 2'-OMe-RNA und einem vollständigen Phosphothioatrückgrat (PS) werden auch *AntagomiRs* genannt.<sup>[166]</sup> Für eine gute Zellgängigkeit werden hydrophobe Gruppen an den Enden angebracht, unter anderem Cholesterol. Aufgrund der hohen Bindestärke von LNA werden häufig Mixmers aus LNA und einem anderen stabilen Nucleotid eingesetzt, je nach Zielsequenz. Phosphothioate werden vermehrt an den Strangenden gegen Exonucleasen eingesetzt.<sup>[145]</sup>

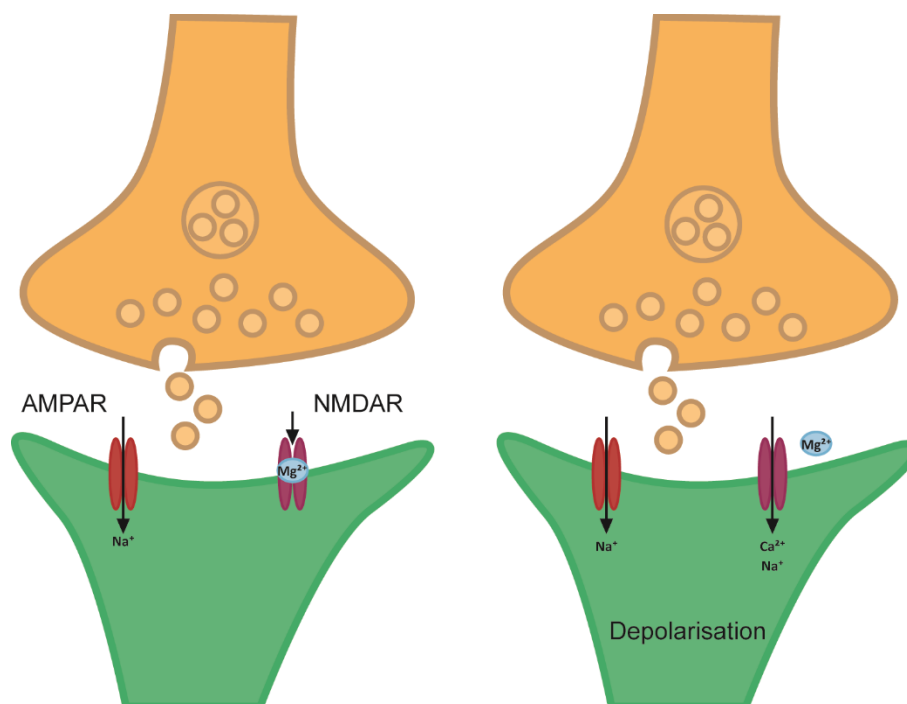


**Abb. 37:** Modifikationen von RNA zur Erhöhung der Stabilität gegen Abbau. Im Vergleich zu RNA wird versucht durch Einführung von Schutzgruppen an der 2'-OH-Gruppe Nukleaseresistenz zu bewirken (2'-OMe, 2'-F, 2'-OMOE oder LNA) oder durch die Einführung von Phosphothioaten in das Rückgrat.

### 1.6.3 Regulation von synaptischer Plastizität durch miRNA

Das Wort *Synapse* wurde 1897 von Charles Sherrington etabliert. Es beschreibt die Schnittstellen zwischen einzelnen Nervenzellen, die zu Milliarden im menschlichen Gehirn vorkommen.<sup>[167]</sup> Sie unterliegen einem ständigen Erneuerungsprozess, der durch eine Änderung der synaptischen Transmission hervorgerufen wird und als synaptische Plastizität bezeichnet wird. Der Prozess der synaptischen Plastizität ist die Grundlage der Gedächtnisbildung und des Lernens auf zellulärer Ebene.<sup>[168]</sup>

Synapsen bestehen allgemein aus zwei Teilen, einer Präsynapse, die ein Signal an eine Postsynapse weitergibt. Transmittermoleküle, wie Glutamat, werden in Vesikeln von der Präsynapse freigesetzt und binden an einen Rezeptor, wie den AMPA-Rezeptor ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazolpropionic Acid, AMPAR) der Postsynapse. Durch Bindung von Glutamat an den Rezeptor öffnet sich der Ionenkanal und es kommt zu einem Natriumioneneinstrom. Durch die Konzentrationsänderung findet eine Depolarisation der Membran statt, ein exzitatorisches post-synaptisches Potential (EPSP). Ein weiterer, in der Membran befindlicher Rezeptor ist der NMDA-Rezeptor (*N*-Methyl-*D*-aspartat, NMDAR). Dieser ist ebenfalls Glutamat-abhängig, wird aber von Magnesiumionen blockiert. Eine Aktivierung erfolgt erst bei hinreichender Depolarisierung der Membran, d.h. einer starken Aktivierung von AMPAR. Daraufhin öffnet sich der Ionenkanal und ein Calciumeinstrom erfolgt neben Natriumionen. Die Calciumionen binden und aktivieren damit die Calmodulin-abhängige Kinase (CamKII). CamKII phosphoryliert die Hydroxygruppen-haltigen Aminosäuren (ein Serin pro Untereinheit) des AMPAR, was zu einer Erhöhung der Sensitivität für Glutamat und damit zu einer Verstärkung der postsynaptischen Antwort führt.<sup>[169]</sup>



**Abb. 38:** Neurotransmitterfreisetzung zwischen Präsynapse (beige) und Postsynapse (grün). Durch Bindung von Glutamat an den AMPAR findet ein Natriumioneneinstrom statt, der die Zelle depolarisiert. Dadurch löst sich die  $\text{Mg}^{2+}$ -Blockade im NMDAR, wodurch neben Natriumionen auch Calciumionen in die Postsynapse eindringen können. Angelehnt an Malenka *et al.*<sup>[170]</sup>

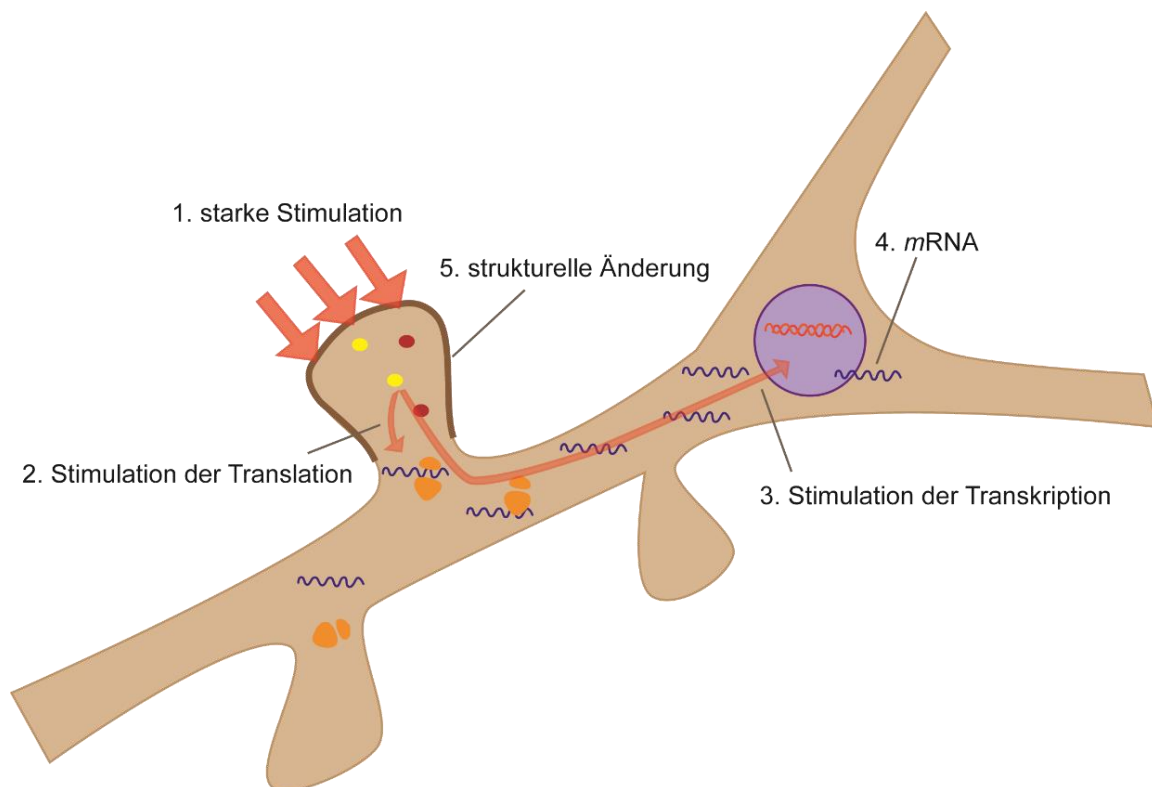
Die Calciumionen sind außerdem Botenstoff zwischen den Rezeptoren und dem Zellkern. Durch ihre Anwesenheit wird mit ATP die Adenylcyclase (cAMP-abhängige Kinase) und die Mitogen-aktivierte Kinase (MAP-Kinase) stimuliert, die den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP Response*

## 1 - Einleitung

*Element Binding* Protein) phosphorylieren und in Folge dessen Promotoren für die Genexpression aktivieren. Es findet eine lokale Proteinsynthese von allen elementaren Proteinen sowie die Neubildung und Verstärkung von Synapsen statt.<sup>[169]</sup>

Der Prozess des Neurotransmitter-gesteuerten Ioneneinstroms, der exzitatorischen Übertragung, wird als Kurzzeitpotenzierung bezeichnet. Sobald eine Calcium-induzierte Proteinsynthese eintritt, wird von der Langzeitpotenzierung (LTP) gesprochen. Die aktivitätsabhängige Übertragung zwischen Neuronen hat eine anhaltende Veränderung auf die Synapse. Dabei wird die Calcium-Aktivierung als frühe Phase der LTP bezeichnet und die Genexpression als späte Phase. Als Gegenreaktion kann aber auch eine Langzeitdepression (LTD) auftreten, die einen Abbau an Rezeptoren bewirkt.<sup>[169]</sup>

Während die Transkription, initialisiert durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung, im Nukleus des Neurons stattfindet<sup>[171]</sup>, befinden sich die Komponenten, die nötig sind für die Proteinsynthese, in den Dendriten wieder.<sup>[172]</sup> Vor allem die *mRNAs*, die Rezeptoren kodieren, treten vermehrt dort auf.<sup>[173]</sup>



**Abb. 39:** Schematische Darstellung der Proteinsynthese in Dendriten. Durch starke Stimulation der Post-Synapse (1) findet eine Stimulation der lokalen Translation von strukturell wichtigen Proteinen (2) sowie der Transkription von mRNA im Nukleus statt (3). Die mRNA wandert nun in die Dendriten zur weiteren Proteinsynthese mit der Folge einer strukturellen Verstärkung der Synapse (5). Angelehnt an Kelleher *et al.*<sup>[174]</sup>

Gleichzeitig zur mRNA tritt in Neuronen auch der posttranskriptionelle Regulator miRNA auf. Die erste Detektion einer miRNA in einem Dendriten erfolgte 2006 von Schratt *et al.*<sup>[175]</sup> in hippocampalen Neuronen aus Ratten. Mit einer FISH (*Fluorescence in situ Hybridisation*)-Sonde lokalisierten sie die miRNA-134, welche das Wachstum von Dornfortsätzen reguliert. Siegel *et al.* identifizierten 2009 weitere miRNAs in hippocampalen Neuronen.<sup>[176]</sup> Wie in anderen Zellen kontrolliert auch in Neuronen eine miRNA verschiedene synaptische Transkripte.<sup>[177]</sup> Das bemerkenswerte ist hier, dass die Proteinsynthese orts- und zeitabhängig in polarisierten Zellen an lokalen Stellen stattfindet, die weit weg vom Zellkörper sind.<sup>[178]</sup> Die miRNA Produktion und Aktivität wird dabei von der neuronalen Aktivität gesteuert. Eine Störung dieses regulativen Systems würde zu einer Hirnfehlfunktion führen.<sup>[179]</sup> Im weitesten Sinne kann damit behauptet werden, dass der Lern- und Erinnerungsprozesses unter der Kontrolle von miRNAs steht.<sup>[177,180,181]</sup> Durch kurzzeitige Kontrolle der aktivitätsabhängigen Genexpression findet ein abrupter Stopp der Proteinsynthese statt, was wie eine molekulare Bremse auf den Lernprozess wirkt.<sup>[182]</sup> Gleichzeitig wirkt die Regulation wie ein molekulares Puffersystem, das große Fluktuationen in der Proteinsynthese verhindert und die Schwelle der LTP nach oben setzt.<sup>[182,183]</sup> Die miRNA kann selbst auch auf verschiedenen Wegen reguliert werden. Die Transkription wird durch aktivitätsgesteuerte Faktoren, die an das miRNA-kodierende Gen binden, initiiert.<sup>[184]</sup> Die Prozessierung der miRNA kann aktivitätsabhängig in Dendriten stattfinden, wo Dicer in erhöhter Konzentration in Synaptosomen vorliegt.<sup>[185]</sup> Die neuronale Aktivität ist der Auslöser für viele einzelne Schritte der synaptischen Plastizität, dennoch sind viele Zusammenhänge bis jetzt ungeklärt.



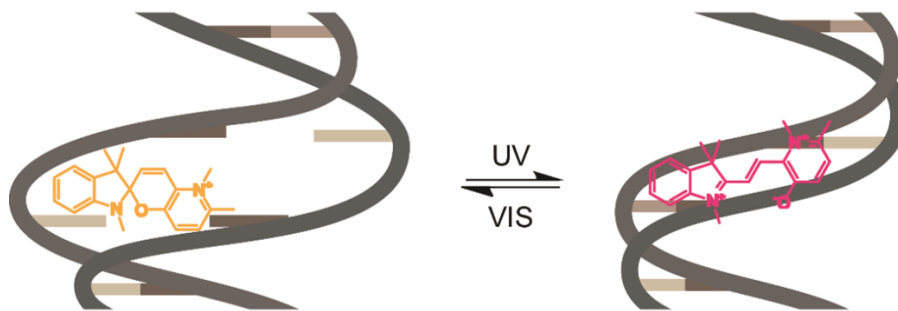


## 2 Postsynthetische Markierung von RNA mit Spiropyranen zur Steuerung der Duplexhybridisierung

### 2.1 Motivation und Zielsetzung

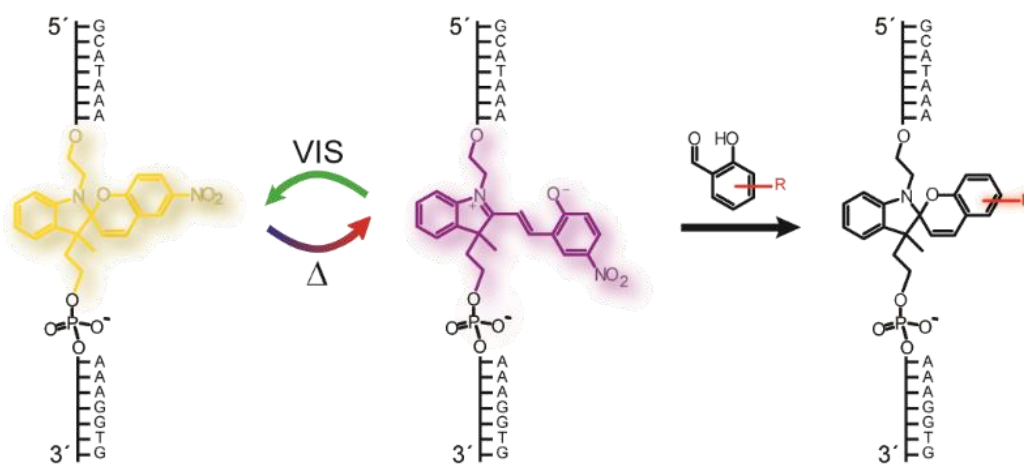
Nukleinsäuren sind an vielen grundlegenden Prozessen in der Zelle beteiligt. Dabei führen sie eine Reihe von verschiedenen Aufgaben aus, unterliegen gleichzeitig aber auch einer Art Selbstregulation. Viele dieser Mechanismen, in denen Nukleinsäuren - vor allem RNA - beteiligt sind, beruhen auf der räumlichen Anordnung. Das kann zum einen die Bildung eines Doppelstrangs, zum anderen auch ein dreidimensionales Konstrukt sein (siehe Kapitel 1.6). Licht bietet als orthogonaler Trigger die Möglichkeit der externen Steuerung dieser strukturellen Veränderung. In der Literatur gibt es einige Beispiele, in denen Photoschalter erfolgreich im Kontext von Nukleinsäuren genutzt wurden, um Einfluss auf die Struktur zu nehmen. Vor allem Azobenzole wurden schon mehrfach für solche Ansätze angewandt. Asanuma und Mitarbeiter zeigten, dass sie die Translation an der T7 Promotorregion steuern<sup>[186]</sup> sowie Einfluss auf RNA Interferenz<sup>[187]</sup> nehmen können. Aber auch andere Photoschalter wie Diarylethene stehen im Fokus, um Oligonukleotide mit Licht zu steuern.<sup>[188,189]</sup>

Ziel dieses Projektes war, den Photoschalter Spiropyran kovalent in einen RNA-Strang einzubauen und damit die Hybridisierung eines Duplexes zu beeinflussen. Dabei soll die sterisch anspruchsvolle Spiropyran-Form (SP) die Watson-Crick-Basenpaarung inhibieren und die planare Merocyanin-Form (MC) in den Basenstapel interkalieren und dadurch stabilisieren (siehe Abb. 40).



**Abb. 40:** Schematische Darstellung des Projektvorhabens. Auf der linken Seite soll die sterisch anspruchsvolle SP-Form die Hybridisierung lokal stören. Durch Belichtung mit UV Licht entsteht die planare MC-Form, die in den Basenstapel interkalieren und die Duplexbildung favorisiert.

Das Vorhaben wurde zuvor für einige Zeit im Arbeitskreis Heckel von Clara Brieke<sup>[51,190]</sup> verfolgt (siehe Abb. 41) und in der Masterarbeit der Autorin<sup>[191]</sup> fortgesetzt. Das Konzept wurde bereits in Kapitel 1.2.5 vorgestellt. Es handelt sich um ein Spiropyran, welches synthetisch so modifiziert wurde, dass es über zwei Linker als Nukleotid-Analogon über Festphasensynthese in ein Oligonukleotid eingebaut werden konnte. Des Weiteren konnte der Chromenteil postsynthetisch ausgetauscht werden, sodass Derivate mit anderen photochemischen Eigenschaften zur Verfügung standen. Dies musste zwangsläufig durchgeführt werden, da sich das verwendete NitroBIPS nur mit sichtbarem Licht isomerisieren lässt. Einzig das Derivat PyBIPS war das erste Spiropyran, das nach kovalentem Einbau in ein Oligonukleotid noch voll photochemisch aktiv war.<sup>[51,190]</sup>



**Abb. 41:** Zusammenfassung des publizierten Systems von C. Brieke. Das Spiropyran NitroBIPS lässt sich über Festphasensynthese in einen DNA-Strang einbauen, verliert jedoch an photochemischen Eigenschaften. Der Chromenteil lässt sich postsynthetisch über Retro-Aldolreaktion austauschen zu anderen Spiropyranderivaten. Entnommen aus der Dissertation von C. Brieke.<sup>[190]</sup>

Trotz erfolgreichem Einbau und Isomerisierung liegen dem System einige Probleme zu Grunde. Die Synthese des Spiropyran-Bausteins erfolgte über elf Stufen. Dabei mussten die Enantiomere des stereogenen Zentrums an C3 auf Stufe 4 über HPLC aufwendig getrennt werden. Des Weiteren wurde, trotz großer Bemühungen um eine Verbesserung, die Ausbeute der Festphasensynthese nicht über 50% Kupplungseffizienz gebracht. Dies hatte zur Folge, dass die Isolierung der Zielsequenz sehr aufwendig war, was einen Mehrfacheinbau fast ausschließt. Außerdem lässt sich das vielversprechende Derivat PyBIPS nicht als Phosphoramidit darstellen und über Festphasensynthese einbauen.

Aufgrund der oben dargestellten Probleme wurde entschieden, einen neuen Ansatz für den kovalenten Einbau von Spiropyranen zu wählen. Das Ziel des vorliegenden Projektes ist ein Spiropyran über einen postsynthetischen Ansatz an ein Oligonukleotid zu binden. Dies hat die Vorteile, dass die aufwendige Synthese des Phosphoramidits entfällt, die niedrige Ausbeute der

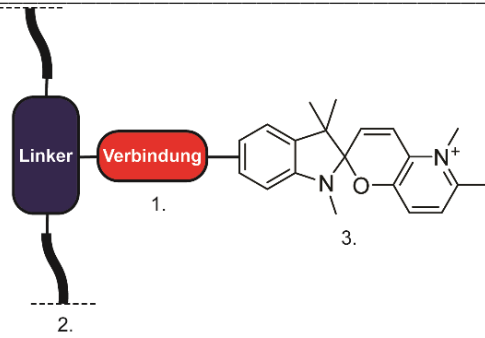
Festphasensynthese durch Anwesenheit des Spiropyrans umgangen wird und das Derivat PyBIPS direkt eingesetzt werden kann. Das neue System soll zunächst computergestützt evaluiert werden, bevor es synthetisch hergestellt und auf photochemische und strukturelle Eigenschaften untersucht wird.

## 2.2 Ergebnisse und Diskussion

### 2.2.1 *In silico*-gestützte Evaluation der Möglichkeiten zum postsynthetischen, kovalenten Einbau von Spiropyranen in Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind Polymere, bestehend aus einem Phosphat-Ribose-Rückgrat, an dem die stickstoffhaltigen Basen befestigt sind. Dieses Konstrukt enthält verschiedene funktionelle Gruppen, die wiederkehrend im Makromolekül vorkommen. In der Literatur ist eine Vielzahl an Beispielen gezeigt wie sich die einzelnen Komponenten der Nukleinsäure chemisch verändern und über Festphasensynthese in ein Oligonukleotid einbauen lassen. Dabei handelt es sich um unnatürliche Nukleobasen<sup>[192]</sup>, Ansätze des photolabilen Schützens<sup>[193]</sup>, Erhöhung der Stabilität der Ribose<sup>[194–196]</sup> und Modifikationen der Phosphateinheit<sup>[197]</sup>.

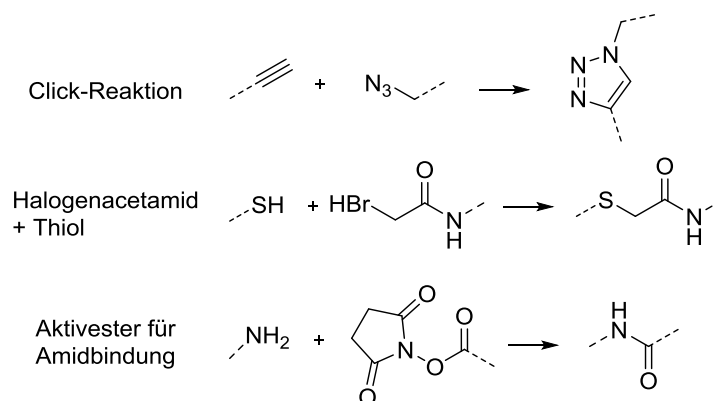
Das Ziel dieses Projektes ist ein Spiropyran postsynthetisch an einen RNA-Strang kovalent zu binden und damit die Watson-Crick-Basenpaarung des Duplex mit der Spiropyranform zu stören und der Merocyaninform zu stabilisieren. Diese Anforderung liefert die Einschränkung, dass das Spiropyran nach Verknüpfung in den Basenstapel gerichtet sein muss, um einen Einfluss ausüben zu können. Dennoch bleiben drei große Variablen übrig, die im Vorfeld erörtert werden sollen. Erstens muss eine funktionelle Gruppe im Oligonukleotid vorhanden sein, die selektiv mit einem Rest am Spiropyran reagieren kann und stabil gegenüber den Bedingungen der Festphasensynthese ist. Zweitens muss die Art der kovalenten Bindung, die orthogonal erfolgt, ausgewählt werden. Drittens muss eine passende Stelle am Spiropyran ausgewählt werden, an der die funktionelle Gruppe angebracht wird. In Abb. 42 sind die offenen Komponenten schematisch dargestellt.



**Abb. 42:** Schematische Darstellung der kovalenten Bindung des Spiropyrans PyBIPS an ein Oligonukleotid. Es müssen die drei Variablen 1. Anker im Rückgrat des Oligonukleotids (Linker), 2. Art der Bindung (Verbindung) und 3. Bindestelle am Spiropyran erörtert werden.

(1) Art der postsynthetischen Bindungsreaktion

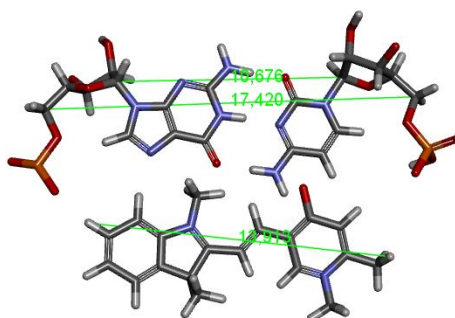
Die funktionellen Gruppen eines natürlichen Oligonukleotids bieten Ansatzpunkte für eine postsynthetische Konjugation mit einem kleinen Molekül, jedoch ist die Reaktion nicht selektiv, aufgrund der wiederholenden Einheiten. In Kapitel 1.4 wurden bereits einige funktionelle Gruppen vorgestellt, die sich für eine selektive Reaktion anbieten und gleichzeitig orthogonal zu den vorhandenen Gruppen im Oligonukleotid sind. Aus diesem Grund wurden in einer ersten Recherche drei verschiedene Reaktionen ausgewählt, die diesen Anforderungen entsprechen. In Abb. 43 sind eine Click-Reaktion, die Reaktion eines Halogenacetamids mit einer Thiofunktion und die Amidbindung über einen Aktivester gezeigt. Alle drei bieten die Voraussetzung, dass sie hochselektiv sind, sowie etabliert in vielen Systemen.<sup>[94]</sup>



**Abb. 43:** Auswahl von drei Reaktionstypen, die sich zum postsynthetischen Verknüpfen des Spiropyrans an ein Oligonukleotid eignen. Oben – Clickreaktion, Mitte – Halogenacetamid mit Thiofunktion, Unten – Amidbindung über einen Aktivester.

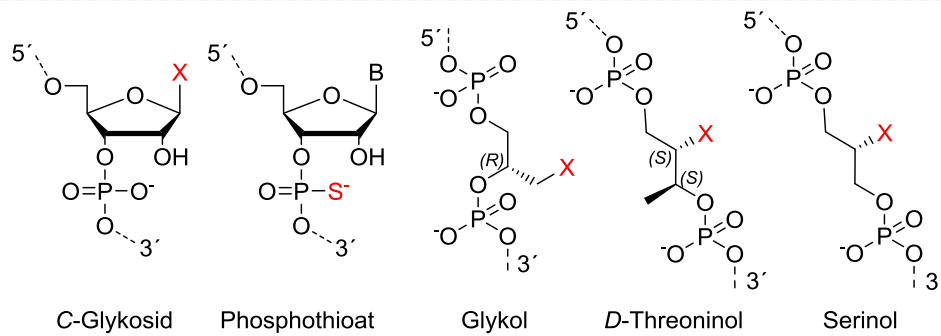
## (2) Anker im Rückgrat der RNA

Für die Auswahl von verschiedenen Motiven, die sich als Anker im Rückgrat eines Oligonukleotids anbieten, wurden zunächst die Größenverhältnisse betrachtet. In Abb. 44 wird der räumliche Anspruch von PyBIPS mit dem Platz im Basenstapel von RNA verglichen. Die Abstände wurden mit dem Programm *DiscoveryStudio 4.0* von *Accelrys* bestimmt. Der weiteste Abstand besteht zwischen den C5-Atomen der Ribose mit 17,4 Å. Das Spiropyran hat in der Merocyanin-Form, die in den Basenstapel interkalieren soll, eine Breite von 13,9 Å. Aufgrund der Größe des Spiropyrans lassen sich Modifikationen an der Base und sterisch anspruchsvolle Verknüpfungsmotive ausschließen.



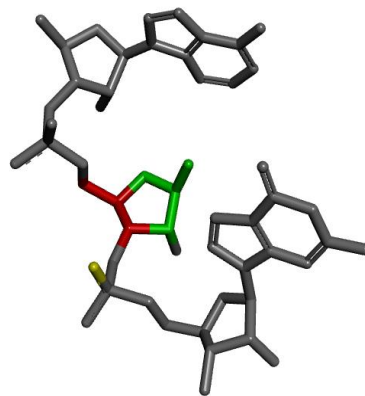
**Abb. 44:** Vergleich des räumlichen Anspruchs von PyBIPS in der Merocyanin-Form im Vergleich zum Platz im Basenstapel.

Ausgehend von der Auswahl der möglichen Reaktionen wurden weiterhin Beispiele in der Literatur studiert, die einen ähnlichen Ansatz oder ein anwendbares System verfolgen. Im Rückgrat der RNA gibt es verschiedene Punkte, an denen eine funktionelle Gruppe angebracht werden kann. Erstens bietet sich ein Basenersatz als ein C-Glykosid an, welches eine Bindestelle am C1 trägt ähnlich einer α-basischen Stelle. Eine direkte Verknüpfung als Basenalogon wie in Goldau *et al.*<sup>[198,199]</sup> kann aufgrund des postsynthetischen Ansatzes nicht verfolgt werden. Eine zweite Variante ist die Möglichkeit der Verknüpfung über ein Schwefelatom in einem Phosphothioatbaustein wie schon 1999 von Sigurdsson<sup>[200]</sup> gezeigt. Eine dritte Möglichkeit stellen nicht-nukleosidische Linker dar, die schon intensiv als alternatives Rückgrat untersucht wurden und durch ihre erhöhte thermische Stabilität auffielen.<sup>[201]</sup> Meggers und Mitarbeiter haben sich mit Glykolbausteinen beschäftigt, die RNA binden können, nicht aber DNA.<sup>[202]</sup> *D*-Threoninol und Serinol wurden intensiv von Asanuma und Mitarbeitern untersucht und in einer Reihe von Beispielen erfolgreich verwendet.<sup>[203]</sup> Während *D*-Threoninol die Windung des Rückgrats nachahmt, sticht Serinol durch seine hohe Flexibilität hervor. In Abb. 45 sind alle potentiellen Motive abgebildet. Sie stellen alle gute *mimics* des Riboserückgrats dar, was minimalen Einfluss auf die Struktur haben sollte.



**Abb. 45:** Übersicht einer Vorauswahl an potentiellen Motiven für den Einbau in RNA und zur postsynthetischen Bindung von PyBIPS.

Für die Verknüpfung über einen Phosphothioatbaustein ist die beste Variante eine Reaktion mit einem Halogenacetamid analog zu Sigurdsson<sup>[200]</sup> einzugehen. Jedoch wird in einer dreidimensionalen Ansicht in Abb. 46 deutlich, dass der Schwefel (in gelb markiert) aus dem Basenstapel in die große Furche zeigt und deshalb nicht den gewünschten Effekt hätte. Das C-Glykosid hat mit Abstand den größten räumlichen Anspruch und ragt weit in den Basenstapel hinein (Ribose markiert in grün). Die nicht-nukleosidischen Linker sind alle an den verknüpfenden Teil der Ribose angelehnt (markiert in rot) und sind damit minimal raumfüllend. Aufgrund der räumlichen Ausrichtung wurden Phosphothioat und C-Glykosid nicht weiter verfolgt und nur die drei nicht-nukleosidischen Linker in der weiteren Analyse miteinbezogen.

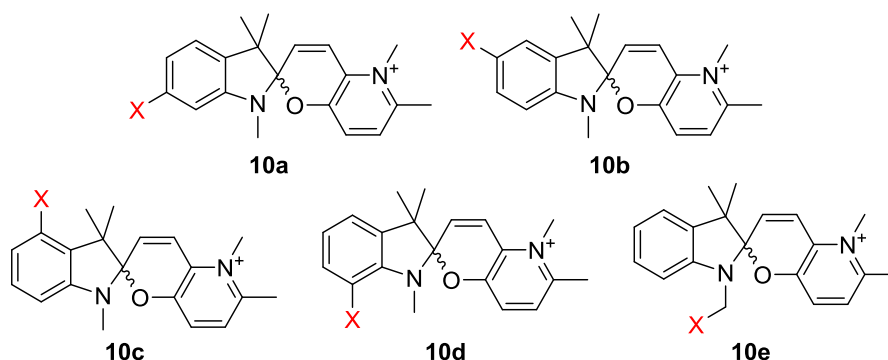


**Abb. 46:** Farblich markierte Darstellung der einzelnen Ansatzpunkte der ausgewählten Motive in einem Ausschnitt aus RNA. Gelb – Ansatzpunkt für Phosphothioat. Rot – nicht-nukleosidische Linker im Rückgrat. Grün – Ansatzpunkt für C-Glykosid.

### (3) Bindestelle an PyBIPS

Die dritte Komponente ist die Auswahl der passenden Substitution am Spiropyran. Dabei ist zu beachten, dass sich als Anknüpfstelle nur der Indolinteil eignet. Das elektronische System des

Chromenteils ist sensibel gegenüber Veränderung in Bezug auf Isomerisierung und Stabilität. In Abb. 47 sind die möglichen Stellen schematisch gezeigt. Aus der Platzanalyse des Basenpaares war zu erkennen, dass der Raum für das Spiropyran begrenzt ist (vgl. Abb. 44). Aus diesem Grund können die Strukturen der oberen Reihe (**10a**, **10b**) im Vorhinein ausgeschlossen werden, da sie einen Durchmesser von  $> 15 \text{ \AA}$  haben. Molekül **10c** und **10d** werden in der weiteren Analyse zur Vereinfachung als eine Struktur angesehen, da das Molekül die gleiche Ausrichtung hat und in der MC-Form planar ist.



**Abb. 47:** Verschiedene Positionen zur kovalenten Verknüpfung des Spiropyrans. Obere Reihe – das Substitutionsmuster vergrößert den Durchmesser, sodass das Spiropyran nicht mehr in den Basenstapel passt. Untere Reihe – ausgewählte Strukturen zur Analyse.

#### (4) Analyse über *Desmond*

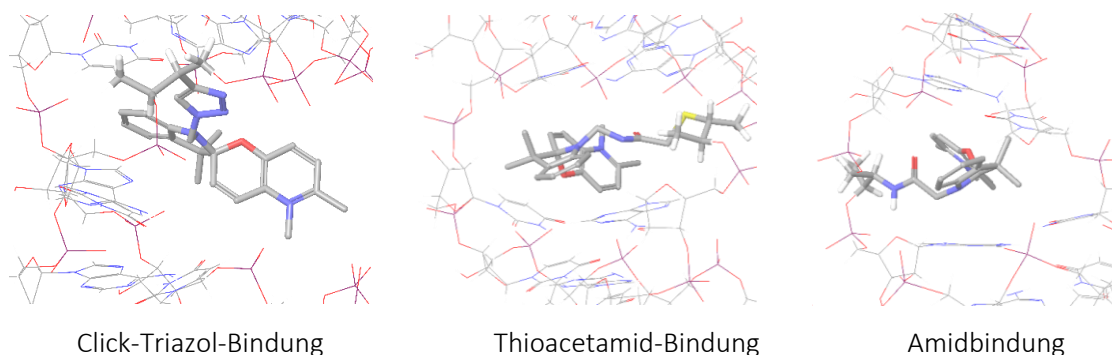
Eine Analyse der ausgewählten Komponenten erfolgte über das Computerprogramm *Desmond* von *Schrödinger*. Dazu wurden die einzelnen Komponenten zusammengesetzt, d.h. der RNA-Duplex mit dem ausgewählten Linker, Bindung und Bindestelle am Spiropyran versehen. Als Testsequenz wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit die, im Arbeitskreis Heckel etablierte, Benchmarksequenz verwendet. Im Gegenstrang wurde gegenüber der Modifikation die Base entfernt, um ein *Wedge* Motiv<sup>[203]</sup> zu erzeugen, welches auch bei Azobenzolen häufig verwendet wird. Dies hat den Vorteil, dass keine Base im Gegenstrang blockiert und kein künstliches Element, wie eine  $\alpha$ -basische Stelle, im Gegenstrang eingebaut werden muss (siehe Tabelle 1). Der Gegenstrang besitzt damit ein Nukleotid weniger.

**Tabelle 1:** AK-Heckel interne Benchmark-Sequenz mit passendem Gegenstrang im *Wedge* Motiv.

	Sequenz	Anzahl Nukleotide
Benchmarksequenz	5'-GCA UAA AXA AAG GUG-3'	14 + Linker
Gegenstrang	3'-CAC CUU U-U UUA UGC-5'	14

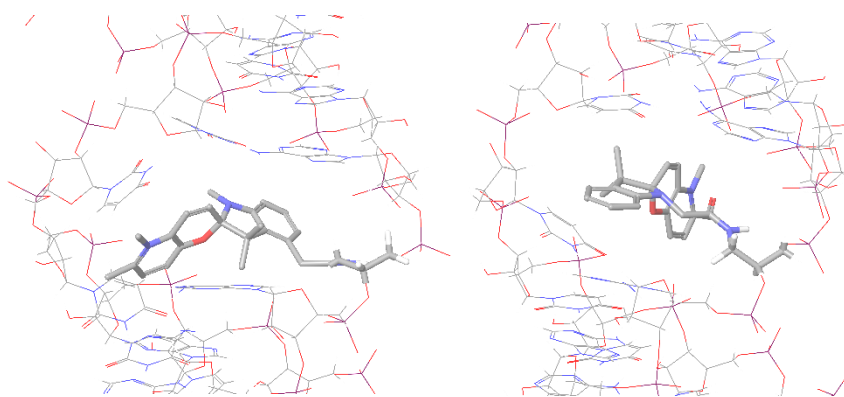
Die verschiedenen Komponenten wurden nach der Auswahl in einer Designstudie untersucht und miteinander verglichen. Das zusammengebaute Konstrukt wurde einer kurzen (5 ns) *Molecular Dynamics*-Simulation im Programm *Desmond* der *Schrodinger Suite* unterzogen. Anschließend wurde die Trajektorie betrachtet und optisch analysiert, wie das Spiropyran räumlich im Basenstapel liegt. Im Folgenden werden einige ausgewählte Beispiele vorgestellt.

Die nicht-nukleosidischen Linker sind klein und unterscheiden sich in der Konstitution. In diesem Rahmen konnte jedoch kein effektiver Unterschied zwischen den Feinheiten der Linker erkannt werden. Unterschiede sind dagegen im Vergleich der drei Bindungsarten zu erkennen. Während der Triazolring der Clickbindung sehr starr ist und viel Platz benötigt, sind die Bindungen durch Substitution flexibel. Aufgrund der Anzahl der Atome, ist die Bindung über ein Thiol länger, als über eine Amidbindung mit dem kleinsten räumlichen Bedarf. Ausschnitte sind in Abb. 48 zu sehen:



**Abb. 48:** Vergleich der drei ausgewählten Bindungstypen im RNA-Duplex im *Wedge* Motiv. Links – Triazolring der Clickreaktion ist sehr rigide und räumlich anspruchsvoll. Mitte – Thioacetamidbindung besteht aus einer langen Kette. Rechts – Amidbindung mit dem kleinsten räumlichen Anspruch.

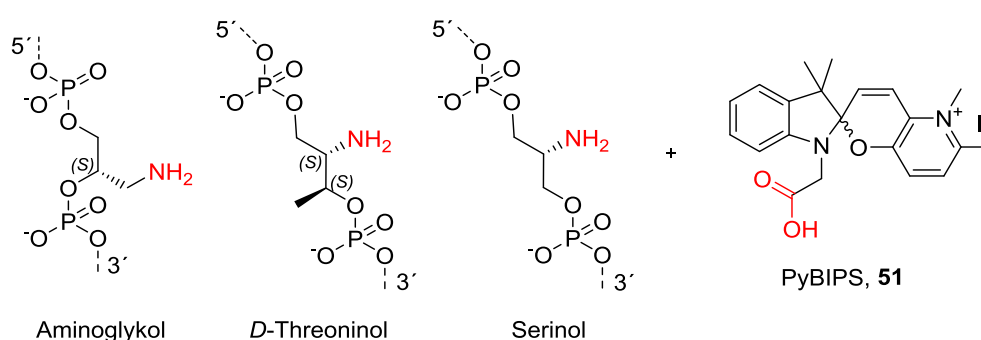
In Abb. 49 ist ein Vergleich der Verknüpfungstelle am Spiropyran dargestellt. Beide Photoschalter sind über eine kurze Amidbindung angebracht. In der abgebildeten Darstellung lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen zwischen der Verknüpfung über die 4-Position am Indolinring oder über den Indolin-Stickstoff.



**Abb. 49:** Vergleich der Bindestelle am Spiropyran. Links – 4-Position des Indolins. Rechts – Bindung über Indolin-Stickstoff.



Nach *in silico* gestützter Analyse der einzelnen Komponenten, die bei einer postsynthetischen Verknüpfung eine Rolle spielen, wurden die Komponenten in Abb. 50 für eine synthetische Ausarbeitung ausgewählt. Dazu ist zu sagen, dass der Platz im Basenstapel für das Spiropyran begrenzt ist und einige Motive dadurch nicht kompatibel sind. Die räumlich kleinste Variante ist die Verwendung eines nicht-nukleosidischen Linkers mit einem Amin, das über eine Amidbindung ein Spiropyran binden kann. Da keine Aussage über Unterschiede der Linker zu diesem Zeitpunkt gemacht werden könnte, sollen alle Varianten hergestellt werden. Außerdem ist es nach Asanuma<sup>[203]</sup> systemabhängig, welcher Linker die beste Wahl ist. Im Fall der Anknüpfstelle am Spiropyran wurde die Verknüpfung über den Indolin-Stickstoff gewählt, da sie synthetisch mit dem wenigsten Zeitaufwand zugänglich ist.

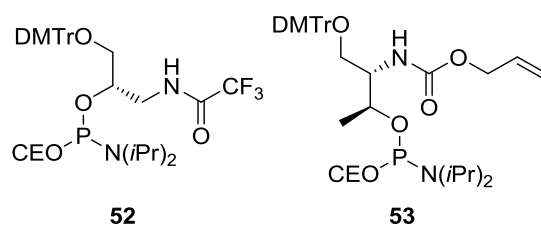


**Abb. 50:** Übersicht der chemisch zu synthetisierenden Moleküle. Es wurden die nicht-nukleosidischen Linker Glykol, *D*-Threoninol und Serinol ausgewählt, die über eine Amidbindung an eine Seitenkette am Indolin-Stickstoff gebunden werden sollen.

### 2.2.2 Synthese der nicht-nukleosidischen Linker für die Festphasensynthese

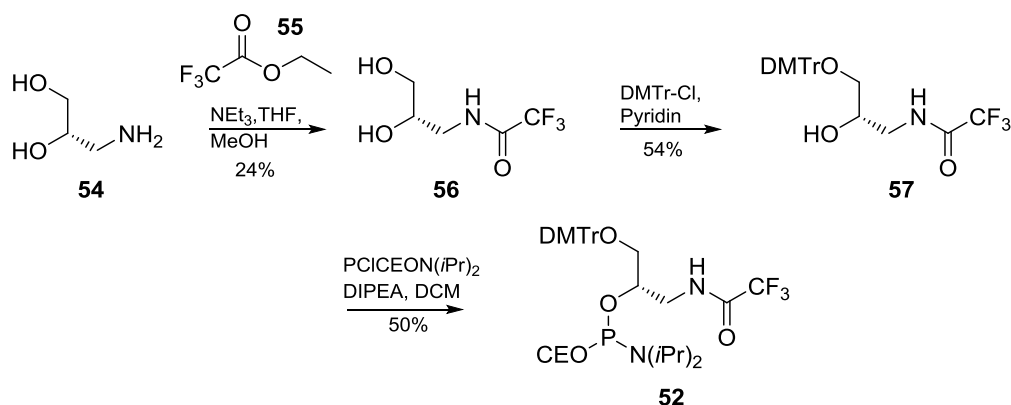
Um die ausgewählten nicht-nukleosidischen Linker über Festphasensynthese in ein Oligonukleotid einzubauen, müssen die passenden Schutzgruppen synthetisch angebracht werden. Zum einen handelt es sich dabei um die Standardschutzgruppen Dimethoxytrityl (DMTr) am 5'-OH und Phosphoramidit am 3'-OH. Des Weiteren muss die Aminofunktion mit einer Schutzgruppe geschützt werden. Dafür wurden zwei verschiedene Strategien gewählt. Erstens sollte die Aminofunktion mit Trifluoressigsäure (TFA) geschützt werden, die bei Abspaltung von der Festphase gemeinsam mit den permanenten Schutzgruppen vom Oligonukleotid entfernt wird. Dabei handelt es sich um eine gängige Methode für die Markierung mit Farbstoffen an primäre Amine wie bei Okamoto *et al.*<sup>[204]</sup> Eine zweite Variante ist die Benutzung einer Alloc-Schutzgruppe (Allyloxycarbonyl), die sich unter Palladiumkatalyse abspalten lässt und damit orthogonal zu allen anderen verwendeten Entschützungsbedingungen ist. Dies bietet die Möglichkeit eine Kupplung des Spiropyrans auf fester Phase durchzuführen, vor Abspaltung der permanenten Schutzgruppen,

zur Vermeidung von Nebenreaktionen. Asanuma *et al.* waren damit in der Lage verschiedene Chromophore an kurze DNA-Sequenzen zu binden.<sup>[205]</sup>



**Abb. 51:** Zielverbindungen: geschützte nicht-nukleosidische Linker als Phosphoramidite für die Oligonukleotidfestphasensynthese. **52** Aminoglycol mit TFA-Schutzgruppe, **53** *D*-Threoninol mit Alloc-Schutzgruppe.

3-Amino-1,2-propandiol (**54**) wurde mit 24% Ausbeute mit Trifluoracetat an der Aminogruppe versehen ohne Schützung der OH-Gruppen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit mussten große Mengen MeOH zugesetzt werden. Die Löslichkeit ist wahrscheinlich auch der Grund für die geringe Ausbeute. Im nächsten Schritt wurde die DMTr-Gruppe am 5'-OH angebracht mit 54% Ausbeute. Im letzten Schritt wurde Phosphoramidit **52** in 50% Ausbeute erhalten und weiterhin in der Festphasensynthese eingesetzt.



**Abb. 52:** Syntheseroute für Zielverbindung **52**.

Die zweite Zielverbindung **53** wurde nach Vorlage von Asanuma *et al.*<sup>[205]</sup> synthetisiert. *D*-Threoninol (**58**) wurde zur Schützung der Aminogruppe mit Allylchloroformiat (**59**) versetzt. Abweichend zur Literatur wurde eine wässrige Aufarbeitung eingeführt und das Produkt nach Säulenchromatographie mit 56% erhalten. Die Schützung der 5'-OH und 3'-OH-Gruppe wurde analog zu Phosphoramidit **52** erfolgreich mit den Schutzgruppen für die Festphasensynthese versehen. Phosphoramidit **53** wurde anschließend in der Festphasensynthese eingesetzt.

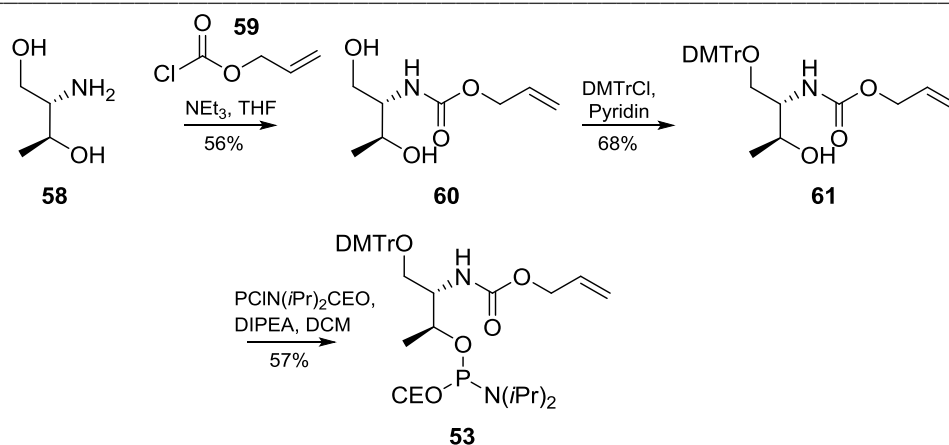


Abb. 53: Syntheseroute für Zielverbindung 53.

Im Anschluss wurde der *D*-Threoninollinker ebenfalls mit einer TFA-Gruppe versehen. Analog zu Aminoglycol wurde ausgehend von Verbindung 58 die Schutzgruppe im Vergleich mit einer deutlich höheren Ausbeute von 72% angebracht. Hier musste ebenfalls 25% MeOH für die Löslichkeit zugegeben werden. Verbindung 62 wurde weiterhin mit DMTr geschützt und dann zur Zielverbindung 64 mit vergleichsweise höheren Ausbeuten umgesetzt.

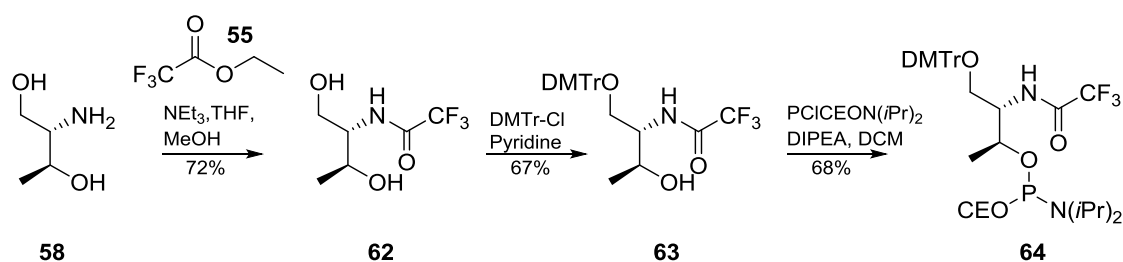


Abb. 54: Syntheseroute für Zielverbindung 64.

### 2.2.3 Festphasensynthese von 2'-OMe-RNA mit nicht-nukleosidischen Linkern

Die synthetisierten Phosphoramidite 52 und 53 wurden über Oligonukleotidfestphasensynthese in 2'-OMe-RNA eingebaut. Bei der Sequenz handelt es sich, um die im Arbeitskreis Heckel etablierte Benchmark-Sequenz, ein 15mer mit der Modifikation an Position 8 (Tabelle 2, RNA-1 und RNA-2). Die Synthese erfolgte unter *UltraMILD*<sup>®</sup>-Bedingungen, da die TFA-Schutzgruppe zu labil für die Anwesenheit des normalen Capping-Reagenzes Essigsäureanhydrid ist. Ein Austausch der TFA-Schutzgruppe zum Essigsäureamid wäre die Folge, welches sich nicht mehr unter milden Bedingungen abspalten ließe.<sup>[206]</sup> Beide Moleküle ließen sich zunächst schlecht in Acetonitril (MeCN) in der gewünschten Konzentration von 0,12 M lösen und lieferten in einer

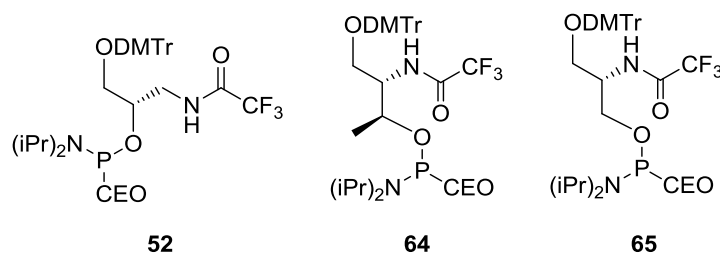
## 2 - Postsynthetische Markierung von RNA mit Spiropyranen

Standartkupplungszeit von 6 Minuten für 2'-OMe-RNA Bausteine eine schlechte Ausbeute (Interne Referenz Synthesizer anhand Detritylierung: <50%). Nach erneutem Trocknen im Vakuum und Verlängerung der Kupplungszeit auf einen doppelten Kupplungsschritt konnte die Ausbeute auf >75% in beiden Fällen gesteigert werden.

**Tabelle 2:** Übersicht aller 2'-OMe-RNA Stränge mit nicht-nukleosidischen Linkern per Herstellung über Festphasensynthesen.

Bezeichnung	Phosphoramidit	Linker	Sequenz
RNA-1	53	D-Threoninol	5'-GCA UAA AXA AAG GUG-3'
RNA-2	52	Aminoglykol	5'-GCA UAA AXA AAG GUG-3'
RNA-3	52	Aminoglykol	5'-GCA UAU AXU AAG GUG-3'
RNA-4	64	D-Threoninol	5'-GCA UAU AXU AAG GUG-3'
RNA-5	65	Serinol	5'-GCA UAU AXU AAG GUG-3'

Des Weiteren wurden 2'-OMe-RNA-Stränge mit einer Sequenz aus einer NMR-Studie der Arbeitskreise Heckel und Schwalbe<sup>[207]</sup> synthetisiert. Dabei wurden die nicht-nukleosidischen Linker ebenfalls in ein 15mer eingebaut mit gleicher Position, aber leicht veränderter Basensequenz (vgl. Tabelle 2 **RNA 3-5**). Für die Analyse mittels NMR-Spektroskopie ist eine unsymmetrische Basenabfolge von Vorteil. Für die Synthese von **RNA 3-5** wurden TFA-geschützte Phosphoramidite eingesetzt. In Abb. 55 sind die eingesetzten Phosphoramidite für Aminoglykol **52**, D-Threoninol **64** und Serinol **65** dargestellt. Verbindung **65** wurde von Thomas Goldau synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle Phosphoramidite konnten mit einer Kupplungsausbeute über 80% eingebaut werden.



**Abb. 55:** Verwendete Phosphoramidite in Projekt 1.

TFA-geschützte **RNA-2-5** wurden nach der Synthese unter *UltraMILD*<sup>®</sup>-Bedingungen mit 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeOH für 4 Stunden oder mit 32%-NH<sub>3</sub> für 4 Stunden abgespalten und anschließend per Umkehrphasen (*Reversed Phase* - RP) HPLC aufgereinigt.

## 2.2.4 Chemische Synthese von Spiropyranen mit Carbonsäure

Für die Darstellung des Spiropyrans **51** mit kurzem Linker und Carbonsäure diente für den Aufbau des Grundgerüsts die etablierte Synthese von Beyer und Wagenknecht als Vorlage.<sup>[208]</sup> Dabei sollte ausgehend von 2,3,3-Trimethylindol **66** im ersten Schritt der Linker am Indolinstickstoff angebracht werden durch Substitution eines Halogens. Im nächsten Schritt wird durch Zugabe von KOH die Imin-Enamin-Tautomerie induziert. Das Enamin kann anschließend mit dem passenden Aldehyden **69** über eine Aldolreaktion zum Spiropyran reagieren. Abschließend wird eine Methylierung des Chromenstickstoffs mit Methyljodid nach Özçoban *et al.* durchgeführt.<sup>[27]</sup>

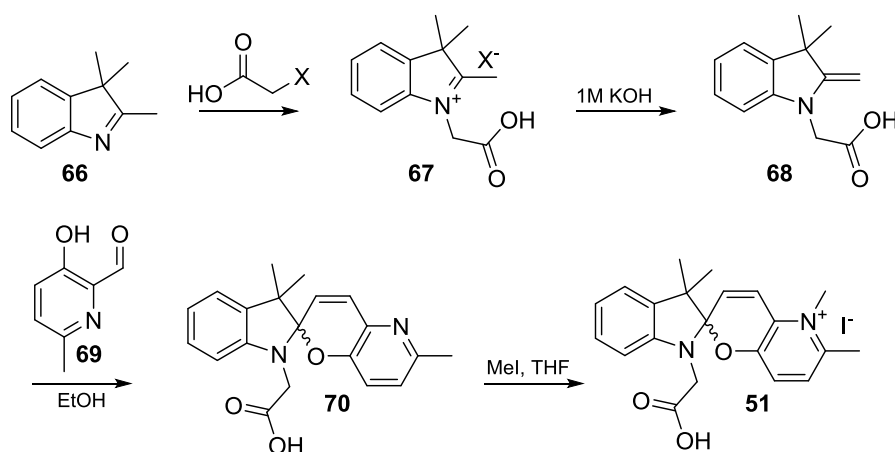
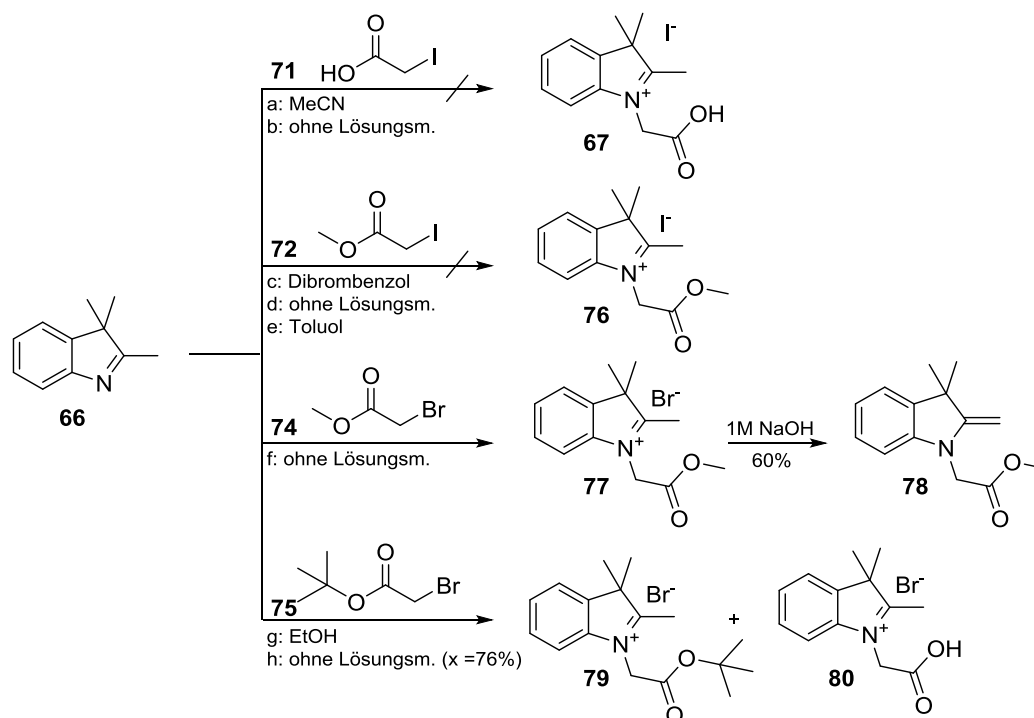


Abb. 56: Syntheseplan für die Darstellung von Spiropyran **51**.

Im ersten Reaktionsschritt in Abb. 56 sollte ausgehend von Verbindung **66** der Linker mit Carbonsäure am Indolinstickstoff installiert werden. Dazu wurde analog zur Literatur<sup>[208]</sup> 2-Iodacetat **71** mit Indolin **66** in MeCN für mehrere Stunden zum Rückfluss erhitzt (siehe Abb. 57, Reaktion a). Es konnte kein Produkt isoliert werden, was auch in der nächsten Reaktion angelehnt an Meguelatti *et al.*<sup>[209]</sup> ohne Lösungsmittel der Fall war (b). Da vermutet wurde, dass die freie Carbonsäure ein Problem in der Aufarbeitung darstellt und nicht wie von Martynaitis *et al.*<sup>[210]</sup> als Perchlorsäure ausgefällt werden konnte, wurde in weiteren Reaktionen eine veresterte Carbonsäure eingesetzt. Mit Verbindung **72** wurden drei verschiedene Reaktionsansätze unter Rückfluss probiert, erstens in Dibrombenzol nach Pisoni *et al.*<sup>[211]</sup> (c), zweitens ohne Lösungsmittel analog zu Ansatz b (d) und drittens in Toluol nach Wang *et al.*<sup>[212]</sup> (e). In Reaktion c konnte zwar massenspektrometrisch das Produkt im Ansatz nachgewiesen, aber nicht isoliert werden. Als nächstes wurde versucht nach Meguelatti *et al.*<sup>[209]</sup> Brom statt Iod als Substituent einzusetzen (f, **74**). Verbindung **66** wurde frisch destilliert eingesetzt, mit dem Erfolg, dass Produkt **77** mit Ether aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden konnte. Nach Tautomerisierung durch 1 M NaOH, konnte Enamin **78** sauber isoliert und in folgenden Reaktionen eingesetzt werden. Trotz längerer

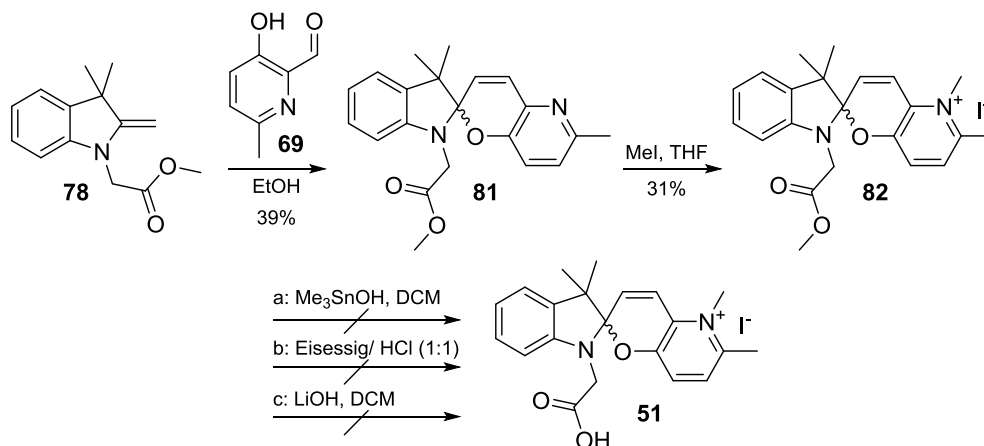
Inkubation in NaOH ließ sich der Methylester nicht, wie in der Literatur beschrieben, spalten. Aus diesem Grund wurde dieselbe Reaktion mit einer *tert*-Butyl-geschützten Carbonsäure durchgeführt (g in EtOH und h ohne Lösungsmittel) mit dem Ziel Verbindung **79** herzustellen. Aus dem Reaktionsgemisch in EtOH ließ sich das Produkt nur mit großem Aufwand isolieren aufgrund von sehr feinem Niederschlag im Gegensatz zur Reaktion ohne Lösungsmittel. Nach Waschen des ausgefallenen Produkts mit Aceton wurde Verbindung **80** als freie Carbonsäure mit 76% Ausbeute hergestellt und in der Folgereaktion eingesetzt.



**Abb. 57:** Übersicht der durchgeführten Synthesen mit dem Ziel Verbindung **67** herzustellen ausgehend von Indolin **66**.

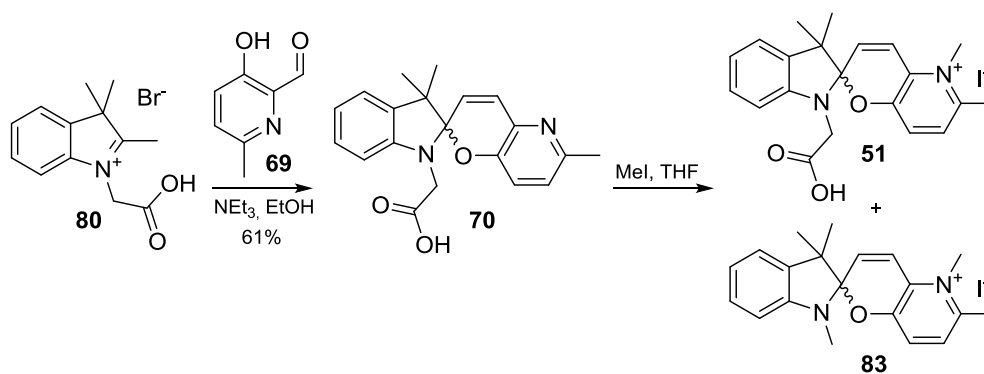
Verbindung **78** wurde zügig unter Erhaltung des Enamins weiter zu Spiropyran **81** über eine Aldolkondensation mit Aldehyd **69** umgesetzt. Auch die Methylierung des Chromenstickstoffs funktionierte wie erwartet. Im letzten Schritt sollte der Methylester gespalten werden. Aus der Darstellung von Enamin **78** ist bekannt, dass eine Hydrolyse mit NaOH keinen Erfolg zeigt. Des Weiteren wurden basische Bedingungen vermieden, da eine Öffnung des Spiropyrans zu Merocyanin-Form gefördert wird und Hydrolyse durch eine Retro-Aldolreaktion eintreten kann.<sup>[23]</sup> Deshalb wurde zunächst versucht nach Nicolaou *et al.*<sup>[213]</sup> eine Esterspaltung durch den Einsatz von  $\text{Me}_3\text{SnOH}$  zu erhalten. Trotz schlechter Löslichkeiten wurden kleine Mengen Produkt erhalten, die jedoch nicht vom Edukt abgetrennt werden konnten. In einem zweiten Ansatz wurde versucht, eine saure Esterhydrolyse mit einem Gemisch aus konzentrierter Salzsäure und Eisessig zu bewirken. In einer massenspektrometrischen Untersuchung wurde nur das decarboxylierte Produkt

gefunden. In einem dritten Versuch wurde nach Hagen *et al.*<sup>[214]</sup> eine LiOH-Lösung eingesetzt, die zum gewünschten Produkt **51** führte. Jedoch konnte das Produkt wieder nicht isoliert werden, aufgrund der ähnlichen Eigenschaften von Produkt **51** und Vorläufer **82** in präparativer Normalphasen- und Umkehrphasensäulenchromatographie.



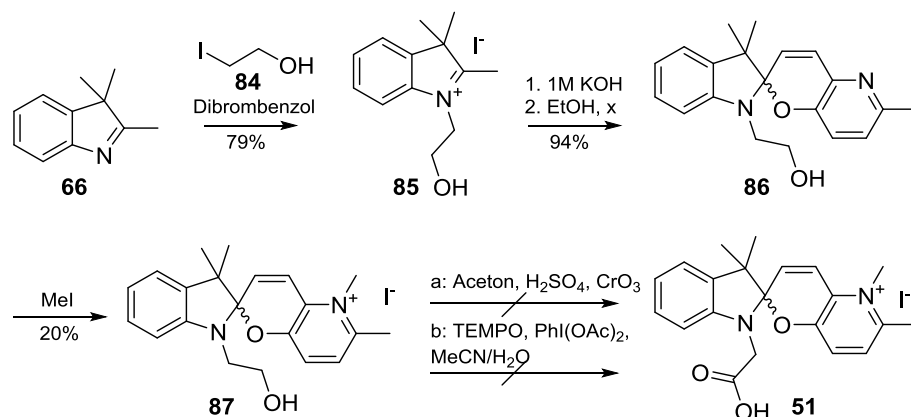
**Abb. 58:** Syntheseübersicht von Verbindung **51** mit dem Ziel den Methylester zu spalten unter Erhalt der Carbonsäure.

Ausgehend von Verbindung **80** mit freier Carbonsäure wurde analog zu Halbritter *et al.*<sup>[22]</sup> die Aldolkondensation mit Aldehyd **69** nach kurzer Inkubation mit  $\text{NEt}_3$  erfolgreich durchgeführt. Im Folgeschritt sollte die Methylierung des Chromenstickstoffs durchgeführt werden. Jedoch wurde in mehreren Versuchen nicht die gewünschte Zielstruktur **51**, sondern **83** nach Decarboxylierung des Linkers erhalten. Die Instabilität wird nach Wang *et al.*<sup>[212]</sup> auf die Reaktivität der Heteroatome zurückgeführt, die besonders in basischen Bedingungen und Hitze zur Decarboxylierung neigen. Auch im Fall von Amid- oder Ester-geschützten Carbonsäuren konnte der Prozess nicht verhindert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Amidbindung zwischen Spiropyran und RNA nicht stabil sein würde und die Bildung unter basischen Bedingungen degradieren würde.



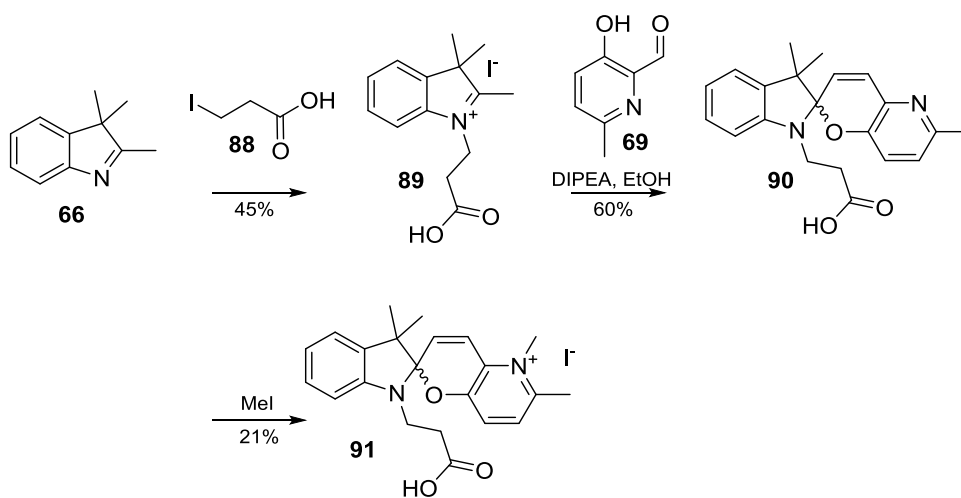
**Abb. 59:** Synthese von Zielverbindung **51** ausgehend von Vorläufer **80**.

In einem letzten Versuch wurde PyBIPS **87** mit Hydroxylinker hergestellt. Das Anbringen des Linkers, die Aldolkondensation und die Methylierung des Stickstoffs wurden analog zu Özçoban *et al.*<sup>[27]</sup> mit guten (79-94%) bis moderaten (20%) Ausbeuten durchgeführt. Abschließend sollte eine Oxidation des Alkohols zur Carbonsäure Produkt **51** liefern. Jedoch konnte Verbindung **51** weder durch eine Jones-Oxidation noch über eine Reaktion mit TEMPO und Periodat erhalten werden (siehe Abb. 60).



**Abb. 60:** Synthese von Zielverbindung **51** ausgehend von Hydroxylinker mit abschließender Oxidation zur Carbonsäure.

Da Verbindung **51** synthetisch nicht dargestellt werden konnte, wurde die Synthese von Verbindung **91** angestrebt (siehe Abb. 61). Durch die Erweiterung des Linkers um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe zu einem Propansäurelinker wurde eine verbesserte Stabilität erhofft. Nach Halbritter *et al.*<sup>[22]</sup> wurde der Linker mit freier Carbonsäure an Indolin angebracht, die Aldolreaktion in guter Ausbeute durchgeführt und nach Methylierung Zielverbindung **91** erhalten.



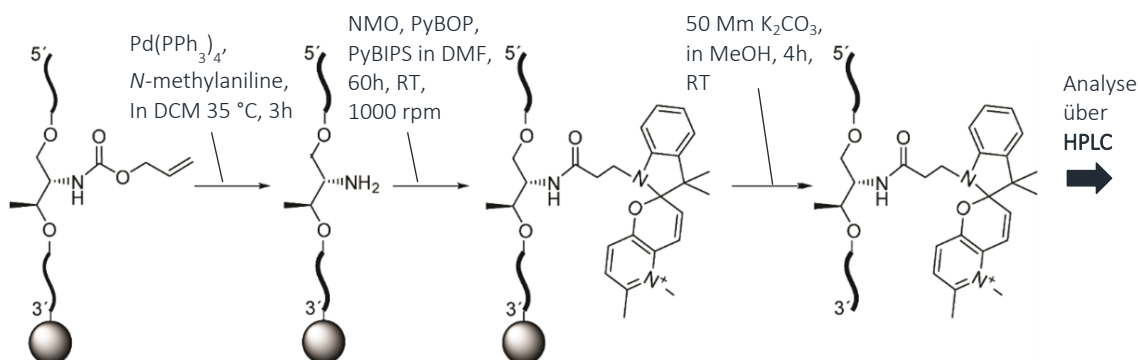
**Abb. 61:** Synthese von Zielverbindung **91** mit Propansäurelinker.



## 2.2.5 Postsynthetische Markierung der 2'-OMe-RNA-Stränge mit PyBIPS

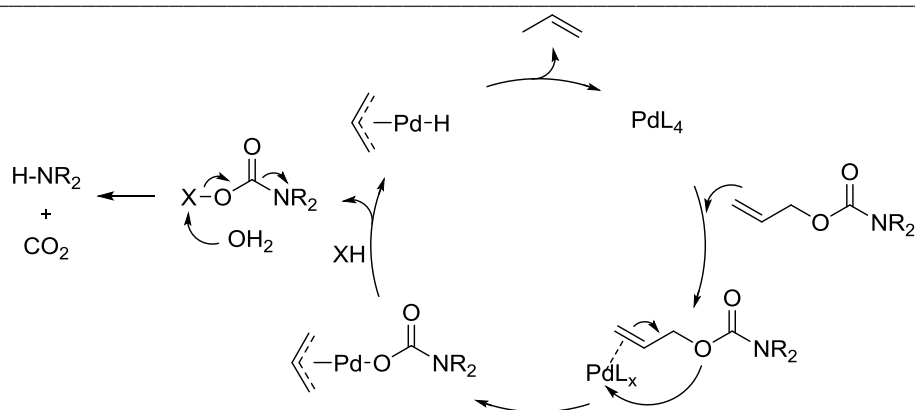
## (1) Alloc-geschützte 2'-OMe-RNA-Stränge

Für die kovalente Bindung des Spiropyrans **91** über eine Amidbindung an RNA, wurden nicht-nukleosidische Linker mit Aminogruppe in 2'-OMe-RNA über Oligonukleotidfestphasensynthese eingebaut. Im Fall von **RNA-1** wurde eine Alloc-Schutzgruppe am Amin angebracht, die sich orthogonal zu allen anderen permanenten Schutzgruppen abspalten lässt. Nach Asanuma *et al.*<sup>[205]</sup> wurde versucht die Schutzgruppe zu entfernen und die Kupplung des Spiropyrans auf fester Phase durchzuführen. In Abb. 62 ist die Reaktionsabfolge dargestellt. Im ersten Schritt sollte die Schutzgruppe mithilfe eines Palladiumkatalysators abgespalten werden. Im Anschluss soll die Kupplung des Spiropyrans folgen und dann die Abspaltung von der Festphase.



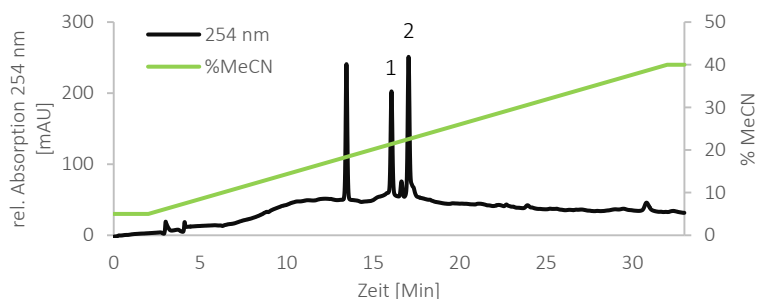
**Abb. 62:** Reaktionsabfolge der Entschützung auf fester Phase mit anschließender Kupplung von PyBIPS und abschließender Abspaltung von der Festphase.

Die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe findet in zwei Schritten statt. In Abb. 63 ist der Mechanismus des Palladium-katalysierten, ersten Reaktionsschritts gezeigt. Die Abtrennung der Allylgruppe wird durch die Bindung an den Palladiumkomplex eingeleitet. Das entstandene Carbamat wird durch den Angriff eines Abfangreagenzes vom Katalysator gelöst. Durch Angriff von Wasser wird das Reagenz wieder abgespalten, es kommt daraufhin zur Decarboxylierung unter Freisetzung des gewünschtenamins. Das Abfangreagenz, ein Nukleophil, wird dabei im Überschuss eingesetzt, um zu verhindern, dass das freie Amin mit dem Allylrest reagieren kann und ein Allylamin bildet.



**Abb. 63:** Mechanismus der Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe über Palladium-Katalyse.

Als erstes wurde versucht unter den Bedingungen von Asanuma *et al.*<sup>[205]</sup> die Abspaltung auf der festen Phase durchzuführen. Anschließend erfolgte die Abspaltung von der Festphase und eine Analyse über RP-HPLC. Da diese Prozedur sehr aufwendig war, wurde eine Testreihe mit bereits abgespaltenen Strängen von **RNA-1** durchgeführt. Dabei wurde die Menge des verwendeten Abfangreagenzes *N*-Methylanilin (NMA) variiert und neben DMF auch DMSO getestet. In einem einzigen Versuch konnte ein neuer Peak im RP-HPLC-Spektrum gesehen werden (siehe Abb. 64, Signal 1), dessen Masse die Entschützung bestätigte. Jedoch war der Ansatz nicht reproduzierbar.

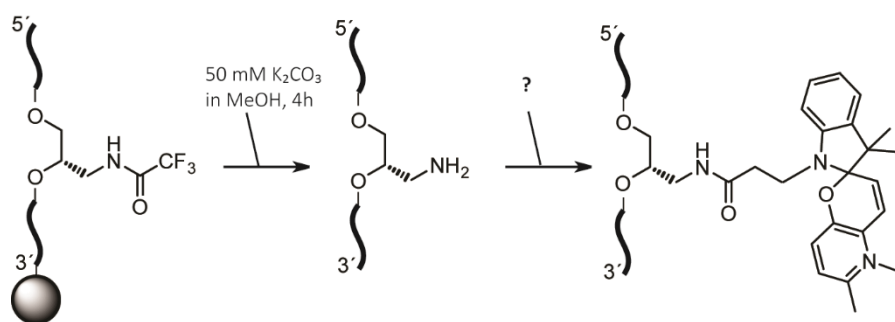


**Abb. 64:** HPLC-Chromatogramm (0,1 M TEAA: MeCN) der Entschützung von **RNA-1** mit einem Palladium-Katalysator in Anwesenheit von NMA. Mit 1 ist das Signal des entschützten Produkts und mit 2 des geschützten Edukts markiert.

Daraufhin wurde das Abfangreagenz auf Barbitursäure gewechselt, welches von Gomes-Martinez *et al.*<sup>[215]</sup> für Peptide empfohlen wird. Hier konnte in mehreren Versuchen kein brauchbares Ergebnis erzielt werden, was hauptsächlich an der Barbitursäure selbst lag, die sich nur sehr schwer aus dem Reaktionsansatz entfernen ließ. Da nach mehreren Versuchen keine erfolgreiche Abspaltung der Allocschutzgruppe erzielt werden konnte, wurde dieser Ansatz verworfen und im Folgenden der TFA-geschützte Strang verwendet.

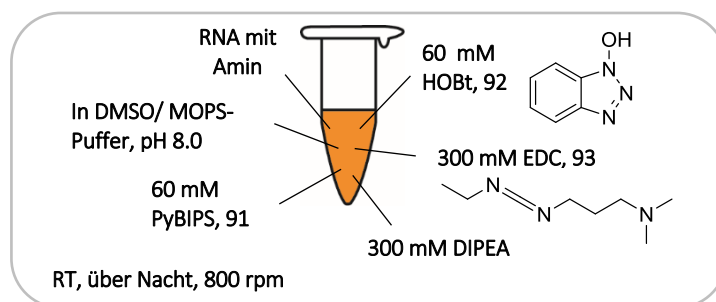
## (2) TFA-geschützte 2'-OMe-RNA Stränge

TFA-geschützte 2'-OMe-RNA Stränge (**RNA 2-5**) wurden von der Festphase abgespalten und dabei alle permanenten Schutzgruppen entfernt. In Abb. 65 ist die Reaktionsabfolge schematisch dargestellt. Den Schlüsselschritt stellt die selektive Amidkupplungsreaktion von Spiropyran **91** dar, für die die passenden Bedingungen erörtert werden. Dazu wurde **RNA-2** mit Aminoglykol-Linker in der Benchmark-Sequenz verwendet.



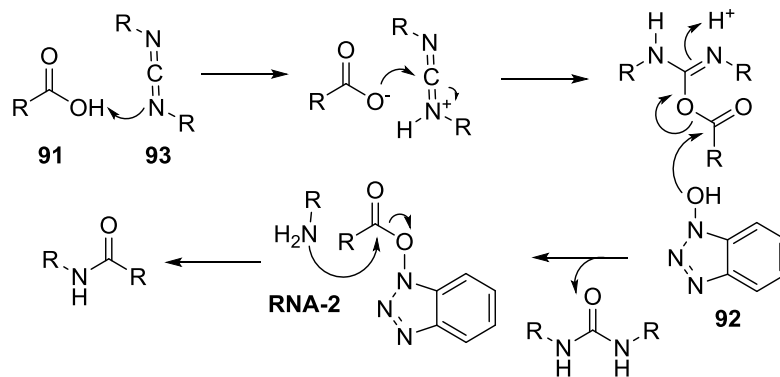
**Abb. 65:** Reaktionsabfolge der TFA-geschützten 2'-OMe-RNA-Stränge. Die TFA-Schutzgruppe wird bei der generellen Entschützung unter *UltraMILD*-Bedingungen abgespalten. Die Spiropyran-Kupplung erfolgt in Lösung, die Bedingungen galt es zu erörtern.

In Kapitel 1.4.1 wurden bereits einige Möglichkeiten für die Kupplung eines Amids mit einer Carbonsäure besprochen. Dabei spielen die Reagenzien für die Aktivierung der Carbonsäure eine große Rolle bzw. ist das Ziel, eine gute Abgangsgruppe einzuführen. Neri und Mitarbeiter veröffentlichten 2016 eine Studie<sup>[216]</sup>, in der sie die Bedingungen für die Kupplung verschiedener Carbonsäuren an freien Aminfunktionen am terminalen Ende eines DNA-8mers untersuchten. Dabei wurde die Carbonsäure wie auch das Kupplungsreagenz variiert. Aus einer Vielzahl an gängigen Reagenzien und Bedingungen hat sich dabei eine Kombination als besonders erfolgreich für die Amidbindung an DNA erwiesen. Es handelt sich um eine klassische Kombination aus HOBt und EDC unter basischen Bedingungen. Für eine 500 pmol Testreaktion von PyBIPS **91** mit **RNA-2** wurden die Bedingungen, wie in Abb. 66 dargestellt, gewählt.



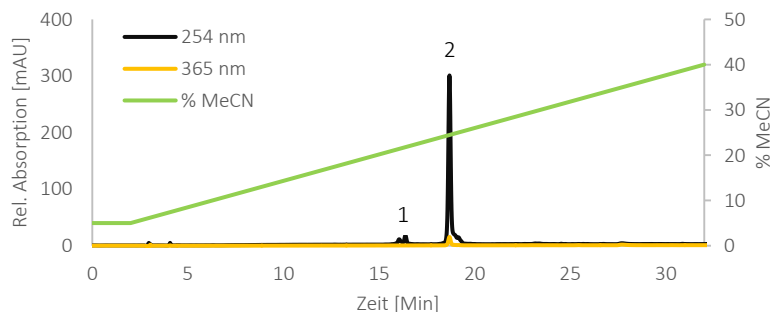
**Abb. 66:** Übersicht der Reagenzien, die für die Kupplung von PyBIPS **91** an die Aminfunktion des nicht-nukleosidischen Linkers in RNA verwendet wurden.

**RNA-2** wurde in MOPS-Puffer vorgelegt, während PyBIPS **91** mit HOBT, EDC und DIPEA präaktiviert wurde (für Details siehe Kapitel 5.3.1). Dabei wurde die Carbonsäure **91** zunächst aktiviert durch Bindung an das Carbodiimid EDC **93**. Im nächsten Schritt erfolgt ein Austausch der Abgangsgruppe durch Angriff von HOBT **92** unter Abspaltung des Harnstoffderivats (vgl. Mechanismus Abb. 67). Die aktivierte Carbonsäure wurde anschließend zu **RNA-2** gegeben und über Nacht bei starkem Schütteln inkubiert zur Kupplung der zwei Komponenten.



**Abb. 67:** Mechanismus der Aktivierung einer Carbonsäure. Im ersten Schritt greift die Hydroxygruppe EDC an. Im zweiten Schritt erfolgt ein Angriff von HOBT unter Abspaltung eines Harnstoffderivats. Im letzten Schritt kann das Amin an den Carbonylkohlenstoff angreifen unter Ausbildung der Amidbindung.

Nach Beendigung der Reaktion sollte **RNA-2** durch EtOH-Fällung nach Li *et al.*<sup>[216]</sup> isoliert werden. Dabei konnte jedoch nur eine kleine Menge des Strangs isoliert werden. Aus diesem Grund wurde auf eine Größenausschlusschromatographie über eine NAP-Säule zurückgegriffen, um die Reagenzien, die im Überschuss vorliegen von **RNA-2** abzutrennen. Oligonukleotidhaltige Fraktionen wurden anschließend per RP-HPLC analysiert (Abb. 68). Die Ausbeute der Reaktion konnte durch Integration der Signale auf 96% bestimmt werden. Eine erfolgreiche Herstellung des gewünschten Produkts wurde massenspektrometrisch bestätigt.



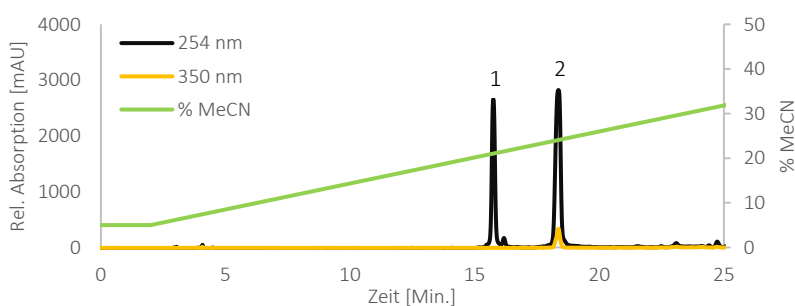
**Abb. 68:** RP-HPLC-Chromatogramm der Markierungsreaktion von **RNA-2** mit PyBIPS **91** (0,1 M TEAA; MeCN). 1-Eduktreste ohne PyBIPS. 2 Produktsignal zu erkennen an Absorption von PyBIPS bei 350 nm.

Im Anschluss folgte eine Vergrößerung des Reaktionsansatzes auf 10 nmol. Um Reagenzien zu sparen, wurden die Verhältnisse der einzelnen Komponenten beibehalten, aber die Äquivalente reduziert. Um dies zu kompensieren, wurden eine verlängerte Inkubationszeit sowie eine zweite Zugabe der Reagenzien erfolgreich getestet. Auf eine Erhöhung der Temperatur wurde verzichtet, um eine Hydrolyse von PyBIPS zu verhindern. Es wurde beobachtet, dass PyBIPS unter den basischen Bedingungen zum Teil in der MC-Form vorliegt, was an der dunkelroten Farbe des Reaktionsansatzes zu erkennen ist. In dieser Form ist es besonders anfällig für Hydrolyse durch Retro-Aldolreaktion.

**RNA-3-5** konnten ebenfalls erfolgreich über die vorgestellte Methode mit PyBIPS verknüpft werden. Eine Zusammenfassung aller hergestellten Stränge ist in Tabelle 3 zu sehen. Jedoch ist zu bemerken, dass im Fall von **RNA-4** und **-5** keine so hohen Ausbeuten wie von **RNA-2** und **-3**, erzielt werden konnten. Im RP-HPLC-Chromatogramm ist zu erkennen, dass nur ca 65% Produktstrang (2) und 35% unmarkierter Strang (1) entstanden sind (siehe Abb. 69). Dies lässt sich auf die Zugänglichkeit der Aminofunktion zurückführen. Der Aminoglykol-Linker hat ein primäres Amin, welches mit wenig sterischen Anspruch mit dem Spiropyran reagieren kann. Die Linker mit sekundärem Amin, *D*-Threoninol und Serinol, sind dagegen schlechter zugänglich in der Umgebung des Oligonukleotids.

**Tabelle 3:** Übersicht der verschiedenen, hergestellten 2'-OMe-RNA mit PyBIPS. X<sup>PY</sup> beschreibt PyBIPS gebunden an den nicht-nukleosidischen Linker.

Bezeichnung vor Kupplung	Bezeichnung nach Kupplung	Linker	Sequenz	Ausbeute
RNA-2	RNA-6	Aminoglykol	5'-GCA UAA AX <sup>PY</sup> A AAG GUG-3'	96%
RNA-3	RNA-7	Aminoglykol	5'-GCA UAU AX <sup>PY</sup> U AAG GUG-3'	75%
RNA-4	RNA-8	<i>D</i> -Threoninol	5'-GCA UAU AX <sup>PY</sup> U AAG GUG-3'	60%
RNA-5	RNA-9	Serinol	5'-GCA UAU AX <sup>PY</sup> U AAG GUG-3'	65%

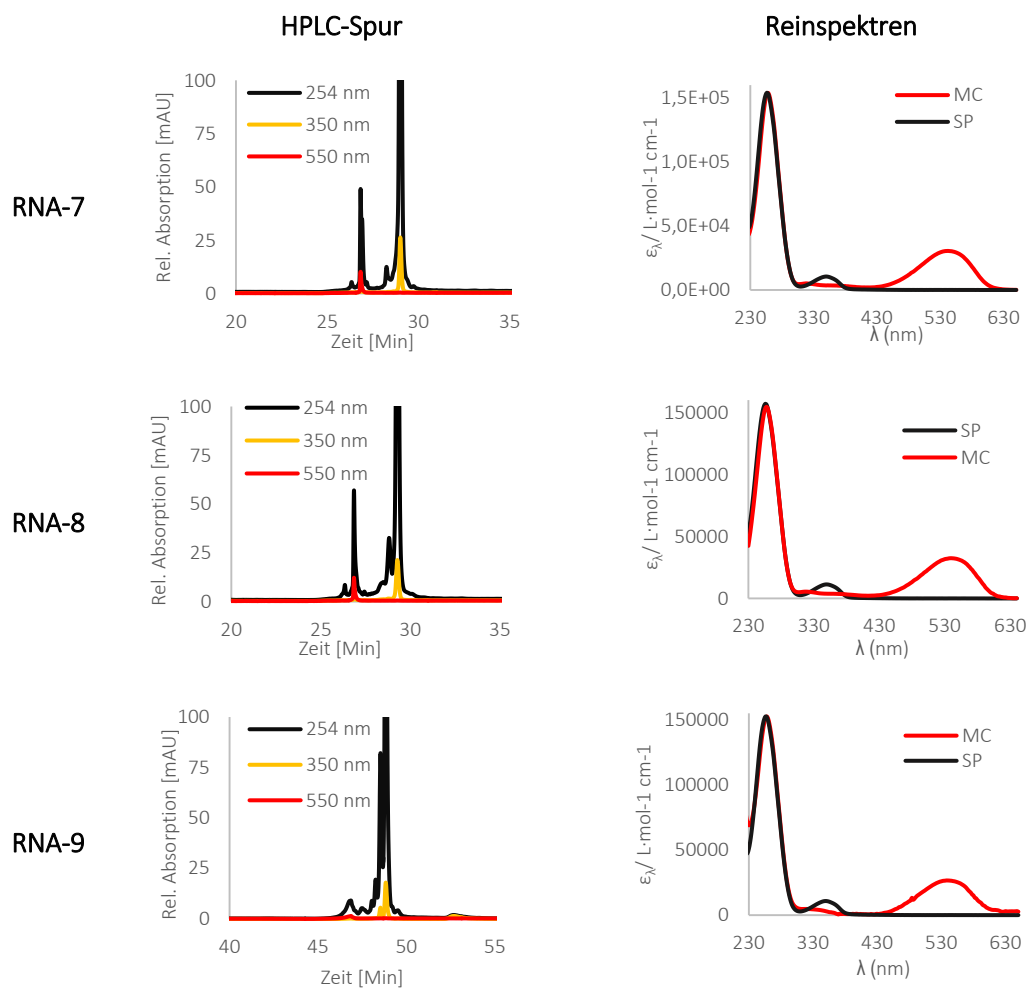


**Abb. 69:** RP-HPLC-Chromatogramm der Markierungsreaktion von **RNA-5** mit PyBIPS **91** (0,1 M TEAA: MeCN). 1 - Eduktreste ohne PyBIPS. 2 - Produktsignal zu erkennen an Absorption von PyBIPS bei 350 nm.

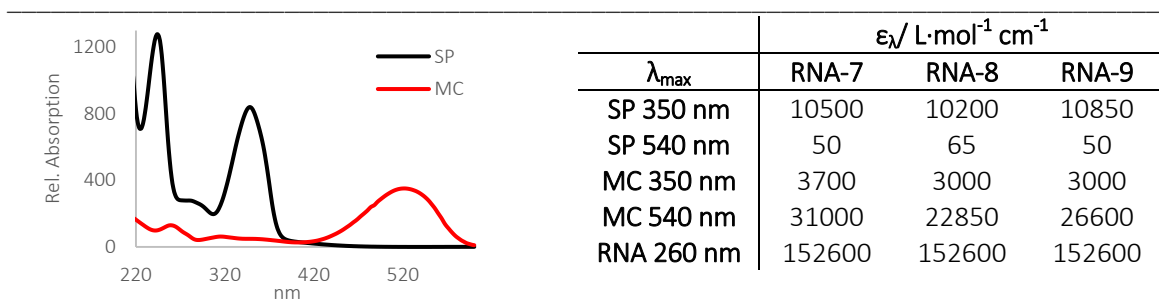
## 2.2.6 Photochemische Charakterisierung von PyBIPS in 2'-OMe-RNA

## (1) Charakterisierung der Einzelstränge

Nach erfolgreicher Darstellung der Zielstränge **RNA-6-9** musste als erstes untersucht werden, wie sich das Spiropyran photochemisch in der Umgebung des Oligonukleotids verhält. PyBIPS liegt auch gebunden an RNA zu 100% in der SP-Form vor mit einem Absorptionsmaximum bei 350 nm. Durch Bestrahlung in das Absorptionsmaximum lässt sich die SP-Form zum Teil in die MC-Form isomerisieren. Reinspektren von beiden Isomeren an 2'-OMe-RNA konnten durch Trennung per RP-HPLC nach Belichtung erhalten werden (siehe Abb. 70). Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  konnte dann über den bekannten  $\epsilon$  der RNA bei 260 nm berechnet werden. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Reinspektren von Spiropyran, gebunden an verschiedene Linker in RNA, festgestellt. Im Vergleich zu ungebundenem Spiropyran (siehe Abb. 71) ist eine bathochrome Verschiebung des Maximums der MC-Form von 20 nm (530  $\rightarrow$  550 nm) zu erkennen.

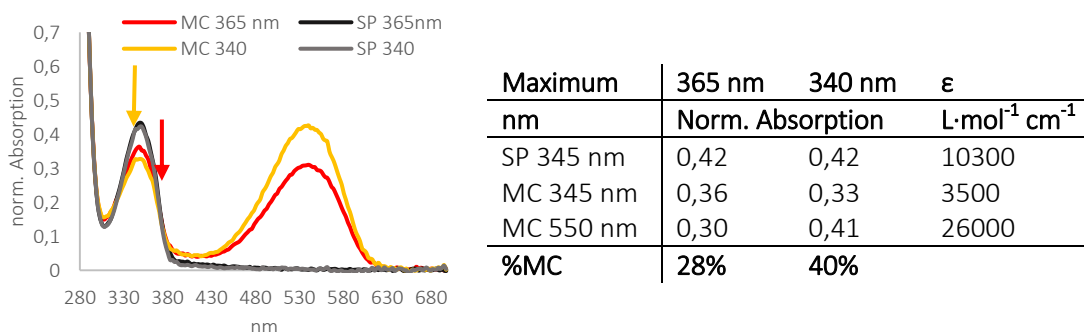


**Abb. 70:** Reinspektren von **RNA-3-5** erhalten durch Trennung der Isomere per RP-HPLC, Chromolith C<sub>18</sub> 100x4,5 mm, isokratisch 85:15 – 0,1M TEAA:MeCN nach Belichtung 10 min., 365 nm, 500 mA, 500 pmol RNA. Links HPLC-Signale; rechts Reinspektren mit Extinktionskoeffizienten.



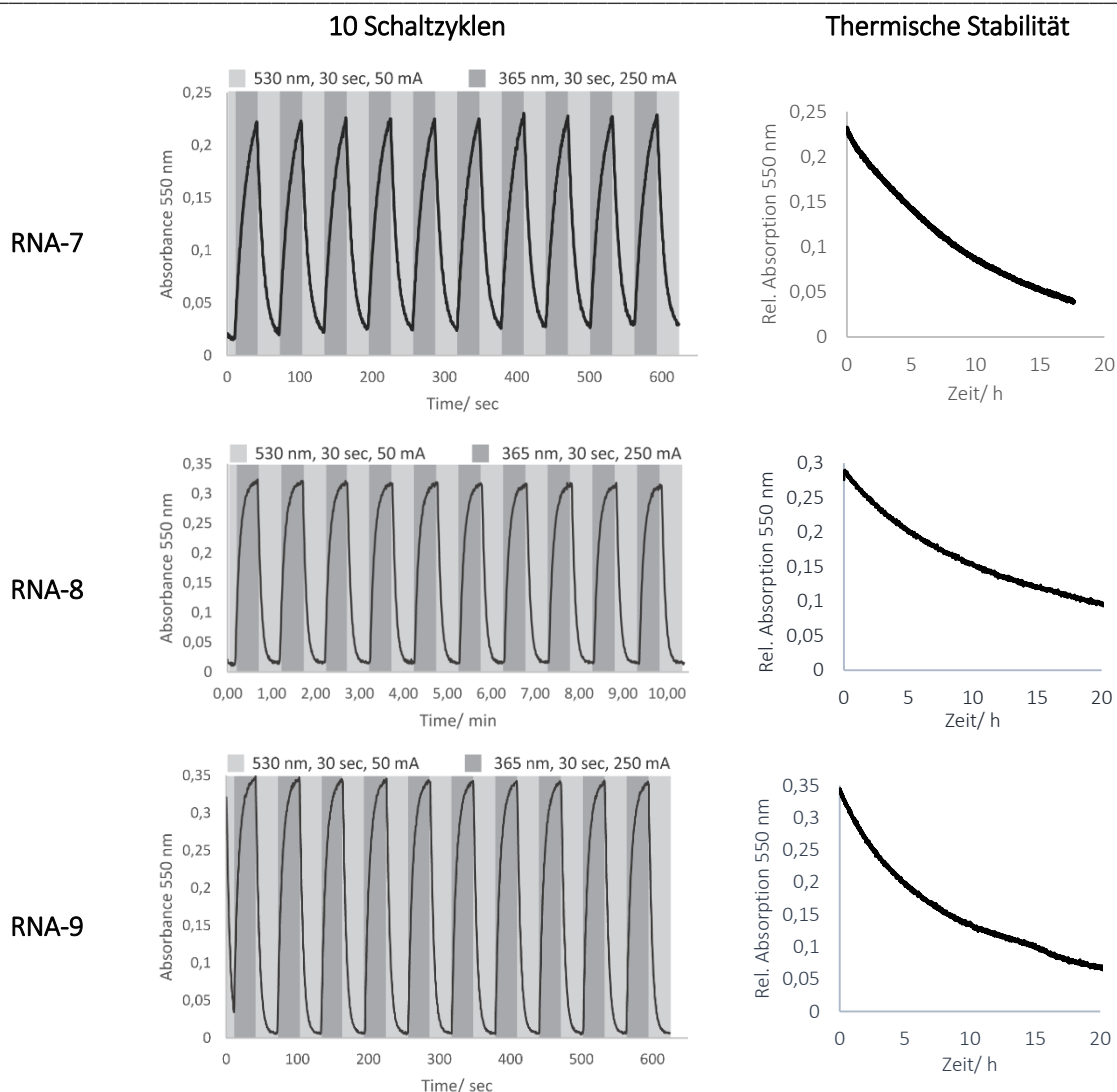
**Abb. 71:** Reinspektren von Verbindung **91**. Detektion und Trennung erfolgten über RP-HPLC in 10:90 – MeCN:0,1 M TEAA. Rechts- Zusammenfassung der Extinktionskoeffizienzen der signifikanten Absorptionsmaxima von **RNA7-9**.

Während die SP-Form keine Absorption im Bereich der MC-Bande zeigt, absorbiert die MC-Form zu einem kleinen Teil auch in der SP-Bande. Zur Belichtung des SP-Maximums stehen zwei LEDs (365 nm und 340 nm) zur Verfügung. Die Menge an MC-Isomer, die generiert werden kann, hängt stark von der Wellenlänge der Belichtung ab. In Abb. 72 ist zu erkennen, dass die Menge an MC durch Bestrahlung bei 340 nm (40%) deutlich über der bei 365 nm (28%) liegt. Dies lässt sich damit erklären, dass 340 nm in das Maximum strahlt und 365 nm nur in Flanke, während die MC-Absorption in diesem Bereich an beiden Punkten gleich ist.



**Abb. 72:** UV/Vis-Absorptionsspektren am Beispiel von **RNA-5** in 1xPBS-Puffer. Ohne Lichteinwirkung liegt PyBIPS zu 100% in SP-Form vor. Durch Belichtung bei 365 nm (rot) oder 340 nm (orange) lassen sich eine unterschiedliche Menge MC generieren – siehe Tabelle rechts.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich der Photoschalter über mehrere Schaltzyklen verhält. Die Einzelstränge wurden 10-mal abwechselnd mit 365 und 530 nm belichtet und die Absorption bei 550 nm beobachtet. Die charakteristische MC-Bande (550 nm) ist ein Maß für die Menge an MC, die gebildet werden kann. Da die Bande bei mehrfachem Hin- und Herschalten konstant bleibt, ist eine Photolyse unwahrscheinlich. In Abb. 73 sind Schaltzyklen sowie die thermische Relaxation gezeigt, d.h. die Zeit, bis die generierte Menge MC-Form ohne Lichteinwirkung wieder in die SP-Form zurück isomerisiert ist. Die Rückisomerisierung wird durch erhöhte Temperatur beschleunigt. Im Vergleich zu ungebundenem PyBIPS **91** ist eine erhöhte Photolysestabilität zu erkennen.<sup>[22]</sup>



**Abb. 73:** Photoschemische Charakterisierung von **RNA-7-9**. Es wurden 10 Schaltzyklen durch abwechselnde Belichtung bei 530 und 365 nm aufgenommen unter Betrachtung der Absorption bei 550 nm. Außerdem wurde die thermische Relaxation der MC-Bande ohne Lichteinwirkung detektiert.

Zuletzt wurde die Quantenausbeute der Isomerisierungsreaktion analysiert. Klassisch wird die Quantenausbeute über die Ferrioxalatmethode<sup>[217]</sup> mit Belichtung und anschließender Quantifizierung über RP-HPLC bestimmt. Da die MC-Form nicht stabil ist und über die Zeit in die SP-Form rückisomerisiert, konnte diese Methode nicht eingesetzt werden. Alternativ dazu wurde von Prof. Dr. Alexander Heckel das *LabVIEW*<sup>®</sup>-basiertes Computerprogramm *PHITS (Photoswitch Irradiator Test Suite)* entwickelt, mit dem die Quantenausbeute bei bekannter Photonenzahl über die Änderung der Absorption in Korrelation zur Konzentration berechnet werden kann (Details siehe Kapitel 5.3.2). Zur Berechnung der Konzentration der einzelnen Spezies (SP oder MC) aus einem Mischspektrum, wurden die Reinspektren (siehe Abb. 70) benötigt. Die Anzahl der Photonen, die von den verwendeten Lichtquelle (LED, 340 und 530 nm) abgegen werden, wurden mit einer Photodiode gemessen (340 nm = 0,1415 nmol/s; 530 nm = 1,22417 nmol/s). Es wurden



mehrere Schaltzyklen des Spiropyrans in RNA gemessen. Nach Dekonvolution der Mischspektren unter Erhalt der jeweiligen Konzentrationen wurde anschließend die Ableitung über die Zeit (dA/dt) gebildet. Danach wurde eine Differentialgleichung an die Ableitungskurve angepasst unter Berücksichtigung der bekannten Werte Photonenfluss,  $\epsilon$ , Schichtdicke (0,3 cm) und Probenvolumen, woraus sich die Quantenausbeute als Optimierungsfaktor ergab. Die Ergebnisse der Berechnungen über PHITS sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4:** Übersicht der berechneten Quantenausbeuten und zugehörigen Extinktionskoeffizienten bei 340 und 530 nm.  
\* Es konnte kein realistischer Wert über die verwendete Methode anhand der gemessenen Daten erhalten werden.

	$\epsilon_{340 \text{ nm, SP}}$	$\Phi_{340 \text{ nm, SP}}$	$\epsilon_{340 \text{ nm, MC}}$	$\Phi_{340 \text{ nm, MC}}$	$\epsilon_{530 \text{ nm, MC}}$	$\Phi_{530 \text{ nm, MC}}$
	$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	%	$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	%	$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	%
<b>RNA-7</b>	9964	2,2	3917	17,9	30876	8,5
<b>RNA-8</b>	10059	3,7	3387	*	31710	14,4
<b>RNA-9</b>	10671	2,8	3387	14,8	25962	15,0

Aus den erhaltenen Quantenausbeuten lässt sich der photostationäre Zustand (PSS) über folgenden Gleichung berechnen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

$$PSS = \frac{\phi_{SP}\epsilon_{SP}}{\phi_{MC}\epsilon_{MC}}$$

**Tabelle 5:** Photostationärer Zustand berechnet anhand der erhaltenen Quantenausbeuten.

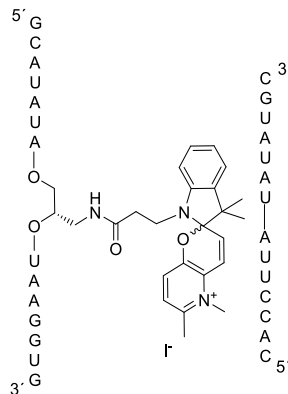
	$PSS_{340 \text{ nm}} (\%SP)$
<b>RNA-7</b>	69%
<b>RNA-8</b>	-
<b>RNA-9</b>	60%

Aus der photochemischen Analyse lassen sich folgende Schlüsse bezüglich der Eigenschaften der Photoisomere Spiropyran und Merocyanin gebunden an RNA ziehen: PyBIPS liegt bevorzugt in der SP-Form vor und lässt sich durch Belichtung in die MC-Form überführen, die in der Regel über Stunden bei Raumtemperatur wieder zurück isomerisiert. Anders als im ungebundenen Zustand<sup>[27]</sup> ist eine Isomerisierung über mehrere Zyklen ohne Ausbleichen möglich. Die charakteristische Merocyanin-Bande ist im Vergleich um 20 nm rotverschoben. Bei Betrachtung der Isomerisierungseffizienz wird klar, dass aufgrund der schlechten Quantenausbeute der SP-Form, zusammen mit der geringen Absorption der MC-Form bei 340 nm, nur maximal 40% der MC-Form generiert werden können. Auch wenn die Menge für eine Anwendung gering erscheint, ist sie im Vergleich zu in der Literatur präsentierten, ungebundenen PyBIPS-Derivaten größer.<sup>[22,27]</sup> Auch die

gemessenen Quantenausbeuten sind in der Umgebung der RNA höher. In der Einzelstranganalyse wurde kein Unterschied zwischen den Spiropyranen an verschiedenen Linkern festgestellt.

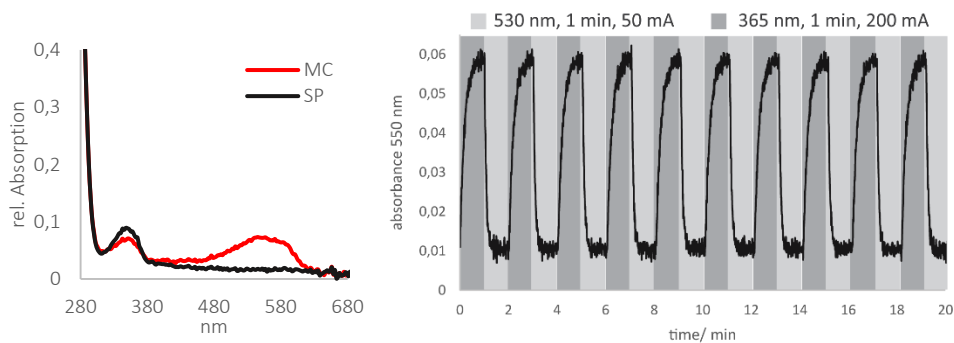
(2) Charakterisierung der Doppelstränge im *Wedge* Motiv

Da das kovalent gebundene PyBIPS im Doppelstrang verwendet werden soll, wurden auch die spektroskopischen Eigenschaften des Doppelstrangs analysiert. In der Literatur gibt es keine Angaben zu einem kovalent an ein Oligonukleotid gebundenem Spiropyran, das in einem Doppelstrang untersucht wurde. Wie in Kapitel 2.2.1 vorgestellt, soll der Photoschalter in einem *Wedge* Motiv untersucht werden (siehe Abb. 74 am Beispiel von **RNA-7**). Hier wurden ebenfalls **RNA-7-9** mit dem passenden Gegenstrang **RNA-10** (5'-CAC CUU AU AUA UGC - 3') verwendet.



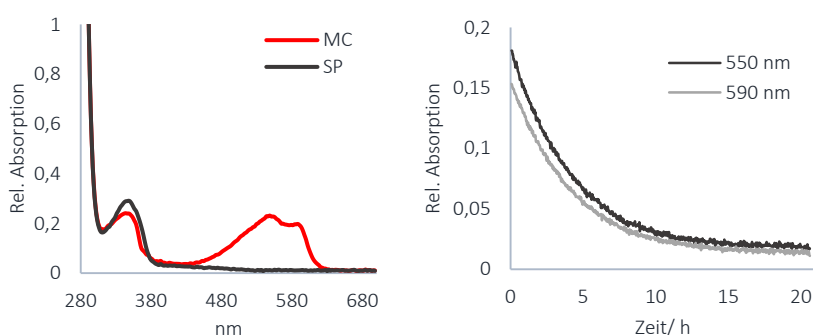
**Abb. 74:** *Wedge* Motiv am Beispiel von **RNA-7** und **RNA-10**. Der Gegenstrang besitzt gegenüber dem Photoschalter keine Base und hat deshalb ein Nukleotid weniger.

Von **RNA-7/10** (vgl. Abb. 74) wurde ein UV/Vis-Absorptionsspektrum gemessen. Dabei wurde keine Veränderung zum Spektrum des Einzelstrangs (**RNA-7**) festgestellt. Wie schon im Einzelstrang zeigt PyBIPS über 10 Schaltzyklen keine Ermüdung.



**Abb. 75:** Spektroskopische Analyse von Duplex **RNA-7/10**. Links – Absorptionsspektrum der SP-Form (schwarz) und MC-Form (rot) nach Belichten mit 365 nm, 200 mA, 2 min., 50  $\mu$ M. rechts – Isomerisierung über 10 Zyklen unter Betrachtung der MC-Bande (550 nm, 50  $\mu$ M).

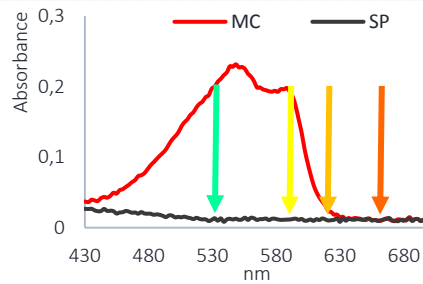
Im Fall des Duplex von **RNA-8/10** (*D*-Threoninol) wurde nach Belichtung der SP-Form ein zweites, bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum der MC-Form bei ca. 590 nm beobachtet (siehe Abb. 76). Beide Maxima zeigen die gleiche thermische Relaxationsrate und sind nach 20 h noch nicht vollständig rückisomerisiert. Es wird vermutet, dass ein Isomer der MC-Form vom Duplex stabilisiert wird, das unter anderen Bedingungen nicht stabil ist. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke kann ausgeschlossen werden, da eine Protonierung von SP- und MC-Form zu einer Blauverschiebung führt (vgl. Kapitel 1.2.2). Das neue rotverschobene Absorptionsmaximum korreliert mit dem von Brixner<sup>[19]</sup> beschriebenen Verhalten des instabilen TTT-Isomers, welches sie durch ultrakurzzeit-spektroskopische Untersuchungen von NitroBIPS-Derivaten in organischem Lösungsmittel charakterisiert haben.



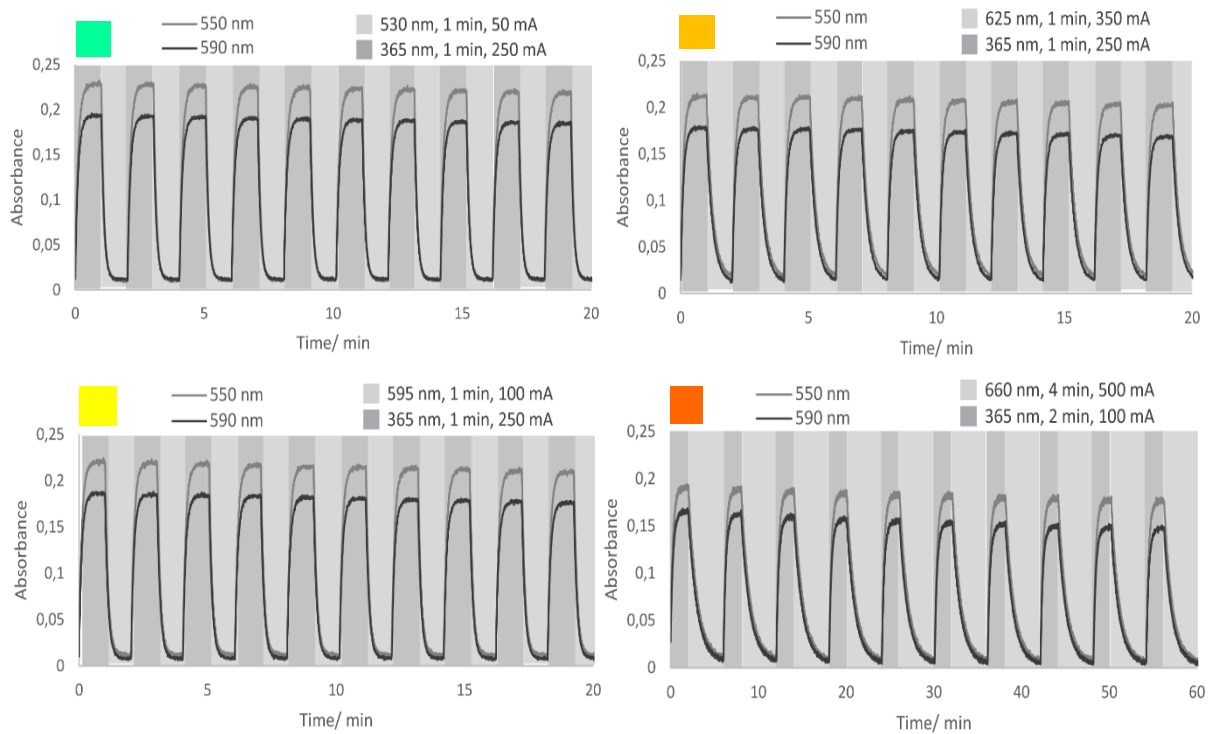
**Abb. 76:** Spektroskopische Untersuchung von **RNA-8/10** (125  $\mu$ M in 1xPBS). Die Stränge wurden zusammen für 3 min. auf 90 °C zur Hybridisierung erhitzt. Linke Seite – Absorptionsspektrum der SP-Form (schwarz) und MC-Form (rot) nach Belichtung 340 nm, 700 mA, 50 mW, 15 min. Rechte Seite – Thermische Relaxation der MC-Bande 550 und 590 nm nach Belichtung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW, 15 min.

Zur genaueren Untersuchung des doppelten Absorptionsmaximums wurden Schaltzyklen mit Belichtung der MC-Bande an verschiedenen Stellen durchgeführt. Dazu wurden die im Arbeitskreis Heckel vorhandenen LEDs mit 530, 595, 625 und 660 nm verwendet (vgl. Abb. 77). In Abb. 78 ist zu erkennen, dass sich mit allen LEDs das Spiropyran im 2'-OMe-RNA-Duplex reversibel über 10 Zyklen schalten lässt, ohne dass ein signifikantes Ausbleichen zu erkennen ist. Bei Belichtung mit 530 nm und 595 nm in die Maxima ist eine schnelle, vergleichbare Isomerisierung zu sehen. Auch dieses Verhalten passt zu der Literatur von Brixner, die besagt, dass ein Ringschluss über beide Absorptionsmaxima initiiert werden kann.<sup>[19]</sup> Bei Belichtung in die Flanke (625 nm und 660 nm) müssen mehr Photonen aufgewendet werden für eine Rückisomerisierung aufgrund des geringeren Extinktionskoeffizienten. Bemerkenswert ist dabei, dass sich PyBIPS über 600 nm isomerisieren lässt und damit im therapeutischen Fenster<sup>[5]</sup> für potentielle biologische Anwendungen liegt.

## 2 - Postsynthetische Markierung von RNA mit Spiropyranen

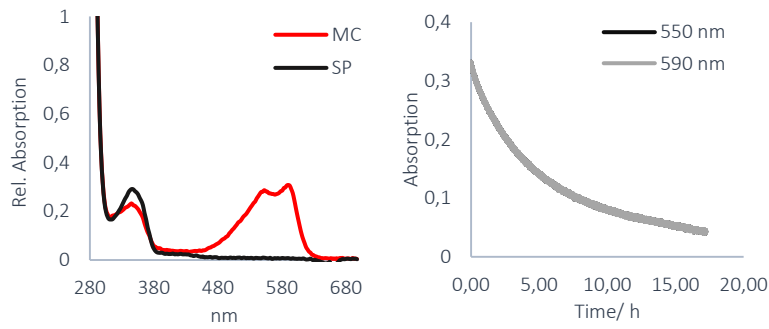


**Abb. 77:** Vergrößerung des Doppel-Absorptionsmaximums von PyBIPS in **RNA-8/10**. Mit den Pfeilen sind die Wellenlängen der jeweiligen Farbe der LED gezeigt, die zur Isomerisierung verwendet wurden (grün – 530 nm, gelb – 595 nm, gelb-orange – 625 nm und orange – 660 nm).



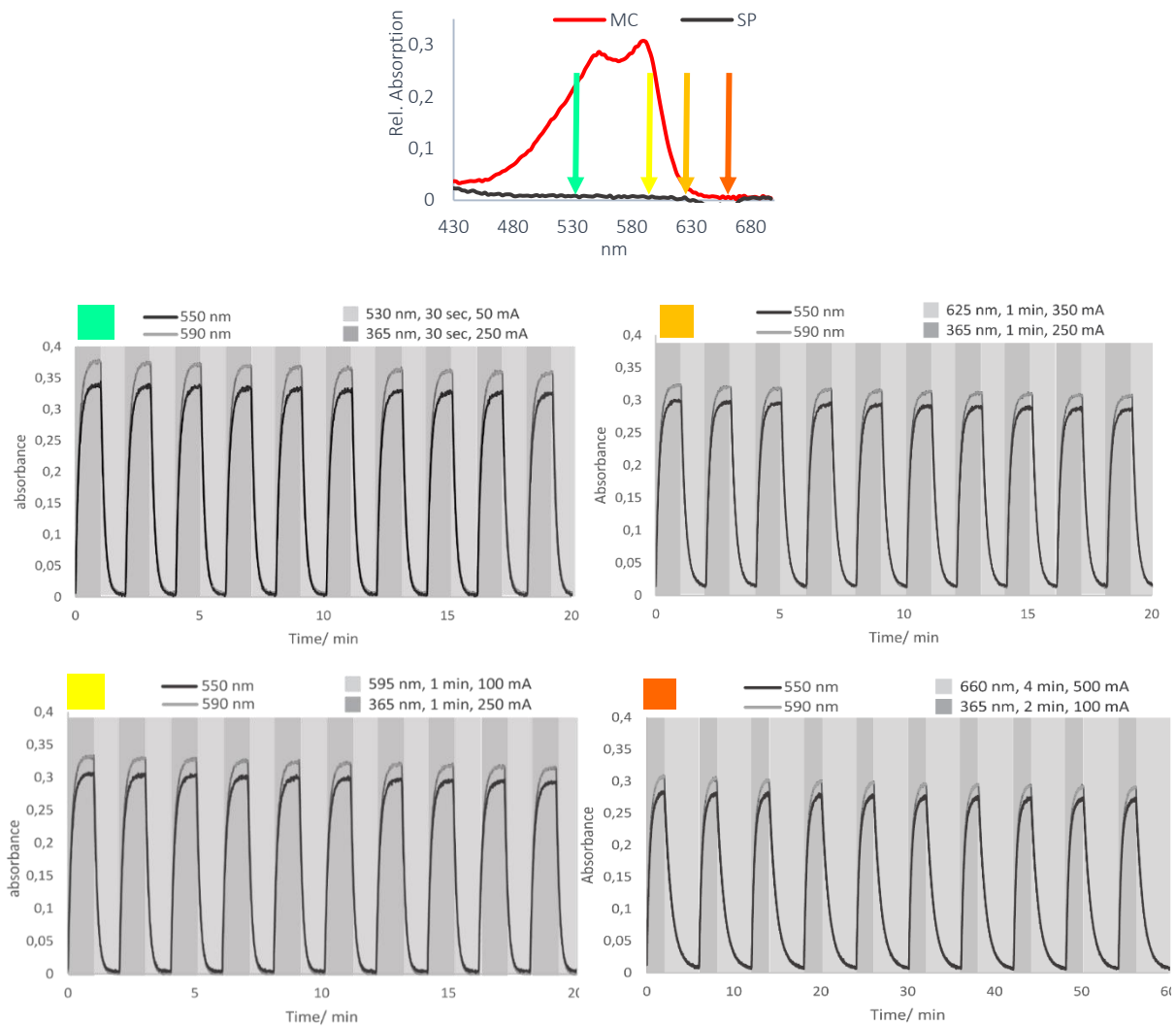
**Abb. 78:** Spektroskopische Untersuchung von **RNA-8/10** (125  $\mu$ M in PBS). Schaltzyklen der einzelnen Kombinationen durch Belichtung mit 365 nm und 530, 595, 625 und 660 nm im Wechsel.

Duplex **RNA-9/10** mit Serinol-Linker zeigt das gleiche Verhalten wie **RNA-8/10**, nur ist das zweite, rot-verschobene Maximum der MC-Form noch ausgeprägter und im Vergleich zum charakteristischen Maximum der MC-Form noch höher. Dies deutet auf eine größere Stabilisierung des Isomers im Doppelstrang hin. Das Doppelmaximum zeigt wie zuvor die gleiche Stabilität in der thermischen Relaxation (siehe Abb. 79).



**Abb. 79:** Spektroskopische Untersuchung von **RNA-9/10** (150  $\mu\text{M}$  in PBS). Die Stränge wurden zusammen für 3 min auf 90  $^{\circ}\text{C}$  zur Hybridisierung erhitzt. Linke Seite – Absorptionsspektrum der SP-Form (schwarz) und MC-Form (rot) nach Belichtung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW, 15 min. Rechte Seite – Thermische Relaxation der MC-Bande 550 und 590 nm nach Belichtung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW, 15 min.

Es wurden wieder 10 Schaltzyklen mit den vorhandenen LEDs gemessen. Dabei ist in Abb. 80 ein vergleichbares Verhalten von PyBIPS wie in Abb. 78 zu sehen.



**Abb. 80:** Spektroskopische Untersuchung von **RNA-9/10** (150  $\mu\text{M}$  in 1xPBS). Oben – Darstellung der Einstrahlung der einzelnen LEDs in das Doppelmaximum. Unten – Schaltzyklen der einzelnen Kombinationen aus 365 nm mit 530, 595, 625 und 660 nm.

Im Gegensatz zu den photochemischen Eigenschaften der Einzelstränge zeigten sich in der Untersuchung der Duplexe einige Unterschiede. Ein zweites rotverschobenes Absorptionsmaximum deutet auf eine weitere MC-Spezies hin, die von den Linkern unterschiedlich stabilisiert wird. Da es in der Literatur keine Beispiele gibt, die Orientierung bieten, soll das Verhalten in Bezug auf die Umgebung im Doppelstrang genauer untersucht werden.

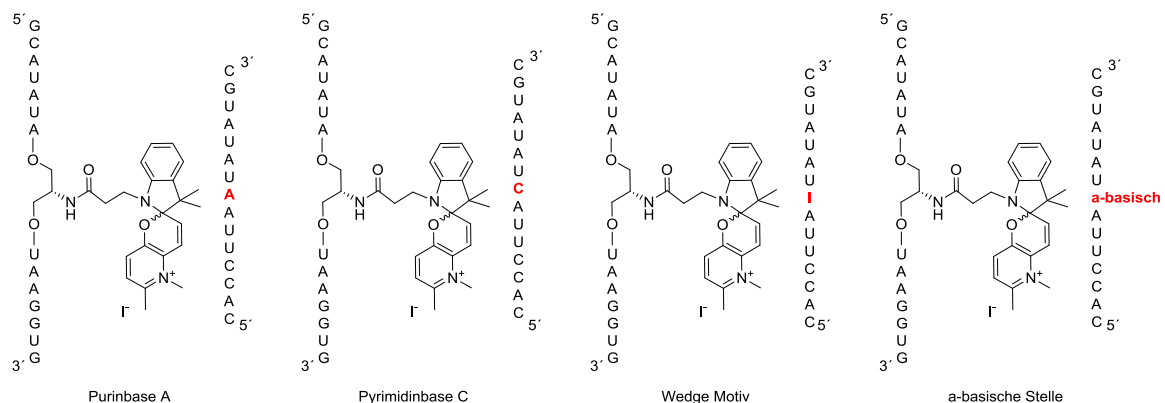
(3) Vergleich von Doppelstrangmotiven

Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens des Spiropyrans im *Wedge* Motiv, gebunden an verschiedene Linker im Rückgrat, wurde der Gegenstrang variiert, um den Einfluss auf das Absorptionsverhalten zu verstehen. Dazu wurden 2'-OMe-RNA-Gegenstränge bei der Fa. *Biomers* käuflich erworben (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Gegenstränge mit verschiedenen Nukleotiden gegenüber PyBIPS.

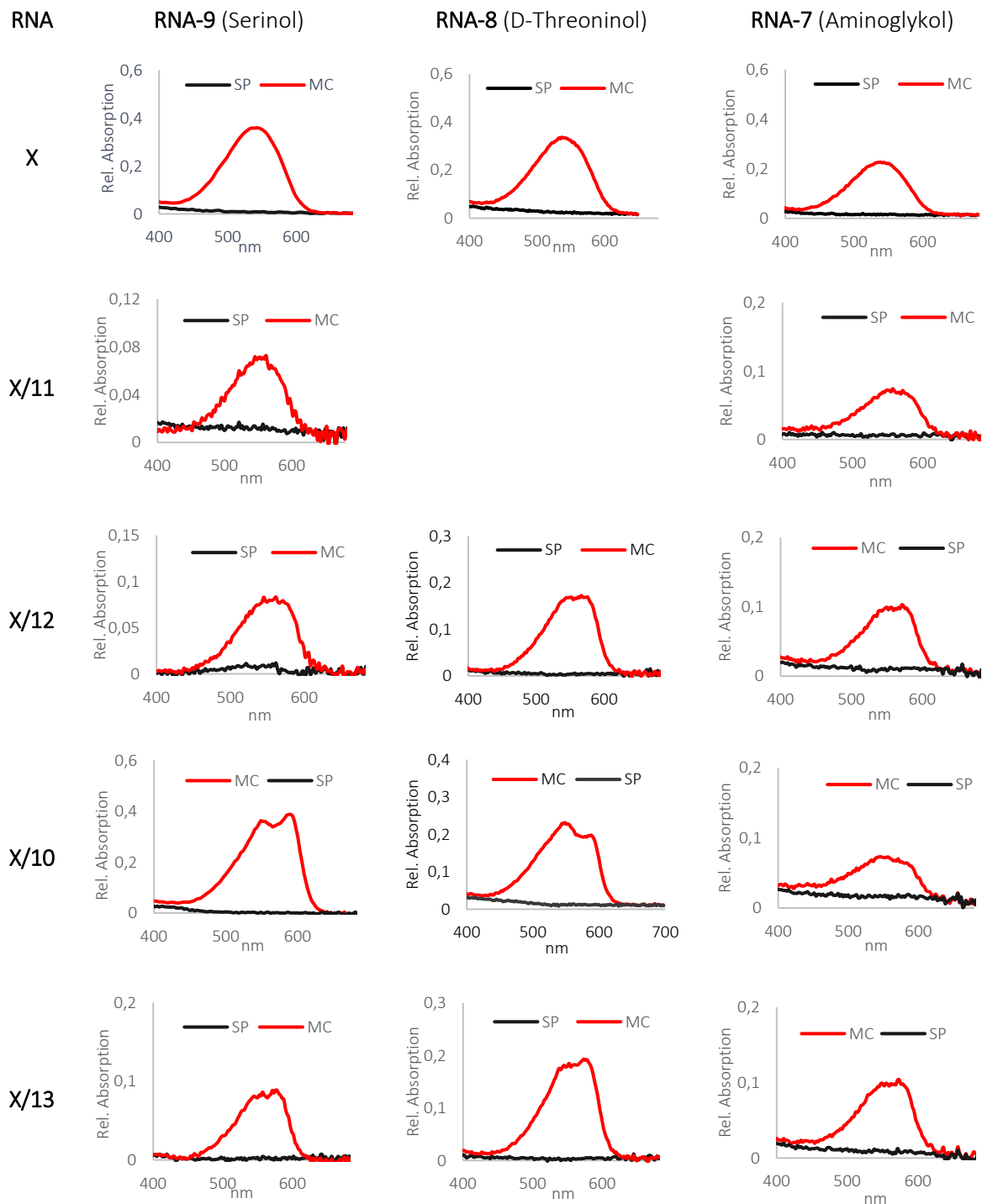
Bezeichnung	Sequenz
RNA-11	5'- CAC CUU AAU AUA UGC-3'
RNA-12	5'- CAC CUU ACU AUA UGC -3'
RNA-13	5'- CAC CUU Aa-basischU AUA UGC -3'

Die Auswahl des Partners, der gegenüber dem Spiropyran im Gegenstrang platziert wird, erfolgte anhand der Größe. Die Purinbase Adenosin (A) benötigt den meisten Platz im Basenstapel gefolgt von der Pyrimidinbase Cytidin (C). Das zuvor untersuchte *Wedge* Motiv ohne gegenüberliegenden Zuckerbaustein bietet weniger Platz als eine a-basische Stelle. Die vier untersuchten Motive sind in Abb. 81 nach dem Platz im Basenstapel von links nach rechts gezeigt am Beispiel von **RNA-9**.



**Abb. 81:** Übersicht der verschiedenen Gegenstränge am Beispiel der Duplexbildung mit **RNA-9**. Der räumliche Anspruch der gegenüberliegenden Base des Spiropyrans sinkt von links nach rechts. Purinbase A, Pyrimidinbase C, *Wedge* Motiv, a-basische Stelle.

RNA-7-9 wurde mit den verschiedenen Gegensträngen wie zuvor hybridisiert (3 min, 90 °C) und anschließend je ein UV/Vis-Absorptionsspektrum beider Photoisomere gemessen. In Abb. 82 sind alle Duplexe im Vergleich zu sehen.



**Abb. 82:** Absorptionsspektren der SP- und MC-Form von RNA-7-9 (X = Einzelstrang) mit verschiedenen Gegensträngen (RNA-10-13) im Duplex in der SP- (schwarz) und MC-Form (rot) nach Belichtung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW, 10 min.

Für alle drei RNA-Stränge mit Spiropyran in einem Duplex-Motiv ist ein klarer Trend zu erkennen. Mit zunehmendem Platz im Basenstapel wird das zweite, rotverschobene Absorptionsmaximum

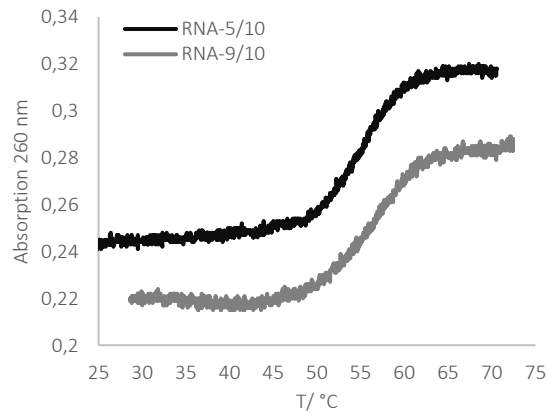
stärker ausgebildet, d.h. ein zweites Isomer stabilisiert. Dies lässt sich schon im Duplex mit einer Pyrimidinbase erkennen. Während im Fall von **RNA-9** eine Zunahme des zweiten Maximums mit zunehmendem Raum im Duplex stattfindet, ist im Fall von **RNA-7** und **-8** zu erkennen, dass das Maximum im *Wedge* Motiv schwächer ist. Die stärkste Ausprägung des rot-verschobenen Maximums findet gegenüber einer a-basischen Stelle statt, die am meisten Platz bietet. Das beobachtete Verhalten zeigt, dass die Ausrichtung des Photoschalters, die vom eingebauten Linker in das Rückgrat bestimmt wird, zusammen mit der Geometrie durch die Konstitution des Gegenstrangs ausschlaggebend ist für die vermutete Bildung des TTT-Isomers. Gleichzeitig würde die Stabilisierung belegen, dass eine Interaktion zwischen Spiropyran und RNA stattfindet. Serinol ist im Vergleich zu *D*-Threoninol flexibler und kann sich dadurch besser anpassen, was schon in Studien zu reinen nicht-nukleosidischen Duplexen festgestellt wurde.<sup>[201]</sup> Das *Wedge* Motiv bietet diagonal in Richtung Phosphatrückgrat des Gegenstrangs Raum, aber nicht in der Höhe. Im Gegensatz dazu ist durch eine zusätzliche Ribose mehr Raum in der Höhe da, der selbst durch die Anwesenheit von Cytidin vom Spiropyran gefüllt wird. Es scheint, dass die Höhe des Raums der von den benachbarten Basen aufgespannt wird, wichtiger für die Stabilisierung ist, als die Tiefe, die in Richtung des Gegenstrangs entsteht.

### 2.2.7 Quantifizierung des Einfluss von PyBIPS auf die Stabilität des Duplex

#### (1) Schmelzpunktstudien

Nach einer ausführlichen Charakterisierung der spektroskopischen Eigenschaften von PyBIPS in einem RNA-Duplex, musste untersucht werden, ob der Photoschalter einen Einfluss auf die Stabilität des Duplex ausübt. Aus diesem Grund wurden Schmelzpunktstudien durchgeführt, um zu prüfen, ob die Photoisomere unterschiedlichen Einfluss haben. Es wurden jeweils die nativen Duplexe ohne PyBIPS und die zugehörigen markierten Duplexe gemessen. Dabei ist zu bemerken, dass nur die SP-Form unter den Bedingungen stabil ist. Die Rückisomerisierung der MC-Form in die SP-Form wird mit steigender Temperatur beschleunigt und kann deshalb nicht in einem herkömmlichen Aufbau bestimmt werden kann. Es wurde die Absorption bei 260 nm detektiert und ausgewertet. Aufgrund der Hyperchromizität von doppelsträngigen Oligonukleotiden lässt sich in einer Temperatur-abhängigen Absorptionsmessung der Schmelzpunkt bestimmen. Es wurden jeweils 6 Zyklen gemessen. In Abb. 83 sind beispielhaft die temperaturabhängigen Absorptionskurven von Serinol-**RNA-5** ohne Spiropyran im *Wedge* Motiv und dem markierten Duplex **RNA-9/10** im Vergleich gezeigt. Aufgrund der Vernachlässigung von Spiropyran bei der Berechnung des Extinktionskoeffizienten ist die Konzentration des markierten Duplex niedriger, was in der Absorption zu sehen ist. Der Schmelzpunkt liegt am Wendepunkt, der durch Ableitung der Kurve bestimmt wird.





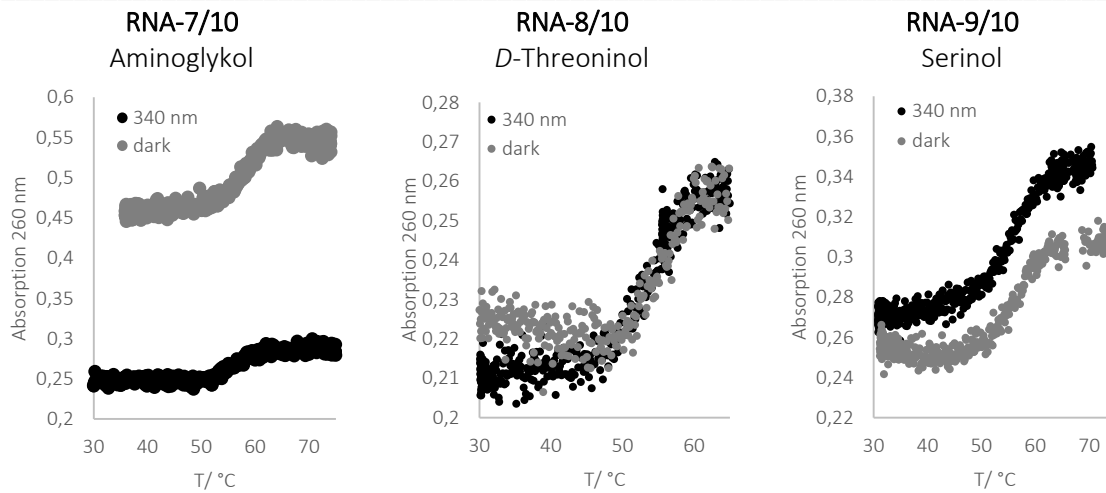
**Abb. 83:** Temperaturabhängige Absorptionskurven von **RNA-5/10** ohne PyBIPS und **RNA 9/10** mit PyBIPS im Vergleich (1  $\mu$ M, 1xPBS).

Die Ergebnisse aller Schmelzpunktmessungen der unmarkierten und markierten Duplexe im *Wedge* Motiv sind in Tabelle 7 dargestellt. Es sind keine Unterschiede zwischen den Duplices mit und ohne Spiropyran zu erkennen, was darauf hindeutet, dass der Photoschalter in der SP-Form keine störende Wirkung auf die Basenpaarung ausübt.

**Tabelle 7:** Vergleich der Schmelzpunkte von markierten (SP-Form) und unmarkierten Duplexen im *Wedge* Motiv.

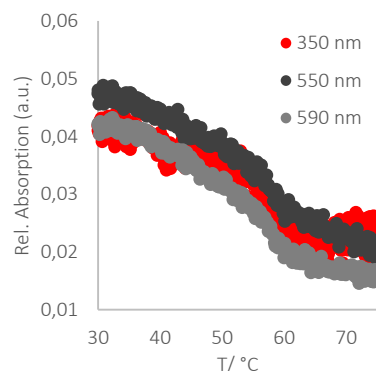
	$T_m$		$T_m$
RNA-4/10	55,0 °C	RNA-8/10	55,5 °C
RNA-5/10	54,9 °C	RNA-9/10	56,0 °C
RNA-3/10	56,5 °C	RNA-7/10	56,3 °C

Um zu überprüfen, ob die MC-Form einen Einfluss auf die Stabilität des Duplex ausübt, wurde ein anderer Messaufbau verwendet, mit dem eine dauerhafte Belichtung die generierte Menge an MC-Form bei erhöhter Temperatur konstant hält. Durch das Programm *PHITS* und den zugehörigen Aufbau konnte gleichzeitig ein Temperaturgradient und eine Belichtung bei 340 nm/365 nm durchgeführt werden. Da die verwendete Küvette nur eine Weglänge von 0,3 cm hat, wurde die Konzentration der Probe auf 5  $\mu$ M erhöht, um über eine optische Dichte von 0,1 zu kommen. Es wurden temperaturabhängige Absorptionsmessungen durchgeführt einmal ohne Belichtung und einmal mit Bestrahlung bei 340 nm. Die Belichtung wurde 15 Minuten vor Start des Temperaturgradienten begonnen, um sicher zu gehen, dass eine maximale Menge an MC-Form generiert wird. Die Ergebnisse der Messung sind in Abb. 84 dargestellt.



**Abb. 84:** Temperaturabhängige Absorptionskurven der Duplexe bei 260 nm (5  $\mu$ M in 1xPBS). Die grauen Kurven wurden ohne Belichtung gemessen, d.h. das Spiropyran liegt in der SP-Form vor. Die schwarzen Kurven wurden unter dauerhafter Bestrahlung bei 340 nm, 700 mA, 50 mW gemessen.

Im Vergleich der gemessenen temperaturabhängigen Absorptionskurven ist zu erkennen, dass es keinen Unterschied zwischen den Schmelzkurven gibt. Einzig für den Duplex **RNA-7/10** (Aminoglykol) ist eine Änderung zu sehen, die aber aufgrund der unterschiedlichen optischen Dichte nochmal reproduziert werden sollte. Da maximal 40% der MC-Form generiert werden können, wäre ein zweiter Wendepunkt oder eine flachere Kurve mit einer Verschiebung zu höherer Temperatur zu erwarten. Um zu überprüfen, ob die MC-Form während der Temperaturerhöhung stabil bleibt, wurden gleichzeitig die charakteristischen Banden von PyBIPS betrachtet. In Abb. 85 sind die entsprechenden Absorptionen bei 350, 550 und 590 nm am Beispiel von **RNA-7/10** gezeigt. Es findet eine allgemeine temperaturabhängige Reduktion der Absorption statt, in der sich keine Isomerisierung erkennen lässt.



**Abb. 85:** Temperaturabhängige Absorptionskurven der charakteristischen Wellenlängen 350, 550 und 590 nm von PyBIPS bei dauerhafter Bestrahlung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW (5  $\mu$ M in 1xPBS) am Beispiel von **RNA-7/10**.

(2) Bestimmung des  $K_D$  über Fluoreszenz

Da über die Schmelzpunktstudie keine genaue Aussage über die Auswirkung der Photoschalters auf den Duplex gemacht werden konnte, wurde versucht, die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Isomere im Duplex zu bestimmen. Es wurde ein Ansatz basierend auf einer Fluoreszenzanalyse gewählt. 2-Aminopurin (2-AP) ist ein Adenin-Konstitutionsisomer, das im freien Zustand fluoresziert. Sobald das Basenalogon Wasserstoffbrücken ausbildet, wird die Fluoreszenz gequenchet. Es wurden vier 2'-OMe-RNA-Stränge mit Sequenz des *Wedge* Motivs hergestellt und jeweils ein Adenosin in der Sequenz ausgetauscht. 2-AP wurde als DNA-Phosphoramidit erworben und in der Festphasensynthese eingesetzt (siehe Abb. 86).

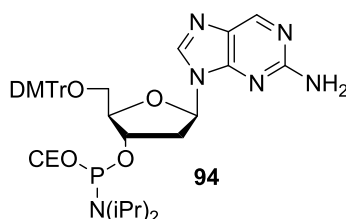
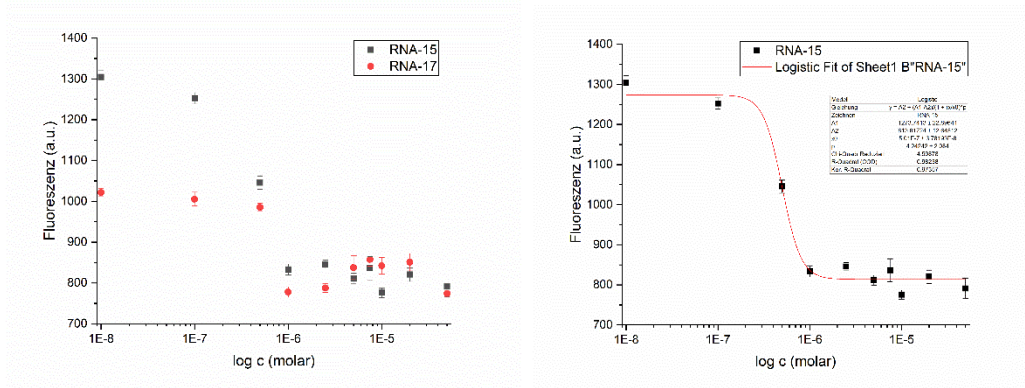


Abb. 86: 2-AP Phosphoramidit **94**.

Tabelle 8: Sequenzen der Gegenstränge mit 2-AP Modifikation.

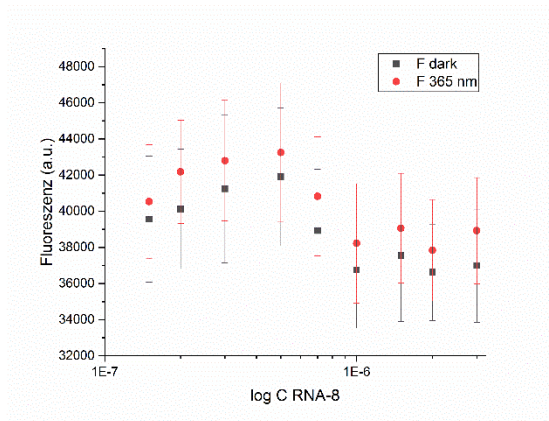
Bezeichnung	Sequenz
RNA-14	5'- CAC CUU AU AUA UGC – 3'
RNA-15	5'- CAC CUU AU AUA UGC – 3'
RNA-16	5'- CAC CUU AUA UGC – 3'
RNA-17	5'- CAC CUU AU AUA UGC – 3'

Zunächst wurde versucht, die Methode anhand von unmodifizierter **RNA-4** zu etablieren und die besten Parameter zu bestimmen. Der fluoreszierende Gegenstrang wird im Überschuss vorgelegt und der Hauptstrang in Zehnerpotenzen dazu titriert, sodass eine Konzentrationsreihe entsteht. Dabei ist darauf zu achten, dass die Konzentration des 2-AP-Strangs weit vom eigentlichen  $K_D$  entfernt ist und die Konzentrationsreihe im richtigen Bereich gewählt wird. Nach Hybridisierung durch Erhitzen wird die Fluoreszenz durch Anregung bei 300 nm und Detektion der Emission bei 360 nm ausgelesen. In Abb. 87 sind die Messpunkte von zwei Titrationsreihen gezeigt, die mit **RNA-4** und **RNA-15/-17** durchgeführt wurde. Die erhaltenen Messpunkte werden halb-logarithmisch aufgetragen um einen sigmoidalen Kurvenverlauf zu sehen. Am Wendepunkt befindet sich die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ). Zur Bestimmung der  $K_D$  wurde im Programm *Origin* ein sigmoidaler Fit angewendet, der im Fall von **RNA-4/15** einen Wert von  $k_D = 0,50 \pm 0,04 \mu\text{M}$  beträgt (siehe Abb. 87).



**Abb. 87:** Fluoreszenz einer Titrationsreihe von **RNA-4/15**. Die Konzentration von **RNA-15** wurde konstant bei 1  $\mu$ M gehalten. **RNA-4** wurde in Konzentrationen zwischen 10 nM und 5  $\mu$ M titriert. Links - halblogarithmische Auftragung mit sigmoidalem Kurvenverlauf der Werte. Rechts sigmoidaler Fit der gemessenen Fluoreszenzdaten von **RNA-4/15**.

Nach Testexperimenten ohne Spiropyran wurden anschließend Messungen mit PyBIPS (**RNA-8**) durchgeführt. Aus den Vorexperimenten wurde das Fazit gezogen, dass die Konzentration des fluoreszenten Strangs auf 100 nM heruntergesetzt werden muss, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Desweiteren sollten viele Messpunkte verwendet werden, um einen möglichen Effekt zu erkennen. Ohne Belichtung sollte die  $K_D$  für die SP-Form zu messen sein. Nach Belichtung wird sich ein Gleichgewicht zwischen SP- und MC-Form einstellen, sodass zwei Wendepunkte erwartet werden. Aus den Vorexperimenten konnten keine Schlüsse bezüglich der besten Position von 2-AP geschlossen werden. In Folgeversuchen wurde **RNA-15** eingesetzt. In Abb. 88 ist eine Titrationsreihe zu sehen, die vor und nach Belichtung auf Fluoreszenz untersucht wurde.



**Abb. 88:** Analyse der Titrationsreihe von **RNA-8/15** vor (schwarz) und nach Belichtung (rot) mit 365 nm, 10 min (96-Well-LED).

Durch Überlagerung der Messwerte ist zu erkennen, dass es keinen messbaren Unterschied zwischen den erhaltenen Werten vor und nach Belichtung gibt. Der sigmoidale Fit ergibt in beiden

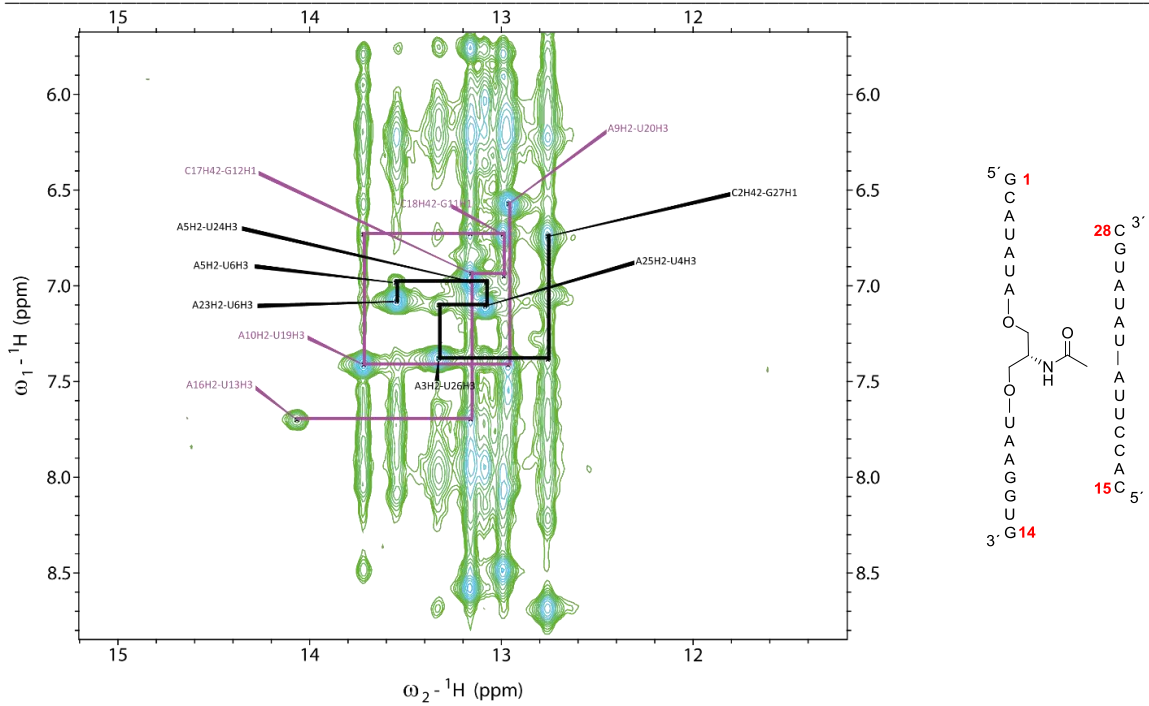
Fällen eine  $K_D = 0,70 \pm 0,01 \mu\text{M}$ . Durch Reduktion der Konzentration liegt ein sehr großer Fehler auf den einzelnen Werten. Dazu kommt, dass nur die unfavorisierte Belichtung bei 365 nm im 96-well Format möglich war, die nur 20% der MC-Form generieren kann. Die Auflösung der Methode reicht nicht aus, um einen nennenswerten Effekt zu detektieren und wurde aus diesem Grund nicht weiter verfolgt.

### (3) NMR-Studie

Da aus den vorangegangenen Studien keine Schlüsse gezogen werden konnten, inwieweit eine Veränderung der Stabilität des Duplexes durch die Anwesenheit der Photoisomere von PyBIPS ausgeübt wird, wurde eine Methode gesucht, die strukturelle Aussagen über das System liefert. Aus diesem Grund wurde eine NMR-Studie in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Harald Schwalbe initiiert. Für die NMR-Messungen wurden Proben in NMR-Menge (jeweils 150 nmol pro Einzelstrang) hergestellt. Die Stränge wurden anschließend an Tom Landgraf (Arbeitskreis Schwalbe) übergeben, der die Einzelstränge zunächst hybridisierte und in den entsprechenden Puffer (25 mM NaPi, pH 7,4, 5 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) für die NMR-Untersuchung überführte.

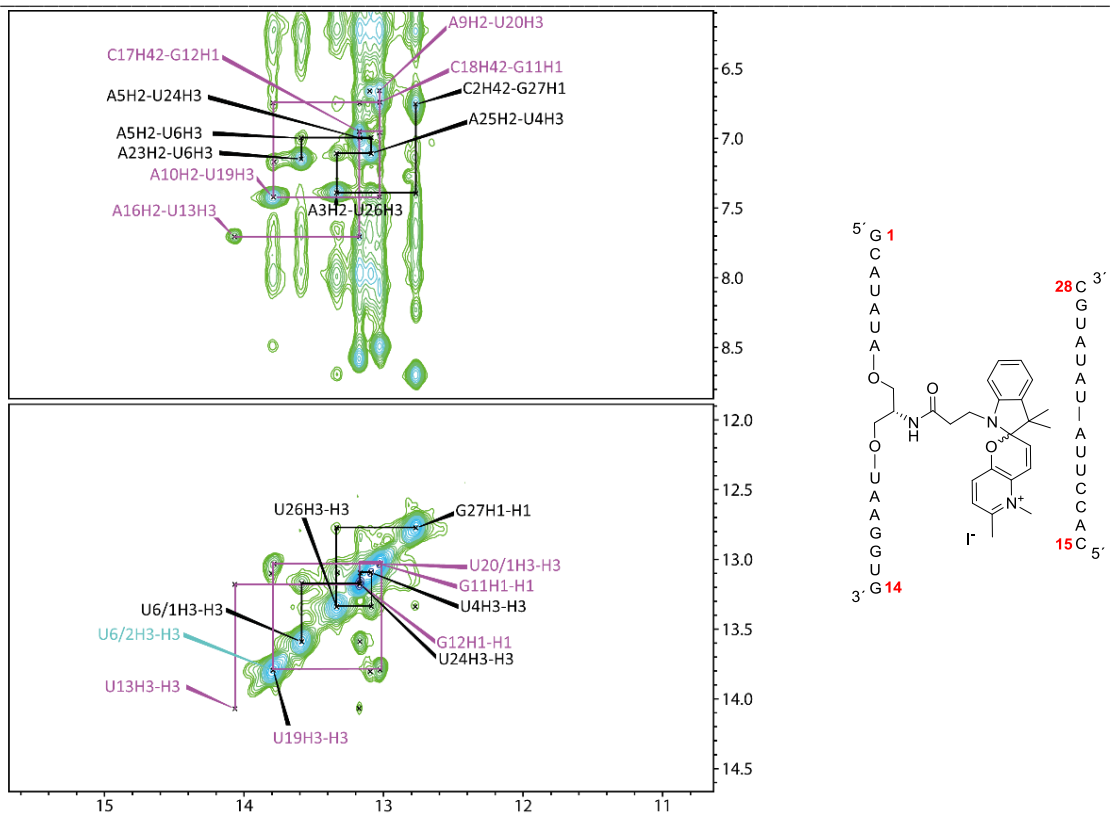
Für die Analyse der Duplexstruktur sind vor allem die Signale der Iminoprotonen wichtig. Durch Watson-Crick-Basenpaarung werden die Protonen, die an den Iminogruppen von Guanin und Uridin gebunden sind, über Wasserstoffbrücken festgehalten und können nicht mit der Umgebung austauschen. Zur Vereinfachung der Zuordnung der Signale wurde zunächst ein Duplex im *Wedge* Motiv ohne Spiropyran untersucht. Dazu wurde **RNA-5** (Serinol) analog zur Markierungsreaktion mit PyBIPS mit Essigsäure umgesetzt unter Ausbildung von Serinolacetat zu **RNA-18**. Nach Hybridisierung mit **RNA-10** im *Wedge* Motiv wurde von Tom Landgraf ein 1H-1D-Spektrum, ein NOESY sowie ein  $^{15}\text{N}$ -HSQC des Duplex gemessen. In Abb. 89 ist der Ausschnitt der Imino-Aromatenregion des NOESY-Spektrums zu sehen. Es konnten jeweils die Signale der Nukleotide 2-6/23-27 und 9-13/16-20 zugeordnet werden. Für die endständigen Nukleotide, sowie die benachbarten Basenpaare zum Linker wurden keine Signale der Iminoprotonen detektiert. Da der Linker eine Unterbrechung des Duplex darstellt, kann es sein, dass die Iminoprotonen der benachbarten Basen in der Lage sind auszutauschen und deshalb kein Signal geben.

## 2 - Postsynthetische Markierung von RNA mit Spiropyranen



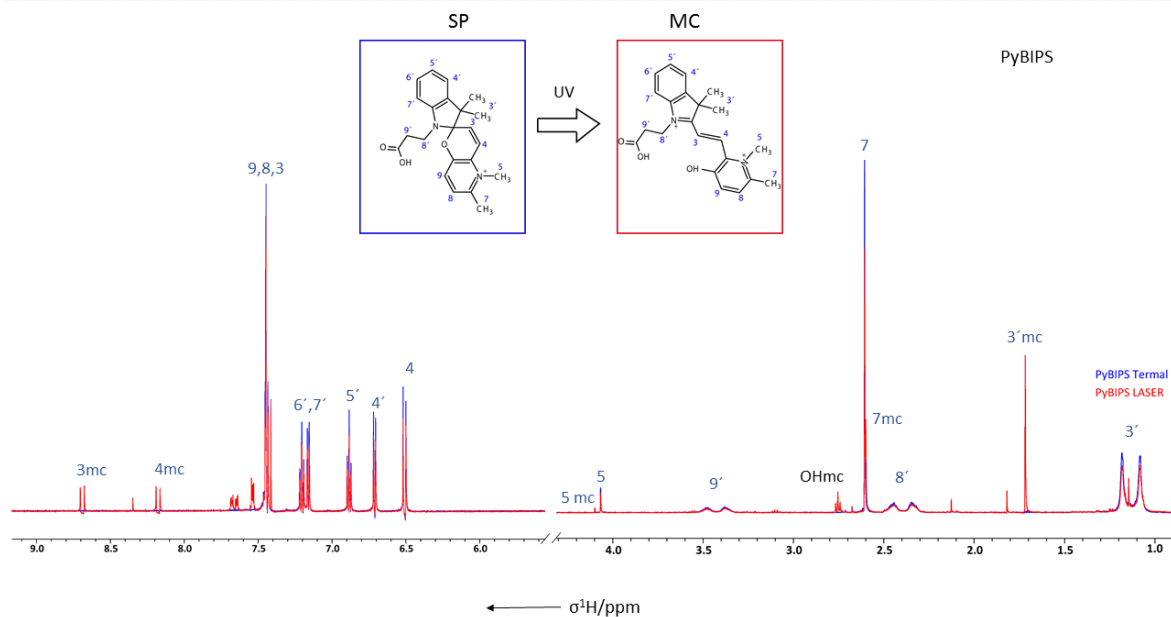
**Abb. 89:** Ausschnitt der Iminoaromatenregion des NOESY-Spektrums von **RNA-18/10**. In violett/schwarz sind jeweils die benachbarten Iminoprotonen markiert.

Nach erfolgreicher Zuordnung der Signale wurden anschließend die Duplices der drei Linker mit PyBIPS im *Wedge* Motiv mittels NMR untersucht. Dazu wurden alle PyBIPS-markierten Stränge plus Gegenstrang in entsprechender Menge hergestellt (150 nmol für 500  $\mu\text{M}$ -Lösungen). Von den Doppelsträngen wurden wieder ein  $^1\text{H}$ -1D-Spektrum sowie NOESY und  $^{15}\text{N}$ -HSQC gemessen. Zunächst wurden Messungen ohne Belichtung durchgeführt, bei denen das Spiropyran zu 100% in der SP-Konformation vorliegt. Durch eine Störung der Watson-Crick-Basenpaarung trennen sich die Wasserstoffbrückenbindungen und das Signal des entsprechenden Iminoprotons verschwindet im NOESY-Spektrum. Bei allen drei Systemen wurde festgestellt, dass neben dem direkt benachbarten auch die Signale der Iminoprotonen des nächsten Basenpaars gestört sind. In Abb. 90 ist am Beispiel von **RNA-9/10** oben die Imino-Aromatenregion und unten die Iminoregion zu sehen. Am Signal von A23H2-U6H3 lässt sich im Vergleich des unmarkierten Strangs (siehe Abb. 89) erkennen, dass das Signal aufgespalten wird. Dies spricht für die Anwesenheit von mehreren Konformationen. Da das Spirozentrum chiral ist und durch Öffnung in die MC-Form invertieren kann, könnte es sein, dass die Enantiomere unterschiedliche Einflüsse durch verschiedene räumliche Orientierung ausüben.



**Abb. 90:** Ausschnitte aus dem NOESY Spektrum von **RNA-9/10**. Oben ist die Iminoaromaten- und unten die Imino-region zu sehen.

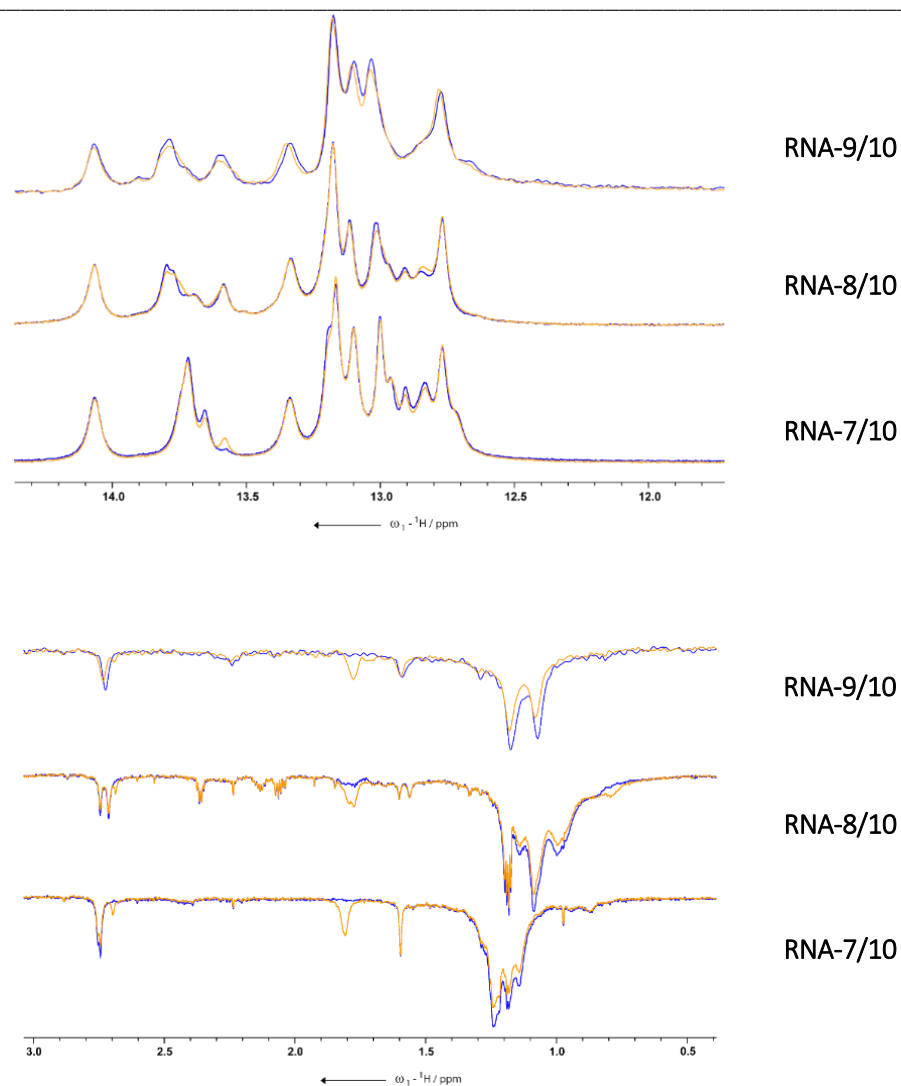
Durch Belichtung des Spiropyrans im NMR Spektrometer sollte anschließend bestimmt werden, wieviel MC-Form generiert werden kann und inwieweit sich die Basenpaarung dadurch ändert. Dies wird durch einen im Arbeitskreis Schwalbe vorhandenen, Glasfaser-gekoppelten Laser ermöglicht, mit dem die Probe im Spektrometer belichtet wurde. Die Schwierigkeit der Analyse liegt hier, wie in den vorigen Experimenten, in der gleichzeitigen Anwesenheit von SP- und MC-Form, die zum Teil überlagernde Signale abgeben. Für eine bessere Interpretation der Spiropyran-signale wurde zunächst Verbindung **91** in  $D_2O$  in SP-Form und mit Belichtung durch den Laser (500 mM, 365 nm, 8 W, Intervall 3x1 s Belichtung, 5 sPause) in der MC-Form analysiert. In Abb. 91 sind die 1D-Spektren von PyBIPS zu sehen. Die blauen Signale gehören zur SP-Form, die roten Signale entstehen bei Belichtung mit 365 nm. Für die weitere Auswertung sind die Signale interessant, die nur im Spektrum von einem der beiden Zustände vorkommen. Anhand der Integrale der Signale der belichteten Probe lässt sich die generierte Menge an Merocyanin berechnen.



**Abb. 91:** 1D-Spektrum von Verbindung **91** in der SP-Form (blau) und nach Belichtung im Spektrometer (rot). Es können 22% MC-Form generiert werden.

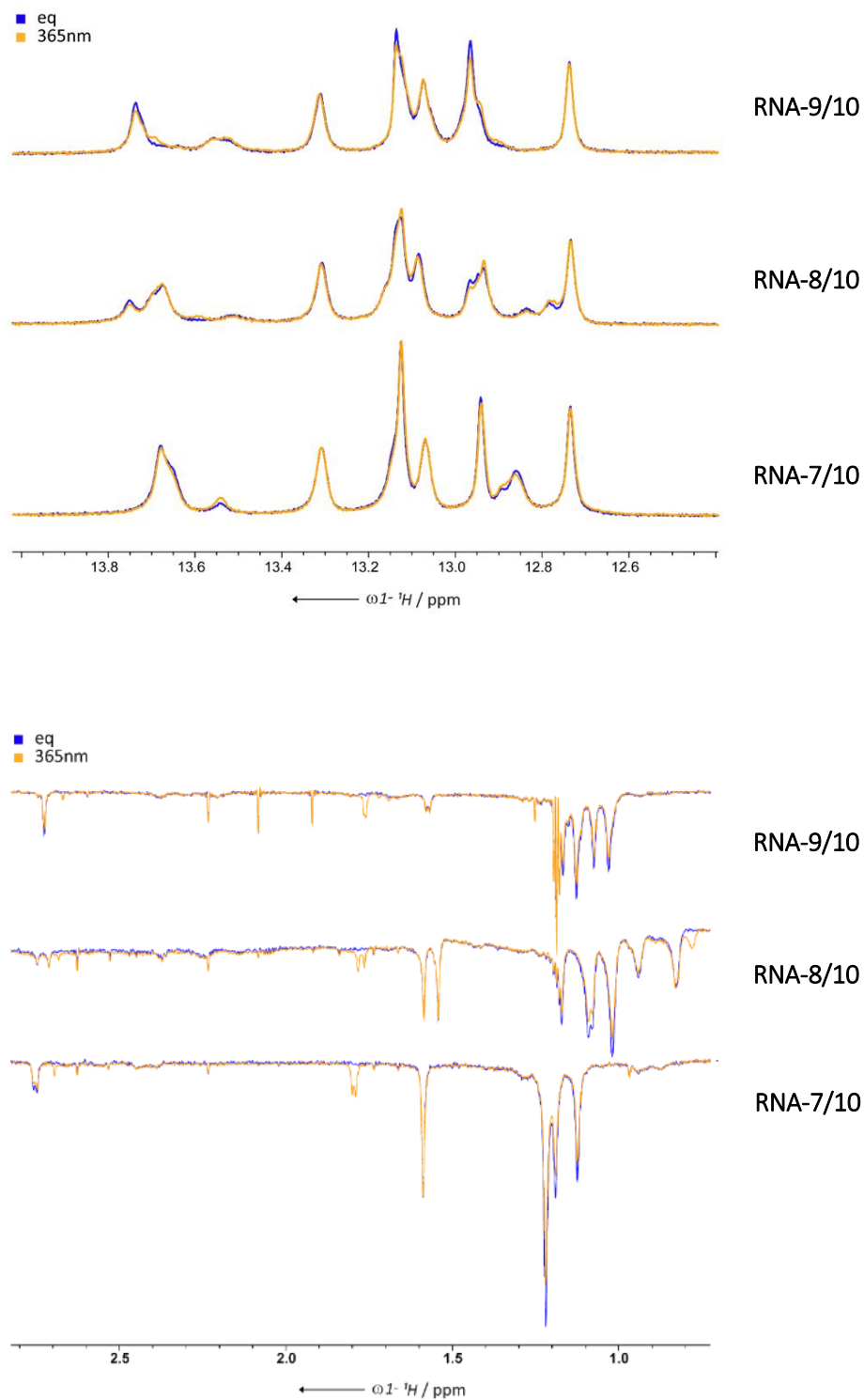
Anschließend folgte die Belichtung der Duplices im NMR-Spektrometer. Hier wurden von Tom Landgraf wiederum <sup>1</sup>H-1D-Spektren sowie NOESY gemessen. In Abb. 92 ist ein Ausschnitt der Iminoprotonenregion (12,0-14,0 ppm) und der Hochfeld-verschobenen Aliphatenregion (0,5-3,0 ppm) zu sehen. Im Vergleich der drei Systeme vor Belichtung (blau) und nach Belichtung (gelb) lassen sich keine signifikanten Veränderungen erkennen. Für eine strukturelle Änderung des Duplex wäre das Erscheinen eines neuen Iminosignals zu erwarten, was nicht der Fall ist. Es findet eine Veränderung in der Population des Signals des A23H2-U6H3 Basenpaars statt, das zwei Nukleotide vom Spiropyran entfernt ist und auf eine strukturelle Änderung hinweist. Bei Betrachtung der Aliphatenregion, in der die Spiropyransignale abgebildet sind, sind neue Signale durch Belichtung zu sehen. Im Fall von D-Threoninol (**RNA-8/10**) ist sogar eine Aufspaltung der Signale zu sehen, was für zwei Konformationen der MC-Form spricht. Zusammengefasst konnten wiederum keine großen Unterschiede zwischen den Systemen erkannt werden. Ein großes Problem für die Auswertung der Daten stellt die geringe Menge an Merocyanin dar, die durch die Belichtung bei 365 nm generiert werden kann.





**Abb. 92:**  $^1\text{H}$ -1D-Spektren der drei Duplexe **RNA-7/10**, **RNA-8/10** und **RNA-9/10**. Oben sind Ausschnitte aus der Iminoprotonenregion zu sehen, unten die Aliphatenregion. Blaue Signale thermisches Gleichgewicht (SP). Gelbe Signale nach Belichtung im Spektrometer mit 365 nm.

Da in den NMR-Untersuchungen mit Belichtung keine nennenswerten Effekte bezüglich einer Veränderung im Duplex detektiert werden konnten, sollte als nächstes versucht werden, durch Erhöhung der Temperatur das Aufschmelzen des Doppelstrangs zu vereinfachen, da vermutet wurde, dass die Bindung zwischen den Basen zu stark ist im Vergleich zum Kraftübertrag, den das Spiropyran darauf ausübt. Dazu wurde eine Messtemperatur von 55 °C gewählt. In den gemessenen  $^1\text{H}$ -1D-Spektren in Abb. 93 ist die Struktur der Duplices destabilisiert, dennoch sind Signale der Iminoprotonen zu sehen. Die A-U-Basenpaare sind getrennt, die G-C-Basenpaare jedoch nicht. Auch hier ist anhand der Iminoprotonensignale zu erkennen, dass keine Veränderung stattfindet. Im Aliphatenbereich sind die Signale von Merocyanin sehr unterschiedlich ausgeprägt.



**Abb. 93:**  $^1\text{H}$ -1D-Spektren der drei Duplexe **RNA-7/10**, **RNA-8/10** und **RNA-9/10** bei 55 °C. Oben sind Ausschnitte aus der Iminoprotonenregion zu sehen, unten die Aliphatenregion. Blaue Signale thermisches Gleichgewicht (SP). Gelbe Signale nach Belichtung im Spektrometer mit 365 nm.

Im Vergleich der NMR-Messungen der drei Systeme mit Belichtung, zur Generierung der MC-Form bei unterschiedlichen Temperaturen fällt auf, dass die angereicherte Menge sehr vom System abhängt. Mit Verbindung **91** konnten nur 21,3% MC-Form erreicht werden, was auf die

Wellenlänge der Belichtung zurückzuführen ist (vgl. 2.2.6). Während Serinol im stabilisierten Duplex bei 25 °C eine größere Isomerisierungseffizienz hat, ist es im Fall von Aminoglykol andersrum (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Prozentanteil Merocyanin der durch Belichtung mit 365 nm in den NMR-Messungen bei verschiedenen Temperaturen generiert werden konnte in verschiedenen Systemen.

MC	Serinol RNA-9/10	D-Threoninol RNA-8/10	Aminoglykol RNA-7/10	PyBIPS 91
25°C	21,2%	15%	15,4%	21,3%
55°C	13,8%	15,5%	22,5%	

Wie in den vorherigen Experimenten zum Einfluss des Photoschalters auf den Duplex, konnten auch in einer intensiven NMR-Studie keine großen Unterschiede gesehen werden. Aus der Analyse der Spektren ist zu erkennen, dass der Photoschalter die benachbarten Basenpaarungen stört, jedoch zeigt eine Isomerisierung des Photoschalters nur kleine Veränderungen in der RNA. Ein großes Problem ist dabei, dass die Menge an Merocyanin, die durch 365 nm Licht generiert werden kann, mit 20% sehr gering ist und sich eine Auswertung und Interpretation der Ergebnisse als schwierig gestaltet.

## 2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Mit dem Ziel, den Photoschalter Spiropyran kovalent in RNA einzubauen, um die Hybridisierung eines RNA-Duplex zu steuern, wurde eine Strategie verfolgt, die für Azobenzole seit Jahren erfolgreich angewendet wird.<sup>[218]</sup> In Vorarbeiten zu Spiropyranen in DNA, vor allem von Clara Brieke<sup>[51,190]</sup>, haben sich einige Probleme herauskristallisiert, wie die geringe Ausbeute beim Einsatz von Spiropyranen in der Festphasensynthese und der Verlust der Isomerisierung durch Licht vieler Spiropyran-Derivate nach Bindung an ein Oligonukleotid. Aus diesem Grund wurde ein postsynthetischer Ansatz gewählt, der zuvor in Bezug auf die Platzverhältnisse im Basenstapel *in silico* evaluiert wurde. Es wurden Struktur motive ausgewählt, die über Oligonukleotidfestphasensynthese in einen 2'-OMe-RNA-Strang eingebaut wurden mit einer funktionellen Gruppe, an die nach der Synthese das Spiropyran PyBIPS selektiv angebracht werden konnte. Aus einer Reihe an verschiedenen Möglichkeiten haben sich die drei nicht-nukleosidischen Linker Aminoglykol, D-Threoninol und Serinol mit Aminogruppe als geeignete Motive hervorgetan. Am Spiropyran wurde synthetisch eine Carbonsäure angebracht, über die der Photoschalter mit sehr guten Ausbeuten über eine Amidbindung an den Strang postsynthetisch angebracht werden konnte. In der photochemischen Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass sich PyBIPS bis zu

40% in die Merocyaninform überführen lässt, über zehn Isomerisierungszyklen kein Ausbleichen zeigt und damit stabiler ist als PyBIPS-Derivate in der Literatur<sup>[22]</sup>. Das Absorptionsmaximum der Merocyaninform zeigt eine bathochrome Verschiebung von 20 nm. Bei Untersuchung des Spiropyrans im ausgewählten *Wedge* Motiv lassen sich Unterschiede unter den drei Konstrukten erkennen. Besonders auffällig ist dabei, dass von der Merocyaninform ein zweites rotverschobenes Absorptionsmaximum ausgeht. Es wird vermutet, dass der RNA-Duplex das sonst instabile TTT-Isomer stabilisiert, welches in Lösung nur eine geringe Lebensdauer hat. Eine Isomerisierung kann durch Bestrahlung der rotverschobenen Bande noch bei 660 nm durchgeführt werden. Durch Variation des Gegenstrangs wurde herausgefunden, dass das Maximum abhängig ist von der Natur des Linkers und dem Platz im Basenstapel. Die Ausrichtung des Merocyanins scheint ausschlaggebend zu sein für die Stabilisierung der Isomere. Im Vergleich des Raumes zwischen den benachbarten Basenpaaren fiel auf, dass die Höhe entscheidender ist als die Tiefe in Richtung Gegenstrang. Eine Aussage über die Menge an Merocyanin, die im Doppelstrang gebildet werden kann, konnte nicht getroffen werden, da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Reinspektren des Duplex über HPLC erhalten werden konnten. Um zu Quantifizieren welchen Einfluss der Photoschalter auf die Duplexstruktur im *Wedge* Motiv ausübt, wurden verschiedene Methoden angewendet. In Schmelzpunktstudien sowie Fluoreszenzmessungen mit 2-Aminopurin-haltigen Gegensträngen zur Bestimmung des  $K_D$  konnten keine Unterschiede festgestellt werden. In einer NMR-Studie wurden daraufhin 1 und 2D-Spektren der Duplexe zum besseren Verständnis der Struktur von Tom Landgraf (Arbeitskreis von Prof. Dr. Harald Schwalbe) gemessen. Durch Belichtung und Temperaturerhöhung der Probe im Spektrometer wurde dabei versucht, einen signifikanten Unterschied zu erkennen. Jedoch konnte auch hier keine Auswirkung auf die RNA durch Isomerisierung von SP- zu MC-Form erkannt werden.

Durch einen postsynthetischen Ansatz konnte PyBIPS erfolgreich an nicht-nukleosidische Linker im Rückgrat von 2'-OMe-RNA angebracht werden, unter Erhalt der photochemischen Eigenschaften. Es wurde zum ersten Mal ein Spiropyran, das kovalent an ein Oligonukleotid gebunden ist, in einer Duplexstruktur untersucht. Die Entstehung eines rotverschobenen Absorptionsmaximums in der Merocyaninform deutet auf die Bildung des TTT-Isomers hin, was weiterhin untersucht werden sollte. Spiropyran und RNA interagieren im vorliegenden System, jedoch scheint der Photoschalter nicht in der Lage zu sein, die nötige Kraft auf den Strang zu übertragen, dass die Isomerisierung einen Einfluss auf die Stabilität ausübt. Um die Barriere zu erniedrigen, sollten die hier angewendeten Ansätze in instabileren Systemen wie einer kleinen Haarnadelstruktur untersucht werden, damit der Effekt größer und damit einfacher zu detektieren wird.

## 3 Protein-Engineering von OmpG

### 3.1 Motivation und Zielsetzung

Proteine bieten, durch ihre große Variabilität an funktionellen Gruppen in einem Makromolekül viele Ansatzpunkte für das Anbringen von nicht-peptidischen Molekülen. Neue, etablierte Methoden zur Mutation der Aminosäuresequenz bieten dazu neue Wege im *Protein Engineering* und zur Umsetzung einer Markierung. Da bei diesen Maßnahmen in die Konstitution eines Proteins eingegriffen wird, ist es wichtig die Stabilität eines Konstrukts zu bewahren. Eine Klasse von Proteinen, die einzigartig unter den Membran-ständigen Proteinen ist, sitzt in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. Die bereits in Kapitel 1.5 vorgestellten Omps bestehen aus einer  $\beta$ -Fasstruktur, die außerordentliche Stabilität aufweist.

Proteine der Omp-Familie, die schon mehrfach für verschiedene Ansätze verwendet wurden und aus diesem Grund auch sehr gut charakterisiert sind, sind  $\alpha$ -Hemolysin<sup>[120]</sup> und OmpF<sup>[219]</sup>. Ein weniger intensiv genutztes Protein ist OmpG. Der Vorteil von OmpG gegenüber den anderen genannten ist, dass es ein Monomer aus nur einer Aminosäurekette ist, was es einfach zugänglich für Veränderungen und in der Handhabung macht. Die Vorarbeiten des *Protein Engineerings* von OmpG wurden zu großen Teilen von Dr. Wolfgang Grosse aus dem Areitskreis von Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Universität Marburg) durchgeführt. Viele der hier angewendeten Methoden bauen auf seinen Ergebnissen auf oder wurden davon übernommen. In seiner Doktorarbeit demonstriert er, auf welchen Wegen man das Monomer modifizieren kann und wie es chemisch am einfachsten zugänglich für Modifikationen ist.<sup>[220]</sup> Durch native chemische Ligation sowie durch Punktmutationen wurden Cysteinreste eingeführt, die anschließend für S-Alkylierung genutzt werden konnten. Dazu kommt, dass durch Analyse der Kristallstruktur von Yildiz *et al.*<sup>[125]</sup> eine Loop-Deletion durchgeführt wurde, die aus dem unkontrollierbaren *Flickering* eine ruhige Pore erschaffen hat. Vor allem in spannungsabhängigen Einzelkanalmessungen, auch *Black Lipid Membran*-Messungen, können durch das klare Signal kleinste Veränderungen detektiert werden.

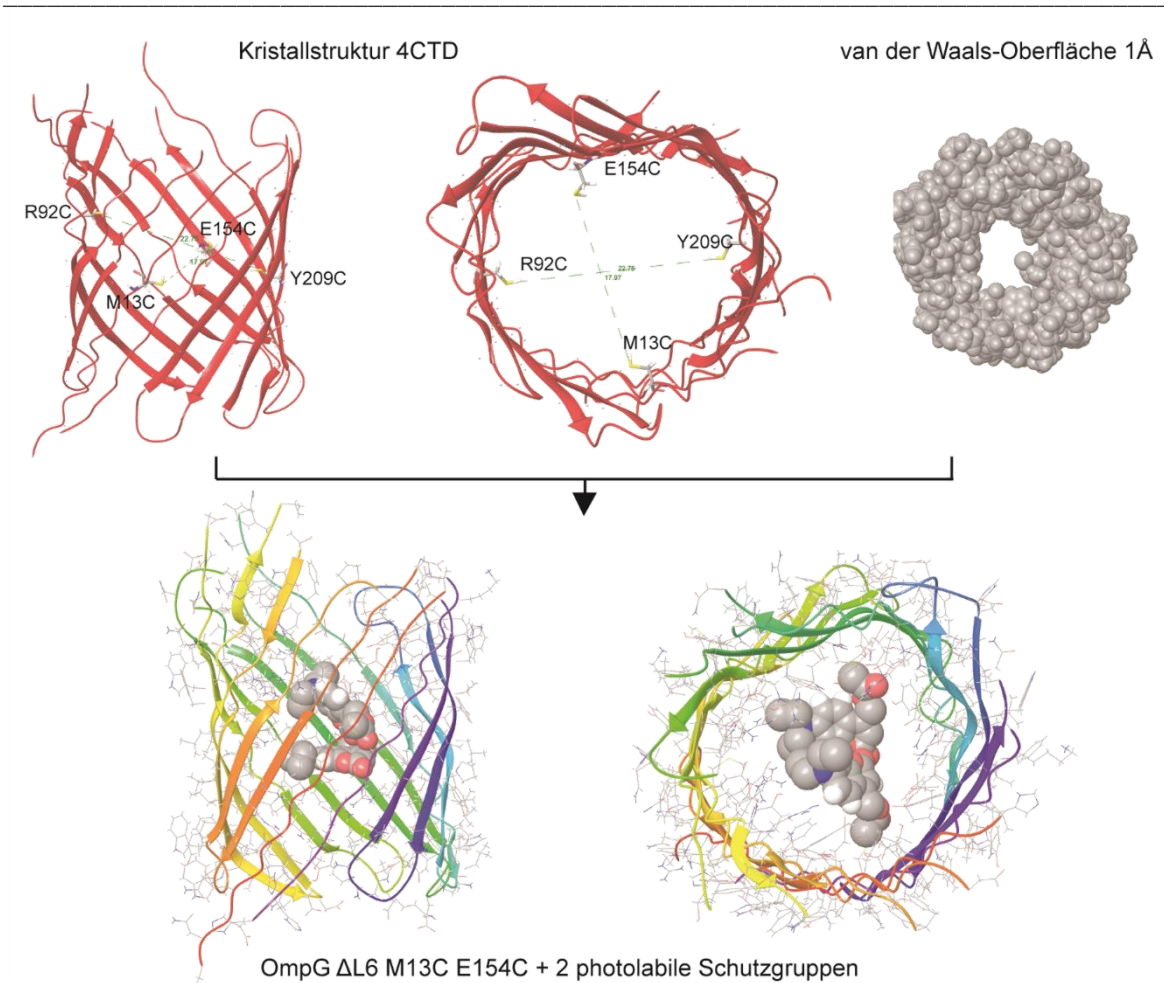
Aus den oben genannten Gründen soll das modifizierte OmpG mit Loop-Deletion  $\Delta L6$  als Templat für die Modifikation mit Licht-sensitiven Molekülen dienen. Durch die ruhige Beschaffenheit der Pore dient OmpG als ideales Modellsystem zum Testen von Modifikationen. Die Chromophore sollen zunächst eine reversible Blockade darstellen, die gegebenenfalls noch Selektion einführen können. Dabei sollen zunächst photolabile Schutzgruppen durch S-Alkylierung in das Innere des

Proteins eingeführt und mittels Einzelkanalmessung untersucht werden. Für die Hybride sollen OmpG-Mutanten, deren Plasmide aus dem Arbeitskreis Essen zur Verfügung gestellt wurden, eingesetzt werden. Für die S-Alkylierung wurden an ausgewählten Stellen Cysteine durch Punktmutation eingeführt. In Tabelle 10 ist eine Übersicht der verwendeten OmpG-Varianten zu sehen. Neben zwei Doppelcystein-Mutanten (**OmpG-1** und **OmpG-2**), wurde eine Einfachmutante (**OmpG-3**) sowie das Templat ohne Cysteine (**OmpG-4**) verwendet. Nach dem Einbau muss das Hybrid zum einen photochemisch charakterisiert werden, zum anderen sollen *Black Lipid Membran*-Messungen von Dr. Philipp Reiß an der Universität Marburg durchgeführt werden.

**Tabelle 10:** Übersicht der OmpG Varianten ohne Loop-6 mit Cysteinpunktmutationen von Wolfgang Grosse.<sup>[220]</sup>

Bezeichnung	OmpG Variante	Mutation
<b>OmpG-1</b>	OmpG/ $\Delta$ L6-M13C-E154C	Große Loop-6 Deletion, Punktmutation M13C und E154C
<b>OmpG-2</b>	OmpG/ $\Delta$ L6-R92C-Y209C	Große Loop-6 Deletion, Punktmutation R92C und Y209C
<b>OmpG-3</b>	OmpG/ $\Delta$ L6-Y209C	Große Loop-6 Deletion, Punktmutation Y209C
<b>OmpG-4</b>	OmpG/ $\Delta$ L6	Große Loop-6 Deletion

Für die S-Alkylierung wurden Cysteine so in die Proteinstruktur eingebracht, dass sie im Fall der Doppelmutanten auf gegenüberliegenden Strängen, sogenannten *trans*, zueinander sitzen. Sie wurden auf halber Höhe des Kanals angebracht um zu verhindern, dass die Modifikation, statt das Innere zu blockieren, außerhalb sitzt. In Abb. 94 sind die vorhandenen Cystein-Punktmutationen in der Kristallstruktur 4CTD<sup>[133]</sup> eingezeichnet. In der Mutante R92C Y209C (**OmpG-2**) sitzen die Cysteine orthogonal zu denen in M13C E154C (**OmpG-1**). Aber während die Aminosäuren in **OmpG-1** auf einer Höhe im Kanal liegen, sitzen sie in **OmpG-2** in der Höhe versetzt zueinander. Aus diesem Grund sind die eingezeichneten Abstände unterschiedlich lang; die Thiolgruppen sitzen in **OmpG-1** 18,0 Å und in **OmpG-2** 22,8 Å auseinander. Der tatsächliche Raum in der Pore lässt sich jedoch erst durch Betrachtung der Van-der-Waals-Oberfläche erkennen, die den Raum deutlich reduziert aufgrund der einbezogenen Aminosäureseitenketten. Ein mögliches Hybrid aus OmpG und zwei photolabilen Schutzgruppen ist in Abb. 94 unten zu sehen. Durch Zeichnung in die Kristallstruktur ist zu erkennen, dass die Größenverhältnisse zueinander passen.



**Abb. 94:** Übersicht der OmpG-Varianten und Positionen der einzelnen Cysteine, die für S-Alkylierung in den Kanal eingeführt wurden. Oben links – Berechnung der Abstände zwischen den Thiolgruppen. Oben rechts – Van-der-Waals-Oberfläche zur Abschätzung des tatsächlichen Platzes. Unten - Mögliche Hybride aus OmpG und photolabiler Schutzgruppen gezeichnet in der Kristallstruktur PDB:4CTD.

## 3.2 Ergebnisse und Diskussion

### 3.2.1 Herstellung der OmpG-Cystein-Varianten

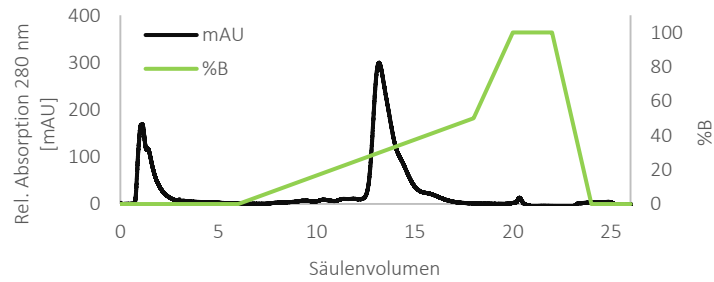
Zur Präparation der OmpG-Varianten wurden die aus Marburg stammenden Plasmide verwendet. Zunächst wurde zur Überprüfung eine Sequenzierung sowie ein Restriktionsverdau der bekannten Schnittstellen des Einbaus der *ompG*-Sequenz in den pET-20b-Vektor durchgeführt. In Abb. 95 ist der allgemeine Ablauf der Proteinsynthese dargestellt, unterteilt in die einzelnen Arbeitsschritte: Transformation in die Expressionszellen, Expression des Proteins in großem Maßstab und im Anschluss die Aufreinigung mit vollständiger Denaturierung.



**Abb. 95:** Allgemeiner Ablauf der Proteinsynthese. Im ersten Schritt wird der *ompG*-Vektor transformiert, gefolgt von der Expression des Proteins. Zuletzt wird eine Aufreinigung durchgeführt und das Protein vollständig denaturiert.

Mit den vorhandenen Plasmiden wurden OmpG-Varianten als *Inclusion Bodies (IB)* in den für die Expression modifizierten *E.coli omp9*<sup>[221]</sup> hergestellt. Dadurch wird eine aufwendige Solubilisierung des Proteins aus der Membran vermieden. Im *Omp9*-Bakterienstamm wurden alle eigenen Membranproteine entfernt, was zu einem verlangsamten Wachstum der Kultur führt. Nach Induktion wurde die Expression für 4 h durchgeführt. Nach Zellaufschluss und Zentrifugation, wurden die im Zellpellet vorhandenen *IB* von Zellresten befreit. Die Überexpression lieferte eine Ausbeute von ca. 60 - 70 mg gewaschene *IB* pro Liter Expressionskultur. Für die Rückfaltung in die native Form wurde eine komplette Denaturierung durch Harnstoff erwirkt mit anschließender *Rapid Dilution* in Detergenz-haltigem Puffer (3%-OG, siehe 5.3.4). Dabei wurden durchschnittlich 70% des Proteins in seiner nativen Form erhalten. Nach Verdau von fehlgefalteten Fragmenten, wurde eine Ionenaustauschchromatographie über einen NaCl-Gradienten durchgeführt (siehe Abb. 96).

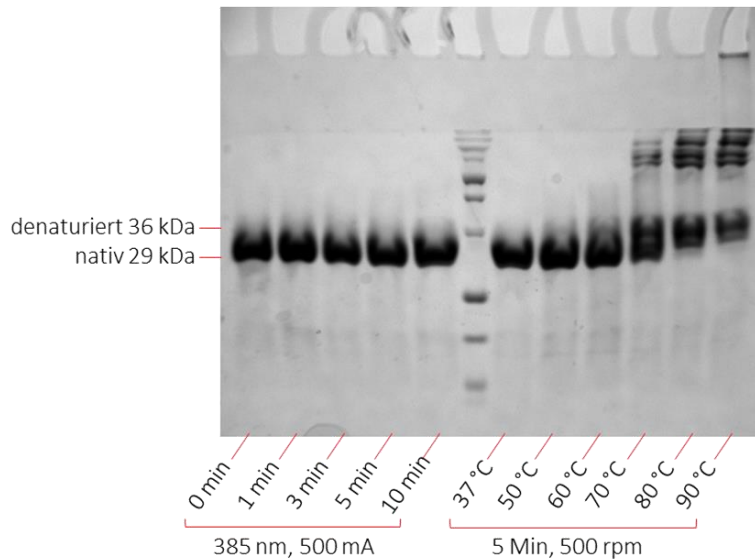




**Abb. 96:** Ionenaustauschchromatogramm. Die Elution von OmpG erfolgt über einen Salzgradienten B (1M NaCl) von 25 mM auf 500 mM NaCl. Das Protein eluiert bei einer Leitfähigkeit von 21,8 mS.

Nach Dialyse auf 10%-Glycerin-haltigen Puffer mit Detergenz (LDAO oder  $C_8E_4$ ) ist die Aufreinigung des nativen Proteins abgeschlossen. Jedoch wurden einige Unterschiede zwischen den Mutanten bezüglich der Stabilität festgestellt. Während die Variante **OmpG-1** nach Monaten bei 4 °C oder -20/-80 °C keinerlei Denaturierung zeigt, ist vor allem die Variante **OmpG-2** empfindlich. Hier wurde in einem SDS-PAGE festgestellt, dass gelagerte Proben mit und ohne Modifizierung einer teilweisen oder kompletten Denaturierung unterlagen. Natives und denaturiertes OmpG lassen sich anhand ihres apparenten Molekulargewichts in einem SDS-PAGE unterscheiden (nativ 29 kDa, denaturiert 36 kDa). Bei längerer Lagerung wurde vor Benutzung eine Kontrolle der Integrität des Proteins durchgeführt.

Da photosensitive Modifikationen eingeführt werden sollen, muss der Kanal gegen dauerhafte Belichtung stabil sein. Aus diesem Grund wurden vorab Stabilitätstests des unmodifizierten Konstrukts durchgeführt. Dabei wurde zum einen eine Belichtungsreihe mit **OmpG-1** durchgeführt, um zu überprüfen, dass keine Denaturierung durch die Belichtung bzw. die Wärme, die bei der Belichtung entstehen kann, eintritt. Zum anderen wurde das Protein einer thermischen Reihe unterzogen zur Bestimmung der Thermostabilität. Beide Testreihen wurden anschließend über ein SDS-PAGE ausgewertet. In Abb. 97 ist zu erkennen, dass selbst nach 10-minütiger Bestrahlung keine Veränderung des nativen Zustands zu erkennen ist. Erst ab einer Inkubation bei 70 °C über 5 min findet eine Denaturierung statt. Das Ergebnis stellt eine gute Grundlage für die Anwendung unter den genannten Bedingungen dar und macht biologische Anwendungen möglich.

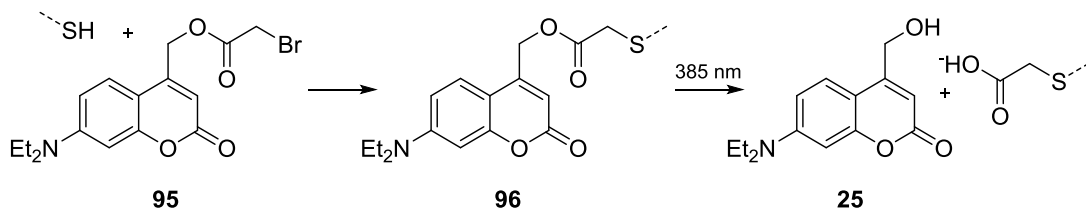


**Abb. 97:** Stabilitätstest von **OmpG-1** mit Analyse in 10% SDS PAGE. Linke Seite – Belichtungsreihe mit 385 nm, 500 mA, 95 mW für 0, 1, 3, 5 und 10 Minuten. Es ist keine Denaturierung des Proteins zu erkennen. Rechte Seite – Thermische Reihe, Erhitzen der Probe für 5 min und 500 rpm bei 37, 50, 60, 70, 80 und 90 °C. Eine nennenswerte Denaturierung erfolgt erst ab 70 °C.

### 3.2.2 Herstellung von OmpG-DEACM Hybriden

Für die postsynthetische Markierung der hergestellten OmpG-Varianten mit einer photolabilen Schutzgruppe wurde zunächst das Cumarin 7-Diethylaminocumarin (DEACM, **25**) ausgewählt. DEACM hat den Vorteil, dass es ein hohes Absorptionsmaximum bei 390 nm besitzt, welches nicht mit der Proteinbande bei 280 nm überlappt. Viele andere, gängige Schutzgruppen sind im Vergleich zu DEACM blauverschoben. Ein weiterer Vorteil ist die blaue Fluoreszenz des Chromophors, die parallel zur Entschützung bei Belichtung der Bande bei 390 nm entsteht und die vor allem für die Analytik von Nutzen ist. In Kapitel 1.3.4 wurde bereits über die Probleme des Cagings von Thiol-Funktionen und Ansätzen zur Lösung des Problems diskutiert. Dabei ist das direkte Caging als Thioether keine bevorzugte Wahl, da die Sulfhydrylgruppe des Kontaktionenpaar-Intermediats zum Angriff an die benachbarte C2-Position neigt und dort irreversibel bindet. Eine gute Lösung stellt die Überbrückung mit Carbamaten dar, was in diesem Fall jedoch nicht realisierbar war. Da die photolabilen Schutzgruppen postsynthetisch an das Protein angebracht werden, muss ein Reaktionspaar eingesetzt werden, das hochselektiv miteinander reagiert. Dies steht in Konkurrenz zu dem Wunsch eines rückstandslosen Abspaltens der photolabilen Schutzgruppe. Da beide Punkte gemeinsam nicht realisiert werden konnten, wurde für die Markierungsstrategie ein Kompromiss eingegangen. Am Cumarinalkohol **25** wurde ein Bromacetat-Linker (**95**) angebracht, der selektiv mit der Thiofunktion reagiert (siehe Abb. 98). Dabei findet ein nukleophiler Angriff des Thiols an den primären Kohlenstoff unter Abspaltung des

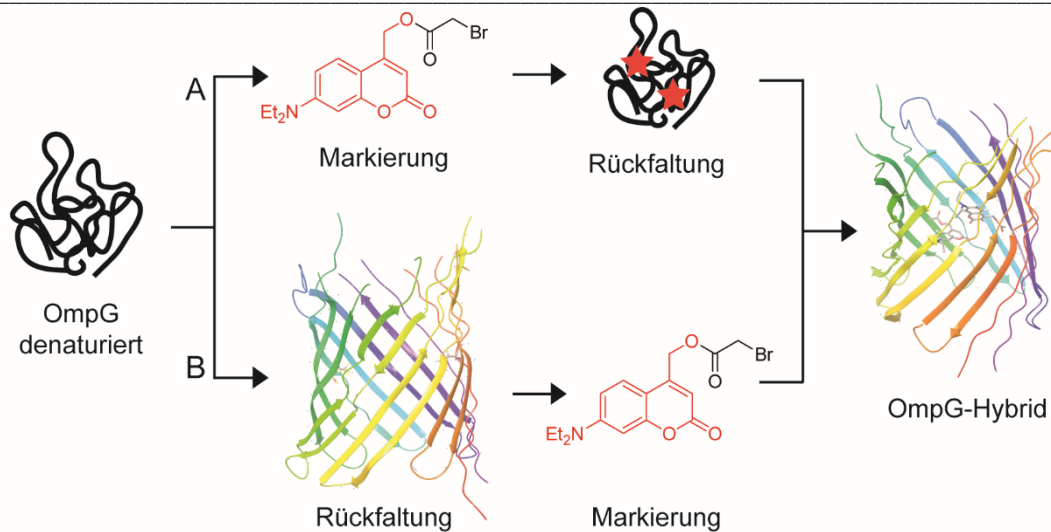
Bromids statt (**96**). Durch Bestrahlung in das Absorptionsmaximum von DEACM spaltet die photolabile Schutzgruppe ab. Der Abspaltmechanismus von Cumarinen läuft über einen Bindungsbruch zwischen C3' und dem Alkoholsauerstoff. DEACM spaltet als Alkohol **25** ab und lässt einen Carbonsäurerest am Thiol zurück. Verbindung **95** wurde von Dr. Thomas Halbritter synthetisiert. Es wurde als erstes versucht die reaktivere Iodacetat-Spezies einzusetzen, jedoch war diese nur für wenige Stunden stabil, sodass auf die robustere Bromacetat-Variante zurückgegriffen wurde, die über Stunden in wässrigem Medium eingesetzt werden kann.



**Abb. 98:** Schematische Darstellung der Bindung von DEACM **95** an die Thiolseitenkette von Cystein. Durch Substitution bindet das Thiol die Schutzgruppe unter Erhalt von **96**. Durch Belichtung in das Absorptionsmaximum von DEACM wird die Abspaltung ausgelöst. Der abgespaltene Alkohol **25** lässt eine Carbonsäure am Thiol zurück.

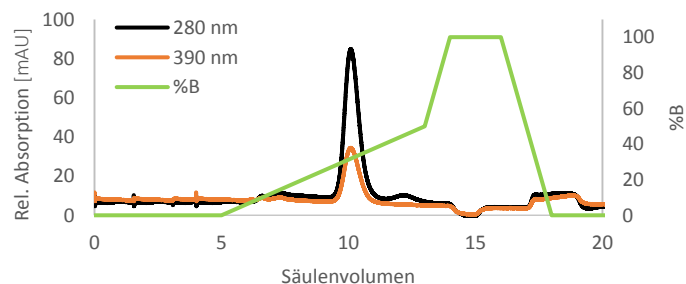
#### (1) Durchführung

Die eigentliche Markierungsreaktion kann auf zwei Wegen durchgeführt werden. Entweder wird am denaturierten Protein die photolabile Schutzgruppe angebracht und nach Abtrennung des Überschusses das Protein in seine natürliche Form rückgefaltet (Abb. 99 - A) oder umgekehrt erst rückgefaltet und im zweiten Schritt die Markierung in der Pore angebracht (B). Für diesen Reaktionsschritt wurde festgestellt, dass für jede Mutante eine individuelle Strategie erfolgreich zum Ziel führt. **OmpG-1** konnte ohne Probleme über beide Reaktionswege in guten Ausbeuten hergestellt werden. **OmpG-2** konnte dagegen nur über Weg B erhalten werden. Während die Markierung mit hoher Umsetzung funktionierte, konnte im zweiten Schritt kein rückgefaltetes Protein in mehreren Versuchen erhalten werden. Dies korreliert mit der verminderten Stabilität von **OmpG-2**. Im Fall von **OmpG-3**, welches nur eine der zwei Punktmutationen von **OmpG-2** besitzt, konnte Weg A mit verminderter Ausbeute von ca 25% erhalten werden. Dies bestätigt die Vermutung von Grosse, dass R92 essentiell für die Stabilität ist und ein Austausch negative Auswirkungen auf die strukturelle Integrität hat.<sup>[220]</sup> Allgemein wurde außerdem festgestellt, dass die Menge an organischem Lösungsmittel, in dem die photolabile Schutzgruppe gelöst wird für die Markierungsreaktion, im nativen Zustand des Proteins so gering wie möglich (max. 1:5 – organisches Lösungsmittel:Puffer) gehalten werden sollte. Dadurch fallen zwar Teile des Cumarins aus, sodass eine stets gesättigte Lösung vorhanden ist, aber das Protein bleibt jedoch stabil.



**Abb. 99:** Schematische Darstellung der möglichen Schritte, um vom denaturierten Protein das Hybrid zu erhalten. A – die Markierung wird am denaturierten Protein durchgeführt und das Protein anschließend in seine native Form gebracht. B – OmpG wird erst rückgefaltet und die Markierung im Anschluss auf der Innenseite angebracht.

Nach der Markierungsreaktion folgte die Aufreinigung des Hybrids – sowohl für gefaltetes als auch für ungefaltetes Protein. Um die großen Mengen an überschüssigem Markierungsreagenz zu entfernen wurde nach Protokoll<sup>[220]</sup> eine Größenausschlusschromatographie mit IEC-Puffer durchgeführt. In späteren Versuchen wurde dies durch Waschen des Reaktionsansatzes in einem Zentrifugenfilter ersetzt. Dabei konnte in einem Schritt der Überschuss entfernt, das Volumen reduziert und auf IEC Puffer gewechselt werden. Nach erfolgreicher Herstellung des Hybrids im gefalteten Zustand folgte eine Ionenaustausch-chromatographie (siehe Abb. 100). Im Anschluss wurde das Protein über einen Zentrifugenfilter aufkonzentriert (5 mg/ml) und eine Dialyse auf einen 10%-Glycerinhaltigen Lagerungspuffer mit Detergenz durchgeführt zur stabilen Lagerung.



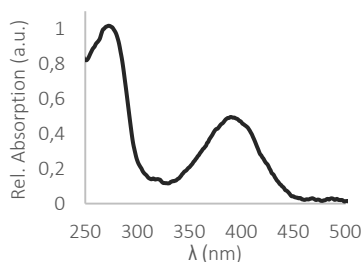
**Abb. 100:** Ionenaustauschchromatogramm. Die Elution von OmpG erfolgt über einen Salzgradienten B (1M NaCl) von 25 mM auf 500 mM NaCl. Das Protein eluiert bei einer Leitfähigkeit von 21,8 mS. Durch gleichzeitige Detektion von 280 und 390 nm ist zu erkennen, ob die Proteinfraction Cumarin enthält.

## (2) Analytik des Hybrids

Um zu bewerten mit welcher Ausbeute die Markierung an des Protein angebracht werden konnte, wurde eine Quantifizierung über Absorption durchgeführt, sowie eine massenspektrometrische Analyse des Massenservice der Universität Marburg. Für die Quantifizierung wurden die Extinktionskoeffizienten von DEACM **95** über eine Konzentrationsreihe in H<sub>2</sub>O/MeCN bestimmt. Dabei ist vor allem der Extinktionskoeffizient von DEACM **95** bei 280 nm wichtig, um keine Fehlinterpretation der Proteinmenge zu erhalten. Der Extinktionskoeffizient von **OmpG-1** bei 280 nm wurde über das Online Programm *ExpASY Prot Param* von *Swiss Institute of Bioinformatics* berechnet anhand der Sequenz (siehe 5.3.3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zu sehen. Für ein Hybrid aus **OmpG-1** mit DEACM (**OmpG-5**, OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2xDEACM) ergibt sich ein Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 78260 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ . Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurde ein Absorptionsspektrum von **OmpG-5** gemessen (siehe Abb. 101). Mit den bekannten  $\epsilon$  bei 280 und 390 nm konnte jeweils die Konzentration bestimmt werden. Die Konzentration von DEACM ist mit 24,9  $\mu\text{M}$  ca. doppelt so hoch wie die Proteinkonzentration von 12,3  $\mu\text{M}$  und bestätigt damit eine vollständige Markierung (vgl. Abb. 101 rechts).

**Tabelle 11:**  $\epsilon$  der Komponenten und des Hybrids.

	$\epsilon_{280\text{ nm}}$	$\epsilon_{390\text{ nm}}$
	L/(mol·cm)	L/(mol·cm)
<b>OmpG-1</b>	71260	0
<b>DEACM</b>	3500	19900
<b>OmpG-5</b>	78260	19900

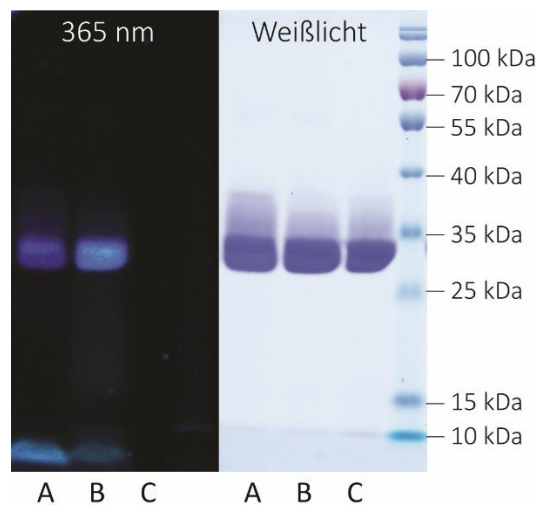


<b>OmpG-5</b>	<b>Einheit</b>	<b>280 nm</b>	<b>390 nm</b>
$\epsilon$	L/(mol·cm)	78260	19900
<b>A</b>	a.u.	0,965	0,495
<b>c (calcd.)</b>	$\mu\text{M}$	12,3	24,9

**Abb. 101:** Bestimmung der Markierungseffizienz von **OmpG-5** anhand der Extinktionskoeffizienten. Absorptionsspektrum des Hybrids **OmpG-5** links mit Berechnung der Konzentrationen von Protein (280 nm) und Markierung (390 nm) in der Tabelle rechts.

Zur Überprüfung ob DEACM durch Bestrahlung von **OmpG-5** wieder abgespalten werden kann, wurde das Hybrid belichtet und via SDS PAGE analysiert (Abb. 102). Zum Vergleich wurden unmodifiziertes **OmpG-1** sowie DEACM-markiertes **OmpG-5** auf das Gel aufgetragen (jeweils 40  $\mu\text{L}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 500 pmol in Lagerungspuffer, siehe 5.3.4). **OmpG-5** wurde zweimal aufgetragen, einmal vor und einmal nach Belichtung für 5 Minuten bei 385 nm (700 mA, 95 mW – vgl. Stabilitätstest

Abb. 97) ohne weitere Aufreinigung aufgetragen. Durch Anregung des Gels mit 365 nm sind nur Cumarin-haltige Banden zu sehen, im Weißlicht nur Proteinbanden. Bei 365 nm ist zu erkennen, dass die unbelichtete Probe **OmpG-5** stark und die belichtete, Abspaltprodukt **OmpG-6** mit Carboxylatresten, nur noch schwach fluoresziert – d.h. im Fall der belichteten Probe ist noch Restfluoreszenz zu erkennen. Es wird vermutet, dass der abgespaltene Cumarinalkohol **25** aufgrund seiner hydrophoben Natur noch im Inneren der Pore sitzen könnte. Es ist außerdem zu sehen, dass ein Großteil des abgespaltenen DEACM-Alkohols **25** aus der Proteinbande herausdiffundiert ist. Durch Coomassie-Färbung der Proteinbanden wurde überprüft, dass keine Denaturierung aufgrund der Belichtung stattgefunden hat.



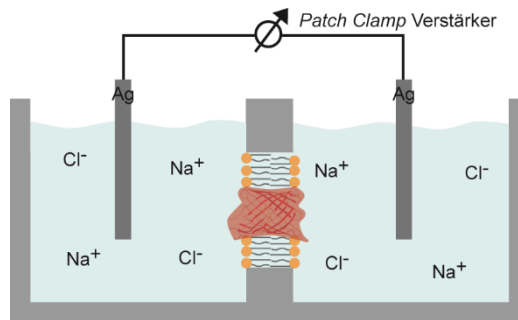
**Abb. 102:** 10% SDS PAGE von belichtetem (A) (385 nm, 700 mA, 95 mW, 5 Minuten) und unbelichtetem (B) **OmpG-5**. Zum Vergleich wurde unmodifiziertes **OmpG-1** (C) aufgetragen. Linke Seite – Anregung der Fluoreszenz von DEACM durch 365 nm, 5 mW Licht. Rechte Seite – Coomassie®-Färbung des Proteins im Weißlicht.

### 3.2.3 Charakterisierung der OmpG-DEACM Hybride mittels *Black Lipid*

#### *Membran*-Messungen

Eine etablierte Form der Charakterisierung von Membranproteinen ist die Bestimmung der Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals in spannungsabhängigen Einzelkanalmessungen. Dazu werden häufig die *Patch-Clamp*-Technik oder die hier verwendete Messung in einer *Black Lipid Membran* (BLM) genutzt. Die BLM-Messungen wurde alle unter Leitung von Dr. Philipp Reiß an der Universität Marburg durchgeführt. Durch Diffusion eines einzelnen Kanals in eine künstliche Membran kann über einen angelegten Stromkreislauf die Leitfähigkeit bestimmt werden. Dazu wird eine Apparatur benutzt, die aus zwei kleinen Kammern (je 5 mL Volumen) besteht. In beide Kammern wird eine Silberelektrode eingetaucht, die über einen Stromkreislauf miteinander verbunden sind. Die Kammern sind durch eine Wand getrennt, die ein 200 µm großes Loch enthält,

welches mit einer künstlichen 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin-(DPhPC)-Membran bedeckt wird. Diese ist sehr robust, was manchmal auch den Einbau eines Kanals erschweren kann, aber auch einen Mehrfacheinbau von Kanälen erschwert.



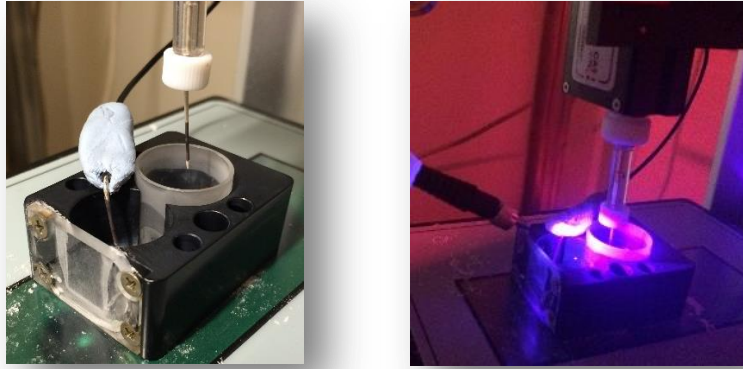
**Abb. 103:** Aufbau der Messzelle der BLM-Messung. Die Kunststoff Kammern werden mit NaCl-Puffer gefüllt. Die Kammern sind durch eine DPhPC-Membran getrennt (gelb-grau). Der Stromkreislauf ist über zwei Silberelektroden verbunden mit einem Verstärker zur Detektion des entstehenden Stroms bei Insertion eines OmpG-Moleküls.

Zur Messung wird eine Spannung im mV-Bereich angelegt und die Stromstärke gemessen. Da sich die Stromstärke im Experiment im pA-Bereich befindet, wird das Signal durch einen Verstärker amplifiziert. Nach Anlegen der Spannung kann nur ein Stromfluss stattfinden, wenn sich ein Kanal in die Membran eingebaut hat. Die detektierte Stromstärke korreliert mit der Menge an Ionen, die den Kanal passieren können. Der elektrische Widerstand  $R$  definiert sich über das Verhältnis von Spannung  $U$  zu Stromstärke  $I$  (Formel 1). Die elektrische Leitfähigkeit  $G$  ist der Kehrwert des Widerstands. Durch graphische Auftragung der Stromstärke gegen die Spannung kann die Leitfähigkeit in der Einheit Siemens (S) anhand der Steigung abgelesen werden. Über die Methode lässt sich die Leitfähigkeit von einem einzelnen Membranprotein bestimmen.

$$\text{Elektrischer Widerstand (R):} \quad R = \frac{U}{I}; \quad \Omega = \frac{V}{A}; \quad (1)$$

$$\text{Elektrische Leitfähigkeit (G):} \quad G = \frac{1}{R}; \quad S = \frac{1}{\Omega} = \frac{A}{V} \quad (2)$$

Die Hybride mit photolabilen Schutzgruppen sollen während der BLM-Messung belichtet werden. Da die Messungen anfällig für kleinste Störungen sind, befindet sich der Aufbau in einem Faradaykäfig, d.h. abgeschirmt von äußeren Feldern. Um elektrische Störungen durch die Lichtquelle zu vermeiden, wurde eine Glasfaser-gekoppelte LED eingesetzt. Die LED und Zubehör wurden außerhalb aufgebaut und die Glasfaser in den Käfig gelegt. Diese wurde dabei so justiert, dass sie mit  $< 1$  cm Abstand auf die Membran zeigt (Abb. 104).



**Abb. 104:** Photo der verwendeten Messzelle. Die Membran sitzt auf der Vorderseite der weißen Kammer im Bild links. Die Elektroden ragen in jeweils eine der beiden Kammern. Die Glasfaser wird von links auf die Membran gerichtet, was auf der rechten Seite unter Messbedingungen bei Rotlicht zu sehen ist mit der 385 nm-abgebenden Glasfaser in Betrieb.

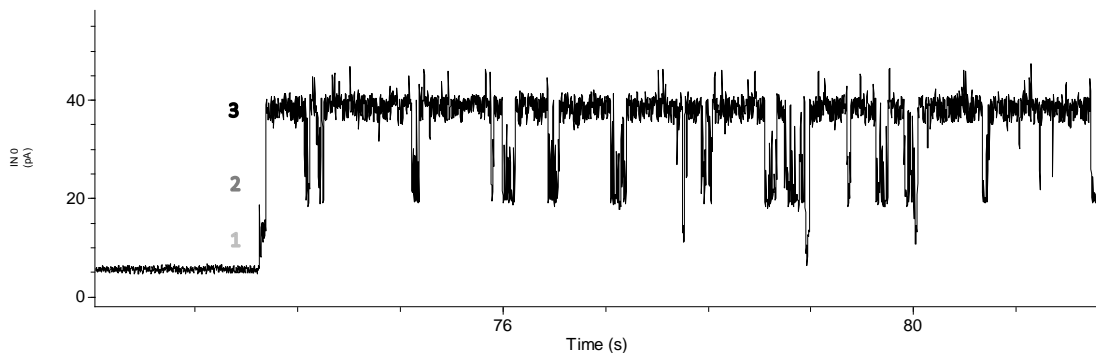
Für die durchgeführten Einzelkanalmessungen wurde eine Elektrolytlösung (siehe 3.3.3) zum Füllen der Kammern verwendet. Die stark verdünnte, proteinhaltige Lösung ( $< 1 \mu\text{M}$ ) wird in eine der Kammern in die Nähe der Membran pipettiert. Es wird gewartet bis sich eine Detergenzmizelle, in der ein Molekül OmpG sitzt in die Membran einbaut und ein Stromfluss zustande kommt. Dies kann direkt passieren, aber auch bis zu Stunden dauern, je nach Konzentration und Robustheit der Membran. Nach Literatur<sup>[133,220]</sup> ist zu erwarten, dass durch den fehlenden Loop 6 eine sehr ruhige Pore vorliegt. In der Vergangenheit wurde zum Start eine Spannung von 80 mV angelegt. Es wurde jedoch festgestellt, dass die eingebauten Kanäle dem Druck zum Teil nicht standhalten konnten und dazu neigten, sich nach kurzer Offenzeit zu verschließen, was durch starke Reduktion der gemessenen Stromstärke zu erkennen war. Daraufhin wurde die Leitfähigkeit für weitere Messungen auf 40 mV herabgesetzt. Bleibt ein Kanal stabil in der Membran für mehrere Minuten, so kann er voll charakterisiert werden, d.h. die Spannung wird zwischen -80 und +80 mV in 20 mV Schritten variiert und die zugehörige Stromstärke wird gemessen. Die Messreihe kann anschließend wie oben beschrieben graphisch ausgewertet werden unter Bestimmung der Leitfähigkeit.

#### (1) BLM-Messungen von **OmpG-1** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154)

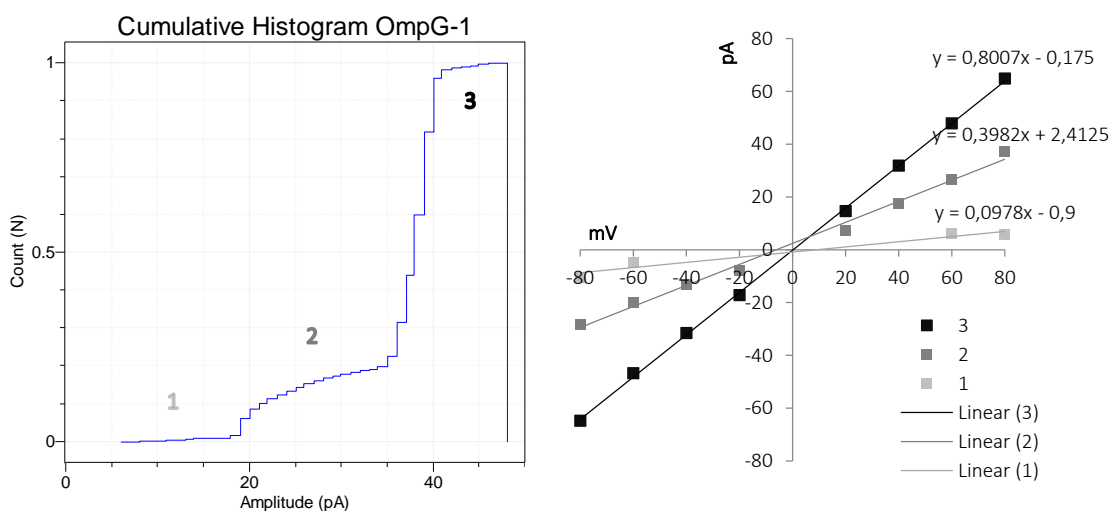
Zum vollständigen Verständnis der Mutante wurde zunächst die unmodifizierte Variante **OmpG-1** analysiert. Erstens wurde das allgemeine Verhalten und zweitens das Verhalten bei Belichtung betrachtet. In Abb. 105 ist ein Ausschnitt eines typischen Signals von **OmpG-1** in einer BLM-Messung zu sehen. Es gibt ein stabiles Hauptniveau und ein zweites Niveau mit geringerer Leitfähigkeit. Im Vergleich zur Literatur<sup>[133]</sup> zu Wildtyp OmpG mit Loop 6 ist der Kanal bei gleichen



Messbedingungen (DPhPC-Membran, 1M NaCl pH = 7,4) sogar deutlich ruhiger. Die Cystein-freie Variante **OmpG-4** zeigt dagegen kurze, unregelmäßige Schließungen in der Literatur und kein zweites definiertes Niveau.<sup>[133]</sup> Dies deutet daraufhin, dass die Cysteinreste eine leichte Schließung mit Besetzung eines zweiten Niveaus bewirken. In Abb. 106 ist links eine Auswertung der Besetzung der Niveaus in einem Histogramm zu sehen, was die zwei definierten Stufen verdeutlicht. In einem Strom-Spannungsgraphen ist zu erkennen, dass das Hauptniveau eine Leitfähigkeit von 0,80 nS besitzt und damit leicht über der Leitfähigkeit von **OmpG-4** (0,73 nS<sup>[133]</sup>) und dem Wildtyp (0,72 nS<sup>[133]</sup>) liegt. Das 2. Niveau zeigt eine Leitfähigkeit von 0,40 nS und das dritte eine Leitfähigkeit von 0,10 nS. In der selben Literatur zu **OmpG-4** wurde außerdem noch ein Minimalporin hergestellt, das keine Loops mehr besitzt. Für beide Varianten wurde festgestellt, dass sie trotzdem noch kurze Schließungen zeigen. Dies wurde durch eine Dynamik im Rückgrat erklärt, die zu einem Twist führt, der kurzzeitig die Pore verengt. Es ist zu vermuten, dass die hier gemessenen Niveaus dem gleichen Phänomen zugrunde liegen.

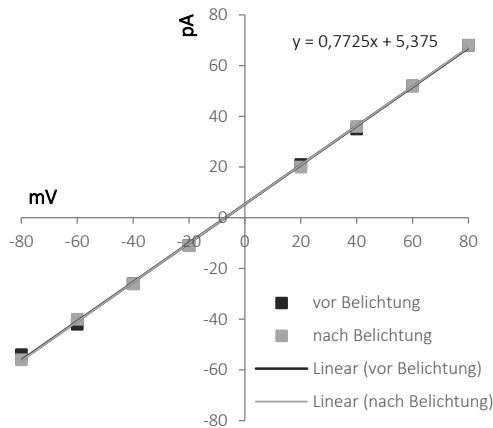


**Abb. 105:** Einzelkanalmessung von **OmpG-1** bei angelegter Spannung von 40 mV. Es sind drei verschiedene Niveaus zu erkennen, gekennzeichnet mit 1,2,3.



**Abb. 106:** Charakterisierung von **OmpG-1**. Links - Histogramm der Population der verschiedenen Niveaus. Rechts - Strom-Spannungsgraph mit Leitfähigkeiten der Niveaus 1,2,3 im Vergleich.

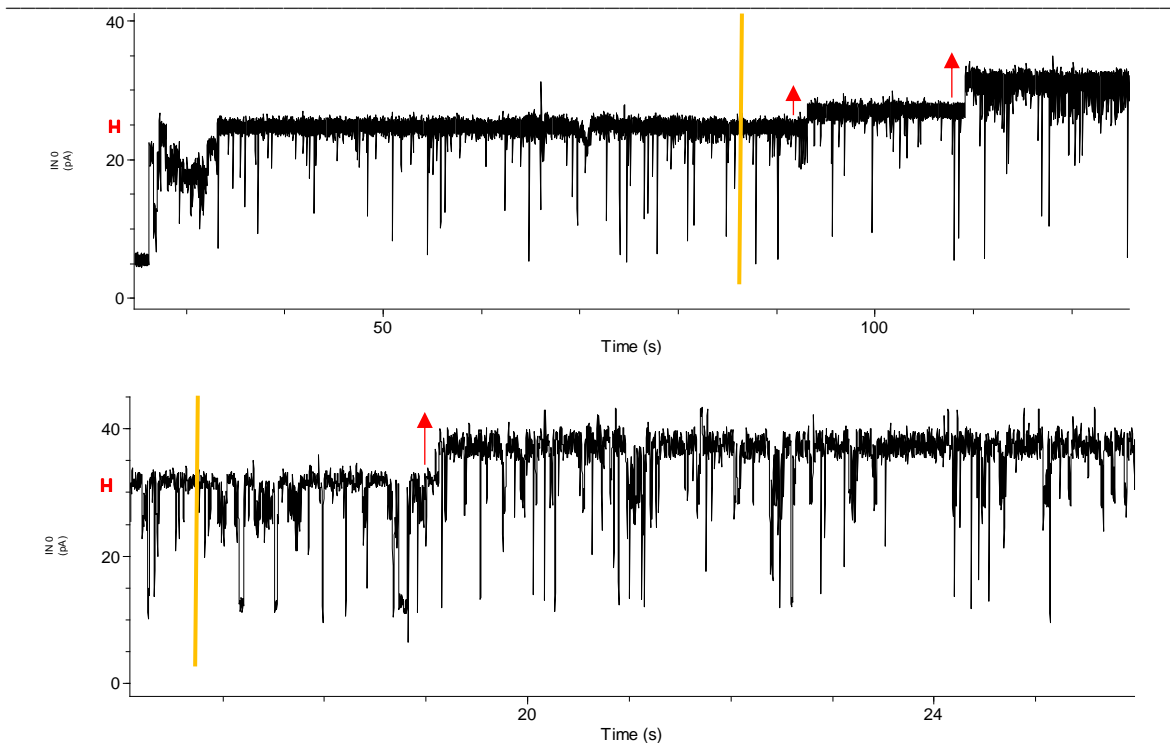
Um sicher zu stellen, dass eine Belichtung keinen Einfluss auf die Konstitution des Kanals ausübt, wurde **OmpG-1** vor und nach Belichtung charakterisiert durch Variation der Spannung zwischen -80 und 80 mV. In der graphischen Auswertung mit linearem Fit der Daten wurde kein Unterschied in der Leitfähigkeit im Vergleich von vor und nach Belichtung erkannt. Die Belichtung stellt kein Problem für die Messmethode dar.



**Abb. 107:** Vergleich der Leitfähigkeiten von **OmpG-1** vor und nach Belichtung mit 385 nm, 700 mA, 95 mW.

(2) BLM-Messungen von **OmpG-5** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2xDEACM)

Die Charakterisierung von DEACM-Hybrid **OmpG-5** wurde unter denselben Bedingungen wie zuvor **OmpG-1** durchgeführt. Hier lag der Fokus darauf zu erkennen, wie sich die eingeführte Modifikation auf die Leitfähigkeit auswirkt und ob durch Belichtung eine Veränderung passiert. Dafür wurde das Hybrid zunächst nach Zugabe und Einbau in die Membran charakterisiert. Anschließend wurde die Belichtung durchgeführt und nach Abspaltung erneut charakterisiert. Dazu muss der Kanal für einige Zeit stabil in der Membran sitzen und es darf kein weiterer Kanal hinzukommen. Die Belichtung bei 385 nm (700 mA, 95 mW) erfolgte während einer angelegten Spannung von 40 mV für 5-10 min. Nach Insertion in die Membran zeigt das Hybrid eine verminderte Leitfähigkeit von 0,71 nS im Vergleich zu unmodifiziertem **OmpG-1** (0,80 nS). Durch Belichtung wird die Abspaltung der photolabilen Schutzgruppen initialisiert, was in der Stromkurve zu sehen ist. In Abb. 108 sind zwei Beispiele gezeigt, in denen die Abspaltung nach nur kurzer Belichtungszeit durch einen Anstieg der Spannungskurve auf ein neues stabiles Niveau zu erkennen ist, einmal in zwei Stufen und einmal in nur einer Stufe.

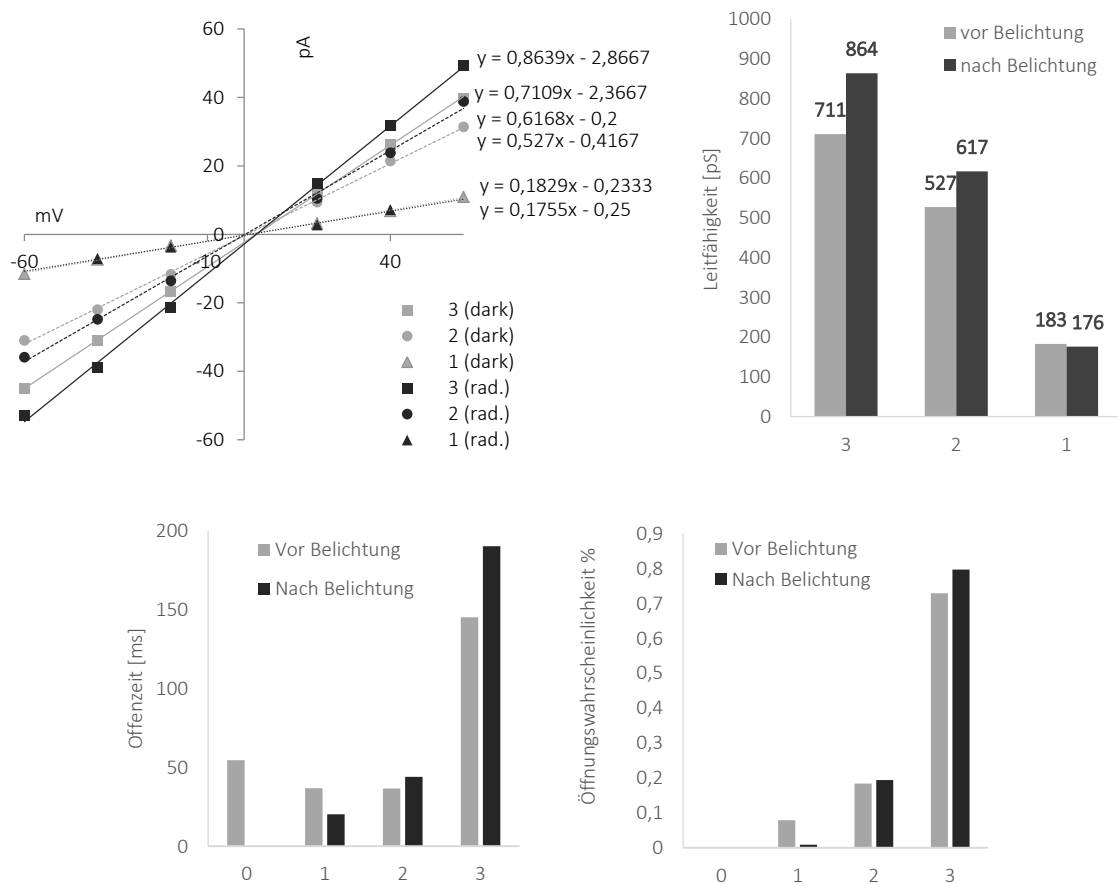


**Abb. 108:** Einzelkanalmessung von **OmpG-5** bei einer angelegten Spannung von 40 mV mit Belichtung (gelbe Markierung Start der Belichtung, 385 nm, 700 mA, 95 mW). Oben - Anstieg der Stromkurve über zwei Stufen. Unten - Anstieg der Stromkurve über eine große Stufe.

Bei genauerer Analyse der unteren Spur in Abb. 108 fiel auf, dass wie bei **OmpG-1** verschiedene Niveaus in den Stromkurven zu erkennen sind. Am Hauptniveau (H) ist zu erkennen, dass das Hybrid **OmpG-5** (0,71 nS) vor Belichtung unter der Leitfähigkeit von **OmpG-1** (0,80 nS) liegt, nach Belichtung aber auf ein höheres Niveau geht (0,86 nS). Die Leitfähigkeit erhöht sich nach Belichtung um 18%. Dieser Anstieg über das Niveau von unmodifiziertem **OmpG-1** lässt sich durch die Carbonsäurereste, die im Inneren des Kanals nach Abspaltung zurückbleiben, erklären. Die Carbonsäuren liegen bei pH = 7,4 deprotoniert vor und stellen damit zwei ionenziehende Reste dar, die den Stromfluss fördern könnten. Um die Hypothese zu belegen, dass die erhöhte Leitfähigkeit nach Abspaltung auf die Carbonsäurereste zurückzuführen ist, wurde **OmpG-6** gezielt hergestellt. **OmpG-1** wurde dazu analog zur Markierung mit DEACM **95** mit Iodessigsäure umgesetzt. Anschließend wurde die Leitfähigkeit für **OmpG-6** in einer Einzelkanalmessung bestimmt und verglichen. Die Leitfähigkeit befindet sich etwa im gleichen Bereich wie zuvor beobachtet nach Abspaltung von DEACM **25** (0,88 nS).

In Abb. 109 ist eine genaue Auswertung der unterschiedlichen Niveaus der unteren Spur aus Abb. 108 dargestellt. Im Strom-Spannungsgraphen wurden alle Leitfähigkeiten der einzelnen Niveaus 1-3 vor und nach Belichtung ausgewertet. Auffällig ist dabei, dass der Anstieg der Leitfähigkeit proportional zur Höhe ist. Das unterste Niveau (1) scheint unabhängig von der Modifikation zu sein.

Bei Analyse der Häufigkeit der Besetzung eines Niveaus (Abb. 109 unten) ist zu sehen, dass die photolabil geschützte Variante dazu neigt häufiger die reduzierten Niveaus (2,3) zu besetzen oder zu schließen (0). Dies verlagert sich nach Abspaltung deutlicher zum komplett offenen Niveau (3) und spiegelt sich auch in der Öffnungswahrscheinlichkeit wieder. Die Beständigkeit der Niveaus mit und ohne Modifikation bestätigt die zuvor beschriebene Dynamik im Rückgrat von **OmpG-1**, die unabhängig von der internen Modifikation stattfindet.



**Abb. 109:** Auswertung der Leitfähigkeiten vor (grau) und nach Belichtung (schwarz) von **OmpG-5** aus Abb. 108 unten. Oben links – Strom-Spannungskurve der einzelnen Niveaus mit Leitfähigkeiten. Oben rechts – graphische Darstellung der einzelnen Niveaus im Vergleich vor und nach Belichtung. Unten links – Zeit mit der ein bestimmtes Niveau besetzt ist. Unten rechts – prozentueller Anteil der Besetzung eines Niveaus im Vergleich der geöffneten Niveaus.

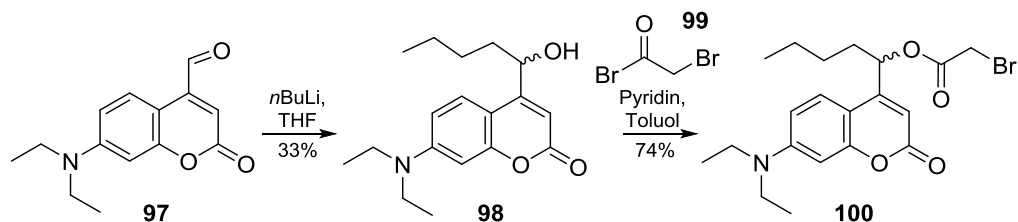
### 3.2.4 Charakterisierung von OmpG-Hybriden mit DEACM Derivaten

Durch die Modifikation mit DEACM konnte gezeigt werden, dass die Leitfähigkeit von **OmpG-1** reduziert werden kann, jedoch war der Effekt nur gering. Im nächsten Schritt wurde daher versucht den sterischen Anspruch des Chromophors zu erhöhen. Das Cumaringrundgerüst ist konjugiert und deshalb planar. Durch den starken Ionenstrom, der bei einer Einzelkanalmessung eingesetzt wird, werden die Moleküle so wahrscheinlich an die Porenwand gedrückt und stellen kein großes Hindernis mehr dar. Im Vergleich zur Kristallstruktur 2IWW von Grosse *et al.*<sup>[133]</sup> in der zu sehen ist,

dass ein eingeführter Dansylrest, der ebenfalls planar ist, an der Kanalwand liegt, unterstützt die Aussage. Aus synthetischer Sicht gibt es nur wenige Ansatzpunkte, die für eine Modifikation des DEACM-Gerüsts geeignet sind, um die Photochemie so wenig wie möglich zu beeinflussen. In Kapitel 1.3.2 wurden bereits verschiedene Cumarinderivate auf DEACM-Basis vorgestellt. BCMACN **37** und DEAC450 **42** haben gute photochemische Eigenschaften, sind jedoch ebenfalls planar. Aus diesem Grund wurde entschieden eine andere Stelle zur Modifikation zu wählen. An der 3'-Methylgruppe soll ein neues, stereogenes Zentrum eingeführt werden, um den sterischen Anspruch zu erhöhen.

(1) Herstellung und BLM-Messung von **OmpG-7** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2*n*Butyl-DEACM)

In einem ersten Ansatz wurde versucht einen *n*Butylrest an der C3'-Position einzuführen. Dazu wurde ausgehend von Cumarinaldehyd **97** mit *n*BuLi eine Reduktion des Aldehyden zum Alkohol durchgeführt unter Erhalt des racemischen Gemischs **98**. Im nächsten Schritt wurde analog zu DEACM **95** der Linker **99** für die Bindung an OmpG in guter Ausbeute angebracht unter Erhalt von Verbindung **100**.

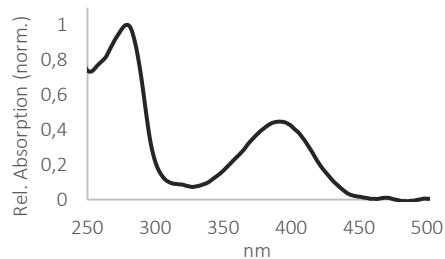


**Abb. 110:** Syntheseroute zur Installation von *n*Butyl an C3' ausgehend von Aldehyd **97** durch Reduktion mit *n*BuLi. Verknüpfung des Bromacetat Linkers analog zu Verbindung **95** unter Erhalt von Verbindung **100**.

Das Anbringen der photolabilen Schutzgruppen **100** sowie die Aufreinigung wurden analog zu **OmpG-5** durchgeführt. Das Hybrid **OmpG-7** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2*n*Butyl-DEACM) wurde anschließend auf die Markierungseffizienz überprüft. Dabei wurden wie zuvor die Extinktionskoeffizienten von Verbindung **100** bestimmt (siehe Tabelle 12) und der Extinktionskoeffizient bei 280 nm berechnet. Mit den bekannten Extinktionskoeffizienten wurden die Konzentrationen von Protein und photolabiler Schutzgruppe berechnet. Dabei fällt auf, dass die Cumarinkonzentration mit 22,2  $\mu$ M zu niedrig ist im Vergleich zur Proteinkonzentration von 12,8  $\mu$ M und damit die Markierungseffizienz nur bei 87% liegt (siehe Abb. 111).

**Tabelle 12:** Extinktionskoeffizienten der charakteristischen Banden von OmpG und nButyl-DEACM.

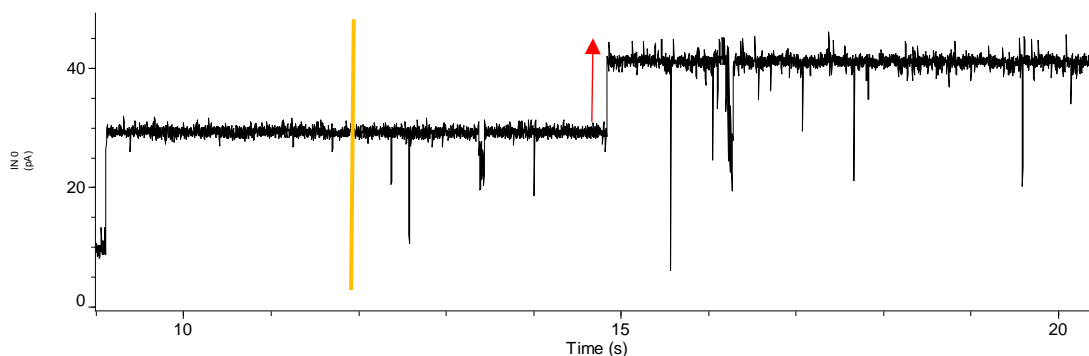
	$\epsilon_{280\text{ nm}}$	$\epsilon_{390\text{ nm}}$
	L/(mol·cm)	L/(mol·cm)
<b>OmpG-1</b>	71260	0
<b>nButyl-DEACM</b>	3500	20200
<b>OmpG-7</b>	78260	20200



<b>OmpG-4</b>	<b>unit</b>	<b>280 nm</b>	<b>390 nm</b>
$\epsilon$	L/mol·cm	78260	20200
<b>A</b>	a.u.	1.00	0.447
<b>C (calcd.)</b>	$\mu\text{M}$	12.8	22.2

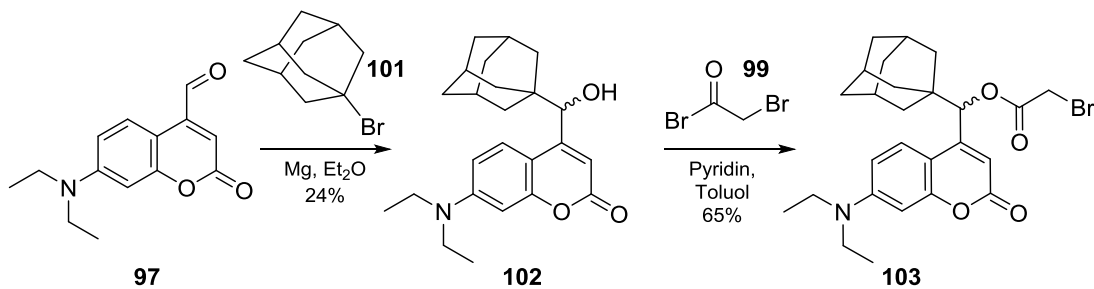
**Abb. 111:** Bestimmung der Markierungseffizienz von **OmpG-7**. Links – Absorptionsspektrum des Hybrids mit Berechnung der Konzentrationen von Protein (280 nm) und Markierung (390 nm) rechts. Für weitere Informationen siehe Abb. 101.

In Abb. 112 ist eine spannungsabhängige Einzelkanalmessung von **OmpG-7** dargestellt. Die Leitfähigkeit vor Belichtung wird durch die *n*Butylreste auf 0,56 nS reduziert. Nach kurzer Belichtungszeit (< 5 s) bei 385 nm (700 mA, 95 mW) findet ein deutlicher Anstieg des Stromflusses statt. Die reduzierte Leitfähigkeit steigt von 0,56 nS auf 0,86 nS in einem Schritt. Dies entspricht einem Anstieg von 35%, was doppelt so hoch ist wie der Effekt von **OmpG-5**. Die Leitfähigkeit des Abspaltprodukts nach Belichtung entspricht dem erwarteten Niveau für **OmpG-6** und bestätigt damit eine erfolgreiche Abspaltung. Die Einführung der *n*Butylgruppe und dem damit verbundenen stereogenen Zentrum hat einen großen Einfluss auf die räumliche Blockade der photolabilen Schutzgruppe und den gewünschten Effekt gezeigt.

**Abb. 112:** Einzelkanalmessung von **OmpG-7** bei einer angelegten Spannung von 40 mV mit Belichtung bei 385 nm (700 mA, 95 mW, Start der Belichtung gelbe Linie). Nach wenigen Sekunden ist ein Anstieg des Stromflusses zu erkennen.

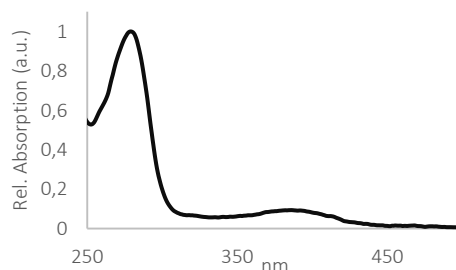
(2) Herstellung und BLM-Messung von **OmpG-8** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2xAdamantan-DEACM)

Aufgrund der guten Ergebnisse von **OmpG-7** wurde weiterhin versucht, den sterischen Anspruch an dieser Stelle zu vergrößern, um eine maximale Blockade des Kanals zu erhalten. Aus diesem Grund wurde als nächstes versucht, anstelle der *n*Butylgruppe einen Adamantanrest einzuführen. Ausgehend von Cumarinaldehyd **97** wurde Adamantan durch Reduktion des Aldehyden zum Alkohol über eine Grignardreaktion angebracht (**102**). Die Insertion von Magnesium stellte große Probleme dar und konnte erst nach mehreren Versuchen mit einem großen Magnesiumüberschuss erfolgreich dargestellt werden. Der Linker (**99**) wurde analog zu den anderen Cumarinvarianten mit akzeptabler Ausbeute angebracht unter Erhalt von Verbindung **103**.



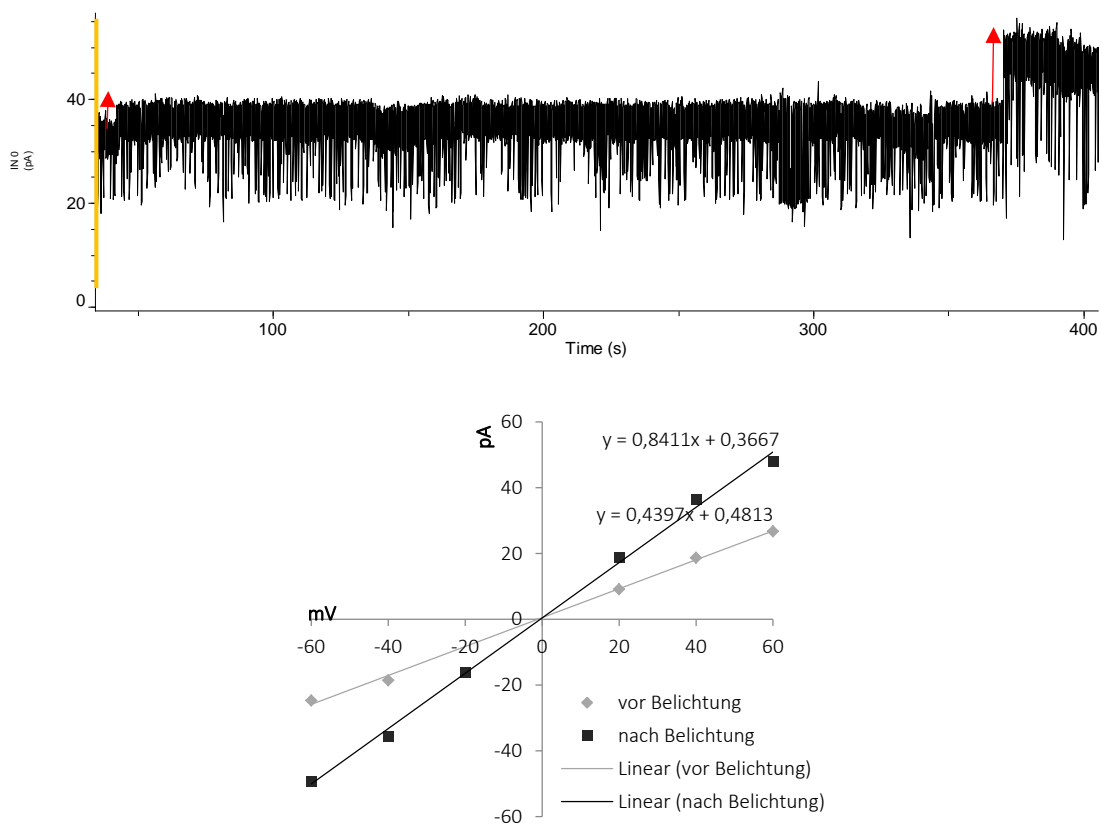
**Abb. 113:** Syntheseroute zur Einführung von Adamantan am C3' durch ein Grignardreagenz. Installation des Linkers analog zu Verbindung **95/97**.

Nach erfolgreicher Synthese wurde Verbindung **103** zur Markierung von **OmpG-1** eingesetzt. Dabei musste Coumarin **103** in CHCl<sub>3</sub> gelöst werden, da die Löslichkeit in MeCN aufgrund der Hydrophobizität des Adamantanrests nicht ausreichte. Bei Zugabe zum Markierungspuffer (1:6 – CHCl<sub>3</sub>:Puffer) fiel direkt eine große Menge an Niederschlag aus. Die Markierung erfolgte an der bereits rückgefalteten Pore und wurde nach Protokoll aufgereinigt. Anhand des Absorptionsspektrums (Abb. 114) ist zu erkennen, dass nur eine unvollständige Markierung stattgefunden hat, was auf die schlechte Löslichkeit in Wasser zurückzuführen ist.



**Abb. 114:** UV/Vis-Absorptionsspektrum von **OmpG-8**.

In Einzelkanalmessungen wurde für **OmpG-8** eine reduzierte Leitfähigkeit gemessen, die mit 0,44 nS noch weiter unterhalb der Leitfähigkeit von **OmpG-7** liegt. In Abb. 115 ist eine Öffnung des Kanals durch Belichtung über zwei sehr weit auseinanderliegende Stufen zu erkennen. Die Leitfähigkeit nach Abspaltung ist mit 0,84 nS wiederum **OmpG-6** zuzuordnen. Die weitere Minimierung der Restleitfähigkeit bestätigt, dass die Einführung des stereogenen Zentrums einen positiven Einfluss auf die räumliche Blockade ausübt. Während ein *n*Butylrest (**OmpG-7**) am C3' die Reduktion der Leitfähigkeit im Vergleich zu **OmpG-5** verdoppelt hat (35%), wird sie durch Adamantan an derselben Stelle (**OmpG-8**) um 39% verringert. Im Vergleich der Größe der beiden Reste an C3' hat die Einführung des Restes an dieser Stelle eine große Auswirkung auf das System, die Natur des Restes eher eine untergeordnete Rolle.

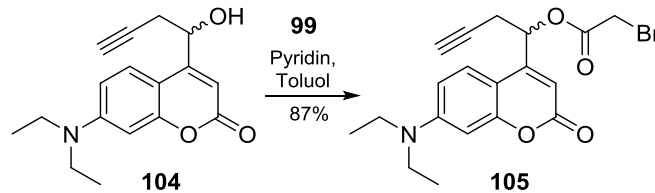


**Abb. 115:** Oben - Einzelkanalmessung für **OmpG-8** bei einer angelegten Spannung von 40 mV. Reduzierte Leitfähigkeit vor Belichtung mit 385 nm, 700 mA, 95 mW (Start der Belichtung gelbe Linie). Danach ist ein Anstieg über zwei Stufen zu beobachten. Unten - Graphische Auswertung der Messreihe mit Bestimmung der Leitfähigkeit vor (grau) und nach Belichtung (schwarz).



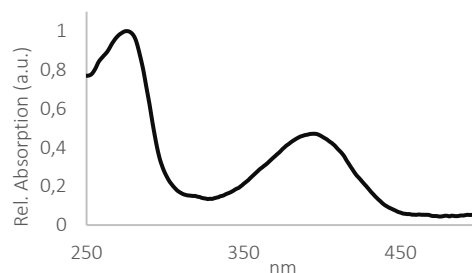
(3) Herstellung und BLM-Messung von **OmpG-9** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2xAlkin-DEACM)

Mit dem Ziel eine vollständige Blockade von **OmpG-1** zu bewirken, wurde ausgehend von den Ergebnissen von **OmpG-7** und **OmpG-8** eine weitere Strategie verfolgt. Da festgestellt wurde, dass eine Modifikation an der 3'-Position einen positiven Einfluss hat, die verwendeten Reste in der Größenordnung jedoch eine untergeordnete Rolle spielen, wurde ein System gesucht, das große Modifikationen erlaubt. Da vermutet wurde, dass eine Markierung und auch eine Rückfaltung mit einem großen Molekül nicht möglich ist, wurde eine Click-Reaktion angestrebt, die ein postsynthetisches Anbringen erlaubt. Nach Anlehnung an Alkin-DEACM-markierte DNA von Seyfried *et al.*<sup>[222]</sup> wurde ein Chromophor mit Alkin gesucht, das weiterhin zum Anhängen von großen Resten genutzt werden kann. Eine DEACM-basierte Variante mit Alkin stellte sich dabei als ideales Templat heraus. Die von Patrick Seyfried synthetisierte Verbindung **104** wurde zur Markierung mit dem Bromacetat-Linker **99** in guter Ausbeute zu Verbindung **105** umgesetzt.



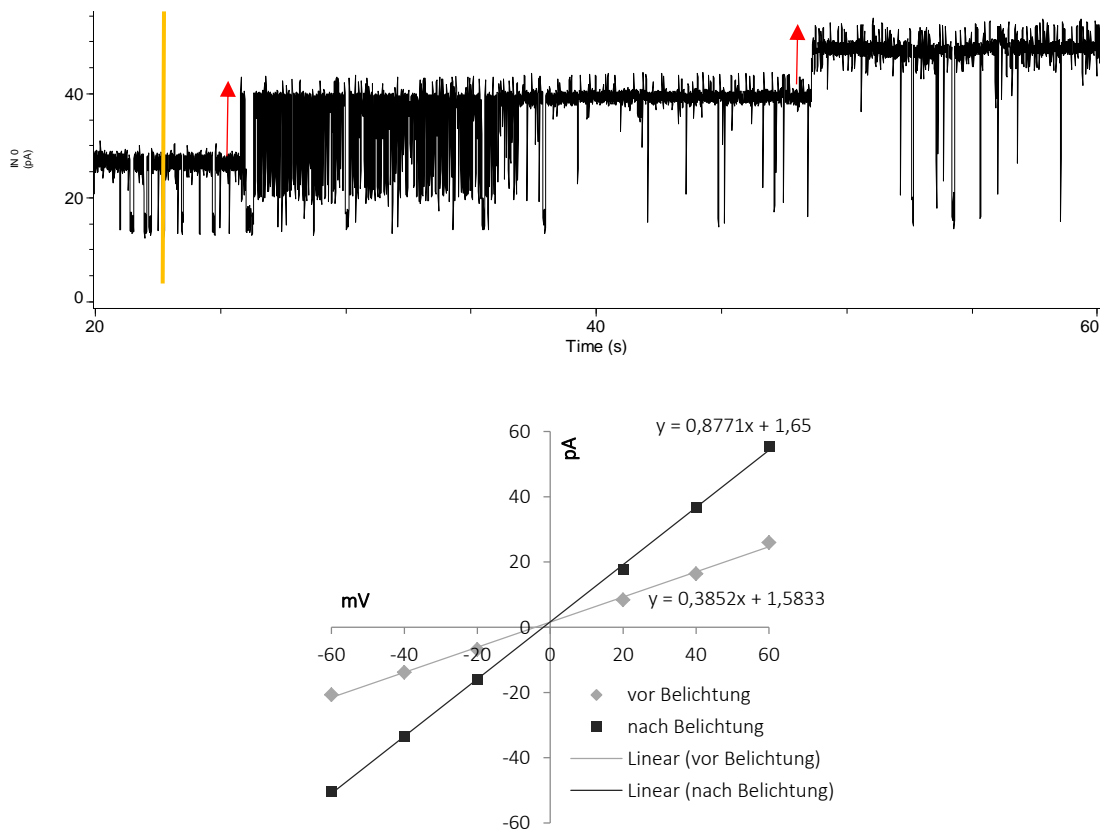
**Abb. 116:** Synthese von Verbindung **105** ausgehend Alkin-DEACM Alkohol **104**.

Verbindung **105** wurde anschließend für die Markierungsreaktion von **OmpG-1** zu **OmpG-9** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2xAlkin-DEACM) eingesetzt. Dabei wurde wieder die Markierung am nativen Protein ohne Probleme durchgeführt im Gegensatz zur anderen Reihenfolge. Beim Versuch erst die Markierung einzuführen und im zweiten Schritt rückzufalten, wurde kein Produkt erhalten. Die Markierung konnte ohne Komplikation am Protein eingeführt werden, jedoch hat sich das Protein nicht mehr rückgefaltet, sondern ist dabei in der Reaktionslösung ausgefallen.



**Abb. 117:** UV/Vis-Absorptionsspektrum von **OmpG-9**.

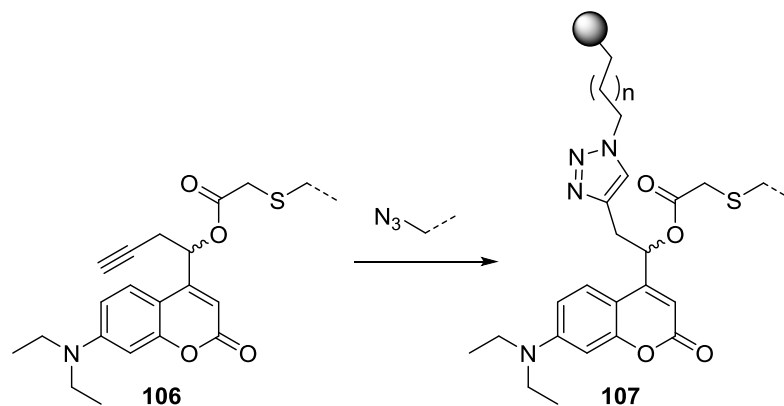
Die Charakterisierung mittels BLM-Messung zeigte wie erwartet eine verminderte Leitfähigkeit durch die photlabilen Schutzgruppen. Dabei wurde eine Leitfähigkeit von 0,38 nS bestimmt, was nochmal unterhalb den bisher gemessenen Werten liegt und 34% der Leitfähigkeit von Abspaltprodukt **OmpG-6** beträgt. In Abb. 118 ist zu sehen, dass durch Belichtung bei 385 nm die Abspaltung ausgelöst wird, gefolgt von einem Anstieg der Stromkurve über zwei definierte Stufen. Leider konnte dieses vielversprechende Ereignis in keinem weiteren Versuch reproduziert werden. Da die photolabile Schutzgruppe auf DNA keinerlei Probleme in der Abspaltung oder unerwünschte Nebenprodukte zeigt, wird vermutet, dass die Umgebung im Inneren der Pore ein Problem für den photochemischen Mechanismus darstellen muss.



**Abb. 118:** Einzelkanalmessung von **OmpG-9** bei einer angelegten Spannung von 40 mV. Reduzierte Leitfähigkeit vor Belichtung mit 385 nm, 700 mA, 95 mW (Start der Belichtung gelbe Linie). Danach ist ein deutlicher Anstieg über zwei Stufen zu beobachten. Unten – graphische Auswertung der Messreihe mit Bestimmung der Leitfähigkeit vor (grau) und nach Belichtung (schwarz).

### 3.2.5 Click-Reaktionen mit Alkin-DEACM-OmpG-Hybriden

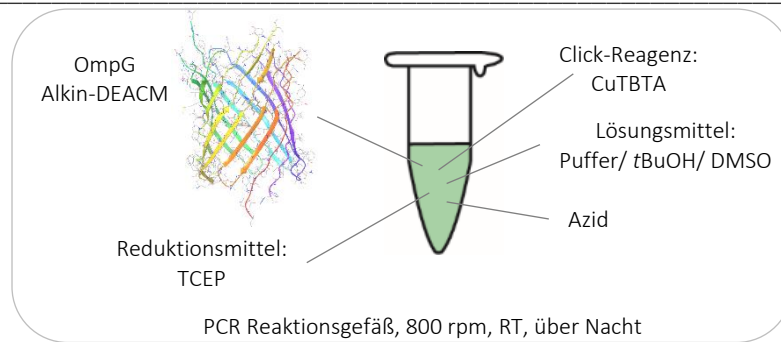
Die Installation einer Alkin-haltigen photolabilen Schutzgruppe bietet die Möglichkeit, große Moleküle nachträglich an den Chromophor zu binden. Cumarin **105** ist kovalent über einen Thiolrest an OmpG gebunden. Die freie Alkinfunktion kann in einer Click-Reaktion mit einem Azid reagieren, welches ein Cargomolekül zum Verschließen der Pore trägt. Durch Belichtung findet ein Bindungsbruch zwischen Cumarin und OmpG statt. Mit dem Cumarin wird der über einen Triazolring gebundene Rest abgespalten und die Blockade sollte sich in der Pore lösen. Das Konzept ist in Abb. 119 dargestellt.



**Abb. 119:** Schematische Darstellung der Click-Reaktion von OmpG-gebundenem Alkin-DEACM und einem zweiten Molekül mit großem sterischen Anspruch mit Azid-Funktion in der Pore. Durch Ausbildung des Triazolrings wird das Molekül kovalent an DEACM gebunden.

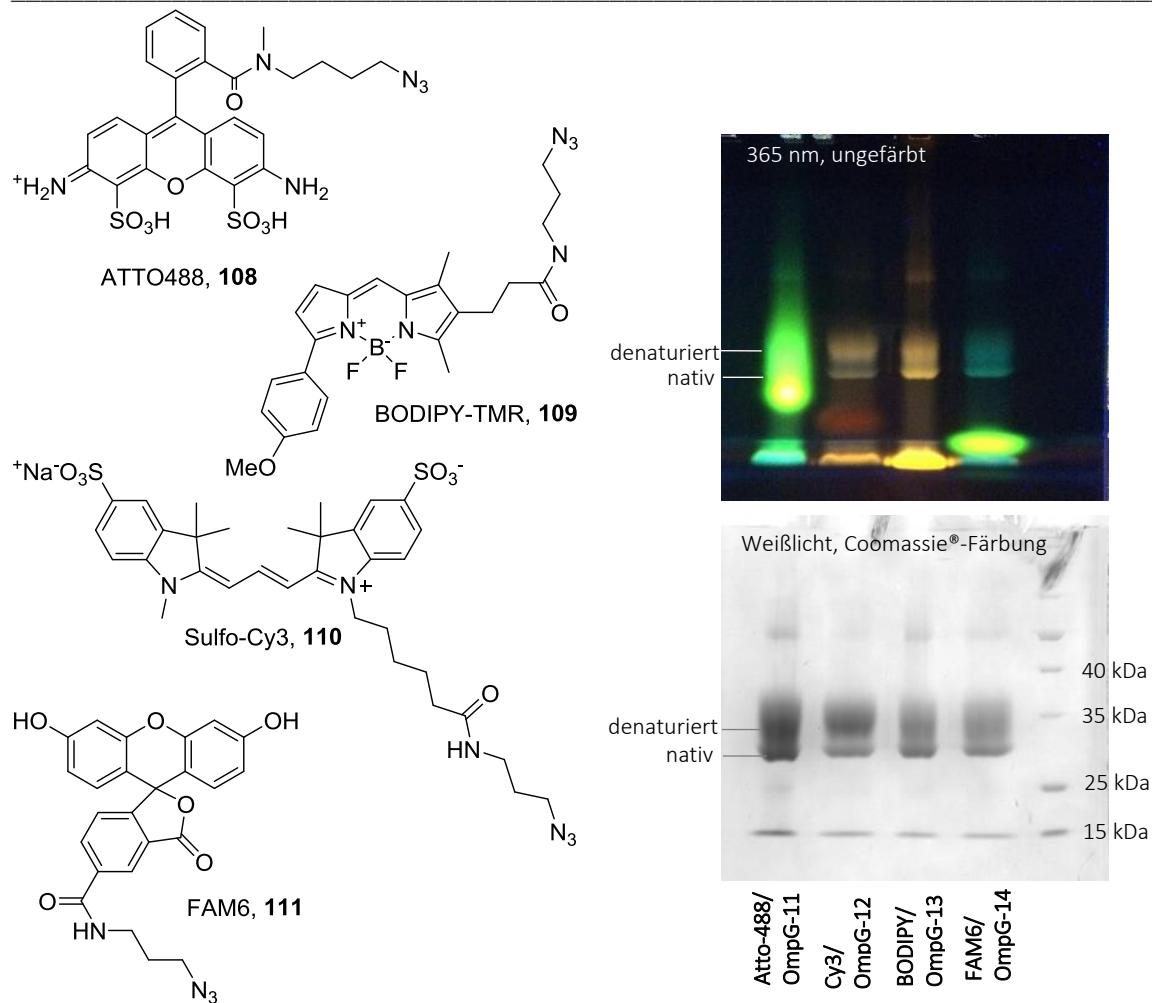
#### (1) Herstellung der OmpG-Click-Hybride

Für die Click-Reaktion sind mehrere Komponenten nötig, die für eine Reaktion aufeinander abgestimmt werden müssen (Abb. 120). Neben Alkin und Azid, sind vor allem die Kupferspezies im TBTA-Komplex sowie das Reduktionsmittel zur Generierung des aktiven Cu(I) wichtig. Zum Testen der Reaktionsbedingungen wurde die Einfachmutante **OmpG-3** gewählt, die mit Alkin-DEACM **105** erfolgreich umgesetzt wurde zu **OmpG-10** (OmpG/ $\Delta$ L6-C209/Alkin-DEACM). Dabei wurden Ansatzgrößen von 100  $\mu$ L gewählt, die zur Analyse der Reaktion in einem SDS PAGE untersucht wurden. Zur guten Detektion im Gel wurde das Azid des Fluorophors ATTO550 eingesetzt. Durch Variation der Lösungsmittelkomposition der Reaktion wurde festgestellt, dass das Protein nur ab einer Puffermenge von 60% stabil in seiner nativen Form bleibt. Eine optimale Bedingung bildet die Mischung Puffer 70% - *t*BuOH:DMSO (1:3) 30% bei einer Inkubation unter starkem Schütteln.



**Abb. 120:** Reaktionsbedingungen der Click-Reaktion an OmpG. Katalysator mit Ligand CuTBTA, Reduktionsmittel für Cu(II) -> Cu(I) TCEP, Azid mit großem Rest, **OmpG-9**, Lösungsmittelgemisch aus Puffer, tBuOH und DMSO.

Nach Festlegung der optimalen Reaktionsbedingungen wurde die Click-Reaktion an **OmpG-9** und **OmpG-10** mit vier verschiedenen Fluorophoren wiederholt (Abb. 121 links). Dabei wurden bewusst verschiedene Grundgerüste ausgewählt, da unklar war, welche Größe in den Kanal passt und aufgrund von Un-/Polarität nicht in die Pore diffundiert zur Reaktion. Eingesetzt wurden die in Abb. 121 gezeigten Azide Rhodamin ATTO488-Azid (**108**), BODIPY-TMR-Azid (**109**), Cyanin-basiertes Sulfo-Cy3-Azid (**110**) und Fluoreszinderivat FAM6-Azid (**111**). Die Reaktionsgemische wurden wie zuvor in einem SDS PAGE analysiert. Durch Anregung der Fluoreszenz durch 365 nm wurde zuerst die Reaktion beurteilt. Nach Coomassie®-Färbung der Proteinbanden, konnte weiterhin eine Aussage über die Stabilität des Konstrukts gegeben werden. In Abb. 121 rechts ist im Gel zu erkennen, dass die Proteinbande in der entsprechenden Farbe des Fluorophors fluoresziert. Dies bedeutet, dass der Fluorophor in der Pore sitzt und vielleicht gebunden hat. Anhand der Coomassie®-gefärbten Proteinbande ist zu sehen, dass eine teilweise Denaturierung stattgefunden hat. Die intakte Bande konnte erfolgreich aus dem Gel extrahiert werden zur weiteren Verwendung. Es kann keine Aussage über die Effizienz der Click-Reaktion in der Pore gegeben werden.

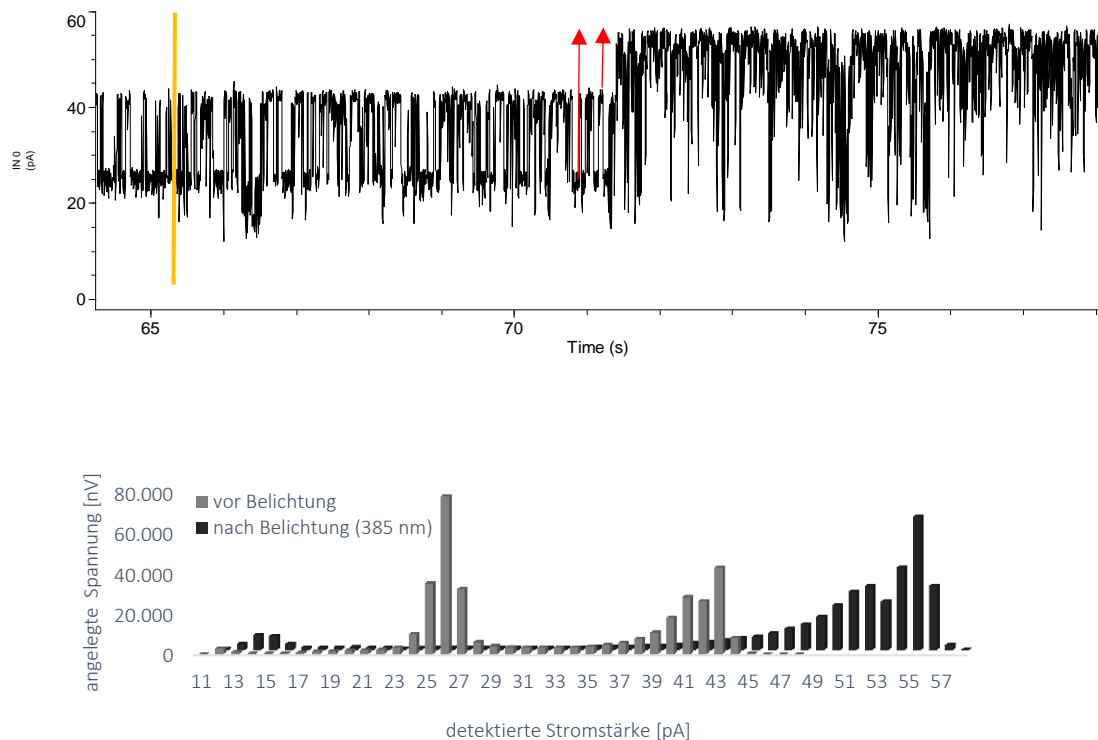


**Abb. 121:** Übersicht der Clickreaktionen mit Farbstoffen. Links – Strukturen der eingesetzten Fluorophor-Azide ATTO488 (108, OmpG-11), BODIPY-TMR (109, OmpG-12), Sulfo-Cy3 (110, OmpG-13) und FAM6 (111, OmpG-14). Rechts – 10% SDS PAGE der Reaktionsansätze, oben bei Anregung der Fluoreszenz durch 365 nm und nach Coomassie®-Färbung im Weißlicht. Es findet eine leichte Denaturierung statt. Die Proteinbanden fluoreszieren, was auf eine erfolgreiche Click-Reaktion hindeutet.

Alle durch Click-Reaktion hergestellten Varianten basierend auf der Doppelmutante **OmpG-1** wurden mittels Einzelkanalmessungen analysiert. Unter den selben Bedingungen wie zuvor wurde erwartet, dass sich ein Hybridmolekül in die Membran einbaut und anschließend mit 385 nm belichtet. Dabei konnte für alle Varianten eine Reduktion der Leitfähigkeit in spannungsabhängigen Einzelkanal-messungen beobachtet werden. Jedoch wurde wie im Fall von Alkin-Derivat **OmpG-9** nur vereinzelt ein Anstieg der Leitfähigkeit durch Belichtung detektiert. Für ATTO488-modifiziertes **OmpG-11** und BODIPY-modifiziertes **OmpG-13** wurde in mehreren Messreihen keine Veränderung durch Belichtung mit 385 nm detektiert. Im Fall von Sulfo-Cy3-modifiziertem **OmpG-12** und FAM6-modifiziertem **OmpG-14** konnte in einmaligen Ereignissen eine Veränderung durch Belichtung gesehen werden.

(2) BLM-Messungen von **OmpG-12** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2xAlkin-DEACM/Sulfo-Cy3)

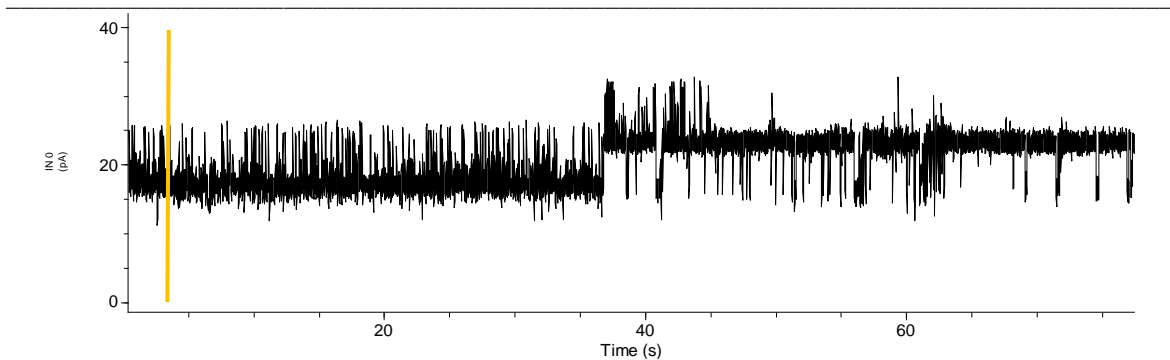
In der spannungsabhängigen Einzelkanalmessung von **OmpG-12** ist zu erkennen, dass der Kanal sehr unruhig ist (siehe Abb. 120). Durch Belichtung geht die Leitfähigkeit auf ein höheres Niveau mit nur noch einem Hauptniveau. In der graphischen Auswertung der Population in **Abb. 122** unten wird verdeutlicht, dass vor Belichtung mit 385 nm zwei definierte Zustände vorliegen, die nach Abspaltung in ein höheres Hauptniveau mit kurzen Schließungen übergehen. Dies spricht dafür, dass der Chromophor an die Alkinfunktion gebunden hat, aber keine große Blockade darstellt. Das Cy3-Gerüst ist planar und hat einen langen Linken. Es liegt nahe, dass der Chromophor nicht ganz in der Pore sitzt oder sich ähnlich zu DEACM **96** an die Wand legen kann.



**Abb. 122:** Einzelkanalmessung von **OmpG-12** bei einer angelegten Spannung von 40 mV (Oben) mit Belichtung bei 385 nm, 700 mA, 95 mV (gelbe Linie Start der Belichtung). Unten – Verteilung der Besetzung der einzelnen Niveaus vor (grau) und nach Belichtung (schwarz) mit 385 nm.

(3) BLM-Messungen von **OmpG-14** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2xAlkin-DEACM/FAM6)

**OmpG-14** hat im Vergleich zu **OmpG-12** eine geringere Leitfähigkeit, die hauptsächlich geschlossen mit kurzen Öffnungen vorliegt. Durch Belichtung steigt die Leitfähigkeit, aber nicht auf den erwarteten Wert für das Abspaltprodukt **OmpG-6**. Hier findet eine Inversion der Besetzung statt, was nicht für eine Abspaltung spricht. Es könnte sein, dass das Abspaltprodukt noch in der Pore sitzt, jedoch ist der Druck der Ionen, die durch den Kanal fließen, so groß, dass dies unwahrscheinlich erscheint.



**Abb. 123:** Spannungsabhängige Einzelkanalmessung von **OmpG-14** bei 40 mV mit Belichtung (385 nm, 700 mA, 95 mW, gelbe Linie Start der Belichtung).

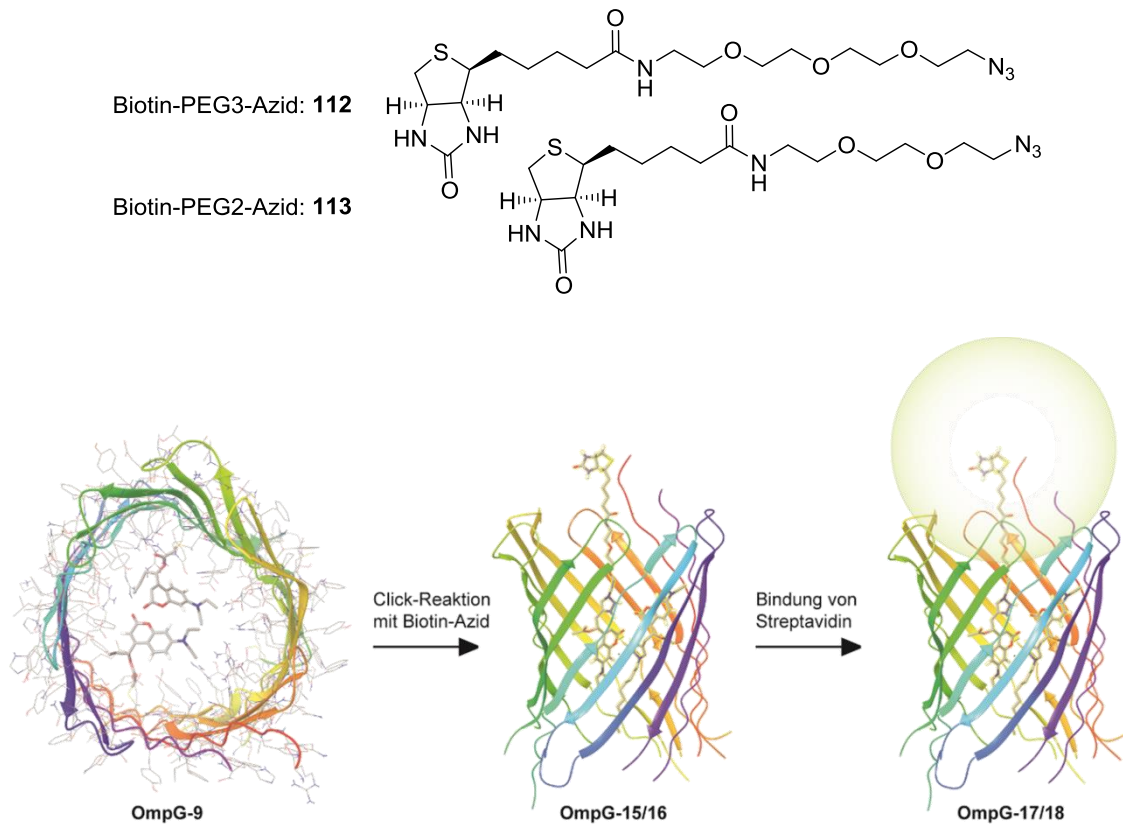
Die hergestellten Hybride aus **OmpG-9** mit gebundenen Fluorophoren zeigten alle eine verminderte Leitfähigkeit, aber Defizite in der Photochemie. Der Einsatz von Fluorophoren war hilfreich für die Analyse und Etablierung der Methode. Jedoch sind Fluorophore selbst absorbierende Chromophore. Probleme bei der Abspaltung könnten durch unvorhersehbare Quenchingmechanismen eintreten, aufgrund der räumlichen Nähe von photolabiler Schutzgruppe und Fluorophor. Wegen der schlechten photochemischen Eigenschaften wurden sie nicht weiter verfolgt.

#### (4) Herstellung eines OmpG-Streptavidin-Komplexes

In einem weiteren Versuch zur Blockade des Kanals wurde auf einen Fluorophor als Reaktionspartner in der Click-Reaktion verzichtet. Es wurde Biotin ausgewählt, welches über einen Kette an Alkin-DEACM gebunden werden soll. Biotin soll so an die Pore gebunden sein, dass es noch in der Lage ist, Streptavidin zu binden, welches dann die Pore verschließen soll. Dazu wurde eine Evaluation des Abstands von der photolabilen Schutzgruppe am Thiol bis zur Öffnung des Kanals in der Kristallstruktur 4CTD durchgeführt. Daraufhin wurde entschieden, zwei unterschiedlich lange PEG-Linker mit terminalem Azid an Biotin zu binden. Eine PEG-2- und PEG-3-Einheit haben voraussichtlich die richtige Länge, dass Biotin die Bindetasche von Streptavidin erreichen kann und gleichzeitig nicht zu viel Spielraum für die Öffnung der Pore vorhanden ist (siehe Abb. 124).

**OmpG-9** wurde dafür in einer Click-Reaktion mit Azid **112** oder **113** verknüpft (**112** -> **OmpG-15**; **113** -> **OmpG-16**). Anschließend wurde eine Aufreinigung über SDS PAGE zur Isolation durchgeführt, um sicher zu stellen, dass keine überschüssigen Reste von Biotin vorhanden sind. Ein Streptavidin besitzt vier Bindestellen für Biotin mit einem  $K_D$  im pikomolaren Bereich.<sup>[223]</sup> Aus

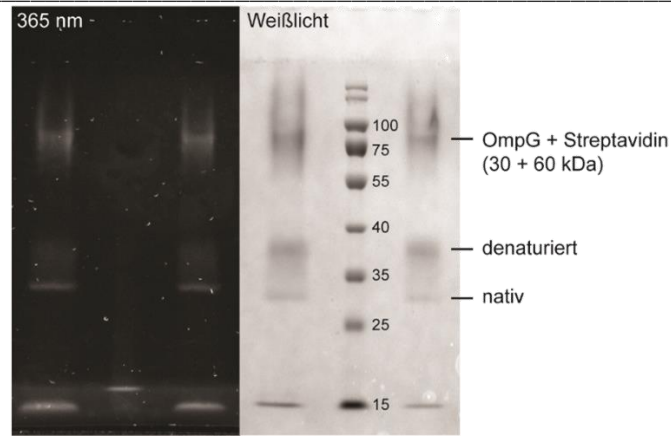
diesem Grund wurde im nächsten Schritt, der Umsetzung mit Streptavidin, darauf geachtet, dass eine hohe Verdünnung vorliegt, um Mehrfachbindungen zu vermeiden.



**Abb. 124:** Oben - Eingesetzte Biotin-PEG-Azide zur Reaktion mit **OmpG-9**. Unten - Schematische Darstellung der Reaktionsschritte gezeichnet in der Kristallstruktur 4CTD. Im ersten Schritt wird Biotin über einen Linker in der Pore mittels Click-Chemie befestigt und über SDS PAGE aufgereinigt (**OmpG-15/16**). Anschließend soll Biotin an Streptavidin gebunden werden zur Verschiebung der Pore (**OmpG-17/18**).

Die Aufreinigung des Komplexes aus OmpG mit Streptavidin (**OmpG-17/18**) wurde wieder über ein SDS PAGE durchgeführt. In Abb. 125 ist das Gel der Reaktionsansätze durch Anregung bei 365 nm und nach Coomassie®-Färbung im Weißlicht zu sehen. Neben der charakteristischen OmpG-Bande bei 29 kDa ist eine weitere Bande zwischen 70 und 100 kDa zu sehen, die vom Molekulargewicht nur auf einen Komplex aus einem OmpG mit einem Streptavidin passt. Die Fluoreszenz der Banden bestätigt die Anwesenheit von gebundenem Cumarin. Beide Konstrukte wurden wie zuvor aus dem Gel extrahiert und in Einzelkanalmessungen analysiert.

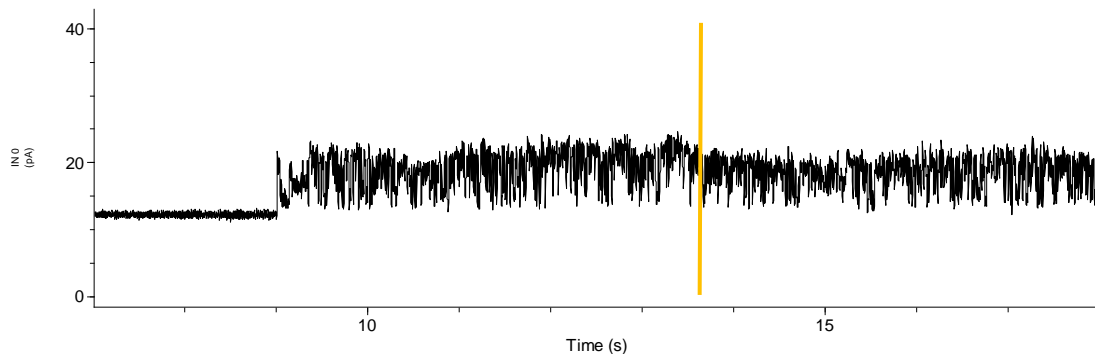




**Abb. 125:** 10% SDS PAGE des Reaktionsansatzes von **OmpG-15** (linke Spur)/**OmpG-16** (rechte Spur) und Streptavidin mit dem Produkt **OmpG-17/18**. Links – Anregung der Fluoreszenz von DEACM durch Belichtung mit 365 nm, Rechts – Proteinbanden Coomassie®-gefärbt im Weißlicht. Neben nativem und denaturiertem OmpG ist eine neue fluoreszierende Bande zwischen 70 und 100 kDa zu sehen, dessen Migration nur auf einen Komplex aus einem OmpG und einem Streptavidin passt.

(5) BLM-Messung von **OmpG-17** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2xAlkin-DEACM/Biotin-PEG2/  
Streptavidin)

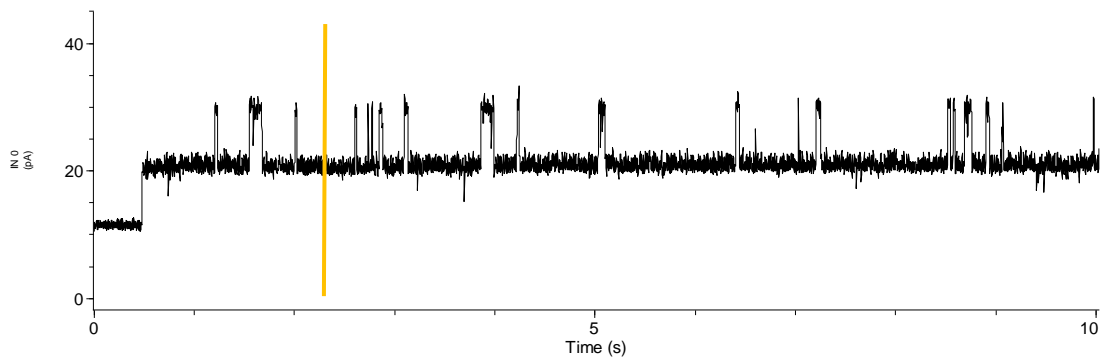
**OmpG-17** zeigte in mehreren Messreihen eine Minimalleitfähigkeit, die kein definiertes Niveau besitzt. Die Leitfähigkeit befindet sich im Bereich zwischen 0,1 und 0,2 nS. Dies spricht für die Blockade des Kanals durch den gebundenen Streptavidin-Komplex. Eine Belichtung bei 385 nm zeigte jedoch wie zuvor keine Veränderung der Stromflusses.



**Abb. 126:** Einzelkanalmessung von **OmpG-17** bei angelegter Spannung von 40 mV. Es wird nur eine minimale Leitfähigkeit detektiert, die sich durch Belichtung mit 385 nm (700 mA, 95 mW, gelbe Linie) nicht verändert.

(6) BLM-Messung von **OmpG-18** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154/2xAlkin-DEACM/Biotin-PEG3/  
Streptavidin)

**OmpG-18** zeigte in spannungsabhängigen Einzelkanalmessungen zwei definierte Stufen (siehe Abb. 127), ein Grundniveau mit kurzen Öffnungen. Dabei beträgt die Leitfähigkeit des Grundniveaus 0,25 nS und die des höheren Niveaus eine Leitfähigkeit von 0,45 nS. Im Vergleich zu **OmpG-17** ist der Kanal ruhiger und weiter geöffnet. Dies korreliert mit der zusätzlichen PEG-Einheit, die dem Komplex mehr Spielraum gibt aus der Pore herauszugehen. Durch Belichtung bei 385 nm konnte auch hier keine Änderung im Stromfluss erkannt werden.

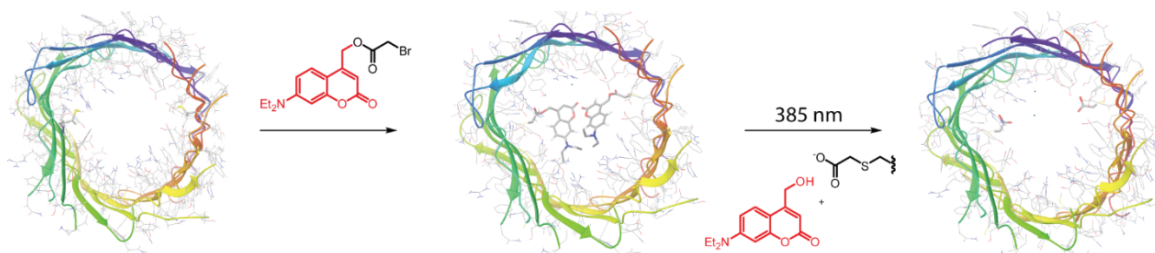


**Abb. 127:** Einzelkanalmessung von **OmpG-18** bei einer angelegten Spannung von 40 mV. Es gibt ein stabiles, kleines Grundniveau mit kurzen Öffnungen. Eine Belichtung bei 385 nm (700 mA, 95 mW, gelbe Linie Start der Belichtung) zeigt keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit.

Alle Alkin-DEACM-haltigen Hybride zeigten in Einzelkanalmessungen vielversprechende Ergebnisse bezogen auf die Reduktion der Leitfähigkeit. Die ausbleibende Abspaltung nach Belichten im Bereich des Absorptionsmaximums ist jedoch ein großes Problem. Schon die Rückfaltung von Alkin-DEACM gebundenem OmpG funktionierte überraschenderweise nicht. Es wurde vermutet, dass ein Quenching der Fluorophore die Abspaltung von DEACM verhindert. Da dasselbe Problem bei Biotin/Streptavidin auftritt, muss eine andere Ursache vorliegen. Die Probleme waren nicht vorherzusehen, da Alkin-modifizierte Reste häufig für die Markierung von Proteinen mit Fluorophoren verwendet werden als z.B. nicht-natürliche Aminosäure. Da die Probleme schon mit **OmpG-9** auftraten, muss die Deaktivierung des Chromophors mit der Alkinfunktion zusammenhängen, auch wenn dieselbe photolabile Schutzgruppe in anderen Systemen gut funktioniert.<sup>[222]</sup>

### 3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel des vorliegenden Projektes war die Blockade des Membranproteins OmpG durch den Einbau von photosensitiven Modifikationen im Inneren des Kanals. OmpG dient dabei als perfektes Modellsystem, da es eine  $\beta$ -Fasstruktur aus nur einem Polypeptid bildet. Durch Deletion des charakteristischen Loop-6 ist der Kanal sehr ruhig, sodass kleinste Veränderungen durch Modifikationen beobachtet werden können. Nach Expression des Proteins folgten die Rückfaltung in die native Form sowie die Markierung mit dem photosensitiven Molekül. Die Arbeitsschritte konnten mit der Mutante **OmpG-1** (OmpG/ $\Delta$ L6-C13-C154) variabel in der Reihenfolge durchgeführt werden. **OmpG-2** (OmpG/ $\Delta$ L6-C92-C209) zeigte Probleme in der Rückfaltung nach Markierung sowie eine allgemeine Instabilität über die Zeit. Zur Markierung wurde die photolabile Schutzgruppe DEACM eingesetzt, die mit einem Bromacetatlinker **95** kovalent an die Thiolgruppen der Cysteine angebracht wurden. Der Linker ist ein Kompromiss aus selektiver, postsynthetischer Markierung der Cysteine und dem Erhalt der Photoaktivität, was nicht mit spurlosem Abspalten der photolabilen Schutzgruppe vereinbar war (siehe Abb. 128). Aus diesem Grund bleibt eine Carbonsäure am Thiol nach Belichtung des Chromophors zurück. Die Bildung des Hybrids wurde massenspektrometrisch (Uni Marburg) und über Absorption bestätigt. Eine erfolgreiche Abspaltung von DEACM konnte in einem SDS PAGE sowie in spannungsabhängigen Einzelkanalmessungen in *Black Lipid* Membranen gezeigt werden.



**Abb. 128:** Schematische Darstellung der Verknüpfung von DEACM im Inneren der Pore OmpG über zwei Cysteinseitenketten (Blick von oben in die Pore). Durch Belichtung bei 385 nm wird der Cumarinalkohol abgespalten und hinterlässt zwei Carboxylreste in der Pore zurück.

Nach Etablierung des Systems wurde weiterhin versucht, den Effekt der Blockade des Kanals zu vergrößern, da die Reduktion der Leitfähigkeit durch DEACM nur 18% betrug. Die zurückbleibenden Carbonsäurereste bewirkten einen Anstieg der Leitfähigkeit von 0,8 auf 0,86 nS. Durch Einführung eines sterisch anspruchsvollen Restes am C3' von DEACM wurde ein stereogenes Zentrum in den Chromophor eingeführt. In Einzelkanalmessungen wurde dabei festgestellt, dass das stereogene

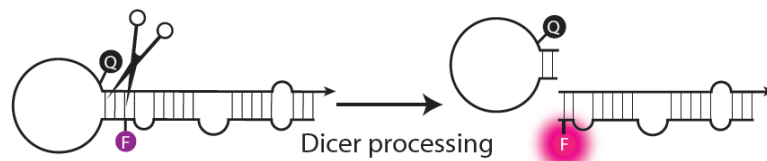
Zentrum eine große Auswirkung auf die Reduktion der Leitfähigkeit hat, die Natur des Substituenten jedoch eine vergleichsweise kleine. Adamantan-DEACM (**OmpG-8**) zeigt eine Reduktion von 39%, während das kleinere *n*Butyl-DEACM (**OmpG-7**) auch 35% bewirkte. Weiterhin wurde versucht, eine Alkin Modifikation am C3' zum Binden von noch größeren Resten zu nutzen. **OmpG-9** zeigte eine Reduktion der Leitfähigkeit um über 50%, jedoch ließ sich die photolabile Schutzgruppe nicht zuverlässig durch Licht vom Protein abspalten. In einer Click-Reaktion mit verschiedenen Fluorophoren wurden die Bedingungen etabliert (**OmpG-11-14**). Auch hier wurde in Einzelkanalmessungen festgestellt, dass die Photochemie nicht verlässlich funktioniert. In einem weiteren Versuch wurde Biotin über PEG-Linker so angebracht, dass es an der Öffnung der Pore Streptavidin binden kann (**OmpG-17/18**). Das Makromolekül sollte den Kanal komplett verschließen, was mit dem kürzeren der beiden Linker in Einzelkanalmessungen demonstriert werden konnte. Dennoch konnte auch hier eine Bestrahlung keinen Effekt erzielen.

Es konnte gezeigt werden, dass OmpG mit verschiedenen DEACM-Varianten erfolgreich modifiziert werden kann. Je nach Größe findet eine teilweise Blockierung des Kanals statt, die durch Belichtung wieder entfernt werden kann. Dazu wurden Methoden zur Synthese und Analytik der Hybride etabliert. In Versuchen über Click-Reaktion Makromoleküle zu binden, konnten vielversprechende Ergebnisse gezeigt werden. Alleine die Photochemie der Alkin-DEACM-Varianten führte zu Problemen in der Abspaltung. Ein Austausch des Chromophors zu einer photolabilen Schutzgruppe mit besserer Quantenausbeute sollte helfen, das System lichtsensitiv zu machen. Auch ein Austausch des PEG-Linkers mit einem Photoschalter, der reversibel die Pore Öffnen und Schließen kann, ist für eine Anwendung in künstlichen Materialien denkbar. Vor allem in der Wahl des gebundenen Makromoleküls gibt es eine große Auswahl an potentiellen Substituenten für Biotin-Streptavidin wie z.B. Fullerene.

## 4 Synthese von Fluorophor-/Quencher-markierter pre-*miRNA*-181a zur Lokalisation in Neuronen

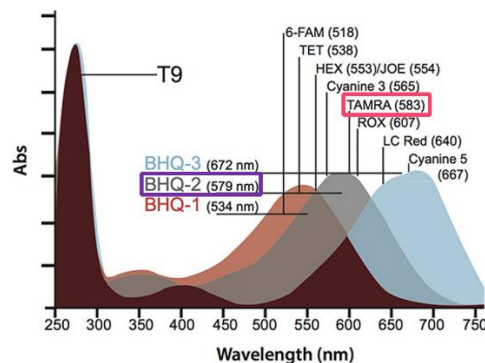
### 4.1 Motivation und Zielsetzung

In Kapitel 1.6 wurde bereits über die verschiedenen Rollen von RNA berichtet. Dabei wurde ein Fokus auf die Rolle von *miRNA* als posttranskriptionelles Regulationselement gelegt sowie die Prozessierung hin zur reifen *miRNA*. Ein besonderes Augenmerk soll hier auf den Zusammenhang zwischen *miRNA* Prozessierung in Bezug auf den Mechanismus der synaptischen Plastizität gelegt werden. Im Fokus der Studie steht *miRNA*-181a, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erin Schuman (Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main) vermehrt in neuronalen Dendriten des Hippocampus gefunden wurde.<sup>[224]</sup> *miRNA*-181a besitzt eine Bindestelle an der 3'-UTR der *mRNA* von GluA2, einer Untereinheit des AMPA-Rezeptors.<sup>[225]</sup> Außerdem übt sie Einfluss auf CamKII aus, welches durch Phosphorylierung des AMPA-Rezeptors eine Signalverstärkung bewirkt. In den Neuronen des Hippocampus von Ratten (*Rattus Norvegicus*) wurde die pre-*miRNA*-181a vermehrt gefunden. Es soll gezeigt werden, dass durch Stimulation der neuronalen Aktivität die lokale Reifung zur *miRNA* in den Dendriten aktiviert werden kann. Aus dieser Fragestellung heraus, wie eine *miRNA* eine *mRNA* reguliert, soll die Prozessierung von Dicer durch externe Steuerung visualisiert werden, um die reife *miRNA* in Neuronen bei Entstehung zu lokalisieren. Dazu wurde von Dr. Jennifer Rinne (JR) eine Sonde entwickelt, die die pre-*miRNA*-181a nachahmt und von Dicer geschnitten wird unter Aktivierung eines Fluoreszenzsignals.<sup>[226]</sup> Die Herausforderung lag zum einen in der Herstellung der langen RNA sowie in der Auswahl und Position eines geeigneten Fluorophor-/Quencherpaares. In Abb. 129 ist eine schematische Darstellung der pre-*miRNA* mit den ausgewählten Positionen für Fluorophor und Quencher gezeigt. Der Fluorophor wurde an das letzte Nukleotid der, nach Prozessierung durch Dicer, reifen *miRNA* angebracht. Der Quencher befindet sich in räumlicher Nähe auf der Gegenseite der Haarnadelstruktur am Ansatz des Loops. Durch Schneiden von Dicer findet eine räumliche Trennung statt, was zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt. In Versuchen, den Quencher in der Sequenz neben den Fluorophor zu setzen, wurde von Dicer keine Prozessierung mehr durchgeführt.



**Abb. 129:** Modell der Haarnadelstruktur der pre-miRNA-181a mit Fluorophor und Quencher. Erst durch Schneiden von Dicer wird der Loop mit Quencher entfernt. Es bleibt die reife miRNA im Doppelstrang zurück. Durch Entfernung des Quenchers wird die Fluoreszenz sichtbar. Entnommen aus der Dissertation von Dr. J.Rinne.<sup>[226]</sup>

Um ein möglichst starkes Fluoreszenzsignal zu erhalten, wurde bei der Auswahl des Fluorophor-/Quencherpaares darauf geachtet, dass ein gutes An/Aus-Verhalten gewährleistet ist. Aus diesem Grund wurde der *Black Hole Quencher*<sup>®</sup>-2 (BHQ-2) mit dem Fluorophor Tetramethyl-6-carboxyrhodamin (TAMRA) ausgewählt. Das Absorptionsspektrum von BHQ-2 hat eine gute Überlappung mit dem Emissionsspektrum von TAMRA (siehe Abb. 130). Da beide Modifikationen nur als dT-Bausteine kommerziell erhältlich waren, die Position des Quenchers aber nicht mit der Oligonukleotidsequenz vereinbar war, wurde dT-BHQ-2 als zusätzliches Nukleotid in die Sequenz eingeführt.



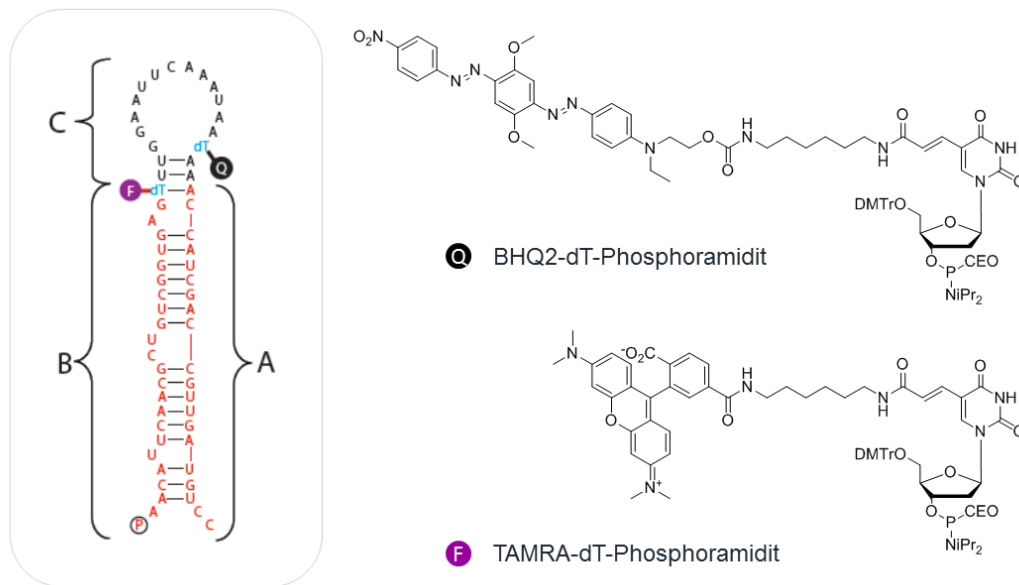
**Abb. 130:** Übersicht gängiger Fluorophore und Quencher zur Anwendung auf Oligonukleotide. In lila ist das Absorptionsspektrum von BHQ-2 markiert. In pink ist das Emissionsmaximum von TAMRA markiert, welches im Absorptionsmaximum von BHQ-2 liegt. Übernommen von *SigmaAldrich* und modifiziert.<sup>[227]</sup>

Die Aufgabe in dem etablierten Projekt bestand im Wesentlichen in der Weiterführung der Herstellung der TAMRA-/BHQ-2-markierten pre-miRNA 181a. Dabei sollte unter anderem die Aufreinigungsprozedur optimiert werden. Die synthetisierten Sonden sollten anschließend an die Arbeitsgruppe von Erin Schuman übergeben werden, zur Anwendung in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie von Neuronen des Hippocampus aus Ratten.

## 4.2 Ergebnisse und Diskussion

### 4.2.1 Synthese der Fluorophor-/Quencher-gelabelten pre-miRNA-181a

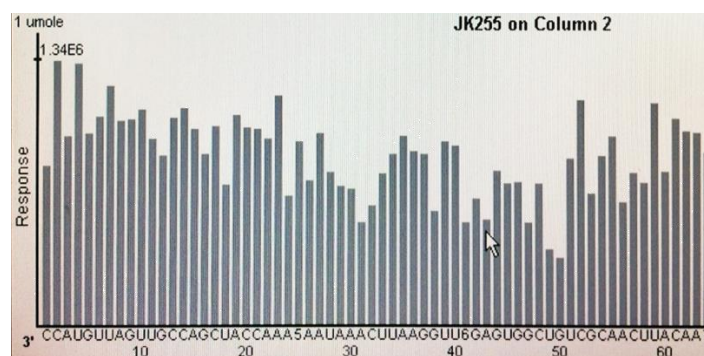
Nach der Vorlage von Dr. Jennifer Rinne<sup>[226]</sup> sollte die pre-miRNA-181a mit Fluorophor und Quencher synthetisch über Oligonukleotidfestphasensynthese hergestellt werden. Die Synthese des 63-mers wurde mit Standard-RNA-Amiditen durchgeführt. Fluorophor (TAMRA) und Quencher (BHQ2) wurden als dT-Derivate eingesetzt, sodass ein postsynthetischer Markierungsschritt umgangen werden konnte. Wichtig für die Erkennung von Dicer ist eine zusätzliche Phosphatgruppe am 5'-Ende, die durch ein Phosphorylierungsreagenz angebracht wurde. In Abb. 131 ist die Sequenz des Konstrukts zu sehen mit den Stellen der Modifikationen. Die Platzierung und Konstitution der Bausteine wurde in den Vorarbeiten ausführlich evaluiert.<sup>[226]</sup> Das Nucleotid mit Quencher wurde zusätzlich in die Sequenz eingeführt ohne Probleme bei der weiteren miRNA-Prozessierung. BHQ2-dT-Phosphoramidit und TAMRA-dT-Phosphoramidit wurden für die Synthese käuflich erworben. In rot sind die Teile der reifen miRNA und dem Gegenstrang markiert, in schwarz die Loopsequenz, die von Dicer abgeschnitten wird.



**Abb. 131:** Übersicht der Komponenten, die zur Synthese der Fluorophor-/Quencher-markierten pre-miRNA181a eingesetzt wurden. Links – Sequenz mit Positionen der Modifikationen F, Q und P. Orangener Teil wird nach Dicer-Prozessierung zur reifen miRNA, schwarzer Teil stellt den abgetrennten Loop nach Dicer Prozessierung dar. Rechts – Struktur der eingesetzten Phosphoramidite von Fluorophor TAMRA (**114**) und Quencher BHQ2 (**115**).

#### 4 - Synthese von Fluorophor-/Quencher-markierter pre-miRNA-181a

Die Oligonukleotidfestphasensynthese wurde über Standardprozeduren durchgeführt, d.h. eine Kupplungszeit pro RNA-Base von 12 Minuten. Aufgrund der Stabilität von Fluorophor und Quencher konnte auf *UltraMILD*<sup>®</sup>-Bedingungen verzichtet werden. Die Modifikationen wurden nach dem Protokoll von Dr. J. Rinne für 30 min, unter mehrfachem Bewegen des gelösten Amidits, gekuppelt. Da die Synthesen zum Teil bis zu 28 Stunden gedauert haben und die Modifikationen nur 24 Stunden im vorgesehenen Lösungsmittel stabil waren, wurden die Synthesen unterbrochen und die Amidite frisch gelöst an den Synthesizer angehängt. In Ansätzen, bei denen die instabilen Amidite länger gelöst vorlagen, wurden zum Teil große Einbrüche im Kupplungsschritt beobachtet. In Abb. 132 ist ein Tritylmonitor einer durchgeführten Synthese dargestellt. Vom Synthesizer *Expedite* wird die Leitfähigkeit detektiert, die von den abgespaltenen Tritylgruppen ausgeht. Die Höhe wird dann in ein relatives Verhältnis zur Kupplungsausbeute gesetzt. Der Einbruch bei Nukleotid 50 ist wahrscheinlich auf die vergleichsweise langsame Abspaltung der DMTr-Gruppe von G zurückzuführen, sodass nicht die gesamte Menge an Tritylkationen detektiert wurde. Trotz der Länge der RNA, konnte die Synthese ohne große Einbrüche bis zum Ende mit guter Ausbeute durchgeführt werden.



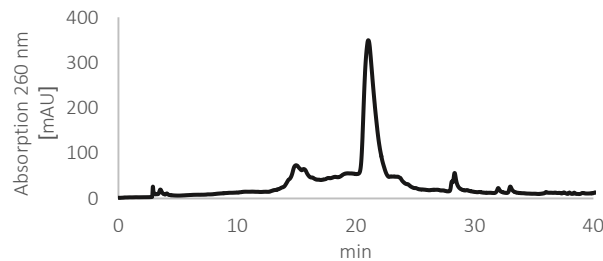
**Abb. 132:** Tritylmonitor einer 1  $\mu$ mol-Synthese von pre-miRNA-181a mit Fluorophor (6), Quencher (5) und 5'-Phosphat (7) am Synthesizer *Expedite*.

Die Abspaltung der synthetisierten RNA erfolgte in einem Gemisch aus *t*-Butylamin/H<sub>2</sub>O (1:3) bei 60 °C, da der Fluorophor TAMRA instabil gegenüber anderen gängigen Abspaltungsreagenzien ist. Nach Abspaltung der TBDMS-Gruppen von der 2'-OH-Position und Fällung in 1-Butanol, wurde versucht, eine Anionenaustauschchromatographie zu umgehen, um den Kontakt mit LiCl aufgrund der späteren Zellanwendung zu vermeiden und durch eine Aufreinigung per denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zu ersetzen. Eine Anionenaustausch-chromatographie mit NaCl wäre nicht in Frage gekommen, da der chaotrope Effekt zum Aufbrechen der Sekundärstruktur nicht ausgereicht hätte. Da die synthetisierte RNA durch die Modifikationen stark gefärbt ist, konnte die Auftrennung im Gel ohne weitere Färbung verfolgt werden. Dies hatte den



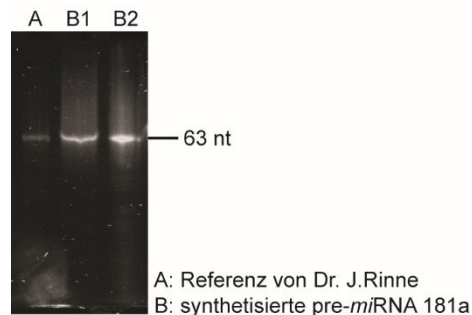
Vorteil, dass kein UV-Shadowing durchgeführt werden musste, was die RNA schädigen kann und auch kein Färbereagens eingesetzt wurde, was nachträglich noch entfernt werden musste.

In der Aufreinigung über PAGE kristallisierten sich zwei Probleme heraus. Erstens ist die Menge an RNA, die über ein präparatives Gel aufgereinigt werden kann, begrenzt und zweitens funktionierte die Extraktion aus dem Gel nicht mit der gewünschten Ausbeute. Für die Anwendung der Sonde in Experimenten mit Neuronen wurden große Mengen (500 pmol pro Zellexperiment) benötigt, die so nicht generiert werden konnten. Aus diesem Grund wurde nach Fällung durch 1-Butanol die Aufreinigung doch über Anionenaustauschchromatographie durchgeführt und über ein analytisches PAGE verfolgt. Die großen Salzmengen wurden entgegen dem vorliegenden Protokoll in einem Zentrifugenfilter durch ausführliches Waschen mit H<sub>2</sub>O entfernt und das Volumen deutlich reduziert, sodass die Probe anschließend über RP-HPLC von Fragmenten anderer Polarität getrennt werden konnte (siehe Abb. 133).



**Abb. 133:** Analytisches RP-HPLC Chromatogramm von synthetischer pre-miRNA 181a mit Fluorophor und Quencher nach Aufreinigung (A – MeCN, B – 0,1 M TEAA; A: 5-→ 55% in 40 min.).

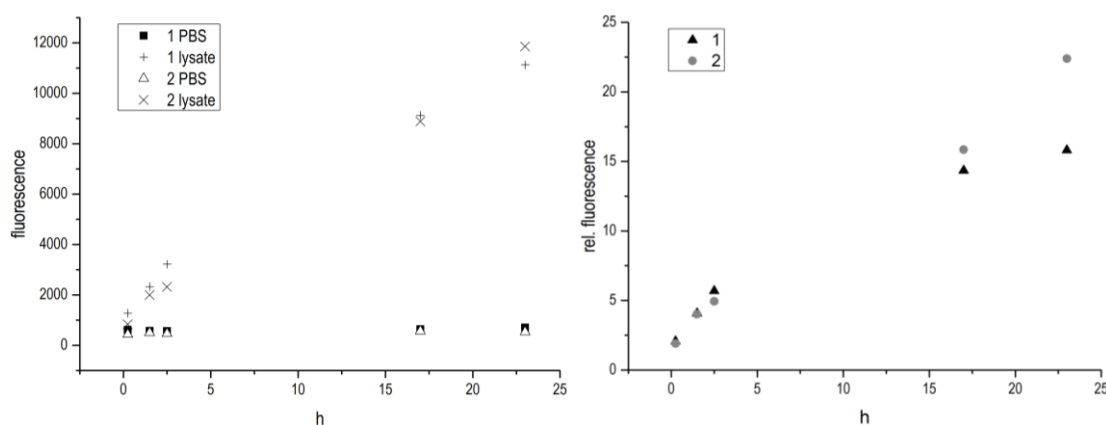
Zur Bestätigung der fehlerfreien Synthese wurde mehrfach vergeblich versucht, ein Massenspektrum des Volllängenprodukts zu erhalten. Deshalb wurden analytische Gele zum Vergleich der hergestellten Sonde von Dr. J.Rinne mit der neu synthetisierten durchgeführt. In Abb. 134 ist ein Ausschnitt aus einem denaturierenden PAGE zu sehen zum Vergleich der Migration der Referenz.



**Abb. 134:** 16% denaturierendes PAGE Ausschnitt zum Vergleich der synthetisierten pre-miRNA 181a mit der von Dr. J.Rinne hergestellten Referenz (A). B1 und B2 beschreiben zwei verschiedene Syntheseansätze.

#### 4.2.2 *In Vitro* Test des Fluoreszenzanstiegs der miRNA-Sonde

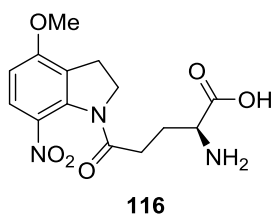
Um sicherzustellen, dass die hergestellte Sonde (pre-miRNA 181a mit TAMRA und BHQ2) den Anforderungen entspricht, wurde ein Fluoreszenzassay durchgeführt. In der Sonde sind Fluorophor und Quencher in räumlicher Nähe installiert, sodass keine Fluoreszenz entsteht. Nach der Prozessierung durch Dicer werden beide Komponenten räumlich voneinander getrennt, was durch einen Anstieg der Fluoreszenz zu sehen sein soll. Vor einer Anwendung in Neuronen sollte überprüft werden, dass die Sonde funktioniert. Dazu wurde neuronales Zelllysate aus dem Gehirn von Ratten extrahiert und in 1xPBS-Puffer verdünnt. Durch Zugabe von RNase-Inhibitor wurde verhindert, dass ein Abbau der RNA durch andere Enzyme stattfindet, die ein falsches positives Signal erzeugt hätten. Die RNA wurde für 24 h im Zelllysate bei 37 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen Proben des gleichen Volumens entnommen und die Fluoreszenz gemessen (siehe 5.3.1). Parallel dazu wurde als Referenz die RNA in PBS-Puffer ohne Zelllysate auf dieselbe Weise behandelt, um sicher zu stellen, dass der Strang an sich stabil ist. Die Fluoreszenzmessung erfolgte durch Anregung von TAMRA bei 540 nm und Detektion der Fluoreszenz bei 580 nm. In Abb. 135 ist die Untersuchung von zwei unterschiedlichen Ansätzen der Oligonukleotidfestphasensynthese zu sehen. Auf der linken Seite ist die detektierte Fluoreszenz der Sonden in Zelllysate und im Vergleich dazu die Fluoreszenz der in PBS inkubierten Sonden über die Zeit aufgetragen. Auf der rechten Seite ist der relative Anstieg der Fluoreszenz gezeigt. Dabei wurde der gemessene Wert für Zelllysate durch den Referenzwert geteilt. Es ist zu erkennen, dass über mehrere Stunden ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz stattfindet. Damit konnte bestätigt werden, dass Fluorophor und Quencher korrekt in die Sequenz eingebaut wurden und von Dicer akzeptiert werden. Ein 25-facher Anstieg ist für das eingesetzte Fluorophor-/Quencherpaar nicht hoch, was an der Verwendung des ganzen Rattengehirns liegt. Dazu kommt noch die Verdünnung in PBS, sodass die Konzentration von Dicer niedrig ist.



**Abb. 135:** Auswertung des Fluoreszenzassays der Sonde in neuronalem Zelllysate (lysate) und zur Referenz in PBS-Puffer. Es wurden die Sonden aus zwei verschiedenen synthetischen Ansätzen überprüft (**1,2**). Links – detektierte tatsächliche Fluoreszenzen (580 nm) durch Anregung bei 540 nm aufgetragen gegen die Inkubationszeit. Rechts – relative Fluoreszenz im Verhältnis der Lysatprobe zur Referenz.

### 4.2.3 Reifung von miRNA-181a in Neuronen des Hippocampus

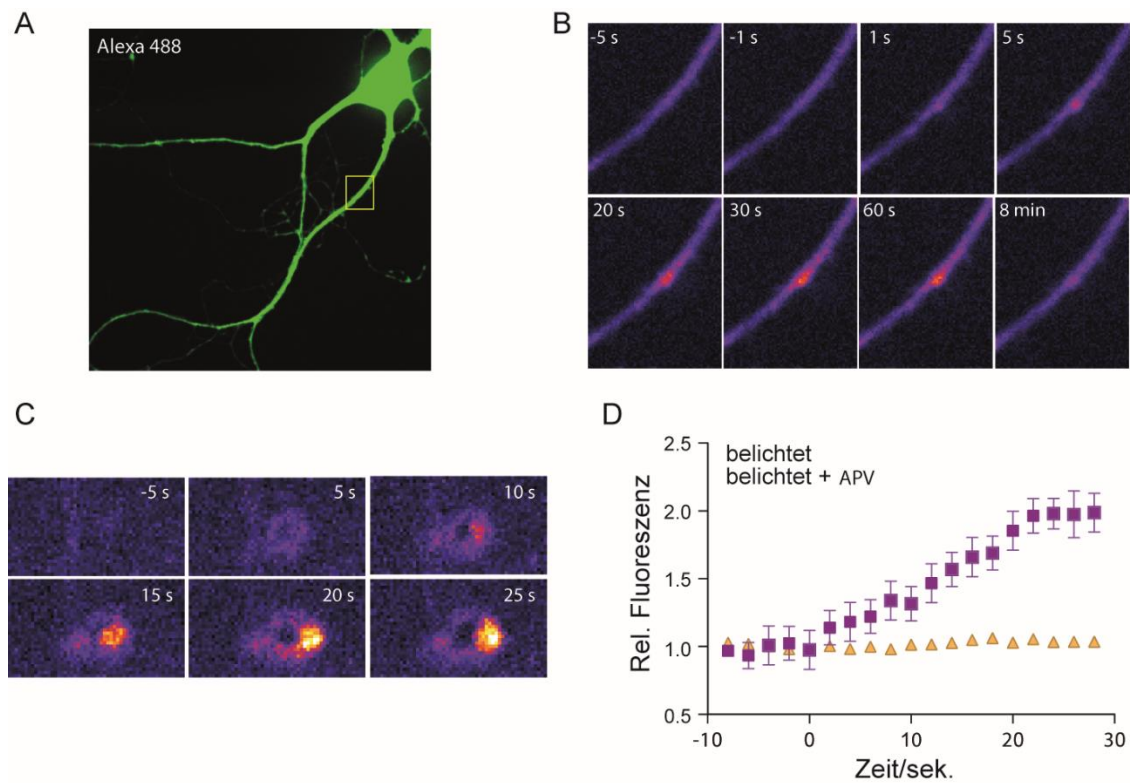
Die synthetisierte Sonde wurde nach Überprüfung der Aktivität an Dr. Sivakumar Sambandan (Arbeitsgruppe Erin Schuman, MPI für Hirnforschung) übergeben zur Anwendung in Zellexperimenten. Die ersten Zellexperimente wurden von Dr. Güney Akbalik durchgeführt. Zu Beginn wurde getestet, ob die Sonde durch Transfektion in die Neuronen eingeführt werden kann. Da in mehreren Versuchen große Mengen des Moleküls in den Zellen ausgefallen waren und die Prozedur viel Zeit in Anspruch nahm, wurde eine Infusion über *Patch Clamp*-Technik gewählt. Die Sonde wurde dabei zusammen mit Alexa488, zum Anfärben der Zelle, in physiologischem Puffer über eine Pipette in kultivierte Neuronen aus dem Hippocampus von Ratten gegeben. Zunächst wurde untersucht, wie sich die Sonde im Neuron ohne Anregung der neuronalen Aktivität verhält. Über eine Periode von 30 min wurde ein leichter Anstieg der Fluoreszenz über das basale Level detektiert, vor allem im Zellkörper. Im Gegensatz dazu wurde durch Depolarisation der Zelle ein starker Anstieg der Fluoreszenz in Soma und Dendriten sichtbar. In einem weiteren Experiment wurde in Anwesenheit von *Dicer-knock-down* Zellen die neuronale Aktivität getestet und nur ein schwacher Fluoreszenzanstieg gemessen. Dies deutet darauf hin, dass Dicer-Aktivität von neuronaler Aktivität abhängt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Konzentration von miRNA in Neuronen mit der Aktivierung des NMDA-Rezeptors korreliert.<sup>[228,229]</sup> Vor allem der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom spielt dabei eine Rolle, der bekannt ist für die Stimulation von Dicer.<sup>[230]</sup> Um zu zeigen, dass neuronale Aktivität die Reifung von pre-miRNA durch Dicer stimuliert, wurden die Neuronen mit MNI-photolabil geschütztem Glutamat inkubiert, das durch 2-Photonenanregung lokal abgespalten werden kann (siehe Abb. 136).



**Abb. 136:** Chemische Struktur von MNI-Glutamat. Durch 2PE-Entschützung kann Glutamat lokal im Dendriten freigesetzt werden.

Durch die lokale Entschützung von Glutamat in individuellen Synapsen (siehe Abb. 137 A, gelber Kasten Uncaging Stelle) wurde ein exzitatorisches post-synaptisches Potential ausgelöst, das einem spontanen Signal gleicht. In der Nähe der entschützten Stelle wurde innerhalb von 1-5 sec nach Belichtung ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet, welcher für einige Sekunden lokal konzentriert bestehen blieb und dann auf Grund von Diffusion verschwand. In Abb. 137 ist in B der Fluoreszenzanstieg über die Zeit zu sehen und in C in einem Dornfortsatz. In Experimenten, die in

Anwesenheit des NMDA-Antagonisten APV (D,L-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure), der die Glutamatbindestelle im Rezeptor blockiert, durchgeführt wurden, war kein Anstieg der Fluoreszenz zu erkennen (siehe Abb. 137 D).



**Abb. 137:** Anwendung der Fluorophor-/Quencher-markierten Sonde in kultivierten Neuronen des Hippocampus von Ratten. A – Detektion der Zelle durch Alexa 488-Färbung. In gelb ist die 2PE-Uncagingstelle im Dendriten markiert. B – Fluoreszenzanstieg im Dendriten über wenige Sekunden nach lokalem Glutamat Uncaging. C – Fluoreszenzanstieg im Dornfortsatz des Dendriten nach neuronaler Aktivierung durch Glutamat. D – Anstieg der Fluoreszenz nach Glutamat-Uncaging in An- und Abwesenheit des NMDA-Antagonisten APV.<sup>[224]</sup>

### 4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Zur Untersuchung der Abhängigkeit von Dicer-Aktivität mit neuronaler Aktivität in Neuronen des Hippocampus von Ratten wurde eine Sonde hergestellt, welche pre-miRNA-181a aus *Rattus Norvegicus* nachahmt. Die Sonde wurde im Vorfeld von Dr. Jennifer Rinne so konstruiert, dass durch die Markierung des Fluorophors TAMRA und Quenchers BHQ-2 ein Paar eingebaut wird, welches bei räumlicher Nähe nicht fluoresziert.<sup>[226]</sup> Der Fluorophor ist am Ende der miRNA-Sequenz über ein dT-Nukleotid angebracht. Der Quencher befindet sich als zusätzliches dT-Nukleotid im gegenüberliegenden Strang am Anfang der Schleife. Durch Prozessierung von Dicer wird der Quencher abgetrennt und die reife miRNA fluoresziert. Die Sonde ist ein vollsynthetisches Konstrukt, welches über Oligonukleotidfestphasensynthese hergestellt wurde. Aufgrund der Länge

und der Modifikationen wurde versucht, eine Aufreinigungsstrategie zu wählen, die von der Standard-prozedur, Anionenaustauschchromatographie, abweicht. In denaturierenden Polyacrylamidgelen wurde eine gute Abtrennung des Produkts von den Nebenprodukten erzielt, jedoch konnte es anschließend nicht mehr quantitativ isoliert werden. Aus diesem Grund wurde die Methode zur Analyse der hergestellten Sonden mit früheren Chargen von Jennifer Rinne verglichen. Durch Inkubation der Sonde in neuronalem Zelllysate wurde erfolgreich überprüft, ob ein Fluoreszenzanstieg durch die Prozessierung von Dicer entsteht.

In der Arbeitsgruppe von Erin Schuman (MPI für Hirnforschung) wurde die Sonde in hochauflösenden Mikroskopieexperimenten eingesetzt. Nach Infusion der Sonde über eine *Patch Clamp*-Pipette wurde zunächst die Verteilung der Sonde und Stabilität überprüft. Erst nach Aktivierung der neuronalen Aktivität wurde ein Fluoreszenzanstieg im gesamten Neuron beobachtet. Durch 2-PE-Uncaging von MNI-Glutamat konnten einzelne Dendriten lokal stimuliert werden mit dem Ergebnis, dass nur an dieser Stelle ein Fluoreszenzanstieg stattfand. Damit konnten sie zeigen, dass die Prozessierung von pre-*mi*RNA-181a in neuronalen Dendriten stattfindet und individuell ausgelöst werden kann.<sup>[224]</sup>

Desweiteren wurde im Zuge der Untersuchung herausgefunden, dass die lokale Proteinsynthese von CamKII durch die Stimulation im Niedrigfrequenzbereich reduziert wird, dies steht im Kontrast zu anderen Untersuchungen, die durch hochfrequente Stimulation eine Vermehrung verursachen. In aktuellen Untersuchungen wird der Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von *mi*RNA-181a in Dendriten und der lokalen Proteinsynthese untersucht.



## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Geräte und Materialien

#### (1) Lösungsmittel

Lösungsmittel wurden von den Firmen *Roth*, *Sigma Aldrich* und *VWR* bezogen und ohne weitere Aufreinigung in den Synthesen eingesetzt. Wasserfreie Lösungsmittel über Molsieb und unter Argon wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Acros* und *Alfa-Aesar* bezogen. Zur säulen-chromatographischen Aufreinigung wurden Lösungsmittel in technischer Qualität eingesetzt. Im Fall von Phosphoramiditen für die Oligonukleotidfestphasensynthese wurden Lösungsmittel mit *p.a.* Qualität verwendet.

#### (2) Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Alfa Aesar*, *Roth*, *Merck*, *TCl* und *VWR* und wurden ohne Aufreinigung verwendet. Bei Bedarf wurde beim Umgang mit der Chemikalie Luft- oder Lichtausschluss gewährleistet.

#### (3) NMR- Spektroskopie

Es wurden  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{19}\text{F}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR- Spektren zur Untersuchung der Syntheseprodukte mit dem Spektrometer DPX250 (250 MHz), AV300 (300 MHz), AM/AV400 (400 MHz), AV500 (500 MHz) und DRX600 (600 MHz) der Firma *Bruker* gemessen. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in deuteriertem Lösungsmittel der Firma *Euriso-Top* mit einer Reinheit über 99,8% durchgeführt. Es wurde ausschließlich  $\text{CDCl}_3$  und  $\text{DMSO-d}_6$  verwendet.

Die Kalibrierung erfolgte anhand der Verschiebung der Lösungsmittelsignale ( $\text{CDCl}_3$  - 7,26;  $\text{DMSO-d}_6$  - 2,50). Die chemische Verschiebung ist in  $\delta$  [ppm] und die Kopplungskonstanten in Hz angegeben. Bearbeitet wurden die Spektren mit dem Programm *Topspin* von *Bruker*.

Multipletts wurden folgendermaßen abgekürzt: s- Singulett, d- Duplett, t- Triplet, q- Quartett, dd- Doublett vom Doublett, pt- Pseudotriplett, m- Multiplett. Gegebenenfalls werden Buchstaben vereinzelt großgeschrieben abhängig von ihrer Kopplung.

### (4) Massenspektrometrie

Massenspektren wurden mit dem ESI Flugzeit-Massenspektrometer *VOYAGER DE-PRO* von *Applied Biosystems* gemessen. Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit einem *MALDI Orbitrap XL* der Firma *Thermo* unter Verwendung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix verwendet.

### (5) Dünnschichtchromatographie

DC-Platten aus Kieselgel (TLC Silica Gel 60) mit Fluoreszenzmarker F254 der Firma *Merck* und *Macherey-Nagel* wurden zur Verfolgung der Phasentrennung bei der Säulenchromatographie verwendet, sowie im Voraus zur Auswahl des Lösungsmittels und zur Verfolgung des Reaktionsverlaufs.

### (6) Säulenchromatographie

Bei den folgenden Synthesen wurde nach vielen Reaktionen eine Säulenchromatographie zur Isolation des Produktes durchgeführt. Dazu wurde Kieselgel 60 der Firma *Macherey-Nagel* verwendet.

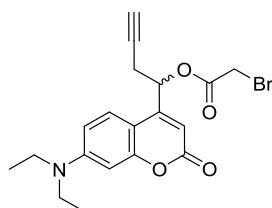
### (7) HPLC

Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte an Geräten der Firma *Agilent* mit Dioden-Array-Detektor. Es wurden ausschließlich Lösungsmittel von HPLC Qualität benutzt. Wässrige Puffer wurden mit ultrareinem Wasser (Fa. *MilliQ*) hergestellt und gegebenenfalls autoklaviert. Die spezifischen Angaben der einzelnen Bedingungen sind in den jeweiligen Abschnitten beschrieben.



## 5.2 Chemische Synthesen

- (1) Synthese von Verbindung **105** (1-[7-(Diethylamino)-2-oxo-chromen-4-yl]but-3-ynyl-2-bromoacetat)



$C_{19}H_{20}BrNO_4$   
M: 406,28 g/mol

Unter Argon und Lichtausschluss wurden 115 mg Verbindung **104** (0,4 mmol, 1,0 Eq.) in 7 mL abs. Toluol vorgelegt. Dazu wurden 50  $\mu$ L abs. Pyridin (0,62 mmol, 1,5 Eq.) und 54  $\mu$ L Bromoacetyl bromid (0,62 mmol, 1,5 Eq.) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum vom dunkelbraunen Reaktionsgemisch entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH:EE – 4:1). Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

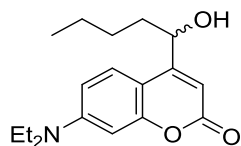
**Ausbeute:** 142 mg (0,35 mmol, 87%).

**R<sub>f</sub>:** 0,25 (CH:EE – 4:1).

**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>]  $\delta$  ppm:** 7,63 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9,0 Hz, Aromat-*H*); 6,71 (Dd, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9,1 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 2,5 Hz, Aromat-*H*); 6,56 (D, 1H, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 2,5 Hz, Aromat-*H*); 6,14 (t, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,5 Hz, CHCH<sub>2</sub>Alkin); 6,08 (s, 1H, Aromat-*H*); 4,38 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 12,9 Hz, CH<sub>2,a</sub>Br); 4,29 (d, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 13,0 Hz, CH<sub>2,b</sub>Br); 3,44 (q, 4H, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, 2xNCH<sub>2</sub>); 2,99 (T, 1H, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 2,6 Hz, Alkin-*H*); 2,95 – 2,80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Alkin); 1,12 (t, 6H, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, 2xNCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR [125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>]  $\delta$  ppm:** 166,8; 161,0; 156,5; 152,7; 150,9; 126,0; 109,4; 105,4; 105,2; 97,6; 79,1; 75,1; 70,3; 44,5; 44,5; 27,3; 24,6; 12,8; 12,8.

**HRMS (MALDI):** *m/z* berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>BrNO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 406,06485, gefunden 406,06462 ( $\Delta m = 0,00023$ , 0,6 ppm).

(2) Synthese von Verbindung **98** (7-(Diethylamino)-4-(1-hydroxypentyl)chromen-2-on)

$C_{18}H_{25}NO_3$   
M: 303,40 g/mol

Unter Argon wurden 123 mg 7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-1-benzopyran-4-carboxaldehyd **97** (0,50 mmol, 1,0 Eq.) in 2,0 mL THF gelöst und auf -80 °C gekühlt. Dazu wurden 300 µL auf -80 °C vorgekühltes *n*-BuLi (0,75 mmol, 1,5 Eq., 2,5 M in *n*-Hexan gelöst in 3 mL THF) gegeben und die Reaktion für 60 min bei -80 °C und über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Durch Zugabe von 3 mL gesättigter  $NH_4Cl$  Lösung wurde die Reaktion beendet. Es wurde EtOAc zugegeben und die organische Phase mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend über Säulenchromatographie weiter aufgereinigt (DCM:Aceton – 33:1). Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

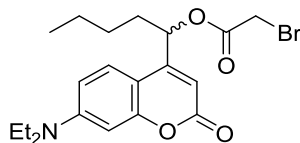
**Ausbeute:** 50 mg (0,17 mmol, 33%).

**R<sub>f</sub>:** 0,6 (DCM:Aceton – 6.1).

**<sup>1</sup>H-NMR [600 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ ppm:** 7,41 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9,1 Hz, Aromat-H); 6,57 (Dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9,1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2,6 Hz, Aromat-H); 6,51 (D, 1H, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2,6 Hz, Aromat-H); 6,24 (s, 1H, Aromat-H); 5,02 - 4,94 (m, 1H, CHOH); 3,41 (q, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,1 Hz, 2x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,07 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3,8 Hz; OH); 1,89 - 1,83 (m, 1H, CHCH<sub>2,a</sub>); 1,77 - 1,70 (m, 1H, CHCH<sub>2,b</sub>); 1,56 - 1,48 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2,a</sub>CH<sub>2</sub>); 1,48 - 1,43 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2,b</sub>CH<sub>2</sub>); 1,42 - 1,32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,21 (t, 6H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,1 Hz, 2x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 0,92 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,3 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ ppm:** 162,7; 158,5; 156,5; 150,3; 125,0; 108,5; 106,3; 105,2; 98,0; 70,1; 44,7; 44,7; 37,0; 27,9; 22,5; 14,0; 12,5; 12,5.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 304,19072, gefunden 304,19076 (Δm=0,00004, 0,1 ppm).

(3) Synthese von Verbindung **100** (1-[7-(diethylamino)-2-oxo-chromen-4-yl]pentyl-2-bromoacetat)

$C_{20}H_{26}BrNO_4$   
M:424,34 g/mol

Unter Argon wurden 50 mg Verbindung **98** (0,17 mmol, 1,0 Eq.) in 2 mL Toluol gelöst und 22  $\mu$ L Pyridin (0,25 mmol, 1,5 Eq.) zugegeben. Nach 5 min wurden 0,2 mL Bromoacetyl bromid **99** (0,25 mmol, 1,5 Eq.) zugegeben und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden zu gleichen Teilen EtOAc und Wasser zugegeben, die Phasen getrennt und die organische Phase mit Wasser und Brine gewaschen. Nach Trocknen über  $MgSO_4$  und entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (CH:EE – 5:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

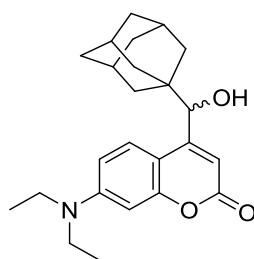
**Ausbeute:** 53 mg (0,12 mmol, 74%).

**R<sub>f</sub>:** 0,4 (CH:EE – 4:1).

**<sup>1</sup>H-NMR [600 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  ppm:** 7,40 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 9,1$  Hz, Aromat-H); 6,60 (Dd, 1H,  $^3J_{HH} = 9,1$  Hz,  $^4J_{HH} = 2,0$  Hz, Aromat-H); 6,52 (D, 1H,  $^4J_{HH} = 2,1$  Hz, Aromat-H); 6,10 (s, 1H, Aromat-H); 5,99 (t, 1H,  $^3J_{HH} = 6,4$  Hz, CH); 3,91 (d, 1H,  $^2J_{HH} = 12,4$  Hz,  $CH_{2,a}Br$ ); 3,89 (d, 1H,  $^2J_{HH} = 12,4$  Hz,  $CH_{2,b}Br$ ); 3,41 (q, 4H,  $^3J_{HH} = 7,1$  Hz, 2x  $CH_2CH_3$ ); 1,95 - 1,90 (m, 2H,  $CHCH_2CH_2$ ); 1,46 - 1,31 (m, 4H,  $CH_2CH_2CH_2CH_3$ ); 1,21 (t, 6H,  $^3J_{HH} = 7,1$  Hz, 2x  $CH_2CH_3$ ); 0,90 (t, 3H,  $^3J_{HH} = 7,2$  Hz,  $CH_2CH_2CH_3$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR DEPT [150 MHz]  $\delta$  ppm:** 124,8; 108,8; 105,6; 98,2; 72,9; 44,9; 44,9; 34,5; 27,5; 25,4; 22,3; 13,9; 12,5; 12,5.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für  $C_{20}H_{27}BrNO_4$   $[M+H]^+$  424,11180, gefunden 424,11134 ( $\Delta m=0,00046$ , 1,1 ppm).

(4) Synthese von Verbindung **102** (4-[1-Adamantyl(hydroxy)methyl]-7-(diethylamino)chromen-2-on)

$C_{24}H_{31}NO_3$   
M: 381,52 g/mol

Unter Argon wurden 100 mg 7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-1-benzopyran-4-carboxaldehyd **97** (0,41 mmol, 1,0 Eq.) in 7 mL Et<sub>2</sub>O vorgelegt bei Raumtemperatur. Dazu wurde 0,5 mL Adamantan-Magnesiumbromid (ca. 0,67 mmol, 1,7 Eq.) getropft, welches zuvor durch Erhitzen von Bromadamantan mit 19x-Überschuss an Magnesiumspänen in Et<sub>2</sub>O hergestellt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Zugabe von gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Entfernen des Lösungsmittels erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (CH:EE – 6:1). Es wurde nur ein Teil des Produkts rein, als orange-farbenes Öl erhalten.

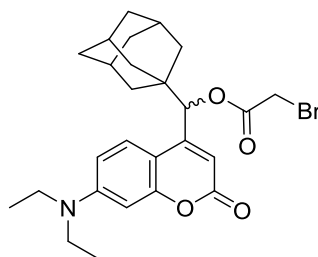
**Ausbeute:** 64 mg (0,17 mmol; 24%).

**R<sub>f</sub>:** 0,14 (CH:EE – 4:1).

**<sup>1</sup>H-NMR [250 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ ppm:** 7,56 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, Aromat-*H*); 6,62 – 6,55 (m, 1H, Aromat-*H*); 6,53 (D, 1H, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2,1 Hz, Aromat-*H*); 6,14 (s, 1H, Aromat-*H*); 4,64 (s, 1H, CHO*H*); 3,41 (q, 4H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,1 Hz, 2x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,79 - 1,48 (m, 24H, Adamantan-*H*); 1,21 (t, 6H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,1 Hz, 2x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 382,23767, gefunden 382,23674 (Δm=0,00093, 2,4 ppm).

- (5) Synthese von Verbindung **103** ([1-Adamantyl-[7-(diethylamino)-2-oxo-chromen-4-yl]methyl]-2-bromoacetat)



$C_{26}H_{32}BrNO_4$   
M: 502,45 g/mol

Unter Argon wurden 60 mg Verbindung **102** (0,16 mmol, 1,0 Eq.) in 5 mL Toluol vorgelegt. Dazu wurden 20  $\mu$ L Pyridin (0,24 mmol, 1,5 Eq.) und 21  $\mu$ L Bromoacetyl bromid **99** (0,24 mmol, 1,5 Eq.) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM:MeOH – 50:1 -> 20:1). Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

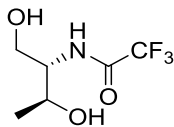
**Ausbeute:** 51 mg (0,10 mmol; 65%).

**R<sub>f</sub>:** 0,22 (DCM).

**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  ppm:** 7,51 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8,7$  Hz, Aromat-H); 6,58 (Dd, 1H,  $^3J_{HH} = 9,0$  Hz,  $^4J_{HH} = 2,0$  Hz, Aromat-H); 6,50 (D, 1H,  $^4J_{HH} = 2,1$  Hz, Aromat-H); 6,01 (s, 1H, Aromat-H); 5,70 (s, 1H, CHO); 3,90 (d, 1H,  $^2J_{HH} = 12,3$  Hz, CH<sub>2,a</sub>O); 3,86 (d, 1H,  $^2J_{HH} = 12,3$  Hz, CH<sub>2,a</sub>O); 3,41 (q, 4H,  $^3J_{HH} = 5,8$  Hz, 2x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,79 - 1,50 (m, 14H, Adamantan-H); 1,21 (t, 6H,  $^3J_{HH} = 7,1$  Hz, 2x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  ppm:** 166,5; 161,9; 156,0; 151,5; 150,5; 125,7; 108,5; 107,8; 97,8; 78,0; 44,7; 44,7; 38,4; 37,5; 36,6; 36,6; 36,6; 29,7; 28,1; 28,1; 28,1; 25,5; 25,5; 12,5; 12,5; 12,5.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>BrNO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 502,15875, gefunden 502,15634 ( $\Delta m = 0,00241$ , 4,8 ppm).

(6) Synthese von Verbindung **62** (2,2,2-Trifluoro-*N*-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)propyl]acetamid)

$C_6H_{10}F_3NO_3$   
M: 201,15 g/mol

Unter Argon wurden bei 0 °C 250 mg *D*-Threoninol **58** (2,38 mmol, 1,0 Eq.) in 30 mL abs. THF und 10 mL abs. MeOH vorgelegt. Dazu wurden 0,365 mL Triethylamin (2,62 mmol, 1,1 Eq.) gegeben und 5 min. gerührt. Anschließend wurden 0,285 mL Trifluoressigsäureethylester (2,38 mmol, 1 Eq.) zugegeben, eine Stunde bei 0 °C gerührt und über Nacht weiter bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und je einmal mit gesättigter  $NaHCO_3$ -, 1 M HCl- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über  $MgSO_4$  wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 344 mg (1,71 mmol, 72%).

**R<sub>f</sub>:** 0,1 (DCM:MeOH – 1:3).

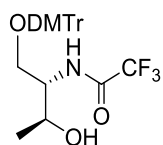
**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** 8,83 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8,7$  Hz, NH); 4,96 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 5,6$  Hz, OH); 4,67 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 5,7$  Hz, OH); 3,83-3,77 (m, 1H,  $CH_{2a}$ ); 3,73-3,68 (m, 1H, CH-N); 3,57-3,53 (m, 1H, CH-CH<sub>3</sub>); 3,46-3,41 (m, 1H,  $CH_{2b}$ ); 1,01 (d, 3H,  $^3J_{HH} = 6,4$  Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR [125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** 157,1 (q); 116,5 (q); 65,1; 60,6; 58,2; 20,5.

**<sup>19</sup>F-NMR [470 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** -73,9.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für  $C_6H_{11}F_3NO_3$  [M+H]<sup>+</sup> 202,06855, gefunden 202,06756 (Δm=0,00099, 4,9 ppm).

(7) Synthese von Verbindung **63** (*N*-[1-[[Bis(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]methyl]-2-hydroxy-propyl]-2,2,2-trifluoroacetamid)



$C_{27}H_{28}F_3NO_5$   
M: 503,52 g/mol

Unter Argon wurden 344 mg Verbindung **62** (1,71 mmol, 1,0 Eq.) und 753 mg DMTr-Cl (2,22 mmol, 1,3 Eq.) in 5 mL abs. Pyridin gelöst und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM gelöst und zügig mit 5%iger Zitronensäure gewaschen, um Pyridinreste zu entfernen. Die organische Phase wurde mit gesättigter  $NaHCO_3$ - und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie (CH:EE, 4:1 – 1:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

**Ausbeute:** 574 mg (1,14 mmol, 67%).

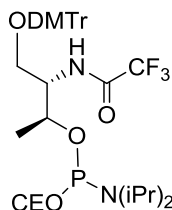
**R<sub>f</sub>:** 0,13 (CH:EE – 4:1).

**$^1H$ -NMR [600 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  ppm:** 9,20 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8,5$  Hz, NH); 7,36 (d, 2H,  $^3J_{HH} = 7,4$  Hz, Aromat-H); 7,29 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 7,5$  Hz, Aromat-H); 7,24-7,19 (m, 5H, Aromat-H); 6,87 (d, 4H,  $^3J_{HH} = 8,9$  Hz, Aromat-H); 4,67 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 5,5$  Hz, OH); 3,97-3,92 (m, 2H, CH-N, CH- $CH_3$ ); 3,73 (s, 6H, O- $CH_3$ ); 3,15 (dD, 1H,  $^3J_{HH} = 9,3$  Hz,  $^4J_{HH} = 4,0$  Hz,  $CH_{2a}$ ); 2,96 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 9,3$  Hz,  $^3J_{HH} = 6,8$  Hz,  $CH_{2b}$ ); 0,92 (d, 3H,  $^3J_{HH} = 6,1$  Hz,  $CH_3$ ).

**$^{13}C$ -NMR [150 MHz DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  ppm:** 158,1; 158,1; 144,9; 135,7; 135,5; 129,6; 129,6; 129,6; 129,6; 127,7; 127,7; 127,6; 127,6; 126,6; 113,1; 113,1; 85,2; 64,8; 62,5; 56,1; 55,0; 55,0; 40,1; 26,3; 26,3; 20,1; 20,1.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für  $C_{27}H_{28}F_3NO_5$  [M]<sup>+</sup> 503,19141, gefunden 503,19055 ( $\Delta m = 0,00086$ , 1,7 ppm).

(8) Synthese von Verbindung **64** (*N*-[1-[[Bis(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]methyl]-2-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-propyl]-2,2,2-trifluoroacetamid)



$C_{36}H_{45}F_3N_3O_6P$   
M: 703,74 g/mol

Unter Argon wurden 200 mg Verbindung **63** (0,40 mmol, 1,0 Eq.) in 2 mL abs. DCM gelöst. Dazu wurden 346  $\mu$ L DIPEA (1,99 mmol, 5,0 Eq.) gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden 177  $\mu$ L 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylchlorophosphin (0,80 mmol, 2,0 Eq.) zugegeben und für 3 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CH:EE – 2:1, *p.a.* Qualität, Kieselgel mit 1%  $NEt_3$  gepackt) aufgearbeitet. Das Produkt wurde als farbloser Schaum erhalten.

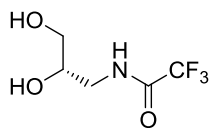
**Ausbeute:** 191 mg (0,27 mmol, 68%).

**R<sub>f</sub>:** 0,8 (CH:EE – 2:1).

**$^1H$ -NMR [400 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  ppm:** 9,32 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8,3$  NH); 7,38-7,34 (m, 2H, Aromat-*H*); 7,33-7,26 (m, 2H, Aromat-*H*); 7,26-7,19 (m, 5H, Aromat-*H*); 6,90-6,84 (m, 4H, Aromat-*H*); 4,12-4,00 (m, 2H, CH-N, CHCH<sub>3</sub>); 3,73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3,62-3,54 (q, 2H, 2x CHCH<sub>3</sub>-*iPr*); 3,53-3,42 (m, 2H, CNCH<sub>2</sub>); 3,23-3,21 (m, 1H, CH<sub>2a</sub>ODMTr); 3,09-3,01 (m, 1H, CH<sub>2b</sub>ODMTr); 2,72 (t, 1H,  $^3J_{HH} = 5,8$  Hz, CH<sub>2a</sub>O); 2,66 (t, 1H,  $^3J_{HH} = 5,8$  Hz, CH<sub>2b</sub>O); 1,13-1,00 (m, 15H, *iPr*-CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>).

**$^{31}P$ -NMR [162 MHz, DMSO- $d_6$ ]  $\delta$  ppm:** 147,4; 146,9.



(9) Synthese von Verbindung **56** (*N*-(2,3-Dihydroxypropyl)-2,2,2-trifluoro-acetamid)

$C_5H_8F_3NO_3$   
M: 187,12 g/mol

Unter Argon wurden bei 0 °C 427 mg (*S*)-3-Amino-1,2-propandiol **54** (4,69 mmol, 1,0 Eq.) in 20 mL abs. THF und 10 mL abs. MeOH vorgelegt. Dazu wurden 0,725 mL Triethylamin (5,16 mmol, 1,1 Eq.) gegeben und 5 min gerührt. Anschließend wurden 0,558 mL Trifluoroessigsäureethylester **55** (4,69 mmol, 1,0 Eq.) zugegeben, eine Stunde bei 0 °C gerührt und über Nacht weiter bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde vom Reaktionsgemisch im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und je einmal mit gesättigter  $NaHCO_3$ -, 1 M HCl- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über  $MgSO_4$  wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 213 mg (1,14 mmol, 24%).

**R<sub>f</sub>:** 0,1 (DCM:MeOH – 1:3).

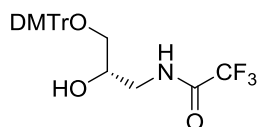
**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** 9,30 (s, 1H, NH); 4,88 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,2 Hz, OH-CH); 4,64 (t, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5,7 Hz, OH-CH<sub>2</sub>); 3,63 - 3,56 (m, 1H, OH-CH); 3,33 - 3,26 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-OH, CH<sub>2a</sub>-N); 3,13 - 3,06 (m, 1H, CH<sub>2b</sub>-N).

**<sup>13</sup>C-NMR [125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** 156,8 (q); 116,5 (q); 69,9; 64,3; 43,4.

**<sup>19</sup>F-NMR [470 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** -74,3.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für  $C_5H_8F_3NO_3 + K^+$  [M+K]<sup>+</sup> 226,00879, gefunden 226,00868 (Δm=0,00011, 0,5 ppm).

(10) Synthese von Verbindung **57** (*N*-[3-[Bis(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxypropyl]-2,2,2-trifluoroacetamid)



$C_{26}H_{26}F_3NO_5$   
M: 489,49 g/mol

Unter Argon wurden 200 mg Verbindung **56** (1,07 mmol, 1,0 Eq.) und 470 mg DMTr-Cl (1,39 mmol, 1,3 Eq.) in 3 mL abs. Pyridin gelöst und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde zügig mit 5%iger Zitronensäure, gesättigter  $NaHCO_3$ - und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH:EE – 4:1) und das Produkt als gelbes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 283 mg (0,58 mmol, 54%).

**R<sub>f</sub>:** 0,1 (CH:EE – 4:1).

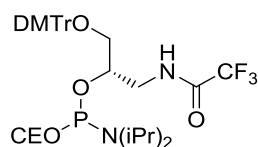
**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** 9,30 (t, 1H,  $^3J_{HH} = 5,6$  Hz, NH); 7,40 (d, 2H,  $^3J_{HH} = 7,5$  Hz, Aromat-H); 7,30 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 7,5$  Hz, Aromat-H); 7,26 (Dd, 4H,  $^3J_{HH} = 8,8$  Hz,  $^4J_{HH} = 1,8$  Hz, Aromat-H); 7,24 – 7,20 (m, 1H, Aromat-H); 6,88 (d, 4H,  $^3J_{HH} = 8,1$  Hz, Aromat-H); 5,14 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 5,6$  Hz, OH); 3,84 – 3,78 (m, 1H, CHOH); 3,73 (s, 6H, 2x OCH<sub>3</sub>); 3,36 (dT, 1H,  $^3J_{HH} = 5,1$  Hz,  $^2J_{HH} = 13,3$  Hz, CH<sub>2,a</sub>N); 3,17 – 3,10 (m, 1H, CH<sub>2,b</sub>N); 2,97 – 2,92 (m, 1H, CH<sub>2,a</sub>ODMTr); 2,88 – 2,83 (m, 1H, CH<sub>2,b</sub>ODMTr).

**<sup>13</sup>C-NMR [125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** 158,5; 158,5; 156,8 (q); 145,5; 136,2; 136,1; 130,2; 130,2; 130,2; 130,2; 128,2; 128,2; 128,1; 128,1; 127,1; 116,3 (q); 113,6; 113,6; 113,6; 113,6; 85,7; 68,1; 66,1; 55,5; 55,5; 43,7.

**<sup>19</sup>F-NMR [470 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** -74,3.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für  $C_{26}H_{26}F_3NO_5 + K^+$  [M+K<sup>+</sup>]<sup>+</sup> 528,13947, gefunden 528,13851 (Δm=0,00096, 1,8 ppm).

(11) Synthese von Verbindung **52** (*N*-[3-[Bis(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]-2-[but-3-ynoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-propyl]-2,2,2-trifluoroacetamid)



$C_{35}H_{43}F_3N_3O_5P$   
M: 689,72 g/mol

Unter Argon wurden 171 mg Verbindung **57** (0,35 mmol, 1,0 Eq.) in 6,5 mL abs. DCM gelöst, auf 0 °C gekühlt und 300 µL DIPEA (1,75 mmol, 5,0 Eq.) zugegeben. Nach 10 min wurden 165 mg Cyanoethyl(*N,N*-diisopropylamino)chlorophosphin (0,7 mmol, 2,0 Eq.) zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung wurde die organische Phase noch drei Mal mit je 15 mL gesättigter  $NaHCO_3$  Lösung gewaschen, anschließend über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH:EE 9:1 → 1:1, gepackt mit 1%  $NEt_3$ ) und das Produkt als farbloser Schaum erhalten.

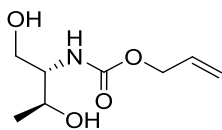
**Ausbeute:** 118 mg (0,19 mmol, 54%).

**R<sub>f</sub>:** 0,84 (CH:EE – 1:1).

**$^1H$ -NMR [300 MHz,  $CDCl_3$ ]  $\delta$  ppm:** 7,46 – 7,40 (m, 2H, Aromat-*H*); 7,36 – 7,27 (m, 5H, Aromat-*H*); 7,25 – 7,11 (m, 2H, Aromat-*H*); 6,87 – 6,76 (m, 4H, Aromat-*H*); 4,08 – 3,96 (m, 1H,  $CH_2$ ); 3,95 – 3,43 (m, 1H,  $CH_2$ ); 3,80 (s, 6H, 2x  $OCH_3$ ); 3,75 – 3,51 (m, 3H,  $CH$ , 2x  $CH_2$ ); 3,44 – 3,32 (m, 1H,  $CH_2$ ); 3,24 – 3,09 (m, 1H,  $CH_2$ ); 2,64 (t,  $^3J_{HH} = 6,3$  Hz, 1H,  $CNCH_2CH_{2b}O$ ); 2,45 (t,  $^3J_{HH} = 6,3$  Hz, 1H,  $CNCH_2CH_{2b}O$ ); 1,30 – 1,10 (m, 12H, *iPr*- $CH_3$ ).  $CH(CH_2)_2$

**$^{31}P$ -NMR [121 MHz,  $DMSO-d_6$ ]  $\delta$  ppm:** 149,5.

**MS (ESI):** m/z berechnet für  $C_{35}H_{44}F_3N_3O_5P$   $[M+H]^+$  690,72, gefunden 690,36.

(12) Synthese von Verbindung **60** (Allyl-*N*-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)propyl]carbamat)

$C_8H_{15}NO_4$   
M: 189,21 g/mol

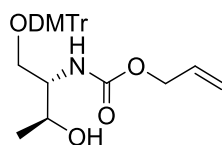
Unter Argon wurden 250 mg *D*-Threoninol **58** (2,37 mmol, 1,0 Eq.) in 20 mL abs. THF gelöst, auf 0 °C gekühlt und 360 µL  $NEt_3$  (2,60 mmol, 1,1 Eq.) und 250 µL Allylchloroformat (2,37 mmol, 1,0 Eq.) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei 0 °C gerührt und weiter bei Raumtemperatur über Nacht. Durch Zugabe von gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung wurde die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit EtOAc extrahiert, die vereinigten, organischen Phasen mit 1 M HCl- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über  $MgSO_4$  getrocknet. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 251 mg (1,32 mmol, 56%).

**$^1H$ -NMR [400 MHz,  $CDCl_3$ ]  $\delta$  ppm:** 5,99 – 5,84 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ); 5,32 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 17,1$  Hz,  $^2J_{HH} = 1,1$  Hz,  $CH_2=CH$ ); 5,23 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 10,4$ ,  $^2J_{HH} = 1,3$  Hz,  $CH_2=CH$ ); 4,58 (d, 2H,  $^3J_{HH} = 5,4$  Hz,  $COOCH_2$ ); 4,21 – 4,13 (m, 1H,  $CH(CH_3)OH$ ); 3,85 (d, 2H,  $^3J_{HH} = 4,0$  Hz,  $CH_2O$ ); 3,60 – 3,52 (m, 1H,  $CH_2-CH(NH)$ ); 1,24 (d, 3H,  $^3J_{HH} = 6,4$  Hz,  $CH_3$ ).

**HRMS (MALDI):**  $m/z$  berechnet für  $C_8H_{15}NO_4 + K^+$   $[M+K]^+$  228,06237, gefunden 228,06319 ( $\Delta m=0,00082$ , 3,6 ppm).

(13) Synthese von Verbindung **61** (Allyl-*N*-[1-[[bis(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]methyl]-2-hydroxy-propyl]carbamat)



$C_{29}H_{33}NO_6$   
M: 491,58 g/mol

Unter Argon wurden 200 mg Verbindung **60** (1,10 mmol, 1,0 Eq.) in 5 mL abs. Pyridin gelöst und 22  $\mu$ L DIPEA (0,13 mmol, 0,1 Eq.) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt und 530 mg Dimethoxytritylchlorid (1,60 mmol, 1,5 Eq.) hinzugegeben. Nach 25 min bei 0 °C wurde die Reaktionslösung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von 5 mL Methanol beendet. Anschließend wurde 10%ige Zitronensäure zugegeben, die Phasen getrennt, die organische Phase mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung und gesättigter  $NaCl$ -Lösung gewaschen und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (CH:EE - 19:1, + 1%  $NEt_3$ ) wurde das Produkt als farbloses Harz erhalten.

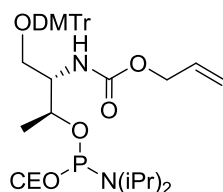
**Ausbeute:** 352 mg (0,72 mmol, 68%).

**R<sub>f</sub>:** 0,24 (CH:EE – 2:1).

**$^1H$ -NMR [250 MHz,  $CDCl_3$ ]  $\delta$  ppm:** 7,42 – 7,35 (m, 2H, Aromat-*H*); 7,33 – 7,24 (m, 5H, Aromat-*H*); 7,23 – 7,10 (m, 2H, Aromat-*H*); 7,00 – 6,77 (m, 4H, Aromat-*H*); 6,12 – 5,69 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ); 5,44 – 5,33 (m, 1H,  $NHCOO$ ); 5,32 – 5,27 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ); 5,23 – 5,17 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ); 4,64 – 4,54 (d, 2H,  $^3J_{HH} = 5,6$  Hz,  $COOCH_2$ ); 4,09 – 3,97 (m, 1H,  $CH(CH_3)-OH$ ); 3,79 (s, 6H,  $OCH_3$ ); 3,66 – 3,54 (m, 1H,  $CH_2-CH(NH)$ ); 3,44 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 9,4$  Hz,  $^4J_{HH} = 4,3$  Hz,  $CH_2-ODMTr$ ); 3,23 (dd, 1H,  $^3J_{HH} = 9,4$  Hz,  $^4J_{HH} = 3,2$  Hz,  $CH_2-ODMTr$ ); 1,15 (d, 3H,  $^3J_{HH} = 6,4$  Hz,  $CH_3$ ). EtOAC-Reste enthalten.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für  $C_{29}H_{33}NO_5 + K^+$   $[M+K]^+$  530,19395, gefunden 530,19269 ( $\Delta m = 0,00126$ ; 2,4 ppm).

(14) Synthese von Verbindung **53** (Allyl-*N*-[1-[[bis(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]methyl]-2-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-propyl]carbamate)



$C_{38}H_{50}N_3O_7P$   
M: 691,81 g/mol

Unter Argon wurden 170 mg von Verbindung **61** (0,35 mmol, 1,0 Eq.) in 10 mL abs. DCM gelöst, auf 0 °C gekühlt und 300  $\mu$ L Diisopropylethylamin (1,75 mmol, 5,0 Eq.) zugegeben. Nach 10 min wurden 165 mg Cyanoethyl(*N,N*-diisopropylamino)chlorophosphin (0,7 mmol, 2,0 Eq.) zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe gesättigte  $NaHCO_3$ -Lösung wurde die Reaktion beendet. Die organische Phase wurde anschließend drei Mal mit je 15 mL einer gesättigte  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (CH:EE - 9:1  $\rightarrow$  7:3, gepackt mit 1%  $NEt_3$ ) als farbloser Schaum erhalten.

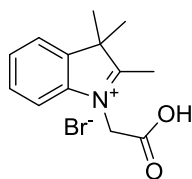
**Ausbeute:** 138 mg (0,20 mmol, 57%).

**R<sub>f</sub>:** 0,04 (CH:EE – 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR [400 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  ppm:** 7,41 (d, 2H,  $^3J_{HH} = 7,5$  Hz, Aromat-*H*); 7,34 – 7,26 (m, 5H, Aromat-*H*); 7,21 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 6,9$  Hz, Aromat-*H*); 6,86 – 6,78 (m, 4H, Aromat-*H*); 5,99 – 5,86 (m, 1H,  $CH_2=CH$ ); 5,31 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 16,9$  Hz,  $CH_2=CH$ ); 5,21 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 10,6$  Hz,  $CH_2=CH$ ); 4,58 (d, 2H,  $^4J_{HH} = 4,1$  Hz,  $COOCH_2$ ); 4,37 – 4,16 (m, 1H,  $CH-N$ ); 3,91-3,82 (m, 1H,  $CH_{2a}ODMTr$ ); 3,79 (s, 6H,  $OCH_3$ ); 3,72-3,60 (m, 1H,  $CH_{2b}ODMTr$ ); 3,56-3,42 (m, 3H,  $CHCH_3$ ,  $CH_2CN$ ); 3,24–3,08 (m, 2H, 2x  $CH-iPr$ ); 2,59 (t, 1H,  $^3J_{HH} = 6,3$  Hz,  $CNCH_2CH_{2a}$ ); 2,39 (t, 1H,  $^3J_{HH} = 6,1$  Hz,  $CNCH_2CH_{2b}$ ); 1,29 – 1,08 (m, 15H,  $CHCH_3$ ,  $iPr-CH_3$ ).

**<sup>31</sup>P-NMR [162 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  ppm:** 148,0.

**MS (ESI):** m/z berechnet für  $C_{38}H_{51}N_3O_7P$   $[M+H]^+$  692,34, gefunden 692,39.

(15) Synthese von Verbindung **80** (2-(2,3,3-Trimethylindol-1-ium-1-yl)ethansäure Bromid)

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>Br  
M: 298,18 g/mol

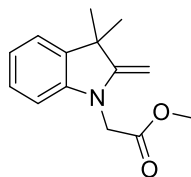
Unter Argon wurden 3,23 mL destilliertes 2,3,3-Trimethylindolin **66** (31,00 mmol, 1,0 Eq.) und 5,60 ml 2-Bromessigsäuretertbutylester **75** (34,50 mmol, 1,1 Eq.) für 8 h auf 120 °C erhitzt. Anschließend wurde der entstandene Feststoff mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als heller Feststoff erhalten. In der Reaktion wurde die *t*-Butylgruppe abgespalten.

**Ausbeute:** 7,12 g (23,50 mmol; 76%).

**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>] δ ppm:** 7,97 - 7,84 (m, 2H, Aromat-*H*); 7,65 – 7,57 (m, 2H, Aromat-*H*); 5,54 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,56 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR [125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>] δ ppm:** 169,0; 166,6; 141,8; 129,5; 124,0; 115,6; 54,8; 49,2; 31,2; 28,5; 22,5; 22,5; 14,9.

**HRMS(MALDI):** m/z berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup> 218,11756, gefunden 218,11744 (Δm=0,00012, 0,6 ppm).

(16) Synthese von Verbindung **78** (Methyl 2-(3,3-dimethyl-2-methylen-indolin-1-yl)acetat)

$C_{14}H_{17}NO_2$   
M: 231,30 g/mol

Unter Argon wurden 5,0 mL 2,3,3-Trimethylindolin **66** (31 mmol, 1,0 Eq) und 3,6 mL Methylbromacetat **74** (38 mmol, 1,2 Eq.) für 5 Stunden auf 80 °C erhitzt. Das kalte Reaktionsgemisch wurde mit Ether suspendiert, abfiltriert und der Feststoff im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde der Feststoff in 150 mL 1 M NaOH für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit je 75 mL DCM extrahiert, die vereinigten, organischen Phasen über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Abschließend wurde eine säulenchromatographische Aufreinigung (CH:Et<sub>2</sub>O - 3:1) durchgeführt und das Produkt als ein gelber Feststoff erhalten.

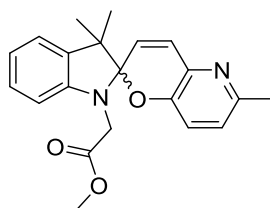
**Ausbeute:** 4.3 g (19 mmol, 60%).

**<sup>1</sup>H-NMR [250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>] δ ppm:** 7,16 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0,8 Hz, Aromat-*H*), 7,06 (td, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,3 Hz, Aromat-*H*), 6,74 (td, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0,8 Hz, Aromat-*H*), 6,68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,8 Hz, 1H, Aromat-*H*), 4,41 (s, 2H, C=CH<sub>2</sub>), 3,89 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 2,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,82 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 2,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,29 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>).

**MS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 232,30, gefunden 232,21.



(17) Synthese von Verbindung **81** (Methyl-2-(3,3,6'-trimethylspiro[indolin-2,2'-pyrano[3,2-b]pyridin]-1-yl)acetat)



$C_{21}H_{22}N_2O_3$   
M: 350,42 g/mol

Unter Argon wurden 2,84 g Verbindung **78** (12 mmol, 1,0 Eq.) in 1 M NaOH gelöst und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit je 50 mL DCM extrahiert, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 1,85 g Verbindung **69** (13 mmol, 1,1 Eq.) in 50 mL Ethanol für 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Vom Reaktionsgemisch wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (CH:EE - 1:1). Das Produkt wurde als ein hellgelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1,7 g (5 mmol, 41%).

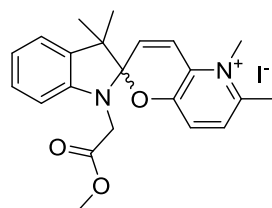
**R<sub>f</sub>:** 0,66 (EE).

**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ ppm:** 7,16 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,2 Hz, Aromat-H); 7,09 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0,8 Hz, Aromat-H); 7,02 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10,5 Hz, Aromat-H); 6,90 – 6,86 (m, 3H, Aromat-H); 6,45 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,8 Hz, Aromat-H); 6,00 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10,5 Hz, Aromat-H); 4,05 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 17,7 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,80 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 17,7 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,70 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 2,45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>] δ ppm:** 171,0; 150,0; 148,7; 146,3; 137,5; 135,9; 131,7; 127,7; 123,9; 123,5; 122,5; 121,8; 119,9; 106,6; 104,4; 52,5; 52,2; 45,3; 26,1; 23,5; 20,0.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für  $C_{21}H_{23}N_2O_3$  [M+H]<sup>+</sup> 351,17032, gefunden 351,17094 (Δm=0,00062, 1,8 ppm).

(18) Synthese von Verbindung **82** (Methyl-2-(3,3,5',6'-tetramethylspiro[indolin-2,2'-pyrano[3,2-b]pyridin-5-ium]-1-yl)acetat Iodid)



$C_{22}H_{25}N_2O_3I$   
M: 492,36 g/mol

Unter Argon wurden 1,0 g Verbindung **81** (2,9 mmol, 1,0 Eq.) in 50 mL THF gelöst, 5,0 mL Iodmethan (80 mmol, 28 Eq.) zugegeben und für zehn Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit THF gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als hell-gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 330 mg (0,9 mmol, 31%).

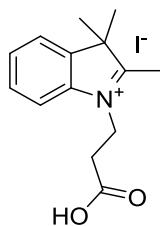
**R<sub>f</sub>:** 0,5 (CH:EE - 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR [500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>] δ ppm:** 7,88 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,8 Hz, Aromat-*H*); 7,74 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, Aromat-*H*); 7,72 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 11,0 Hz, Aromat-*H*); 7,18 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, Aromat-*H*); 7,17 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, Aromat-*H*); 7,14 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, Aromat-*H*); 6,57 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz, Aromat-*H*); 6,50 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 11,0 Hz, Aromat-*H*); 4,18 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 17,1 Hz, CH<sub>2</sub>); 4,14 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 3,98 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 17,2 Hz, CH<sub>2</sub>); 3,62 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 2,71 (s, 3H, Aromat-CH<sub>3</sub>); 1,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR [125 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>] δ ppm:** 170,7; 150,8; 148,5; 145,8; 135,1; 134,4; 131,1; 130,2; 129,1; 128,2; 123,3; 122,3; 120,5; 107,3; 104,9; 53,4; 52,5; 44,7; 26,7; 26,4; 21,0; 20,1.

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup> 365,18597, gefunden 365,18613 (Δm=0,00016, 0,4 ppm).

(19) Synthese von Verbindung **89** (3-(2,3,3-Trimethylindol-1-ium-1-yl)propansäure Iodid)



$C_{14}H_{18}NO_2I$   
M: 359,04 g/mol

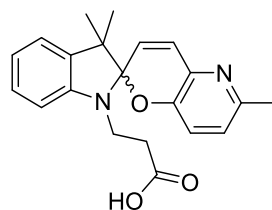
Unter Argon wurden 1,94 mL 2,3,3-Trimethylindol **66** (18,84 mmol, 1,0 Eq.) und 3,77 g 3-Iodpropansäure **88** (18,84 mmol, 1,0 Eq.) zusammengegeben und für 6 h auf 120 °C erhitzt. Der entstandene Feststoff wurde anschließend mit Aceton gewaschen, abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 3,02 g (8,39 mmol; 45%).

**$^1H$ -NMR [250 MHz, DMSO- $D_6$ ]  $\delta$  ppm:** 12,77 (s, 1H, COOH); 8,01-7,95 (m, 1H, Aromat-H); 7,86-7,80 (m, 1H, Aromat-H); 7,65-7,59 (m, 2H, Aromat-H); 4,65 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 7,0$  Hz,  $CH_2COOH$ ); 2,98 (t, 2H,  $^3J_{HH} = 7,00$  Hz,  $NCH_2$ ); 2,85 (s, 3H,  $CH_3$ ); 1,53 (s, 6H, 2x  $CH_3$ ).

**HRMS (MALDI):** m/z berechnet für  $C_{14}H_{18}NO_2 [M]^+$  232,13321, gefunden 232,13352 ( $\Delta m = 0,00031$ , 1,3 ppm).

(20) Synthese von Verbindung **90** (3-(3,3,6'-Trimethylspiro[indolin-2,2'-pyrano[3,2-b]pyridine]-1-yl)propansäure)



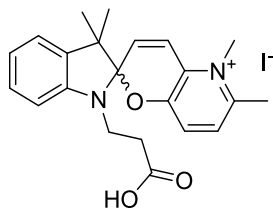
$C_{21}H_{22}N_2O_3$   
M: 350,42 g/mol

Unter Argon wurden 1,68 g Verbindung **89** (4,68 mmol, 1,0 Eq.) in 10 mL abs. Ethanol gelöst und 0,90 mL DIPEA (5,14 mmol, 1,1 Eq.) zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 0,71 g Verbindung **69** (5,14 mmol, 1,1 Eq.) zugegeben und für 2 h weitergerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit wenig kaltem EtOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als hell-gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 0,96 g (2,70 mmol; 60%).

$^1\text{H-NMR}$  [250 MHz, DMSO- $D_6$ ]  $\delta$  ppm: 12,18 (s, 1H, COOH); 7,14-7,06 (m, 2H, Aromat-H); 7,02-6,93 (m, 3H, Aromat-H); 6,81-6,73 (m, 1H, Aromat-H); 6,65-6,59 (m, 1H, Aromat-H); 6,03 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 10,5$  Hz, Aromat-H); 3,58-3,43 (m, 1H,  $\text{CH}_{2,\text{a}}$ COOH); 3,41-3,31 (m, 1H,  $\text{CH}_{2,\text{b}}$ COOH); 2,64-2,40 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>); 2,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

(21) Synthese von Verbindung **91** (3-(3,3,5',6'-Tetramethylspiro[indolin-2,2'-pyrano[3,2-b]pyridin-5-ium]-1-yl)propansäure Iodid)



$C_{22}H_{25}N_2O_3I$   
M: 492,36 g/mol

Unter Argon wurden 1,00 g Verbindung **90** (2,85 mmol, 1,0 Eq.) in 20 mL abs. THF gelöst und 3,00 mL Iodmethan (48,19 mmol, 17,0 Eq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 14 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 0,30 g (0,60 mmol; 21%).

**$^1H$ -NMR [500 MHz, DMSO- $D_6$ ]  $\delta$  ppm:** 12,25 (s, 1H, COOH); 7,84 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 8,8$  Hz, Aromat-H); 7,72 (s, 1H, Aromat-H); 7,70 (D, 1H,  $^3J_{HH} = 3,2$  Hz, Aromat-H); 7,17-7,13 (m, 2H, Aromat-H); 6,84 (pT, 1H,  $^3J_{HH} = 7,4$  Hz, Aromat-H); 6,70 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 7,8$  Hz; Aromat-H); 6,60 (d, 1H,  $^3J_{HH} = 11,0$  Hz; Aromat-H); 4,14 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 3,60-3,52 (m, 1H, CH<sub>2,a</sub>COOH); 3,46-3,40 (m, 1H, CH<sub>2,b</sub>COOH); 2,67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,65-2,57 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>); 1,23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**$^{13}C$ -NMR [125 MHz, CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  ppm:** 173,3; 151,1; 148,2; 146,2; 135,5; 134,7; 132,0; 130,9; 129,0; 128,4; 122,7; 122,4; 120,1; 107,3; 106,5; 53,9; 40,6; 33,4; 25,5; 20,9; 20,1.

**MS (ESI):** m/z berechnet für  $C_{22}H_{25}N_2O_3 [M]^+$  365,16, gefunden 364,97.

## 5.2 Methoden

### 5.3.1 Oligonukleotid Methoden

#### (1) Festphasensynthese von 2'-OMe-RNA

Die Festphasensynthesen wurden am Synthesizer *ABI 392 DNA/RNA* der Fa *Applied Biosystems* durchgeführt. Es wurden 2'-OMe-RNA Stränge unter *UltraMILD*<sup>®</sup> Bedingungen synthetisiert. Dazu wurden *UltraMILD*<sup>®</sup> Amidite (2'-OMe-Pac-A, 2'-OMe-Ac-C und 2'-OMe-*i*PrPac-G) und *UltraMILD*<sup>®</sup> Cappingreagenz (THF/Pyridin/Pac-Anhydrid) von *LinkTech* verwendet. Ausschließlich beim Festphasenmaterial 2'-OMe-G wurde auf *UltraMILD*<sup>®</sup> Bedingungen verzichtet, da es nicht käuflich erwerbbar war (2'-OMe-dmf-G-CPG; 0,2 µmol und 1,0 µmol, 1000 Å, von *LinkTech*). 2'-OMe-Amidite und Sonderamidite wurden für 6 min gekuppelt. Als Aktivator wurde 5-(Ethylthio)-1H-tetrazol (ETT) 0,3 M in absolutem MeCN gelöst oder später 5-Benzylthio-1H-tetrazol (BTT) 0,3 M fertig gelöst in abs. MeCN von *EMP Biotech* eingesetzt. Der Feststoff wurde mindestens 24 h im Vakuum getrocknet, unter Argon gelagert und die Lösung erst vor der Synthese frisch angehängt. Die Synthese erfolgte im *DMTr-On* Modus. Die Abspaltung erfolgte *UltraMILD*<sup>®</sup> mit 0,05 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeOH oder mit 32% ammoniakalischer Lösung für 4 h bei Raumtemperatur. Die Aufreinigung wurde mittels RP-HPLC (*Agilent 1200*; Säule *MultoKrom C<sub>18</sub> 100-5* 4,5x250 mm von *CS Chromatographie*) mit A: MeCN und B: 0,1 M TEAA (Gradient siehe Tabelle 13) vorgenommen. Es wurde 254 nm mit einem Dioden-Array-Detektor dabei verfolgt. Die 5'-OH-Entschützung wurde durch Inkubation mit 80% Essigsäure für 20 Minuten erhalten und die RNA-Stränge anschließend durch RP-HPLC aufgereinigt. Abschließend folgte eine quantitative Bestimmung der Konzentration über Absorption bei 260 nm und eine qualitative Analyse per Massenspektrometrie.

**Tabelle 13:** RP-HPLC-Gradient für die Aufreinigung von 2'-OMe-RNA nach Abspaltung von der Festphase.

t (min)	%A - MeCN	%B – 0,1 M TEAA
0	5	95
2	5	95
32	40	60

## (2) Festphasensynthese und Aufreinigung von RNA mit Fluorophor und Quencher

Sequenz der synthetisierten pre-miRNA181a: (5'-3')

pAAC AUU CAA CGC UGU CGU GAG **F**UU GG AAU UCA AAU AA**Q** AAA CCA UCG ACC GUU GAU UGU  
ACC

p – 5'-Phosphat; **F** – dT-TAMRA; **Q** – dT-BHQ2

Die mit Fluorophor- und Quencher-gelabelte RNA wurde an einem *Expedite* Synthesizer (*PerSeptive BioSystems*) im *DMTr-Off* Modus hergestellt. Dazu wurden 2'-tBDMS-geschützte RNA-Phosphoramidite (*Sigma Aldrich* oder *LinkTech*) verwendet. Sonderamidite wie dT-TAMRA, dT-BHQ2 und 5'-Phosphatmodifizier (5'-*Chemical Phosphorylating Agent*) sowie das Festphasenmaterial (1  $\mu$ mol Ac-C-CPG, 1000 Å) wurden von *LinkTech* erworben. Alle RNA-Amidite wurden nach Standardprotokoll für 12 min gekuppelt, für die Sonderamidite wurde die Kupplungszeit auf 30 min. verlängert. Die Abspaltung von der Festphase erfolgte durch Inkubation mit *t*-Butylamin/H<sub>2</sub>O (1:3) für 6 h bei 60 °C unter starkem Schütteln. Danach wurden die 2'-tBDMS Schutzgruppen mit *N*-Methylpyrrolidon (300  $\mu$ L), Triethylamin (150  $\mu$ L), und Triethylamin-Trihydrofluorid (200  $\mu$ L) bei 60 °C für 90 min. entfernt und eine Fällung mit 1-Butanol und Inkubation für 4 h bei -80 °C durchgeführt. Die eigentliche Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie (Gradient siehe Tabelle 14, 80 °C, Säule *DNAPac PA-100* 9x250 mm von *Thermo Fisher*) am Gerät *Jasco UV-970* oder über PAGE (siehe Acrylamidgele, 5.3.6). Jedoch wurde die zweite Methode aufgrund der schlechten Rückgewinnung nur für kleine Mengen verwendet. Zum Entsalzen wurde die RNA in einem Zentrifugenfilter (1000 oder 3000 MWCO, *Pall Corporation*) mehrfach mit DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und auf minimales Volumen eingeeengt. Im Anschluss wurde RP-HPLC durchgeführt (*Agilent, MultoKrom C<sub>18</sub> 100-5* 4,5x250 mm, Gradient siehe Tabelle 15). Abschließend wurde zur Kontrolle der Reinheit ein Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

**Tabelle 14:** Anionenaustauschchromatographie-Gradient zur Aufreinigung der RNA.

t (min)	%A - DEPC-MQ	%B - 1 M LiCl
0	100	0
60	0	100

**Tabelle 15:** Verwendeter RP-HPLC Gradient für RNA.

t (min)	%A - MeCN	%B – 0,1 M TEAA
0	5	95
2	5	95
40	55	45

## (3) Postsynthetische Markierung von RNA mit Spiropyranen

10 nmol 2'-OMe-RNA wurden in 140  $\mu$ L MOPS-Puffer (50 mM MOPS, pH 8,0, 500 mM NaCl) vorgelegt. Dazu wurden 100  $\mu$ L Spiropyran (60 mM in DMSO), 8  $\mu$ L EDC (300 mM in DMSO), 8  $\mu$ L HOBT (60 mM in DMSO) und 8  $\mu$ L DIPEA (300 mM in DMSO) gegeben. Die Mischung wurde vor der Zugabe für 15 min. bei 700 rpm inkubiert. Die Inkubation von RNA und Label erfolgte über Nacht bei 700 rpm, worauf eine weitere Zugabe (50  $\mu$ L Spiropyran, 4  $\mu$ L EDC, 4  $\mu$ L HOBT und 4  $\mu$ L DIPEA) mit Inkubation über Nacht folgte.

Die Aufreinigung erfolgte über Größenausschlusschromatographie (NAP-25 Säule, Eluent H<sub>2</sub>O, Fa. GE), wodurch Großteile der Reagenzien abgetrennt werden konnten. Oligonukleotidhaltige Fraktionen wurden vereinigt und über RP-HPLC (*Multokrom C<sub>18</sub> 100-5* 4,5x250 mm, Gerät *Agilent*, Gradient siehe Tabelle 16) markierte ( $R_t$ : 18,4 min.) von nicht-markierten Strängen ( $R_t$ : 15,6 min.) abgetrennt. Die erfolgreiche Markierung wurde per Massenspektrometrie bestätigt.

**Tabelle 16:** RP-HPLC-Gradient zur Aufreinigung der Markierungsreaktion.

t (min)	%A - MeCN	%B – 0,1 M TEAA
0	5	95
2	5	95
25	30	70

## (4) Oligonukleotidmassenspektrometrie

Die Identität der Oligonukleotide sowie der postsynthetisch modifizierten Oligonukleotide wurde mit dem *microTOF-Q* Gerät der Firma *Bruker Corporation* im Negativmodus bestätigt. Massen und Extinktionskoeffizienten der Einzelstrangoligonukleotide wurden über das Online-Tool *IDT Oligoanalyzer* von *Integrated DNA Technologies* berechnet. Die Masse von Strängen mit Modifikationen nicht-nukleosidischer Natur wurden über die im AK Heckel vorhandene Massen-Berechnungstabelle bestimmt.

**Tabelle 17:** Übersicht aller verwendeten Oligonukleotide mit zugehörigem Extinktionskoeffizienten und berechneter und gemessener Masse

#	Sequenz 5'-3'	Modifikation	$\epsilon$ (L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> )	m berechnet (g/mol)	m gefunden (g/mol)	$\Delta m$
<b>RNA-1</b>	GCA UAA AXA AAG GUG	Threoninol	154000	4904,4	4904,0	0,4
<b>RNA-2</b>	GCA UAA AXA AAG GUG	Aminoglycol	154000	4887,9	4887,7	0,2
<b>RNA-3</b>	GCA UAU AXU AAG GUG	Aminoglycol	152600	4841,9	4843,8	1,9
<b>RNA-4</b>	GCA UAU AXU AAG GUG	Threoninol	152600	4855,9	4857,8	1,9
<b>RNA-5</b>	GCA UAU AXU AAG GUG	Serinol	152600	4841,9	4843,8	1,9
<b>RNA-6</b>	GCA UAA AXA AAG GUG	Aminoglycol+PyBIPS	152600	5235,1	5236,2	1,1
<b>RNA-7</b>	GCA UAU AXU AAG GUG	Aminoglycol+PyBIPS	152600	5189,1	5190,1	1,0
<b>RNA-8</b>	GCA UAU AXU AAG GUG	Threoninol+PYBIPS	152600	5203,1	5204,0	0,9
<b>RNA-9</b>	GCA UAU AXU AAG GUG	Serinol+PYBIPS	152600	5189,1	5190,0	0,1
<b>RNA-18</b>	GCA UAU AXU AAG GUG	Serinolacetat	152600	4883,9	4885,9	2,0



<b>RNA-10</b>	CAC CUU AU AUA UGC	Antisense <i>Wedge</i> Motiv	138200	4546,8	4547,7	0,9
<b>RNA-14</b>	CAC CUU AU AUA UGC	2-Aminopurin	125600	4518,0	4517,7	0,3
<b>RNA-15</b>	CAC CUU AU AUA UGC	2-Aminopurin	125600	4518,0	4517,7	0,3
<b>RNA-16</b>	CAC CUU AU AUA UGC	2-Aminopurin	125600	4518,0	4517,7	0,3
<b>RNA-17</b>	CAC CUU AU AUA UGC	2-Aminopurin	125600	4518,0	4517,7	0,3
<b>RNA-11</b>	CAC CUU AAU AUA UGC					
<b>RNA-12</b>	CAC CUU ACU AUA UGC					
<b>RNA-13</b>	CAC CUU AXU AUA UGC	a-basische Stelle				

Antisense **RNA-11-13** wurden von der *Fa. Biomers* käuflich erworben und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

#### (5) $K_D$ Bestimmung über 2-Aminopurin Markierung

Gegenstränge im *Wedge* Motiv mit 2-Aminopurin an variierenden Positionen wurden über Oligonukleotidfestphasensynthese hergestellt (siehe Tabelle 17). Dazu wurde 2-Aminopurin-phosphoramidit **94** als DNA-Baustein von der *Fa. Chemgenes* käuflich erworben (siehe Methode (1)). Zur  $K_D$ -Bestimmung wurde eine Titrationsreihe angesetzt, d.h. die Konzentration des Aminopurin-haltigen Gegenstrangs wurde konstant bei 100 nM gehalten und der Hauptstrang in Konzentrationen zwischen 100 nM und 5  $\mu$ M zugegeben sodass ein Gesamtvolumen von 100  $\mu$ L in 1xPBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) erreicht wurde. Die Mischungen wurden anschließend für 3 min. auf 95 °C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur gebracht zur Hybridisierung. Anschließend wurde die Fluoreszenz am *Tecan Plate Reader infinite M200 PRO* durch Anregung bei 300 nm und Detektion der Fluoreszenz bei 360 nm gemessen.

Die Bestimmung des  $K_D$  erfolgte durch eine sigmoidale Auftragung der Konzentration des Hauptstrangs gegen die gemessene Fluoreszenz. Durch einen sigmoidalen Fit im Programm *Origin* wurde der Wendepunkt =  $K_D$  bestimmt.

#### (6) Fluoreszenzmessung in neuronalem Zelllysat

Je 500 pmol Fluorophor-/Quencher-gelabelte pre-miRNA 181a wurden in 400  $\mu$ L neuronalem Zelllysat aus Rattenhirn (*rattus norvegicus*, Zellmenge unbekannt) mit RNase-Inhibitor oder 400  $\mu$ L 1xPBS Puffer bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Von beiden Ansätzen wurden in regelmäßigen Abständen 40  $\mu$ L entnommen und in eine schwarze 96-well-Platte (*Corning*) überführt. Fluoreszenz wurde am *Tecan Plate Reader infinite M200 PRO* durch Anregung bei 540 nm und Detektion der Fluoreszenz bei 580 nm gemessen. Zur Hintergrundkorrektur und zur Berechnung des relativen Anstiegs wurde der in Lysat gemessene Wert durch den Wert in 1xPBS geteilt.

## 5.2.2 Photochemische Methoden

### (1) UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden am Spektrometer *Evolution 300* von *Thermo Scientific* aufgenommen. Dabei wurden je nach Probenvolumen eine 13, 70 oder 1000  $\mu\text{L}$  Küvette mit 1 cm Schichtdicke von *Hellma* verwendet.

Bei sehr kleinen Probenvolumen oder zur Bestimmung der Konzentration über Absorption wurden UV/Vis-Absorptionsspektren am Gerät *NANODROP2000* von *Thermo Scientific* mit 2-4  $\mu\text{L}$  Probenvolumen gemessen.

### (2) Temperaturabhängige Absorptionsspektren

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte von RNA-Duplexen wurden Temperatur-abhängige UV/Vis-Absorptionsspektren am Spektrometer *Evolution 300* von *Thermo Scientific* gemessen. In eine 1 mL Küvette (*Hellma*) wurden der Strang mit nicht-nukleosidischem Linker sowie der entsprechende Gegenstrang mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in 1xPBS-Puffer zusammengegeben. Die Temperatur wurde über ein externes Peltierelement gesteuert und die Temperatur in der Probe über einen Temperaturfühler detektiert. Es wurden 7 Zyklen eines Temperaturgradienten zwischen 20 und 75  $^{\circ}\text{C}$  in 1  $^{\circ}\text{C}$  Schritten gemessen und dabei die Absorption bei 260 nm detektiert. Die Messpunkte wurden anschließend im Programm *Origin* analysiert zur Bestimmung des Wendepunkts (= Schmelzpunkts).

### (3) Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren wurden am *Tecan Plate Reader infinite M200 PRO* aufgenommen. Dazu wurden 50-100  $\mu\text{L}$  Probe in eine schwarze 96 well Platte von *Corning* pipettiert. Es wurde zunächst die z-Position optimiert und danach die Fluoreszenz in 2 nm-Schritten detektiert.

Zur Detektion von fluoreszenten Proteinbanden wurden SDS PAGE-Gele ohne weitere Anfärbung auf einem Transilluminator *BIO View UV light (USDT-30ML-8R)* von *Biostep* mit 365 nm (5 mW) angeregt.

## (4) Belichtungsmethoden

Oligonukleotid- sowie Proteinproben wurden mit einem selbstgebauten Multi-LED Gerät (LEDs von *Roithner Lasertechnik*) belichtet. Dabei wurde für Cumarin-haltige OmpG-Proben 385 nm verwendet (UVLED-385-310-SMD, 385 nm, 310 mW; 500 mA). Spiropyran-haltige Lösungen wurden mit 365 oder 530 nm belichtet (UVLED-365-250-SMD, 365 nm, 250 mW, 500 mA; H-HP803PG, 530 nm, 55 lm, 700 mA).

In BLM-Messungen wurden OmpG-Hybride durch eine Glasfaser-gekoppelte LED (*Thorlabs*, LED M385F1, 1000  $\mu\text{m}$  Glasfaser) ausgestattet mit einem *Thorlabs* LED-Treiber DC2100 bei 700 mA (95 mW) für 3-10 Minuten belichtet.

## (5) PHITS

Das von Prof. Dr. Alexander Heckel selbstentwickelte Programm *PHITS* (*Photoswitch Irradiation Test Suite*) auf Basis von *Labview*<sup>®</sup> bietet die Möglichkeit ein UV/Vis-Absorptionsspektrum zu messen und gleichzeitig mit bis zu zwei LEDs gewünschter Wellenlänge Temperatur-kontrolliert zu bestrahlen. Die LEDs von *Thorlabs* (mit Treiber DC4104) werden orthogonal zum Strahlengang des Glasfaser-gekoppelten UV/Vis-Spektrometers in einem CVH100 Küvettenhalter montiert. Als Lichtquelle des Spektrometers dient ein DH-mini und als Detektor ein USB4000 mit CCC Array Detektor (beide *Ocean Optics*). Das integrierte Thermostat Ministar 125 von der *Fa. Huber* wurde mit einem selbstgebauten Temperaturfühler, passend auf eine 45  $\mu\text{L}$  Küvette mit orthogonalem Strahlengang (3x3 mm, *QS High precision Cell, Hellma*), ausgestattet.

Mit dem Programm PHITS und dem zugehörigen Aufbau wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Neben Absorptionsspektren konnten durch die Möglichkeit der gleichzeitigen Belichtung und Messung der Absorption Schaltzyklen der Photoschalter automatisiert gemessen werden. Es wurden Schmelzpunktstudien der MC-Form des Spiropyrans in RNA unter dauerhafter Belichtung durchgeführt. Dabei wurde eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  beider Stränge in 1xPBS-Puffer gewählt. In Tabelle 18 ist eine Liste der verwendeten LEDs von Thorlabs gezeigt.

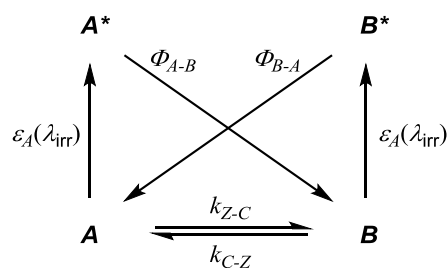
**Tabelle 18:** Übersicht der verwendeten LEDs am Aufbau PHITS.

Wellenlänge	Bezeichnung	mW	mA
340 nm	M340L4	53 mW	700 mA
365 nm	M365L2	310 mW	700 mA
530 nm	M530L2	400 MW	1600 mA
595 nm	M595L3	445 mW	700 mA
625 nm	M625L3	700 mW	1000 mA
660 nm	M660L3	640 mW	1200 mA

## (6) Bestimmung der Quantenausbeute

Die Quantenausbeuten des Photoschalters Spiropyran wurden am Gerät PHITS bestimmt. Mithilfe einer Photodiode (AK Wachtveitl) wurde die Menge an Photonen bestimmt, die von der jeweiligen LED abgegeben wurde. Spiropyran-haltige RNA-Stränge wurden in einer 45  $\mu\text{L}$  Küvette in PBS-Puffer mehrfach isomerisiert. Über RP-HPLC mit Diodenarray-Detektor (*Agilent; Chromolyth C<sub>18</sub>, 100x4,5 mm, isokratisch 85:15 – 0,1 M TEAA:MeCN*) wurden die Reinspektren der SP- und MC-Form gemessen.

Die Bestimmung der Quantenausbeute erfolgte in zwei Schritten. Als erstes mussten mit Hilfe der Reinspektren die Absorptionsspektren dekonvolviert werden, um zu bestimmen, welche Spezies zu welcher Konzentration vorliegt. Anschließend wurde die Konzentration einer der beiden Komponenten über die Zeit betrachtet. Durch die Ableitung fand eine Vereinfachung der Gleichung statt. Zur Bestimmung der photochemischen Parameter wurde ein Fit über die Zeit mit einer Differentialgleichung durchgeführt. Durch die Anpassung der Differentialgleichung an die gemessenen Daten wird die Quantenausbeute als Optimierungsparameter bestimmt. Ein Beispielsystem eines Photoschalters mit zwei Zuständen ist in Abb. 138 zu sehen und die zugehörigen Gleichungen darunter.



**Abb. 138:** Modell eines Photoschalters mit zwei Grundzuständen und zwei angeregten Zuständen.

Differentialgleichungen zum Fitten der dekonvolvierten Absorptionsspektren:

$$\frac{dA}{dt} = -\Phi_{A-B} \frac{I_{\lambda_{irr}}}{V} (1 - 10^{-\epsilon_A \lambda_{irr} A d}) + \Phi_{B-A} \frac{I_{\lambda_{irr}}}{V} (1 - 10^{-\epsilon_B \lambda_{irr} A d}) \quad (3)$$

$$\frac{dB}{dt} = -\Phi_{B-A} \frac{I_{\lambda_{irr}}}{V} (1 - 10^{-\epsilon_B \lambda_{irr} B d}) + \Phi_{A-B} \frac{I_{\lambda_{irr}}}{V} (1 - 10^{-\epsilon_A \lambda_{irr} A d}) \quad (4)$$

### 5.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### (1) Vektoren und Zellen

Alle verwendeten Plasmide wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Essen (Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

Alle *ompG*-Varianten wurden in einen pET 20b(+)-Vektor (Novagen) mit T7-Expressionsplattform über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* in der *Multiple Cloning Site* eingebaut. Außerdem wurde die Erkennungssequenz *pelB* am N-Terminus und ein Hexa-Histidin-Tag am C-Terminus eingefügt (Abb. 139).



**Abb. 139:** Vektorkarte pET20b(+) von Novagen mit Markierung der wichtigen Informationen (rot).

Die Cysteinmodifikationen wurden anschließend im Arbeitskreis Essen in den Vektor durch *Site-directed Mutagenesis* eingeführt. Eine Übersicht der vorhandenen Plasmide ist in Tabelle 19 gezeigt.

**Tabelle 19:** Liste der vorhandenen Plasmide aus der Arbeitsgruppe Essen.

Plasmid	Beschreibung
pET20b ompG (ohne <i>pelB</i> )	Wildtyp aus <i>E. coli</i> K-12
pET20b ompG ΔLK	Kleine Loop-6 Deletion
pET20b ompG ΔL6	Große Loop-6 Deletion
pET20b ompG ΔL6 M13C_E154C	Große Loop-6 Deletion, Punktmutation C13 und C154
pET20b ompG ΔL6 R92C_Y209C	Große Loop-6 Deletion, Punktmutation C92 und C209
pET20b ompG ΔL6 Y209C	Große Loop-6 Deletion, Punktmutation C209

Mit den erhaltenen Plasmiden wurde eine Sequenzierung (*GATC Biotech*) sowie ein Restriktionsverdau zur Bestätigung durchgeführt. Aus den Sequenzierungsdaten lässt sich die Aminosäuresequenz über das Online Programm *ExpASY translator* bestimmen.

## 5 - Experimenteller Teil

### Proteinsequenz aus Sequenzierung von **OmpG-1** (ompG/ $\Delta$ L6-M13C-E154C)

```
MEERNDWHFN IGACCYEIENV EGYGEDMDGL AEPSVYFNAA NGPWRIALAY YQEGPVDYSA
GKRGTWFDRP ELEVHYQFLE NDDFSFGLTG GFRNYGYHYV DEPGKDTANM QRWKIAPDWD
VKLTDDLRFN GWLSMYKFAN DLNNTGYADT RVETCTGLQY TFNETVALRV NYYLERGFNM
DDSRNNGEFS TQEIRAYLPL TLGNHSVTPY TRIGLDRAGH DFNRVGLFYG YDFQNGLSVS
LEYAFEWQDH DEGDSDFHY AGVGVNYSFH HHHHH
```

### Proteinsequenz aus Sequenzierung von **OmpG-2** (ompG/ $\Delta$ L6-R92C-Y209C)

```
MEERNDWXXN IGAMYEIENV EGYGEDMDGL AEPSVYFNAA NGPWRIALAY YQEGPVDYSA
GKRGTWFDRP ELEVHYQFLE NDDFSFGLTG GFCNYGYHYV DEPGKDTANM QRWKIAPDWD
VKLTDDLRFN GWLSMYKFAN DLNNTGYADT RVETETGLQY TFNETVALRV NYYLERGFNM
DDSRNNGEFS TQEIRAYLPL TLGNHSVTPC TRIGLDRAGH DFNRVGLFYG YDFQNGLSVS
LEYAFEWQDH DEGDSDFHY AGVGVXYSFH HHHHH
```

### Proteinsequenz aus Sequenzierung von **OmpG-3** (ompG/ $\Delta$ L6-Y209C)

```
MEERNDWXXN IGAMYEIENV EGYGEDMDGL AEPSVYFNAA NGPWRIALAY YQEGPVDYSA
GKRGTWFDRP ELEVHYQFLE NDDFSFGLTG GFRNYGYHYV DEPGKDTANM QRWKIAPDWD
VKLTDDLRFN GWLSMYKFAN DLNNTGYADT RVETETGLQY TFNETVALRV NYYLERGFNM
DDSRNNGEFS TQEIRAYLPL TLGNHSVTPC TRIGLDRAGH DFNRVGLFYG YDFQNGLSVS
LEYAFEWQDH DEGDSDFHY AGVGVXYSFH HHHHH
```

## Zelllinien

Die Expressionszelllinie *E. coli* BL21 (DE3)omp9 (B F<sup>-</sup> ompT hsdSB(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm (DE3)  $\Delta$ lamB ompF::Tn5  $\Delta$ ompA  $\Delta$ ompC  $\Delta$ ompN :: $\Omega$ )<sup>[221]</sup>, welche speziell für die Expression von OmpG als *Inclusion Bodies* genetisch angepasst wurde, stammt ursprünglich von der Gruppe Koebnik<sup>[221]</sup>. Auch die Zelllinie wurde uns freundlicherweise von der Gruppe Essen übergeben. Aufgrund der Deletion an eigenen Porinen in der Zellmembran, weisen die *E. coli* BL21 (DE3)omp9 Zellen ein deutlich verlangsamtes Wachstum auf.

Zur Präparation von Plasmid DNA wurde die allgemein bekannte Zelllinie *E. coli* DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), pho-A, supE44,  $\lambda$ <sup>-</sup>, thi-1, gyrA96, relA1) mit überdurchschnittlicher Amplifikation verwendet.

### (2) Restriktionsverdau

Zur Kontrolle der erhaltenen Plasmide wurden Restriktionsverdaus mit *EcoRI* und *NdeI* (beide *Thermo Scientific*) durchgeführt. 500 mg Plasmid wurden mit jeweils 1  $\mu$ L des gewünschten Enzyms in Puffer O (*Thermo Scientific*) in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ L für 4-6 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Verdau über ein Agarosegel (1%, 1xTBE-Puffer) analysiert.

---

### (3) Chemisch kompetente Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde die  $\text{RuCl}_2$ -Methode verwendet. Es wurden die zur Plasmid Präparation geeigneten *E. coli DH5 $\alpha$*  sowie die zur Expression der OmpG Varianten zugeschnittenen *E. coli BL21 (DE3)omp9* verwendet.

Aus einer Übernachtskultur (5 mL LB Medium) wurde eine 500 mL Hauptkultur (LB Medium) der *E. coli* Variante inokuliert und bei 37 °C bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5$  inkubiert. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis gekühlt, in 50 mL Falcons aliquotiert und zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 15 min, Zentrifuge 5430R, Rotor F-35-6-30, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 30 mL vorgekühltem Tfb I Puffer resuspendiert (100 mM  $\text{RuCl}_2$ , 50 mM  $\text{MnCl}_2$ , 30 mM KOAc, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15% Glycerin (v/v)). Nach 15 minütigem Inkubieren bei 4 °C wurde wieder zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 15 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1,6 mL Tfb II Puffer (0,2 M MOPS/NaOH, pH 6,5, 10 mM  $\text{RuCl}_2$ , 75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15% Glycerin (v/v)) resuspendiert und in 100  $\mu\text{L}$  Einheiten aliquotiert. Die fertigen, kompetenten Zellen wurden in flüssigem  $\text{N}_2$  eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

### (4) Plasmid Transformation

100  $\mu\text{L}$  Aliquote chemisch kompetenter Zellen wurden auf Eis mit 1  $\mu\text{L}$  Plasmid versetzt und anschließend 60 Minuten inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30-60 Sekunden bei 42 °C und eine direkte Zugabe von 1 mL LB Medium mit weiterer Inkubation bei 37 °C für 30 min auf einem Thermoschüttler von HLC Ditabis. Die Zellen wurden vorsichtig abzentrifugiert (Tischzentrifuge VWR Mini Star), in 50  $\mu\text{L}$  Restvolumen resuspendiert und ein Reinigungsausstrich durchgeführt (Agarplatte aus LB Medium und entsprechendem Antibiotikum versehen).

### (5) Plasmid Präparation

Nach Transformation in *E. coli DH5 $\alpha$*  wurden Übernachtskulturen (4 mL LB Medium, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp, 1% Glukose) mit einem Klon inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (8000 g, 4 °C, 3 min), der Überstand verworfen und mit dem Zellpellet das Protokoll des QIAGEN Mini Prep Kit durchgeführt. Die Elution der Plasmide erfolgte in Wasser. Abschließend wurde die Konzentration mittels Nanodrop bestimmt.

### 5.3.4 Proteinchemische Methoden

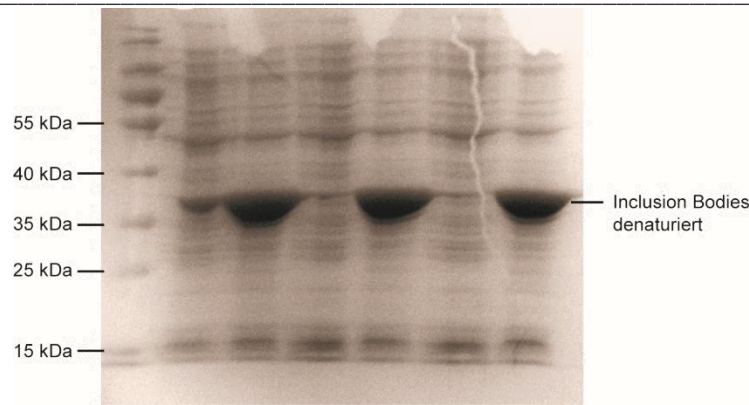
Die proteinchemischen Methoden sind im Wesentlichen orientiert an der Doktorarbeit von Wolfgang Grosse<sup>[220]</sup> (Arbeitsgruppe Essen) mit Abänderungen.

Alle verwendeten Puffer wurden aus autoklaviertem, ultrareinem Wasser angesetzt und vor Gebrauch sterilfiltriert.

#### (1) Expression und Aufreinigung von OmpG als *Inclusion Bodies*

Nach Grosse *et al.*<sup>[220]</sup> wurden OmpG-Mutanten als *Inclusion Bodies* exprimiert nach Transformation in Porin-mangelnde *E. coli* BL21 (DE3)omp9 Zellen. Es wurden 5 Übernachtskulturen (1 mL 2-YT Medium, 100 µg/mL Amp, 1% Glukose) mit jeweils einem Klon der Transformation inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Aus den Übernachtskulturen wurden am nächsten Tag Tageskulturen mit je 50 µL inokuliert (5 mL 2-YT Medium, 100 µg/mL Amp, 1% Glukose) und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,6-0,7 inkubiert. Es wurden 1 mL für die Analyse mittels SDS-PAGE und 100 µL zur weiteren Inokulation entnommen und bei 0 °C gelagert. Die restlichen 3,9 mL wurden mit 1 mM IPTG für eine Testexpression induziert und für ca. 2h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde wieder die OD verglichen und 1 mL der Kultur zur Analyse entnommen. Für die Kontrolle mittels SDS PAGE wurden die Zellen abzentrifugiert, das Pellet in Ladepuffer resuspendiert und für 5 min bei 98 °C denaturiert (siehe Abb. 140). Es wurden 10 µL aller entnommenen Proben aufgetragen und anhand der OmpG-Bande der beste Klon für die weitere Expression ausgewählt. Eine weitere Übernachtskultur (100 mL 2-YT Medium, 100 µg/mL Amp, 1% Glukose) wurde mit 100 µL, der bei 0 °C gelagerten, Probe der Tageskultur geimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (3 x 2 L 2-YT Medium, 100 µg/mL Amp, 1% Glukose) mit 20 mL der Übernachtskultur inokuliert, bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,6 inkubiert und dann mit 1 mM IPTG die Expression induziert. Nach 4-5 h wurde die Expression abgebrochen, die Zellen abzentrifugiert (4000 g, 4° C, 30 min; Sorvall LYNX6000 Thermo Scientific) und das Pellet in TN Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl) resuspendiert. DNase und 1mM PMSF wurden vor der Zellyse (*Emulsiflex*) zugegeben, die entstandene Suspension zentrifugiert (22000 g, 4° C, 25 min; Sorvall LYNX6000 Thermo Scientific) und der Überstand verworfen.





**Abb. 140:** Testexpressionsgel 12%-SDS PAGE zur Überprüfung der Expressionseffizienz.

Die Aufreinigung der *Inclusion Bodies* erfolgte durch mehrfaches Resuspendieren, um Zellreste zu entfernen. Zunächst wurde drei Mal in 30 mL Triton-TN Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 2,0% (v/v) Triton-X-100) resuspendiert, 1 mL zur Analytik entnommen und zentrifugiert (20000 g, 4 °C, 15 min). Vom Überstand wurde ebenfalls eine Probe zur Analytik entnommen. Dieselbe Prozedur wurde danach drei Mal in TN Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl) durchgeführt. Aus den entnommenen Proben konnte mittels SDS PAGE die Reinheit der *Inclusion Bodies* kontrolliert werden. Gewaschene *Inclusion Bodies* wurden abschließend in TN-Puffer (10 mg/mL) resuspendiert, mit flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

## (2) Rückfaltung und Aufreinigung

Gewaschene *Inclusion Bodies* wurden abzentrifugiert (20000 g, 4 °C, 1 min), das Pellet in Denaturierungspuffer resuspendiert (25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 6 M Harnstoff, 1 mM TCEP) und für 10 min auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurde wieder zentrifugiert (20000 g, 4 °C, 3 min), nichtlösliche Rückstände verworfen und die Konzentration über die Absorption bei 280 nm bestimmt (*Nanodrop*). Der klare Überstand wurde mittels *Rapid Dilution* unter leichtem Schütteln (200 rpm) in Rückfaltungspuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 2,5 M Harnstoff, 1 mM TCEP, 3% OG (w/v)) getropft, sodass eine Konzentration von ca. 1 mg/mL OmpG entstand. Nach mildem Schütteln über Nacht (30 °C, 200 rpm) wurde eine Rückfaltungskontrolle über ein SDS PAGE durchgeführt. Durch Zugabe von Proteinase K (10 µg/mL, 25 °C, 30 min), Beenden der Reaktion durch Zugabe von 13 mM PMSF in DMSO) konnten fehlgefaltete Komponenten abgebaut werden.

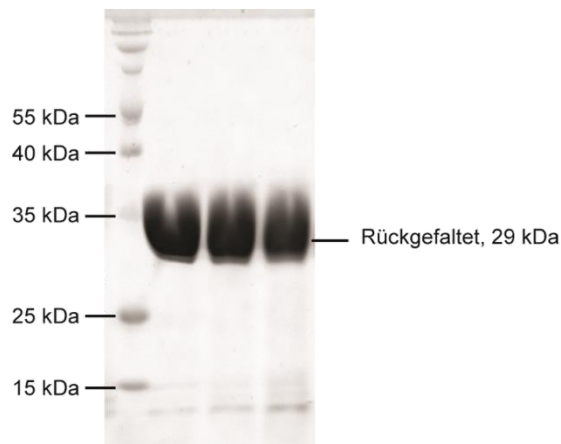
Die Proteinlösung wurde anschließend in einen Zentrifugenfilter überführt (siehe Abschnitt Aufkonzentrieren/ Entsalzen) und mit Ionenaustauschpuffer (IEC) A (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10% Glycerin, 0,05% LDAO, 25 mM NaCl) gewaschen. Dabei wurden bereits kleine

## 5 - Experimenteller Teil

Proteinfragmente entfernt. Rückgefaltetes OmpG wurde anschließend über Ionenaustauschchromatographie (IEC, *HiTrap Q HP*, *GE Healthcare*, 5 mL; *NGC Chromatography System Quest 10 Plus*, *BIO RAD*) weiter aufgereinigt (vgl. SDS PAGE der Fraktionen in Abb. 141). Die Elution erfolgte bei ca. 21,8 mS/cm (NaCl-Gradient siehe Tabelle 20). Im Anschluss wurden Proteinfraktionen aufkonzentriert, die Konzentration bestimmt und bei -80 °C gelagert oder weiter umgesetzt.

**Tabelle 20:** Verwendeter Ionenaustauschchromatographie-Gradient zur Aufreinigung von OmpG.

Säulenvolumen	% 10 mM NaCl	% 1 M NaCl
0	100	0
6	100	0
16	50	50



**Abb. 141:** 10%-SDS PAGE zur Kontrolle der gesammelten Fraktionen der IEC nach Rückfaltung.

### (3) Aufkonzentrieren/ Entsalzen

Zum Reduzieren des Probenvolumens, dem Erhöhen der Proteinkonzentration oder zum Pufferaustausch wurden Zentrifugenfilter verwendet. Je nach Volumen wurden die Filter *Pierce Protein Concentrator PES* der Größe 2-6 mL oder 20 mL mit 10K MWCO von *Thermo Scientific* verwendet. Vor Gebrauch wurden die Filter mindestens zwei Mal mit ultrareinem Wasser gewaschen und bei 5000 g nach Herstellerangabe verwendet. Auch Puffer-Lösungsmittelgemische mit einem Anteil bis 50% MeCN wurden ohne Schädigung der Membran verwendet.

## (4) S-Alkylierung von OmpG

Zur Modifikation mit photolabilen Schutzgruppen oder Photoschaltern wurde rückgefaltetes Protein auf eine Konzentration von 0,1 mM mit Alkylierungspuffer (100 mM  $KP_i$ , pH 7,5, 0,4%  $C_8E_4$ ) verdünnt. Es wurde 1 mM TCEP zugegeben, für 10 min. gewartet und dann die photosensitive Modifikation in 50-fachem Überschuss, gelöst in MeCN, zugegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass das Verhältnis Puffer:MeCN - 5:1 nicht überschritten wird. Nach Inkubation für 30-60 min (37 °C, 300 rpm) wurde die Zugabe beider Komponenten wiederholt und über Nacht mit denselben Bedingungen inkubiert.

Anfangs folgte eine Größenausschlusschromatographie über eine PD10-Säule (GE) mit Puffer IEC-A, doch aufgrund großer Verluste wurde auf einen Zentrifugenfilter gewechselt. Dies ermöglichte ebenfalls den Wechsel auf die Bedingungen der folgenden IEC (siehe Tabelle 20). In der IEC wurde die Wellenlänge des Proteins und der Modifikation detektiert. Proteinfraktionen wurden abschließend aufkonzentriert, die Konzentration bestimmt und auf Lagerungspuffer dialysiert (25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 10% Glycerin, 0,4%  $C_8E_4$ ) und bei -80 °C gelagert.

## (5) Click-Reaktionen an Alkin-DEACM-OmpG-Hybriden

Für die Click-Reaktion der OmpG-Varianten wurden die Komponenten  $CuSO_4$  und Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA), das Reduktionsmittel TCEP und die Reaktionspartner **OmpG-9** und Azid in Stammlösungen vorgelegt. Äquivalente und Konzentrationen sind in Tabelle 21 zu sehen. Bei der Zusammensetzung wurde darauf geachtet, dass ein Gesamtvolumen von 100  $\mu$ L entsteht, welches zu 70% aus dem Lagerungspuffer des Proteins und zu 30% aus einem 3:1-Gemisch DMSO/t-BuOH besteht.  $CuSO_4$  und TBTA wurden für 10 min zusammen inkubiert und dann auf das Reaktionsgemisch gegeben, welches bei 900 rpm über Nacht bei Raumtemperatur in einem PCR-Gefäß stark geschüttelt wurde.

Tabelle 21: Reagenzien zur Click-Reaktion

	Lösungsmittel	Eq.	Endkonzentration (mM)	Stammlösung (mM)
Protein	Tris/HCl pH 8	1	1 mg/ml (40 $\mu$ M)	
Azid	DMSO	10	0,4	
TCEP	H <sub>2</sub> O	20	0,8	80
$CuSO_4$	H <sub>2</sub> O	20	0,8	10
TBTA	DMSO/tBuOH	20	0,8	10

## 5 - Experimenteller Teil

Die Aufreinigung und Analyse erfolgte durch ein SDS PAGE. Proteinhaltige Banden wurden ausgeschnitten und das Protein aus dem Gel eluiert. Für die Bindung von Streptavidin wurden eluierte OmpG-Varianten (100  $\mu$ L, ca. 0,85 nmol, 1 Eq.) mit Biotinlinker nach Zugabe von Streptavidin (4 nmol in ultrareinem Wasser, 2 Eq.) für 30 Minuten bei 30 °C, 300 rpm inkubiert. Auch hier erfolgte die Aufreinigung über SDS PAGE mit anschließender Elution aus dem Gel.

### (6) Dialyse

Zur Lagerung wurden OmpG-Derivate nach Aufreinigung über IEC auf Lagerungspuffer dialysiert (25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 10% Glycerin, 0,4% C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>). Dazu wurde die Dialyseeinheit *Slyde-a-Lyzer* von *Thermo Fisher Scientific* (10K MWCO) verwendet. Die Probe wurde in einem Volumen von 100-200  $\mu$ L in die entsprechende Kammer pipettiert, auf das Reservoir mit Dialysepuffer gesetzt und auf einem Schüttler für 2 h bei 4 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Pufferreservoir ausgetauscht und über Nacht weiter dialysiert.

### (7) Protein-Massenspektrometrie

Das Molekulargewicht der OmpG-Varianten wurde aus den Sequenzierungsergebnissen über das Online Programm *Expasy ProtParam* berechnet. Das Gewicht von markierten OmpG wurde durch Addition der bestätigten Massen der unmarkierten Variante mit der Modifikation bestimmt. In Tabelle 22 ist eine Übersicht der berechneten und gemessenen Massen zu sehen. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an der Universität Marburg von Dr. Uwe Linne durchgeführt. Nach Entsalzen unter denaturierenden Bedingungen über eine *MassPrep*-Säule von *Waters* (60 °C, 0,05% Ameisensäure/ MeCN) am Gerät *Waters ACQUITY H-Class* wurde ein ESI am Gerät *Synapt G2Si* von *Waters* gemessen.

**Tabelle 22:** Übersicht der berechneten im Vergleich zu den spektrometrisch bestimmten Massen.

Bezeichnung	Masse berechnet	Masse gefunden	$\Delta m$
OmpG-1	31986,8 Da	31987,0 Da	0,2
OmpG-2	31927,7 Da	31928,0 Da	0,3
OmpG-3	31980,7 Da	31982,0 Da	1,3
OmpG-4	31976,4 Da	32040,8 Da	64,4
OmpG-5	32563,2 Da	32560,0 Da	3,2
OmpG-7	32675,4 Da	32674,0 Da	1,4
OmpG-8	32831,2 Da	32715,0 Da	116,2

### 5.3.5 Black Lipid Membran Messungen

OmpG-Leitfähigkeiten wurden über die *Black Lipid Membran*-Methode (BLM) untersucht. Dazu wurden 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPhPC, *Avanti polar lipids*) in *n*-Decan solubilisiert (25 mg/ml) und über ein 200 µm rundes Loch gestrichen, welches die beiden Kammern trennt (Polystyrol Küvette: CP2A, Doppelschichtkammer: BCH-22A, *Warner Instruments*). Die Kammern wurden gleichmäßig mit BLM-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 M NaCl) gefüllt. Die Messungen wurden unter Rot-Licht durchgeführt. Die nativen OmpG-Varianten wurden in 0,5-2 µL Portionen in geringer Konzentration (< 10 µM) in die Nähe der Membran in den Puffer gegeben. Nach Anlegen von Spannung wurde auf die Insertion eines Kanals in die Membran gewartet. Nach Einbau eines Kanal wurde eine Charakterisierung durch Modulation der Spannung zwischen 80 und -80 mV durchgeführt und die zugehörige Stromstärke in pA detektiert. Zur Belichtung wurde eine Spannung von 40 mV angelegt und die Belichtung mit einer Glasfaser-gekoppelten LED für mehrere Minuten durchgeführt (siehe Abschnitt Belichtung). Anschließend erfolgte eine zweite Charakterisierung durch Spannungswechsel. Die Detektion des Stromflusses erfolgte über einen *Multipatch 700B patch-clamp* Amplifier der mit einem *Digidata 1440A A/D* Konverter verbunden ist.

Stromkurven wurden über das Programm *Clampex 10.4* (*Axon Instruments*) analysiert. Zur besseren Analyse wurde ein 200 Hz-Filter auf die Datenpunkte angewendet.

### 5.3.6 Elektrophoretische Trennverfahren

#### (1) Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Harnstoff-haltige Polyacrylamidgele wurden zur Aufreinigung und Analyse von RNA eingesetzt. Dazu wurden 16%-Acrylamidgele mit TBE-Puffer angesetzt (16% Acrylamid (19:1 – AA:BAA), 7 M Harnstoff, 1xTBE Puffer). 0,5x TBE-Puffer wurde außerdem als Laufpuffer verwendet (1xTBE: 100 mM Trisbase, 83 mM Borsäure, 1 mM Na-EDTA). Präparative Gele (60 mL) wurden über Nacht polymerisiert und nach Probenapplikation für 5 h bei 250 V aufgetrennt. Analytische Gele (7 mL) wurden für 1 h bei 250 V aufgetrennt. Die RNA-haltigen Banden wurden anschließend durch Inkubation mit *SYBR Gold*<sup>®</sup> von Thermo Fisher angefärbt und auf einem Transilluminator (*BIO View UV light* von *Biostep*) bei 305 nm angeregt.

## (2) SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele wurden zur Analytik der OmpG Präparationsschritte und zur Aufreinigung kleiner Probenvolumen verwendet. In der Regel wurden Gele mit 1% SDS und 10 oder 12% Acrylamid (19:1 – AA:BAA, *Roth*) im Trenngel verwendet und nach folgendem Schema zusammengesetzt (Tabelle 23).

**Tabelle 23:** Pipettierschema für SDS-haltiger Polyacrylamidgele.

SDS PAGE	Trenngel			Sammelgel	
	12%	10%	10%	4%	4%
Acrylamid (19:1)	3 ml	2,5 ml	1,25 ml	0,5 ml	0,25 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,6 ml	2,6 ml	1,3 ml	-	-
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	-	-	-	1,25 ml	0,625 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	50 µl	50 µl	25 µl
H <sub>2</sub> O	4,2 ml	4,7 ml	2,35 ml	3,025 ml	1,5 ml
APS (10%)	100 µl	100 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl	5 µl	2,5 µl
Gesamtvolumen	<b>10 ml</b>	<b>10 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>2,5 ml</b>

Es wurden ein SDS-haltiger Laufpuffer (50 mM Tris/HCl, pH = 7,4, 40 mM Glycin, 10% SDS) und nicht-denaturierender Ladepuffer (SDS 5 g/L, 30% Glycerin, Bromphenolblau) eingesetzt. In der Regel wurde eine Spannung zwischen 120 und 150 mV angelegt über 1-1,5 h (Apparatur und Stromquelle VWR). Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde *Coomassie Brilliant Blau*<sup>®</sup> von *Thermo Fisher Scientific* eingesetzt.

## (3) Extraktion aus SDS-PAGE Gelen

Um Fragmente aus dem Acrylamidgel zu extrahieren, wurden die mit fluoreszierenden Cumarinderivaten versehenen Proteinbanden auf einem Transilluminator (365 nm, 5 mW) markiert. Die Banden wurden ohne weitere Färbung in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 300 µL Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl, 10% Glycerin (v/v), 0,4% C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>) versetzt und zermörsert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße über Nacht bei Raumtemperatur und 600 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden Gelreste mit einem 0,45 µM Zentrifugenfilter von VWR abfiltriert und die Konzentration über Absorption bei 280 nm mittels *Nanodrop* bestimmt.

### 5.3.7 MD-Simulation

Um eine bessere Einschätzung der Größenverhältnisse von RNA, Linker und Spiropyran zu bekommen, wurde einfache MD-Simulationen durchgeführt. Dazu wurde der Spiropyrananteil im Programm *Chemdraw* gezeichnet und im Programm *Discovery Studio 4.0* in den RNA-Duplex mit Sequenz aus Tabelle 1 eingebaut. Anschließend wurde das Konstrukt in das Interface *Maestro* des *Schrodinger Programms Pakets* übertragen und eine kurze *Molecular Dynamics* Simulation mit dem Programm *Desmond* des *Schrodinger Pakets* durchgeführt. Es wurde das SPC-Wassermodell in einer orthorhombischen Box mit den Maßen 10x10x10 Å um die RNA gelegt. Es wurde ein OPLS Kraftfeld von 2005 verwendet über eine Simulationszeit von 5 ns mit Intervallen von 5 ps im NPT Ensemble. Anschließend wurde die Simulation optisch anhand der Größenverhältnisse analysiert.

### 5.3.8 Puffer

Die eingesetzten Puffer wurden mit ultrareinem Wasser angesetzt und nach Bedarf autoklaviert und sterilfiltriert (0,22 µm oder 0,45 µm, *VWR*). Für die Anwendung von RNA wurde ultrareines Wasser (1 L) mit 1 mL DEPC (Diethyldicarbonat) für 24 h inkubiert und anschließend autokalviert. In den meisten Fällen wurde nach Mischung der Komponenten der pH-Wert nachträglich eingestellt und dann auf das Gesamtvolumen aufgefüllt.

#### (1) Puffer Oligonukleotide

100 mM TEAA (pH 7,4):

Eisessig		100 mM
Triethylamin		100 mM

MOPS (pH 8,0):

MOPS		50 mM
NaCl		500 mM

1 xPBS (pH 7,4):

NaCl		137 mM
KCl		2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1,4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		10 mM

## 5 - Experimenteller Teil

---

TBE (pH 7,4):

Tris-Base	100 mM
Borsäure	83 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	1 mM

### (2) Puffer Bakterien

TfB-I:

RuCl <sub>2</sub>	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
KOAc	30 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
Glycerin	15% (v/v)

TfB-II (pH 6,5):

MOPS/NaOH	200 mM
RuCl <sub>2</sub>	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
Glycerin	15% (v/v)

### (3) Puffer OmpG

TN/ Triton-TN (pH 8,0):

Tris/HCl	50 mM
NaCl	100 mM
Triton-X-100	2% (v/v)

Denaturierungspuffer (pH 8,0):

Tris/HCl oder KP <sub>i</sub>	25 mM
Harnstoff	6 M
TCEP	1 mM

Rückfaltungspuffer (pH 8,0):

Tris/HCl oder KP <sub>i</sub>	25 mM
Harnstoff	2,5 M
TCEP	1 mM
OG	3% (w/v)
OmpG	1 mg/mL



## IEC-A/B (pH 8,0):

Tris/HCl	10 mM
NaCl	25 mM (A)/1 M
Glycerin	(B) 10%
LDAO	0,05% (w/v)

## Alkylierungspuffer (pH 7,5):

KP <sub>i</sub>	100 mM
C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>	0,4% (v/v)

## Lagerungspuffer (pH 8,0):

Tris/HCl	25 mM
NaCl	100 mM
Glycerin	10% (v/v)
C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>	0,4% (v/v)

## BLM-Messungen (pH 7,4):

Tris/HCl	10 mM
NaCl	1 M

## SDS PAGE Laufpuffer (pH 7,4):

Tris/HCl	50 mM
Glycin	40 mM
SDS	10% (w/v)

## SDS PAGE nicht-denaturierender Ladepuffer:

SDS	5 g/L
Glycerin	30% (v/v)
Bromphenolblau	

## SDS PAGE Elutionspuffer (pH 8,0):

Tris/HCl	20 mM
NaCl	250 mM
Glycerin	10% (v/v)
C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>	0,4% (v/v)



## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

#### **A**

A	Adenin
AA	Acrylamid
a.u.	atomic units
Abb	Abbildung
abs	absolut
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
ADAR	Adenosin Deaminase acting on RNA
Amp	Ampicillin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure Rezeptor
ANBP	Dialkylaminonitrobiphenyl
ANB	Aminonitrobenzyl
AP	Aminopurin
APS	Ammoniumpersulfat
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
ATP	Adenosintriphosphat

#### **B**

BAA	Bisacrylamid
BBHCM	8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycoumarin-4-yl)methyl
BCMACM	Bis(carboxymethyl)aminocoumarin
Bhc	Bromhydroxycoumarin
BHQ	Black Hole Quencher
BIPS	Spirobenzopyran
BLM	Black Lipid Membran
BNI	Bromnitroindolin
BTT	Benzylthiotetrazol

#### **C**

C	Cis
C	Cytosin
C	Cystein
CamKII	Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CDNI	Carboxydinitroindolin
CH	Cyclohexan
COSY	Correlated Spectroscopy
CPG	Controlled pore glass
CREB	cAMP Response element-binding protein
CuAAC	Cu-(I) Alkin Azid Click Reaktion
Cy	Cyanin

#### **D**

D	Debye
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEACM	Diethylaminocoumarin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMNPE	Dimethoxynitrophenylethyl

## 6 - Anhang

---

DMP	Dimethoxyphenacyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPhPC	1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin

### E

E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EE	Essigsäureethylester
EMP	Engineered Minimal Porin
eq.	Equivalent
EPSP	exzitatorisches post-synaptisches Potential
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
EtOAc	Essigsäureethylester
ETT	Ethylthiotetrazol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

### F

Fa	Firma
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
fs	Femtosekunde
FW	Formula Weight
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography

### G

g	Gramm
G	Guanin
G	elektrische Leitfähigkeit
GFP	Green-fluorescent Protein

### H

h	Stunde
H	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (Hochaufgelöste Massenspektrometrie)
Hz	Hertz
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence

### I

IB	Inclusion Bodies
iPrPac	<i>iso</i> -Propylphenoxyacetyl
IEC	Ion exchange chromatography (Ionenaustauschchromatographie)
Ihc	Iodhydroxycumarin
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid

### K

K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
----------------	------------------------

### L

LB	Luria Bertani Broth
LDAO	<i>N,N</i> -Dimethyldodecylamin- <i>N</i> -oxide
LDP	Langzeitdepression
LED	Light-emitting Diode
LNA	locked Nucleic Acid
LPS	Lipopolysaccharid
LTP	Langzeitpotenzierung

### M

m	Multipllett
M	Mol

---

M	Methionin
M	Molekulargewicht
mA	milli Ampere
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
mAU	milli Absorbance Units
MC	Merocyaninform
MCM	Methoxycumarin
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Mega Hertz
MNI	Methoxynitroindolin
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
miRNA	Micro RNA
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
mV	milli Volt
mW	milli Watt
MWCO	Molecular Weight Cut Off
<b><u>N</u></b>	
NDBF	Nitrodibenzofuran
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
NLS	Nuklear Localisation Sequenz
nm	Nanometer
NMA	<i>N</i> -Methylanilin
NMDAR	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Aspartat Rezeptor
NMR	Nuklear Magnetische Resonanz
Nitro-BIPS	6-Nitrospirobenzopyran
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange spectroscopy
NPE	1-(2-Nitrophenyl)ethyl
NPP	2-(2-Nitrophenyl)propyl
Nt	Nukleotid
Nu	Nukleophil
<b><u>O</u></b>	
OD	Optische Dichte
OG	<i>N</i> -Octyl- $\beta$ - <i>D</i> -glucosid
OMe	Methoxy
Omp	Outer Membrane Protein
ONB	<i>o</i> -Nitrobenzyl
<b><u>P</u></b>	
Pac	Phenoxyacetyl
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Photonenanregung
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethersulfon
PDB	Protein Databank
pHP	<i>p</i> -Hydroxyphenacyl
PPG	photolabile Schutzgruppe
ppm	Parts per Million
PyBIPS	<i>N</i> -Methylspiropyridopyran
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
PS	Phosphothioat
<b><u>R</u></b>	
R	Arginin
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
rpm	Rounds per Minute

## 6 - Anhang

---

rRNA	ribosomale RNA
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
<b><u>S</u></b>	
s	Singulett
S	Siemens
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
siRNA	small interfering RNA
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
SP	Spiro-Form
<b><u>T</u></b>	
t	Triplett
T	Thymin
T	Trans
TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBE	Tris, Borsäure, EDTA
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
<i>t</i> -BuOH	<i>Tert</i> -Butanol
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tricarboxyethylenphosphin
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammonium acetat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin
TEN	Tris, EDTA, NaCl
TFA	Trifluoressigsäure
Tfb	Transformationspuffer
THF	Tetrahydrofuran
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
tRNA	transfer RNA
TS	Transition State (Übergangszustand)
<b><u>U</u></b>	
U	Uracil
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
<b><u>V</u></b>	
Vis	Visible (sichtbarer Bereich)
<b><u>Y</u></b>	
YT	Yeast, Trypton

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Schematische Darstellung der Absorptionsspektren des Beispiels A und B. Isomer A lässt sich durch Belichtung im UV Bereich zu Isomer B isomerisieren. Die Rückisomerisierung zu Isomer A kann außer durch Anregung mit Licht im sichtbaren Bereich auch thermisch erfolgen.<sup>[9]</sup> 2
- Abb. 2:** Übersicht über verschiedene, bekannte Photoschalter mit Photoisomeren – a) Spiropyran, b) Azobenzol, c) Stilben, d) Diarylethen und e) Fulgid. 3
- Abb. 3:** Linke Seite – Darstellung von Spiropyran- und Merocyanin-Form, oben schematisch mit Bedingungen der Isomerisierung, unten mit Verbildlichung des räumlichen Anspruchs von SP und MC. Rechte Seite – Foto von SP- und MC-Form gelöst in Wasser. Die MC-Form zeigt die charakteristische rote Farbe. 4
- Abb. 4:** Charakteristische Absorptionsspektren der SP-Form (grau), der MC-Form (violett) und der protonierten MC-Form,  $MCH^+$  (gelb) am Beispiel von NitroBIPS **1** in MeCN. Entnommen aus Klajn et al.<sup>[13]</sup> 4
- Abb. 5:** Darstellung der möglichen Isomere durch Rotation der zentralen Bindungen der Methinbrücke.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  beschreiben den Diederwinkel der cis- und trans-Orientierung der einzelnen Bindungen von Merocyanin **1b**.<sup>[12,14]</sup> 5
- Abb. 6:** Darstellung des Isomerisierungsmechanismus photochemisch oder thermisch initialisiert. Beide Wege gehen über ähnliche Zwischenstufen von der Spiropyran-Form **1a** in die Merocyanin-Form **1b** über. Angelehnt an Klajn.<sup>[13,15]</sup> 6
- Abb. 7:** Vergleich der MC-Isomere TTC und TTT. Links - Darstellung der Struktur der Isomere mit Markierung der entscheidenden Bereiche für TTT blau und TTC rot. Rechts – Absorptionsspektren der Spiropyran-Derivate NitroBIPS (X=H) oben und DinitroBIPS (X=NO<sub>2</sub>) unten. Das Absorptionsmaximum der TTT-Form ist im Vergleich zu TTC Rot-verschoben. Entnommen aus Nuernberger et al.<sup>[19]</sup> 7
- Abb. 8:** Schematische Übersicht von möglichen Isomerisierungs- und Protonierungszustände der SP- und MC-Form. Außer der photochemisch induzierten Isomerisierung lassen sich SP- und MC-Form pH-Wert-abhängig protonieren, einhergehend mit einer Änderung des Absorptionsspektrums. Ausgehend von der MC-Form ist Hydrolyse in Anwesenheit von Wasser möglich. Angelehnt an Kaiser et al.<sup>[22]</sup> 7
- Abb. 9:** Spiropyran-Derivate ausgehend von BIPS **9**. Linke Seite - Nitroderivate NitroBIPS **1** und DinitroBIPS **11**. Rechte Seite - Pyridinderivate PyBIPS **10** und PyBIPS-Derivat ohne Methylgruppe **12**. 9
- Abb. 10:** Literaturbeispiele zum kovalenten Einbau von NitroBIPS in DNA. a) Anknüpfung an einen nicht-nukleosidischen Linker **13 b**) über Click-Reaktion an der 2'-OH-Gruppe eines RNA-Bausteins. a) und b) von Beyer und Wagenknecht<sup>[50]</sup>. c) Nukleotidanalogen als Mimik des DNA-Rückgrats von Brieke und Heckel<sup>[51]</sup>. 11
- Abb. 11:** Photochemische Charakterisierung von PyBIPS in DNA. Links – Absorptionsspektrum der SP- (schwarz) und MC-Form (grau). Rechts – Schaltzyklus durch Belichtung mit UV und sichtbarem Licht. Entnommen aus Brieke et al.<sup>[51]</sup> 11
- Abb. 12:** Darstellung der verschiedenen Grundgerüste von Nitrobenzyl **16**, Cumarin **22**, Arylcarbonylmethyl **26** und Nitroindolin **30** mit den Möglichkeiten für Substitution und Positionen der möglichen Abspaltung. Auf der rechten Seite prominente Vertreter der einzelnen Klassen. Nitrobenzyllderivate Nitrophenylethyl (NPE, **17**), Nitrophenylpropyl (NPP, **19**), Dimethoxynitrophenylethyl (DMNPE, **18**), Nitrodibenzofuran (NDBF, **20**) und Dialkylamininitrophenyl (ANBP, **21**). Cumarinderivate: Methoxycumarin (MCM, **23**), Bromhydroxycumarin (Bhc, **24**) und Diethylaminocumarin (DEACM, **25**). Phenacylderivate: Dimethylphenacyl (DMP, **27**), p-Hydroxyphenacyl (pHP, **28**) und Acetylnitrobenzyl (ANB, **29**). Nitro-indolderivate: Methoxynitroindolin (MNI, **31**), Carboxymethoxydinitroindolin (CDNI, **32**) und Bromnitroindolin (BNI, **33**). 13
- Abb. 13:** Neuartige photolabile Schutzgruppen für die Anwendung im therapeutischen Fenster zwischen 600 und 1000 nm basierend auf den Chromophoren Heptamethincyanin (Cy7, **34**, links) und BODIPY (**35**, rechts).<sup>[57,68]</sup> 14
- Abb. 14:** Mechanismus der Photolyse von Cumarinen: vom angeregten Zustand kann ein Übergang zurück in den Grundzustand strahlungslos oder über Emission von Fluoreszenz erfolgen oder der C-O Bindungsbruch wird initialisiert. Das entstandene Kontaktionenpaar kann rekombinieren und zurück in den Grundzustand übergehen oder durch Angriff eines Nukleophils das reaktive Cumarinkation abgefangen werden.<sup>[54,70,71]</sup> 15

- Abb. 15:** Cumarinderivate mit verbesserter Wasserlöslichkeit BBHCM **36** und BCMACM **37** von Hagen et al.<sup>[74,75]</sup> 8-Aza-basierendes Ihc **39** und Bhc **38** für verbesserte Wasserlöslichkeit und Quantenausbeuten von Furuta et al.<sup>[80]</sup> Rot-verschobene Cumarine von Jullien et al.<sup>[76]</sup> Thio-DEACM **40**, CN-DEACM **41** und DEAC **450** **42** von Ellis-Davies.<sup>[77]</sup> 17
- Abb. 16:** Möglichkeiten photolabile Schutzgruppen im Kontext von Proteinen einzusetzen. A – Das Protein wird z.B. an einer funktionellen Gruppe einer Aminosäureseitenkette geschützt. B – Die Interaktion zwischen einem Molekül und dem Protein wird photochemisch durch Schützung des Effektmoleküls inhibiert. Angelehnt an Baker und Deiters.<sup>[81]</sup> 17
- Abb. 17:** Expression eines photolabil geschützten NLS-Faktors mit GFP-Reporter über Amber-Codon-Suppression. Der Einbau eines photolabil geschützten Lysins (**43**, links) in die NLS-Sequenz (Mitte) verhindert das Eindringen in den Nukleus. Nach Belichtung ist über 100 Sekunden eine Diffusion des NLS-GFP-Komplexes in den Nukleus sichtbar (rechts). Entnommen aus Deiters et al.<sup>[87]</sup> und modifiziert. 18
- Abb. 18:** Postsynthetisches Schützen einer Cysteinseitenkette mit DMNPE **44** über einen Acetatlinker an der Innenseite eines Ionenkanals. Durch die Bindung des hydrophoben Chromophors schließt sich der Ionenkanal. Durch Belichtung wird die photolabile Schutzgruppe (**45**) abgespalten und hinterlässt eine Carboxylfunktion am Thiol. Durch Deprotonierung wird die Hydrophilie wiederhergestellt und der Ionenkanal öffnet sich. Angelehnt an Szymanski et al.<sup>[93]</sup> 19
- Abb. 19:** Belichtung eines Cumarins **46** auf einer Thiofunktion (Thioether). Es entstehen zwei Photoprodukte: A – das Migrationsprodukt mit kovalenter Bindung am C3 (**47**). B – das gewünschte, freigesetzte Produkt Alkohol **24**.<sup>[95]</sup> 19
- Abb. 20:** Lösungsansätze zur Verhinderung der Migration des Thiolrestes an C3. A) Blockade des C3 durch eine Methylgruppe, die destabilisierend auf das Migrationsprodukt **49** wirkt. B) Verwendung eines Thiocarbonatlinkers **50**, der erst im zweiten Schritt das Thiol freisetzt.<sup>[96–98]</sup> 20
- Abb. 21:** Übersicht gängiger Reaktionen von terminalen Aminen. a) Nukleophile Addition an Isocyanate, b) Amidbildung durch Substitution eines NHS-Esters, c) Amidbildung durch Substitution eines Azids, d) Bildung von Iminen aus Aldehyden, e) Öffnung von Anhydriden und f) Öffnung von Epoxiden. 22
- Abb. 22:** Übersicht über gängige Reaktionen von Sulfhydrylen mit anderen funktionellen Gruppen am Beispiel als Cysteinseitenkette. a) Acyl, b) Alkyl, c) Maleimid, d) Iodacetamid, e) Metall-Thiol dative Bindung und f) Disulfid. 23
- Abb. 23:** Reaktionszyklus der Click-Reaktion nach Sharpless et al.<sup>[103]</sup> Das Alkin bindet im ersten Schritt an den Kupfer-komplex. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung des Azids, welches anschließend die Alkinfunktion angreift. Es entsteht ein intermediärer Sechsring, der sich in einen stabileren Fünfring umlagert, bevor er sich vom Katalysator löst. 24
- Abb. 24:** Links - Transmembranprotein aus  $\alpha$ -Helices am Beispiel von Aquaporin (PDB:4WO5), rechts -  $\beta$ -Fasstruktur am Beispiel von OmpG (PDB: 4CTD). 26
- Abb. 25:** Übersicht verschiedener Transportmechanismen von Membranproteinen. Carrier unterliegen einer begrenzten Transportrate und werden weiter in aktiv und passiv unterschieden, während Kanäle einen unlimitierten Durchfluss zulassen, bezogen auf die Menge. 26
- Abb. 26:** Schematische Darstellung der Hülle von Gram-negativen Bakterien. Das Zytoplasma ist von einer inneren Membran, einer Phospholipid-Doppelschicht umgeben. Darum befindet sich ein Netzwerk aus verknüpften Polysacchariden, auch Periplasma. Die äußere Membran ist zur Hälfte aus Phospholipiden und nach außen mit Lipopolysacchariden versehen, die charakteristisch für verschiedene Zelltypen sind. Porine sitzen in der äußeren Membran. Angelehnt an Varki et al.<sup>[107]</sup> 27
- Abb. 27:** Genereller Aufbau von  $\beta$ -Fasstrukturen. Linke Seite – struktureller Aufbau mit wichtigen Kennziffern zur Beschreibung einer  $\beta$ -Fasstruktur dargestellt. Rechte Seite – Beispiel einer  $\beta$ -Fasstruktur am Beispiel einer Einheit des Trimers OmpF (PDB:2OMF). 28
- Abb. 28:** Übersicht über die vorgestellten Porine der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. Kleine Porine OmpA und OmpX bestehend aus 8 Strängen. Das allgemeine Porin OmpF, hier zu Übersicht als Monomer dargestellt. Eisenabhängiges, großes Porin FhuA und Toxin  $\alpha$ -Hemolysin mit großer intrazellulärer Domäne. 30
- Abb. 29:** Geschlossene und offene Form von OmpG abhängig vom pH-Wert, dargestellt von der Seite und von oben. Loop 6 wird bei niedrigem pH-Wert verlängert und kann die Pore verschließen. Kristallstrukturen von Yildiz et al.<sup>[125]</sup> (geschlossene Form: 2IWW, offene Form: 2I WV). 31



- Abb. 30:** Verteilung der Aminosäuren dargestellt anhand der Seitenketten in der Kristallstruktur (PDB: 2WVP) von OmpG, grau - neutrale, rot – positiv und blau – negativ geladene Seitenketten. A- Darstellung von der Seite, im mittleren Teil, der mit der Lipiddoppelschicht interagiert, sind auf der Außenseite nur unpolare Seitenketten, an den Rändern zur Wechselwirkung mit den Lipidkopfgruppen auch polare, bevorzugt positiv. B – Blick von oben in den Kanal von der Loop-Richtung. Die Innenseite ist bedeckt von polaren Aminosäureseitenketten, die in Gruppen gleicher Polarität auftreten. 32
- Abb. 31:** Untersuchungen verschiedener OmpG-Varianten von Chen et al.<sup>[130]</sup> mittels Black Lipid Membran-Messungen. Linke Seite – Leitfähigkeitsmessung des Wildtyps und der OmpG-Varianten mit Disulfidbrücke zur Stabilisierung im Vergleich. Rechte Seite – OmpG-Variante mit Deletion von D215, was zur Erhöhung der Anzahl an ausgebildeten Wasserstoffbrücken führt und den Stromfluss ruhiger. Die ruhigste Stromkurve zeigt die OmpG-Variante mit Disulfidbrücke und D215-Deletion. Entnommen aus Chen et al.<sup>[130]</sup> 34
- Abb. 32:** Schematische Darstellung der S-Alkylierung von OmpG. In A und B sind die Cysteinpunktmutationen C13 (grün) und C209 (pink) in die Kristallstruktur eingezeichnet zur Visualisierung der Position im Kanal. In C sind die beiden Arbeitsschritte, Rückfaltung in die native Form und Markierung mit Dansylodacetamid, zu sehen. Unabhängig von der Reihenfolge lässt sich das OmpG-Hybrid darstellen. Entnommen aus Grosse et al.<sup>[132]</sup> 35
- Abb. 33:** Vergleich des Wildtyps OmpG mit den Varianten OmpG  $\Delta$ L6 II und EMP. Oben – Strukturmodelle der drei Varianten in einer Membran. Durch Reduktion der Loopregionen wird die Pore kleiner und weniger flexibel. Unten – Darstellung der Polarität der Proteinoberfläche. In Blau/Rot sind geladene Aminosäuren dargestellt. Weiße Flächen zeigen neutrale Regionen an, die gezielt in EMP eingeführt wurden. Entnommen aus Grosse et al.<sup>[133]</sup> 36
- Abb. 34:** Übersicht über verschiedene Klassen von RNA. Die Hauptunterteilung findet zwischen kodierender und nicht-kodierender RNA statt. Während kodierende RNA nur die Funktion der mRNA ausübt, ist nicht-kodierende RNA in den verschieden Aufgaben und der Regulation von Transkription und Translation in unterschiedlichster Form beteiligt. 38
- Abb. 35:** Prozessierung der miRNA von der Transkription über pri- und pre-miRNA bis zur reifen miRNA. Das Primärtranskript pri-miRNA wird vom Enzym Drosha geschnitten. Die erhaltene pre-miRNA wird über das Transportprotein Exportin-5 aus dem Nukleus in das Zytoplasma überführt, wo es von Dicer zur reifen miRNA prozessiert und in den RISC-Komplex geladen wird. Entnommen aus Winter et al.<sup>[160]</sup> mit der Zustimmung von Springer Nature. 40
- Abb. 36:** A – Formierung des RISC Loading Komplexes. Dicer wird durch die Bindung von TRBP aktiviert. Ago2 koordiniert die Bindung der pre-miRNA zum fertigen Komplex. B – Prozessierung der pre-miRNA. Im Fall einer perfekten Basenpaarung schneidet Ago2 den Gegenstrang in der pre-miRNA zur ac-pre-miRNA. In beiden Fällen schneidet Dicer die Schleife der Haarnadelstruktur ab. Die reife miRNA kann dann in den RISC geladen werden, während der Gegenstrang abgebaut wird. Entnommen aus Winter et al.<sup>[160]</sup> mit der Zustimmung von Springer Nature. 41
- Abb. 37:** Modifikationen von RNA zur Erhöhung der Stabilität gegen Abbau. Im Vergleich zu RNA wird versucht durch Einführung von Schutzgruppen an der 2'OH-Gruppe Nukleaseresistenz zu bewirken (2'-OMe, 2'-F, 2'-OMOE oder LNA) oder durch die Einführung von Phosphothiaten in das Rückgrat. 42
- Abb. 38:** Neurotransmitterfreisetzung zwischen Präsynapse (beige) und Postsynapse (grün). Durch Bindung von Glutamat an den AMPAR findet ein Natriumioneneinstrom statt, der die Zelle depolarisiert. Dadurch löst sich die Mg<sup>2+</sup>-Blockade im NMDAR, wodurch neben Natriumionen auch Calciumionen in die Postsynapse eindringen können. Angelehnt an Malenka et al.<sup>[170]</sup> 43
- Abb. 39:** Schematische Darstellung der Proteinsynthese in Dendriten. Durch starke Stimulation der Post-Synapse (1) findet eine Stimulation der lokalen Translation von strukturell wichtigen Proteinen (2) sowie der Transkription von mRNA im Nukleus statt (3). Die mRNA wandert nun in die Dendriten zur weiteren Proteinsynthese mit der Folge einer strukturellen Verstärkung der Synapse (5). Angelehnt an Kelleher et al.<sup>[174]</sup> 44
- Abb. 40:** Schematische Darstellung des Projektvorhabens. Auf der linken Seite soll die sterisch anspruchsvolle SP-Form die Hybridisierung lokal stören. Durch Belichtung mit UV Licht entsteht die planare MC-Form, die in den Basenstapel interkaliert und die Duplexbildung favorisiert. 47
- Abb. 41:** Zusammenfassung des publizierten Systems von C. Brieke. Das Spiropyran NitroBIPS lässt sich über Festphasensynthese in einen DNA-Strang einbauen, verliert jedoch an photochemischen Eigenschaften. Der

<i>Chromenteil lässt sich postsynthetisch über Retro-Aldolreaktion austauschen zu anderen Spiropyranderivaten. Entnommen aus der Dissertation von C. Brieke.<sup>[190]</sup></i>	48
<b>Abb. 42:</b> Schematische Darstellung der kovalenten Bindung des Spiopyrans PyBIPS an ein Oligonukleotid. Es müssen die drei Variablen 1. Anker im Rückgrat des Oligonukleotids (Linker), 2. Art der Bindung (Verbindung) und 3. Bindestelle am Spiopyran erörtert werden.	50
<b>Abb. 43:</b> Auswahl von drei Reaktionstypen, die sich zum postsynthetischen Verknüpfen des Spiopyrans an ein Oligonukleotid eignen. Oben – Clickreaktion, Mitte – Halogenacetamid mit Thiofunktion, Unten – Amidbindung über einen Aktivester.	50
<b>Abb. 44:</b> Vergleich des räumlichen Anspruchs von PyBIPS in der Merocyanin-Form im Vergleich zum Platz im Basenstapel.	51
<b>Abb. 45:</b> Übersicht einer Vorauswahl an potentiellen Motiven für den Einbau in RNA und zur postsynthetischen Bindung von PyBIPS.	52
<b>Abb. 46:</b> Farblich markierte Darstellung der einzelnen Ansatzpunkte der ausgewählten Motive in einem Ausschnitt aus RNA. Gelb – Ansatzpunkt für Phosphothioat. Rot – nicht-nukleosidische Linker im Rückgrat. Grün – Ansatzpunkt für C-Glykosid.	52
<b>Abb. 47:</b> Verschiedene Positionen zur kovalenten Verknüpfung des Spiopyrans. Obere Reihe – das Substitutionsmuster vergrößert den Durchmesser, sodass das Spiopyran nicht mehr in den Basenstapel passt. Untere Reihe – ausgewählte Strukturen zur Analyse.	53
<b>Abb. 48:</b> Vergleich der drei ausgewählten Bindungstypen im RNA-Duplex im Wedge Motiv. Links – Triazolring der Clickreaktion ist sehr rigide und räumlich anspruchsvoll. Mitte – Thioacetamidbindung besteht aus einer langen Kette. Rechts – Amidbindung mit dem kleinsten räumlichen Anspruch.	54
<b>Abb. 49:</b> Vergleich der Bindestelle am Spiopyran. Links – 4-Position des Indolins. Rechts – Bindung über Indolin-Stickstoff.	54
<b>Abb. 50:</b> Übersicht der chemisch zu synthetisierenden Moleküle. Es wurden die nicht-nukleosidischen Linker Glykol, D-Threoninol und Serinol ausgewählt, die über eine Amidbindung an eine Seitenkette am Indolin-Stickstoff gebunden werden sollen.	55
<b>Abb. 51:</b> Zielverbindungen: geschützte nicht-nukleosidische Linker als Phosphoramidite für die Oligonukleotidfestphasensynthese. <b>52</b> Aminoglycol mit TFA-Schutzgruppe, <b>53</b> D-Threoninol mit Alloc-Schutzgruppe.	56
<b>Abb. 52:</b> Syntheseroute für Zielverbindung <b>52</b> .	56
<b>Abb. 53:</b> Syntheseroute für Zielverbindung <b>53</b> .	57
<b>Abb. 54:</b> Syntheseroute für Zielverbindung <b>64</b> .	57
<b>Abb. 55:</b> Verwendete Phosphoramidite in Projekt 1.	58
<b>Abb. 56:</b> Synthesepfad für die Darstellung von Spiopyran <b>51</b> .	59
<b>Abb. 57:</b> Übersicht der durchgeführten Synthesen mit dem Ziel Verbindung <b>67</b> herzustellen ausgehend von Indolin <b>66</b> .	60
<b>Abb. 58:</b> Syntheseübersicht von Verbindung <b>51</b> mit dem Ziel den Methylester zu spalten unter Erhalt der Carbonsäure.	61
<b>Abb. 59:</b> Synthese von Zielverbindung <b>51</b> ausgehend von Vorläufer <b>80</b> .	61
<b>Abb. 60:</b> Synthese von Zielverbindung <b>51</b> ausgehend von Hydroxyllinker mit abschließender Oxidation zur Carbonsäure.	62
<b>Abb. 61:</b> Synthese von Zielverbindung <b>91</b> mit Propansäurelinker.	62
<b>Abb. 62:</b> Reaktionsabfolge der Entschützung auf fester Phase mit anschließender Kupplung von PyBIPS und abschließender Abspaltung von der Festphase.	63
<b>Abb. 63:</b> Mechanismus der Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe über Palladium-Katalyse.	64
<b>Abb. 64:</b> HPLC-Chromatogramm (0,1 M TEAA; MeCN) der Entschützung von <b>RNA-1</b> mit einem Palladium-Katalysator in Anwesenheit von NMA. Mit <b>1</b> ist das Signal des entschützten Produkts und mit <b>2</b> des geschützten Edukts markiert.	64
<b>Abb. 65:</b> Reaktionsabfolge der TFA-geschützten 2'-OMe-RNA-Stränge. Die TFA-Schutzgruppe wird bei der generellen Entschützung unter UltraMILD-Bedingungen abgespalten. Die Spiopyran-Kupplung erfolgt in Lösung, die Bedingungen galt es zu erörtern.	65
<b>Abb. 66:</b> Übersicht der Reagenzien, die für die Kupplung von PyBIPS <b>91</b> an die Aminfunktion des nicht-nukleosidischen Linkers in RNA verwendet wurden.	65

- Abb. 67:** Mechanismus der Aktivierung einer Carbonsäure. Im ersten Schritt greift die Hydroxygruppe EDC an. Im zweiten Schritt erfolgt ein Angriff von HOBt unter Abspaltung eines Harnstoffderivats. Im letzten Schritt kann das Amin an den Carbonylkohlenstoff angreifen unter Ausbildung der Amidbindung. 66
- Abb. 68:** RP-HPLC-Chromatogramm der Markierungsreaktion von **RNA-2** mit PyBIPS **91** (0,1 M TEAA: MeCN). 1-Eduktreste ohne PyBIPS. 2 Produktsignal zu erkennen an Absorption von PyBIPS bei 350 nm. 66
- Abb. 69:** RP-HPLC-Chromatogramm der Markierungsreaktion von **RNA-5** mit PyBIPS **91** (0,1 M TEAA: MeCN). 1 - Eduktreste ohne PyBIPS. 2 -Produktsignal zu erkennen an Absorption von PyBIPS bei 350 nm. 67
- Abb. 70:** Reinspektren von **RNA-3-5** erhalten durch Trennung der Isomere per RP-HPLC, Chromolith C<sub>18</sub> 100x4,5 mm, isokratisch 85:15 – 0,1M TEAA:MeCN nach Belichtung 10 min., 365 nm, 500 mA, 500 pmol RNA. Links HPLC-Signale; rechts Reinspektren mit Extinktionskoeffizienten. 68
- Abb. 71:** Reinspektren von Verbindung **91**. Detektion und Trennung erfolgten über RP-HPLC in 10:90 – MeCN:0,1 M TEAA. Rechts- Zusammenfassung der Extinktionskoeffizienten der signifikanten Absorptionsmaxima von **RNA7-9**. 69
- Abb. 72:** UV/Vis-Absorptionsspektren am Beispiel von **RNA-5** in 1xPBS-Puffer. Ohne Lichteinwirkung liegt PyBIPS zu 100% in SP-Form vor. Durch Belichtung bei 365 nm (rot) oder 340 nm (orange) lassen sich eine unterschiedliche Menge MC generieren – siehe Tabelle rechts. 69
- Abb. 73:** Photoschemische Charakterisierung von **RNA-7-9**. Es wurden 10 Schaltzyklen durch abwechselnde Belichtung bei 530 und 365 nm aufgenommen unter Betrachtung der Absorption bei 550 nm. Außerdem wurde die thermische Relaxation der MC-Bande ohne Lichteinwirkung detektiert. 70
- Abb. 74:** Wedge Motiv am Beispiel von **RNA-7** und **RNA-10**. Der Gegenstrang besitzt gegenüber dem Photoschalter keine Base und hat deshalb ein Nukleotid weniger. 72
- Abb. 75:** Spektroskopische Analyse von Duplex **RNA-7/10**. Links – Absorptionsspektrum der SP-Form (schwarz) und MC-Form (rot) nach Belichten mit 365 nm, 200 mA, 2 min., 50 µM. rechts – Isomerisierung über 10 Zyklen unter Betrachtung der MC-Bande (550 nm, 50 µM). 72
- Abb. 76:** Spektroskopische Untersuchung von **RNA-8/10** (125 µM in 1xPBS). Die Stränge wurden zusammen für 3 min. auf 90 °C zur Hybridisierung erhitzt. Linke Seite – Absorptionsspektrum der SP-Form (schwarz) und MC-Form (rot) nach Belichtung 340 nm, 700 mA, 50 mW, 15 min. Rechte Seite – Thermische Relaxation der MC-Bande 550 und 590 nm nach Belichtung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW, 15 min. 73
- Abb. 77:** Vergrößerung des Doppel-Absorptionsmaximums von PyBIPS in **RNA-8/10**. Mit den Pfeilen sind die Wellenlängen der jeweiligen Farbe der LED gezeigt, die zur Isomerisierung verwendet wurden (grün – 530 nm, gelb – 595 nm, gelb-orange – 625 nm und orange – 660 nm). 74
- Abb. 78:** Spektroskopische Untersuchung von **RNA-8/10** (125 µM in PBS). Schaltzyklen der einzelnen Kombinationen durch Belichtung mit 365 nm und 530, 595, 625 und 660 nm im Wechsel. 74
- Abb. 79:** Spektroskopische Untersuchung von **RNA-9/10** (150 µM in PBS). Die Stränge wurden zusammen für 3 min auf 90 °C zur Hybridisierung erhitzt. Linke Seite – Absorptionsspektrum der SP-Form (schwarz) und MC-Form (rot) nach Belichtung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW, 15 min. Rechte Seite – Thermische Relaxation der MC-Bande 550 und 590 nm nach Belichtung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW, 15 min. 75
- Abb. 80:** Spektroskopische Untersuchung von **RNA-9/10** (150 µM in 1xPBS). Oben – Darstellung der Einstrahlung der einzelnen LEDs in das Doppelmaximum. Unten – Schaltzyklen der einzelnen Kombinationen aus 365 nm mit 530, 595, 625 und 660 nm. 75
- Abb. 81:** Übersicht der verschiedenen Gegenstränge am Beispiel der Duplexbildung mit **RNA-9**. Der räumliche Anspruch der gegenüberliegenden Base des Spiropyran sinkt von links nach rechts. Purinbase A, Pyrimidinbase C, Wedge Motiv, a-basische Stelle. 76
- Abb. 82:** Absorptionsspektren der SP- und MC-Form von **RNA-7-9** (X = Einzelstrang) mit verschiedenen Gegensträngen (**RNA-10-13**) im Duplex in der SP- (schwarz) und MC-Form (rot) nach Belichtung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW, 10 min. 77
- Abb. 83:** Temperaturabhängige Absorptionskurven von **RNA-5/10** ohne PyBIPS und **RNA 9/10** mit PyBIPS im Vergleich (1 µM, 1xPBS). 79
- Abb. 84:** Temperaturabhängige Absorptionskurven der Duplexe bei 260 nm (5 µM in 1xPBS). Die grauen Kurven wurden ohne Belichtung gemessen, d.h. das Spiropyran liegt in der SP-Form vor. Die schwarzen Kurven wurden unter dauerhafter Bestrahlung bei 340 nm, 700 mA, 50 mW gemessen. 80

- Abb. 85:** Temperaturabhängige Absorptionskurven der charakteristischen Wellenlängen 350, 550 und 590 nm von PyBIPS bei dauerhafter Bestrahlung mit 340 nm, 700 mA, 50 mW (5  $\mu$ M in 1xPBS) am Beispiel von **RNA-7/10**. 80
- Abb. 86:** 2-AP Phosphoramidit **94**. 81
- Abb. 87:** Fluoreszenz einer Titrationsreihe von **RNA-4/15**. Die Konzentration von **RNA-15** wurde konstant bei 1  $\mu$ M gehalten. **RNA-4** wurde in Konzentrationen zwischen 10 nM und 5  $\mu$ M titriert. Links - halblogarithmische Auftragung mit sigmoidalem Kurvenverlauf der Werte. Rechts sigmoidaler Fit der gemessenen Fluoreszenzdaten von **RNA-4/15**. 82
- Abb. 88:** Analyse der Titrationsreihe von **RNA-8/15** vor (schwarz) und nach Belichtung (rot) mit 365 nm, 10 min (96-Well-LED). 82
- Abb. 89:** Ausschnitt der Iminoaromatenregion des NOESY-Spektrums von **RNA-18/10**. In violett/schwarz sind jeweils die benachbarten Iminoprotonen markiert. 84
- Abb. 90:** Ausschnitte aus dem NOESY Spektrum von **RNA-9/10**. Oben ist die Iminoaromaten- und unten die Iminoregion zu sehen. 85
- Abb. 91:** 1D-Spektrum von Verbindung **91** in der SP-Form (blau) und nach Belichtung im Spektrometer (rot). Es können 22% MC-Form generiert werden. 86
- Abb. 92:** 1H-1D-Spektren der drei Duplexe **RNA-7/10**, **RNA-8/10** und **RNA-9/10**. Oben sind Ausschnitte aus der Iminoprotonenregion zu sehen, unten die Aliphatenregion. Blaue Signale thermisches Gleichgewicht (SP). Gelbe Signale nach Belichtung im Spektrometer mit 365 nm. 87
- Abb. 93:** 1H-1D-Spektren der drei Duplexe **RNA-7/10**, **RNA-8/10** und **RNA-9/10** bei 55 °C. Oben sind Ausschnitte aus der Iminoprotonenregion zu sehen, unten die Aliphatenregion. Blaue Signale thermisches Gleichgewicht (SP). Gelbe Signale nach Belichtung im Spektrometer mit 365 nm. 88
- Abb. 94:** Übersicht der OmpG-Varianten und Positionen der einzelnen Cysteine, die für S-Alkylierung in den Kanal eingeführt wurden. Oben links – Berechnung der Abstände zwischen den Thiolgruppen. Oben rechts – Van-der-Waals-Oberfläche zur Abschätzung des tatsächlichen Platzes. Unten - Mögliche Hybride aus OmpG und photolabiler Schutzgruppen gezeichnet in der Kristallstruktur PDB:4CTD. 93
- Abb. 95:** Allgemeiner Ablauf der Proteinsynthese. Im ersten Schritt wird der ompg-Vektor transformiert, gefolgt von der Expression des Proteins. Zuletzt wird eine Aufreinigung durchgeführt und das Protein vollständig denaturiert. 94
- Abb. 96:** Ionenaustauschchromatogramm. Die Elution von OmpG erfolgt über einen Salzgradienten B (1M NaCl) von 25 mM auf 500 mM NaCl. Das Protein eluiert bei einer Leitfähigkeit von 21,8 mS. 95
- Abb. 97:** Stabilitätstest von **OmpG-1** mit Analyse in 10% SDS PAGE. Linke Seite – Belichtungsreihe mit 385 nm, 500 mA, 95 mW für 0, 1, 3, 5 und 10 Minuten. Es ist keine Denaturierung des Proteins zu erkennen. Rechte Seite – Thermische Reihe, Erhitzen der Probe für 5 min und 500 rpm bei 37, 50, 60, 70, 80 und 90 °C. Eine nennenswerte Denaturierung erfolgt erst ab 70 °C. 96
- Abb. 98:** Schematische Darstellung der Bindung von DEACM **95** an die Thiolseitenkette von Cystein. Durch Substitution bindet das Thiol die Schutzgruppe unter Erhalt von **96**. Durch Belichtung in das Absorptionsmaximum von DEACM wird die Abspaltung ausgelöst. Der abgespaltene Alkohol **25** lässt eine Carbonsäure am Thiol zurück. 97
- Abb. 99:** Schematische Darstellung der möglichen Schritte, um vom denaturierten Protein das Hybrid zu erhalten. A – die Markierung wird am denaturierten Protein durchgeführt und das Protein anschließend in seine native Form gebracht. B – OmpG wird erst rückgefaltet und die Markierung im Anschluss auf der Innenseite angebracht. 98
- Abb. 100:** Ionenaustauschchromatogramm. Die Elution von OmpG erfolgt über einen Salzgradienten B (1M NaCl) von 25 mM auf 500 mM NaCl. Das Protein eluiert bei einer Leitfähigkeit von 21,8 mS. Durch gleichzeitige Detektion von 280 und 390 nm ist zu erkennen, ob die Proteinfraction Cumarin enthält. 98
- Abb. 101:** Bestimmung der Markierungseffizienz von **OmpG-5** anhand der Extinktionskoeffizienten. Absorptionsspektrum des Hybrids **OmpG-5** links mit Berechnung der Konzentrationen von Protein (280 nm) und Markierung (390 nm) in der Tabelle rechts. 99
- Abb. 102:** 10% SDS PAGE von belichtetem (A) (385 nm, 700 mA, 95 mW, 5 Minuten) und unbelichtetem (B) **OmpG-5**. Zum Vergleich wurde unmodifiziertes **OmpG-1** (C) aufgetragen. Linke Seite – Anregung der Fluoreszenz von DEACM durch 365 nm, 5 mW Licht. Rechte Seite – Coomassie®-Färbung des Proteins im Weißlicht. 100

- Abb. 103:** Aufbau der Messzelle der BLM-Messung. Die Kunststoff Kammern werden mit NaCl-Puffer gefüllt. Die Kammern sind durch eine DPhPC-Membran getrennt (gelb-grau). Der Stromkreislauf ist über zwei Silberelektroden verbunden mit einem Verstärker zur Detektion des entstehenden Stroms bei Insertion eines OmpG-Moleküls. 101
- Abb. 104:** Photo der verwendeten Messzelle. Die Membran sitzt auf der Vorderseite der weißen Kammer im Bild links. Die Elektroden ragen in jeweils eine der beiden Kammern. Die Glasfaser wird von links auf die Membran gerichtet, was auf der rechten Seite unter Messbedingungen bei Rotlicht zu sehen ist mit der 385 nm-abgebenden Glasfaser in Betrieb. 102
- Abb. 105:** Einzelkanalmessung von **OmpG-1** bei angelegter Spannung von 40 mV. Es sind drei verschiedene Niveaus zu erkennen, gekennzeichnet mit 1,2,3. 103
- Abb. 106:** Charakterisierung von **OmpG-1**. Links - Histogramm der Population der verschiedenen Niveaus. Rechts - Strom-Spannungsgraph mit Leitfähigkeiten der Niveaus 1,2,3 im Vergleich. 103
- Abb. 107:** Vergleich der Leitfähigkeiten von **OmpG-1** vor und nach Belichtung mit 385 nm, 700 mA, 95 mW. 104
- Abb. 108:** Einzelkanalmessung von **OmpG-5** bei einer angelegten Spannung von 40 mV mit Belichtung (gelbe Markierung Start der Belichtung, 385 nm, 700 mA, 95 mW). Oben - Anstieg der Stromkurve über zwei Stufen. Unten - Anstieg der Stromkurve über eine große Stufe. 105
- Abb. 109:** Auswertung der Leitfähigkeiten vor (grau) und nach Belichtung (schwarz) von **OmpG-5** aus Abb. 108 unten. Oben links - Strom-Spannungskurve der einzelnen Niveaus mit Leitfähigkeiten. Oben rechts - graphische Darstellung der einzelnen Niveaus im Vergleich vor und nach Belichtung. Unten links - Zeit mit der ein bestimmtes Niveau besetzt ist. Unten rechts - prozentueller Anteil der Besetzung eines Niveaus im Vergleich der geöffneten Niveaus. 106
- Abb. 110:** Syntheseroute zur Installation von nButyl an C3' ausgehend von Aldehyd **97** durch Reduktion mit nBuLi. Verknüpfung des Bromacetat Linkers analog zu Verbindung **95** unter Erhalt von Verbindung **100**. 107
- Abb. 111:** Bestimmung der Markierungseffizienz von **OmpG-7**. Links - Absorptionsspektrum des Hybrids mit Berechnung der Konzentrationen von Protein (280 nm) und Markierung (390 nm) rechts. Für weitere Informationen siehe Abb. 101. 108
- Abb. 112:** Einzelkanalmessung von **OmpG-7** bei einer angelegten Spannung von 40 mV mit Belichtung bei 385 nm (700 mA, 95 mW, Start der Belichtung gelbe Linie). Nach wenigen Sekunden ist ein Anstieg des Stromflusses zu erkennen. 108
- Abb. 113:** Syntheseroute zur Einführung von Adamantan am C3' durch ein Grignardreagenz. Installation des Linkers analog zu Verbindung **95/97**. 109
- Abb. 114:** UV/Vis-Absorptionsspektrum von **OmpG-8**. 109
- Abb. 115:** Oben - Einzelkanalmessung für **OmpG-8** bei einer angelegten Spannung von 40 mV. Reduzierte Leitfähigkeit vor Belichtung mit 385 nm, 700 mA, 95 mW (Start der Belichtung gelbe Linie). Danach ist ein Anstieg über zwei Stufen zu beobachten. Unten - Graphische Auswertung der Messreihe mit Bestimmung der Leitfähigkeit vor (grau) und nach Belichtung (schwarz). 110
- Abb. 116:** Synthese von Verbindung **105** ausgehend Alkin-DEACM Alkohol **104**. 111
- Abb. 117:** UV/Vis-Absorptionsspektrum von **OmpG-9**. 111
- Abb. 118:** Einzelkanalmessung von **OmpG-9** bei einer angelegten Spannung von 40 mV. Reduzierte Leitfähigkeit vor Belichtung mit 385 nm, 700 mA, 95 mW (Start der Belichtung gelbe Linie). Danach ist ein deutlicher Anstieg über zwei Stufen zu beobachten. Unten - graphische Auswertung der Messreihe mit Bestimmung der Leitfähigkeit vor (grau) und nach Belichtung (schwarz). 112
- Abb. 119:** Schematische Darstellung der Click-Reaktion von OmpG-gebundenem Alkin-DEACM und einem zweiten Molekül mit großem sterischen Anspruch mit Azid-Funktion in der Pore. Durch Ausbildung des Triazolrings wird das Molekül kovalent an DEACM gebunden. 113
- Abb. 120:** Reaktionsbedingungen der Click-Reaktion an OmpG. Katalysator mit Ligand CuTBTA, Reduktionsmittel für Cu(II) -> Cu(I) TCEP, Azid mit großem Rest, **OmpG-9**, Lösungsmittelgemisch aus Puffer, tBuOH und DMSO. 114
- Abb. 121:** Übersicht der Clickreaktionen mit Farbstoffen. Links - Strukturen der eingesetzten Fluorophor-Azide ATTO488 (**108, OmpG-11**), BODIPY-TMR (**109, OmpG-12**), Sulfo-Cy3 (**110, OmpG-13**) und FAM6 (**111, OmpG-14**). Rechts - 10% SDS PAGE der Reaktionsansätze, oben bei Anregung der Fluoreszenz durch 365 nm und

- nach Coomassie®-Färbung im Weißlicht. Es findet eine leichte Denaturierung statt. Die Proteinbanden fluoreszieren, was auf eine erfolgreiche Click-Reaktion hindeutet. 115
- Abb. 122:** Einzelkanalmessung von **OmpG-12** bei einer angelegten Spannung von 40 mV (Oben) mit Belichtung bei 385 nm, 700 mA, 95 mV (gelbe Linie Start der Belichtung). Unten – Verteilung der Besetzung der einzelnen Niveaus vor (grau) und nach Belichtung (schwarz) mit 385 nm. 116
- Abb. 123:** Spannungsabhängige Einzelkanalmessung von **OmpG-14** bei 40 mV mit Belichtung (385 nm, 700 mA, 95 mW, gelbe Linie Start der Belichtung). 117
- Abb. 124:** Oben - Eingesetzte Biotin-PEG-Azide zur Reaktion mit **OmpG-9**. Unten - Schematische Darstellung der Reaktionsschritte gezeichnet in der Kristallstruktur 4CTD. Im ersten Schritt wird Biotin über einen Linker in der Pore mittels Click-Chemie befestigt und über SDS PAGE aufgereinigt (**OmpG-15/16**). Anschließend soll Biotin an Streptavidin gebunden werden zur Verschließung der Pore (**OmpG-17/18**). 118
- Abb. 125:** 10% SDS PAGE des Reaktionsansatzes von **OmpG-15** (linke Spur)/**OmpG-16** (rechte Spur) und Streptavidin mit dem Produkt **OmpG-17/18**. Links – Anregung der Fluoreszenz von DEACM durch Belichtung mit 365 nm, Rechts – Proteinbanden Coomassie®-gefärbt im Weißlicht. Neben nativem und denaturiertem OmpG ist eine neue fluoreszierende Bande zwischen 70 und 100 kDa zu sehen, dessen Migration nur auf einen Komplex aus einem OmpG und einem Streptavidin passt. 119
- Abb. 126:** Einzelkanalmessung von **OmpG-17** bei angelegter Spannung von 40 mV. Es wird nur eine minimale Leitfähigkeit detektiert, die sich durch Belichtung mit 385 nm (700 mA, 95 mW, gelbe Linie) nicht verändert. 119
- Abb. 127:** Einzelkanalmessung von **OmpG-18** bei einer angelegten Spannung von 40 mV. Es gibt ein stabiles, kleines Grundniveau mit kurzen Öffnungen. Eine Belichtung bei 385 nm (700 mA, 95 mW, gelbe Linie Start der Belichtung) zeigt keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit. 120
- Abb. 128:** Schematische Darstellung der Verknüpfung von DEACM im Inneren der Pore OmpG über zwei Cysteinseitenketten (Blick von oben in die Pore). Durch Belichtung bei 385 nm wird der Cumarinalkohol abgespalten und hinterlässt zwei Carboxylreste in der Pore zurück. 121
- Abb. 129:** Modell der Haarnadelstruktur der pre-miRNA-181a mit Fluorophor und Quencher. Erst durch Schneiden von Dicer wird der Loop mit Quencher entfernt. Es bleibt die reife miRNA im Doppelstrang zurück. Durch Entfernung des Quenchers wird die Fluoreszenz sichtbar. Entnommen aus der Dissertation von Dr. J.Rinne.<sup>[226]</sup> 124
- Abb. 130:** Übersicht gängiger Fluorophore und Quencher zur Anwendung auf Oligonukleotide. In lila ist das Absorptionsspektrum von BHQ-2 markiert. In pink ist das Emissionsmaximum von TAMRA markiert, welches im Absorptionsmaximum von BHQ-2 liegt. Übernommen von SigmaAldrich und modifiziert.<sup>[227]</sup> 124
- Abb. 131:** Übersicht der Komponenten, die zur Synthese der Fluorophor-/Quencher-markierten pre-miRNA181a eingesetzt wurden. Links – Sequenz mit Positionen der Modifikationen F, Q und P. Orangener Teil wird nach Dicer-Prozessierung zur reifen miRNA, schwarzer Teil stellt den abgetrennten Loop nach Dicer Prozessierung dar. Rechts – Struktur der eingesetzten Phosphoramidite von Fluorophor TAMRA (**114**) und Quencher BHQ2 (**115**). 125
- Abb. 132:** Tritylmonitor einer 1 µmol-Synthese von pre-miRNA-181a mit Fluorophor (6), Quencher (5) und 5'-Phosphat (7) am Synthesizer Expedite. 126
- Abb. 133:** Analytisches RP-HPLC Chromatogramm von synthetischer pre-miRNA 181a mit Fluorophor und Quencher nach Aufreinigung (A – MeCN, B – 0,1 M TEAA; A: 5-> 55% in 40 min.). 127
- Abb. 134:** 16% denaturierendes PAGE Ausschnitt zum Vergleich der synthetisierten pre-miRNA 181a mit der von Dr. J.Rinne hergestellten Referenz (A). B1 und B2 beschreiben zwei verschiedene Syntheseansätze. 127
- Abb. 135:** Auswertung des Fluoreszenzassays der Sonde in neuronalem Zelllysate (lysate) und zur Referenz in PBS-Puffer. Es wurden die Sonden aus zwei verschiedenen synthetischen Ansätzen überprüft (**1,2**). Links – detektierte tatsächliche Fluoreszenzen (580 nm) durch Anregung bei 540 nm aufgetragen gegen die Inkubationszeit. Rechts – relative Fluoreszenz im Verhältnis der Lysatprobe zur Referenz. 128
- Abb. 136:** Chemische Struktur von MNI-Glutamat. Durch 2PE-Entschützung kann Glutamat lokal im Dendriten freigesetzt werden. 129
- Abb. 137:** Anwendung der Fluorophor-/Quencher-markierten Sonde in kultivierten Neuronen des Hippocampus von Ratten. A – Detektion der Zelle durch Alexa 488-Färbung. In gelb ist die 2PE-Uncagingstelle im Dendriten markiert. B – Fluoreszenzanstieg im Dendriten über wenige Sekunden nach lokalem Glutamat Uncaging. C – Fluoreszenzanstieg im Dornfortsatz des Dendriten nach neuronaler Aktivierung durch Glutamat.

---

<i>D – Anstieg der Fluoreszenz nach Glutamat-Uncaging in An- und Abwesenheit des NMDA-Antagonisten APV.<sup>[224]</sup></i>	130
<b>Abb. 138:</b> <i>Modell eines Photoschalters mit zwei Grundzuständen und zwei angeregten Zuständen.</i>	162
<b>Abb. 139:</b> <i>Vektorkarte pET20b(+) von Novagen mit Markierung der wichtigen Informationen(rot).</i>	163
<b>Abb. 140:</b> <i>Testexpressionsgel 12%-SDS PAGE zur Überprüfung der Expressionseffizienz.</i>	167
<b>Abb. 141:</b> <i>10%-SDS PAGE zur Kontrolle der gesammelten Fraktionen der IEC nach Rückfaltung.</i>	168

## 6.3 Literaturverzeichnis

- [1] J. A. Barltrop, P. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 697–699.
- [2] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604.
- [3] L. Möckl, D. C. Lamb, C. Bräuchle, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14192–14197.
- [4] J. Niu, M. Ben Johny, I. E. Dick, T. Inoue, *Biophys. J.* **2016**, *111*, 1132–1140.
- [5] R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316.
- [6] M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10978–10999.
- [7] J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1947–1960.
- [8] N. Ankenbruck, T. Courtney, Y. Naro, A. Deiters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, DOI 10.1002/anie.201700171.
- [9] H. Bouas-Laurent, H. Dürr, *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 639–665.
- [10] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422–4437.
- [11] H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 1809–1825.
- [12] M. M. Lerch, M. J. Hansen, W. A. Velema, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12054.
- [13] R. Klajn, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 148.
- [14] M. Bletz, U. Pfeifer-Fukumura, U. Kolb, W. Baumann, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 2232–2236.
- [15] N. P. Ernsting, B. Dick, T. Arthen-Engeland, *Pure Appl. Chem.* **1990**, *62*, DOI 10.1351/pac199062081483.
- [16] P.-X. Wang, F.-Q. Bai, Z.-X. Zhang, Y.-P. Wang, J. Wang, H.-X. Zhang, *Org. Electron.* **2017**, *45*, 33–41.
- [17] H. Görner, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 416–423.
- [18] J. T. C. Wojtyk, A. Wasey, P. M. Kazmaier, S. Hoz, E. Buncel, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 9046–9055.
- [19] P. Nuernberger, S. Ruetzel, T. Brixner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11368–11386.
- [20] J. Buback, P. Nuernberger, M. Kullmann, F. Langhojer, R. Schmidt, F. Würthner, T. Brixner, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 3924–3935.
- [21] S. Ruetzel, M. Diekmann, P. Nuernberger, C. Walter, B. Engels, T. Brixner, *J. Chem. Phys.* **2014**, *140*, 224310.
- [22] C. Kaiser, T. Halbritter, A. Heckel, J. Wachtveitl, *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 4111–4123.
- [23] M. Hammarson, J. R. Nilsson, S. Li, T. Beke-Somfai, J. Andréasson, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 13561–13571.
- [24] C. Beyer, Synthesis and Characterization of Photoswitchable Building Blocks Based on Spirobenzopyrans and New Approaches for Postsynthetic Oligonucleotide Labeling, Regensburg, **2010**.
- [25] J. Andersson, S. Li, P. Lincoln, J. Andréasson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11836–11837.
- [26] J. Kohl-Landgraf, M. Braun, C. Özçoban, D. P. N. Gonçalves, A. Heckel, J. Wachtveitl, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14070–14077.
- [27] C. Özçoban, T. Halbritter, S. Steinwand, L.-M. Herzig, J. Kohl-Landgraf, N. Askari, F. Groher, B. Fürtig, C. Richter, H. Schwalbe, et al., *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1517–1520.
- [28] T. Halbritter, C. Kaiser, J. Wachtveitl, A. Heckel, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 8040–8047.
- [29] K. Sumaru, M. Kameda, T. Kanamori, T. Shinbo, *Macromolecules* **2004**, *37*, 4949–4955.
- [30] V. A. Krongauz, E. S. Goldburt, *Macromolecules* **1981**, *14*, 1382–1386.
- [31] H. Lee, W. Wu, J. K. Oh, L. Mueller, G. Sherwood, L. Peteanu, T. Kowalewski, K. Matyjaszewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2453–2457.
- [32] Č. Koňák, R. C. Rathi, P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromolecules* **1997**, *30*, 5553–5556.
- [33] R. Rosario, D. Gust, A. A. Garcia, M. Hayes, J. L. Taraci, T. Clement, J. W. Dailey, S. T. Picraux, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 12640–12642.
- [34] S. Samanta, J. Locklin, *Langmuir* **2008**, *24*, 9558–9565.
- [35] A. Koçer, M. Walko, W. Meijberg, B. L. Feringa, *Science* **2005**, *309*, 755–758.
- [36] Y. Ito, N. Sugimura, O. H. Kwon, Y. Imanishi, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 73–75.
- [37] D. . Weston, J. Kirkham, D. . Cullen, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1999**, *1428*, 463–467.
- [38] B. I. Ipe, S. Mahima, K. G. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7174–7175.
- [39] T. Udayabhaskararao, P. K. Kundu, J. Ahrens, R. Klajn, *ChemPhysChem* **2015**, n/a-n/a.
- [40] P. K. Kundu, D. Samanta, R. Leizrowice, B. Margulis, H. Zhao, M. Börner, T. Udayabhaskararao, D. Manna, R. Klajn, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 646–652.
- [41] I. Willner, R. Blonder, A. Dagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9365–9366.



- [42] V. I. Minkin, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2751–2776.
- [43] F. M. Raymo, S. Giordani, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4651–4652.
- [44] R. Rosario, D. Gust, M. Hayes, J. Springer, A. A. Garcia, *Langmuir* **2003**, *19*, 8801–8806.
- [45] D. A. Parthenopoulos, P. M. Rentzepis, *Science* **1989**, *245*, 843–845.
- [46] C. K. Lee, D. A. Davis, S. R. White, J. S. Moore, N. R. Sottos, P. V. Braun, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16107–16111.
- [47] J. R. Nilsson, S. Li, B. Onfelt, J. Andreasson, *Chem Commun* **2011**, *47*, 11020–11022.
- [48] D. D. Young, A. Deiters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1225–1228.
- [49] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Yoshida, T. Takarada, X. Liang, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **2001**, 108–109.
- [50] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2010**, 1371–1376.
- [51] C. Brieke, A. Heckel, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 15726–15734.
- [52] T. Stafforst, D. Hilvert, *Chem. Commun. Camb. U. K.* **2009**, 287–288.
- [53] J. Engels, E.-J. Schlaeger, *J Med Chem* **1977**, *20*, 907–911.
- [54] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
- [55] M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3358–3377.
- [56] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879.
- [57] A. P. Gorka, R. R. Nani, J. Zhu, S. Mackem, M. J. Schnermann, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14153–14159.
- [58] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042.
- [59] A. Specht, J.-S. Thomann, K. Alarcon, W. Wittayanan, D. Ogden, T. Furuta, Y. Kurakawa, M. Goeldner, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1690–1695.
- [60] S. Kantevari, Y. Buskila, G. C. R. Ellis-Davies, *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **2012**, *11*, 508–513.
- [61] S. Gug, S. Charon, A. Specht, K. Alarcon, D. Ogden, B. Zietz, J. Leonard, S. Haacke, F. Bolze, J.-F. Nicoud, et al., *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1303–1307.
- [62] J. Noguchi, A. Nagaoka, S. Watanabe, G. C. R. Ellis-Davies, K. Kitamura, M. Kano, M. Matsuzaki, H. Kasai, *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2447–57.
- [63] G. C. R. Ellis-Davies, M. Matsuzaki, M. Paukert, H. Kasai, D. E. Bergles, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 6601–6604.
- [64] P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3783–3786.
- [65] N. Rubinstein, P. Liu, E. W. Miller, R. Weinstein, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6369–6372.
- [66] R. R. Nani, A. P. Gorka, T. Nagaya, H. Kobayashi, M. J. Schnermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13635–13638.
- [67] R. R. Nani, A. P. Gorka, T. Nagaya, T. Yamamoto, J. Ivanic, H. Kobayashi, M. J. Schnermann, *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 329–337.
- [68] E. Palao, T. Slanina, L. Muchová, T. Šolomek, L. Vítek, P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 126–133.
- [69] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6861.
- [70] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117.
- [71] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703–710.
- [72] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [73] M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119–2122.
- [74] V. Hagen, B. Dekowski, N. Kotzur, R. Lechler, B. Wiesner, B. Briand, M. Beyermann, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 1621–1627.
- [75] V. Hagen, F. Kilic, J. Schaal, B. Dekowski, R. Schmidt, N. Kotzur, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2790–2797.
- [76] L. Fournier, I. Aujard, T. Le Saux, S. Maurin, S. Beaupierre, J.-B. Baudin, L. Jullien, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 17494–17507.
- [77] J. P. Olson, H.-B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Higley, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 130415074117000.
- [78] H. Takano, T. Narumi, N. Ohashi, A. Suzuki, T. Furuta, W. Nomura, H. Tamamura, *Tetrahedron* **2014**, DOI 10.1016/j.tet.2014.04.063.
- [79] T. Narumi, H. Takano, N. Ohashi, A. Suzuki, T. Furuta, H. Tamamura, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1184–1187.
- [80] H. Takano, T. Narumi, W. Nomura, T. Furuta, H. Tamamura, *Org. Lett.* **2015**, 151015101757009.
- [81] A. S. Baker, A. Deiters, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 140521152022001.

- [82] D. S. Lawrence, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 570–575.
- [83] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [84] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498–500.
- [85] J. W. Chin, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 379–408.
- [86] K. Wals, H. Ova, *Front. Chem.* **2014**, *2*, DOI 10.3389/fchem.2014.00015.
- [87] A. Gautier, D. P. Nguyen, H. Lusic, W. An, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4086–4088.
- [88] A. Kaffman, N. M. Rank, E. M. O’Neill, L. S. Huang, E. K. O’Shea, *Nature* **1998**, *396*, 482–486.
- [89] A. Lange, R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine, A. H. Corbett, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5101–5105.
- [90] R. Kühn, F. Schwenk, M. Aguet, K. Rajewsky, *Science* **1995**, *269*, 1427–1429.
- [91] Y. G. Kim, J. Cha, S. Chandrasegaran, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 1156–1160.
- [92] J. C. Miller, S. Tan, G. Qiao, K. A. Barlow, J. Wang, D. F. Xia, X. Meng, D. E. Paschon, E. Leung, S. J. Hinkley, et al., *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 143–148.
- [93] W. Szymański, D. Yilmaz, A. Koçer, B. L. Feringa, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2910–2923.
- [94] G. T. Hermanson, in *Bioconjugate Tech.*, Elsevier, **2013**, pp. 757–785.
- [95] M. M. Mahmoodi, D. Abate-Pella, T. J. Pundsack, C. C. Palsuledesai, P. C. Goff, D. A. Blank, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5848–5859.
- [96] M. M. Mahmoodi, S. A. Fisher, R. Y. Tam, P. C. Goff, R. B. Anderson, J. E. Wissinger, D. A. Blank, M. S. Shoichet, M. D. Distefano, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8289–8300.
- [97] N. Kotzur, B. Briand, M. Beyermann, V. Hagen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16927–16931.
- [98] N. Kotzur, Wellenlängenselektiv Abspaltbare Photolabile Schutzgruppen Für Thiole, Humboldt-Universität zu Berlin, **2009**.
- [99] G. T. Hermanson, in *Bioconjugate Tech.*, Elsevier, **2013**, pp. 1–125.
- [100] P. D. Bragg, C. Hou, *Arch. Biochem. Biophys.* **1975**, *167*, 311–321.
- [101] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [102] R. Huisgen, H. Gotthardt, H. O. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 135–136.
- [103] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [104] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [105] D. L. Nelson, M. M. Cox, A. L. Lehninger, *Lehninger Biochemie: mit 131 Tabellen*, Springer, Berlin; Heidelberg, **2009**.
- [106] H. J. C. Gram, C. Firedländer, *Fortschr. Med.* **1884**, 185–189.
- [107] A. Varki, Ed., *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., **2009**.
- [108] R. Koebnik, K. P. Locher, P. Van Gelder, *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 239–253.
- [109] G. E. Schulz, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2002**, *1565*, 308–317.
- [110] S. W. Cowan, T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Pauptit, J. N. Jansonius, J. P. Rosenbusch, *Nature* **1992**, *358*, 727–733.
- [111] A. Pautsch, G. E. Schulz, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1013–1017.
- [112] R. Mot, J. Vanderleyden, *Mol. Microbiol.* **1994**, *12*, 333–334.
- [113] J. Vogt, G. E. Schulz, *Struct. Lond. Engl.* **1993** **1999**, *7*, 1301–1309.
- [114] R. M. Garavito, J. P. Rosenbusch, *J. Cell Biol.* **1980**, *86*, 327–329.
- [115] D. Jeanteur, J. H. Lakey, F. Pattus, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 2153–2164.
- [116] G. E. Schulz, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, *5*, 701–707.
- [117] K. P. Locher, B. Rees, R. Koebnik, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch, D. Moras, *Cell* **1998**, *95*, 771–778.
- [118] A. D. Ferguson, E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs, W. Welte, *Science* **1998**, *282*, 2215–2220.
- [119] J. E. Gouaux, O. Braha, M. R. Hobaugh, L. Song, S. Cheley, C. Shustak, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 12828–12831.
- [120] L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux, *Science* **1996**, *274*, 1859–1865.
- [121] R. Misra, S. A. Benson, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 4105–4111.
- [122] P. Model, G. Jovanovic, J. Dworkin, *Mol. Microbiol.* **1997**, *24*, 255–261.
- [123] D. A. Fajardo, J. Cheung, C. Ito, E. Sugawara, H. Nikaido, R. Misra, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4452–4459.
- [124] S. Conlan, H. Bayley, *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42*, 9453–9465.
- [125] Ö. Yildiz, K. R. Vinothkumar, P. Goswami, W. Kühlbrandt, *EMBO J.* **2006**, *25*, 5240–5240.
- [126] M. Behlau, D. J. Mills, H. Quader, W. Kühlbrandt, J. Vonck, *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 71–77.
- [127] H. Bayley, L. Jayasinghe, *Mol. Membr. Biol.* **2004**, *21*, 209–220.

- [128] S. Cheley, O. Braha, X. Lu, S. Conlan, H. Bayley, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1257–1267.
- [129] W. Grosse, L.-O. Essen, U. Koert, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 830–839.
- [130] M. Chen, S. Khalid, M. S. P. Sansom, H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 6272–6277.
- [131] S. Reitz, M. Cebi, P. Reiß, G. Studnik, U. Linne, U. Koert, L.-O. Essen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4853–4857.
- [132] W. Grosse, P. Reiß, S. Reitz, M. Çebi, W. Lübben, U. Koert, L.-O. Essen, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7716–7723.
- [133] W. Grosse, G. Psakis, B. Mertins, P. Reiss, D. Windisch, F. Brademann, J. Bürck, A. Ulrich, U. Koert, L.-O. Essen, *Biochemistry (Mosc.)* **2014**, *53*, 4826–4838.
- [134] F. Crick, *Nature* **1970**, *227*, 561–563.
- [135] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618–618.
- [136] The FANTOM Consortium, *Science* **2005**, *309*, 1559–1563.
- [137] The ENCODE Project Consortium, *Nature* **2012**, *489*, 57–74.
- [138] The ENCODE Project Consortium, Analysis Coordination, Chromatin and Replication, Genes and Transcripts, Integrated Analysis and Manuscript Preparation, Management Group, Multi-species Sequence Analysis, NISC Comparative Sequencing Program\*, Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center\*, Washington University Genome Sequencing Center\*, et al., *Nature* **2007**, *447*, 799–816.
- [139] J. Brosius, H. Tiedge, *RNA Biol.* **2004**, *1*, 81–83.
- [140] X.-Y. Meng, Y. Luo, M. N. Anwar, Y. Sun, Y. Gao, H. Zhang, M. Munir, H.-J. Qiu, *Front. Immunol.* **2017**, *8*, DOI 10.3389/fimmu.2017.01663.
- [141] W. R. Jeck, N. E. Sharpless, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 453.
- [142] K. Inamura, *Cells* **2017**, *6*, 12.
- [143] S. Clancy, *Nature Education n.d.*, *1*.
- [144] S. T. Grivna, *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1709–1714.
- [145] J. Stenvang, A. Petri, M. Lindow, S. Obad, S. Kauppinen, *Silence* **2012**, *3*, 1.
- [146] L. He, G. J. Hannon, *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522–531.
- [147] A. Serganov, D. J. Patel, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 776–790.
- [148] W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, *428*, 281–286.
- [149] A. Eulalio, E. Huntzinger, E. Izaurralde, *Cell* **2008**, *132*, 9–14.
- [150] W. Filipowicz, S. N. Bhattacharyya, N. Sonenberg, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 102–114.
- [151] J. Lu, G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, et al., *Nature* **2005**, *435*, 834–838.
- [152] C. Kanellopoulou, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 489–501.
- [153] X. Cai, *RNA* **2004**, *10*, 1957–1966.
- [154] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, V. N. Kim, *EMBO J.* **2004**, *23*, 4051–4060.
- [155] J. Han, Y. Lee, K.-H. Yeom, J.-W. Nam, I. Heo, J.-K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B.-T. Zhang, V. N. Kim, *Cell* **2006**, *125*, 887–901.
- [156] J. Han, J. S. Pedersen, S. C. Kwon, C. D. Belair, Y.-K. Kim, K.-H. Yeom, W.-Y. Yang, D. Haussler, R. Blelloch, V. N. Kim, *Cell* **2009**, *136*, 75–84.
- [157] J. G. Ruby, C. H. Jan, D. P. Bartel, *Nature* **2007**, *448*, 83–86.
- [158] M. T. Bohnsack, K. Czaplinski, D. Gorlich, *RNA N. Y. N* **2004**, *10*, 185–191.
- [159] E. Lund, *Science* **2004**, *303*, 95–98.
- [160] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, S. Diederichs, *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 228–234.
- [161] S. Diederichs, D. A. Haber, *Cell* **2007**, *131*, 1097–1108.
- [162] A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, *Cell* **2003**, *115*, 209–216.
- [163] R. Rupaimoole, F. J. Slack, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 203–222.
- [164] M. Petersen, J. Wengel, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 74–81.
- [165] S. Obad, C. O. dos Santos, A. Petri, M. Heidenblad, O. Broom, C. Ruse, C. Fu, M. Lindow, J. Stenvang, E. M. Straarup, et al., *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 371–378.
- [166] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685–689.
- [167] A. Peters, S. L. Palay, *J. Neurocytol.* **1996**, *25*, 687–700.
- [168] B. Alvarez-Castelao, E. M. Schuman, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 28623–28630.
- [169] R. Klinke, H.-C. Pape, A. Kurtz, S. Silbernagl, Eds., *Physiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2010**.
- [170] A. Citri, R. C. Malenka, *Neuropsychopharmacology* **2008**, *33*, 18–41.

- [171] Y. Zhou, H. Wu, S. Li, Q. Chen, X.-W. Cheng, J. Zheng, H. Takemori, Z.-Q. Xiong, *PLoS ONE* **2006**, *1*, e16.
- [172] M. A. Sutton, E. M. Schuman, *Cell* **2006**, *127*, 49–58.
- [173] E. M. Schuman, J. L. Dynes, O. Steward, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 7143–7146.
- [174] R. J. Kelleher, A. Govindarajan, S. Tonegawa, *Neuron* **2004**, *44*, 59–73.
- [175] G. M. Schratt, F. Tuebing, E. A. Nigh, C. G. Kane, M. E. Sabatini, M. Kiebler, M. E. Greenberg, *Nature* **2006**, *439*, 283–289.
- [176] G. Siegel, G. Obernosterer, R. Fiore, M. Oehmen, S. Bicker, M. Christensen, S. Khudayberdiev, P. F. Leuschner, C. J. L. Busch, C. Kane, et al., *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 705–716.
- [177] G. Schratt, *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 842–849.
- [178] F. Besse, A. Ephrussi, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 971–980.
- [179] G. Siegel, R. Saba, G. Schratt, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2011**, *21*, 491–497.
- [180] T. W. Bredy, Q. Lin, W. Wei, D. Baker-Andresen, J. S. Mattick, *Neurobiol. Learn. Mem.* **2011**, *96*, 89–94.
- [181] B. J. Saab, I. M. Mansuy, *Neuropharmacology* **2014**, *80*, 61–69.
- [182] A. Fiorenza, A. Barco, *Neurobiol. Learn. Mem.* **2016**, *135*, 3–12.
- [183] M. S. Ebert, P. A. Sharp, *Cell* **2012**, *149*, 515–524.
- [184] S. M. Eacker, M. J. Keuss, E. Berezikov, V. L. Dawson, T. M. Dawson, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25068.
- [185] G. Lugli, J. Larson, M. E. Martone, Y. Jones, N. R. Smalheiser, *J. Neurochem.* **2005**, *94*, 896–905.
- [186] Y. Kamiya, T. Takagi, H. Ooi, H. Ito, X. Liang, H. Asanuma, *ACS Synth. Biol.* **2014**, 140827094921002.
- [187] H. Ito, M. Urushihara, X. Liang, H. Asanuma, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 311–315.
- [188] H. Cahová, A. Jäschke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3186–3190.
- [189] S. Barrois, H.-A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 905–914.
- [190] C. Brieke, Entwicklung Neuartiger Photo Schaltbarer Nukleotidanaloga Und Diethylaminocumarin Als Photolab Ile Modifikation Zur Wellenlängen- Selektiven Photoaktivierung von Oligonukleotiden, Goethe Universität Frankfurt am Main, **n.d.**
- [191] J. Kahlstatt, **n.d.**
- [192] A. W. Feldman, F. E. Romesberg, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 394–403.
- [193] B. K. Ruble, S. B. Yeldell, I. J. Dmochowski, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, DOI 10.1016/j.jinorgbio.2015.03.010.
- [194] T. P. Prakash, *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 1616–1641.
- [195] T. P. Prakash, B. Bhat, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 641–649.
- [196] W. B. Wan, P. P. Seth, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9645–9667.
- [197] V. K. Sharma, J. K. Watts, *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 2221–2242.
- [198] T. Goldau, K. Murayama, C. Brieke, S. Steinwand, P. Mondal, M. Biswas, I. Burghardt, J. Wachtveitl, H. Asanuma, A. Heckel, *Chem. - Eur. J.* **2014**, n/a-n/a.
- [199] T. Goldau, K. Murayama, C. Brieke, H. Asanuma, A. Heckel, *Chem. - Eur. J.* **2015**, n/a-n/a.
- [200] S. T. Sigurdsson, *Methods* **1999**, *18*, 71–77.
- [201] K. Murayama, Y. Tanaka, T. Toda, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 14151–14158.
- [202] E. Meggers, L. Zhang, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1092–1102.
- [203] H. Asanuma, H. Kashida, Y. Kamiya, *Chem. Rec.* **2014**, *14*, 1055–1069.
- [204] S. Ikeda, M. Yuki, H. Yanagisawa, A. Okamoto, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7191–7195.
- [205] H. Asanuma, Y. Hara, A. Noguchi, K. Sano, H. Kashida, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5144–5146.
- [206] Glen Research, **n.d.**
- [207] H. S. Steinert, F. Schäfer, H. R. A. Jonker, A. Heckel, H. Schwalbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1072–1075.
- [208] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2752–2755.
- [209] K. Meguellati, G. Koripelly, S. Ladame, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2738–2742.
- [210] V. Martynaitis, R. Steponavičiūtė, S. Krikštolaitytė, J. Solovjova, S. Mangelinckx, N. De Kimpe, W. Holzer, A. Šačkus, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3945–3953.
- [211] D. S. Pisoni, L. Todeschini, A. C. A. Borges, C. L. Petzhold, F. S. Rodembusch, L. F. Campo, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5511–5520.
- [212] B. Wang, J. Fan, S. Sun, L. Wang, B. Song, X. Peng, *Dyes Pigments* **2010**, *85*, 43–50.
- [213] K. C. Nicolaou, A. A. Estrada, M. Zak, S. H. Lee, B. S. Safina, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1378–1382.
- [214] V. Hagen, F. Kilic, J. Schaal, B. Dekowski, R. Schmidt, N. Kotzur, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2790–2797.
- [215] P. Gomez-Martinez, M. Dessolin, F. Guibé, F. Albericio, *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1999**, 2871–2874.

- [216] Y. Li, E. Gabriele, F. Samain, N. Favalli, F. Sladojevich, J. Scheuermann, D. Neri, *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 438–443.
- [217] A. Rodrigues-Correia, P. Seyfried, A. Heckel, in *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, John Wiley & Sons, Inc., **2014**.
- [218] H. Ito, X. Liang, H. Nishioka, H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5519–5524.
- [219] K.-L. Lou, N. Saint, A. Prilipov, G. Rummel, S. A. Benson, J. P. Rosenbusch, T. Schirmer, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20669–20675.
- [220] W. Grosse, Ion Channel Engineering: Das Monomere Porin OmpG Als Modell, Universität Marburg, **2011**.
- [221] A. Prilipov, P. S. Phale, P. Gelder, J. P. Rosenbusch, R. Koebnik, *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *163*, 65–72.
- [222] P. Seyfried, L. Eiden, N. Grebenovsky, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 359–363.
- [223] T. Sano, C. R. Cantor, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 3369–3373.
- [224] S. Sambandan, G. Akbalik, L. Kochen, J. Rinne, J. Kahlstatt, C. Glock, G. Tushev, B. Alvarez-Castelao, A. Heckel, E. M. Schuman, *Science* **2017**, *355*, 634–637.
- [225] R. Saba, P. H. Storchel, A. Aksoy-Aksel, F. Kepura, G. Lippi, T. D. Plant, G. M. Schratt, *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 619–632.
- [226] J. Rinne, Light-Inducible Molecular Beacons for Spatio-Temporal Activation and Visualising the Maturation of MicroRNA-181 in Neuronal Dendrites, Goethe-Universität Frankfurt, **2016**.
- [227] “Black Hole Quencher®,” can be found under <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/black-hole-quencher.html>, **n.d.**
- [228] M. J. Kye, P. Neveu, Y.-S. Lee, M. Zhou, J. A. Steen, M. Sahin, K. S. Kosik, A. J. Silva, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24682.
- [229] M. van Spronsen, E. Y. van Battum, M. Kuijpers, V. R. Vangoor, M. L. Rietman, J. Pothof, L. F. Gummy, W. F. J. van IJcken, A. Akhmanova, R. J. Pasterkamp, et al., *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74907.
- [230] G. Lugli, V. I. Torvik, J. Larson, N. R. Smalheiser, *J. Neurochem.* **2008**, *106*, 650–661.



## 7 Lebenslauf

### Josefine Kahlstatt

Geburtsdatum: 5. April 1988 in Frankfurt am Main  
Staatsangehörigkeit: Deutsch



### Ausbildung

04/2014-06/2018

Goethe Universität Frankfurt am Main, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Prof. Dr. Alexander Heckel  
**Promotion in Chemie**

Titel der Dissertation: *Optische Kontrolle von Biomolekülen: Postsynthetische Markierung von RNA mit Spiropyranen und OmpG mit Cumarinen*

04/2012-01/2014

Goethe Universität Frankfurt am Main  
**Master of Science in Chemie**

Titel der Masterarbeit: *Untersuchungen zur reversiblen Photoschaltung von RNA-Hybridisierung mit Spiropyranen.*

04/2009-03/2012

Goethe Universität Frankfurt am Main  
**Bachelor of Science in Chemie**

01/2008-12/2008

Oakland University (Rochester, Michigan, USA)  
Winter- und Herbstsemester mit Schwerpunkt Chemie und Wirtschaft

### Stipendien

04/2014-12/2014

Goethe-Stipendium des Exzellenzclusters Makromolekulare Komplexe (CEF), Frankfurt am Main

**Erstveröffentlichte Publikationen**

J.Kahlstatt, P.Reiss, T. Halbritter, L.-O. Essen, U.Koert, A.Heckel. *A light-triggered transmembrane porin* - *Chem. Commun.* **2018**, 54, 9623-9626.

Sambandan S., Akbalik G., Kochen L., Rinne J., Kahlstatt J., Glock C., Tushev G., Alvarez-Castelao B., Heckel A., Schuman EM. *Activity-dependent spatially localized miRNA maturation in neuronal dendrites* - **Science** **2017**, 355,634-637.