

**Präzisionsmakromoleküle zur multivalenten Präsentation  
supramolekularer Bindungsmotive und deren Wechselwirkung  
mit Proteinen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Theresa Maria Seiler**  
aus Dillingen a.d. Donau

Düsseldorf, Juli 2024



Aus dem Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Laura Hartmann  
Institut für Makromolekulare Chemie  
Universität Freiburg

ehemals:  
Institut für Organische und Makromo-  
lekulare Chemie der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Schrader  
Institut für Organische Chemie  
Universität Duisburg-Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2024



Diese Arbeit wurde im Zeitraum von März 2018 bis Juli 2022 im Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf unter Betreuung von Prof. Dr. Laura Hartmann angefertigt.

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist. Diese Dissertation wurde weder in der vorliegenden noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht, noch wurden bisher anderweitige Promotionsversuche meinerseits unternommen.

Düsseldorf, den 17. Juli 2024

---

Theresa Maria Seiler



## Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Laura Hartmann für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses interessanten Themas. Darüber hinaus bedanke ich mich für ihre stetige Unterstützung und ihren wissenschaftlichen Rat bei aufkommenden Fragen.

An Prof. Dr. Thomas Schrader geht mein Dank für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit.

Frau Dr. Monir Tabatabai möchte ich dafür danken, dass ihre Tür über die Jahre hinweg stets offenstand und sie mir bei jeglichen Fragestellungen bei Seite stand. Ebenso danke ich ihr für ihre Arbeit und Unterstützung in alltäglichen Dingen, ohne welche, das Arbeiten im Labor nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren möchte ich mich bei Stephanie Scheelen, Sonja Coors, Birgit Ohler, Maria Breuer und Michaela Kitzka für die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderer Dank geht jedoch an Michaela Kitzka, die so oft die Papierarbeit für eine schnelle Dienstreise nach Essen übernahm oder die Arbeiten des Sicherheitsteams durch Organisation der Unterlagen unterstützt hat.

Ich möchte ebenso meinen Kooperationspartnern danken, durch deren Schweiß und Fleiß diese Arbeit erst zu dieser wurde, die sie nun ist. Vielen Dank an Dr. Antonio Bietti und Prof. Dr. Schrader für die Synthese und Bereitstellung des wertvollen Tweezers und Molekülsimulationen. Vielen Dank Dr. Annika Lennartz, Katrin Hommel und Prof. Dr. Shirley Knauer für die Durchführung und Auswertung der biologischen Assays und der Zurverfügungstellung von Protein. Vielen Dank Dr. Kai Klein, Dr. Sebastian Kollenda und Prof. Dr. Matthias Epple für die Synthese und Charakterisierung der Goldnanopartikel-Konjugate und der Durchführung der Zellassays. Vielen Dank Dr. Kristian Juul-Madsen und Prof. Dr. Thomas Vorup-Jensen für die komplexe Auswertung der SPR-Daten. Vielen Dank Dr. Christine Beuck und Prof. Dr. Peter Bayer für die Durchführung der DOSY-NMR Messungen und der NMR-Titration.

Ich danke dem gesamten Arbeitskreis, den Kollegen und Freunden, die ich über diese Jahre gefunden habe. Ihr habt stets für das beste und lustigste Arbeitsklima gesorgt, viele wertvolle Gespräche geliefert und legendär gefeiert. Insbesondere seien Sophia Boden, Peter Pasch,

Robert Steinfort und Lennart Hofer für die gemeinsame Zeit und alle wertvollen Gespräche im Labor zu nennen.

Jannis Langer und Georgia Partalidou möchte ich für ihren Beitrag durch ihre Bachelorarbeiten danken. Ihr wart die besten Bacheloranden, die ich mir hätte wünschen können.

Im Speziellen danke ich Lennart Hofer, der den Prozess dieser Arbeit vom Frühstadium bis zum Ende im Labor mit verfolgt hat. Du hattest immer ein offenes Ohr, hilfreiche Ratschläge, warst für viel Quatsch zu haben und bist ein großartiger Diskussionspartner! Vielen Dank für deine Freundschaft!

Besonders möchte ich den beiden Herzensmenschen Michele Illmann und Tanja Paul danken! Vielen Dank für eure Freundschaft! Ihr habt diese Zeit zu einer unvergesslichen gemacht! Ihr habt mir ebenso immer zur Seite gestanden, in dunklen Zeiten gut zugeredet und die Höhen mit mir gefeiert! Ein hoch auf uns und viele weitere unvergessliche Jahre!

Serap Üclü, vielen Dank für all die deepen SPR-Gespräche und deine tägliche Unterstützung in dreistündigen Telefonaten! Du bist mir sehr ans Herz gewachsen!

Bei meiner Familie möchte ich mich besonders für die stetige Unterstützung, sowohl finanziell als auch emotional, während des gesamten Studiums und der Promotionszeit bedanken. Vielen Dank für euer Verständnis und dass ihr so geduldet auf das Ende meine Universitätszeit gewartet habt!

Zu guter Letzt möchte ich meinem Partner Antonio Bietti danken. Ich danke dir, dass du mir den Rücken freigehalten hast, mich immer bedingungslos unterstützt hast und in stressigen als auch schwierigen Zeiten immer die richtigen Worte gefunden hast, um mich aufzubauen und immer wieder neu zu motivieren! Ohne dich wäre das nicht möglich gewesen!!

Ich liebe dich!

**"In der Welt der Wissenschaft gibt es keine Grenzen, nur unendliche Möglichkeiten."**

Stephen Hawking



### **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

T. Seiler, A. Lennarz, K. Klein, K. Hommel, A. Figueroa Bietti, I. Hadrović, S. Kollenda, S. Sager, C. Beuck, E. Chlosta, P. Bayer, K. Juul-Madsen, T. Vorup-Jensen, T. Schrader, M. Epple, S. Knauer, L. Hartmann, „Potentiating Tweezer Affinity to a Protein Interface with Sequence-Defined Macromolecules on Nanoparticles”, *Biomacromolecules*, **2023**, *24*, *8*, 3666-369.

Beiträge: Synthese der Monomeren Bausteinen, Makromoleküle, sowie die CuAAC der Makromoleküle und der durch Kooperationspartner zur Verfügung gestellten Molekularen Tweezer zu den finalen Tweezer-Makromolekülen. Charakterisierung der erhaltenen Konstrukte mittels <sup>1</sup>H-NMR, <sup>31</sup>P-NMR, HPLC-MS, HR-ESI-MS und Etablierung sowie Durchführung des SPR-Assays. Analyse des SPR-Assays mittels Steady-state. Mitarbeit am FP-Assay sowie partiell an der Synthese der Tweezerfunktionalisierten ultrakleinen Goldnanopartikel. Beteiligung an der Abfassung der Veröffentlichung.

### **Andere Veröffentlichungen:**

A. Höing, A. Kirupakaran, C. Beuck, M. Pörschke, F. C. Niemeyer, T. Seiler, L. Hartmann, P. Bayer, T. Schrader, S. K. Knauer, „Recognition of a Flexible Protein Loop in Taspase 1 by Multivalent Supramolecular Tweezers”, *Biomacromolecules*, **2022**, *23*, *11*, 4504-4518.

S. B. van der Meer, T. Seiler, C. Buchmann, G. Partalidou, S. Boden, K. Loza, M. Heggen, J. Linders, O. Prymak, C. L. P. Oliveira, L. Hartmann, M. Epple, “Controlling the surface functionalization of ultrasmall gold nanoparticles by sequence-defined macromolecules“, *Chemistry – A European Journal*, **2020**, *26*, 202003804.

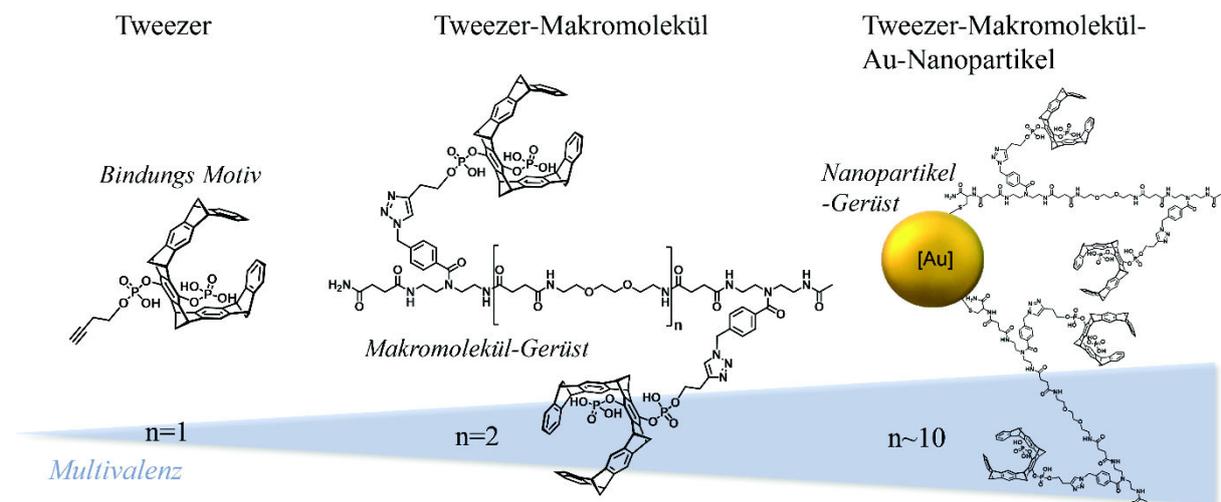
F. Jacobi, D. Wilms, T. Seiler, T. Queckbörner, M. Tabatabai, L. Hartmann, S. Schmidt, „Effect of PEGylation on Receptor Anchoring and Steric Shielding at Interfaces: An Adhesion and Surface Plasmon Resonance Study with Precision Polymers“, *Biomacromolecules*, **2020**, *21*, *12*, 4850-4856.



## KURZZUSAMMENFASSUNG

Die Supramolekulare Chemie rückte vor allem in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Wissenschaft, insbesondere im Feld der Biologie. Hinsichtlich der nur schwer zu erforschenden grundlegenden Prozesse auf molekularer Ebene werden neuartige chemische Werkzeuge gefordert um Protein-Protein Wechselwirkungen (engl.: protein-protein interactions, PPIs) genauer zu untersuchen. Ein besseres Verständnis und mögliche Modulierungen von PPIs haben großes Potenzial zur Nutzung für neuartige Diagnosemethoden und Therapien von Krankheiten. Eine große Herausforderung stellt hierbei die spezifische Erkennung und Bindung von Proteinoberflächen dar. Supramolekulare Liganden müssen zur effektiven Modulation von PPIs oft in flachen Rillen oder großen Poren auf der Proteinoberfläche binden.

Diese Dissertation befasst sich mit dem Design, der Synthese und Untersuchung eines supramolekularen Liganden zur selektiven Bindung in der Nähe des nuklearen Exportsignals (engl. *nuclear export signal*, NES) des Zielproteins Survivin um effektiv die Bindung zum Partnerprotein CRM1 zu inhibieren. Survivin ist ein wichtiges Mitglied der Familie der Apoptose-Inhibitoren. Es reguliert zudem die Zellproliferation und wird in fast allen menschlichen Krebszellen überreguliert. Da seine Doppelfunktion durch den Exportrezeptor CRM1 vermittelt wird, stellt die gezielte Inhibierung der Interaktion durch synthetische Modulatoren ein attraktives Ziel, besonders im Hinblick auf die Entwicklung von Therapeutika, dar. Um einen spezifischen, hochaffinen Inhibitor für die CRM1-Survivin Interaktion zu erhalten, wurden in dieser Arbeit sequenzdefinierte makromolekulare Gerüste synthetisiert, welche in Kombination mit jeweils zwei von *Schrader et al.* etablierten molekularen Pinzetten (engl.: Tweezers), potente divalente Liganden darstellen. Zur weiteren Erhöhung der Valenz und zur gleichzeitigen Erleichterung der Zellaufnahme wurde das Konzept um die Anbringung auf ultrakleinen Goldnanopartikeln erweitert (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Konzeptübersicht: Entwicklung multivalenter Liganden mit dem Bindungsmotiv des aminosäurespezifischen molekularen Tweezers (n=1).<sup>1</sup>

Inspiziert von den Abständen der zu bindenden, im Homodimer vorliegenden, Lysinseitenketten in der Nähe des NESs, wurden drei Tweezer-Makromoleküle mit zunehmenden Interligandenabständen entwickelt. Für die Synthese der makromolekularen Grundgerüste wurde die Polymerfestphasensynthese nach *Hartmann et al.* herangezogen. Sie ermöglicht die individuelle Einstellung von Parametern wie der Valenz, der Abstände, der Konturlänge oder der Hydrophilie durch Verwendung von maßgeschneiderten Bausteinen. Die Anbringung der Tweezer erfolgte in Kooperation mit dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Schrader* und mittels Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition. In nachfolgenden biochemischen Untersuchungen gemeinsam mit dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Knauer* hinsichtlich der Bindung (Oberflächenplasmonenresonanz, engl.: surface plasmon resonance, SPR) und Inhibition (Pull-Down Assays) der Survivin/CRM1 Interaktion zeigte das längste divalente Konstrukt die höchsten Affinitätswerte und eine effiziente Hemmung der PPI bei ca. 10  $\mu\text{M}$ . Da allerdings die Tweezer-Makromoleküle allein nicht fähig sind die Zellmembranen zu durchdringen, dies aber für die Entwicklung von effektiven Therapeutika essenziell ist, wurde im nächsten Schritt sowohl der monovalente Tweezer als auch das divalente Tweezer-Makromolekül in Kooperation mit dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Eppe* an ultrakleine Goldnanopartikel angebracht. So konnte zum einen das Konzept der Multivalenz durch Erhöhung der Tweezer-Valenz von zwei auf 10 respektive 16 erhöht werden, wodurch zum einen die Affinität um das 100fache verbessert werden, als auch die Inhibitionsfähigkeit weiter gesteigert werden konnte. Zum anderen konnte in einer Zellaufnahme Studie mit HeLa-Zellen der erfolgreiche Transport der Tweezer-Nanopartikelkonstrukte in die Zellen gezeigt werden und die Konstrukte in Zellorganellen durch konfokale Mikroskopie nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, wie ein supramolekulares

Erkennungsmotiv zu einem starken PPI-Inhibitor durch die individuelle Kombination verschiedener multivalenter Gerüste weiterentwickelt werden kann. Durch Kombination von Multivalenz und Einbindung von Peptidsequenzen komplementär zur Proteinoberfläche könnte in zukünftigen Projekten die Spezifität als auch die Affinität weiter verbessert werden.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1 Einführung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Kurze Einführung in die Supramolekulare Chemie</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Molekulare Erkennung</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Wirt-Gast Systeme und Selbstorganisation .....	5
1.2.2 Protein Erkennung .....	7
1.2.3 Molekulare Pinzetten .....	11
<b>1.3 Multivalente Liganden</b> .....	<b>15</b>
1.3.1 Prinzipien der Multivalenz .....	16
1.3.2 Multivalente Gerüststrukturen .....	18
1.3.3 Präzisionsmakromoleküle als multivalente Gerüststrukturen .....	20
<b>1.4 Supramolekulare Chemie/Liganden für Wechselwirkung an Proteinen</b> .....	<b>29</b>
1.4.1 Supramolekulare Liganden zur Bindung an Survivin .....	31
<b>2 Motivation und Ziele</b> .....	<b>37</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1 Design und Synthese der divalenten Pinzettenmakromoleküle</b> .....	<b>40</b>
3.1.1 Synthese divalenter Azid-funktionalisierter Oligomere .....	45
3.1.2 Konjugation der molekularen Tweezer an makromolekularen Gerüsten .....	62
<b>3.2 Bindungsstudien zu den divalenten Tweezer-Makromolekülen an Survivin</b> .....	<b>71</b>
3.2.1 ITC .....	72
3.2.2 NMR-Titration .....	75
3.2.3 Fluoreszenzpolarisation .....	77
3.2.4 SPR .....	78
3.2.5 Pull-Down .....	85
<b>3.3 Tweezermakromoleküle auf ultrakleinen Goldnanopartikeln</b> .....	<b>87</b>
3.3.1 Synthese und Charakterisierung .....	90
3.3.2 Bindungsstudien an Survivin .....	96
3.3.3 Zellaufnahmestudie .....	100
<b>4 Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>103</b>

<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>111</b>
<b>5.1</b>	<b>Chemikalien und analytische Methoden</b> .....	<b>111</b>
<b>5.2</b>	<b>Synthese und Charakterisierung</b> .....	<b>121</b>
5.2.1	Building Block Synthese .....	121
5.2.2	Festphasensynthese und Aufreinigung der Präzisionsmakromoleküle.....	123
5.2.3	Synthese der Tweezermakromoleküle .....	132
5.2.4	Synthese der funktionalisierten usAuNPs .....	140
<b>6</b>	<b>Verzeichnis</b> .....	<b>142</b>
<b>6.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>142</b>
<b>6.2</b>	<b>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>147</b>
<b>Appendix</b>	.....	<b>XIX</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....		<b>XLV</b>

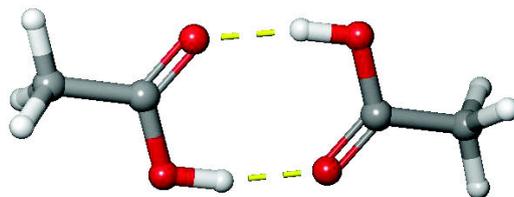
# 1 EINFÜHRUNG

## 1.1 Kurze Einführung in die Supramolekulare Chemie

Über die letzten fünfzig Jahre hat sich die Supramolekulare Chemie zu einem vielfältigen interdisziplinären Forschungsgebiet entwickelt, das sich von Chemie über Physik und Biologie zu chemischen Verbindungen mit verschiedenen Unterkategorien entwickelt hat.<sup>2, 3</sup> Sie beschäftigt sich mit der Erforschung von molekularen Komplexen, die durch spezifische nicht-kovalente, intermolekulare Kräfte organisiert und zusammengehalten werden.<sup>3</sup> Der Begriff wurde erstmals von *Jean-Marie Lehn* mit seinen beiden Veröffentlichungen zu Kronenthern, der Wirts-Gast Chemie und molekularer Erkennung im Jahr 1978 eingeführt.<sup>4, 5</sup> Bereits 1967 gelang *Charles J. Pederson* der Durchbruch mit der Synthese eines zyklischen Kronenthers und seinen komplexierenden Eigenschaften von Metallionen. Erst 1987 erlangte das Forschungsgebiet der Supramolekularen Chemie jedoch zunehmende Aufmerksamkeit durch die Vergabe des Nobelpreises an *Jean-Marie Lehn, Charles J. Pedersen* und *Donald J. Cram* für die „Entwicklung und Verwendung von Molekülen mit strukturspezifischer Wechselwirkungen von hoher Selektivität“.<sup>6</sup>

Doch die Wurzeln des Konzepts reichen weit tiefer. Bereits Ende des 18. Jahrhunderts definierte der Wissenschaftler *Paul Ehrlich* als Erster den Begriff des zellularen Rezeptors in seinen Immunitätsstudien. In seiner berühmten Seitenkettentheorie erklärt er, dass ohne eine Bindung von Substrat und Zelle keine Funktion ausgelöst wird.<sup>7, 8</sup> 1894 erkannte *Emil Fischer*, dass Interaktionspartner, wie Schlüssel und Schloss ineinander passen müssen und erweiterte somit die Theorie um die Selektivität, die durch geometrische Komplementarität der Interaktionspartner geschaffen wird und grundlegend für die molekulare Erkennung ist.<sup>9</sup>

Neben der Selektivität spielt ebenso die Affinität zwischen den Interaktionspartnern eine große Rolle, die nach *Alfred Werner* in der Koordination der Substrate zu Grunde liegt.<sup>10</sup> Zusätzlich wurde bereits 1937 der Begriff „Übermolekül“ durch den deutschen Chemiker *Karl Lothar Wolf* eingeführt. Er beschreibt die Komplexbildung aus koordinativ gesättigten Verbindungen, wie es bei der Selbstassoziierung einer Carbonsäure zum Dimer der Fall ist (Abbildung 2).<sup>11, 12</sup>

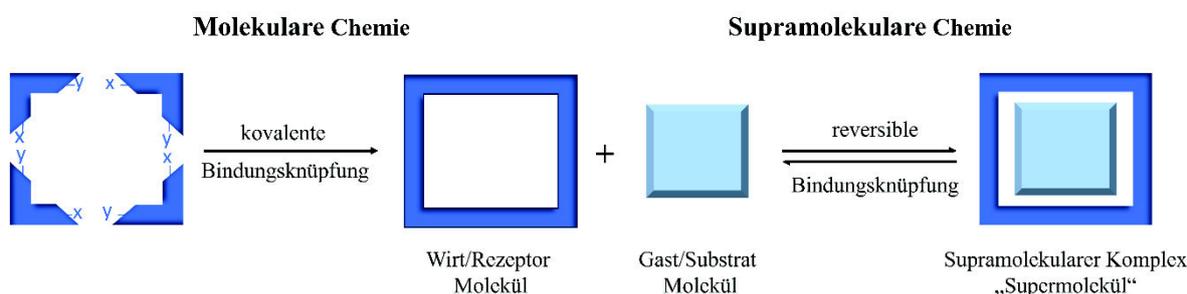


**Abbildung 2:** Veranschaulichung der Komplexbildung aus zwei Carbonsäuren zum Dimer durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen.<sup>11</sup>

Gestützt durch diese Konzepte definiert *Lehn* die Supramolekulare Chemie als Forschungsgebiet, das sich mit organisierten Einheiten höherer Komplexität, die aus der Verbindung von zwei oder mehr chemischen Spezies resultieren und durch intermolekulare Kräfte zusammengehalten werden, beschäftigt.<sup>13</sup> Kurz gesagt wird sie oft als ‚Chemie, die über das Molekül hinausgeht‘ bezeichnet, oder auch ‚Chemie der nicht-kovalenten Bindung‘ oder ‚nicht-molekulare Chemie‘ sind im Sprachgebrauch bekannt.<sup>14</sup>

Ein essenzieller Schritt für den Durchbruch der Supramolekularen Chemie stellte die Forschung von *Charles J. Pedersen* dar, welchem, mit der ersten Synthese eines cyclischen Kronenthers zur Erkennung und Komplexierung von Metallionen gelang, einen selektiven Wirt-Gast Komplex zu entwickeln.<sup>15, 16, 17</sup>

Aus der Wirt-Gast Chemie, die die kleinste Kategorie an Supermolekülen bildet, geht besonders der Zusammenhang zwischen molekularer und supramolekularer Chemie in Bezug auf Struktur und Funktion hervor. Demnach ist die molekulare Erkennung ein essentieller Teil der Wirt-gast Chemie.<sup>18</sup> (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Verlaufs von Molekularer Chemie zu Supramolekularer Chemie.<sup>19</sup>

Bei der vereinfachten Betrachtung der supramolekularen Chemie als Komplexierungsereignis werden die beiden interagierenden Partner als Wirt und Gast bzw. als Rezeptor und Substrat definiert.<sup>3, 13</sup> Letztere Terminologie findet sich vor allem in biologischen Systemen, wie sie

Fischer untersucht hat, wieder. Der häufig genutzte Begriff des Liganden hingegen wird oft unspezifisch auf beide Partner des Komplexes angewendet.<sup>13</sup> Beim Wirt/Rezeptor handelt es sich um eine großes, kovalent verknüpftes Molekül oder Aggregat. Sie sind beispielsweise zyklische Verbindungen oder Enzyme im biologischen Kontext, die einen zentralen Hohlraum oder Loch aufweisen. Dieser Hohlraum dient dazu selektiv den kleineren Interaktionspartner, das Substrat bzw. den Gast zu koordinieren, wodurch diese Moleküle zu einem Supermolekül zusammengefügt werden. Der Gast kann hierbei sowohl ein einatomiges Kation oder organisches Anion sein als auch ein komplexeres Molekül, wie ein Hormon. Folglich weisen Rezeptoren konvergente Bindungsstellen, wie Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren oder Lewis-Donatoren auf, während Substrate, dementsprechend divergente Bindungsstellen, wie Lewis-saure Metallkationen auf. Die Bindungsstelle eines jeweiligen Wirts oder Gastes ist jeweils der Bereich, der sowohl die geeignete Größe, Geometrie als auch chemische Beschaffenheit aufweist um mit einem Interaktionspartner in eine nicht-kovalenten Wechselwirkung zu treten.<sup>19, 20</sup>

Diese nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Molekülen sind für die reversible Bildung der Aggregate/Supermoleküle von entscheidender Bedeutung. Sie sind nicht genau definiert und werden allgemein als eine Bindungsinteraktion verstanden, die nicht mit dem klassischen Überlapp von zwei Atomorbitalen beschrieben werden kann. Die Bindungsstärke von nicht-kovalenten Wechselwirkungen ist im Wesentlichen schwächer als die der kovalenten, die zwischen 150 kJ/mol-450 kJ/mol liegen können.<sup>19</sup> Zu den nicht-kovalenten Wechselwirkungen zählen von recht schwachen Lösungsmittelleffekten (Hydrophobizität), Van der Waals-WW (dispersive / induktive WW) und Wasserstoffbrückenbindungen über Dipol-Dipol-, bis Ion-Dipol-, und Ion-Ion Wechselwirkungen. Die Stärke dieser Wechselwirkungen reichen von 2 kJ/mol für Dispersionswechselwirkungen bis zu 300 kJ für Ion – Ion Wechselwirkungen (Tabelle 1).<sup>21, 22</sup>

**Tabelle 1:** Übersicht der nicht-kovalenten Wechselwirkungen und ihre zugehörigen Bindungsstärken in [kcal/mol].<sup>19, 22</sup>

Interaktion	Energie [kJ/mol]
Ion-Ion WW	200 - 300
Ion-Dipol WW	50 - 200
Wasserstoffbrückenbindung	4-120
Dipol-Dipol WW	5 - 50
Kation- $\pi$ WW	5 - 80
$\pi$ - $\pi$ WW	0 - 50
Van der Waals WW	< 5, in Abhängigkeit der Oberfläche
Hydrophobe WW	Bezogen auf Lösungsmittel-WW-Energie

Wirt-Gast Systeme sind sehr labil, außer die Assoziation und Dissoziation werden durch sterische Hindernisse des Wirts gesteuert. Die Stabilität des Wirt-Gast Assoziationskomplex wird hingegen in erheblichen Maß von der Solvatationsenergie des Wirts als auch des Gasts gesteuert. Folglich kann die Assoziationskonstante für Wirt-Gast-Komplexe von Lösungsmittel zu Lösungsmittel, je nach relativen Beiträgen dieser Solvatationsenergien drastisch variieren.<sup>22</sup> Die Stabilität der Komplexe kann dennoch als Summe der verschiedenen WW betrachtet werden, wobei die Energiebilanz des gesamten Systems minimiert werden muss.<sup>22, 23</sup>

Die molekulare Erkennung betrachtend ist die Reversibilität der Komplexbildung von wesentlicher Bedeutung. So kann bei einem fehlerhaften Erkennungsprozess durch Dissoziation der Komplex aufgebrochen und neu gebildet werden.<sup>24</sup>

So hat die Forschung im Gebiet der Supramolekularen Chemie in den letzten Jahren darauf abgezielt, die Vielseitigkeit der nicht-kovalenten Wechselwirkungen nutzbar zu machen.<sup>25</sup>

Dieses Ziel zu erreichen, wurde vor allem von dem Wunsch, die äußerst spezifischen Bindungswechselwirkungen der Natur zu verstehen und zu imitieren, die durch die Analogie von "Schloss und Schlüssel" veranschaulicht werden, angetrieben.<sup>26, 27</sup>

Große Bedeutung kommt hierbei synthetischen Wirt-Gast-Systemen zu, die supramolekulare Strukturen von hoher Komplexität bilden können. Supramolekulare Systeme sind hinsichtlich Spezifität und Funktionalität („molekulare Schalter“) plan- und optimierbar, woraus sich Konzepte für die Entwicklung von neuen Materialien für molekulare Erkennung, molekulare Strukturen und Selbstorganisation ableiten.<sup>28</sup>

## 1.2 Molekulare Erkennung

Die molekulare Erkennung ist ein wesentliches Konzept in verschiedenen Bereichen, darunter Biochemie, Pharmakologie und Materialwissenschaft, und das Verständnis der Grundsätze der molekularen Erkennung ist entscheidend für die Entwicklung neuer Medikamente, Materialien und Technologien. Mittlerweile hat sie ein Niveau erreicht, auf dem es möglich ist für viele Arten von kleinen bis mittelgroßen Molekülen synthetische Rezeptoren, mit einem guten Maß an Vorhersehbarkeit und Selektivität zu designen und zu synthetisieren.<sup>26, 27</sup>

Die molekulare Erkennung ist zu verstehen als die Bindung von einem oder mehreren Substratmoleküle durch ein synthetisches Rezeptormolekül. Grundlegend, um in Wechselwirkung zu treten und spezifisch zu binden sind komplementäre molekulare Strukturen und chemische Eigenschaften. Für die Spezifität der molekularen Erkennung sind neben der Größe, Form und chemischen Beschaffenheit der interagierenden Partner ebenso die Anziehungskräfte, die zwischen ihnen herrschen, wichtig. Folglich beruht dieser Prozess auf den molekularen Informationen, die in der Architektur und den Koordinationsstellen der interagierenden Partner gespeichert sind. Besonders wichtig ist er für das Funktionieren vieler biologischer Systeme, wie beispielsweise die Interaktionen zwischen Enzymen und Substraten oder auch Protein-Protein-Interaktionen. Folglich schließt die molekulare Erkennung neben der Speicherung von Information ebenfalls das Auslesen dieser auf molekularer Ebene ein. Essenziell ist hierbei, dass eine Bindung allein noch keine Erkennung darstellt.<sup>13, 29, 30</sup>

Ausgehend davon, wie Moleküle sich untereinander erkennen und organisieren, kann die Supramolekulare Chemie in die Kategorien der Wirt-Gast-Chemie und der Selbstorganisation eingeteilt werden. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Bereichen ist die Frage der Größe und Form.

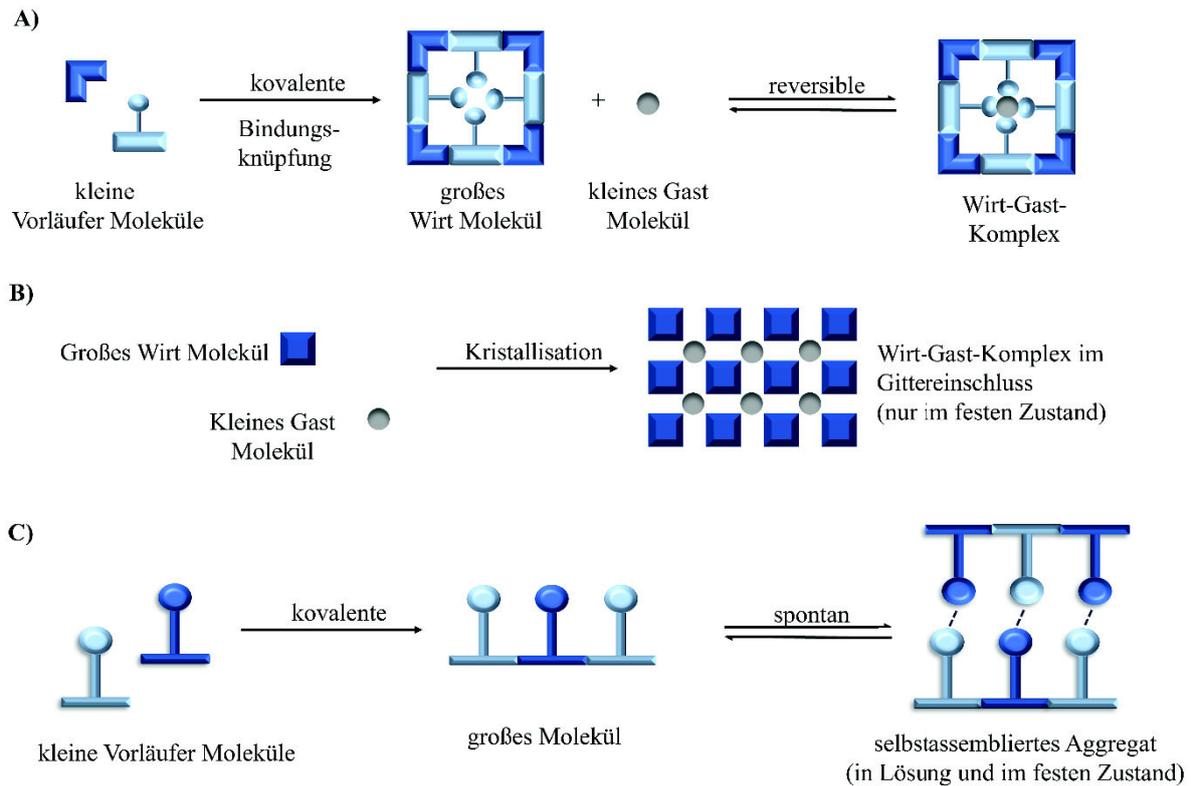
### 1.2.1 Wirt-Gast Systeme und Selbstorganisation

Bei allen Wirt-Gast Systemen bildet das signifikant größere Molekül, welches das kleinere ‚Gast‘-Molekül umhüllt den ‚Wirt‘. Beide Interaktionspartner müssen komplementäre Eigenschaften wie Größe, Geometrie und chemischen Eigenschaften aufweisen, um miteinander interagieren zu können. Der Bereich, welcher bei jedem Interaktionspartner direkt an der Komplexbildung beteiligt ist, wird als Bindungsstelle bezeichnet.

Eine der ersten Definitionen zur Wirt-Gast Struktur wurde 1948 von *H.M. Powell* vorgeschlagen.<sup>31</sup> Er prägte den Begriff „Clathrat“, abgeleitet aus dem griechischen Wort Kethra, das

„Balken“ bedeutet. Es handelt sich hierbei um einen vollständigen Einschluss einer Gruppe von Molekülen in einer geeigneten, von einer anderen gebildeten, Struktur. Diese Einschlussverbindungen zeigen allerdings nur als kristalline Festkörper ein Wirt-Gast-Verhalten, da der Hohlraum, in welchem der Gast gebunden ist durch eine Lücke zwischen zwei oder mehreren Wirtsmolekülen in der Packung des Wirtsgitters entstanden ist.<sup>19, 31, 32</sup> Verfügt der Wirt hingegen über einen permanenten intramolekularen molekularen Hohlraum mit spezifischen Bindungsstellen, so ist diese Bindungsstelle eine intrinsische molekulare Eigenschaft des Wirtes und existiert somit nicht nur im festen Zustand, sondern auch in Lösung. Diese Wirt-Gast-Komplexe werden als *Cavitas* bezeichnet.<sup>14, 19</sup>

Neben diesen Wirt-Gast-Komplexbildungen kann zusätzlich eine dritte Komplexbildungssituation unterschieden werden. Hierbei gibt es keine signifikanten Größenunterschiede zwischen den beiden Komponenten und keiner fungiert als Wirt oder Gast. Dieser Prozess der Selbstorganisation ist als Gleichgewicht der Komponenten zu verstehen. Die spontane Erkennung zwischen zwei oder mehr diskreten Molekülen führt zu nur einem wohldefinierten Aggregat mit einer Struktur, die nur von den in den chemischen Bausteinen enthaltenen Informationen abhängt.<sup>14, 33, 34</sup> Das gebildete Aggregat ist das thermodynamisch stabilste innerhalb der möglichen formbaren Spezies.<sup>35</sup> Nach einer früheren Definition nach *Johanathan Lindsey* muss beim Selbstorganisationsprozess zwischen strikter und gerichteter Selbstorganisation unterschieden werden. Bei der strikten Selbstorganisation wird direkt ein wohldefiniertes Aggregat gebildet. Bei der gerichteten hingegen wird der Prozess durch zusätzliche Komponenten, wie Solvations- oder Schabloneneffekte oder bei Festkörpern durch Keimbildungs- und Kristallisationsprozesse beeinflusst oder gesteuert. Folglich folgt die Selbstassemblierung im idealisierten Fall einem kooperativen oder allosterischen Prozess.<sup>19, 36</sup>



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Komplexbildungsmöglichkeiten: A) Bildung eines Wirt-Gast-Komplex, B) Einschluss von Gastmolekülen in Hohlräume, in einem von Wirtsmolekülen gebildetem Gitter, C) Bildung eines selbstassemblierten Aggregats, das nicht der klassischen Wirt-Gast-Beschreibung entspricht.<sup>19</sup>

Ein prominentes Beispiel aus der Natur, welche voll von supramolekularen Systemen ist, stellt die Desoxyribonukleinsäure (DNS) mit ihrer Doppelhelix dar.<sup>37</sup> Komplementäre Basenpaare bilden Wasserstoffbrückenbindungen, die unterstützt durch  $\pi$ - $\pi$ -Stacking, die beiden einzelnen DNS-Stränge zusammenhalten. Das Zusammenfinden dieser Einzelstränge läuft spontan in einem strengen Selbstorganisationsprozess ab.<sup>37</sup>

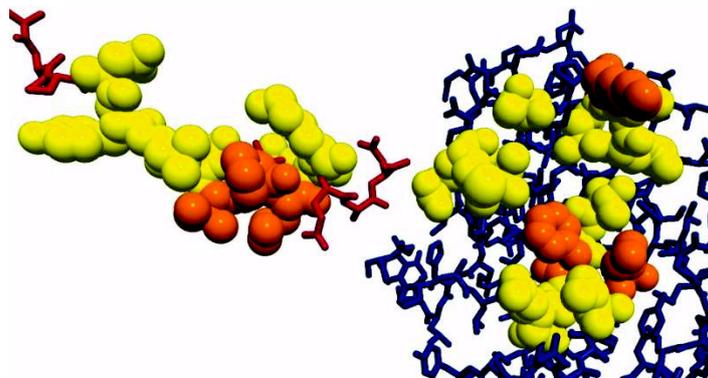
## 1.2.2 Protein Erkennung

Die Natur selbst ist voll von supramolekularen Erkennungsereignissen. Seien es Wirt-Gast Systeme, wie Substrate und Enzyme, die erst dann ihre Funktion bei erfolgreicher Erkennung entfalten oder spontane Selbstorganisationen wie die Bildung der DNS-Doppelhelix, welche die gesamte genetische Information trägt.<sup>37, 38</sup> Zum größten Teil laufen diese Erkennungsprozesse auf Proteinebene ab, wodurch Aminosäurereste eine wesentliche Rolle spielen. Protein-Protein Interaktionen (PPI) spielen eine entscheidende Rolle, bei der Funktion von Zell-

/Organellenstruktur, der Immunreaktion, der Hemmung von Proteinenzymen, der Signaltransduktion oder auch der Apoptose.<sup>39</sup> Dennoch sind für viele Proteine die genauen Proteinbindungsstellen noch weitestgehend unbekannt.<sup>40</sup> Proteine, in ihrer nativen gefalteten Konformation, bilden eine dem Lösungsmittel ausgesetzte äußere Oberfläche sowie eine innere, dem Lösungsmittel entzogene Oberfläche. Aktive Stellen von Enzymen liegen meist im Inneren der Proteine.<sup>39</sup>

Die Kontaktflächen bei PPI liegen auf der äußeren Oberfläche und sind Allgemeinen flach und weisen häufig keine Rillen und Taschen auf, wie es bei Bindungsstellen zu kleinen Molekülen der Fall ist. Zudem sind sie mit rund 1500-3000 Å recht groß.<sup>41</sup>

Entscheidend für PPIs sind ebenfalls die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Grenzflächen der jeweiligen Proteine, die ähnliche strukturelle Eigenschaften aufweisen.<sup>42</sup> Die Bildung von PP-Komplexen ist weitestgehend durch hydrophobe Effekte, die zwischen unpolaren Regionen von Proteinresten durch Van-der-Waals-Interaktionen auftreten gesteuert. Auch die elektrostatische Komplementarität trägt einen großen Beitrag, wenn es darum geht ein Protein an die Oberfläche eines anderen anzudocken.<sup>43</sup> Nicht zuletzt die Wasserstoffbrückenbindungen, die zu 76% durch Aminosäureseitenkettenreste gebildet werden.<sup>44</sup>



**Abbildung 5:** Komplex, der zwischen dem bakteriellen Zellteilungsprotein ZipA (blau) und dem FtsZ-Fragment (rot) gebildet wird, mit Hervorhebung der mutierten Reste nach Alanin-Scanning-Mutagenese der gesamten Protein-Protein-Grenzfläche mittels einer van-der-Waals-Darstellung. In gelb sind die Reste mit einer relativen freien Bindungsenergie von weniger als 2,0 kcal/mol und in orange die Reste mit einer relativen Bindungsenergie von mehr als 2,0 kcal/mol dargestellt. Die PDB-ID lautet 1F47. Für die Erstellung dieser Abbildung wurde die VMD-Software<sup>83</sup> verwendet.<sup>44</sup>

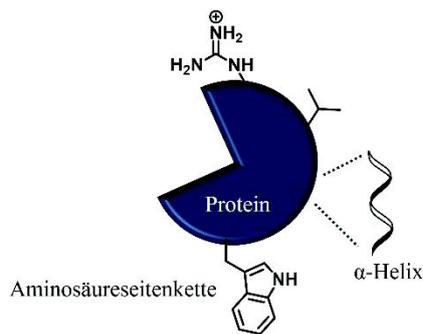
Durch das Besondere Augenmerk der Literatur auf Struktur, Energetik, elektrostatische Komplementarität und Kinetik von PPIs konnten sogenannte „Hot-Sports“ auf Proteinoberflächen ausgemacht werden.<sup>45, 46</sup> Dieser definierte Bereich befindet sich auf der Oberfläche in der Nähe des geometrischen Zentrums der PPI-Grenzfläche. Besonders die sich dort befindenden Reste tragen zur Stabilität des Komplexes bei. Demzufolge ist der Nachweis spezifischer

Aminosäurereste von größter Wichtigkeit. Mit dem sogenannten Alanin-Scanning können Aminosäurereste, die maßgeblich an der Bindung beteiligt sind auffindig gemacht werden (Abbildung 5). Hierbei werden diese Aminosäuren zu Alanin mutiert. Wird darauffolgend eine Verringerung der freien Bindungsenergie beobachtet, so können die einzelnen für die PPI wichtigen Aminosäuren auffindig gemacht werden.<sup>39</sup> Wells *et al.* erstellten beispielsweise durch Zuordnung der  $\Delta\Delta G$ -Werte eine Karte zum Protein, dessen Struktur bereits bekannt ist. Hier zeigte sich, dass die Reste, deren Mutationen am meisten zum Verlust der Affinität beitragen nahe beieinander liegen, obwohl sie in der Primärsequenz nicht zwingend zusammenhängen.<sup>45, 46</sup> Allerdings treten diese Hot-Spots in der Regel als Cluster auf, die dann als Hot-Spot Regionen benannt werden. Ihre jeweiligen Beiträge sind kooperativ und stabilisieren die PPI gesamtlich.<sup>43</sup>

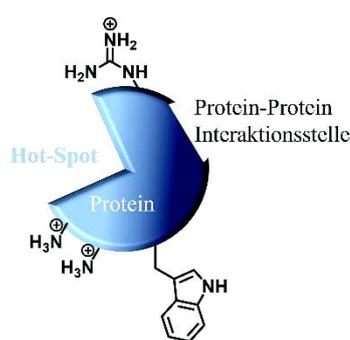
Die Allgemeingültigkeit des Hot-Spot-Modell für PPI bleibt weiterhin eine offene Frage. Unter anderem konnten durch das Alanin-Screening vor allem Peptid Hormone und ihre Hormonrezeptoren sowie Antikörper und Antigene charakterisiert werden. Dennoch sind weiterhin einige Proteinschnittstellentopologien noch nicht näher charakterisiert.<sup>39</sup> Da PP-Wechselwirkungen grundlegend für viele biologische Interaktionen wie Immunantworten, Apoptose, zelluläre Transporte oder Signalübertragung sind, ist die Identifizierung der interagierenden Proteine und ihres Interaktionsmechanismus eine entscheidende Voraussetzung, um ein tieferes Verständnis von Protein-Protein-Komplexen und ihren Funktionen zu erlangen.<sup>47</sup> Viele der in der Vergangenheit dazu durchgeführten Studien heben die Bedeutung der Aminosäurereste an den Schnittstellen der Grenzflächen hervor.<sup>42, 48</sup> Die gezielte Beeinflussung der Schnittstellen durch kleine Moleküle zur PPI-Inhibierung birgt vor allem in Hinblick auf die Entwicklung potenter Arzneimittel ein enormes Potential.<sup>40, 49, 50</sup> PPI wirken orthogonal zu herkömmlichen Arzneimittelzielen, wie Enzym und Transkriptionsfaktoren.<sup>51</sup> Ein prominentes Beispiel aus der Medizin ist Vancomycin, welches die Interaktion mit Enzymen blockiert. Die Erforschung dieser Schnittstellen stellt jedoch eine Herausforderung dar, da die jeweiligen Interaktionsoberflächen groß und flach sind und keine spezifischen Bindungstaschen aufweisen.<sup>48, 49</sup>

Nach Hamachi und Mitarbeitern, gibt es drei mögliche Wege, wie Proteinoberflächen selektiv erkannt werden können (Abbildung 6): (i) Erkennung einer Substruktur, die durch die Peptidsequenz auf der Proteinoberfläche definiert ist; (ii) Erkennung der exponierten funktionellen Gruppen, die einen Fingerabdruck eines jeden Proteins darstellen. Ausrichtung auf Hot-Spots oder Nachahmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Sowie (iii) die Erkennung von Proteinen durch typische Protein-Ligand-Wechselwirkungen.<sup>52</sup>

i) Erkennung von Protein -Substrukturen



ii) Erkennung von Proteinoberflächen



iii) Protein-Ligand Interaktion



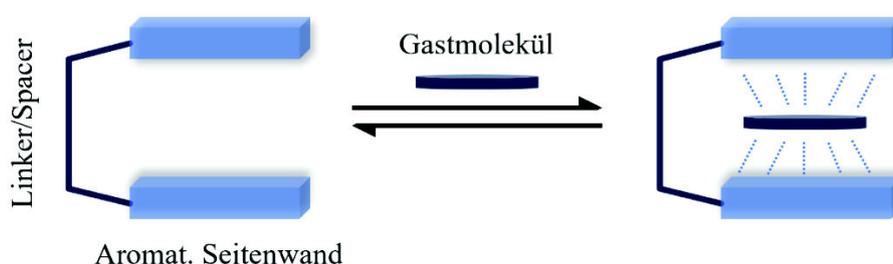
**Abbildung 6:** Zusammenfassung der drei Strategien der Proteinerkennung nach *Hamachi* und Mitarbeitern. i) Erkennung von Protein-Substrukturen, ii) Erkennung von Proteinoberflächen wie Hot-Spots oder Protein-Protein-Interaktionsstellen, iii) Erkennung durch typische Protein-Ligand Wechselwirkung.<sup>52</sup>

Die Erkennung von Proteinen durch synthetische Moleküle wird darüber hinaus häufig in zwei Kategorien unterteilt, die auf den verfügbaren Bindungsstellen basieren: Wechselwirkungen, im Inneren des Proteins und Wechselwirkungen auf der Oberfläche. In der Literatur sind mehrere synthetische Wirtsmoleküle beschrieben, die Protein-Grenzflächen durch supramolekulare Wirt-Gast-Wechselwirkungen erkennen: Kronenether<sup>53</sup>, Porphyrine<sup>54</sup>, Cyclodextrine<sup>55</sup>, Cucurbiturils<sup>56</sup>, Calixarene<sup>57</sup>, molekulare Pinzetten<sup>58</sup>.

Die Bindungsenergie dieser supramolekularen Wirt-Gast-Systeme in Wasser wird durch den hydrophoben Effekt gesteuert. Dabei spielen Elektrostatik und andere nicht-kovalente Wechselwirkungen eine sekundäre, modulierende Rolle. Daher ist es notwendig, eine andere Strategie zu verwenden als für die bisher gründlich erforschten Interaktionen supramolekularer Systeme in organischen Lösungsmitteln. Um sicherzustellen, dass Proteinerkennungselemente in Wasser ausreichend löslich sind und um Wassermoleküle von Proteinbrückenbindungen abzu stoßen, muss ein optimales Gleichgewicht zwischen hydrophilen und hydrophoben Wechselwirkungen hergestellt werden.<sup>59</sup>

### 1.2.3 Molekulare Pinzetten

1987 wurde der Begriff „molekulare Pinzette“ oder „molecular Tweezer“ erstmals von *Chin Wen Chen* und *Howard William Whitlock Jr.* eingeführt. Ihre Entdeckung, der Verknüpfung zweier Koffeinmoleküle über eine Diin-Brücke, legte den Grundstein der Entwicklung der molekularen Pinzetten, wie sie heute und in dieser Arbeit ihre Anwendung finden.<sup>60</sup> Durch die fixe Verdrückung der aromatischen Seitenwände mit einem definierte Abstand von 7 Å wird eine Verbindung geschaffen, die es durch  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkung ermöglicht kleine aromatische Moleküle wie 2,6-Dihydroxybenzoesäure oder 1,3-Dihydroxynaphthalin-2-carbonsäure einzuschließen. Auf Grund dessen wird hier vom Sandwich-Modell gesprochen, wie in **Abbildung 7** verdeutlicht.<sup>61</sup>



**Abbildung 7:** Vereinfachte schematische Darstellung eines molekularen Tweezers und Bildung eines Sandwich-Modells durch Einschluss eines kleinen Gastmoleküls.

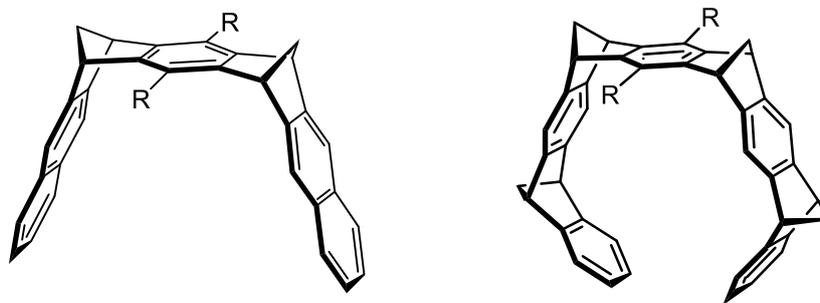
Molekulare Pinzetten sind folglich molekulare Rezeptoren, die durch zwei identische flache und in der Regel aromatische Bindungseinheiten, die durch einen Abstandshalter (Linker) verbunden sind.<sup>61</sup> Im Allgemeinen müssen folgende drei Kriterien erfüllt sein. Zum einen muss ein Abstandshalter vorhanden sein, der einerseits die Selbstassoziation mehrerer molekularer Pinzetten verhindert und andererseits muss dieser Linker einen Abstand von  $\sim 7$  Å herstellen, sodass der Einschluss eines einzelnen aromatischen Moleküls gewährleistet ist. Ebenso muss der Abstandshalter die Pinzette starr in ihrer syn-Konformation halten.<sup>62</sup> Der Vorteil einer starren Vorstrukturierung liegt vor allem darin, dass keine Organisation zur Sandwich-Form stattfinden muss um das Gastmolekül zu binden, wodurch entropische Verluste minimiert und die Bindungsstärke merklich erhöht werden.<sup>63</sup> <sup>62</sup> *Zimmerman et al.* forschten zu molekularen Pinzetten, die durch ihre Linker einen hohen Grad an Vororganisation aufweisen und somit die aromatischen Bindungsarme in einer syn-Konformation aufrechterhalten.<sup>64</sup> Eine gewisse Konformationsbeweglichkeit bleibt auf Grund der Rotation der Bindungseinheiten entlang der  $\sigma$ -Bindung,

die die Verknüpfung zum Linker darstellt. Durch diese Drehung kann die Größe des Hohlraums geändert werden, wodurch der Einschluss des Gastes optimiert wird.<sup>61</sup>

Das Forschungsfeld der molekularen Pinzetten und Clips als molekulare Rezeptoren stellt ein vielfältiges und interessantes Forschungsgebiet dar.

So forschte neben *Zimmerman Nolte* zu molekularen Clips auf Glycolurilbasis<sup>65</sup>, *Klärner* berichtet 2003 über seine Forschung zu molekularen Clips und Pinzetten aus Polyaren<sup>66</sup>. Auch zu chiralen molekularen Pinzetten<sup>62</sup> wurde berichtet sowie zu Molekularen Pinzetten speziell zur Fulleren Bindung<sup>67</sup> oder auch molekulare Pinzetten als molekulare Schalter<sup>68</sup>.

1996 brachte *Klärner et al.* eine neue Art von molekularen Pinzetten in den Fokus der Forschung. Seine sich durch wiederholende Diels-Alder-Reaktionen aus Norbornadien-Einheiten zusammengesetzten Systeme, sind von di-, über tri- zu tetramethylen verbrückt und weisen eine starre bandförmige konkav-konvexe Struktur auf (**Abbildung 8**). Diese ist optimal für die Bildung von Komplexen mit aromatischen Gastmolekülen durch mehrfache  $\pi$ - $\pi$ - und CH- $\pi$ -Wechselwirkungen. Ebenfalls ist durch den Aufbau des Systems weiterhin eine gewisse Flexibilität gegeben, so dass die Seitenwände, ähnlich zu mechanischen Pinzetten, gestaucht oder gedehnt werden können um sich geometrisch an das Gastmolekül anpassen zu können.<sup>69</sup> Auch eine synthetische Anpassung durch Variation der Anzahl und Größe an Spacereinheiten ist bei diesen Strukturen möglich.

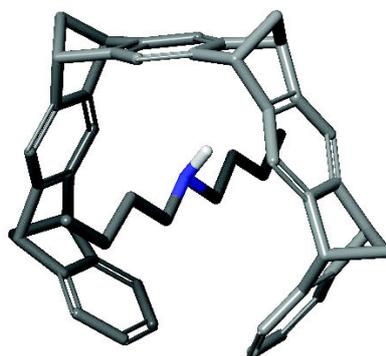


**Abbildung 8:** Chemische Struktur der di- und tetramethylenverbrückten aromatischen Clips (links) und Tweezers (rechts).<sup>66</sup>

Dimethylenverbrückte Strukturen (**Abbildung 8**, links) werden als Clips bezeichnet, da sie ihr Substrat im Hohlraum „einklemmen“. Die Pinzetten weisen keine parallele Ausrichtung der aromatischen Seiteneinheiten auf, wodurch sie eine geringe Abweichung von *Whitlocks* Konzept aufweisen. Sie ähneln in ihrer Struktur hingegen einem Makrozyklus, wodurch nicht nur eine planare Wechselwirkung zum Substrat möglich ist, sondern diese viel mehr als einkapselt

betrachtet werden können. Hierdurch ist Interaktion von Substraten durch das gesamte Atomgerüst der Pinzetten möglich.<sup>61</sup>

*Klärner* und seine Mitarbeiter untersuchten ihre molekularen Pinzetten hinsichtlich ihrer Bindung und Einschluss erstmals gegenüber kleineren aromatischen Gastmolekülen wie 1,4-Dicyanobenzol und 1,4-Benzochinon.<sup>69</sup> Später erweiterten sie ihre Forschung hinsichtlich aliphatischer und aromatischer kationischer Substratmoleküle, wie Dibutylammoniumtertrafluoroborat. Zur Untersuchung letzterer führten sie <sup>1</sup>H-NMR Experimente durch. Auf Grund von Löslichkeitsproblemen der Substrate wurden die Untersuchungen nur mit den besser löslichen Ammoniumsalzen der Substrate in CDCl<sub>3</sub> durchgeführt. Dieses Experiment zeigt eine starke Hochfeldverschiebung der  $\alpha$ -Protonen des Dibutylammoniumtertrafluoroborat nach Zugabe der molekularen Pinzette. Anhand der Signalerschiebungen konnten *Klärner et al.* zeigen, dass die Alkylkette wie ein Faden durch den Hohlraum der Pinzette gezogen wurde und das Stickstoffatom des Ammoniumions durch Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung zentral fixiert ist (Abbildung 9).<sup>70</sup>



**Abbildung 9:** Darstellung von Alkylkette-Tweezer-Komplex. Die Alkylketten werden wie ein Faden durch den Hohlraum der Pinzette 9a gezogen und halten das Stickstoffatom des Ammoniumions in der zentralen Position. Die Alkylkette wird durch mehrfache Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen die vorherrschen fixiert.<sup>70</sup>

Die experimentellen Daten belegen, dass der Kohlenwasserstoff-Tweezer aufgrund seiner elektronischen und topologischen Eigenschaften kationische Substrate in organischen Medien über moderate nicht-kovalente Wechselwirkungen selektiv binden kann. Diese Entdeckung der Bindung von kationischen Alkyl-Substraten im Inneren dieser neuartigen molekularen Pinzette war eine essenzielle Entdeckung für die Weiterentwicklung. So können im Hinblick auf biomedizinische Anwendungen zwar Substrate ähnlich zu den synthetischen gebunden werden, dennoch beschränkt sich die bisherige Anwendung auf organische Lösungsmittel. So entwickelte *Klärner* in Zusammenarbeit mit seinem Nachfolger *Schrader* wasserlösliche molekulare Pinzetten zur biologischen Anwendung. Durch Einführung polarer und ionischer funktioneller

Gruppen an die zentrale Spacer-Einheit (des tweezers von Abbildung 8) wurde zum einen die Wasserlöslichkeit und zum anderen die Bindungsselektivität verbessert.<sup>71</sup> Hierfür wurde die molekulare Pinzette symmetrisch mit Phosphonat-, Phosphat-, Sulfat-, oder O-Methylencarboxylat-Gruppen versehen.<sup>71, 72</sup> Auch hier zeigten sich Ammoniumgruppen als bevorzugte Gäste der wasserlöslichen Pinzetten. Speziell die Aminosäuren Lysin mit ihrer Ammoniumgruppe und Arginin mit ihrer Guanidiniumgruppe zeigten hohe Affinitäten. Besonders der Komplex aus Phosphat-funktionalisierter Pinzette und Lysin überzeugte mit seinen Affinitäten mit einer Assoziationskonstante von  $K_a \approx 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .<sup>71, 72</sup> Durch NMR-Spektroskopie wurde ersichtlich, dass die jeweiligen Alkylketten ebenfalls durch die Kavität der Pinzette gefädelt vorliegen. Dadurch ist eine zusätzliche Salzbindung zwischen Ammonium/Guanidinium und dem Phosphat-Anion möglich, wodurch die Selektivität erhöht wird. Durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) konnte die Reversibilität des Bindungsereignis festgestellt werden. So kann das Gastmolekül durch dipolare, aprotische Lösungsmittel, wie Dimethylsulfoxid (DMSO), aus der Kavität verdrängt werden.<sup>58, 71, 72</sup> Bereits 2005 konnte *Fokkens et al.* in einem Experiment mit der Phosphonat-Pinzette geschützte Peptide in Wasser erkennen. Dieser Ergebnisse führten zu Annahme, dass molekulare Pinzetten in Peptidgerüsten eingebaute Lysine und Arginine erkennen und binden können, wodurch sie als praktisches supramolekulares Werkzeug für biologische Ziele dienen können.<sup>71</sup>

2018 folgt durch *Heid et al.* eine neue Generation molekularer Pinzetten. Diese sind asymmetrisch und besitzen eine zusätzliche funktionelle Gruppe, wodurch eine weitere Erkennungseinheit angebracht werden kann.<sup>73</sup> Durch funktionelle Einheiten kann das Repertoire verschiedener spezifischer künstlicher Erkennungseinheiten erweitert werden. Dadurch können sowohl Spezifitäten als auch Affinitäten hinsichtlich biologischer Ziele verbessert werden, was in Bezug auf die Erforschung biologischer Funktionen und Prozessen unerlässlich ist. Die erste von *Schrader et al.* entworfene asymmetrische funktionelle Monobutinyldiphosphat-Pinzette besitzt demnach eine Alkin-Funktionalität (Abbildung 10). Diese Einheit kann in einer Kupferkatalysierten Klick-Reaktion mit einer weiteren Erkennungseinheit, wie einer Azid-funktionalisierten Peptidsequenz umgesetzt werden. In Kapitel 1.4.1 wird näher darauf eingegangen, wie *Meiners* und *Hadrović* diese Kombination zur Inhibierung einer PPI nutzen.<sup>74</sup>

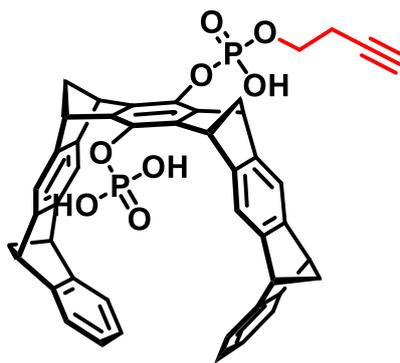


Abbildung 10: Asymmetrische funktionelle Monobutynylphosphatmonophosphat-Pinzette.<sup>73</sup>

### 1.3 Multivalente Liganden

Die Wirts-Gast-Chemie spielt oft eine entscheidende Rolle für die Wechselwirkung zwischen biomolekularen Spezies. Einfache Systeme, wie Kronenether werden benutzt, um bestimmte Eigenschaften der natürlichen biologischen Interaktion zu modulieren, geben aber allein keinen Einblick in die komplizierten Prozesse, die z. B. bei der Wechselwirkung zwischen Proteinen auftreten.<sup>75</sup> Denn die Natur benutzt häufig das Konzept der Multivalenz, in welchem Proteine multimere Architekturen ausbilden.<sup>76</sup> Hierbei kommt es zur Interaktion mehrerer Liganden einer Verbindung mit mehreren Epitopen eines Rezeptors.<sup>77</sup> Es ist ein Mittel zur Kompensation schwacher einzelner Wechselwirkungen durch mehrerer kooperativer Bindungsereignisse.<sup>78</sup> Denn durch Multivalenz kann die funktionelle Avidität, Bindungsaffinität und Selektivität zwischen den interagierenden Partnern drastisch erhöht werden.<sup>77, 79</sup> Multivalente Bindungen sind daher wesentlich widerstandsfähiger, beispielsweise gegen Scherkräfte, als einzelne Bindungen zwischen der gleichen Anzahl monovalenter Liganden.<sup>79, 80</sup> Durch die sequenzielle Dissoziation einzelner Bindungen ist die multivalente Wechselwirkung auch vollständig reversibel und spiegelt damit den dynamischen Charakter physiologischer Wechselwirkungen wider.<sup>81</sup> Das Phänomen der Multivalenz steuert demnach eine Vielzahl an biologischen Prozessen, deren Manipulation mit künstlichen Liganden vielversprechende Auswirkungen bezüglich Therapeutika hat und weiter haben könnte.<sup>75</sup>

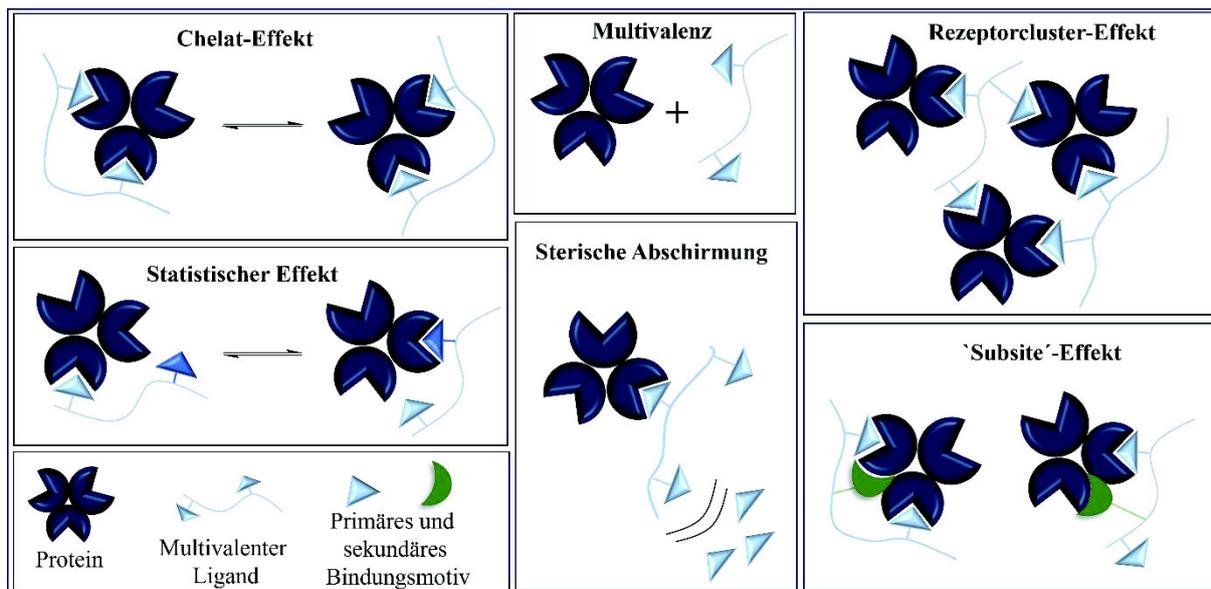
### 1.3.1 Prinzipien der Multivalenz

1998 schlugen *Whitesides et al.* zur Charakterisierung einen Verstärkungsfaktor  $\beta$  vor. Er wird aus dem Verhältnis der Bindungskonstante eines multivalenten Liganden zur Bindungskonstante eines monovalenten Liganden gebildet (Gleichung 1).<sup>82</sup>

$$\beta = \frac{K_{multi}}{K_{mono}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Dieser Faktor gibt somit den Anstieg der Bindungsavidität/-affinität eines multivalenten Bindungsereignisses wieder. Wie sehr die Affinität durch multivalente Interaktionen erhöht werden kann, wiesen erstmals *Ashwell et al.* nach. In ihrem Experiment zeigten sie, dass durch vierfache Erhöhung der präsentierten Galaktose Reste die Affinität zum korrespondierenden Protein um das 10000 fache erhöht wurde.<sup>83, 84</sup> Letztendlich stellt sich die Frage, was der Zunahme der Bindungsstärke zugrunde liegt. Es werden verschiedene Effekte diskutiert, welche die Bindungsverstärkung hervorrufen können. Hierzu zählt der Chelateffekt, sterische Abschirmung, der statistische Effekt, sogenannte Subsite Bindung und der Clustereffekt (Abbildung 11).

Der Chelateffekt, als Prinzip, wie er in der klassischen Chemie seit langer Zeit bekannt ist, kann auch hier als bindungsverstärkender Modi verstanden werden. Grundlegend ist der Entropiegewinn als Ursache für die Affinitätssteigerung anzuführen. Durch die Koordination der Liganden and das zentrale Metall werden Wassermoleküle der Hydratationsschale substituiert. Während bei monovalenten Liganden sich die Anzahl der Liganden und der verdrängten Wassermolekülen deckt, so dass die Anzahl an beweglichen Teilchen in Lösung unverändert bleiben, so kommt es bei der Koordination eines multivalenten Liganden zur Verdrängung mehrerer Wassermoleküle, was in einem Entropiegewinn resultiert.<sup>85</sup> Auch bei einem Protein-Ligand-Komplex kommt es zum Entropiegewinn. So ist bei einer bereits bestehenden primären Bindung, die Wahrscheinlichkeit einer weiteren, durch den bereits beglichenen Translations- und Rotationsentropischen Verlust der ersten Bindung, erhöht.<sup>82,86</sup> Dies gilt ebenso, für einen zuvor abgelösten Liganden, solange das multivalente Gerüst noch immer am Rezeptor gebunden ist.<sup>82</sup>



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Effekte, die bei einer multivalenten Präsentation von Liganden und Rezeptoren auftreten und zur Erhöhung der Bindungsavidität führen. Dargestellt ist die Statistische Effekt, bei der der gebundene Ligand durch einen anderen Liganden ersetzt wird, weil sie sich in der Nähe befinden. Der Chelat-Effekt zeigt die Bindung von zwei Liganden, die auf demselben Gerüst präsentiert werden, an denselben Rezeptor. Unter Rezeptorcluster-Effekt ist die Bindung von mehr als einem Rezeptor an die Liganden auf einem Gerüst zu verstehen. Sterische Abschirmung ist die Abstoßung zwischen den Rückgraten und ungebundenen Liganden, die die Verdrängung der gebundenen Liganden durch einen ungebundenen Liganden verhindert. Beim Subsite-Effekt bindet ein weiterer Ligand zusätzlich an einer anderen „Seite“ des Rezeptors.<sup>87, 88</sup>

Dem intramolekularen Chelat-Effekt steht der intermolekulare Rezeptorcluster-Effekt gegenüber. Bei dieser Art der Aggregation bindet ein multivalenter Ligand an mehrere verschiedenen Rezeptoren (Abbildung 11). In diesem Fall kann die Steigerung der Affinität durch die aus der Quervernetzung resultierende Stabilität erklärt werden.<sup>89</sup>

Der „Subsite“-Effekt stellt eine Art von Chelat-Effekt dar. Hierbei kommt es zur Hö-  
hung der Affinität durch zusätzliche Bindung eines Ligand außerhalb der Erkennungsdomäne  
oder an einer sekundären Bindungsstelle.<sup>90</sup>

Des Weiteren kann noch ein statistischer Effekt aufgeführt werden. Dieser Effekt ist auf  
das kinetische Verhalten eines multivalenten Liganden zurückzuführen und beruht auf dem  
Wechsel zwischen Assoziation, Dissoziation und Reassoziaton. Häufig liegt dieser Effekt zu  
Grunde, wenn die Verbindungen zwischen den bindenden Einheiten des multivalenten Ligan-  
den zu kurz sind um eine Chelatbildung zu erzielen. Off-Raten multivalenter Liganden sind im  
Vergleich zu deren von monovalenten Liganden verlangsamt. So kommt es zu einer hohen lo-  
kalen Konzentration und folglich zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Bindungsbildung,  
wodurch die Bindungsaffinität steigt.<sup>86</sup>

Als letztes ist die sterische Abschirmung oder sterische Stabilisierung zu nennen. Bei diesem Effekt beruht die Affinitätssteigerung auf der sterischen Abschirmung kompetitiver Moleküle durch nicht-bindende Einheiten oder das Grundgerüst der multivalenten Liganden, die im Gegensatz zu monovalenten Liganden in Größe und Volumen überlegen sind. Somit können größere Bereiche um die Bindungsstelle abgeschirmt und das System stabilisiert werden.<sup>89</sup> Dieser Mechanismus kommt besonders bei der Hemmung des Zugangs von Bakterien oder der Inhibierung von Protein-Protein Interaktionen zu tragen.

Obwohl bisher noch nicht gänzlich geklärt ist, welcher dieser multivalenten Bindungsmodi stattfindet, ob einige gleichzeitig auftreten oder Bindungsmodi bevorzugt werden, konnte das Konzept der Multivalenz in der Biochemie bereits erfolgreich eingesetzt werden. Ein besonders breit erforschtes Gebiet ist das der Kohlenhydrat-Lektin Wechselwirkungen.<sup>84, 91, 92</sup> Hierfür werden synthetische Kohlenhydratanaloga, sogenannte Glykomimetika, verwendet um die zu Grunde legenden Wechselwirkungen zu erforschen und Therapeutika zu entwickeln.<sup>79, 84, 85, 82</sup>

### 1.3.2 Multivalente Gerüststrukturen

Damit multivalente Liganden als Inhibitoren oder Effektoren in biologischen Prozessen wirken können, ist die Wahl eines geeigneten Gerüsts zur Präsentation der bindenden Einheiten entscheidend über den Erfolg und das Auftreten der zuvor in Kapitel 1.3.1 beschriebenen Effekte.<sup>88</sup> Das Grundgerüst und die Verbindung zwischen den bindenden Ligandmotiven bestimmen bereits viele Ligandenmerkmale.<sup>93</sup> So können je nach Anforderung verschiedener Parameter, wie die Größe, die Form, die Valenz zwischen den Bindungsmotiven, die Dichte derer zueinander oder auch Flexibilität für eine optimale Bindung angepasst werden. Daneben spielt sowohl die Toxizität als auch die Wasserlöslichkeit für die Biokompatibilität eine wichtige Rolle, da die Inhibitoren/Effektoren/Modulatoren für die behandelnden Organismen nicht schädlich sein dürfen.<sup>94</sup>

Die Flexibilität der Abstandseinheiten ist beispielsweise ein Parameter, welcher genauer berücksichtigt werden muss. Die Bindung eines multivalenten Systems an einen Rezeptor geht mit der Abnahme der Konformationsentropie einher. Dieser Effekt wird durch hochflexible Linker zusätzlich verstärkt, da bei der Komplexbildung mehr Konformationsfreiheitsgrade aufgegeben werden. *Whitesides et al.* zeigten jedoch, dass dieser Effekt nicht so drastisch ist, wie in früheren Berechnungen angegeben.<sup>76, 95</sup> Hierbei wurde ein Modellsystem aus einem kovalent an sein Zielprotein gebundenen Liganden, getrennt durch einen Oligo(ethylenglykol)-Linker,

verwendet. Die geringste Bindungsaffinität resultierte aus dem System ohne Linker, da der Ligandenabstand daher zu kurz ist, um das Gegenstück zu erreichen. Zwei Linkermoleküle stellten sich als die günstigste Anzahl heraus. Die interessanteste Erkenntnis war jedoch, dass selbst bei einer Vergrößerung des Abstandes auf 20 Einheiten, sich die Assoziationskonstante nur um den Faktor acht verringerte. Grund hierfür ist die verbleibende Konformationsbeweglichkeit, trotz gebundenen Zustands. Folglich sind flexible Linker, die etwas länger als benötigt sind am besten geeignet, um hohe Bindungsaffinitäten zu erzielen.<sup>96</sup>

Die optimale Wahl des Gerüsts für die Entwicklung einer multivalenten Architektur ist herausfordernd. So liegen die Erkennungseinheiten auf dendritischen Gerüsten starrer und exponierter vor als auf flexiblen, linearen, welche die Affinität der Liganden mitbestimmt. Somit kann die optimale Ligandendichte für ein bestimmtes Ziel für verschiedene Gerüste unterschiedlich sein.<sup>94</sup> Je nach Eigenschaften und Zweck der Liganden können die jeweiligen Bindungsmotive auf verschiedene lineare, verzweigte oder kugelförmige Gerüste präsentiert werden. Die Auswahl geht über natürliche, halbsynthetische und synthetische Gerüste für die Präsentation der Erkennungseinheiten. Eine Vielzahl geht von beispielsweise Proteinen, Nanopartikeln, sphärischen Displays wie Liposome, Dendrimere oder auch Polymere aus, um Substrat-Rezeptor-Wechselwirkungen zu untersuchen.<sup>77</sup>

Dendrimere haben Vorteile, die sowohl Polymere als auch kleine Moleküle besitzen. Sie sind makromolekulare verzweigte Verbindungen um einen inneren Kern. Sie bilden definierte homogene Strukturen, sind monodispers und sind gleichzeitig in der Lage eine Vielzahl an Bindungseinheiten zu präsentieren. Besonders als Glykodendrimere finden eine breite Anwendung bei der Untersuchung von zellulären Vorgängen.<sup>90,97</sup>

Liposome sind kugelförmige aus Lipiddoppelschicht gebildete Systeme. Durch ihren wässrigen Kern sind sie besonders als Wirkstoffträger von Interesse. Die Anzahl der Erkennungseinheiten wird durch das Verhältnis von Lipiden mit und Lipide ohne Erkennungseinheiten gesteuert. Nachteilig an diesen Systemen ist die schwierige Vorhersage der genauen Anordnung der Erkennungseinheiten durch die Diffusion der einzelnen Lipidkomponenten.

Nanopartikel sind ein weiteres Beispiel der sphärischen Systeme. Die Monolayer- und Mixed-Monolayer-geschützten Cluster besitzen einen metallischen oder Halbleiterkern mit einer selbstorganisierten organischen Schale.<sup>98</sup> Vorteil dieser Gerüste ist die Anpassung der Größe und Form sowie die interessanten elektronischen und spektrophotometrischen Eigenschaften je nach Kern.<sup>82,97,99</sup> Ein prominentes Beispiel eines solchen Nanopartikel-Liganden Systems ist die Hemmung des Influenza-Virus durch Sialinsäure-funktionalisierten Gold-

Nanopartikel.<sup>100</sup> Da Gold-Nanopartikel eine hohe Biokompatibilität aufweisen, weshalb sie häufig Anwendung in biologischen Systemen finden.

Auch Polymere kommen häufig als Gerüste für die multivalente Präsentation in Frage. Die Synthese mittels radikalischer Polymerisationen bietet zwar einen größeren Spielraum bzgl. Reaktionsbedingungen oder auch Monomerfunktionalitäten, allerdings liefert diese Methode heterogene Verbindungen mit hohen Polydispersitäten. Polymerisationsmethoden wie die Kontrollierte nitroxide-mediated radical polymerization (NMRP), atom transfer radical polymerization (ATRP), reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) oder ring-opening metathesis polymerization (ROMP) liefern mehr Kontrolle hinsichtlich Molekulargewicht und Molekulargewichtverteilung als auch für die Sequenz und Endgruppenfunktionalitäten.<sup>101</sup> Durch ihre systematisch veränderbaren Eigenschaften, wie Größe und Valenz eignen sich Polymere hervorragend als Sonden für multivalente Bindungsvorgänge.<sup>90</sup>

Eine weitere Klasse, die polymere Eigenschaften mit sich bringen, sind die der definierten linearen Gerüste. Durch ihre verkürzte Struktur lassen sie sich kontrollierter synthetisieren und bilden homogene Gerüste.<sup>102</sup>

Die genaue Kontrolle über die Synthese und die resultierenden Strukturen ist besonders für die Korrelation von Struktur und Wechselwirkung erforderlich, um biologische Prozesse weiterhin genauer untersuchen und verstehen zu können. Denn obwohl bereits eine Reihe multivalenter Inhibitoren unter anderem auch gegen arzneimittelresistente Krankheitserreger hervorgebracht wurden, gibt es noch keine Arzneimittel mit diesem Konzept.<sup>103, 104</sup>

### 1.3.3 Präzisionsmakromoleküle als multivalente Gerüststrukturen

Gerade hinsichtlich der Beobachtung und Steuerung zellulärer Prozesse werden für eine effiziente und selektive Interaktion multivalente genau definierte Strukturen benötigt.<sup>105</sup> Ein vielversprechender Ansatz für künstliche definierte Gerüste liefert die Festphasensynthese. Dieser kombinatorische Ansatz liefert eine hohe Kontrolle über Parameter, wie Sequenz, Länge oder Positionierung der Bindungseinheiten.

#### Festphasensynthese -

1963 war es *R. B. Merrifield*, der die schwierige und zeitaufwendige Peptidsynthese von *E. Fischer* mit seinem Konzept der Festphasensynthese (solid phase synthesis, SPS) von sequenzdefinierten Peptiden zu einer bis heute genutzten Vorgehensweise gemacht hat.<sup>106-108</sup> Hierfür nutzte *Merrifield* ein unlösliches Trägermaterial, eine feste Phase, an welchem das zu bildende

Peptid, durch schrittweises koppeln von Aminosäuren, assembliert wird. Auf diese Weise konnte die Peptidsynthese sowohl beschleunigt als auch vereinfacht werden. Aufwendige Isolations- und Aufarbeitungsschritte fallen nun durch die Möglichkeit, das Harz mit Peptid durch Waschen und Filtration von überschüssigen Reagenzien, Abbauprodukten oder unerwünschten Nebenprodukten zu befreien, weg. Hierdurch können höhere Umsatzraten als bisher erreicht werden. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung der festen Phase zeigt sich in der Verwendung von hohen Überschüssen an Reagenzien, wodurch neben hohen Umsätzen auch hohe Reinheiten erzielt werden können.<sup>109, 110</sup>

Bei der Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS) wird das Peptid vom C- zum N-Terminus am festen Trägermaterial aufgebaut. Letzteres ist mit einer funktionellen Gruppe versehen, welches es ermöglicht die erste Aminosäure über ihren Carboxylrest kovalent zu binden.<sup>108, 111</sup> Sowohl reaktive Seitenkettenfunktionalitäten als auch die Amino-Endgruppen der jeweiligen Aminosäuren sind zur Verhinderung von Nebenreaktionen geschützt. Für eine erfolgreiche Anbringung von aufeinanderfolgenden Aminosäuren muss folglich die Schutzgruppe des terminalen Amins selektiv abgespalten werden, bevor ein weiteres Monomer assembliert werden kann. Die Bindungsbildung zwischen bereits angebrachter und anzubringender Aminosäure wird unter geeigneten Reaktionsbedingungen und mit Hilfe von Aktivierungsreagenzien durchgeführt. Ein Reaktionszyklus besteht somit aus Abspaltung der Schutzgruppe, Auswaschen ungewünschter Reaktionsprodukte und Kupplung eines Monomers. Erst nach Erreichen der gewünschten Sequenz wird in einem finalen Schritt die kovalente Bindung zwischen Oligomer und der festen Phase gespalten, um das angestrebte Produkt zu erhalten. Das Prinzip der Festphasensynthese ist besonders für die Herstellung kleiner Peptidsequenzen geeignet. Bei der Synthese größerer Sequenzen kann es durch unvollständige Kupplungen und Aggregationen von nicht ausgewaschenen und gesammelten Verunreinigungen zu einer Verringerung der Diffusion kommen, wodurch Zugang zur Oberfläche der Festphase oder Kettenenden blockiert wird.<sup>111, 112</sup>

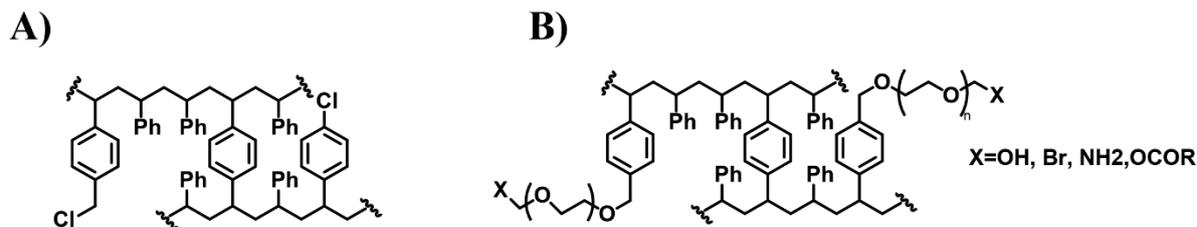
### Die Feste Phase

Die Wahl der Festen Phase, auch Harz genannt, legt den Grundstein der Synthese. Es selbst muss zum einen stabil und inert gegenüber dem verwendeten Lösungsmittel, Kupplungsreagenzien und Monomeren sein.<sup>113, 114</sup> Zum anderen werden durch das Harz Reaktionsbedingungen wie Lösungsmittel, Abspaltbedingungen und auch die resultierende Endfunktionalität festgelegt. Eine der ersten Harze ist ein mit Divinylbenzol quervernetztes Polystyrol Copolymer. Aufgrund ihrer Verfügbarkeit, ihrer niedrigen Kosten und ihrer Stabilität werden sie bis heute

gerne genutzt.<sup>115, 116</sup> Polystyrolharze zeigen in unpolaren Lösungsmitteln wie Dichlormethan (DCM) ein starkes Quellverhalten und können bis auf das sechsfache Volumen wachsen, wodurch ihr Zustand in Lösung eher als Gel angesehen werden kann.<sup>117</sup> Gute Quelleigenschaften und somit eine ausreichende Porengröße sind unabdingbar für eine erfolgreiche Synthese, da sich die reaktiven Kettenenden hauptsächlich im Inneren der Polystyrolkugelchen befinden. Nur so wird eine ausreichende Diffusion der Reaktanden zum Harz und diesen Enden möglich, um ein Kettenwachstum zu gewährleisten.<sup>109, 118, 119</sup> Dennoch neigten längere Sequenzen oder Sequenzen mit hydrophoben Aminosäuren zur Aggregation auf dem ebenfalls hydrophoben Polystyrolharz, wodurch die Zugänglichkeit zu den reaktiven Enden nicht mehr gewährleistet war, was in Abbruchsequenzen resultierte.<sup>108</sup> Um diese Problematik zu umgehen wurden polare Harze entwickelt, mit welchen bessere Resultate erzielt werden konnten.<sup>120, 121</sup> So wurde sowohl eine hohe mechanische Stabilität als auch gutes Solvationsverhalten durch die Copolymerisation von Ethylenoxid und Polystyrol oder durch das Aufpfropfen von PEG-Ketten auf Polystyrolkugelchen, wie bei den Tenta Gel® Harz, erreicht.<sup>122, 123</sup> Der verlängerte Linker dieser Harze führt zu einer besseren Erreichbarkeit der reaktiven Enden auch außerhalb des Harzes und erlaubt zusätzlich die Verwendung polarer Lösungsmittel.<sup>124, 125</sup>

### Der Linker

Linker sind erforderliche Funktionalisierungen, um Monomere an einem Harz assemblieren zu können. Diese Linkermoleküle bilden über die gesamte Synthese hinweg eine stabile Bindung zwischen Harz und Polymerkette. Darüber hinaus werden sowohl die Abspaltbedingungen als auch die resultierende Endgruppe des Produktes durch den Linker festgelegt. Das von *Merrifield* gewählte Harz weist einen Chloromethyllinker, der nur unter stark sauren Bedingungen mit Fluorwasserstoffsäure gespalten werden kann. Chlorotriptyllinker beispielsweise, die weit verbreitete Anwendung in der Festphasensynthese finden, können hingegen unter weit mildereren Bedingungen (1% Trifluoressigsäure, TFA) bereits abgespalten werden. Als Endgruppe resultiert in diesem Fall eine Carbonsäure. Dem gegenüber stehen Harze mit Linkern, die in Amidendgruppen resultieren. Ein prominenter Vertreter ist das Rink Amid Harz. Mittlerweile gibt es neben einer Vielzahl an Harzen ebenso eine Vielzahl an Linkern, die je nach Bedarf für die Synthese gewählt werden können.<sup>119, 121</sup>



**Abbildung 12:** Schematisch dargestellte Ausschnitte des klassischen Merrifield Harzes (A), links) und des TentaGel® Harzes (B), rechts).

### Die Schutzgruppen

Neben ständigen Verbesserungen der Festphase wurden auch Schutzgruppen für reaktive Funktionalitäten an End- und Seitengruppen der Monomere untersucht. Denn Schutzgruppen sind unerlässlich für eine vielversprechende Synthese um unerwünschte Bindungen und Nebenreaktionen zu verhindern.<sup>126</sup> Die zu Beginn von *Merrifield* verwendete Carboxybenzylgruppe zum Schutz der N-Termini der Aminosäuren erwies sich als ungeeignet. Der Abspaltvorgang mit Bromwasserstoff in Essigsäure führte nicht nur zur Abspaltung der Schutzgruppe sondern auch zu Peptidverlust durch teilweises Spalten der Esterbindung zwischen Peptid und Harz.<sup>107</sup> Später wechselte er zur tert-butyloxycarbonyl- (Boc) Schutzgruppe für das Aminende und schützte Seitenkettenfunktionalitäten mit benzylbasierten Derivaten. Auf Grund der unterschiedlichen Säureempfindlichkeit der beiden Schutzgruppen wurde eine Unterscheidung zwischen Abspaltung an der Hauptkette oder Abspaltung an der Seitenkette möglich. Auch der Verlust an Peptid konnte auf ein Minimum reduziert werden.<sup>108</sup> Die Strategie von orthogonalen Schutzgruppen wird bis heute genutzt. Die häufigste zum Einsatz kommende Schutzgruppe für terminale Amine ist die basenlabile Fmoc- (Fluorenylmethoxycarbonyl) Schutzgruppe, die in sogenannten Standard-Fmoc-Kupplungsprotokolle zum Einsatz kommt (Abbildung 13).<sup>127</sup> Diese kann bereits mit 20%iger Piperidinlösung in DMF abgespalten werden, wodurch die Kombination mit den häufig verwendeten säurelabilen Linkermolekülen unproblematisch ist.<sup>128, 129</sup> Ein weiterer Vorteil ist die Überwachung der Effizienz der Entschützung mittels UV-Absorption oder Fluoreszenzspektroskopie. Das reaktive Spaltprodukt Dibenzolfulven wird durch die Aminbase abgefangen und bildet ein unreaktives Addukt, welches die Quantifizierung des Reaktionsverlaufs ermöglicht (Abbildung 13).<sup>127, 128</sup>

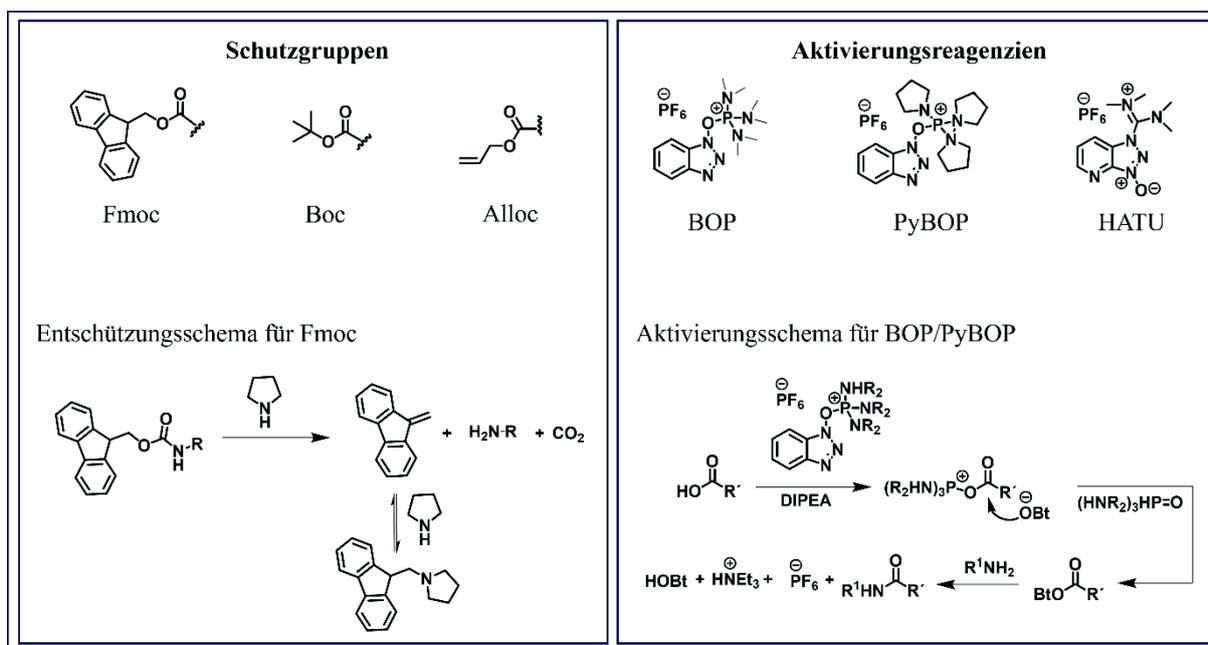
Für die Schützung der Seitenketten kommen verschiedene Schutzgruppen in Frage. Unterteilen lassen sich diese in basenlabile, säurelabile und eine Gruppe an Schutzgruppen, die sich häufig katalytisch entfernen lassen.<sup>126</sup> Je nach verwendeter Kupplungs- und Synthesestrategie sollten

auch hier die Schutzgruppen richtig gewählt werden. So sind tert-Butyloxycarbonyl (Boc) und Trityl (Trt) Beispiele säurerlabile Gruppen, die unter Verwendung der Fmoc-Kupplungsprotokolle stabil sind, jedoch bei Bedarf leicht abgespalten werden können.<sup>126, 130, 131, 132</sup> Beide können gleichzeitig mit der finalen Abspaltung des Produkts unter sauren Bedingungen entfernt werden. Während Boc auch unter milderer Bedingung spezifisch ohne Beeinträchtigung anderer Bindungen abgespalten werden kann wird Trityl in der Regel nur bei finalen Abspaltungen des Produkts konzertiert abgespalten.<sup>126, 133</sup> Die Alloc-Schutzgruppe (Abbildung 13) ist ein Vertreter der katalytisch abspaltbaren Schutzgruppen. Die Allyleinheit wird durch einen Palladium (0) Katalysator auf ein Nucleophil oder sogenannten Scavenger in Gegenwart einer Protonenquelle übertragen.<sup>134, 135</sup>

### Die Amid Kupplung / Das Aktivierungsreagenz

Die Amidbindungsbildung ist die zentrale Reaktion bei der Assemblierung von Aminosäuren. Hierfür ist bei moderaten Reaktionstemperaturen zwingend eine Aktivierung der Carboxygruppe notwendig. Durch den Zusatz des Aktivierungsreagenz wird die Carboxygruppe so in ein Acylhalogenide, Acylazide, Acylimidazole, Anhydride oder Ester umgewandelt.<sup>136, 137</sup> Das ursprünglich von *Merrifield* gewählte Reagenz Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) findet bis heute Anwendung in der SPPS und führt zur Bildung eines O-Acylisoharnstoff-Mischanhydrids, welches im darauffolgenden Schritt leicht vom Amin angegriffen werden kann. Als treibende Kraft wirkt hier die Bildung eines Harnstoffnebenprodukts.<sup>138, 139</sup> Um die Bildung einer unreaktiven N-Acylharnstoff Komponente zu hindern und Racemisierung zu unterbinden wurden Additive hinzugegeben, die als Nucleophile fungieren und die Bildung des Aktivesters beschleunigen. Als ein häufiger Vertreter dieser additive gilt HOBt (1-Hydroxybenzotriazol).<sup>138</sup> *Castro et al.* boten mit ihrem Castro Reagenz, BOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium) eine neue Alternative.<sup>140</sup> Das auf HOBt basierende Phosphoniumsalz ist der erste Vertreter der gleichnamigen Aktivierungsreagenzklasse. Da Phosphoniumsalze mit der Carboxygruppe reagierten, ist zur Bildung des OBt-Esters eine nicht-nucleophile Base wie DIPEA (Diisopropylethylamin) oder NMM (N-Methylmorpholin) notwendig. Die treibende Kraft dieser Reaktion ist Bildung der Phosphoniumoxid-Spezies (Abbildung 13). Da bei der Verwendung von BOP es zur Bildung der stark toxischen Verbindung HMPA (Hexamethylphosphoramid) kommt, wurden im Laufe der Zeit weitere Phosphonium Salze wie PyBOP® (Benzotriazol-1-yloxy-tripyrrolidino-phosphonium) entwickelt.<sup>141, 142</sup> Im Gegensatz zu den zuvor aufgeführten Carbodiimiden entstehen bei Reagenzien auf Phosphoniumbasis bei

der Reaktion mit Aminen keine Guanidinium-Nebenprodukte.<sup>143</sup> Dennoch kann auch hier zur Beschleunigung des Prozess und zur Unterbindung von Epimerisierung, bei vorhandenen Stereozentren, HOBt oder das nicht explosive OxymaPure (Ethyl cyanoglyoxalat-2-oxim) als Additive zugegeben werden.<sup>141</sup> Neben Phosphoniumverbindungen sind Guanidiniumsalze die am häufigsten verwendeten Kupplungsreagenzien in der Peptidsynthese.<sup>143</sup> Als erster Vertreter dieser Klasse gilt HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat), welches anfangs fälschlicherweise in der Uroniumform postuliert wurde. HATU als weiterer Stellvertreter basiert auf dem HOBt ähnlichem HOAt (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol) und zeigt eine höhere Reaktivität als sein Analogon HBTU, weshalb es häufig für sterisch anspruchsvolle Aminosäuren verwendet wird.<sup>144, 145</sup> Ursächlich scheint hierfür ein Nachbargruppeneffekt zu sein.<sup>146</sup> Mechanistisch ähnelt der Kupplungsmechanismus dem der Carbodiimide. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass der O-Acylisoharnstoff durch Substitution des Hydroxylamins gebildet wird, welches darauffolgend als Nukleophil wirkt, wodurch der entsprechende aktive Ester entsteht. Wie bei den Phosphonium-Reagenzien ist eine Base zur Deprotonierung der Carboxylverbindung erforderlich. Durch Verwendung effektiver Kupplungsreagenzien konnte die Peptidsynthese umfangreich erweiterte werden. Und auch die Erforschung neuerer, grünerer Reagenzien schreitet fort um die Peptidsynthese stetig voran zu treiben.<sup>139, 143</sup>



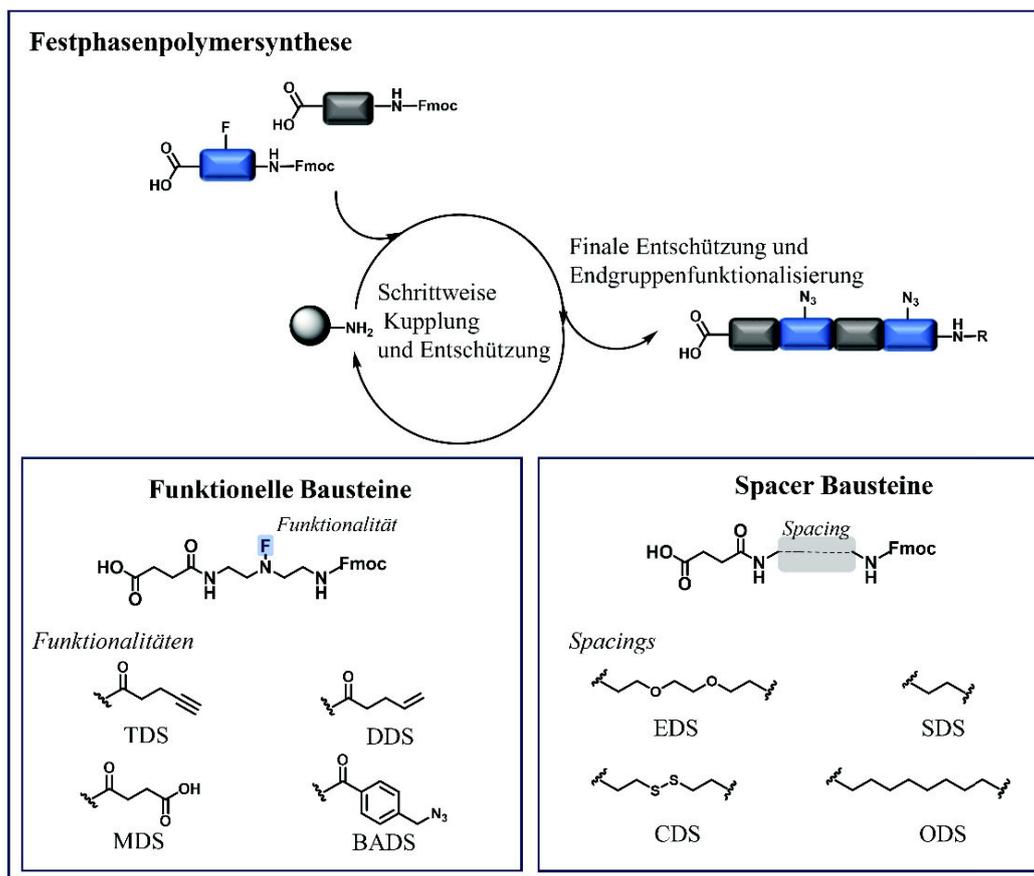
**Abbildung 13:** Exemplarische Darstellung an Schutzgruppen und dem Entschützungsschema mit Fmoc (links) sowie Aktivierungsreagenzien und dem Aktivierungsschema für BOP/PyBOP (rechts).

### Solid Phase Polymer Synthesis – SPPoS

Durch die Pionierarbeit von *Merrifield* und der weiteren intensiven Forschung auf dem Gebiet der Festphasensynthese konnte der Bereich der Peptidchemie rasch und umfangreich wachsen. Es wurde schnell klar, dass sich diese Methode auf andere mehrstufige Reaktionen und Monomere wie kleine organische Moleküle<sup>147</sup>, Oligonukleotide<sup>148</sup> oder Oligosaccharide<sup>149</sup> ausweiten lässt. Für die Industrie ist die Festphasensynthese insbesondere als voll automatisierbarer Prozess besonders attraktiv.<sup>128</sup>

Unter Verwendung des allgemeinen Prinzips der Peptidfestphasensynthese nach *Merrifield* etablierten *Hartmann et al.* einen Ansatz zum Erhalt von sequenzdefinierten, monodispersen Oligo(amidoaminen)/ Makromolekülen.<sup>150, 151</sup> In diesem Ansatz bilden maßgefertigte Bausteine, die nach dem Vorbild der Aminosäuren mit einer Carboxylgruppe und einem Fmoc-geschützten Amin funktionalisiert sind, die monomeren Einheiten. Diese lassen sich, wie zuvor beschrieben in einem Stufenwachstumsprozess an einer festen Phase aneinander assemblieren. Auch eine weitere Seitenkettenfunktionalisierung mit beispielsweise Kohlenhydraten, ist mit dieser Methode möglich, wodurch eine Vielfalt an Makromolekülen zugänglich wird.<sup>150-152</sup>

Um die Bausteine in der SPPoS verwenden zu können ist neben der Bifunktionalität eine kostengünstige Synthese unerlässlich, da große Überschüsse für vollständige Kupplungsschritte benötigt werden. Auch die Reinheit spielt eine große Rolle, da bereits ein Baustein mit 95 % Reinheit bei einer dreimaligen Kupplung die theoretische maximale Reinheit auf 86 % reduziert. Um die finalen Makromoleküle hinsichtlich ihrer Eigenschaften und Funktionalitäten individuell gestalten zu können, entwickelten *Hartmann et al.* in den letzten Jahren eine Bibliothek an maßgeschneiderten Bausteinen (**Abbildung 14**).<sup>153, 154 155-157</sup>



**Abbildung 14:** Beispielhafte, schematische Darstellung der Festphasenpolymersynthese von präzisions Makromolekülen sowie exemplarische Darstellung von funktionellen Bausteinen (links) und spacer Bausteinen (rechts). Als funktionelle Bausteine sind TDS<sup>151</sup>, DDS<sup>155</sup>, MDS<sup>158</sup> und BADS<sup>154</sup> genannt. Als spacer Bausteine sind EDS<sup>151</sup>, SDS<sup>159</sup>, CDS<sup>151</sup> und ODS<sup>160</sup> genannt.

Diese Bibliothek lässt sich in zwei Gruppen an Bausteinen aufteilen: Sogenannte *spacer* Bausteine und *funktionelle* Bausteine. Funktionelle Bausteine besitzen eine Seitenkette mit einer funktionellen Einheit, die die Anknüpfung von Erkennungseinheiten an das Rückgrat über verschiedene Ligationsmethoden, wie z.B. Bildung von Amidbindungen, Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition oder Thiolen-Klickreaktionen, je nach Gruppe die sie tragen, ermöglicht.<sup>153, 155, 156</sup> Spacer Bausteine werden verwendet, um beispielsweise den Abstand der Liganden, die Gesamtkonturlänge oder die Hydrophilie anzupassen. Ausgehend von einem zentralen Di-/Triamin werden die jeweiligen Bausteine in mehrstufigen Syntheseschritten in ihre finale Aminstruktur mit freier Carboxy- und Fmoc-geschütztem Amin, überführt. Der wohl am häufigsten verwendete Spacer Baustein ist EDS (engl.: ethylene glycol – diamine – succinic acid) Ethylendioxy Succinamid), der eine flexible und amphiphile Diethylenglykol-Einheit enthält.<sup>161</sup> ODS (engl.: (octyl – diamine – succinic acid) Octyldiamin Succinic acid) als weiteres Beispiel ist das hydrophobe Gegenstück zu EDS.<sup>157</sup> Bei den funktionellen Bausteinen reicht die

Auswahl von TDS mit Alkinfunktionalität, über DDS mit Alkenfunktionalität, BADS mit Azidfunktionalität bis hin zu MDS mit Carbonsäurefunktionalität und weiteren.<sup>151, 153, 154, 158, 162</sup>

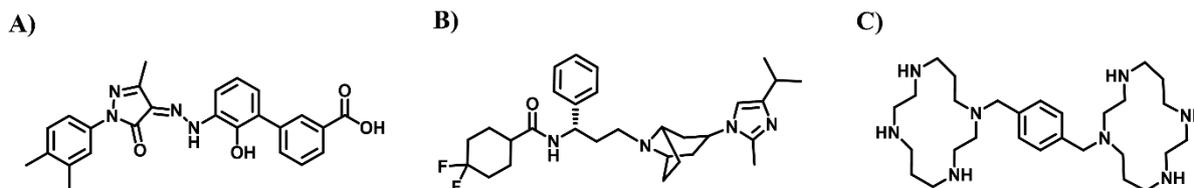
Durch die Vielfalt an Bausteinen und die Möglichkeit diese auf verschiedensten Arten zu kombinieren, bietet die SPPoS einen hervorragenden Ansatz für maßgeschneiderte Verbindungen in Hinblick auf Funktionalitäten, Sequenz, Anzahl und Position von Liganden, molekulares Gewicht, Gesamtlänge und auch Hydrophilie. Dies kommt besonders zum Tragen, wenn es um die Untersuchung von Wechselwirkungen von Biomolekülen und Aufklärung der zu Grunde liegenden Mechanismen oder das Eingreifen in diese geht. Denn durch definierte Strukturen ist eine verbesserte Korrelation von Struktur und Wechselwirkung möglich. So konnte die Gruppe von *Hartmann* bereits erfolgreich an ihren Studien zu Glykomimetika den Einfluss verschiedener Parameter auf die resultierenden Eigenschaften als Glykomimetikum zeigen.<sup>154, 156, 163, 164</sup>

## 1.4 Supramolekulare Chemie/Liganden für Wechselwirkung an Proteinen

Dadurch, dass supramolekulare Protein-Ligand- und Protein-Protein-Wechselwirkungen wichtige zelluläre Prozesse regulieren, steht die Erforschung dieser schon seit längerer Zeit im Fokus der Wissenschaft. Da viele dieser Prozesse in Zusammenhang mit Krankheiten wie z.B. einige Formen von Krebs stehen, gilt die Aufklärung und Modulation dieser Prozesse als vielversprechende Strategie für die Entwicklung von potenten neuen Wirkstoffen. Grundlegend hierfür ist die selektive und verstärkte Erkennung von Proteineinheiten und die Modulation der PPI durch synthetische supramolekulare Wirtsmoleküle die in dieser Arbeit als Liganden bezeichnet werden.<sup>51, 165-168</sup> Schätzungsweise gibt es ~ 130.000 – 650.000 Arten von PP-Interaktionen im menschlichen Interaktom, von denen bis heute bei weitem noch nicht alle gänzlich aufgeklärt sind.<sup>169, 170</sup> Obwohl immer mehr Wissen über PPIs gesammelt wird, ist die Entwicklung künstlicher PPI Inhibitoren und insbesondere von Stabilisatoren nach wie vor eine große Herausforderung.<sup>171, 172</sup> Der bisherige klassische Ansatz zur Entdeckung kleiner Wirkstoffmoleküle konzentrieren sich auf gut definierte Ligandbindungsstellen, wie sie bei Enzymen oder Ionenkanäle zu finden sind, mit denen kleine Moleküle interagieren können.<sup>173</sup> Hingegen, wie bereits in Kapitel 1.2.2 erläutert finden Protein-Protein-Interaktionen oft an großen, flachen, hydrophoben Grenzflächen der jeweiligen Proteine statt. Demnach spielt die Komplementarität der jeweiligen Oberflächenbereiche und somit die molekulare Beschaffenheit, die Größe, Polarität und die Zugänglichkeit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung potenter Binder.<sup>169, 174, 175</sup>

Das Auftreten von „Hot-Spots“ begünstigt die Entwicklung von Medikamenten, denn um in PPIs einzugreifen ist es oft ausreichend, wenn kleine Moleküle an diesen Stellen ansetzen.<sup>176</sup> Darüber hinaus sind Hot-Spots ein wichtiger Bestandteil bei verschiedenen Ansätzen zur Suche nach PPI Modulatoren. So konnten durch die gezielte Ausrichtung auf Hot Spots Wirkstoffe entdeckt werden, die PPI direkt modulieren.<sup>177</sup> Durch zelluläre Screening Test mittels der STATs-technologie (signal transducers and activators of transcription), wurde Eltrombopag, ein nicht-peptid-Agonisten des menschlichen Thrombopoietin (TPO), gefunden und entwickelt (Abbildung 15). Es ist der erste niedermolekulare PPI-Modulator auf dem Markt und wird für die Behandlung der seltenen Krankheit idiopathische thrombozytopenische Purpura zugelassen. Auch für die Behandlung der Thrombozytenzahl bei Patienten mit Leberzirrhose auf Grund von Hepatitis C wird es derzeit klinischen Studien getestet.<sup>178-180</sup> Ebenso wurden auch Erfolge bei Verbindungen die als allosterische Modulatoren fungieren verzeichnet. So wurde beispielsweise durch das Hochdurchsatzscreening, welches ein bewährtes Mittel zur Entdeckung von

klassischer Wirkstoffe ist, das Anti-HIV/AIDS-Medikament Maraviroc, ein allosterischer PPI-Inhibitor des CCR5-Chemokinrezeptors entdeckt (Abbildung 15).<sup>176, 181, 182</sup> Ein weiteres Beispiel ist Plerixafor. Plerixafor ist ein partieller Antagonist des Chemokinrezeptors CXCR4 und ein allosterischer Agonist von CXCR7. Zusammen mit G-CSF wird es zur Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen im peripheren Blut für die autologe Transplantation bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom und multiplem Myelom eingesetzt.<sup>183, 184</sup>



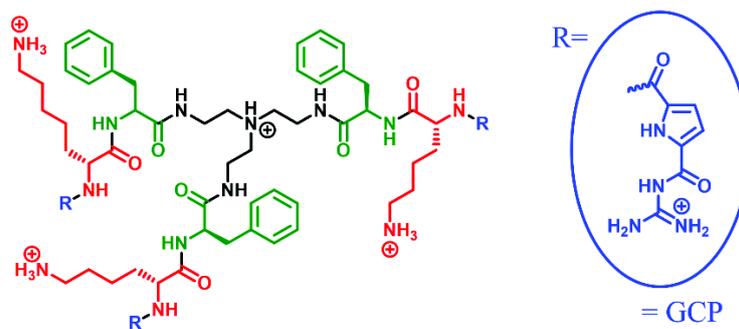
**Abbildung 15:** Abbildungen der Strukturformeln der bereits in der Medizin als Medikament eingesetzten niedermolekularen Molekülen. A) Eltrombopag, ein nicht-peptidischer Agonist des menschlichen Thrombopoietin (TPO), B) Maraviroc, ein niedermolekularer allosterischer CCR5-Chemokin-Antagonist, C) Plerixafor, ein partieller Antagonist des Chemokinrezeptors CXCR4 und ein allosterischer Agonist von CXCR7.<sup>177</sup>

Klassische Methoden der medizinischen Chemie stoßen bei der Entwicklung geeigneter PPI-Modulatoren an ihre Grenzen. Denn es fehlen natürliche niedermolekulare Liganden, die als Referenz dienen können. Auf Grund dessen, der Beschaffenheit der PPI und dem Fakt, dass PPI-Modulatoren im Allgemeinen ein höheres molekulares Gewicht ( $> 400$  Da) als die typischen niedermolekularen Wirkstoffe (200-500 Da) haben, sind Screening-Methoden begrenzt, da die auf herkömmliche Wirkstoffbibliotheken ausgelegt sind.<sup>176, 185, 186</sup> So kann als weiterer geeigneter Ansatz zur Entwicklung der Modulatoren der strukturbasierte Ansatz gewählt werden. Hierbei werden Aminosäuren und Peptidsequenzen identifiziert, die maßgeblich für die PPI sind und die Grundlage für das rationale Design der Modulatoren liefern. Zu diesem Ansatz zählt die molekulare Modellierung<sup>187, 188</sup> oder das Peptid-Engineering<sup>189, 185</sup>. Synthetische Liganden, die die einzigartigen Eigenschaften der Aminosäure- oder Peptiderkennung besitzen bieten eine ideale Grundlage. Naphthylidin-Konjugate der Calixarene<sup>57</sup> beispielsweise erkennen je nach zusätzlich gebundenem Metallion Cystein, Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.<sup>190, 191</sup> Mit einem, am oberen Rand, mit Peptidschleifen versehenen Calix[5]aren konnte bereits die Interaktion von Cytochrom c und seinem Partnerprotein Cytochrom-c-Peroxidase blockiert werden.<sup>192</sup> Die molekulare Pinzette CLR01<sup>58</sup> beispielsweise erkennt selektiv Lysin- und Arginin-Seitenketten.<sup>72</sup> Sie konnte bereits erfolgreich bei der Hemmung der Selbstassemblierung multipler Amyloide eingesetzt werden.<sup>193, 194</sup> Ebenso konnte eine Wirksamkeit in Tierversuchen gegenüber der Alzheimer- und Parkinsonkrankheit verzeichnet werden. Dennoch sind

Selektivität und Affinität nicht immer ausreichend. Gerüste mit zunehmender Größe und Flexibilität können größere Proteinoberflächen abdecken. Die Wirtsmoleküle werden hierzu auf Gerüsten wie Dendrimeren oder Polymere in einer oft multivalenten Weise präsentiert.<sup>152, 195</sup>

Auch die Kombination von Ligand und zusätzlichen Erkennungseinheiten wurden eingesetzt um Selektivität und Affinität zu steigern.<sup>74</sup>

So entdeckten *Gigante et al.* bei der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem Protein 14-3-3 und dem Östrogenrezeptor alpha (ERα) eine Struktur mit trivalenter Präsentation des Oxoanion bindenden GCP-Motivs. Diese wies zum einen eine Selektivität gegenüber dieser PPI auf. Zum anderen konnte ein Stabilisierungseffekt dieser PPI beobachtet werden. Die grundlegende Affinität wies einen 200fachen größeren Wert auf, als die der 14-3-37-ERα Wechselwirkung selbst.<sup>196, 197</sup>

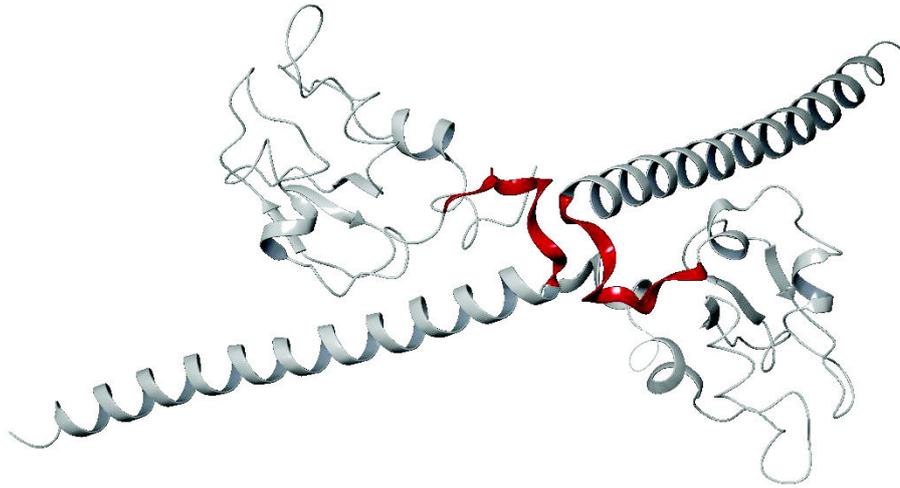


**Abbildung 16:** Chemische Struktur des supramolekularen Stabilisators mit trivalenter Präsentation des bindenden GCP-Motivs.<sup>197</sup>

#### 1.4.1 Supramolekulare Liganden zur Bindung an Survivin

Neben der Vielzahl an interessanten Proteinen zur Erforschung von PPIs steht vor allem das Krebs-relevante Protein Survivin, wie in Abbildung 17 zu sehen, im Fokus des Collaborative Research Center (CRC) 1093. In der Biologie wird es auch mit der Abkürzung BIRC5 benannt, was für den baculoviralen Apoptoseinhibitor Repeat (BIR), der 5 enthält, steht. Folglich gehört es zu den Apoptose-Inhibitor-Proteinen und ist mit 142 Aminosäuren und 16,5 kDa das kleinste dieser Familie.<sup>198</sup> Durch seine Funktion als Hemmer des kontrollierten Zelltods und der daraus resultierenden Förderung des Zellüberlebens leitet sich auch der Name *survivin ab.* Darüber hinaus ist es als Teil des chromosomalen Passagierkomplexes (CPC) zusätzlich an der mitotischen Regulation beteiligt und fördert die Zellproliferation.<sup>199</sup> Diese beiden Funktionen und der Fakt, dass es in normalen erwachsenen Gewebe meist nicht vorhanden ist, aber in fast allen

Krebsarten überreguliert ist, machen Survivin zu einem äußerst attraktiven Ziel der Krebsforschung.<sup>200, 201</sup> Die Überexpression bzw. die durch Survivin ausgelöste Zellresistenz gegen Apoptose wird darüber hinaus mit einer Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie in Verbindung gebracht.<sup>202-204</sup>

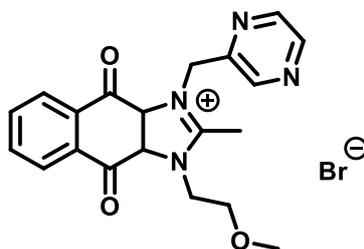


**Abbildung 17:** Kristallstruktur des Survivin-Dimers (PDB ID: 1F3H). Beide Monomere sind in grau eingefärbt. Das NES ist rot eingefärbt.

Survivin wird in diversen Zellorganellen wie Zytoplasma, Zellkern oder Mitochondrien exprimiert.<sup>205</sup> So ist das nukleare Survivin für die Regulation der Zellteilung verantwortlich, während das zytoplasmatische Survivin für die Hinderung der Apoptose zuständig ist.<sup>206</sup>

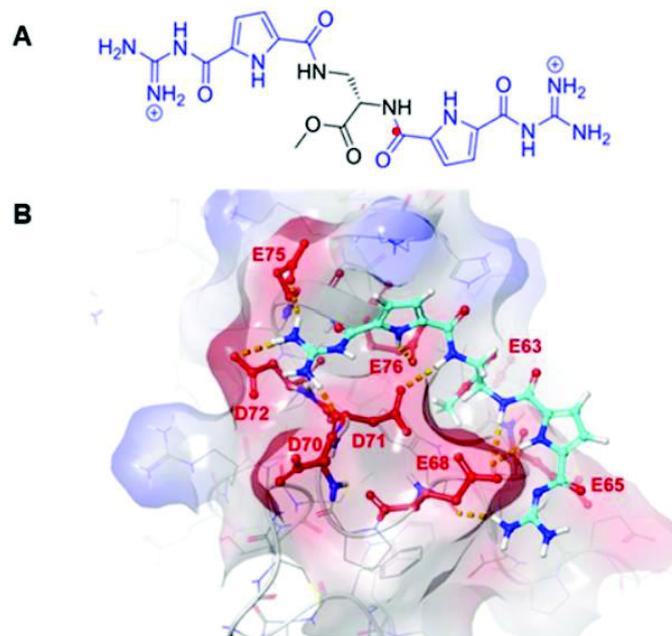
Wie aus der Kristallstruktur ersichtlich liegt das Protein in seiner kristallisierten Form in einer fadenförmigen Dimerstruktur vor (Abbildung 17).<sup>206</sup> Es besitzt neben einer verlängerten C-terminalen Helix, die sich über elf Helixwindungen erstreckt, eine N-terminale BIR-Domäne.<sup>207</sup> Letztere besteht aus einem dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, das von vier kleineren  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Es ist besonders charakteristisch für Proteine, die den programmierten Zelltod (Apoptose) stören.<sup>205, 207</sup> Daneben besitzt Survivin ein leucinreiches Nukleares Exportsignal (NES), das zwischen BIR-Domäne und  $\alpha$ -Helix angeordnet ist und zum Teil mit der Dimerisierungsschnittstelle überlappt. Die einzelnen Strukturelemente von Survivin sind essenziell für seine Funktion. Denn es selbst besitzt keine enzymatische Aktivität. Seine Doppelfunktion erfüllt es durch die PPI mit anderen Proteinen.<sup>205, 208</sup> Während beispielsweise für die Regulation der Zellteilung die zentrale Linker-Region (Aminosäuren 90-102) als Interaktionsstelle mit den Partnerproteinen aus dem CPC ausgemacht wurde, so ist der zu Grunde liegende Mechanismus für die Regulation der Zellteilung noch nicht gänzlich aufgeklärt.<sup>205, 209, 210</sup> Das NES ist eine der wichtigsten Regionen des Proteins, denn sie ist die Interaktionsstelle für den

Exportrezeptor CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1).<sup>207</sup> Die Bedeutung der NES Region wurde durch Versuche mit einer Mutante, bei welcher zwei wichtige hydrophobe Reste (L96, L98) durch Alanin ersetzt wurden, deutlich. Die Bindung zwischen Survivin und CRM1 wurde geschwächt, wodurch ebenso der Kernexport gehemmt wurde, was schließlich in einem Verlust der Apoptosehemmung resultiert.<sup>211</sup> Seit dem ist die Störung der Expression bzw. Störung der Funktion von Survivin im Fokus der Krebsforschung.<sup>198, 208</sup> Zum einen wurde an Verbindungen zur CRM1 Inhibierung geforscht.<sup>212-215</sup> Zum andern wurde auch dem Ansatz, besonders zur Inhibierung von Survivin und somit den Export ins Zytoplasma zu unterbinden, mit niedermolekularen Verbindungen nachgegangen. Hierfür wurden diverse potenzielle Inhibitoren verschiedener PPIs von Survivin sowohl in-vitro als auch in-vivo untersucht.<sup>216-219</sup> YM-155 ist eine der ersten und bekanntesten niedermolekularen Verbindungen. Es hemmt selektiv die Transkription und Expression von Survivin in Tumorzelllinien. Es konnte bereits eine offene Phase-I-Studie durchlaufen und befindet sich derzeit in Phase II bei Patienten mit Melanom und Prostatakrebs.<sup>220</sup> Dennoch weist es eine nicht ausreichende Aktivität als Einzelwirkstoff auf, ebenso wie das Oligonukleotid LY2181308.<sup>221</sup>



**Abbildung 18:** Darstellung der Struktur der niedermolekularen Verbindung YM-155.<sup>220</sup>

Trotz der verschiedenen Strategien und Wirkungsmechanismus, die auf die Expression von Survivin abzielen, konnte noch kein effizienter Wirkstoff gefunden werden. Die Herausforderung besteht vor allem darin, dass Survivins Funktionen durch mehrere PPI ausgelöst werden, die wie in Kapitel 1.4 erwähnt, die Erforschung der Funktionsweisen und das Eingreifen mit geeigneten Modulatoren in eine PPI erschwert.<sup>205</sup> Vallet et al. verfolgten den Ansatz multivalenter Präsentation von einem supramolekularen Erkennungsmotiv, für die Modulation der Survivin Histone-H3 Interaktion.<sup>222</sup> Mit Hilfe des Oxoanion bindenden GCP-Motiven konnten sie in diese erfolgreich mit ihrer Struktur L1 eingreifen, die an die H3 Bindungsstelle von Survivin bindet.<sup>222</sup>



**Abbildung 19:** A) Chemische Struktur des supramolekularen GCP-Liganden 1 (L1) mit zwei Guanidiniumcarboxylpyrrol-Gruppen (blau). B) Docking von L1 (türkis) an die Histone H3-Bindestelle von Survivin. Die gepunkteten Linien (orange) zeigen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein. Interaktionsstellen des Liganden sind rot hervorgehoben.<sup>222</sup>

Auch in zellulärer Umgebung wurde die Interaktion erfolgreich unterbunden. *Aschmann et al.* erweiterten die Multivalenz und konnten kürzlich auf der Grundlage von Strukturanalyse und computergestützter Modellierung zwei Strukturen mit multivalenter Präsentation des GCP-Motivs identifizieren, die selektiv verschiedene PPIs des Proteins Survivin mit jeweiligem Partnerprotein hemmen.<sup>195</sup> Eine dieser PPIs ist die CRM1-Survivin Interaktion. Diese bleibt weiterhin ein geeignetes Ziel der Modulation, da diese PPI sowohl für die mitotischen als auch für die anti-apoptischen Funktionen von Survivin wesentlich ist.<sup>223</sup>

Diese PPI steuerten auch *Meiners et al.* an. Sie wählten eine Lysin-spezifisch bindende molekulare Pinzette als supramolekulares Bindungsmotiv, die darüber hinaus mit einer zum NES komplementären Peptidkette, versehen ist. Mit diesem Liganden erreichten sie eine Bindung mikromolarer Affinität an die überlappende Dimerschnittstelle und konnten folglich die Interaktion von Survivin und seinem Interaktionspartner CRM1 beeinträchtigen. Auch wenn es ihnen gelungen ist, das NES abzuschirmen, so ist der Effekt auf die Bindungsaffinität nur moderat.<sup>74</sup>

Trotz dieser wünschenswerten Eigenschaften ist noch kein spezifischer Wirkstoff gegen Survivin in die Klinik gelangt. Ein Teil der Herausforderung könnte darin bestehen, dass Survivin

keine eigene enzymatische Aktivität besitzt, sondern die meisten seiner Aufgaben in Verbindung mit anderen Proteinen erfüllt. Es kann am besten als Anpassungsprotein beschrieben werden kann, das mit seinen Partnern interagiert oder sie an ihren Bestimmungsort transportiert. Folglich liegt der Fokus auf einer potenten Inhibierung der Interaktion von Survivin und seinen Partnerproteinen. In dieser Arbeit wird die Inhibierung der Survivin-CRM1 Interaktion als vielversprechender Ansatz verfolgt.



## 2 MOTIVATION UND ZIELE

Das Feld der Supramolekulare Chemie hat in den letzten Jahren vermehrt an Aufmerksamkeit gewonnen. Seit der Verleihung des Nobelpreises an *Lehn, Pedersen* und *Cram* vor 30 Jahren hat sich die Supramolekulare Chemie stetig weiterentwickelt: Von gut verstandenen, nicht kovalenten Wechselwirkungen, über künstliche Rezeptormoleküle und solche die durch Selbstassemblierung komplexe Strukturen ausbilden. Doch gerade hinsichtlich des Bereiches der chemischen Biologie, welche sich unter anderem mit der Entdeckung von neuen, potenten Arzneimitteln beschäftigt, stellt die Supramolekulare Chemie im Hinblick der Untersuchung und Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkung ein wichtiges Forschungsgebiet dar.<sup>51, 222</sup> Mit ihr gilt es ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden Prinzipien der Erkennung und funktionellen Modulation von Proteinen zu erforschen und zu verstehen. Gerade zur Beeinflussung des oft komplexen Zusammenspiels von Proteinen werden neuartige chemische Werkzeuge notwendig. Hierfür haben in den letzten Jahren synthetische supramolekulare Wirtsmoleküle zur selektiven Erkennung an Bedeutung gewonnen.<sup>167, 224</sup> Die Entwicklung künstlicher Protein-Protein-Inhibitoren und insbesondere Stabilisatoren ist jedoch nach wie vor eine der großen Herausforderungen. Die Interaktion von Proteinen findet an relativ großen, oft flachen Proteinoberflächen statt, sodass Ligandensysteme in flachen Rillen oder großen Poren auf der Proteinoberfläche binden müssen, anstatt wie herkömmliche Enzyminhibitoren, die dem Schlüssel-Schloss Prinzip folgen und in tiefen Taschen an aktiven Stellen des Proteins binden.

Zu Realisierung dieser Anforderungen werden maßgeschneiderte komplementäre Erkennungsmotive von zunehmender Größe und Flexibilität für spezifische Epitope auf Proteinoberflächen entwickelt. Oft basieren sie auf makrozyklischen supramolekularen Liganden, angebracht auf mehrarmigen Gerüsten, wie Dendrimeren, Markomolekülen, oder Nanopartikeln. Denn die supramolekularen Liganden allein weisen zwar eine Selektivität gegenüber ihren Zielstrukturen auf, diese ist aber für eine spezifische Bindung an Proteineineptiopen nicht ausreichend.<sup>168, 224, 225</sup>

Ein vielversprechendes supramolekulares Bindungsmotiv stellen sogenannte molekulare Pinzetten, auch Tweezer genannt, dar. Die in dieser Arbeit verwendete Pinzette von *Schrader et al.*<sup>71, 73</sup> besitzt einen makrozyklischen Hohlraum aus Norbonylverbrückten Phenylringen. Durch ihren elektronenreichen Innenraum und den zusätzlichen Phosphatfunktionalitäten kann sie spezifisch Arginin- und Lysinseitenketten in seiner Kavität binden. Die molekulare Pinzette CLR01 konnte bereits positiv hinsichtlich der Auflösung toxischer Proteinaggregate bei der

Forschung neuer Wirkstoffe gegen Alzheimer getestet werden.<sup>71</sup> Der Nachteil dieses Liganden liegt jedoch in der Bindung aller zugänglichen Arginin- und Lysinseitenketten auf der Proteinoberfläche mit ähnlichen Affinitäten. Durch Einführung des asymmetrischen Monobutynyl-Tweezers ist die Anbringung einer weiteren Erkennungseinheit durch Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition möglich. In vorausgegangener Arbeit von *Meiners et al.* konnte auf diesem Weg ein potenter Peptid-Tweezer hergestellt werden. Das zusätzlich angebrachte Peptid, weist die komplementäre Sequenz für den Zielbereich, das NES, des Zielproteins Survivin auf. Durch die zusätzliche Erkennungseinheit konnte somit sowohl die Selektivität als auch die Affinität erhöht werden.<sup>74</sup>

Ein weiteres Werkzeug zur Erzeugung von Liganden-Systemen mit hohen Bindungsaffinitäten ist das Konzept der Multivalenz, wie es die Natur sich selbst zu Nutze macht. Da Wechselwirkungen zwischen einzelnen Liganden und Rezeptoren schwach ausgeprägt sind, wird durch eine simultane Bindung von einem multivalenten Liganden an einen oder mehrere spezifische Ziele diese Limitierung umgangen. Die Arbeit von *Höing et al.* veranschaulicht dieses Konzept durch die Verwendung multivalenter Tweezer-Konstrukte am Zielmolekül Taspase. Durch die Anbringung von bis zu fünf Tweezer-Molekülen an einem geeigneten Grundgerüst ist die gleichzeitige Bindung mehrerer Lysine/Arginine über die Proteinoberfläche hinweg möglich. Ebenso schaffen derart große Gerüste eine zusätzliche sterische Abschirmung anderer Interaktionspartner, das durch Kombination statistischer Effekte zu einer höheren Bindungswahrscheinlichkeit führt, wodurch das Konzept der Multivalenz erfolgreich gezeigt werden konnte.<sup>226</sup>

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen potenten Modulator für die Survivin-CRM1 Interaktion zu designen und synthetisieren. Da die wichtige Interaktionsstelle das NES bildet, soll an diese Position möglichst selektiv und mit einer hohen Affinität gebunden werden. Da mehrere Lysin-Seitenketten auf der Oberfläche für eine potenzielle Bindung frei zugänglich sind, kann der molekulare Tweezer als Bindungsmotiv dienen. Hierfür soll das Prinzip der Multivalenz zunutze gemacht werden, um die Bindungsaffinität und möglicherweise auch -selektivität zu steigern.

Um einen erfolgreichen Binder zu designen, muss dieser gewisse Anforderungen erfüllen, die von Survivin als Interaktionspartner vorgegeben werden. Hierfür wird zunächst die Oberflächenbeschaffenheit, die Topologie und die zugänglichen Lysine, sowie deren Abstände in der

Kristallstruktur des Proteins analysiert. Da Survivin in Lösung als Homodimer vorliegt, können durch Analyse der Kristallstruktur vier freie Lysine, die zur Bindung zur Verfügung stehen ausgemacht werden. Zwischen allen Lysinen lassen sich verschiedene Abstände ermitteln.<sup>227</sup>

Die von *Hartmann et al.* entwickelte Methode der Festphasenpolymersynthese (SPPoS), liefert einen geeigneten Ansatz zur Synthese eines flexiblen, maßgeschneiderten Gerüsts zur Anbringung des bindenden Motivs des molekularen Tweezers. Inspiriert von der Festphasenpeptidsynthese werden maßgeschneiderte Bausteine, die sich in funktionelle und platzhaltende Bausteine unterteilen, durch Peptidbindungsknüpfung aneinander assembliert. Diese Methode ermöglicht die genaue Einstellung der Gerüstparameter wie Valenz, Gesamtlänge, Hydrophilie oder Ligandenabstand.

Ziel ist es mit dieser Methode drei diazidofunktionalisierte, in der Gesamtlänge und im Ligandenabstand sich unterscheidende und für die Lysin-Abstände passende Makromoleküle zu synthetisieren. Durch Verwendung des Azid-funktionalisierten Bausteins, BADS, kann die Anbringung des durch die Gruppe von *Prof. Schrader* zur Verfügung gestellten Alkin-funktionalisierten molekularen Tweezer in einer Cu(I) vermittelten Cycloaddition durchgeführt werden. Anschließend soll zunächst in Zusammenarbeit mit verschiedenen Arbeitsgruppen der Universität Duisburg/Essen die Bindung und die Bindungsstärke an das Zielmolekül Survivin mittels NMR-Titration, ITC-Titration und SPR-Messungen untersucht werden. In einem Pull-Down Assay soll die Inhibitionsstärke der Liganden ermittelt werden. Da es bisher keinen SPR-Assay für Survivin gibt, muss dieser Assay als Teil der Arbeit etabliert werden.

Im weiteren Schritt soll die Multivalenz von einem divalenten System auf eine höhere Ebene gebacht werden. Dafür soll das divalente Makromolekül in Zusammenarbeit mit der Gruppe von *Prof. Epple* an ultrakleine Nanopartikel angebracht werden. Auch diese Nanopartikelkonstrukte werden dann auf ihre Bindung an Survivin mittels SPR-Messungen untersucht. Die Inhibitionsfähigkeit wird erneut mittels Pull-Down-Assay ermittelt.

Durch die Anbringung auf den ultrakleinen Goldnanopartikeln sollte ebenfalls die Zellaufnahmefähigkeit gegeben sein, der in einem Zellassay mit HeLa Zellen nachgegangen wird. Da hierfür eine Fluoreszenz Voraussetzung für die Sichtbarkeit ist, wird ebenfalls der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein mittels Festphasensynthese als abschließender Baustein eingebracht.

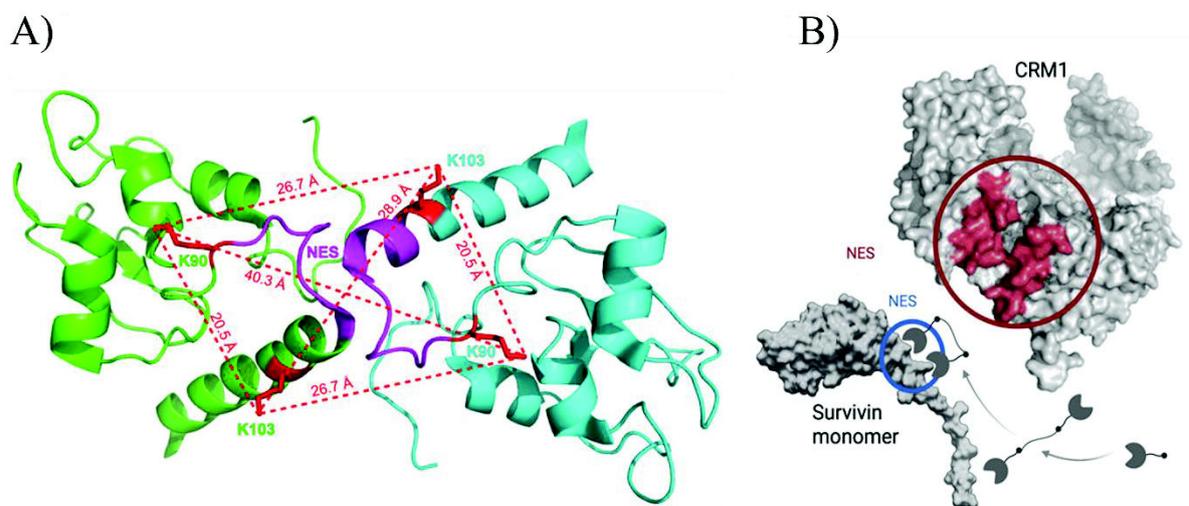
### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.1 Design und Synthese der divalenten Pinzettenmakromoleküle

Protein-Protein Interaktionen oder Protein-Ligand Interaktionen bilden eine wichtige Grundlage unseres Lebens. Durch ihre nichtkovalenten reversiblen Interaktionen regulieren sie zahllose Prozesse, wie Signaltransduktion oder Kommunikation. Einige dieser Prozesse stehen ebenfalls mit Krankheiten in Verbindung.<sup>177</sup> So auch die Interaktion von Survivin und seinen Interaktionspartnerproteinen, da diese für die Regulation der Zellproliferation und einer zytoprotektiven Funktion verantwortlich sind.<sup>228</sup> In fast allen Krebsarten ist es stark überreguliert, wodurch die Modulation dieser Interaktion ein vielversprechendes Ziel der Forschung hinsichtlich neuer Therapeutika darstellt. Eine Strategie besteht darin, den Transport von Survivin aus dem Zellkern zu stören, welches wiederum ein wichtiger Schritt für seine zytoprotektive Funktion für Krebszellen ist. Survivin wird über die Interaktion seines nuklearen Exportsignals (NES, 89VKKQFEELTL98) mit dem Exportrezeptor CRM1 aktiv aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert.<sup>229, 230</sup> Da CRM1-Inhibitoren nicht nur den Kernexport von Survivin unterbinden, sondern auch den intrazellulären Transport anderer Proteine wird der Ansatz eines auf Survivin zugeschnittenen Modulators verfolgt. Durch die Beschaffenheit der PP-Interaktionsflächen, die in der Regel flach sind und nur wenig Furchen und keine Bindungstaschen aufweisen ist die gezielte Modulation bis heute eine Herausforderung.<sup>165, 186</sup> Supramolekulare Bindungsmotive, wie die molekulare Phosphat Pinzette (CLR01) von *Schrader*, die selektiv Lysin- und Arginin-Seitenketten in seiner Kavität bindet (Lysin:  $K_a = 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ; Arginin:  $K_a = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) bieten einen neuen vielversprechenden Ansatz.<sup>71</sup> *Meiners et al.* kombinierten diese mit einer zum NES komplementären Peptidkette als weitere Erkennungseinheit und konnten zwar mitunter durch sterische Abschirmung die Survivin-CRM1-Interaktion inhibieren, dennoch wurde die Bindungsaffinität nur wenig gesteigert.<sup>74</sup>

Als geeignete Ankerpunkte stellten sich mit Hilfe von Computermodellierung und NMR-Titrations am Monomer von Survivin zwei Lysine (K90/K103), die das NES flankieren, heraus.<sup>74</sup> Die multivalente Präsentation der molekularen Pinzette auf Gerüsten mit zunehmender Größe und Flexibilität in dieser Arbeit erweitert den bisherigen Ansatz und liefert vielversprechende Effekte hinsichtlich Affinität durch das Prinzip der Multivalenz.<sup>231, 232</sup> Auf diesen Erkenntnissen basierend wurden die divalenten Tweezermakromoleküle (TM) dieser Arbeit entworfen.

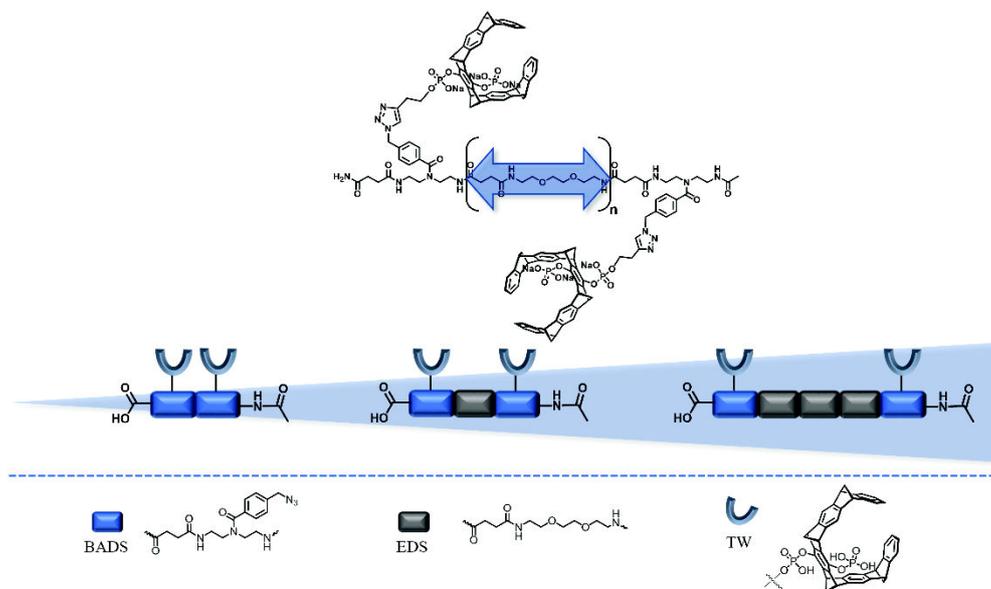
Survivin liegt in wässrigem Puffer als Homodimer vor, das bei Auftauchen natürlicher Bindungspartner auseinander diffundiert. Jedes Homomer besitzt die beiden NES flankierenden Lysine K90 und K103. Ausgehend davon können mittels divalenter Tweezermakromoleküle die beiden Lysinen K90 und K103 eines Homomers angesteuert werden. Ebenfalls ist es möglich die NES-Region in dimerer Form zu adressieren und das NES zu blockieren, da dieses zum Teil mit der Dimerisierungsschnittstelle überlappt (Abbildung 20).<sup>227</sup> In diesem Fall ist wie in Abbildung 20 zu sehen, die Verbrückung von K90 zu K90', K103-K103' oder K90-K103'/ K90'-K103 durch ein divalentes Tweezermakromolekül als angestrebtes Ziel zu verstehen.



**Abbildung 20:** A) Vereinfachte Darstellung des Survivin-Dimers und die daraus resultierenden Abstände der Lysinreste K90/K90' und K103/K103'. B) Schematische Darstellung von multivalenten Tweezer-Konstrukten (dunkelgrau), die die Bindung der NES-Region von Survivin (PDB1E31) (blauer Kreis) an die offene NES-Spalte (rot gefärbter Bereich/roter Kreis) des Exportrezeptors CRM1 (PDB3GJX) stören.<sup>1</sup> Darstellungen nicht maßstabsgetreu gezeichnet. Erstellt von Inesa Hadrović aus der Universität Duisburg-Essen.

Durch das Andocken der divalenten Strukturen wird neben einer erhöhten Inhibierungseffizienz auf Grund der durch multivalente Effekte ausgelöste verstärkte Bindung, auch die sterische Abschirmung der NES-Region erwartet. Durch Molecular Dynamics (MD) Simulationen, die von der Kooperationspartnerin Inesa Hadrović aus der Universität Duisburg-Essen durchgeführt wurden, lässt sich der Abstand zwischen K90 und K103 auf einem Monomer mit etwa 20 Å bemessen. Die Abstände der Lysine im Dimer sind wie zu erwarten größer und belaufen sich auf 40 Å (K90-K90'), 29 Å (K103-K103') bzw. 27 Å (K90-K103'/K90'-K103) (Abbildung 20). Um sowohl die kürzeste Distanz von 20 Å als auch die längste von 40 Å und um den Distanzbereich dazwischen abzudecken wurden drei Gerüste, die sich im Abstand der Pinzetten und somit ebenfalls in der Konturlänge unterscheiden zur divalenten Präsentation der Pinzetten gewählt. Ausgehend von der alkinfunktionalisierten Pinzette (Monobutinyldiphosphat

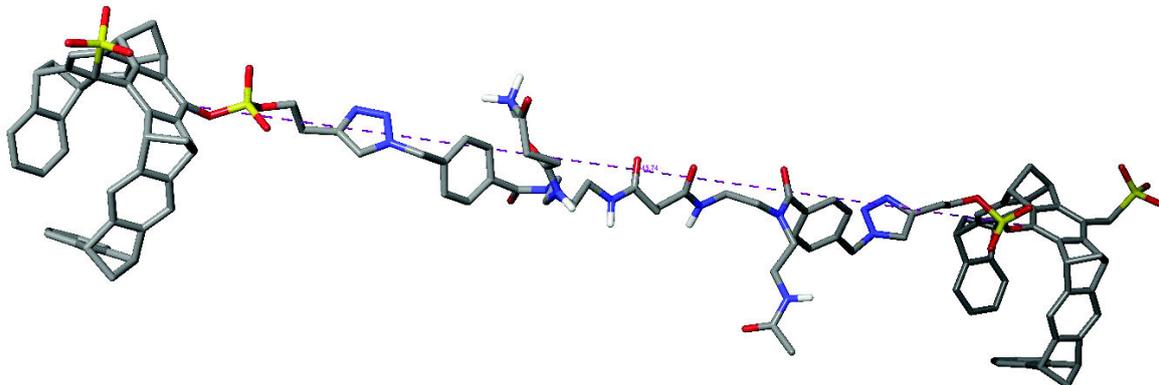
Tweezer), deren Verknüpfung mittels Kupfer katalysierte Azid-Alkin Huisgens Cycloaddition (CuAAC) in vorausgegangen Arbeiten mit weiteren Strukturelementen erfolgreich war,<sup>74, 233, 234</sup> basieren die verwendeten Makromoleküle, die als Grundgerüste fungieren auf flexiblen und azidhaltigen Einheiten/Bausteinen. Die Grundgerüste werden mittels Festphasenpolymersynthese synthetisiert, wodurch die genaue Positionierung der molekularen Pinzette möglich ist. Die einfachste und kürzeste Variante eines divalenten Konstruktes ist die, der Verwendung von zwei azidhaltigen Einheiten, die in dieser Arbeit zum finalen funktionalisierten Produkt Short-TM führt. Um den Abstand zwischen den Lysinerkennenden-Pinzetten zu erhöhen, wird EDS als flexible Einheit zwischen den Azid-tragenden Bausteinen eingefügt, wodurch das Pinzettenmakromolekül Medium-TM entsteht. Als dritte Variante wird der Abstand weiter vergrößert, sodass das Tweezermakromolekül Long-TM drei EDS-Einheiten enthält. Die drei Strukturen und ihre schematische Darstellung sind in folgender Abbildung dargestellt (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Darstellung einer Tweezermakromolekül-Struktur sowie schematische Darstellung aller drei sich in der Länge und im Interligandenabstand unterscheidenden Tweezermakromoleküle.<sup>1</sup>

Um die geometrischen Abmessungen dieser divalenten Pinzettenmakromolekül-Designs zu bestimmen und die Pinzettenabstände innerhalb der Strukturen mit den möglichen zu überbrückenden Lysin-Abständen in der NES-Region abzugleichen, wurden MD-Simulationen von der Kooperationspartnerin Inesa Hadrović aus der Universität Duisburg-Essen durchgeführt (Abbildung 22). Hierfür wurden drei designte divalenten Pinzettenmakromoleküle in gestreckter als auch in einer energetischen Senke modelliert. Die jeweiligen Werte sind **Tabelle 2** zu entnehmen. Als Referenzpunkt wurde das aromatische

Kohlenstoffatom am Phosphorester der Pinzetten verwendet. In gestreckter Variante liegt bereits das kürzeste Pinzettenmakromolekül über der maximal benötigten Länge von 40 Å.



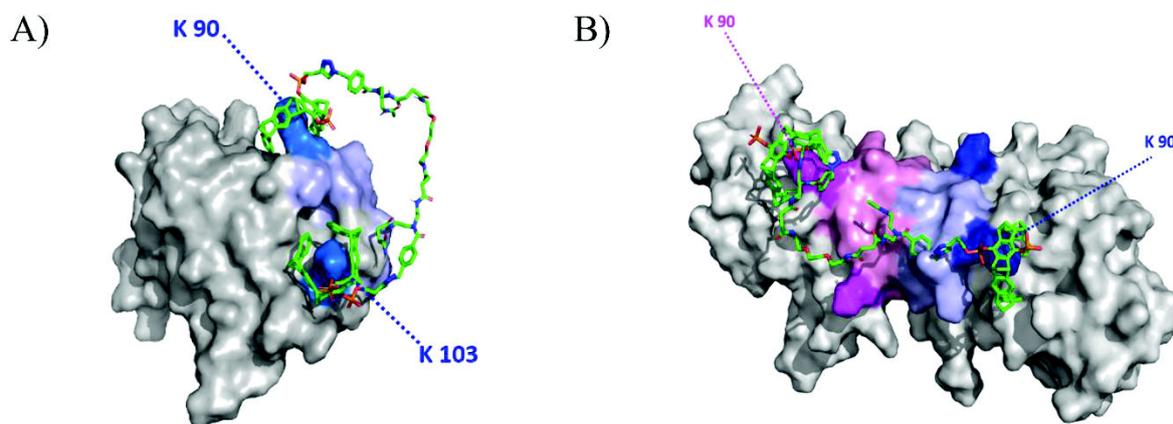
**Abbildung 22:** Darstellung des kürzesten Pinzettenmoleküls Short-TM in gestreckter Version (Erstellt mittels Schrödinger Maestro Software).

**Tabelle 2:** Pinzettenabstände der divalenten Pinzettenmakromoleküle. Die Abstände sind mittels MD-Simulation ermittelt.\*Jeweils erstes aromatisches C-Atom eines Tweezermoleküls.

	Short-TM	Medium-TM	Long-TM
	[Å]	[Å]	[Å]
TW Abstand* (MD) (gestreckte Konformation)	45,7	60,7	92,7
TW Abstand* (MD) (energetisch minimierte Konformation)	19,1	42,8	38,6

Der gestreckte Zustand jedoch bildet den realen Zustand nur bedingt ab, da diese Konformation energetisch ungünstig ist. Durch die Modellierung der Strukturen in einer energetisch minimierten Konformation ist eine deutliche Verringerung der Pinzettenabstände innerhalb der Moleküle zu sehen. Ursächlich sind hierfür sind mitunter die flexiblen Ethylenglykoleinheiten der EDS-Spacer-Bausteinen, die sich stärker ineinander verknäulen.<sup>152, 235</sup> Wodurch der geringere Abstand der Pinzetten im Long-TM mit drei EDS-Einheiten gegenüber des mittleren Konstrukts Medium-TM mit einer EDS-Einheit zu erklären ist. Letzterem ist gemäß der MD-Simulation in energetisch günstiger Konformation die Überbrückung von zwei Lysinen im Dimeren-Survivin ohne Streckung möglich. Die kürzeste Verbindung Short-TM scheint hingegen in ihrer energetisch günstigsten Konformation nicht gänzlich fähig zu sein den

kleinsten Lysin-Lysin-Abstand von 20 Å überbrücken zu können. Abbildung 23 zeigt beispielhaft die Überbrückung der Lysine K90/K90' im Homomer (A) sowie im Homodimer von Survivin Anhand der mittleren Struktur Medium-TM.



**Abbildung 23:** A) Survivin-Monomer und B) Dimer mit hervorgehobenen Lysinen in der NES-Region (blau und rosa) sowie die Verbrückung der Lysinreste K90/90' durch den exemplarisch verwendeten Liganden Medium-TM. Nach PDB 1XOX modifiziert.<sup>1</sup> Erstellt von der Kooperationspartnerin Inesa Hadrović .

Häufig wird die Flexibilität des Linkers oder des gesamten Konstrukts bei multivalenten Konstrukten als Nachteil angesehen, z. B. aufgrund eines höheren Entropieverlusts bei der Bindung.<sup>76, 103, 231, 236, 237</sup> Dennoch ist der Ansatz und die Annahme dieser Arbeit, dass flexible Liganden einen Vorteil gegenüber ebenso flexiblen Zielen, wie der NES-Schleife in diesem Fall, besitzen. Somit können sie sich besser an Positionsänderungen der Zielstellen, hier der Lysinreste anpassen. Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen von *Krishnamurthy et al.*, die an ihren Versuchen mit Ethylglykollinkern zeigten, dass flexible Linker den Konformationsraum ausloten können, um die Bindung an verschiedenen Bindungsstellen zu optimieren. Die Ergebnisse zeigen, dass der erwartete Nachteil der Konformationsentropie gering ist.<sup>95</sup> Auch *Kane's* Ergebnisse, welcher ebenfalls den Einfluss von verschiedenen Linkerlängen untersucht hat, unterstützen den Ansatz. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch bei ungünstigem Verlust an Konformationsentropie des Linkers während der Bindung die Abhängigkeit der freien Energie der multivalenten Bindung von der Linkerlänge schwach sein kann, sodass flexible Linker eine wirksame Strategie zur Entwicklung potenter multivalenter Liganden darstellt.<sup>96</sup>

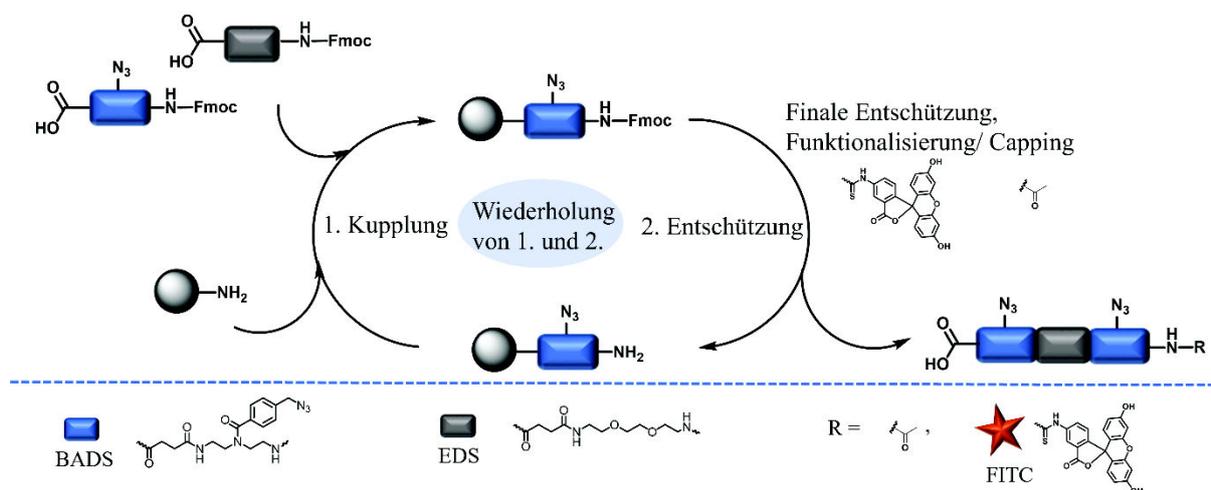
Es sollte auch beachtet werden, dass, selbst wenn keine zweiwertige Chelatbindung auftritt, mehrwertige Konstrukte immer noch zu einer erhöhten Avidität führen können, z. B. durch eine statistisch erhöhte Bindung aufgrund des Vorhandenseins von zwei Tweezer-Einheiten. Wenn

es um das Potenzial geht, auch mit anderen Bindemitteln zu konkurrieren, profitieren flexible Liganden wie die funktionalisierten Makromoleküle dieser Studie zusätzlich von sterischer Abschirmung, sowohl im ein- als auch im zweiwertigen gebundenen Zustand.<sup>76, 152, 235</sup> Diese sterische Abschirmung hängt weitestgehend von der hydrodynamischen Gesamtgröße des Liganden ab. Diese lässt sich aber nicht ausreichend vorhersagen, sodass die Betrachtung und Einfluss dieser in Kapitel 3.1.2 und 3.2 beleuchtet werden.

### 3.1.1 Synthese divalenter Azid-funktionalisierter Oligomere

Die in Abbildung 21 implementierten makromolekularen Grungerüste wurden mit Hilfe der Festphasenpolymersynthese nach *Hartmann et al.* synthetisiert, an welche die molekularen Pinzetten anschließend konjugiert wurden. Dieser Ansatz ermöglicht den Zugang zu sequenzdefinierten Strukturen. Das präzise Bestimmen von Anzahl, Abständen, Positionen oder auch der Gesamtlänge ist vor allem für die spätere Korrelation von Funktion und Struktur von Bedeutung.<sup>161, 237, 238</sup> Daneben liefert die Bausteinbibliothek, die *Hartmann* und Mitarbeiter aufgebaut haben, Zugang zu diversen maßgeschneiderten Bausteinen, die durch ihre schrittweise Assemblierung ermöglichen Eigenschaften und Funktionalitäten der Makromoleküle genau bestimmen zu können und bei Bedarf systematisch zu verändern. Die Bausteine besitzen eine für den Einsatz in der Festphasensynthese unerlässliche Bifunktionalität, die zum einen aus einer Carbonsäure-Funktionalität und zum anderen aus einem Fmoc-geschützten Amin besteht. Funktionale Bausteine, besitzen darüber hinaus eine weitere funktionelle Gruppe an ihren Seitenketten. Spacer Bausteine bilden eine weitere Kategorie. Sie werden genutzt, um den Abstand zwischen den funktionalen Bausteinen zu regulieren, die Konturlänge einzustellen oder Einfluss auf die Hydrophilie der Struktur zu nehmen. In dieser Arbeit wurde als Funktioneller Baustein *p*-(azidomethyl)benzoyl diethylenetriamin succinic acid (BADS)<sup>154</sup> gewählt. Er trägt die essenzielle Azid-Funktionalität zur späteren Anbringung des Alkin-funktionalisierten molekularen Tweezers mittels Kupfer-katalysierter-Azid-Alkin-Cycloaddition. Zum anderen trägt er ein Benzyl in seiner Seitenkette, das die Interaktion mit den hydrophoben Proteinoberflächen der PPI-Schnittstellen begünstigen könnte, wie es auch bei hydrophoben Bereichen in der Nähe von Kohlenhydratbindungsstellen von Con A der Fall ist.<sup>154, 239, 240</sup> Trotz seiner etablierten Syntheseroute gilt bei Aziden geringer molekularer Gesamtmasse Vorsicht auf Grund der Explosionsgefahr. Als Spacer Baustein findet der Baustein EDS<sup>161</sup> (ethylene-glycol-diamine-succinic acid) Anwendung. Er wurde verwendet, um die Abstände zwischen den BADS-Bausteinen einzustellen. Durch seine Ethylenglykoleinheit sorgt er zum einen für die Flexibilität, zum anderen erhöht er

die Hydrophilie des finalen Makromoleküls. Beide Bausteine wurden mit kleinen Änderungen nach bereits etablierten Syntheseprotokollen synthetisiert (Siehe Kapitel 5.2.1).<sup>154, 161</sup> Die Bausteine wurden in moderaten bis hohen Ausbeuten in Reinheiten >95% erhalten. Analysiert wurden die Bausteine mittels <sup>1</sup>H-NMR, ESI-MS und RP-HPLC (siehe Experimententeil). Anschließend fanden sie ihre Anwendung in der nach *Hartmann* etablierten Festphasenpolymersynthese, deren Ablauf in Abbildung 24 abgebildet ist.



**Abbildung 24:** Schematischer Verlauf der Festphasenpolymersynthese der Makromoleküle unter der Verwendung der Bausteine EDS und BADS.<sup>1</sup>

Als Feste Phase / Harz kam das weit verbreitete TentaGel<sup>®</sup> SRam auf Grund seiner guten Quelleigenschaften in diversen Lösungsmitteln wie DCM oder DMF zum Einsatz. An dieses Harz wurde nach ausgiebigen Quellen in DCM im ersten Schritt BADS durch Verwendung eines Überschusses (5 Äq.) und der Kupplungsreagenz PyBOP (5 Äq.) sowie der Base DIPEA (10 Äq.) in DMF angebracht. Nach der darauffolgenden Fmoc-Entschützung mit einer 25%igen-Piperidin Lösung in DMF, bei welcher das terminale Amin des Bausteins freigesetzt wird, folgte ein neuer Kupplungsschritt mit einem weiteren Baustein. Jeder Schritt wird durch Waschzyklen mit DMF zur Eliminierung überschüssiger Reaktanden und Spaltprodukte beendet. Durch die Wiederholung dieser Schritte wurden die jeweiligen Bausteine assembliert und die gewünschten makromolekularen Sequenzen gebildet. Vor der jeweiligen letzten Entschützung der terminalen Amine wurden die Ansätze jeweils halbiert. Besonders bei der Entschützung der BADS-Bausteinen ist darauf zu achten, die Reaktionszeiten einzuhalten, um eine mögliche Umlagerung der Seitenkette vom sekundären Amin an das entstehende freie primäre Amin zu vermeiden.<sup>154</sup> Die erste Hälfte wurde nach anschließender Entschützung mit Essigsäureanhydrid acyliert, um in nachfolgenden Reaktionen unerwünschte Nebenreaktionen eines freien Amins zu unterbinden. Nach Fertigstellung der jeweiligen Sequenz folgte zur

Gewinnung der Strukturen die Abspaltung vom Harz, wodurch ein chemisch inertes Amid am C-Terminus der Sequenzen erhalten wird. Die Abspaltung erfolgte mit einer Lösung aus 95 vol% Trifluoressigsäure (TFA) in DCM und darauffolgender Fällung in eisgekühlten Diethylether. Nach Zentrifugation und Lyophilisierung konnten die drei makromolekularen Grungerüste isoliert werden.

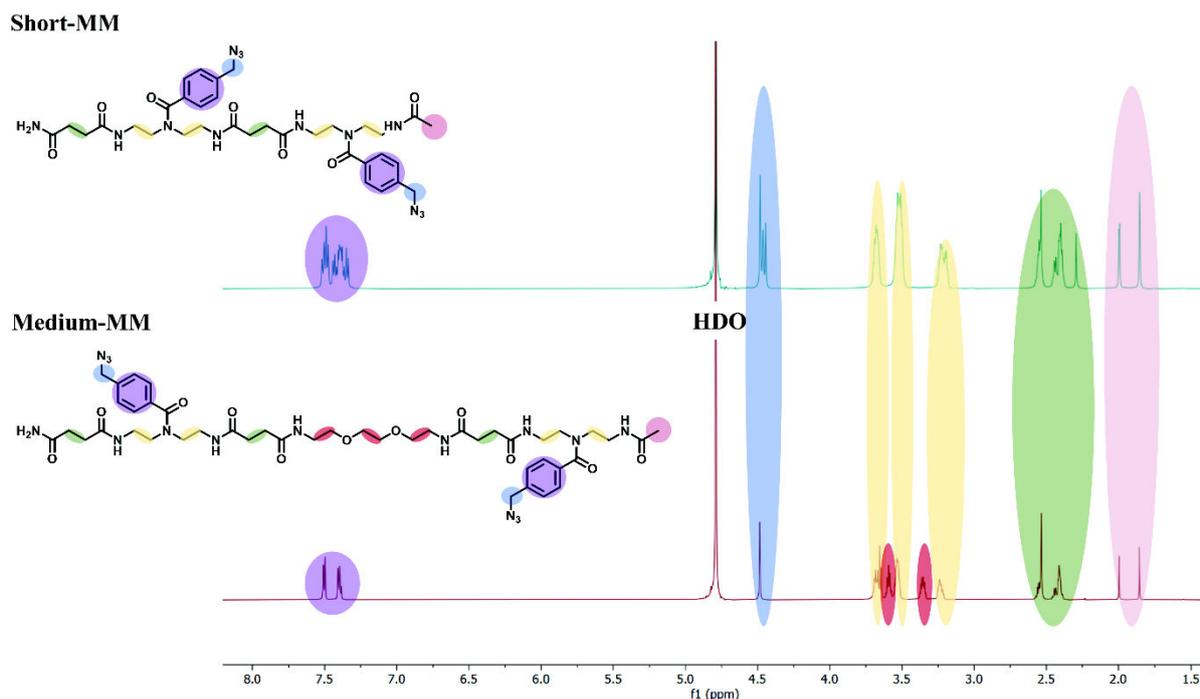
Durch die Abspaltung der Strukturen mit hohen Mengen an TFA verbleibt diese selbst nach Ausfällen des Produkts und Waschzyklen in den isolierten Produkten zurück. Da TFA Rückstände sich gegenüber Peptiden als problematisch hinsichtlich des Verhaltens durch Einfluss auf die Konformation und somit auf die Genauigkeit der biologischen Assays erwiesen, wurden die Makromoleküle mittels präparativer HPLC in einem 0.1 % Ameisensäure Wasser/Acetonitril-Gemisch erneut aufgereinigt.<sup>241, 242</sup> Dieser Schritt hat den weiteren wichtigen Vorteil, dass in der im Folgenden anstehenden Konjugation der Pinzettenmoleküle, reine Gerüste, frei von Abbruchsequenzen oder Nebenprodukten, eingesetzt werden. Zuletzt folgt die Lyophilisierung wonach insgesamt die drei Makromoleküle als farblose Feststoffe in moderaten Ausbeuten erhalten wurden. Alle Strukturen tragen jeweils zwei Azide, die jeweils an erster und letzter Position der Sequenz sind. Insgesamt unterscheiden sich die Moleküle in ihrem Abstand zwischen diesen Azid-funktionalitäten und damit in ihrer Gesamtlänge. Durch Integration des erhaltenen UV-Signals der RP-HPLC-Messung wurde die relative Reinheit und Monodispersität der Strukturen bestimmt. Die Reinheiten konnte für alle Makromoleküle auf >95 % bestimmt werden (Tabelle 3). Die Elutionszeiten betreffend lässt sich sagen, dass die kürzeste Struktur (Short-MM), für die geringste Interaktion mit dem C18 Säulenmaterial zeigt, wodurch sie am schnellste eluiert. Short-MM enthält im Gegensatz zu Medium-MM und Long-MM kein EDS, wodurch der Unterschied zu dieser Struktur größer ausfällt als der zwischen den beiden EDS-enthaltenden Strukturen, die in ihrem Laufverhalten sehr ähnlich sind. Die Verifizierung der Gerüste erfolgte mittels HR-ESI-MS und <sup>1</sup>H-NMR (siehe Tabelle 3 und Experimentalteil).

**Tabelle 3:** Analytische Daten der Verbindungen Short-MM, Medium-MM und Long-MM. Reinheit in %, bestimmt durch Integration des detektierten UV-Signal bei 214 nm des HPLC-Elugramm. Elutionszeit erhalten aus RP-HPLC-Messungen bei einem Lauf von 30 min, 25°C und einem Eluenten 0-50 Vol.% MeCN in H<sub>2</sub>O. HR-ESI-MS Daten berechnet sowie gefunden.

	Reinheit	Elutionszeit	HR-ESI-MS		
	[%]	[min]	Berechnet für		Gefunden
<b>Short-MM</b>	>95	15,5	C <sub>34</sub> H <sub>46</sub> N <sub>13</sub> O <sub>7</sub> [M + H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	748,3638	748,3633
<b>Medium-MM</b>	>95	16,9	C <sub>44</sub> H <sub>63</sub> N <sub>15</sub> O <sub>11</sub> [M + 2H <sup>+</sup> ] <sup>2+</sup>	489,7489	489,7487
<b>Long-MM</b>	>95	16,6	C <sub>64</sub> H <sub>99</sub> N <sub>19</sub> O <sub>19</sub> [M + 2H <sup>+</sup> ] <sup>2+</sup>	719,8755	719,8754

HR-ESI-MS bestätigt die erfolgreiche Synthese der Makromoleküle. Die theoretisch berechneten Masse-Ladungs-Verhältnisse entsprechen den in der Massenspektrometrie gefundenen Werten, wie aus **Tabelle 3** entnommen werden kann.

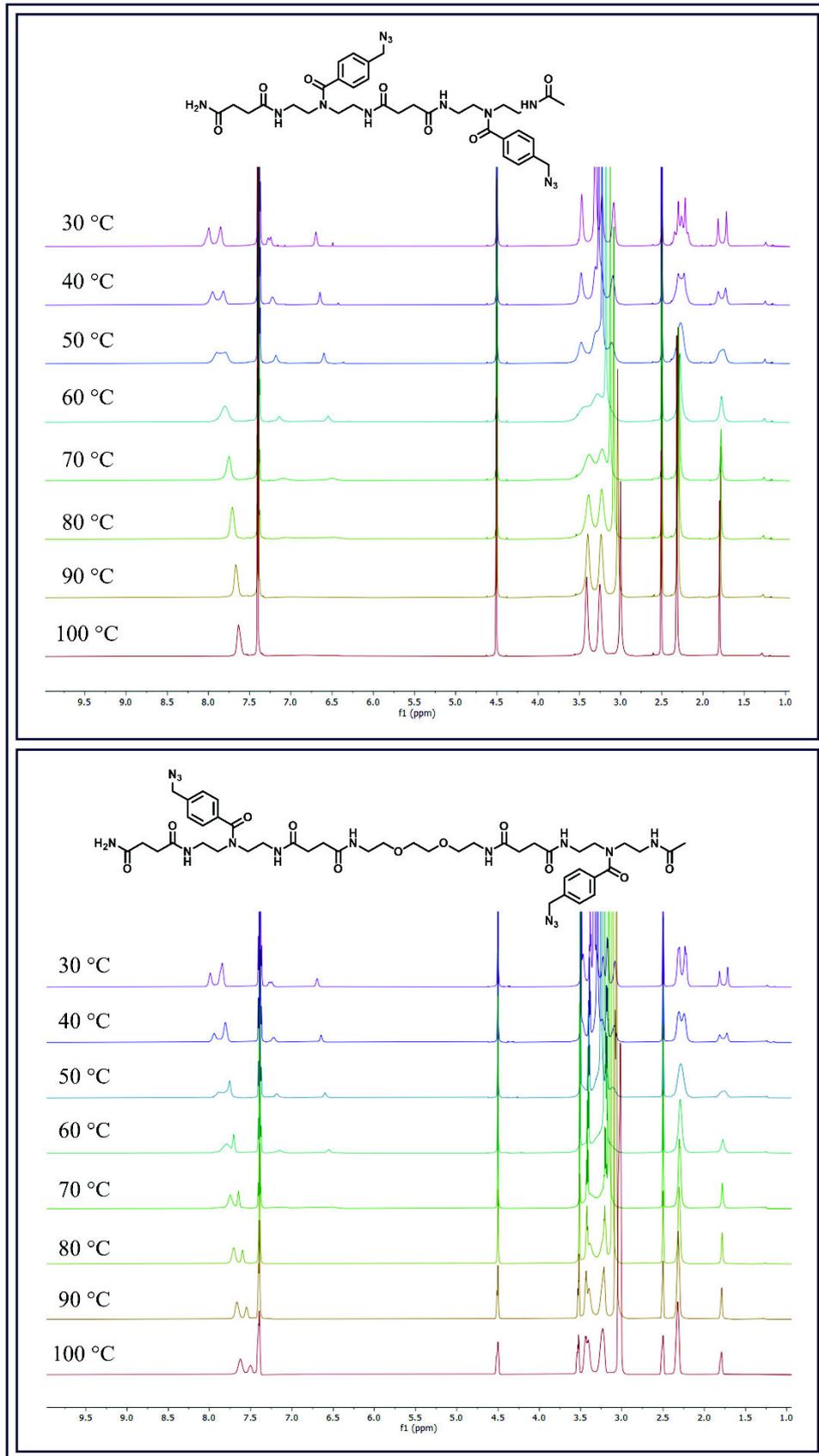
Des Weiteren konnte durch <sup>1</sup>H-NMR die erfolgreiche Synthese bestätigt werden. Die Abbildung 25 zeigt exemplarisch die übereinander platzierten <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der beiden Verbindungen Short-MM (oben, türkis) und Medium-MM (unten, rot) in D<sub>2</sub>O. Beide Spektren weisen charakteristische Signale der jeweilig enthaltenen Bausteine auf.



**Abbildung 25:** Vergleichende Darstellung der  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , RT) Spektren der Verbindungen Short-MM (oben, türkis) und Medium-MM (unten, rot). Farbliche Zuordnung der Signale der H-Protonen in den jeweiligen Strukturen.

Am stärksten ins Tieffeld verschoben liegen die aromatischen Signale der Seitenkette der BADS- Bausteinen vor. Hier fällt auf, dass die Aufspaltung der Signale für die Verbindung Medium-MM deutlich klarer ist als die der gegenübergestellten Short-MM. Es ist zu vermuten, dass hierfür ursächlich die räumliche Nähe der BADS-Seitenketten zueinander ist, die besonders in wässrigem Medium zu pi-stacking neigen. Während bei Short-MM diese relativ nah beieinander liegen, werden diese in der Medium-MM Verbindung durch einen EDS-Baustein weiter voneinander getrennt und haben somit eine ähnlichere Umgebung. Weiter im Hochfeld verschoben, bei 4,52 – 4,41 ppm liegt das charakteristische Signal der Methylenprotonen des BADS-Linkers. Durch ihre Nähe zum Aryl und Azid erfahren sie eine stärkere Entschirmung als die Ethylenprotonen der jeweiligen Bausteine. Hier zeigt sich ebenfalls eine Aufspaltung der Signale für die Verbindung Short-MM. Dieses charakteristische Signal liegt in DMSO bei 4,50 ppm und als Singulett vor, wodurch darauf zu schließen ist, dass die beiden Strukturen durch das Lösungsmittel unterschiedlich beeinflusst werden. Zwischen 3,74 – 3,63 ppm liegen Signale der die Ethylenprotonen von EDS und BADS, die als Multiplets zu erkennen sind. Sofern eine Struktur neben BADS auch EDS enthält überlappen die jeweiligen Signale miteinander. Die Signale der Bersteinsäureanhydrideinheiten zeigen Multiplets zwischen 2,61 – 2,29 ppm. Die beiden am stärksten ins Hochfeld verschobenen Signale können den gecappten N-terminalen Enden, zugeordnet werden. Die Aufspaltung der Signale, der chemisch

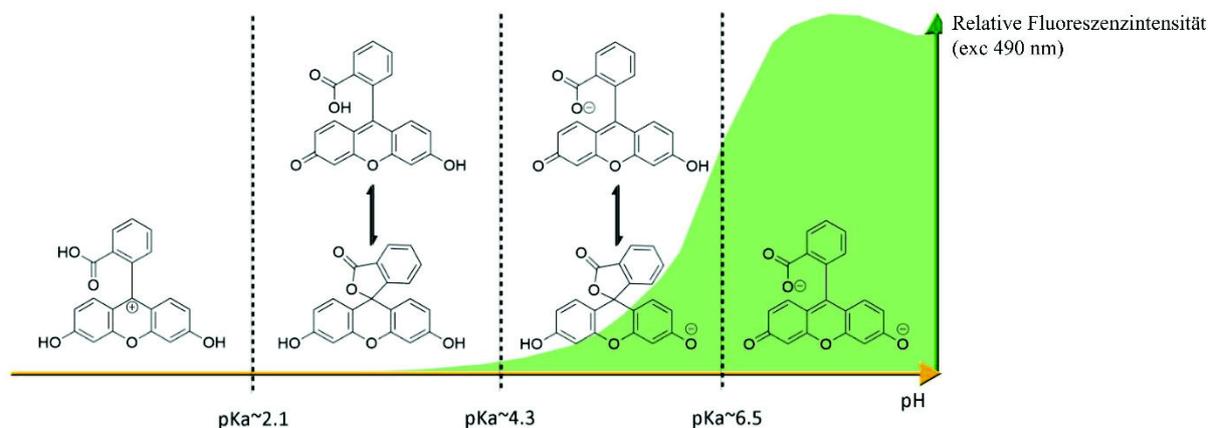
äquivalenten Protonen lässt auf Rotationsisomere schließen. Dies konnte *Baier* bereits für den BADS-Baustein beobachten.<sup>154</sup> *Boden* setzte sich mit verschiedenen Gerüsten für Glykomakromolekülen auseinander und konnte diese Aufspaltung bei Verwendung eines Aryl-Bausteins im Oligomerbackbone ebenso beobachten.<sup>243</sup> Zur genauern Betrachtung wurden die beiden Strukturen, gelöst in DMSO-d<sub>6</sub>, von 30°C bis 100 °C in 10 °C Schritten vermessen (Abbildung 26). Hier ist deutlich zu sehen, dass die beiden Signale bei steigenden Temperaturen Koaleszenz zeigen und zu einem Signal zusammen laufen. Durch diese Messungen ist ebenfalls zu sehen, dass neben diesen Protonen ebenfalls die Ethylen- und Arylprotonen dieses Phänomen aufzeigen. Es ist zu vermuten, dass je nach Temperatur eine weniger starke bis starke Rotation des Aryllinkers in der Seitenkette auftritt, wodurch der Austausch der Protonen die Umgebung der anderen Protonen beeinflusst wird.



**Abbildung 26:** Vergleichende Darstellung der <sup>1</sup>H-NMR Spektren (600 MHz) der Verbindungen Short-MM (oben) und Medium-MM (unten). Die Spektren wurden in 10 Grad Schritten bis 100 °C in DMSO-d<sub>6</sub> vermessen.

### 3.1.1.1.1 Einbau von FITC als Fluoreszenzmarker

Um die finalen Pinzettenmakromoleküle hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Survivin-CRM1 Interaktion zu testen ist für einige biologische Assays eine bildgebende Komponente als sogenannter Read-out notwendig. Beispiele hierfür sind die Fluoreszenztitration und die Beobachtung der Verbindungen in Zellen. Folglich ist es wichtig an die aus 3.1.1 bekannten makromolekularen Grundgerüste einen (Fluoreszenz-)farbstoff in die Strukturen zu integrieren um deren Eigenschaften um die Fluoreszenz zu erweitern. Wichtig ist gerade für die Beobachtung in Zellen, dass sich hier die gewählten Farbstoffe nicht in ihren Emissionsbanden überschneiden und alle eingefärbten Komponenten, Zellmembran, Zellkern, Lysozom, und die zu verfolgenden Verbindungen, klar voneinander sichtbar sind. Ein bekannter und häufig verwendeter Fluorophor bildet das Fluorescein ab. Unter basischen Bedingungen absorbiert es blaues Licht bei einem Absorptionsmaximum von 490 nm und emittiert grünes Licht bei einem Emissionsmaximum von 515 nm.<sup>244</sup> In Abhängigkeit des umliegenden pHs verändert sich die ionische Ladung und damit die chemische Struktur. Die phenolischen Fragmente bilden ein Gleichgewicht zwischen einer offenen Carboxylfunktion und einem geschlossenen Lacton (Abbildung 27).<sup>245</sup>

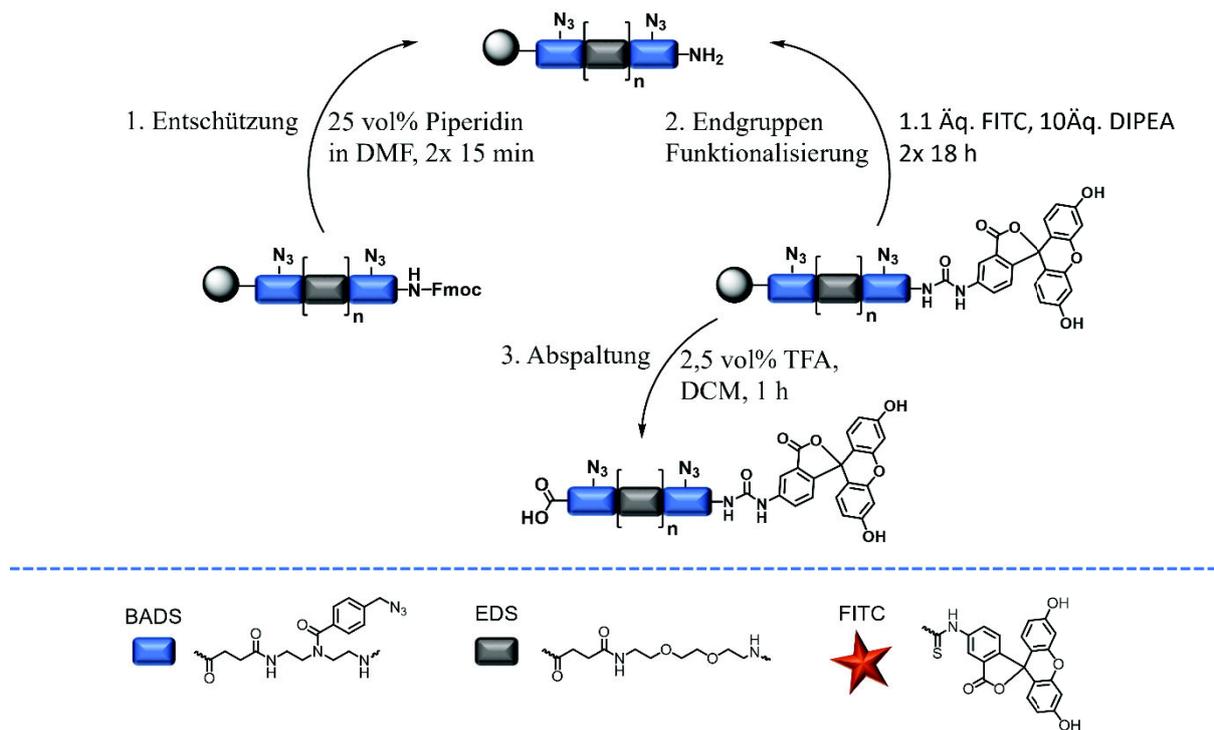


**Abbildung 27:** Ionische Formen von Fluorescein entsprechend den pH-Bereichen und ihren relativen Fluoreszenzintensitäten. Bei neutralem pH-Wert und unter Anregung bei 490 nm überwiegt die am stärksten fluoreszierende di-anionische Form von Fluorescein gegenüber anderen Formen. Unterhalb von pH = pKa ~ 6,4 zeigt das monoanionische Fluorescein eine blauverschobene Absorption, gefolgt von einer drastischen Abnahme der Fluoreszenz. Bei einem noch niedrigeren pH-Wert werden neutrale und weitere kationische Formen von Fluorescein bei einer Bestrahlung von 490 nm nicht fluoreszierend.<sup>246</sup>

Dies führt zu einer Fluktuation der photophysikalischen Eigenschaften.<sup>245</sup> Der Nachteil dieses Fluorophors liegt in seinem Photobleaching bei Lichteinwirkung, wodurch auf dunkle Lagerung und Verarbeitung zu achten ist.<sup>246, 247</sup> Derzeit sind mehrere Derivate für verschiedene Anwendungen bekannt. Die bekanntesten basieren auf der Modifizierung der benzohaltigen

Lactoneinheit. Ein Vertreter ist das Fluoresceinisotiocyanat (FITC), das auf Grund seiner guten Reaktivität eines der am häufigsten verwendeten Derivate ist. Es besitzt ebenso eine intensive Fluoreszenz, kann als pH-empfindliche Sonde im Bereich der Neutralen Form eingesetzt werden und lässt sich besonders leicht mit chemischen Strukturen verbinden, welche eine Aminfunktionalität tragen.<sup>246</sup> Die Konjugationsbindung basiert auf einer Thioharnstoff-Bildung, deren Stabilität aufgrund ihrer starken H-Bindungs-Wechselwirkungen von der physiochemischen Umgebung abhängt.

Durch diese Eigenschaften bestens geeignet wurde FITC als Fluoreszenzfarbstoff zur Anbringung an die makromolekularen Gerüste gewählt. Durch den Vorteil der Polymerfestphasensynthese unter der Verwendung der bifunktionalen Bausteine, liegt nach Kupplung der Bausteine bis zur gewünschten Sequenz, wie in vorangegangenem Kapitel erläutert, ein geschütztes Amin vor. Die zweite Hälfte der in Kapitel 3.1.1 halbierten Ansätze wurden zur Synthese, der drei Strukturen Short-F-MM, Medium-F-MM und Long-F-MM verwendet (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Schematische Darstellung der Synthese zur FITC-Anbringung mittels SPPoS.

Die nach der Vorschrift aus Kapitel 3.1.1 synthetisierten, sich noch an der Festphase befindenden, Sequenzen wurden anschließend zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit zwei aufeinanderfolgenden Zyklen aus 25 vol% Piperidin in DMF und Waschen mit DMF unterzogen. Auch hier wurde die Reaktionszeit so kurz wie möglich gehalten, um die Bildung von

Nebenprodukten durch Umlagerung des BADS-Bausteins zu vermeiden. Hiernach folgte die Endgruppenfunktionalisierung mit Fluoresceinisothiocyanat im leichten Überschuss (1.1 Äq.). Dieses wurden in DMF gelöst und zu der jeweiligen Sequenz zugegeben. Um eine vollständige Kupplung dieser anspruchsvollen Komponente zu gewährleisten, wurde die Reaktion auf 18h erhöht. Zusätzlich wurde eine Doppelkupplung, erneute Kupplung unter gleichen Bedingungen nach Beendigung der ersten, durchgeführt. Dies soll ebenfalls einen vollständigen Umsatz begünstigen, da bei steigenden Sequenzen und sterisch anspruchsvolleren Resten die Kupplungseffizienz durch herabgesetzte Diffusion abnimmt. Durch die hohe Anfälligkeit von FITC gegenüber Photobleaching wurde ebenso unter Lichtausschluss gearbeitet. Eine vollständige Kupplung wurde durch Microcleavage und anschließender Messung in RP-HPLC-MS überprüft. Nach der Abspaltung mit 2,5%vol TFA in DCM und anschließender Fällung, Trocknung und Lyophilisierung wurden die Makromoleküle als gelb/orangene Feststoffe erhalten. Um für die Reaktion der Konjugation der Pinzettenmoleküle möglichst reine Edukte einzusetzen, wurden diese fluoreszenzmarkierten Makromoleküle ebenfalls durch präparative HPLC aufgereinigt. Durch die herabgesetzte Löslichkeit in Wasser durch den Fluorophor wurden die Strukturen bereits im Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Wasser angelöst. Die darauf erhaltenen aufgereinigten Verbindungen wurden mittels RP-HPLC, HR-ESI-MS und  $^1\text{H-NMR}$  verifiziert (**Tabelle 4** und Experimentalteil).

**Tabelle 4:** Analytische Daten zu den Verbindungen Short-F-MM, Medium-F-MM und Long-F-MM. Reinheit in %, bestimmt durch Integration des detektierten UV-Signals bei 214 nm des HPLC-Elugramms. Elutionszeit erhalten aus RP-HPLC-Messungen bei einem Lauf von 30 min, 25°C und einem Eluenten von 0-50 Vol.% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$ . HR-ESI-MS Daten berechnet sowie gefunden.

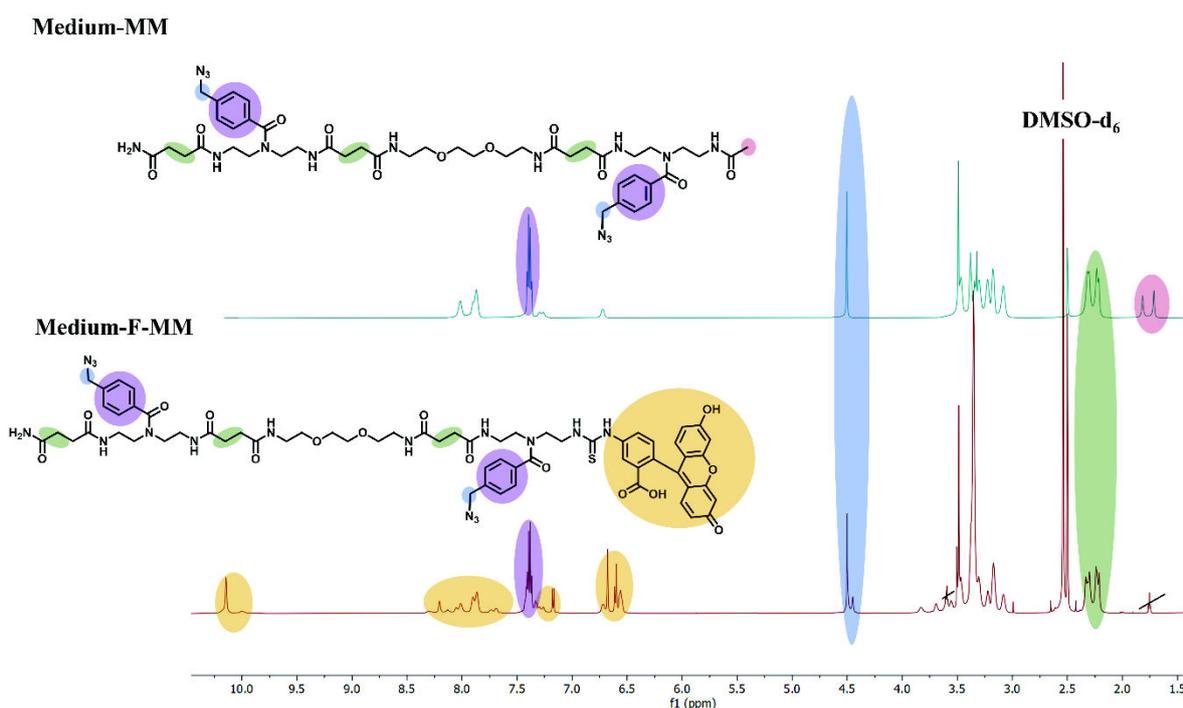
	Reinheit	Elutionszeit	HR-ESI-MS		
	[%]	[min]	Berechnet für		gefunden
Short-F-MM	>95	24,5	$\text{C}_{53}\text{H}_{56}\text{N}_{14}\text{O}_{11}\text{S}$ [M + 2H <sup>+</sup> ] <sup>2+</sup>	548,1981	548,978
Medium-F-MM	>95	22,6	$\text{C}_{63}\text{H}_{74}\text{N}_{16}\text{O}_{15}\text{S}$ [M + 2H <sup>+</sup> ] <sup>2+</sup>	663,2615	663,2613
Long-F-MM	>95	21,7	$\text{C}_{83}\text{H}_{110}\text{N}_{20}\text{O}_{23}\text{S}$ [M + 2H <sup>+</sup> ] <sup>2+</sup>	893,3881	893,3877

Durch die Analyse mittels RP-HPLC lässt sich neben der relativen Reinheit ebenfalls die Monodispersität der Makromoleküle verdeutlichen. Die Retentionszeiten betrachtend zeigt sich, dass im Vergleich zu den unfunktionalisierten Makromolekülen Short-MM, Medium-MM und Long-MM die Elution zu späteren Zeiten eintritt. Ursächlich ist die, durch den Fluorophor

erhöhte Hydrophobizität, und die damit einhergehende verstärkte Wechselwirkung mit dem C18-Säulenmaterial. Innerhalb der drei fluoreszenzmarkierten Makromoleküle steigt die Retentionszeit mit der Abnahme der hydrophilen Spacer-Einheit EDS, was ebenfalls mit der Gesamthydrophobizität der jeweiligen Strukturen zu erklären ist.

HR-ESI-MS bestätigte die erfolgreiche Synthese der Makromoleküle. Die theoretisch berechneten Masse-Ladungs-Verhältnisse entsprechen den in der Massenspektrometrie gefundenen Werten Massenspektrometrie gefundenen Werten, wie aus **Tabelle 4** entnommen werden kann.

Für einen weiteren Strukturbeweis wurden  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in  $\text{DMSO-d}_6$  der Verbindungen aufgenommen. In **Abbildung 29** ist beispielhaft der Vergleich der Makromoleküle Medium-MM und Medium-F-MM gezeigt.



**Abbildung 29:**  $^1\text{H-NMR}$  Stack der Verbindungen Medium-MM (oben, türkis) und Medium-F-MM (unten, rot) (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , RT). Farbliche Zuordnung der Signale der H-Protonen in den jeweiligen Strukturen.

Deutlich zu erkennen ist der Wegfall der Acetylprotonensignale im Hochfeld bei der fluoreszenzmarkierten Verbindung Medium-F-MM (rot). Diese zeigt hingegen die charakteristischen Signale der FITC-Komponente im Tieffeld auf (gelb). Das Multipllett bei 10,28-9,83 ppm kann den Säure- und Alkoholprotonen des FITC zugeordnet werden, welches folglich in offener Form vorliegt. Die weiteren Signale der FITC-Protonen liegen etwas

verschoben in Hochfeldrichtung als Multipletts vor. Diese Signale überlagern sich zum Teil mit den im D<sub>2</sub>O durch protonenaustausch sichtbaren Signalen der Amid Protonen. Des Weiteren können auch hier charakteristische Signale der Bausteine BADS und EDS gefunden werden. Das Multiplett bei 7.45 – 7.24 ppm ist in beiden Spektren charakteristisch und unverändert, und kann den Arylprotonen des BADS-Bausteins zugeordnet werden (violett). Das Signal bei 4.57 - 4.41 ppm kann für beide Spektren der Methylbrücke der BADS-Seitenkette zugeordnet werden. Die Anbringung des Fluorophors hat nur wenig auswirkung auf die Aufspaltung des Signals für den angrenzenden BADS-Bausteins. Methylgruppen von BADS und EDS die eng zu Sauerstoff- oder Stickstoffatomen sind überlagern sich in mehreren Multipletts im Bereich von 3.87 – 3.03 ppm. Klar abgegrenzt sind bei 2.40-2.16 ppm zwei Multipletts zu sehen, die den Bernsteinsäureprotonen der Bausteingerüste EDS und BADS zugeordnet werden können.

### **3.1.1.1.2 Einbau von Cystein zur Anbringung an Goldnanopartikeln**

In den vorausgegangenen Kapiteln lag der Fokus auf der Synthese der makromolekularen Grundgerüste für eine divalente Präsentation des lysinbindenden-Ligandenmotivs des molekularen Tweezers. Die finalen Liganden wurden auf ihre Affinität sowie ihr inhibitorisches Potenzial gegenüber der Survivin-Crm1-Interaktion untersucht (Kapitel 3.2). Für die spätere erfolgreiche Anwendung dieser rational entwickelten Inhibitoren besteht eine weitere Herausforderung in der Aufnahme und der effizienten Bereitstellung in Zellen. Problematisch ist jedoch die schlechte intrazelluläre Bioverfügbarkeit, die viele supramolekulare und sowie die in dieser Arbeit entworfenen makromolekulare Liganden besitzen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das Konzept der Pinzetten Makromoleküle als Inhibitoren um ein etabliertes Trägermaterial zur Zellaufnahme erweitert. Als Trägermaterial wurden ultrakleine Goldnanopartikel gewählt, an welche die Pinzetten Moleküle konjugiert wurden (siehe Kapitel 3.3). Goldnanopartikel und insbesondere ultrakleinen Goldnanopartikeln (usAuNP) haben in den letzten Jahren vermehrt das Interesse dieses Forschungsgebiets auf Grund ihrer vorteilhaften Eigenschaften auf sich gezogen. Diese Vorteile und weitere Details werden in Kapitel 3.3 genauer ausgeführt. Die Konjugation kann über Thiol- oder Disulfidkomponenten erfolgen, da das Edelmetall auf Grund seines weichen Charakters stabile, pseudo-kovalente Bindungen mit ebenso weichen schwefelhaltigen Verbindungen eingehen kann.<sup>248 249</sup>

Da die entstandenen Makromoleküle auf Oberflächen von usAuNP installiert werden sollten, musste das jeweilige makromolekulare Gerüst entsprechend angepasst werden. Um die Bildung von Au-S-Bindungen zu ermöglichen, muss in das makromolekulare Grundgerüsts eine Thiolgruppe eingebracht werden. Das Prinzip der Polymerfestphasensynthese ermöglicht durch

ihren Ursprung in der Peptidfestphasensynthese nach *Merrifield* neben der Verwendung von maßgeschneiderten Bausteinen weiterhin die gezielte Einbindung von Aminosäuren. Dieser Vorteil ermöglicht es, mühelos auf die Bausteinbibliothek der Natur zurückgreifen zu können. So wurde die Thiol-Funktionalität durch Kopplung von L-Cystein, als erster Baustein der Sequenz, eingeführt. L-Cystein, als thiolhaltige-Aminosäure, muss für den Einsatz in der SPPoS ebenfalls einen Fmoc geschützten N-Terminus sowie eine für die Syntheseroute geeignete Schutzgruppe am Thiol aufweisen. Die Schwefelschutzgruppe verhindert ungewollte Nebenreaktionen durch ein freies Thiol. Darüber hinaus hat sie einen Einfluss auf die Racemisierung, für diese Cystein während der Kupplungsreaktion sehr anfällig ist.<sup>126</sup> Die Racemisierung kann durch geeignete Kupplungsreagenzien minimiert werden. Dennoch ist die Konfiguration der Aminosäure nicht entscheidend für die Anbringung an das Trägermaterial, wodurch die Wahl auf ein weit verbreitetes und nützliches Derivat fiel.

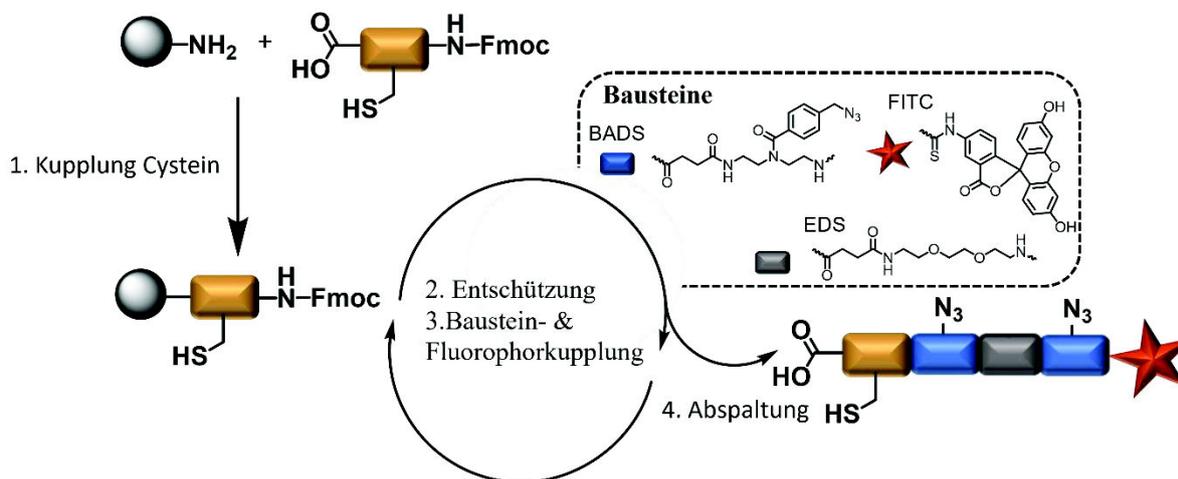
Vorteile des Trityl-geschützten Cysteins, sind der kostengünstige Erwerb, sowie die simultane Entschützung mit der globalen, TFA-sauren, Abspaltung des Makromoleküls vom Harz.<sup>126</sup>

Als Gesamtsequenz wurde das mittlere makromolekulare Gerüst Medium-MM herangezogen. Es enthält zur Anbringung der Alkin-Pinzette zwei Azid-tragende Bausteine, die durch einen spacerbaustein getrennt sind. Dies soll einen ausreichenden Abstand auf der *usAuNP* Oberfläche für die Bindung schaffen und gleichzeitig die Ursprungsgröße der Goldnanopartikel durch die Makromolekülhülle möglichst wenig beeinflussen.

Die Azidfunktionalität wird durch Verwendung des funktionellen Bausteins BADS sichergestellt. An diesem kann mittels CuAAC die Konjugation der molekularen Pinzetten nachfolgend erfolgen. EDS, wird als flexibler, hydrophiler Spacing-Baustein eingesetzt. Beide Bausteine, aus der Bausteinbibliothek von *Hartmann*, wurden nach bereits etablierten Protokollen synthetisiert und konnten in moderaten bis hohen Ausbeuten und Reinheiten gewonnen werden.<sup>154, 161</sup>

Ihre erfolgreiche Synthese wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR, ESI-MS und RP-HPLC Analyse bestätigt (siehe Kapitel 5.2.1). Um eine Nachverfolgung der funktionalisierten *usAuNPs* in biologischen Zellassays zu gewährleisten, wurde darüber hinaus ein Fluoreszenzfarbstoffe in die Struktur des Makromoleküls integriert. Die Wahl dessen wird neben der Kompatibilität für die Festphasensynthese von den Emissionen der anderen, für die Einfärbung der Zellteile, wie Zellkern, Lysozome oder Zellmembran benötigten Farbstoffe, beeinflusst. Unter Berücksichtigung dieser Parameter wurde Fluoresceinisothiocyanat als geeigneter Farbstoff bestimmt. Er konnte bereits erfolgreich in der Festphasenpolymersynthese durch Kupplung an freie Amine unter Ausbildung einer Thioureafunktion eingesetzt werden.

Mit den ausgewählten Bausteinen wurde mittels Festphasenpolymersynthese ein makromolekulares Grundgerüst synthetisieren, welches für die anschließende Funktionalisierung von ultrakleinen Goldnanopartikeln geeignet ist (Abbildung 30). Die SPPoS wurde am Tenta-Gel® S RAM Harz durchgeführt.



**Abbildung 30:** Schematische Darstellung der Festphasensynthese zur Implementierung von L-Cystein und dem anschließenden Erhalt der Verbindung Cys-Medium-F-MM.

Nachdem das Harz für 20 min in DMC gequollen wurde, wurden 5 Äq. der Aminosäure L-Cystein für 1h unter Verwendung von 5 Äq. PyBOP als Kupplungsreagenz und 10 Äq. DIPEA gekuppelt. Um die Anbringung der Aminosäure sicher zu stellen, wurde ein sogenanntes Doublecoupling durchgeführt. Hierfür wird das L-Cystein unter den gleichen Bedingungen, wie der ersten Kupplung, erneut gekuppelt. Wichtig ist, dass keine Entschützung nach der ersten Kupplung erfolgt. Anschließend wird mit 25vol% Piperidin in DMF die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Durch Wiederholung der Kupplungs- und Entschützungsschritte werden alle weiteren Bausteine auf dem Harz aufgebaut. Als letzter Baustein wurde FITC angebracht, um den für die biologischen Assays wichtigen Farbstoff einzuführen. Hierzu wurden 1.1 Äq. dieses in DMF gelöst und mit 10 Äq. DIPEA für 18 h gekuppelt. Auch hier wurde eine Doppelkupplung zur gänzlichen Funktionalisierung durchgeführt. Um Photobleaching zu minimieren, wurde ebenso unter Lichtausschluss gearbeitet. Nach Fertigstellung der Sequenz wurde mit einer Lösung aus 2,5%vol TFA, 2,5% TIPS (Triisopropylsilan) in DCM abgespalten und in Ether gefällt. TIPS dient als zusätzliche Abfangreagenz für das bei der Abspaltung freiwerdende Trityl, das während der Kupplung als Schutzgruppe für das Thiol der Aminosäure fungiert. Auf diese Weise wurde nach schließender Trocknung und Lyophilisierung das Makromoleküle als gelb/oranger Feststoff erhalten.

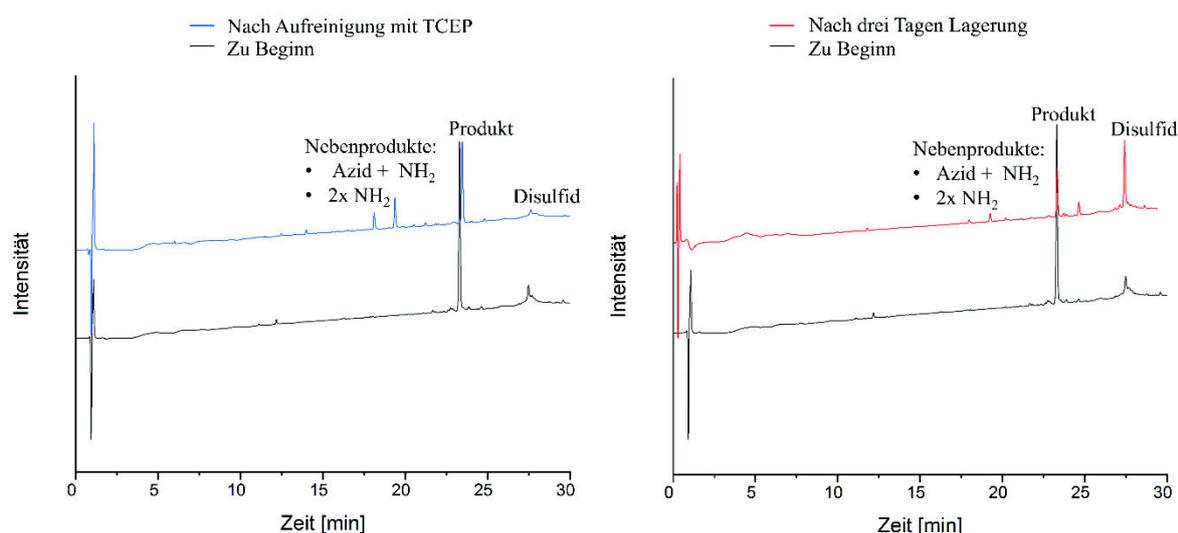
Das erhaltene Makromolekül weist am C-Terminus eine Thiol-funktionalität auf, die für die Funktionalisierung der ultrakleinen Goldnanopartikel genutzt werden kann. Am N-Terminus befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff, der die Visualisierung der Partikel in biologischen Assays sicherstellt. Das Gerüst zwischen diesen beiden essenziellen Bestandteilen, weist zwei Azid-Funktionalitäten zur Anbringung der Lysin-erkennenden molekularen Tweezer auf. Diese sind wiederum durch einen Platzhalter-Baustein getrennt. Er erhöht zum einen die Hydrophilie und die Flexibilität, zum anderen schafft er Distanz zwischen großen aromatischen Einheiten. Der Ansatz eines längeren Makromoleküls mit drei EDS-Bausteinen wurde nicht weiterverfolgt, um in der Größenordnung von 2 nm der ultrakleinen Goldnanopartikel zu bleiben und diese nicht durch Gerüste mit großer Konturlänge zu beeinflussen.

Für die nachfolgende Konjugation an die *usAuNPs* sollte das makromolekulare Grundgerüst eine maximale Reinheit aufweisen. Hierzu sollte das Makromolekül ebenfalls durch eine präparative HPLC aufgereinigt werden. Durch die herabgesetzte Löslichkeit in Wasser, ausgelöst durch den Fluorophor, wurden die Strukturen in einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Wasser gelöst. Sowohl der Lösungsvorgang als auch die Aufreinigung selbst birgt die Gefahr der Disulfid Bildung durch oxidierenden Sauerstoff. Dies ist besonders problematisch da durch die Oxidation reaktive Endgruppen verloren gehen, die in Hinblick auf die spätere Anbringung an das Trägermaterial, die *usAuNPs* von großer Wichtigkeit sind, da nur freie Thiole die Verbindung mit Gold eingehen können und somit für die Funktionalisierung der Partikel sorgen. Darüber hinaus können Disulfide zusätzlich auf Grund ihrer Größe bei der Aufreinigung der funktionalisierten *usAuNP* zusätzliche Probleme bzgl. der Abtrennung verursachen. Es gibt verschiedene Methoden, um den Verlust reaktiver Thiolgruppen durch Oxidation zu verhindern, z. B. die Verwendung von Thiolacton *in situ*, das nach der Aminolyse ein Thiol erzeugt. Für die Reduktion von Disulfiden wurde hier die Zugabe von TCEP (Tris(2-chlorethyl)phosphat) als Reduktionsmittel gewählt. Hierdurch wird die Trennung vom thiolhaltigen-Makromolekül von unerwünschten Nebenprodukten gewährleistet. Das Reduktionsmittel selbst kann durch frühe Elutionszeiten ebenfalls über die präparative Methode entfernt werden.

Um die Stabilität/Kompatibilität des Makromoleküls gegenüber dem Reduktionsmittel vorab zu betrachten wurde das Makromolekül im Rohzustand und mit TCEP (zu einer 2 mg/mL konzentrierten Lösung des aufzureinigenden Makromoleküls wurden 2 mg TCEP hinzugegeben) versetzt, mittels RP-HPLC-MS untersucht (Abbildung 31 links). Wie im

Elugramm ersichtlich, kann durch die Zugabe von TCEP die Disulfidmenge reduziert werden (Abnahme des Signals bei  $t_R = 27,5$  min und Zunahme des Produktpeaks bei 23,5 min Elutionskurve), allerdings werden gleichzeitig zwei neue Produkte gebildet. Sie weisen Retentionszeiten von  $t_R = 18,1$  min und  $t_R = 19,3$  min auf. Durch Kopplung der RP-HPLC mit einem ESI-Massenspektrometer konnten die HPLC-Peaks modifizierten Makromolekülen zugeordnet werden. So konnte zum einen eine Struktur mit einem reduzierten Azid, sowie eine Struktur, bei welcher beide Azide zu primären Aminen reduziert wurden, den gefundenen Massen zugeordnet werden. Die Reduktion von Aryl-Aziden zu Aminen ist ebenfalls durch freie Thiole möglich ist.<sup>250</sup> Sichtbar wird dies bei Betrachtung der HPLC-Spektren derselben Probe (ohne TCEP) nach drei Tagen (Abbildung 31, rechts). Die Bildung der Aminprodukte ist ebenfalls zu erkennen, allerdings mit weniger starken Ausprägung. Folglich scheint durch die Reduktionsstärke von TCEP die Reduktion der Aryl-Azide zu Aminen beschleunigt (siehe Abbildung 31). Problematisch ist der dadurch resultierende Verlust von reaktiven Azid-Funktionalitäten, die essenziell für die Anbringung der molekularen Pinzetten sind. Zusätzlich können die neu entstandenen freien Amine an unerwünschten Nebenreaktionen nachfolgend, sowohl in der Funktionalisierung der Partikel als auch bei der CuAAC teilnehmen, was sich nachteilhaft auf die Gesamtsynthese auswirkt.

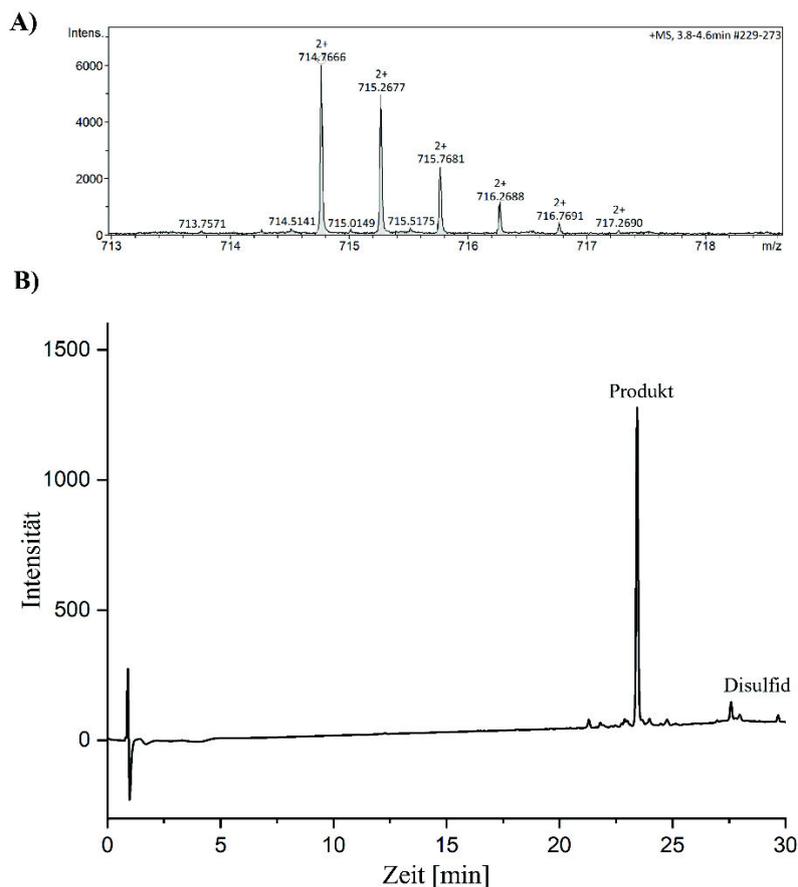
Im Gesamten stellte sich diese Methode als ungeeignete Aufreinigung für das makromolekulare Grundgerüst heraus, sodass dieser Ansatz verworfen wurde.



**Abbildung 31:** RP-HPLC-Spektren der Verbindung Cys-Medium-F-MM im Rohzustand (schwarzes Elugramm) sowie nach der Aufreinigung mit TCEP (blau, links) und dem Elugramm nach versetzten der Struktur mit TCEP nach drei Tagen (rotes Elugramm, rechts). Die jeweiligen Peaks der Produkte, der Disulfide und des reduzierten Nebenproduktes wurden zugeordnet. Elutionszeiten wurden aus den RP-HPLC-Messungen bei einem Lauf von 30 min, 25 °C und einem Eluenten 0-50 Vol.% MeCN in H<sub>2</sub>O erhalten.

Stattdessen wurde, um die Bildung der Nebenprodukte mit reduzierten Aziden als auch Disulfide möglichst gering zu halten, anschließend auf eine Aufreinigungsprozedur zurückgegriffen, bei welcher der Fokus auf einer zügigen Arbeitsweise liegt. Durch möglichst wenig Aufarbeitungszeit in Lösung soll die Bildung von Aminen und Disulfiden minimiert werden.

Das nach beschriebener Methode gewonnene Makromolekül wurde anschließend mittels RP-HPLC, HR-ESI-MS und  $^1\text{H-NMR}$  verifiziert (siehe Abbildung 32 und Kapitel 5). Die relative Reinheit, bestimmt durch Integration des UV-Signals der HPLC, beträgt 77 %. Das Disulfid besitzt einen Anteil von 16 %. Massen kleinerer Nebenprodukte konnten nicht weiter zugeordnet werden. Ohne zusätzliche Aufreinigung wurde in Absprache mit den Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe Epple aus der Universität Duisburg Essen das makromolekulare Gerüst zur Anbringung auf den ultrakleinen Goldnanopartikeln verwendet. Die Anbringung selbst bietet den Vorteil, dass nur Sequenzen mit einem freien Thiol angebracht werden können. Zusätzlich herrschen bei der Synthese der Funktionalisierung der Goldnanopartikel ebenfalls reduktive Bedingungen, die möglicherweise einen Teil der Disulfide reduzieren und somit die Anzahl an freien Liganden erhöhen. Weitere Abbruchsequenzen, insbesondere das Fehlen von EDS-Bausteinen, fallen möglicherweise nicht stark ins Gewicht, da zum einen auf Grund der kleinen Oberfläche die Makromoleküle dicht aneinander sitzen werden und durch Hydrierung und der damit einhergehenden Wasserstoffbrückenbindungen es ebenfalls zum Knäueln kommen kann. Des Weiteren bilden die Azide den essenziellen Teil der Sequenz, da diese für die Anbringung der molekularen Pinzetten unabdingbar sind. Die Anzahl der zur Verfügung stehenden Azide wurde vor Anbringung analytisch quantifiziert (Siehe Kapitel 3.3)

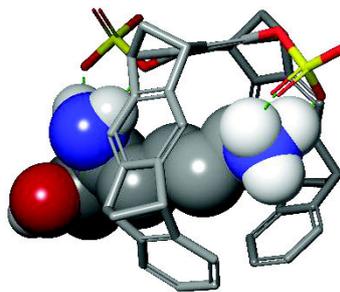


**Abbildung 32:** RP-HPLC-Chromatogramm (B) und HR-ESI-MS-Spektrum (A) der Verbindung Cys-Medium-F-MM. Peaks mit beschrifteten Produkt- und Disulfidpeak. RP-HPLC-Messung wurde bei 25 °C und einem Eluenten von 0-50 vol.% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min durchgeführt.

### 3.1.2 Konjugation der molekularen Tweezer an makromolekularen Gerüsten

Ziel der Arbeiten in diesem Kapitel war die Synthese eines ersten Satzes an so genannten divalenten Tweezer-Makromolekülen (TMs). Diese wurden ausgehend vom Liganden des molekularen Tweezers und sequenzdefinierten Oligoamidoamin-Gerüsten entwickelt. Diese wurden anschließend in biologischen Assays hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung bezüglich der Survivin-CRM1 Interaktion untersucht. Die dafür mittels Polymerfestphasensynthese synthetisierten sequenzdefinierten makromolekularen Gerüste (Kapitel 3.1.1) wurden neben der Voraussetzung zur Anbringung von zwei Pinzetten-Molekülen, hinsichtlich der zu überbrückenden Distanzen auf der Oberfläche des Proteins Survivin designed. Sie unterscheiden sich vor allem im Abstand zwischen den funktionellen Bausteinen, und somit in der Entfernung der Tweezer-Einheiten innerhalb eines Tweezer-Makromoleküls. Eingestellt wurden diese Abstände durch die Verwendung des Platzhalterbausteins EDS, der darüber hinaus die Flexibilität und Hydrophilie der Tweezer-Makromoleküle steigert. Die Anzahl der integrierten EDS-

Bausteine variiert von Null bis drei Einheiten. Um die Tweezer-Makromoleküle vor allem in Zellaufnahmen zu verfolgen und sichtbar zu machen, wurden die jeweiligen makromolekularen Grundgerüste ebenfalls mit FITC als Fluoreszenzfarbstoff versehen. Die makromolekularen Grundgerüste wurden, wie in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.1.1.1 genauer erläutert, mittels Festphasenpolymersynthese erfolgreich synthetisiert. Anschließend folgte die Anbringung der molekularen Pinzette an die, sich hauptsächlich in ihrem intramolekularen Abstand unterscheidenden, makromolekularen Gerüste. Der molekulare Tweezer wurde im Arbeitskreis von *Prof. Dr. Schrader* von *Antonio Bietti* und *Inesa Hadrović* synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Der molekulare Tweezer ist eine torusförmige Anordnung von sich abwechselnden Benzol- und Norbornanringen, wodurch eine elektronenreiche und unpolare Kavität geformt wird. Diese ist ideal geeignet kationische Seitenketten der Aminosäure Lysin im Inneren zu binden (Abbildung 33). Durch zwei zusätzliche Phosphatgruppen kommt es zur Ionenpaarbildung, wodurch die Seitenkette zusätzlich im Inneren gehalten wird.<sup>71</sup>



**Abbildung 33:** Bindung eines Lysinrestes in der Kavität des molekularen Tweezers (CLR01). Die Abbildung wurde mit Hilfe von Maestro 11.5 Schroedinger erstellt.

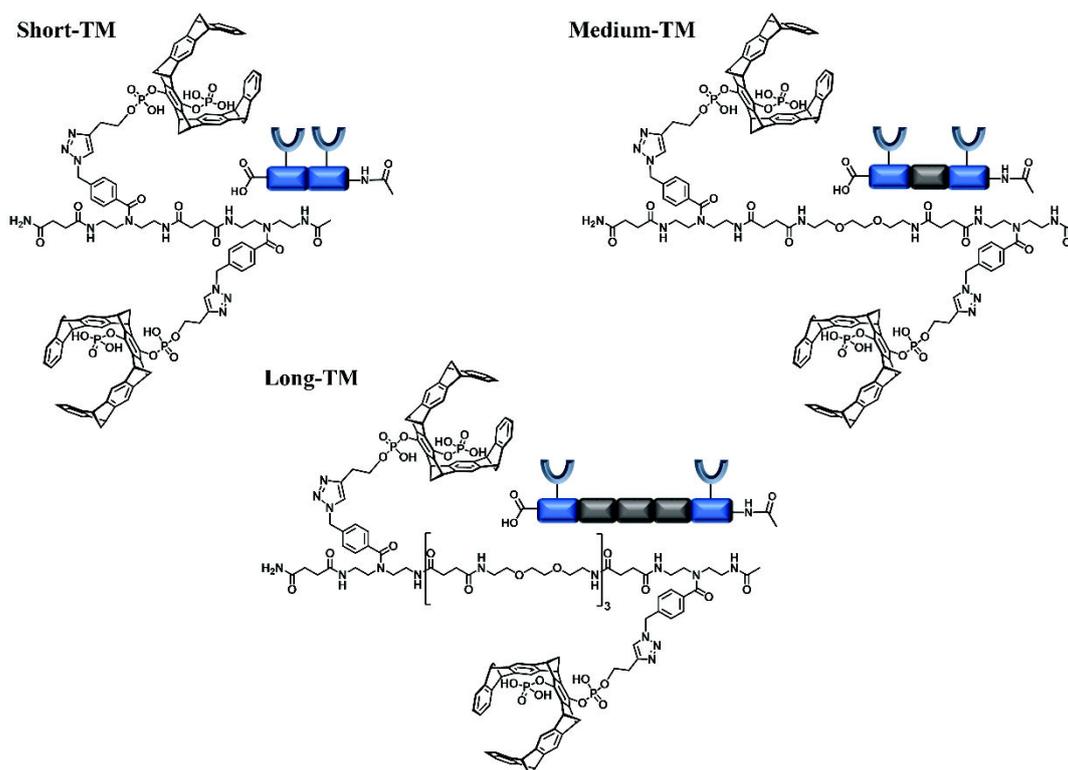
Durch die Funktionsweise dieses Bindungsmechanismus unter physiologischen Bedingungen ist der molekulare Tweezer bestens für die Modulation von Protein-Protein-Interaktionen geeignet.<sup>251, 252</sup> Um diesen Liganden erfolgreich mit den molekularen Gerüsten zu verbinden und potente Ligandensysteme zur Inhibierung von Survivin und CRM1 zu erhalten wurde die molekulare Pinzette um eine funktionelle Alkin-Gruppe durch *Schrader et al.* asymmetrisch erweitert.<sup>73</sup>

Durch die Azid-Funktionalität der makromolekularen Gerüste und der Alkin-Funktionalitäten des molekularen Tweezers erfolgte die Anbringung mittels einer Cu(I) katalysierten Azid-Alkin-Cyclodaddition. Der Definition nach müssen die unter diesen Begriff fallenden Reaktionen modular, mit einer breitgefächerten Anwendbarkeit sein. Darüber hinaus liefern sie einfach

aufzuarbeitende, stereospezifische, chemische Verbindungen in sehr hohen Ausbeuten.<sup>253</sup> Auf Grund dessen und der vielfältigen Anwendungsgebieten blieb die Klickchemie bis heute ein beliebtes Forschungsgebiet. Besondere Aufmerksamkeit bekam die Klickchemie mit der Vergabe des Nobelpreis 2022 an *Carolyn Bertozzi*, *Morten Meldal* und *Barry Sharpless*.<sup>254</sup>

In dieser Arbeit wurde zur erfolgreichen Synthese der CuAAC das von *Sharpless* beschriebene System aus Cu(II) und Natriumascorbat verwendet. Im ersten Anlauf wurde analog zu Inesa Hadrović s Synthesen verfahren.<sup>233</sup> Hierzu wurden 1 Äq. des Short-MM Makromoleküls und 2.2 Äq. der molekularen Pinzette in einem 1:1 Gemisch aus H<sub>2</sub>O/THF gelöst. Obwohl die Reaktion Sauerstoff toleriert, wurde das Gemisch vor Zugabe von 22 µL frisch destilliertem DIPEA für 10 min mit Argon gespült. Anschließend wurde das Katalysatorgemisch aus 8,3 mg CuSO<sub>4</sub> und 13 mg Natriumascorbat in 1 mL Wasser vorgelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 18 h konnte der Verbrauch von Cu(II) an der blau-Färbung der Lösung erkannt werden. Leider zeigte sich eine Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie als nicht erfolgreich, weshalb erneut Base und Katalystorgemisch zugegeben wurde und für 8 h weiter bei Raumtemperatur gerührt wurde, um einen möglichst vollständigen Umsatz zu gewährleisten. Anschließend wurde durch Zugabe von 2,5 %iger Salzsäurelösung die Reaktion gequentscht. Hierbei formte sich das gewünschte Produkt als weißer ausfallender Niederschlag. Nach Entfernung des organischen Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Niederschlag durch Zentrifugation, gefolgt von aufeinanderfolgenden Waschschrinen mit 2,5%iger Salzsäure und Wasser gereinigt. Das Waschen mit Salzsäure hat zudem den Vorteil Kupfersalze effektiv aus dem System zu waschen. Auf Grund der geringen Mengen, ist diese Aufreinigung gegenüber der Filtration über eine Fritte hinsichtlich Handhabung und Produktverlust von großem Vorteil. Um Überschüssige Pinzette loszuwerden, wurde zwischen den Waschschrinen mit Acetonitril/Wasser 1:1 gewaschen. Als letzter Schritt wurde das Produkt lyophilisiert wonach es als sandfarbener Feststoff gewonnen wurde. Durch die saure Behandlung der Reaktionsmischung wurde das Produkt mit freien Phosphorsäuren erhalten. Die Vermessung des Produktes mittels RP-HPLC blieb leider erfolglos. Dennoch konnte mittels <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>P-NMR und MALDI-TOF-MS die erfolgreiche Synthese bestätigt werden (siehe Kapitel 5.2 und Exprimentalteil). Um die Verbindungen in den nachfolgenden biologischen Assays einsetzen zu können wurden die Phoshorsäuren mit Natriumhydroxid (6 Äq.) deprotoniert um somit die Löslichkeit in wässrigen Medien zu gewährleisten.

Durch diese Reaktionsvorschrift konnten drei divalenten Tweezermakromoleküle synthetisiert werden, die sich maßgeblich in ihrem Ligandenabstand und folglich in ihrer Konturlänge unterscheiden. Durch die unterschiedliche Anzahl an EDS-Einheiten, die für die Einstellung der Ligandenabstände genutzt wurden, weisen die drei Tweezermakromoleküle ebenfalls unterschiedliche Grade an Flexibilität auf. Die in Abbildung 34 gezeigten finalen Strukturen konnten in moderaten Ausbeuten erhalten werden. Klick Reaktionen sind zwar mit hohen Ausbeuten postuliert, dennoch ist der molekulare Tweezer ein anspruchsvoller Ligand, der im Gegensatz zu den verwendeten Grundgerüsten eine geringe Löslichkeit in wässrigen Phasen aufweist. Dies könnte durchaus zu einer verringerten Ausbeute führen. Der Fakt, dass der molekulare Tweezer eine sehr wertvolle Resnot darstellt, machte eine Optimierung hinsichtlich der Reaktionsbedingungen unmöglich. Aufarbeitungsschritte können des Weiteren ebenfalls zu einer Minimierung der Ausbeute führen. Ebenso wie das Belüften nach Lyophilisierung, das erhaltene Produkt sowohl in kleinen Mengen als auch als feines Pulver erhalten wurde.



**Abbildung 34:** Strukturen und schematische Darstellung der final synthetisierten Tweezer-Makromoleküle Short-TM, Medium-TM, Long-TM.

In Abbildung 35 sind beispielhaft die  $^1\text{H-NMR}$  Spektren der Verbindungen Medium-MM (oben, blau) und Medium-TM (Mitte, grün) vergleichend übereinandergelegt gezeigt.

Besonders auffallend ist die Verschiebung des Signals der verbrückenden Methylprotonen des BADS-Linkers (blau hinterlegt). Sie sind für Verbindung Medium-TM deutlich weniger abgeschirmt im Tieffeld zu finden. Dies liegt an der Verknüpfung der molekularen Pinzette mit dem makromolekularen Grundgerüst, wodurch das benachbarte Azid zum Triazol verändert wird. Das neu gebildete Triazol kann durch das Protonsignal bei 8.11-8.06 ppm nachgewiesen werden (pink hinterlegt). Im Vergleich zum makromolekularen Grundgerüst sind zusätzlich die durch die molekulare Pinzette entstandenen Signale zu sehen. Diese sind im Spektrum des Tweezer-Makromoleküls in hellgrün (Succinimid)/grün hinterlegt. Die Backbone Signale bleiben, abgesehen von der Aufspaltung, durch die Verknüpfung weitestgehend unbeeinflusst. Stark im Hochfeld liegend fallen Signale der verbrückenden Methylgruppen der molekularen Pinzette mit Signalen der Bernsteinsäure aus dem Backbone zusammen.

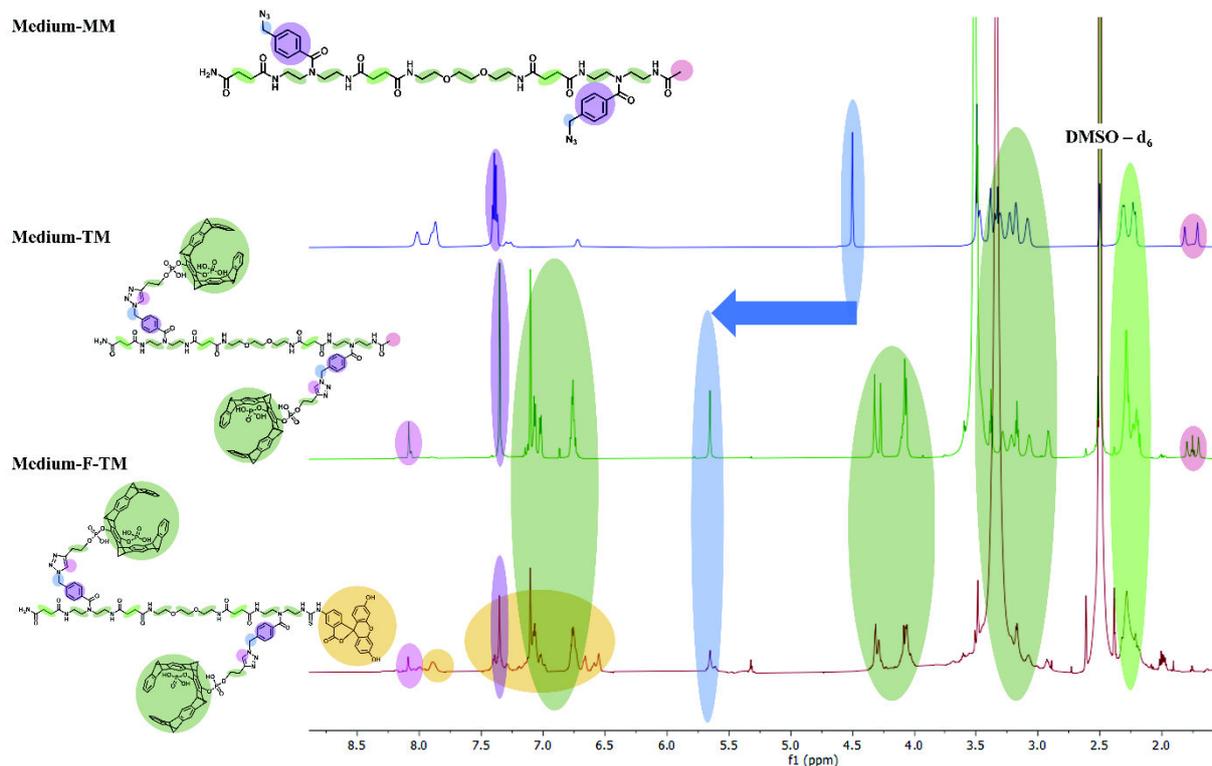
Für die fluoreszenz-markierten Makromoleküle wurde die erste Verbindung aus Short-F-MM und molekularer Pinzette ebenfalls nach eben beschriebener Syntheseroute synthetisiert. Hierbei war es wichtig auf Grund des Fluorophors und dessen Photobleaching darauf zu achten, dass die Reaktionen im Ausschluss von Licht durchgeführt wurden. Da auch in diesem Fall die Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie nicht möglich war wurde auch hier bei Auftreten der Blaufärbung erneut Katalysatorsystem und Base zugegeben und die Reaktionszeit um weitere 8 h verlängert. Nach der Aufarbeitung, bei der Betrachtung der Analytik zeigte sich, dass das Produkt kaum gebildet wurde. Folglich führt die Übertragung der Reaktionsbedingungen hier nicht zum Erfolg. Hauptverantwortlich ist hierbei der Fluorophor. Durch ihn kommt es neben der Erhöhung der gesamten molekularen Masse zur sterischen Abschirmung des am N-Terminus befindlichen Azids des BADS-Bausteins. Ebenso führt die Einführung eines konjugierten  $\pi$ -Systems zur Erhöhung der Hydrophobizität, wodurch die Löslichkeit im wässrigen Gemisch weiter reduziert wird. Die Wasserlöslichkeit wird ebenso weiter negativ durch mögliche  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen zwischen Fluorophor und der molekularen Pinzette beeinflusst.

Die Gewinnung der molekularen Pinzette basiert auf einer anspruchsvollen 19-Stufen Synthese, die vor allem Zeit beansprucht und die molekulare Pinzette somit zu einem wertvollen Gut macht. Durch die dadurch limitierte Menge an zur Verfügung stehender molekularer Pinzette war es nicht möglich ein Screening bezüglich der besten Kupplungsbedingungen durchzuführen. Folglich wurde basierend auf den Überlegungen, die die Synthese negativ beeinflusst haben, die Syntheseroute bestmöglich angepasst. Hierfür wurde der THF-Gehalt in der Reaktionslösung für eine bessere Löslichkeit angepasst. Ebenso wurde von einem konzessiven Ansatz

auf einen konsekutiven Ansatz umgestellt, in welchem die Äquivalente der molekularen Pinzette an die zu klickenden Positionen aufgeteilt und nacheinander zugegeben wurden. In diesem Fall wurde 1 Äq. des Short-MM Makromoleküls und vorerst nur 1.1 Äq. der molekularen Pinzette in einem 1:1,5 Gemisch aus H<sub>2</sub>O/THF gelöst. Anschließend wurde frisch destilliertes DIPEA zugegeben und erneut für 10 min mit Argon gespült. Anschließend wurde das Katalysatorgemisch in 1 mL Wasser vorgelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 18 h konnte auch hier der Verbrauch von Cu(II) an der blau-Färbung (Cu(I)) der Lösung erkannt werden. Anschließend wurde die zweite Hälfte der molekularen Pinzette (1.1 Äq.) in 1 mL THF gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Auch wurde erneut 22 µL Base und gleiche Mengen an Katalystorgemisch zugegeben. Nach 8 h Rühren bei Raumtemperatur wurde dann erneut eine kleine Menge an Katalysatorgemisch (4,1 mg CuSO<sub>4</sub> und 6,5 mg Natriumascorbat) in 0,5 mL Wasser vorbereitet, zugegeben und für weitere 18 h zur Reaktion gebracht. Darauf folgte das Quenchen der Reaktion durch Zugabe von 2,5 %iger Salzsäurelösung zur Reaktion. Hierbei formte sich ein orange/gelber Niederschlag. Die weiter Aufarbeitung wurde nicht weiter geändert. Hierbei wurde ebenfalls dauerhaft auf den Ausschluss von Licht geachtet. So wurde nach Entfernung des organischen Lösungsmittels unter vermindertem Druck der Niederschlag durch Waschen und Zentrifugation aufgereinigt. Nach Lyophilisierung konnte das Produkt als orangefarbener Feststoff erhalten werden. Alle drei Ligandensysteme konnten in moderaten bis geringen Ausbeuten erhalten werden. Ihre erfolgreiche Synthese wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>P-NMR und MALDI-MS (siehe Kapitel 5.2 und Experimentallteil) nachgewiesen. Um die Verbindungen in den nachfolgenden biologischen Assays einsetzen zu können wurden die Phosphorsäuren mit Natriumhydroxid (6 Äq.) deprotoniert um somit die Löslichkeit in wässrigen Medien zu gewährleisten.

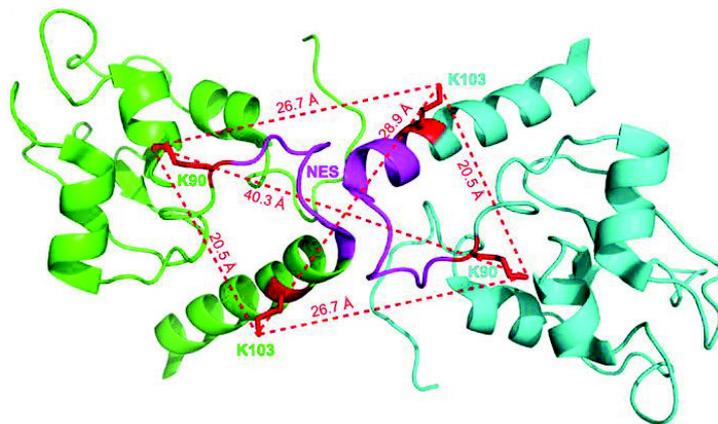
Durch die Umstellung auf das iterative Verfahren konnte die Generation der divalenten Tweezer-Makromoleküle um drei weitere Tweezer-Makromoleküle, die am N-Terminus einen Fluorophor tragen erfolgreich erweitert werden. Diese drei Ligandensysteme unterscheiden sich ebenso innerhalb ihres Tweezerabstandes, der durch die EDS-Einheiten variiert wurde. Mit steigender Anzahl an EDS-Einheiten ist von einer Erhöhung der Flexibilität des Systems auszugehen. Der Fluorophor bietet die Möglichkeit eines optischen Read-outs, welcher hauptsächlich für biologische Assays notwendig ist.

Abbildung 35 zeigt die  $^1\text{H}$ -NMR Spektren des makromolekularen Grundgerüst Medium-MM, des Tweezer-Makromoleküls Medium-TM und des Fluorophore-tragenden Tweezer-Makromolekül Medium-F-TM vergleichend. Das am weitesten ins Hochfeld verschobene Signal der Acetylprotonen ist sowohl beim reinen makromolekularen Grundgerüst als auch bei der Verbindung Medium-TM zu finden (hellrot markiert). Bei der fluoreszenz-markierten Struktur Medium-F-MM geht dieses Signal verloren, stattdessen sind die Signale des Fluorophors im aromatischen Bereich als mit aromatischen Signalen der Verbindung überlappendes Multiplett zu finden (hellgrün). Bei beiden Tweezer-Makomolekülen ist die in blau markierte Verschiebung der verbrückenden Methylprotonen zu höheren ppm deutlich zu sehen. Das als Multiplett erscheinende Signal bei der Verbindung Medium-F-TM lässt sich auf die enge räumliche Nachbarschaft des BADS und der daran befindlich molekularen Pinzette zum Fluorophore erklären. Auch die weniger klaren Multipletts können dadurch erklärt werden. Weitere Multipletts die Tweezer – Protonen enthalten sind in den Spektren der Tweezer-Makromoleküle grün markiert und weiter im Tieffeld zu finden.



**Abbildung 35:** <sup>1</sup>H-NMR der Verbindungen Medium-MM (blau, Oben) und Medium-TM (grün, Mitte) und Medium-F-TM (rot, Unten) übereinandergelegt. Die Spektren wurden jeweils auf das Lösungsmittelrestsignal von DMSO-d<sub>6</sub> gelockt.

Nachdem die Reihen an Tweezer-Makromolekülen erfolgreich synthetisiert wurden, wurden sie hinsichtlich ihrer Affinität und des Potenzials zur Überbrückung zweier Lysine auf der Oberfläche von Survivin betrachtet. Hierfür wurden zuerst DOSY-NMR Experimenten von *Dr. Christine Beuck* aus der Universität Duisburg-Essen mit den drei Konstrukten Short-TM, Medium-TM und Long-TM zur Ermittlung des Zustandes in Lösung und der Hydrodynamischen Radien durchgeführt. Anschließend wurden die über MD-Simulationen (durchgeführt von Inesa Hadrović der Universität Duisburg-Essen) ermittelten Abstände innerhalb der jeweiligen Tweezer-Makromoleküle hinzugezogen und mit dem realen Zustand, den erhalten Werten aus den DOSY-NMR Experimenten verglichen (**Tabelle 5**).



**Abbildung 36:** Darstellung des Survivin Homodimers und die gemessenen Abstände zwischen den Lysinresten K90/K90' und K103/K103'. (PDB ID: 1XOX).

**Tabelle 5:** Tweezerabstände und hydrodynamische Durchmesser  $d_H$  von zweiwertigen TMs, bestimmt durch MD-Simulation und DOSY-NMR. \*Als Referenzpunkt wurde das erste aromatische Proton (an welchem der Linker covalent gebunden ist) des Tweezers verwendet.

	Short-TM	Medium-TM	Long-TM
Pinzetten Entfernung* (MD) [Å] (gestreckte Konformation)	45,7	60,7	92,7
Pinzetten Entfernung* (MD) [Å] (energetisch günstige Konformation)	19,1	42,8	38,6
$d_H$ (DOSY) [Å]	20,2	22,4	22,2

So ist gemäß der MD-Simulation für günstige energetische Konformationen die Überbrückung der zwei entferntesten Lysine im Survivin-Dimer für den Medium-TM ohne zusätzliche Streckung möglich. Der stärkste in der Konturlänge, Long-TM, kann hingegen ohne zusätzliche Streckung nur die kleineren Distanzen im Dimer überbrücken. Werden jedoch die hydrodynamischen Durchmesser, die aus den DOSY-NMR-Messungen erhalten wurden, betrachtet, ist nur die kürzere Überbrückung von zwei Lysinen im Survivin-Monomer ohne zusätzliche Streckung für alle drei Tweezer-Makromoleküle möglich. Bereits bei den MD-Simulationen zeigt sich, dass es für die Tweezer-Makromoleküle energetisch günstig ist, eine in sich gewundene Konformation anzunehmen, die maßgeblich durch die flexiblen Ethylenglykoleinheiten der EDS-Bausteine und die intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung der Amidbindungen möglich ist. Diese Konformation führt wiederum zu kürzeren Pinzettenabständen im Vergleich zu einer vollständig gestreckten Konformation.<sup>152, 235</sup> Der Blick auf die durch DOSY-NMR

ermittelten hydrodynamischen Durchmesser, die ebenfalls eine zusätzliche Abnahme der Größe zeigt, bestätigt durch die starke Größenabnahme das bereits angenommene Knäulverhalten der Strukturen. Interessanterweise zeigt der makromolekulare Ligand mit der längsten Konturlänge (Long-TM,  $n=3$ ) sowohl in energetisch günstiger Konformation als auch im hydrodynamischen Durchmesser einen geringeren Wert, als Medium-TM ( $n=1$ ), was höchstwahrscheinlich auf eine stärkere Knäulung durch die vermehrte Anzahl an möglichen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen ist. Obwohl eine Flexibilität des Linkers häufig bei multivalenten Konstrukten als Nachteil angesehen wird, z. B. aufgrund eines höheren Entropieverlusts bei der Bindung gesehen wird,<sup>231, 237</sup> ist in dieser Arbeit die Annahme, dass eine gewisse Flexibilität der Strukturen vorteilhaft, wenn nicht sogar notwendig ist, um sich der ebenso flexiblen Zieloberfläche, wie in diesem Fall der NES-Schleife des Survivins, anzupassen.

Hinzu kommt, dass makromolekulare Liganden, wie in dieser Arbeit von einer sterischen Abschirmung profitieren. Hierfür ist der Bindungsmodus nicht ausschlaggebend, sodass dies sowohl im ein- als auch im zweiwertigen gebundenen Zustand einen positiven Effekt hat.<sup>76, 152, 235</sup> Zusätzlich weisen mehrwertige Liganden eine erhöhte statistische Bindung auf, welche in einer erhöhten Avidität resultiert, selbst wenn keine simultane Bindung der beiden Tweezer-Motive eintritt.

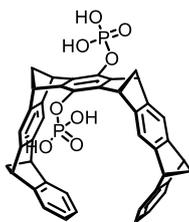
Zur genauen Betrachtung der Affinität sowie des Inhibitionsvermögens der einzelnen Verbindungen sowie zur Untersuchung des Einflusses ihrer Architektur, wurden biologischen Assays durchgeführt. Diese werden im nachfolgenden Kapitel genauer betrachtet.

### **3.2 Bindungsstudien zu den divalenten Tweezer-Makromolekülen an Survivin**

Die Erkennung des Survivin-Proteins durch seinen kognitiven Rezeptor CRM1 ist ein relevantes Beispiel für eine pathobiologisch bedeutende PPI. Dadurch, dass Survivin in der Regel in gesundem Gewebe nicht vorhanden, aber in fast allen Arten von Krebszellen überexprimiert ist, wird es mit einer Resistenz gegen Chemo- und Strahlentherapie in Verbindung gebracht.<sup>200, 201</sup> Daher gilt Survivin als ein wichtiges Ziel für die potenzielle Entwicklung neuer und besserer Anti-Tumor-Therapien.<sup>229, 255</sup> Eine Strategie besteht in der Hemmung der Interaktion mit seinem Kernexportrezeptor CRM1. Sowohl für die Rolle als Apoptose hemmendes Protein, als auch für die mitotische Regulation ist die Interaktion mit seinem Kernexportrezeptor CRM1 von zentraler Bedeutung. Vermittelt wird diese Interaktion durch das Kernexportsignal (NES).

Da CRM1 nicht nur als Nuklearexportrezeptor für Survivin fungiert, beeinträchtigt folglich ein CRM1-Inhibitor auch den intrazellulären Transport anderer Proteine, wodurch wichtige biologische Prozesse gestört werden.<sup>230, 256, 257</sup> Folglich sollten geeignete Inhibitoren auf Survivin zugeschnitten werden, um diese Interaktion selektiv zu stören.

Nun sollen die erhaltenen Moleküle hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Survivin-Crm1-Interaktion untersucht werden. Zusätzlich wurde der Einfluss des Ligandenabstands und die Erhöhung der Valenz, sprich der Vergleich zwischen einem monovalenten Tweezer zu den synthetisierten divalenten Strukturen untersucht. Hierfür wurden eine Reihe an biologischen Assays durchgeführt, die in nachfolgenden Kapiteln näher ausgeführt sind. Als Referenz wird in einigen Assays der monovalente Tweezer CLR01 verwendet, der bereits in vorausgegangenen Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse geliefert hat (Abbildung 37).



**Abbildung 37:** Struktur des monovalenten Tweezers CLR01.

### 3.2.1 ITC

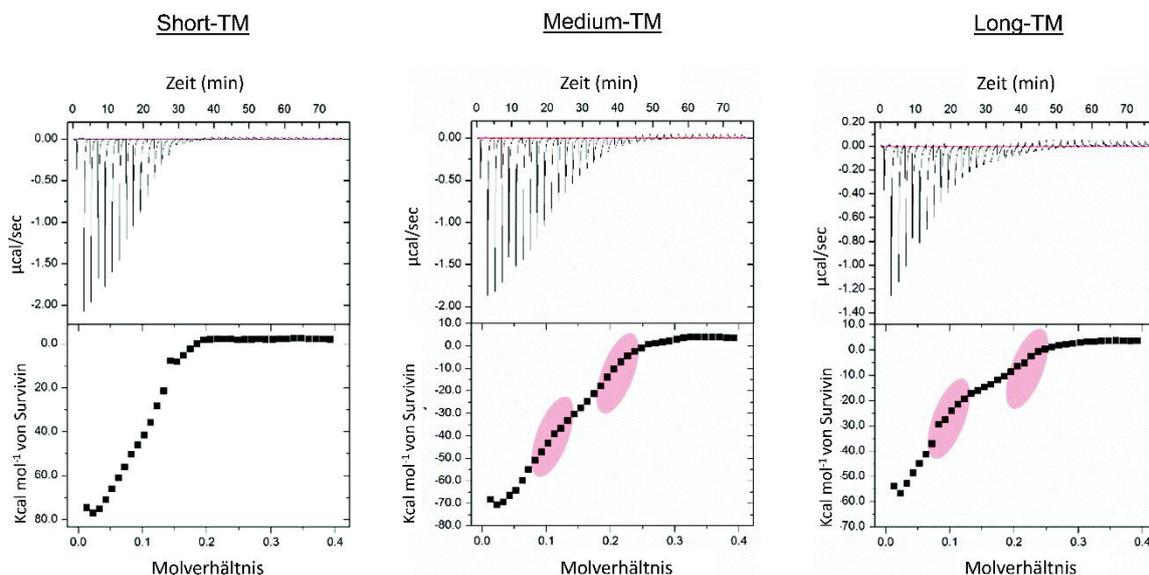
Um nun tiefere Einblicke in die direkte Bindung der Tweezer-Makromoleküle an Survivin zu erlangen, wurde als erstes isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt. Diese Messungen wurden von den Kooperationspartnerinnen *Inesa Hadrović* aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Schrader* und *Annika Meiners* aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Shirley Knauer* durchgeführt.

Bei einer ITC-Messung wird die Wärmeenergie gemessen, die bei einer molekularen Wechselwirkung zwischen zwei Substanzen freigesetzt oder aufgenommen wird. Dies ermöglicht die Bestimmung thermodynamischer Parameter, wie die freie Gibbsche Energie ( $\Delta G$ ), die Bindungsenthalpie ( $\Delta H$ ), die Bindungsentropie ( $\Delta S$ ) und die Gleichgewichtsassoziationskonstante ( $K_A$ ) in einem einzigen Experiment. Mit Hilfe dieser Daten können Einblicke in die Stärke und Art der Wechselwirkung, von Proteinen und Liganden gewonnen werden.<sup>258-260</sup> Allerdings liefert ITC keine Informationen über Wärmeänderungen auf molekularer Ebene, sodass diese

Methode immer Unterstützung einer anderen Technik erfordert um die Ergebnisse verbindlich zu erklären.<sup>261</sup>

Um die Bindungskonstanten mit dieser Methode zu ermitteln, wurde sowohl die direkte Titration als auch die umgekehrte Titration angewandt. Liegt das Protein in der Messzelle vor und der Ligand wird hinzutitriert, so wird von einer direkten Titration gesprochen. Wird das Protein zum Liganden titriert, so ist die Rede einer umgekehrten Titration.

Für beide Messungsarten konnten steile exotherme Bindungskurven erzielt werden. Allerdings sind vor allem bei der umgekehrten Titration scharfe Knickpunkte am Sättigungsplateau zu erkennen. Diese sind bereits bei der Verbindung Medium-TM gut sichtbar und für die Verbindung Long-TM stark ausgeprägt. Aus dem Kurvenprofil lässt sich ein sequenzielles Bindungsereignis, das aus zwei konsekutiven Bindungsschritten besteht, ableiten. In Abbildung 38 sind die signifikanten Stellen in rot markiert. Vorzustellen ist ein solches mögliches Bindungsereignis beispielsweise dann als Bindung von K90 durch einen molekularen Tweezer und anschließender Bindung von K103 durch den zweiten, am selben Makromolekül befindenden molekularen Tweezer.

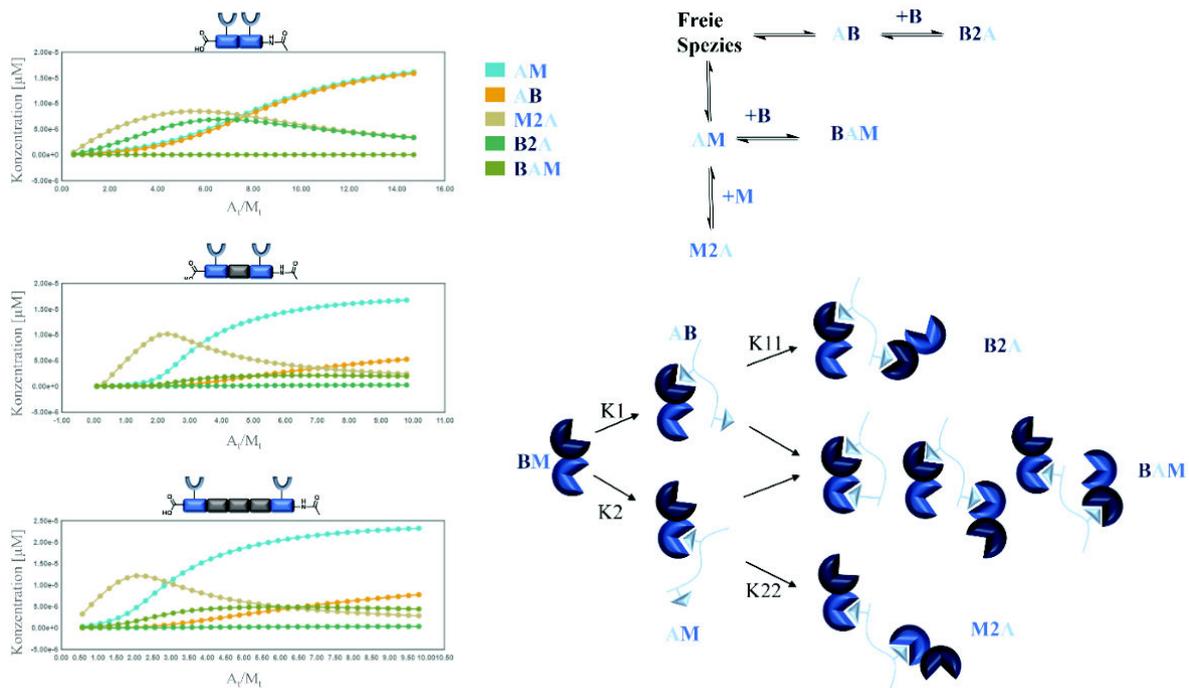


**Abbildung 38:** ITC Thermogramm und Bindungsisotherme aus der Bindung der Verbindungen Short-TM, Medium-TM und Long-TM an Survivin. Erhalten wurden die Thermogramme und Bindungsisothermen durch umgekehrte Titration.

Aus diesem Grund konnten die Bindungskurven nicht mit Standard-Bindungsmodellen angepasst und folglich quantitativ ausgewertet werden. Werden die Bindungskurven dennoch vergleichend mit der des monovalenten molekularen Tweezer CLR01 betrachtet, zeigt sich ebenfalls ein Unterschied, der auf einen veränderten Bindungsmodus hindeutet.<sup>74</sup> Ursächlich ist neben der divalenten Präsentation des molekularen Tweezers ebenfalls das Grundgerüst zwischen den

beiden bindenden molekularen Tweezer-Einheiten. Die zusätzlich, vor allem bei höheren Konzentrationen auftretenden endothermen Peaks, sind für die einzelnen Verbindungen unterschiedlich ausgeprägt und steigen in ihrer Intensität mit der Konturlänge der jeweiligen Verbindung. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt könnte eine Aggregation oder Ausfallen der Probe bzw. des Komplexes sein.

Zusätzlich wurde eine direkte Titration, bei welcher das Protein bereits in der Zelle vorliegt, und die Liganden hinzutitriert werden, durchgeführt. Die erhaltenen Kurven wurden mit einem Modell, bei welchem zwei unabhängige Bindungsstellen vorliegen, ausgewertet. Die daraus erhaltenen thermodynamischen Daten wurden mit Hilfe der Affinimeter-Software „cloud-Version“ ausgewertet (Abbildung 39). Aus diesen Daten geht hervor, dass die höher affine Bindungsstelle eine niedrigere Enthalpie aufweist. Allerdings spiegelt dieser Fit nur bedingt die Komplexität des Systems wider. Folglich wurde ein eigenes Modell entwickelt, das neben einem zweiwertigen Liganden einen ebenso zweiwertigen Rezeptor enthält, um die zentralen Bindungsereignisse zu berücksichtigen.



**Abbildung 39:** Speziesverteilungsdiagramme (links) aus direkter Titration der jeweiligen divalenten Tweezer-Makromoleküle basierend auf einem Modell, dass neben einem zweiwertigen Liganden einen ebenso zweiwertigen Rezeptor enthält. Aufgetragen ist hierbei die Konzentration gegen das molare Verhältnis von Titrant zu Titrat ( $A_v/M_i$ ). Mögliche Bindungsereignisse der divalenten Liganden und eines zweiwertigen Rezeptors sind rechts in der Abbildung dargestellt.

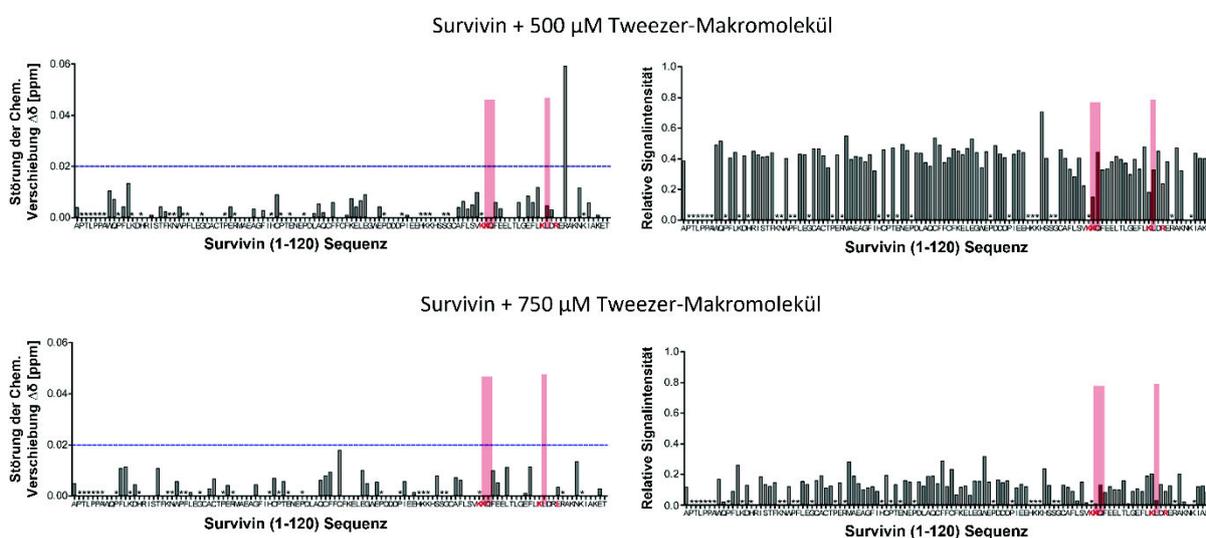
Für das kürzeste Tweezer-Makromolekül ergibt sich ein Speziesverteilungsdiagramm, das bevorzugt die Spezies MA und MB gebildet. Liegt jedoch ein Überschuss an Protein vor, so werden bevorzugt M2A und M2B gebildet. Die Bildung der Spezies MAB geht hier nicht hervor. Ganz anders ist es jedoch für die beiden anderen Liganden Medium-TM und Long-TM. Aus ihren Speziesverteilungsdiagrammen geht die Bildung des MABs hervor. Ebenso scheint für diese Liganden die Bildung von MA stärker zu sein als die von MB, wodurch davon auszugehen ist, dass zuerst die Bindung an der Bindungsstelle mit höherer Affinität erfolgt und anschließend die Bindung mit höherer Enthalpie auftritt. Die thermodynamischen Daten lassen ebenso darauf schließen, dass das System dazu neigt die Gesamtentropie zu minimieren. So ist die Bindung zweier Liganden an ein Protein entropisch günstiger als die gewünschte 1:1 Bindung. Folglich ist eine Verbrückung mehrerer Proteine durch die divalenten Liganden nicht unwahrscheinlich (Abbildung 39).

### 3.2.2 NMR-Titration

Zur genaueren Betrachtung der durch ITC gewonnenen Ergebnisse wurde anschließend von *Dr. Christine Beuck* aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Bayer* der Universität Duisburg-Essen eine

NMR-Titration mit  $^{15}\text{N}$ -markiertem Survivin durchgeführt. Diese Methode dient zur Spezifizierung durch Kartierung der Bindung der Tweezer an bestimmte Aminosäurereste von Survivin. Hierzu wird der jeweilige makromolekulare Tweezer-Ligand bis zu einer äquimolaren Menge an  $^{15}\text{N}$ -markiertem Survivin hinzutitriert. Durch Bindung des Liganden an Survivin wird eine Signalverschiebung als auch häufig reduzierte Signalintensitäten für die jeweiligen an der Bindung beteiligten Aminosäurereste induziert. Mit dieser Methode konnte bereits in einem vorausgegangenen Experimenten mit einem Tweezer-Peptid an Survivin die Regioselektivität des Liganden erfolgreich gezeigt werden.<sup>74</sup>

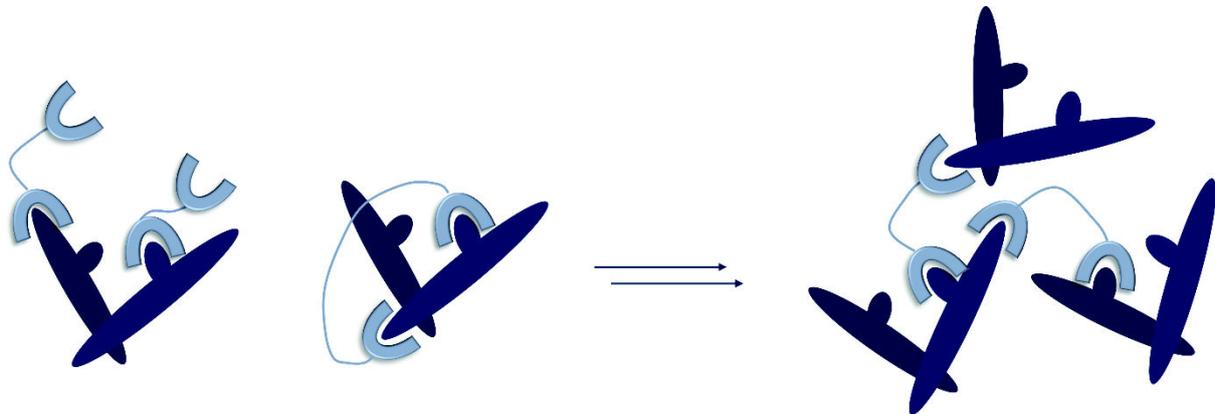
Die NMR-Titration wurde vorerst mit dem kürzesten Liganden Short-TM bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  und anschließend bei 750  $\mu\text{M}$  durchgeführt.



**Abbildung 40:** Störung der chemischen Verschiebung und relative Signalintensitäten der NMR-Titration von Survivin mit 500 M (oben) und 750 M (unten) Short-TM.

Dabei zeigt sich für beide Messungen keine Signalverschiebung (Abbildung 40). Auch eine Intensitätsverringern ist für die Aminosäurereste um K90 und K103 kaum vorhanden und somit wenig spezifisch. Auffällig ist eine zu verzeichnende Intensitätsverringern für alle Aminosäurereste. Sowohl die chemische Verschiebung als auch die relativen Signalintensitäten offenbaren bereits verschiedene Bindungsmodi, die unter anderem auf eine Aggregation und Ausfallen des Proteins bzw. Protein-Ligand-Komplex hindeuten, wodurch keine Spezifizierung möglich war. Möglicherweise findet, vor allem bei höheren Konzentrationen, nicht nur das erhoffte Bindungsereignis zwischen einem divalenten Tweezer-Makromolekül und Survivin statt, sondern auch eine Art der intermolekularen Verbrückung (cross-linking) und somit eine Komplexbildung. Dieser Komplex kann dann ebenfalls durch weitere Tweezer-Makromoleküle

mit weiteren Survivin-Einheiten verbrückt werden, so wie es in Abbildung 41 vereinfacht schematisch dargestellt ist. Diese These kann durch die Abnahme der gesamten Signalintensität, statt der Abnahme einer bestimmten Region, gestützt werden.



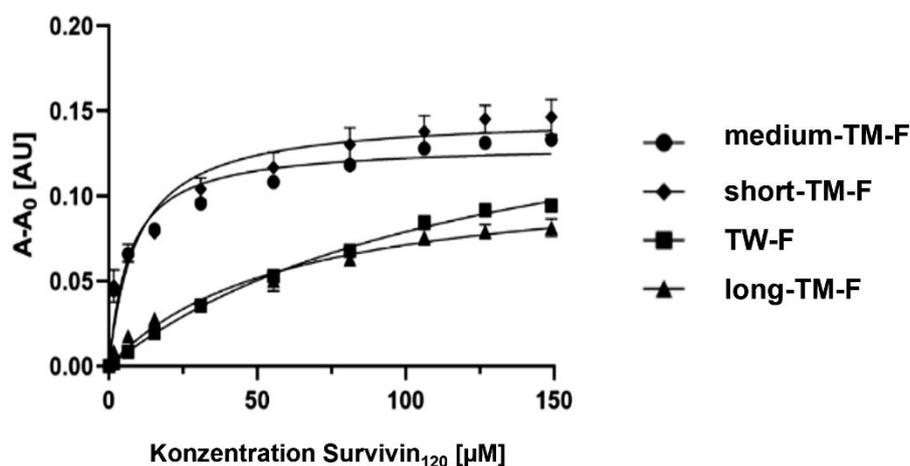
**Abbildung 41:** Schematische Darstellung der Verbrückung mehrerer Survivin-Proteine durch divalente Tweezer-Makromoleküle.

Auf Grund des beobachteten Verhaltens ist die Methode als Misserfolg zu verzeichnen, wodurch auf die Vermessung der übrigen anderen divalenten Tweezer-Makromoleküle verzichtet wurde. Dennoch ist anzumerken, dass die Ergebnisse der NMR-Titrations und die gesammelten ITC-Daten eine Korrelation aufweisen. Selbst wenn die mehrfache Verbrückung, die vermeintlich zur Aggregation führt nicht direkt das stufenweise Bindungsereignis, auf das die ITC-Titrationskurven hinweisen zeigt, so stützt es dennoch die bereits durch ITC postulierte Aggregation und das darauffolgende Ausfallen des Komplexes.

### 3.2.3 Fluoreszenzpolarisation

Um weitere Einblicke in die Bindung der Tweezer-Makromoleküle zu erlangen, wurde als weiteres Experiment ein Fluoreszenz-Anisotropie Assay zusammen mit *Dr. Annika Lennartz* der Universität Duisburg Essen durchgeführt. Dieser gibt nicht nur Aufschluss darüber, ob eine Bindung an die Oberfläche des Proteins stattfindet, sondern auch, ob der jeweilige Ligand die Fähigkeit besitzt, die Survivin-CRM1 Interaktion zu inhibieren. Hierfür wurden die FITC-markierten divalenten Tweezer-Makromoleküle hinsichtlich ihrer Bindung an Survivin120 mittels Fluoreszenz-anisotropie untersucht. Die Daten wurden auf die gemessene Anisotropie  $A_0$  in Abwesenheit des Proteins normiert. Ausgewertet wurden die Daten auf Grund der Komplexität dieses multivalenten Bindungsereignis mittels eines Single-Site-Bindungsmodell, wodurch die Bindungsaffinitäten  $131 \pm 21 \mu\text{M}$  für den unmodifizierten Tweezer TW-F,  $9,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$  für den kurzen divalenten Short-TM-F,  $7 \pm 2 \mu\text{M}$  für den mittleren Medium-TM-F sowie  $59,3 \pm$

0,9  $\mu\text{M}$  für den langen Long-TM-F betrogen. Zwar bildet ein Single-Site-Bindungsmodell den realen Zustand nur geringfügig ab, wie bereits die ITC-Titration und das NMR-Titrationsexperiment vermuten lassen. Dennoch lässt sich ein erster Vergleich der unterschiedlichen Liganden untereinander aufstellen. So zeigt dieses Experiment ebenfalls die erfolgreiche Bindung an die Oberfläche von Survivin. Wird der monovalente Ligand TW-F im Vergleich zu den divalenten Systemen betrachtet, so zeigt sich hier ein deutlicher Anstieg der Bindungsaffinität. Diese Affinitätssteigerung kann mit dem Multivalenten Effekt erklärt werden, wie er in Kapitel 1.3.1 ausführlich erklärt ist.<sup>231</sup> Einzig allein das längste System Long-TM-F passt nicht zum erwarteten Trend der anderen vermessenen Systeme. Eine Erklärung für das Verhalten des Konstruktes Long-TM-F konnte bisher jedoch nicht gefunden werden.



**Abbildung 42:** Fluoreszenzanisotropie-Experimente zeigen eine verstärkte Bindung an Survivin120 für bivalente Tweezer-Makromoleküle. Fluoreszenzmarkierte monovalente oder bivalente Tweezer-Makromoleküle (0,2  $\mu\text{M}$ ) wurden mit Survivin120 auf bis zu 150  $\mu\text{M}$  titriert. Die Daten wurden an ein Eins-zu-Eins-Bindungsmodell angepasst und sind als Mittelwerte  $\pm$  SD mit  $n=3$  unabhängigen Experimenten dargestellt.

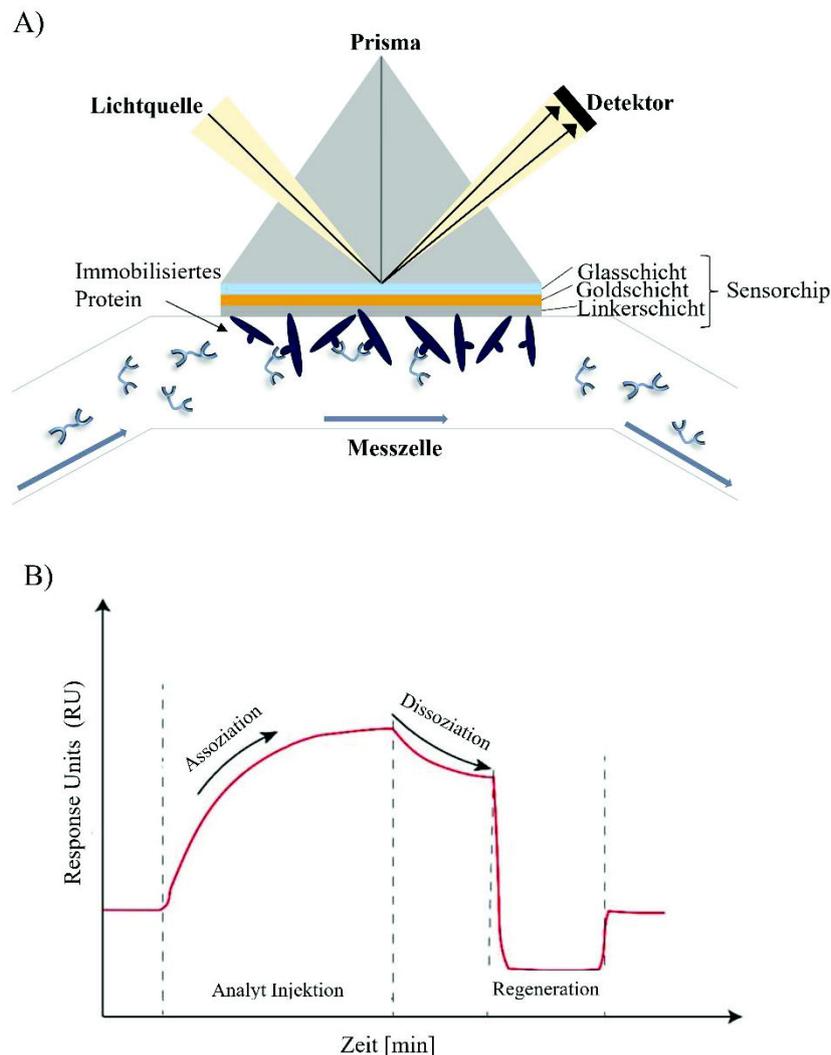
### 3.2.4 SPR

Um umfassendere Erkenntnisse über die Auswirkung der Bindung der divalenten Liganden an Survivin zu gewinnen, wurde zur weiteren Untersuchung ein Oberflächenplasmonresonanz-Assay entwickelt (SPR). Diese Messmethode wurde bisher für Survivin noch nicht verwendet, wodurch für diese Arbeit ein Assay etabliert werden musste. Hierfür konnte auf die Erfahrungen aus der Etablierung des Taspase-Assays, durchgeführt von Serap Üclü, aufgebaut werden.<sup>152</sup> Das verwendete Protein Survivin wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Shirley Knauer zur Verfügung gestellt.

Im Gegensatz zu den bisherigen Methoden wie ITC, NMR-Titration und Fluoreszenzanisotropie liegt das Protein hierbei nicht in Lösung vor, sondern ist auf einer Sensorchipoberfläche fest immobilisiert. Der Sensorchip besteht aus einer funktionalisierten Goldoberfläche, auf welcher das Protein kovalent gebunden oder „gefangen“ werden kann. Die Immobilisierung eines Wechselwirkungspartners ist der erste Schritt eines SPR-Assays. Die Immobilisierungstechnik ist essenziell und wird in Abhängigkeit der Interaktionspartner und des Forschungszwecks gewählt. Des Weiteren muss das Protein nach der Immobilisierung seine Aktivität beibehalten. Für den Prozess selbst stehen mehrere Kopplungsverfahren zur Auswahl, die in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden reaktiven Gruppen gewählt werden. Häufig werden Aldehyde, Thiole oder Amine verwendet. Letztere sind für die Untersuchung der Inhibierung der Survivin-CRM1 Interaktion mittels divalenter Tweezer-Makromolekülen ungeeignet, da die primären Amine der Lysin-Seitenketten selektiv von den Tweezer-Liganden erkannt werden. Für diesen Fall wurde die Thiol-Kupplung ausgewählt, die als robuster gilt als die der Amin-Chemie und deren Erfolg im Wesentlichen von der Verfügbarkeit von Thiol-Gruppen anhängt. Verfügbare Thiole auf der Oberfläche von Survivin wurden zuvor mittels Simulation, aus der in PDB verfügbaren Datenbank, evaluiert. Für die Immobilisation wurde ein Carboxyl-derivatisierter C1-Chip mittels EDC/NHS durch Modifizierung der Carboxylgruppen zu N-Hydroxysuccinimid-Estern aktiviert. Anschließend wird durch Kupplung von Cysteamin eine Disulfidgruppe eingeführt, über welche durch Austausch im darauffolgenden Schritt Survivin angebracht wurde. Nicht reagierte Disulfide wurden durch Reaktion mit L-Cystein deaktiviert.

Der Messzelle steht eine Referenzzelle gegenüber, deren Goldoberfläche mittels Ethanolamin deaktiviert wurde. Das Messprinzip beruht auf der Änderung des Brechungsindex der Goldoberfläche. Das Detektionssystem besteht aus einer Lichtquelle, welche durch ein Prisma auf der Goldoberfläche fokussiert wird, wodurch die Plasmonresonanz in der Goldoberfläche angeregt wird. Das emittierte Licht, wird in einem Detektor aufgefangen. Ein veränderter Brechungsindex, resultiert in einer Verschiebung des Detektionswinkel, was wiederum in sogenannte Response Units (RU) übersetzt wird. Die Grundlinie für jede Messung wird auf null RU gesetzt. Bindet nun ein Ligand auf der Oberfläche führt dies zu einer Veränderung der Massenkonzentration, wodurch der Brechungsindex proportional steigt und der indirekt detektierte RU-Wert ebenfalls ansteigt. Ein Messzyklus besteht aus der Assoziation des Liganden an die Oberfläche, der Gleichgewichtseinstellung zwischen gebundenen und in Lösung befindenden Liganden, der Dissoziation und Regeneration. Um sicher zu stellen, dass die Oberfläche vollständig von Liganden befreit ist, wird ein Regenerationsschritt durchgeführt. Als erfolgreiche

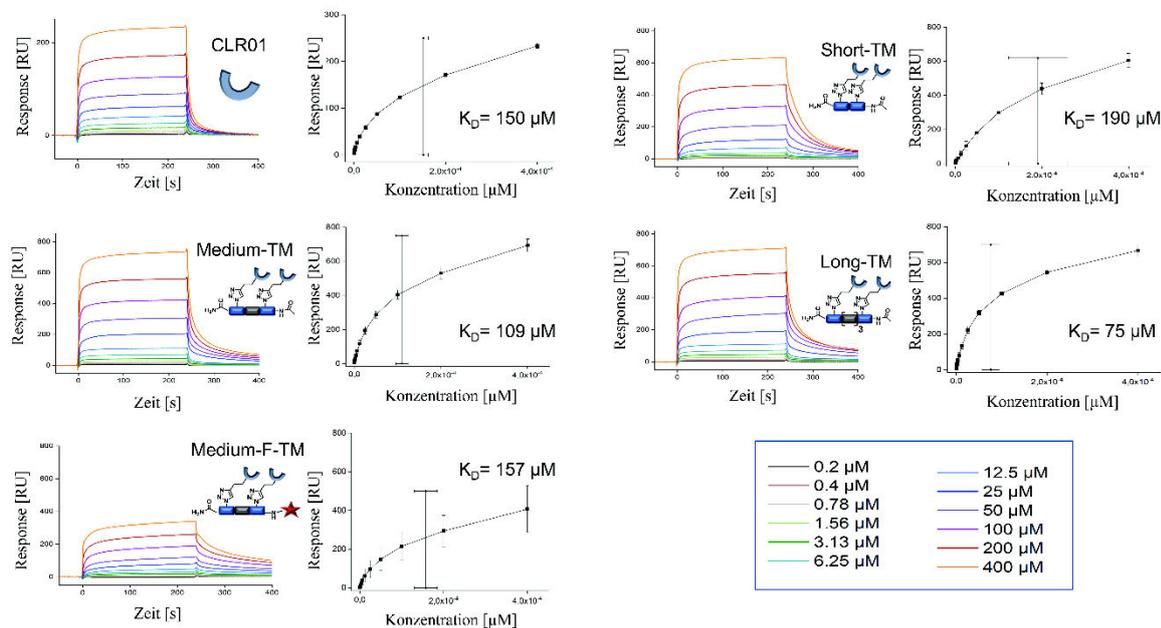
Regenerationsmethode wurde in dieser Arbeit 100  $\mu\text{M}$  L-Lysin gefolgt von Puffer eingesetzt, um die Tweezer-Makromoleküle abzulösen.



**Abbildung 43:** Vereinfachter Versuchsaufbau des SPR (A) und exemplarisches SPR-Sensogram. Abbildungen sind angelehnt an [262] und [263].

SPR als Methode bietet eine vielfältige Einsatzmöglichkeit zur Bestimmung der Konzentration an aktiven Analyten, der Kinetik bezüglich der Komplexbildung zur Affinität, die die Bindungsstärke widerspiegelt. Die Affinität, kann auf verschiedene Arten bestimmt werden. Zum einen aus der Berechnung der kinetischen Konstanten, zum anderen aus der Messung von Bindungsgleichgewichten. In dieser Arbeit wurde letzteres zur Ermittlung von Affinitäten verwendet. Zur Untersuchung wurde Survivin auf dem Goldchip immobilisiert und sowohl der monovalente Ligand CLR01 als auch die divalenten Tweezer-Makromoleküle in steigenden Konzentrationen in der sogenannten Multizyklus-Methode injiziert. Die resultierenden SPR-

Sensogramme zeigen eine direkte Bindung aller Tweezer-Liganden an Survivin mit starken Response Units wie in Abbildung 44 zu sehen.



**Abbildung 44:** SPR-Bindungsaffinität. Sensorgramme für das Bindungsereignis zwischen dem monovalenten Tweezer CLR01, den Tweezer-Makromolekülen Short-TM, Medium-TM, Long-TM und Medium-F-TM und immobilisiertem Survivin120, gemessen mittels SPR (links). Die Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, und für jede Verbindung ist ein repräsentatives Beispiel abgebildet. In allen Fällen waren die Konzentrationen der Verbindungen von oben nach unten 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125, 0,390625 und 0,1953125  $\mu\text{M}$ . Kurvenregressionen der Gleichgewichtsreaktionen als Funktion der Konzentration werden mit Hilfe eines Steady-State-Modells angepasst, aus dem  $K_D$ -Werte abgeleitet werden können. Die Fehler stellen die Standardabweichung aus drei Messungen dar. Die Analyse der Gleichgewichts-Affinität in Form eines  $K_D$ -Wertes kann durch Auftragen der RUs im Gleichgewichtszustand gegen die Konzentration als entsprechende Kurve für die Verdünnungsreihe erhalten werden. Dies führt zu einer Sättigungskurve. Nach Durchführung eines Fits wird der jeweilige  $K_D$ -Wert, der der Konzentration bei halbem Maximum entspricht, erhalten.<sup>1</sup>

Die Analyse der Gleichgewichts-Affinität in Form eines  $K_D$ -Wertes kann durch Auftragen der RUs im Gleichgewichtszustand gegen die Konzentration als entsprechende Kurve für die Verdünnungsreihe erhalten werden. Dies führt zu einer Sättigungskurve. Nach Durchführung eines Fits wird der jeweilige  $K_D$ -Wert, der der Konzentration bei halbem Maximum entspricht, erhalten. Alle Messungen wurden in Triplikaten ausgeführt. Alle Liganden zeigen eine Bindungsaffinität, die sich als Durchschnitt der Dreifachmessungen zusammensetzt, im  $\mu\text{M}$  Bereich. Die Fehler bewegen sich im Bereich von 10 – 45  $\mu\text{M}$  und sind in Abbildung 44 in den  $K_D$ -Fits als Fehlerbalken angegeben. Auffällig ist eine bessere Bindung vom monovalenten Liganden CLR01 mit einer Konstante von 150  $\mu\text{M}$  im Gegensatz zur Bindung des kleinsten divalenten Tweezer-Makromolekül Short-TM mit einer Konstante von 190  $\mu\text{M}$ . Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der engen, räumlich wenig flexiblen Architektur des kürzesten Liganden

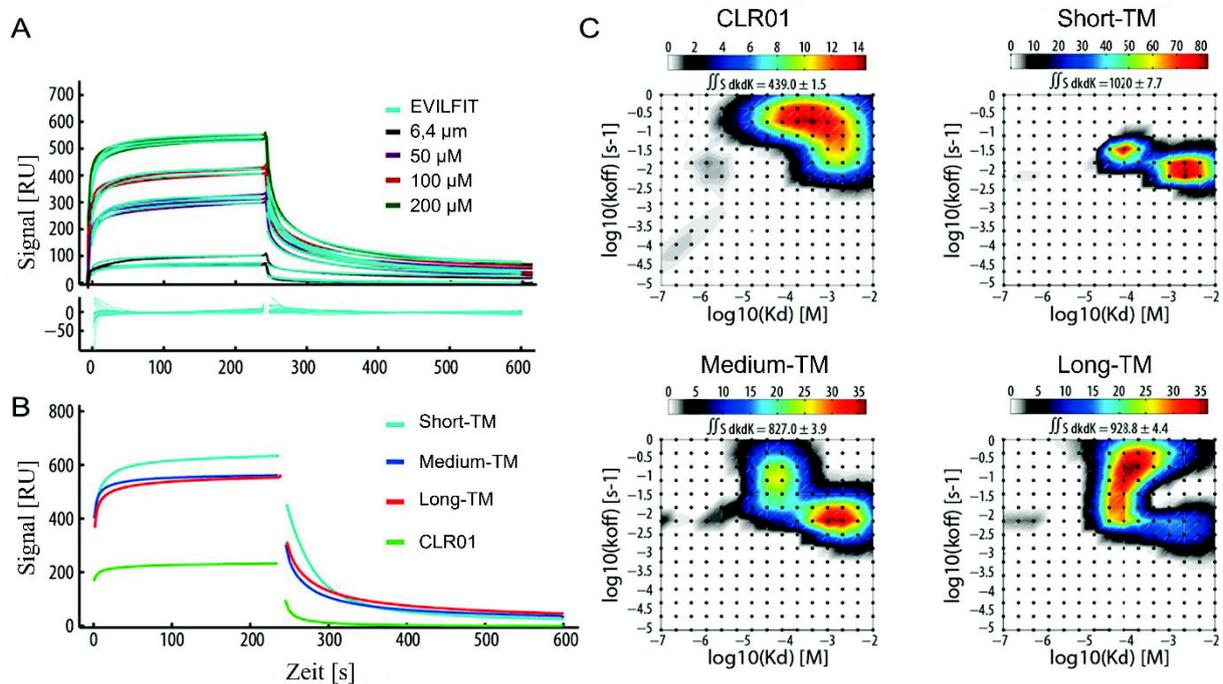
liegen. Bindet dieser Ligand mit einem Tweezer-Molekül an ein freies zur Verfügung stehendes Lysin, so schirmt der restliche Teil des Liganden möglicherweise andere Tweezer-Makromoleküle sterisch ab und ist zeitgleich in seiner Konformation zu geknäult/verkürzt, um simultan mit beiden Tweezer-Molekülen zu binden. Ähnliche Beobachtungen konnte *A. Höing* in seinen Studien zur Untersuchung von multivalenten Tweezer-Molekülen an Taspase 1 machen.<sup>226</sup>

Zwar ist eine simultane Bindung mit beidem Tweezer-Moleküle für Short-TM theoretisch möglich, wie MD-Berechnungen und Simulation zeigen. Dennoch ist die kürzeste Verbindung selbst in ihrer gestreckten Konformation nicht lang genug, um alle Kombinationen an Lysinen, wie die Verbrückung des Survivin -Dimers, zu binden. Auch bei der Betrachtung der erhaltenen  $K_D$ -Werte erzielt das divalente Tweezer-Konjugat Short-TM im Vergleich die schlechtesten Affinitätswerte. Es wäre zwar zu vermuten, dass auf Grund der starken Knäulung in Wasser das längste Konstrukt long-TM Schwierigkeiten aufweist diese Kräfte für eine starke Bindung am Protein zu umgehen, dennoch tendieren alle Moleküle in wässrigen Lösungen durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Effekten und Van-der-Waals-Kräften zur Knäulung um die Interaktion der Moleküle, die mit dem umgebenden Wasser in Kontakt kommen zu reduzieren und die energetisch günstigste Konfiguration zu erreichen.

Längere und flexiblere Molekülstrukturen profitieren dennoch davon verschiedene konformationelle Zustände annehmen zu können. Die Flexibilität erlaubt es ihnen sich möglichst effektiv an die spezifische Form und chemischen Eigenschaften anzupassen, wodurch eine stärkere Bindung resultiert.<sup>264, 265</sup> Somit weist Long-TM die stärkste Bindungskonstante mit einem  $K_D$ -Wert von 75  $\mu\text{M}$  auf, die entgegen der MD-Simulation und der Theorie, dass lange flexible Liganden hinsichtlich der Bindung entropisch ungünstig sind, steht. Dieses Ergebnis stützt somit die These, dass flexible Liganden für ebenso flexible Zieloberflächen, wie hier der NES-Schleife eine vielversprechende Herangehensweise liefern.

Die Bestimmung der Affinitätskonstante ( $K_D$ ) über Einstellung eines Gleichgewichtszustandes wird nach dem Langmuir-Modell für die Sättigung von Oberflächenbindungsstellen mit dem Bindungsreaktanten bei einer stationären Konzentration abgeleitet. Da dieses Modell jedoch nur eine 1:1-Bindung berücksichtigt bildet dieses Modell den realen Zustand nur bedingt ab und ist daher für multivalente Wechselwirkungen und die Bestimmung ihrer Bindungskinetik nicht ausreichend geeignet.<sup>266</sup> Um die Kinetik der Bindung der divalenten Tweezer-Makromoleküle an Survivin aus den SPR-Bindungskurven abzuleiten, wurde ein Verfahren angewandt, welches bereits für multivalente Analyten/Liganden etabliert wurde.<sup>267-269</sup> Durch *Kristian Juul-Madsen* und *Thomas Vorup-Jensen* aus der Universität Aarhus wurde das multivalente

Bindungsereignis mathematisch als eine Reihe von parallelen Reaktionen nach dem Modell von *Kitov und Bundle*<sup>270</sup> modelliert. Durch die Bedingungen im SPR-Experiment können diese Reaktionen als eine Reihe von multiplen Pseudo-Reaktionen erster Ordnung angenähert werden. Die minimale Verteilung dieser 1:1-Bindungsreaktionen kann mit dem Algorithmus EVILFIT eindeutig bestimmt werden.<sup>271, 272</sup> Die Übereinstimmung von experimentellen Messdaten (farbiges Sensogramm abgebildet in A) und Modell (türkise Linie abgebildet in Abbildung 45 A) zeigen eine sehr gute Übereinstimmung, sodass die Abweichung weniger als 5 % des Signals betragen (Abbildung 45A).



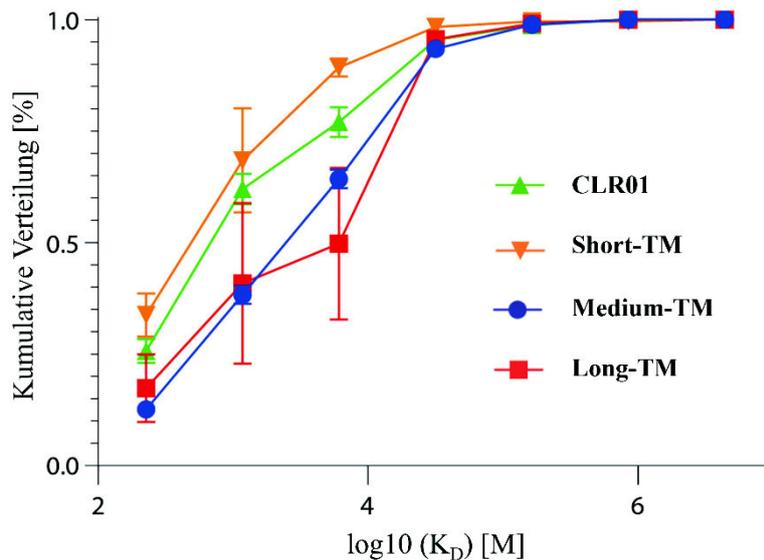
**Abbildung 45:** Beispielhafte SPR-Bindungskurve von Long-TM. Die in Türkistönen gefärbten Anpassungskurven sind den experimentellen Daten überlagert, wobei zwischen den Assoziations- und Dissoziationsphasen 5 s Abstand liegen, um eine optimale Anpassung zu gewährleisten. Das untere Feld zeigt, wie gut die Anpassung war. (B) SPR-Bindungskurven bei 400 µM für den monovalenten Tweezer CLR01 und die divalenten Tweezer-Konjugate (Short-TM, Medium-TM und Long-TM). (C) EVILFIT 2D-Diagramme für den monovalenten Tweezer CLR01 und die divalenten Tweezer-Konjugate (Short-TM, Medium-TM und Long-TM) zeigen verschiedene Ensembles unterschiedlicher  $k_{on,i}/k_{off,i}$ - und somit  $K_{D,i}$ -Werte, die auf unterschiedliche mono- und multivalente Bindungsmodi hinweisen.<sup>1</sup>

Beim Vergleich zeigt sich für den monovalenten Liganden CLR01 ein deutlich niedrigeres Signal als für die divalenten Liganden. Die divalenten Liganden untereinander vergleichend betrachtend zeigt sich ein etwas höher gebildetes Signal für den kurzen Liganden Short-TM gegenüber dem mittleren und langen Konstrukt (Abbildung 45 B). Nach der Modellierung mit dem EVILFIT-Algorithmus zeigt sich der Unterschied ebenfalls in den Bindungskapazitäten der TM-Liganden, die mit 1020 RU für Short-TM, über den der beiden anderen divalenten

Liganden lag (Medium-TM: 827 RU, Long-TM: 929 RU). Folglich spiegelt das höhere SPR-Signal in Abbildung 45 B die Fähigkeit der SPR-Oberfläche wider, die Bindung mit Short-TM besser anpassen zu können, was durch die kleinere Geometrie gegenüber Medium-TM und Long-TM zu erklären ist. Die in Abbildung 45 C dargestellten 2D-Plots mit  $K_D$  (in M, berechnet aus  $k_{off,i}/k_{on,i}$ ) auf der Abszisse und  $k_{off}$  (in  $s^{-1}$ ) auf der Ordinatenachse zeigt die Häufigkeit der Paare in farbigen Konturen (höhere Häufigkeit in roten Farbtönen). Der monovalente CLR01 Ligand erzeugte ein relativ schlecht aufgelöstes Ensemble schwacher Wechselwirkungen mit einer durchschnittlichen  $K_D$  von  $3,36 \pm 6,0 \times 10^{-2}$  M und einem schnellen  $k_{off}$ -Wert von  $0,5-0,01 s^{-1}$ , wie für monovalente Liganden zu erwarten ist. Die zweiwertigen TM-Konstrukte hingegen zeigen definiertere Wechselwirkungen mit langsameren Off-Raten. Für das kurze divalente Tweezer-Makromolekül zeigt sich zusätzliche eine Bindungspopulation bei einem  $K_D$  von  $\sim 5 \times 10^{-5}$  M, die sich in einen langsameren  $k_{off}$  von  $0,05-0,01 s^{-1}$ , als für den monovalenten Tweezer CLR01, unterscheidet. Hieran ist maßgeblich die Verlängerung des Linkers ursächlich, der die Interaktion verstärkt.

Zur genaueren Betrachtung und Bewertung dieses Trends wurden die erstellten 2D-Plots in sieben gleiche Bereiche unterteilt, die jeweils durch  $K_D$ -Intervalle definiert sind. Anschließend wurde die kumulative Häufigkeit von Interaktionen als Funktion des  $K_D$ s im Intervall von  $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  M in Abbildung 46 dargestellt. Die Kurven der jeweiligen Liganden zeigen auf, dass sowohl CLR01 als auch das kürzeste divalente TM-Konstrukt Short-TM ihren größten Bindungsanteil im niedrigen Affinitätsspektrum aufweisen, während die Verlängerung des Linkers von kurz zu mittel und zu lang eine Verteilung mit einem größeren Anteil der Bindung mit erhöhter Affinität ergab.

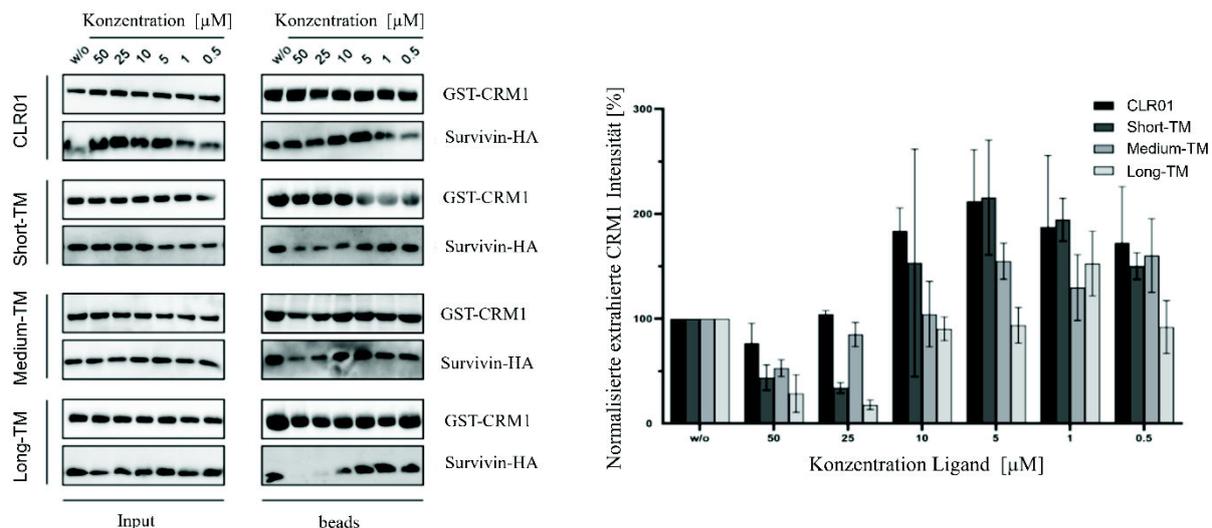
Zwar kann aus diesen Daten nicht der zugrundeliegende Bindungsmechanismus abgeleitet werden, dennoch unterstützen sie das postulierte multivalente Bindungsereignis, das ebenso durch ITC und NMR-Titration bereits vermutet wurde. Ebenfalls spiegeln diese Ergebnisse, die bereits durch das vereinfachte 1:1 Bindungsmodell gewonnenen Daten und ihren Trend wider. Dadurch zeigt sich erneut der Vorteil von Konstrukten, die in ihrer Konturlänge weiter und flexibler konstruiert sind, dass eine Anpassung an den ebenfalls flexiblen Teil der Proteinoberfläche möglich scheint.



**Abbildung 46:** Die kumulative Verteilung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) wurde aus den 2D-Diagrammen abgeleitet, was einen direkten Vergleich der ein- und zweiwertigen Liganden ermöglichte.

### 3.2.5 Pull-Down

Um den Einsatz dieser vielversprechenden divalenten Liganden weiter genauer und vor allem auf ihre hemmende Wirkung hinsichtlich der Survivin-CRM1-Interaktion zu untersuchen, wurde ein in vitro Pull-down Assay von *Dr. Annika Meiners* aus dem Arbeitskreis Knauer der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Hierfür wurde rekombinantes GST-CRM1 an sogenannte GSH-getaggte-Beads gebunden. Ebenfalls wurde überexprimiertes HA-markiertes Survivin 142 in voller Länge mit steigender Konzentration (0,5-50  $\mu\text{M}$ ) an mono und divalenten Liganden vor inkubiert. Anschließend wurden die CRM1-versehene Perlen und prä-inkubiertes Survivin zusammengegeben. Nach einer Interaktionszeit, in der nicht inhibiertes Survivin an das Beads-gebundene CRM1 binden kann, wurden die Beads von ungebundenem Protein durch Waschen gereinigt, und die Interaktion von Survivin-HA mit CRM1 mittels SDS-Page und darauffolgendem Western Blotting untersucht.



**Abbildung 47:** Divalente TMs unterbrechen die Survivin/CRM1-Interaktion. HEK 293T-Zelllysate mit überexprimiertem Survivin142-HA wurden mit CLR01 oder kurzen, mittleren sowie langen TM in Konzentrationen von 0,5 bis 50  $\mu\text{M}$  vorinkubiert. GST-CRM1 wurde zusammen mit rekombinantem RanQ69L und dGTP entweder mit nicht oder mit vorinkubierten Zelllysaten gemischt, um den Aufbau des Proteinkomplexes zu ermöglichen. Sowohl GST-CRM1 als auch das interagierende Survivin142-HA wurden von GSH-beschichteten Beads gezogen. Die Proteine in der Inputfraktion und in den Beads-Proben wurden mittels Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern für GST oder HA analysiert. Beispielhafte Blots aus Pull-down-Assays (links). Densitometrische Quantifizierung von Pull-down-Assays, bestehend aus dem Mittelwert von zwei oder drei Wiederholungen (rechts).<sup>1</sup>

Durch alle Liganden wurde die Interaktion zwischen Survivin und CRM1 gestört. Dies lässt sich an den verringerten Mengen an Survivin zeigen, die aus der Lösung gezogen wurden (Abbildung 47). Insbesondere das längste Konstrukt, Long-TM, hemmte die Interaktion zwischen Survivin und CRM1 bereits bei Konzentrationen von weniger als 10  $\mu\text{M}$  erheblich. Dies wird insbesondere in der densitometrischen Quantifizierung der entsprechenden Western-Blot-Bilder deutlich, in welchen keine wirksame Hemmung durch die kürzeren Liganden zu erkennen ist (Abbildung 47, rechte Seite). Besonders das kürzeste Konstrukt zeigt eine ähnlich geringe, teilweise schlechtere Hemmung als der monovalente Ligand CLR01. Dies spiegelt ebenfalls die erhaltenen Werte aus der 1:1 Bindung als auch die des multivalenten Bindungsereignis des SPR-Assays wider. Besonders ist hervorzuheben, dass der monovalente Tweezer (CLR01) mit einem  $K_D$  von etwa 50  $\mu\text{M}$  nur bei der höchsten verwendeten Konzentration hemmend wirkt, was mit früheren Studien übereinstimmt.<sup>74</sup>

Es ist jedoch anzumerken, dass die Quantifizierung der ursprünglich qualitativen Western-Blot-Methode durchaus herausfordernd ist.<sup>273</sup> Obwohl die beobachteten Trends des Pull-Down-Assay in hohem Maße reproduzierbar sind, gilt dies nicht für die aus den Analysen gewonnenen absoluten Werte. In einigen Fällen ergeben sich aus der Variabilität der Proteinbeladung und der Blot-Effizienz in verschiedenen experimentellen Wiederholungen große Fehlerbalken (Abbildung 47 rechts). Nichtsdestotrotz zeigt das längste Konstrukt, Long-TM, eine fast

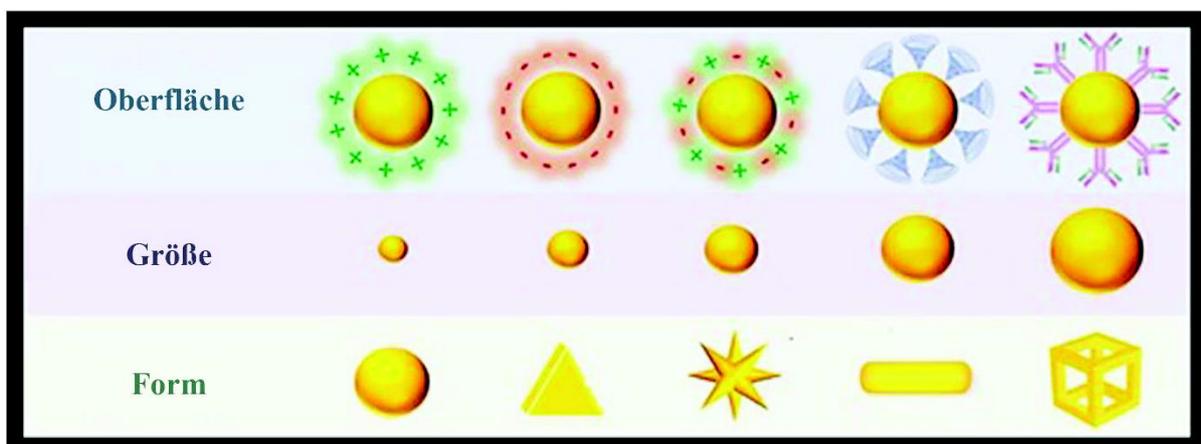
vollständige Hemmung der Interaktion zwischen Survivin und CRM1, nicht nur in der Quantifizierung, sondern ebenfalls stark ausgeprägt in den ursprünglichen Western-Blots (Abbildung 47, links, unterste Tafel). Zurückzuführen ist diese Zunahme des inhibitorischen Potenzials zum Teil auf die größere Molekülstruktur, die im Gegensatz zu den restlichen divalenten Tweezer Makromolekülen potenziell eine bessere räumliche Abschirmung der NES-Region nach Bindung an die Oberfläche gewährleistet. Ähnliche Beobachtungen bezüglich des Zusammenhangs der Molekülgröße und der Hemmfähigkeit konnten Meiners et al. bei ihren Untersuchungen mit Tweezer-Peptid-Hybriden zur Inhibition der Survivin/CRM1 Interaktion machen.<sup>74</sup> Das längere Tweezer-Peptid-Konjugat konnte eine größere Effizienz vorweisen, obwohl das kürzere Konjugat ähnlich gute Affinitäten aufwies. Besonders anzumerken ist, dass die Pull-Down-Experimente mit Tweezer-Peptid-Hybriden an freiem Survivin durchgeführt wurde. Die Pull-Down-Experimente in dieser Arbeit jedoch mit Zelllysate, wodurch bewiesen werden konnte, dass die divalenten Tweezer-Makromoleküle auch in komplexen Proteingemischen funktionieren und als Inhibitoren der Survivin-CRM1 Interaktion fungieren.

### 3.3 Tweezermakromoleküle auf ultrakleinen Goldnanopartikeln

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde das Konzept der Multivalenz anhand divalenter Tweezer-Makromoleküle als Inhibitoren der Survivin-CRM1 Interaktion vorgestellt und deren inhibitorischen Fähigkeiten durch geeignete biologische Assays untersucht. Es konnte sowohl gezeigt werden, dass Ligandenkonstrukte bei gleicher Bindungsmotivanzahl mit einer größeren Struktur die mögliche Bindungsstelle am besten abschirmen und die besten Affinitätswerte liefern. Ebenso zeigte sich, dass eine Erhöhung der Valenz an Bindungsmotiven von einem auf zwei Tweezer-Liganden in einem Anstieg der gesamten Avidität resultiert. Diese Beobachtung kann auf das Konzept der Multivalenz zurückgeführt werden. In diesem Kapitel soll das Konzept der Multivalenz durch die Präsentation des monovalenten Tweezers und eines divalenten Tweezer-Makromolekül auf ultrakleinen Goldnanopartikeln (ultra small goldnanoparticles, usAuNPs) auf eine höhere Ebene erweitert werden.

In den letzten Jahren haben (Metall)Nanopartikel, insbesondere Goldnanopartikel (AuNPs) großes Interesse der biomedizinischen Wissenschaft, auf Grund ihrer vielfältigen vorteilhaften physikalischen und chemischen Eigenschaften, erfahren.<sup>274, 275</sup> Die im biomedizinischen Bereich eingesetzten Nanopartikel bestehen aus Gold, Silber, Siliziumdioxid, verschiedenen Polymeren oder vergleichbaren Materialien.<sup>276-279</sup> Goldnanopartikel stellen dabei den wichtigsten

Vertreter dar, über welchen seit 1996 über 87.000 Artikel zu verzeichnen sind.<sup>280</sup> Auf Grund ihrer Biokompatibilität durch ihren inerten sowie geringen zytotoxischen Charakter und ihren ausgeprägten optischen Eigenschaften werden sie seit langem für therapeutische Zwecke eingesetzt.<sup>281</sup> Ihr optisches Verhalten hängt von ihrer Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ab, die sich in einem breiten Absorptionsspektrum, mit einem Absorptionsmaximum um 520 nm, was zu einer typischen intensiv roten Farbe führt, äußert.<sup>282</sup> Dieses Phänomen beruht auf der durch auftreffendes Licht ausgelöste kollektive Oszillation freier Metallelektronen.<sup>283, 284</sup> In diesem Fall absorbieren die AuNPs die Wellenlänge, der entsprechenden Oszillationsfrequenz. Die genaue Wellenlänge hängt jedoch von verschiedenen Parametern, wie das Medium, Größe oder Form ab.<sup>285</sup> Interessanterweise ändert sich diese optische Eigenschaft bei kleinen AuNPs. Liegen diese in einem Größenbereich mit Durchmessern von 0,5-2 nm so zeigen sie Photolumineszente Eigenschaften, da sie im Bereich der Fermi-Wellenlänge von Gold liegen.<sup>283</sup> Verschiedene Formen und Größen in welchen AuNPs zuverlässig synthetisiert werden können sind beispielsweise Nanosphären, Nanostäbchen, Nanowürfeln oder Nanokäfige.<sup>286</sup> Durch die relativ einfache chemische Modifizierung mit funktionellen Gruppen weisen AuNPs ein hohes Potenzial auf, als Trägermaterial für biologische Moleküle, Proteine, Medikamente oder kleine Moleküle zu fungieren (Abbildung 48).<sup>281</sup>



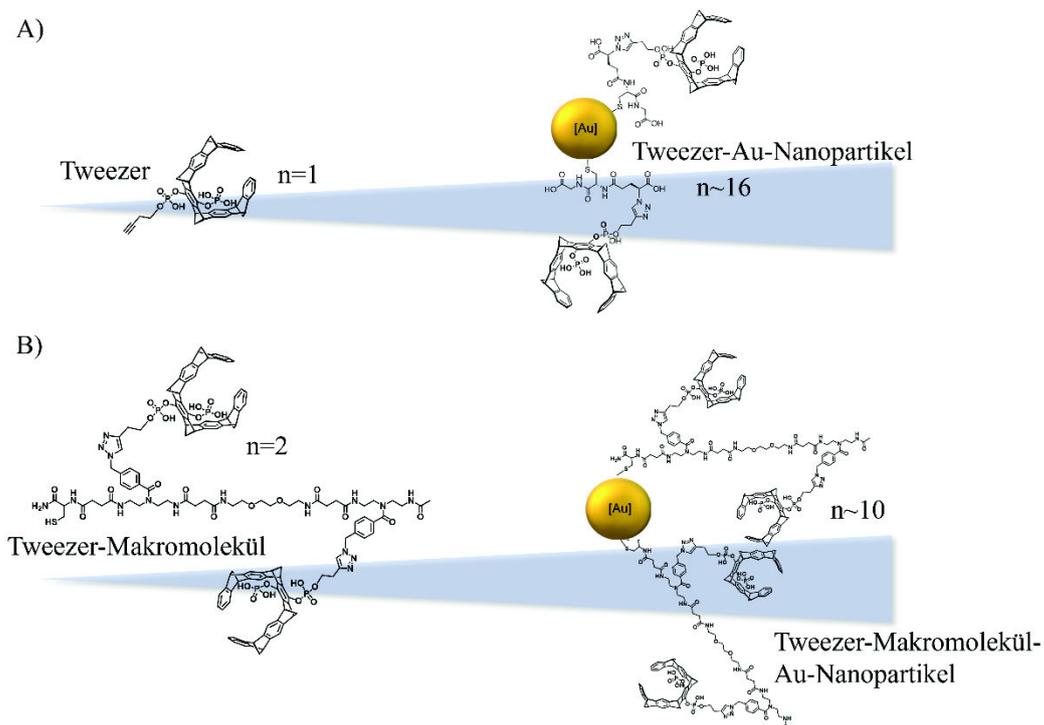
**Abbildung 48:** Modifikation von AuNPs in einer Vielzahl von Varianten. Aufgeführt sind die Parameter Oberfläche, Größe und Form, die variiert werden können.<sup>280</sup>

Ultrakleine Goldnanopartikel als spezielle Vertreter der Goldnanopartikel weisen eine Größe von ca. 2 nm auf. Chemisch gesehen befinden sie sich an der Grenze zwischen metallischen Nanopartikeln und präzisen atomaren Metallclustern.<sup>287-289</sup> Auf Grund dessen eignen sie sich besonders als supramolekulares Transportsystem, das Zellmembranen und in besonderen Fällen die Kernmembran als auch die Blut-Hirn-Schranke durchdringen können.<sup>290-293</sup>

Die Synthese von Goldnanopartikeln kann auf verschiedene Weisen in der Gasphase oder Lösung stattfinden.<sup>281, 294</sup> Die verschiedenen Techniken zur Synthese werden dabei in chemische, physikalische und biologische Techniken unterteilt.<sup>281</sup> Häufig wird die Synthesestrategie von wasserlöslichen, stabilen Goldclustern, stabilisiert durch Liganden oder Polymeren in Medien verfolgt.<sup>295</sup> Beim lösungsbasierten Ansatz kann die Synthese sowohl in polaren als auch in unpolaren Lösungsmitteln durchgeführt werden. Hierbei wird typischerweise ein Au(III)-Salz oder ein Au(I)-Komplex durch ein Reduktionsmittel in Gegenwart von Liganden zu Au(0) reduziert. Die Liganden, die als Elektronendonatoren fungieren und koordinativ an die Oberfläche binden sind häufig Carbonsäuren, Amine, Phosphine oder Thiole, wobei die Bindungsstärke dem HSAB-Konzept und somit der Reihenfolge  $O < N < P < S$  folgt.<sup>295</sup> Die Citrat-Reduktions-Synthesetechnik von *Turkevitch* stellt die wohl am häufigsten verwendete Technik für sphärische AuNPs dar, da sie stabile, in ihrer Größe (10-20 nm) kontrollierte NPs durch eine einfache Synthese liefert.<sup>296</sup> Hierbei fungiert das Citrat sowohl als Stabilisierungs- als auch als Reduktionsmittel. Anschließend kann das Citrat durch einen Ligandenaustausch ersetzt werden, sofern der neue Ligand eine stärkere Metall-Liganden-Bindung aufweist.<sup>295</sup> Durch Variation der Parameter Temperatur, Salzkonzentration und Zugabegeschwindigkeit kann die Größe der Liganden gesteuert werden.<sup>297</sup> Eine weitere Methode, die zu ultrakleinen Goldnanopartikeln (1-6 nm) führt, ist die von *Brust-Schiffrin*.<sup>298</sup> Bei dieser vorerst auf einem Zweiphasensystem basierenden Methode wird AuCl<sub>4</sub> in Gegenwart von Alkylthiolen mit Natrium Borhydrid reduziert und ermöglicht somit die Herstellung direkter Thiol-stabilsierter ultrakleiner AuNPs.<sup>299</sup> *Negishi et al.* erreichten mit ihrer Synthese, basierend auf dem Ansatz von *Whetten et al.*, Partikel mit einer Größe von etwa 1 nm. Ihr Verfahren beruht auf der Reduktion von HAuCl<sub>4</sub> durch NaBH<sub>4</sub> in Gegenwart des biogenen Tripeptids Glutathion (GSH) wodurch sie Thiol-stabilisierte, wasserlösliche ultrakleine AuNPs erhielten.<sup>300</sup>

Diese Ansätze zum Erhalt ultrakleiner Goldnanopartikel verfolgt auch der Arbeitskreis von *Prof. Dr. Epple* in der Universität Duisburg-Essen. Sie zeigten bereits die erfolgreich Funktionalisierung von usAuNPs mit Liganden wie Thiol-haltigen Peptiden oder mittels katalysierter Kupfer-Klick Reaktion verbundenen aminosäurebindenden molekularen Tweezern an Azidhaltigen usAuNPs.<sup>234, 301</sup> Darüber hinaus konnten sie bei Untersuchungen Fluoreszenz-markierte usAuNPs hinsichtlich ihrer Zellaufnahme und das Durchdringen von Barrieren, das für den Einsatz als Trägersystem für Arzneimitteln unerlässlich ist, besondere Erfolge erzielen.<sup>291,</sup>

Um nun für die in dieser Arbeit untersuchten divalenten Tweezer-Makromoleküle die Affinität zu Survivin weiter zu erhöhen und somit die Interaktion zu CRM1 effektiver zu inhibieren, wird das Prinzip der Multivalenz durch Anbringung sowohl von Tweezermolekülen, als auch eines divalenten Tweezer-Makromoleküls auf der Oberfläche von ultrakleinen Goldnanopartikeln erweitert (Abbildung 49). Gleichzeitig wird durch das Trägermaterial der usAuNPs die Zellaufnahme ermöglicht, die für eine effektive Hemmung von Survivin im biologischen System essenziell ist.



**Abbildung 49:** Konzeptübersicht: Erhöhung der Multivalenz durch Anbringung des aminosäurespezifischen molekularen Tweezers ( $n=1$ ) an ultrakleine Goldnanopartikel (A) als auch der Anbringung von des divalenten Tweezermakromolekül an ultrakleine Goldnanopartikel (B).

So liegt der Fokus in diesem Teil der Arbeit auf der Synthese und Untersuchung der Effekte der Ausweitung der Multivalenz auf die Bindungseigenschaften des Tweezer-Makromolekül-funktionalisierten usAuNP und die Zellaufnahmefähigkeiten. Hierfür wurde die Festphasensynthese um die Immobilisierung auf usAuNPs ausgeweitet.

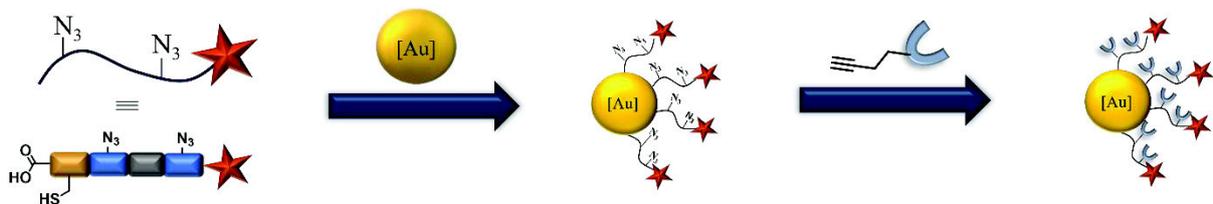
### 3.3.1 Synthese und Charakterisierung

Um den Einfluss der Tweezer-Makromolekül-funktionalisierten usAuNPs zu untersuchen, wurde zuerst die Festphasensynthese des Makromoleküls hinsichtlich der Immobilisation angepasst. Als Modelmakromolekül, wurde Medium-MM gewählt, da es sowohl einen

Ligandenabstand gewährleistet als auch eine Konturlänge aufweist, die den endfunktionalisierten usAuNP in seinem vorhergesehenen Durchmesser nicht negativ beeinflusst.

Wie bereits in Kapitel 3.1.1.1.2 beschrieben, wurde zur Ausbildung der (pseudo-)kovalenten Bindung an den Goldkern als erster Baustein der Sequenz die Thiol-haltige Aminosäure L-Cystein implementiert. Des Weiteren wurde für die Nachverfolgung und Sichtbarkeit im Zellassay der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein am Ende der Sequenz angebracht. Die erfolgreiche Synthese wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ , ESI-MS und HPLC bestätigt (Kapitel 3.1.1.1.2, Kapitel 5.2.2).

Nach der erfolgreichen Synthese des Makromoleküls galt es zwischen zwei Möglichen Syntheserouten zu entscheiden. Zum einen war es möglich, wie bisher die Funktionalisierung des Makromoleküls mit dem makromolekularen Tweezer mittels Kupfer-Katalysierter Alkin-Azid-Cycloaddition durchzuführen und darauffolgend die Funktionalisierung der Goldnanopartikel mit dem Ligandenkonstrukt Cys-Medium-TM-F. Zum anderen, die Umkehrung der Syntheseschritte, sodass zuerst die Funktionalisierung der Goldnanopartikel durchgeführt wird und die Anbringung des Tweezers den letzten Schritt darstellt. Im Gegensatz zur Syntheseroute der divalenten Tweezer-Makromoleküle wurde für die Synthese der funktionalisierten Goldnanopartikel letztere Variante gewählt, sodass zuerst das Azid-tragende Makromolekül an die Oberfläche der usAuNPs angebracht wurde und darauffolgend die CuAAC zur Anbringung der Tweezer-Motive durchgeführt wurde (Abbildung 50). Durch diese Syntheseroute wird der Verlust des kostbaren Tweezers geringgehalten. Zusätzlich ist bekannt, dass frei zugängliche Thiole mit der CuAAC interferieren können, wodurch Azide zu Aminen reduziert werden. Sie selbst fungieren hierbei als Reduktionsmittel und werden oxidiert wodurch eine Anlagerung an den AuNP nicht mehr möglich ist.<sup>250</sup> Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass die CuAAC erfolgreich an usAuNPs mit guten Ausbeuten durchgeführt werden kann.<sup>234, 303</sup>



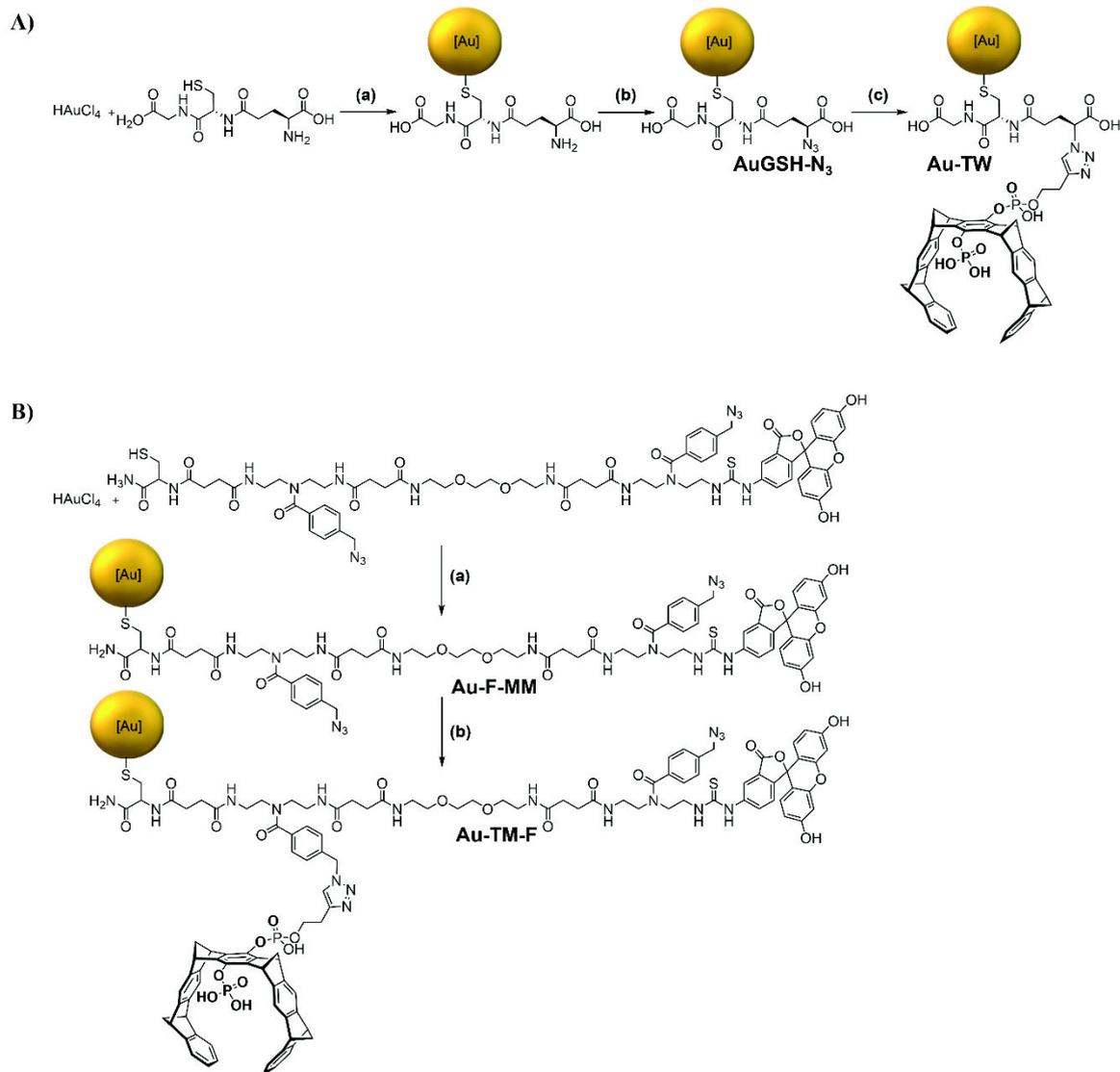
**Abbildung 50:** Schematische Darstellung der Syntheseroute von Cystein-tragenden Makromolekül über Makromolekül-funktionalisierten Goldnanopartikel (Au-F-MM) bis zum finalen Tweezer-Makromolekül-funktionalisierten Goldnanopartikel (Au-F-TM).

Um den Einfluss der Präsentation des molekularen Tweezers genauer betrachten zu können wurde neben dem divalenten Tweezer-Makromolekül ebenfalls der molekulare Tweezer als monovalentes Bindungsmotiv auf der Oberfläche der usAuNPs präsentiert. Die Synthese der usAuNPs wurde durch eine modifizierte einphasige *Brust-Synthese*<sup>298</sup> nach bereits etablierten Protokollen vom Kooperationspartner *Dr. Kai Klein* aus dem Arbeitskreis Epple der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.<sup>303, 304</sup>

Die beiden Intermediate (Au-GSH und AuGSH-N<sub>3</sub>) wurden von *Dr. K. Klein* ausführlich mittels DCS und HRTEM auf ihre Größe, sowie mittels NMR auf ihre chemische Umgebung hin überprüft. Diese Ergebnisse werden in dieser Arbeit nicht weiter ausgeführt.<sup>304</sup>

Die nachfolgende CuAAC mit dem Monobutyniltweezer wurde zum Teil zusammen, als auch allein von *Dr. Klein* durchgeführt. Hierfür wurden die usAuNP-N<sub>3</sub> in Wasser vorgelegt. Anschließend wurde 0,4 Äq. in MeOH vorgelöster Tweezer zugegeben, wonach die Zugabe der Katalysatormischung aus 0,08 Äq. Cu, 0,77 Äq. THPTA und 0,77 Äq. Natriumascorbat erfolgte. Nach einer Reaktionszeit von 14 h wurden die funktionalisierten usAuNPs durch Spinfiltration aufgereinigt, sodass das finale Produkt (Au-TW) erhalten wurde.

Zur Anbringung des Azid-tragenden Makromoleküls konnte auf die Anbringung des Glutathions und die Umfunktionalisierung auf Grund der stabilen Metall-Ligand Bindung durch das freie Thiol des L-Cysteins verzichtet werden. So wurde Tetrachlorgoldsäure in Wasser verdünnt vorgelegt und mit 5 mL 0,1 M NaOH basisch gestellt. Anschließend wurde das in MeOH vorgelöste Makromolekül (1,2 Äq.) zugegeben. Nach Rühren für 30 min wurde die eisgekühlte NaBH<sub>4</sub>-Lösung (4 Äq.) zugegeben, wodurch die Bildung der usAuNPs direkt begann. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurden die gebildeten usAuNPs durch Waschen mit 0,1 M NaOH und Wasser durch Zentrifugation von ungebundenem Makromolekül so lange aufgereinigt, bis keine Fluoreszenz im Filtrat mehr sichtbar war um die finalen Makromolekül-funktionalisierten usAuNPs (Au-F-MM) zu erhalten. Die CuAAC wurde analog zur Anbringung des Alkin-Tweezers durchgeführt, sodass nach Aufreinigung die finalen Tweezer-Makromolekül-funktionalisierten usAuNPs (Au-TM-F) erhalten wurden.<sup>304</sup>



**Abbildung 51:** Synthese von TW-funktionalisierten us-AuNPs: (A) Direkte Bindung von TW-Alkynyl an Azid-funktionalisierte us-AuNPs zu Au-TW. (B) Zweistufige Synthese von Au-TM-F-Nanopartikeln. Anbringung der Azid-funktionalisierten Makromolekülen, gefolgt von CuAAC-Konjugation von TW-Alkynyl. Reaktionsbedingungen: (A) (a)  $\text{NaBH}_4$  in Wasser; (b) Imidazolsulfonylazid-Dihydrogensulfat,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH/Wasser; (c) CuAAC mit TW-Alkin; (B) (a)  $\text{NaBH}_4$  in MeOH/Wasser; (b) CuAAC mit TW-Alkin.<sup>1</sup>

Zur Charakterisierung der erhaltenen usAUPs wurden von *Dr. Kai Klein* UV-Vis, HRTEM, DCS und von *Dr. Christine Beuck* DOSY durchgeführt. Wobei HRTEM, DCS und DOSY als direkter Nachweis für die ultrakleinen Nanopartikel herangezogen werden, woneben die UV-VIS Betrachtung als indirekter Nachweis für die Größe, durch ausbleiben der Plasmonenresonanz größerer Partikel, dient. HRTEM Aufnahmen sind auf Grund der Betrachtung eines kleinen Teiles der Probe als nicht repräsentativ zu betrachten. Allerdings geben sie durch die atom-scharfe Auflösung Hinweise auf die Struktur. So zeigt die HRTEM-Analyse überwiegend sphärische, monodisperse Nanopartikel für die Proben AuGSH, AuGSH- $\text{N}_3$  und Au-TM-F mit

Durchmessern von  $1,7 \text{ nm} \pm 0,9 \text{ nm}$ ,  $2,0 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$  und  $1,67 \text{ nm} \pm 0,74 \text{ nm}$  wie aus **Tabelle 6** entnommen werden kann.

**Tabelle 6:** Durchmesser der verschiedenen Nanopartikel aufgelistet nach Methoden. HRTEM, DCS und DOSY-NMR.

	HRTEM	DCS	DOSY
AuGSH	$1,7 \text{ nm} \pm 0,9 \text{ nm}$	$1,5 \text{ nm} \pm 0,2 \text{ nm}$	3,32 nm
AuGSH-N <sub>3</sub>	$2,0 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$	$1,5 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$	3,36 nm
Au-TW	-	$1,48 \text{ nm} \pm 0,75 \text{ nm}$	-
Au-F-MM-N <sub>3</sub>	-	$1,88 \text{ nm} \pm 0,44 \text{ nm}$	3,29 nm
Au-TM-F	$1,67 \text{ nm} \pm 0,74 \text{ nm}$	$1,88 \text{ nm} \pm 0,68 \text{ nm}$	3,09 nm

Die HRTEM Aufnahmen sind deshalb wichtig, da für die Berechnung der hydrodynamischen Durchmesser die Umrechnung über die Stokes-Einstein-Gleichung nur für sphärische Partikel gilt. Die DCS liefern etwas kleinere Werte für die hydrodynamischen Durchmesser. Dies liegt daran, dass der errechnete hydrodynamische Durchmesser unterschätzt wird, dadurch, dass bei der relativen Betrachtung immer kleiner werdenden Partikel die Diffusion durch das Lösemittel einen steigenden Einfluss auf die Sedimentationsgeschwindigkeit nimmt.<sup>305, 306</sup> Des Weiteren wird für die Dichte der Wert von elementarem Gold verwendet, welcher über der wirklichen Dichte der Partikel liegt. Die DOSY-Messungen hingegen liefern größere Erwartungswerte (**Tabelle 6**). Hier wird die Diffusion im Lösungsmittel der Nanopartikel mit ihrer Ligandenhülle betrachtet. Auch hier fließt in die Berechnung ein Diffusionskoeffizient ein, für welchen die Annahme der sphärischen Partikel gilt. Der kleine Durchmesser des Au-F-TM kann durch eine mögliche intramolekulare Wechselwirkung zwischen den Liganden erklärt werden, die demnach eine dichter gepackte Ligandenschicht zur Folge hat.

Den wohl jedoch wichtigsten Faktor der Charakterisierung stellt die Quantifizierung der funktionalisierten Partikel dar. Während für die AuGSH-N<sub>3</sub> Partikel mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie ein Umsatz von 95 % bestimmt werden konnte, so stellt sich diese Methode als ungeeignet für die Tweezer-tragenden Partikel Au-TM und Au-F-TM heraus. Die UV-Vis Spektren weisen durch die Tweezer-Liganden zwar ein deutliches Absorptionsspektrum bei 222 nm auf, dennoch ist eine ausreichende Integration durch eine unzureichende Grundlinie und die Untergrundabsorption der Goldnanopartikel zum UV-Bereich mit Fehlern behaftet, wodurch nur ein grober Wert von 12 Tweezermolekülen, nach Abzug der Untergrundabsorption und gefitteter Grundlinie, ermittelt werden konnte. Zur genauen Bestimmung wurde die Probe anschließend mittels ICP-MS/ICP-OES auf die Elemente Au und P (engl.:

Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry) von der Firma Spectro Model Spectro Acros nach Mikrowellenaufschluss untersucht. Durch die Umrechnung der Massenverhältnisse in die molare Elementkonzentration und der Konzentration der Nanopartikel pro Probe wurde die Phosphormenge pro Nanopartikel bestimmt. Dadurch, dass jedes Tweezer-Molekül zwei Phosphoräureanteile besitzt, ist die Phosphorkonzentration doppelt so hoch, wie die der gebundenen Tweezer-Moleküle. Durch Heranziehen dieser Gegebenheit konnte die Menge an gebundenen Tweezer-Molekülen auf 16 Stück pro Nanopartikel bestimmt werden (Tabelle 7).<sup>304</sup>

**Tabelle 7:** Grad der Funktionalisierung (Anzahl der funktionellen Gruppen pro Partikel), abgeleitet durch UV-Signal (Anzahl der Azide für Au-F-MM) und ICP-MS (Anzahl der Pinzetten für Au-TW und Au-TM-F).

Verbindung	Funktionalisierung N <sub>3</sub> / Tweezer-Molekül
Au-TM	16
Au-F-MM	150
Au-TM-F	10

Für die Quantifizierung der Makromolekül-funktionalisierten Nanopartikel wurde zuerst erneut der Ansatz über UV-Vis gewählt. Das UV-Vis Spektrum der Partikel zeigt neben der Absorptionsbande der Nanopartikel und einer schwachen Absorptionsbande bei 280 nm der Phenylringe eine ausgeprägte Bande bei ca. 490 nm des angebrachten Fluoresceins. Diese Bande ermöglicht eine quantitative Analyse der immobilisierten Liganden. Durch Integration des Signals und einer Umrechnung mit Hilfe einer Kalibrierkurve in eine Konzentration in der Nanopartikeldispersion konnte die gebundene Menge an Makromolekül auf ca. 75 pro Nanopartikel bestimmt werden. Für die anschließende Bestimmung der Tweezer-Moleküle nach erfolgreich durchgeführter CuAAC zeigte sich jedoch, dass die Bestimmung mittels Integration des UV-Vis Signals nicht möglich ist. Die Tweezer-Absorptionsbande liegt mit ca. 222 nm im Überlapp mit der, der Nanopartikel selbst und der Phenylgruppen des Makromoleküls. Folglich wurde für diese Bestimmung ebenfalls die Analyse mittels ICP-MS gewählt. Hier konnte nach gleicher Berechnung, wie für die Au-TM Partikel eine Anzahl von zehn gebundenen Tweezer-Molekülen bestimmt werden. Die genaue Verteilung der Tweezer-Moleküle lässt sich nicht bestimmen. Statistisch gesehen ist jedoch eine zweifache Funktionalisierung eines Makromoleküls auf der Oberfläche der Nanopartikel unwahrscheinlich. Insgesamt ist in beiden Fällen, Au-TW und Au-TM-F, deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der konjugierten Pinzetten um einiges geringer als die Zahl der verfügbaren Azidgruppen ist (Tabelle 7). Eine mögliche Ursache dieses Effekts ist die räumliche Verdrängung der sperrigen TW-Moleküle auf der Oberfläche der usAu-Nanopartikel. Dennoch konnte im Vergleich zu den zweiwertigen TM-Konstrukten die Anzahl der

konjugierten makromolekularen Pinzetten auf 16 für Au-TW bzw. 10 für Au-TM-F erhöht werden.<sup>304</sup>

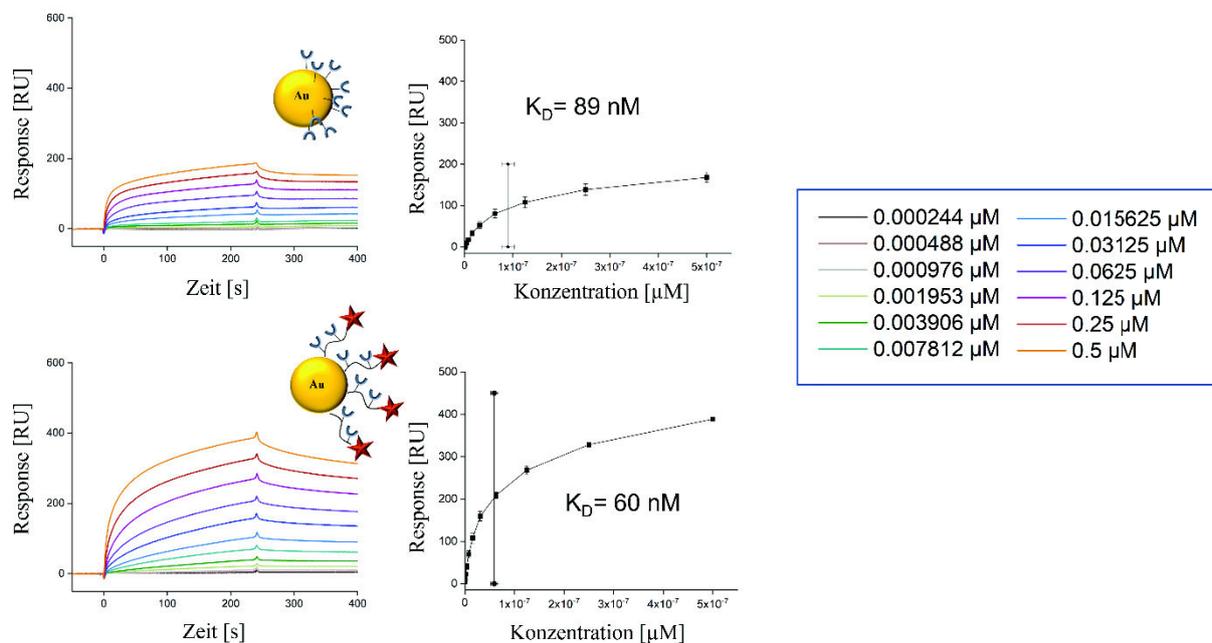
### 3.3.2 Bindungsstudien an Survivin

Die bereits oben beschriebenen Assays haben gezeigt, dass bereits die zweiwertige Präsentation der Tweezer-Motive eine erhöhte Affinität zu Survivin zeigen. Zusätzlich zeigten sie die Fähigkeit auf die Interaktion zwischen Survivin und CRM1 zu hemmen. Um den Einfluss einer erhöhten Valenz weiter auf die Hemmung der Interaktion der beiden Partner-Proteine zu untersuchen, wurden die Tweezernanopartikel in einer Hemmungsstudie (Pull-Down Assay) und Bindungsstudie (SPR-Assay) untersucht. Um die postulierte erleichterte Zellaufnahme zu bestätigen, wurde ebenfalls eine Zellaufnahmestudie durchgeführt.

Der SPR-Assay wurde analog zur bereits beschriebenen Methode durchgeführt (Kapitel 3.2.4). Hierfür wurde Survivin auf der Oberfläche des Gold-chips immobilisiert und die Liganden in Flow in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe über den Chip gegeben. Um unspezifische Bindungen durch freie Azide oder den Fluorophor auszuschließen wurden ebenfalls negativ-Kontrollen neben den beiden zu vermessenden Proben Au-TW und Au-F-TM synthetisiert und vermessen. Die erste negativ-Kontrolle ist der Vorläufer AuGSH-N<sub>3</sub> der Au-TW-Partikel und trägt freie Azide auf der Oberfläche. Zur Untersuchung des Fluorophors wurden die Verbindungen Medium-F-MM und Au-F-MM herangezogen, die neben freien Aziden ebenfalls einen Fluorophor tragen. Obwohl die beiden letzteren Proben kein bindendes Tweezer-Motiv tragen, zeigt die Verbindung Au-F-MM eine schwache Bindung an Survivin. Dies ist wahrscheinlich auf eine Wechselwirkung zwischen Survivin und den mit Fluorophoren markierten Makromolekülen zurückzuführen, die sich aus der hohen Dichte des Medium-F-MM auf den Au-Partikeln ergibt. Durch die Präsentation des Medium-F-MM auf dem Goldnanopartikeln entsteht eine viel höhere lokale Konzentration im Vergleich zum nicht konjugierten System Medium-F-MM. Diese lokal hohe Konzentration führt durch ausgeprägte hydrophobe Effekte und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zu einer unspezifischen Bindung (siehe Kapitel 5).

Die Bindungskurven der Nanopartikel zeigen im Gegensatz zu den divalenten Systemen einen steilen Anstieg und eine deutlich langsamer abfallendere Dissoziationskurve, die bereits auf eine stärkere Bindung an Survivin hindeutet. Zur ersten Einschätzung wurden auch die multivalenten usAu-Tweezer Partikel mittels Gleichgewichtsanalyse ausgewertet. So zeigten die nur mit Tweezer-funktionalisierte Nanopartikel mit einem  $K_D$ -Wert von 89 nM eine geringere

Affinität als das Konstrukt Au-F-TM mit 60 nM, obwohl diese Partikel mit 16 Tweezer-Molekülen eine größere Anzahl an bindenden Motiven aufweist als Au-F-TM mit 10 (Abbildung 52). Interessanterweise scheint auch hier das System mit einer größeren Flexibilität, verursacht durch die makromolekularen Gerüste, vorteilhaft zur Inhibierung der Survivin-CRM1 Interaktion zu sein. Bemerkenswerterweise weisen beide Nanopartikel Bindungskonstanten im Gegensatz zu den divalenten Konstrukten im nanomolaren Bereich auf, was eine Verbesserung der Affinität um den Faktor 100 bedeutet. Dies zeigt ebenfalls den Erfolg der erhöhten Multivalenz. Anschließend wurden die Nanopartikel ebenfalls als multivalentes System, analog zu den Tweezer-Makromolekülen von Thomas Vorup-Jensen und Kristian Juul-Madsen nach dem Modell von Kitov und Bundle<sup>270</sup> ausgewertet.

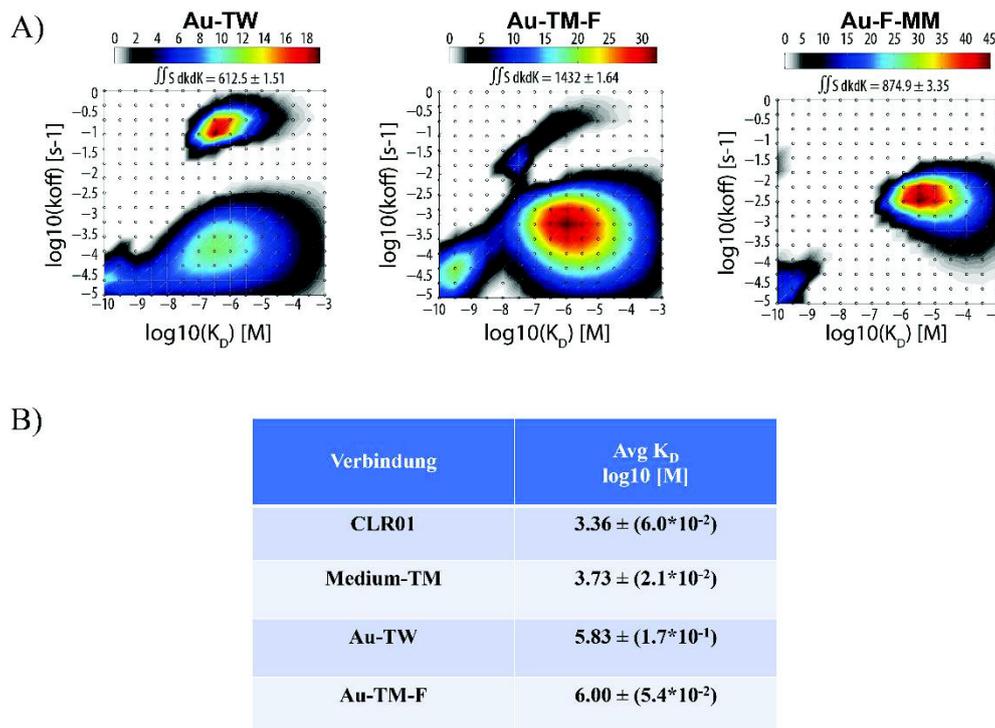


**Abbildung 52:** SPR-Bindungsaffinität. Sensorgramme für das Bindungsereignis zwischen Tweezer-Nanopartikel Au-TW bzw. Au-F-TM und immobilisiertem Survivin120, gemessen mittels SPR (links). Die Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, und für jede Verbindung ist ein repräsentatives Beispiel abgebildet. In allen Fällen waren die Konzentrationen der Verbindungen von oben nach unten 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015625, 0,007812, 0,003906, 0,001953, 0,000976, 0,000488 und 0,000244  $\mu\text{M}$ . Kurvenregressionen der Gleichgewichtsreaktionen als Funktion der Konzentration werden mit Hilfe eines Steady-State-Modells angepasst, aus dem  $K_D$ -Werte abgeleitet werden können. Die Fehler stellen die Standardabweichung aus drei Messungen dar. Die Analyse der Gleichgewichts-Affinität in Form eines  $K_D$ -Wertes kann durch Auftragen der RUs im Gleichgewichtszustand gegen die Konzentration als entsprechende Kurve für die Verdünnungsreihe erhalten werden. Dies führt zu einer Sättigungskurve. Nach Durchführung eines Fits wird der jeweilige  $K_D$ -Wert, der der Konzentration bei halbem Maximum entspricht, erhalten.<sup>1</sup>

Da beide TW-Nanopartikelkonjugate eine ähnliche Anzahl von TW-Motiven besitzen, weisen beide ebenfalls ein recht ähnliches Bindungsverhalten in ihren SPR-Bindungskurven auf. So besitzen ebenfalls beide TW-Nanopartikelkonjugate deutlich verringerte  $k_{\text{off}}$ -Werte, welche für

multivalente Wechselwirkungen zu erwarten sind. Wie bereits in der langsamer abflachenden Dissoziationskurve zu erkennen, spiegelt sich dies ebenfalls in der Dissoziationskinetik wider, die ebenfalls stark verlangsamt ist. Dies lässt auf ein nahezu irreversibles Bindungsereignis schließen, welches zum einen auf eine Adsorption der Partikeloberfläche an das Protein oder auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Letzteres ist durch die Testung der Negativprobe AuGSH-N<sub>3</sub>, welche keine Bindung an Survivin zeigt, auszuschließen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die dichte Anordnung des Bindungsmotiv der molekularen Pinzette auf der Oberfläche der Nanopartikel für multiple Wechselwirkung mit dem auf der Chip Oberfläche immobilisierten Protein sorgt. Möglicherweise tritt hier das Bindungsereignis, welches zur Aggregation bei den ITC- und NMR-Titrations führt, auf. Hierbei werden beispielsweise zwei Proteine auf der Chipoberfläche, durch Bindung zweier Tweezermoleküle desselben Nanopartikel, verbrückt. Zur theoretischen Prüfung wurde hierzu der Abstand von immobilisiertem Survivin auf der Oberfläche aus dem Immobilisierungslevel berechnet. Bei der Annahme von 1000 RU entsprechen 1 ng an gebundenem Protein pro mm<sup>2</sup>, ergibt sich bei einem Immobilisationslevel von 2118,6 RU 2,11 ng Protein pro mm<sup>2</sup>. Bei einem Molekulargewicht von survivin120 von 13814 Da errechnen sich  $91,80 \cdot 10^9$  Survivin Moleküle pro mm<sup>2</sup>. Bei einer einfachen Anordnung von quadratischen Kästchen auf einer 1 mm<sup>2</sup> Fläche, ist der intermolekulare Abstand entlang der Seiten der Kästchen die Quadratwurzel aus  $(91,80 \cdot 10^9) = 302,983$  Moleküle/mm, oder  $1 \text{ mm} / 302,983 \text{ Moleküle/mm} = 3,3 \cdot 10^{-6} \text{ mm} = 3,6 \text{ nm}$ .<sup>267</sup> Eine solche Überbrückung von zwei Proteinen könnte also basierend auf der hydrodynamischen Größe der Tweezer-Nanopartikel-Konjugate auftreten. Dies würde auch mit der beobachteten Zunahme der Bindung und verlangsamt Dissoziation übereinstimmen, ähnlich wie bei einer Chelatbindung der Liganden an mehrere Lysine eines Proteins.

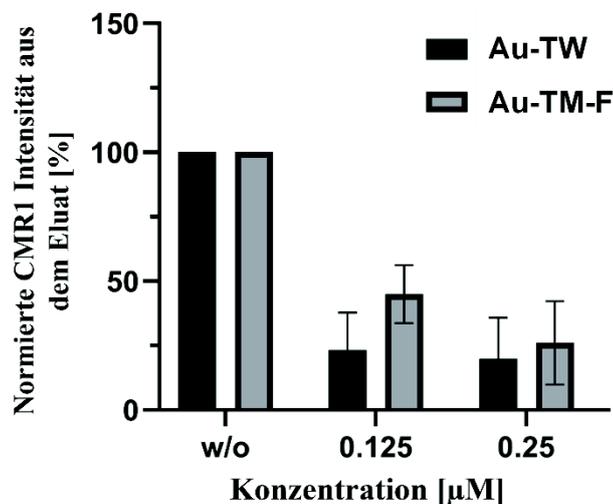
Die Betrachtung der gemittelten K<sub>D</sub>-Werte für die TW-Nanopartikelkonjugate liefert um mindestens zwei Größenordnungen niedrigere Ergebnisse als für den monovalenten Liganden CLR01 (K<sub>D</sub>  $5,71 \cdot 10^{-4} \pm 1,72 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) oder eines der TW-Makromoleküle (z. B., Medium-TM K<sub>D</sub>  $2,82 \cdot 10^{-4} \pm 0,82 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) mit  $0,69 \cdot 10^{-6} \pm 0,03 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  für Au-TW bzw.  $1,24 \cdot 10^{-6} \pm 0,22 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  für Au-TM-F (Abbildung 53B).



**Abbildung 53:** EVILFIT 2D-Diagramme, die aus direkten SPR-Messungen für die Bindung von Au-TW, Au-TM-F und Au-F-MM an immobilisiertes Survivin abgeleitet wurden (A) sowie Durchschnitts  $K_D$ -Werte im Vergleich der Verbindungen CLR01, Medium-Tm, Au-TW und Au.TM-F (B).<sup>226</sup>

Ähnliche Werte im oberen nanomolaren Bereich wurden bisher nur für ein Konjugat, das aus molekularem Tweezer und kovalent gebundenem Peptidliganden am Protein 14-3-3 erreicht.<sup>233</sup> Somit gehören die TW-Nanopartikelkonjugate mit ihren  $K_D$ -Werten zu den stärksten Tweezer-Konjugaten, die bisher an unterschiedlichsten Proteinen getestet wurden.<sup>226</sup> Zusätzlich sind sie nach dem derzeitigen Kenntnisstand die Liganden mit der höchsten Affinität auf der Grundlage einer multivalenten Präsentation, ohne weiteres Bindungsmotiv.

Neben der Affinität sollte ebenfalls die hemmende Wirkung der Pinzetten-Nanopartikelkonstrukte auf die Interaktion der Partnerproteine Survivin und CRM1 untersucht werden. Hierfür wurden erneut von Katrin Hommel aus dem Arbeitskreis von Shirley Knauer aus der Universität Duisburg-Essen in vitro Pull-Down Experiment durchgeführt.



**Abbildung 54:** Tweezer-Nanopartikel-Konjugate (Au-TW, Au-TM-F) inhibieren die Survivin-CMR1 Interaktion. Darstellung der densitometrischen Quantifizierung von Pull-Down Assay, bestehend aus dem Mittelwert von zwei oder drei Wiederholungen.<sup>226</sup>

Wie in Abbildung 54 ersichtlich hemmen die Konstrukte Au-TW und Au-TM-F die Interaktion bereits effektiv bei niedrigen Konzentrationen von 0,125  $\mu\text{M}$  und 0,25  $\mu\text{M}$ .

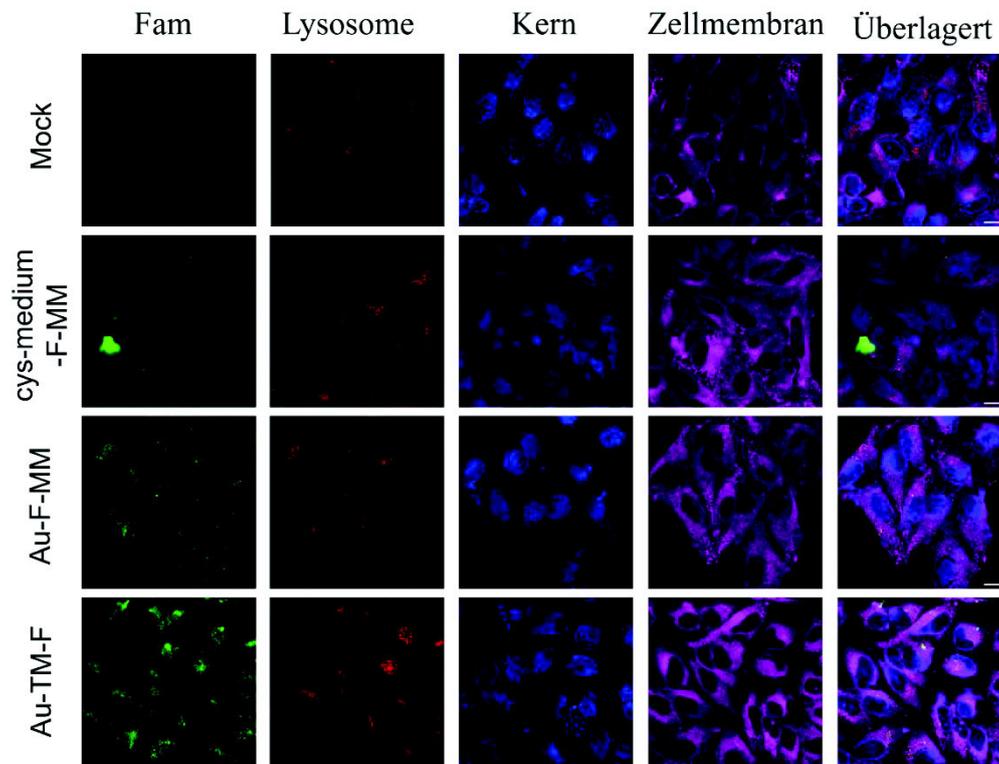
Die Quantifizierungen der zugehörigen Western-Blot-Daten zeigten eine Reduzierung der Bindung um bis zu 75 %. Dies zeigt eindeutig das Potenzial der Tweezer-Nanopartikelkonjugate. Sie sind somit fähig auch in komplexen Proteingemischen, wie sie in den Zelllysaten vorhanden sind, die Ziel Interaktion zu hemmen, was eine Voraussetzung für ihre gezielte zelluläre Anwendung ist.

### 3.3.3 Zellaufnahmestudie

Zuletzt wurde überprüft, ob die potenten Survivin-Crm1-Inhibitoren Au-TW und Au-F-TM, wie postuliert, die Zellmembran durchdringen können und wo genau sie in den Zellen lokalisiert werden können.

Hierfür wurden von *Dr. Sebastian Kollenda* aus dem Arbeitskreis Epple der Universität Duisburg-Essen HeLa Zellen in einer 2x4-Well-Platte präpariert und fixiert. Zur genauen Beobachtung und Auswertung wurden die fixierten Zellen mit verschiedenen etablierten Markern angefärbt. Anschließend wurde das Verhalten des Präkursors, das unfunctionalisierte Makromolekül selbst (Cys-Medium-F-MM), neben dem Tweezer-Nanopartikelkonstrukten, Au-F-TM durch konfokale Mikroskopie verfolgt. Durch das konfokale Mikroskop sichtbar gemacht, zeigt

sich eine freie Verteilung der Nanopartikelkonstrukte im gesamten Zytoplasma, wobei sich eine leichte Konzentrationserhöhung in den Lysosomen abbildet (Abbildung 55).



**Abbildung 55:** CLSM-Aufnahmen der Makromolekülverbindung cys-Medium-F-MM und der beiden Nanopartikelkonstrukte Au-F-TM und Au-F-MM-Tweezer mit HeLa-Zellen (aufgenommen von Dr. S. Kollenda) nach einer Inkubationszeit von 24 h. Der Maßstab beträgt 20 µm. Die Verbindungen tragen Fluorescein als Fluoreszenzfarbstoff. Die Lysosome wurden mit LysoTracker Red, die Zellkerne mit Hoechst und die Zellmembranen mit CellMask Deep Red eingefärbt.<sup>1</sup>

Für das fluoreszenz-markierte Makromolekül kann keine Zellaufnahme detektiert werden. Der stark fluoreszierende lokale Spot in den Zellaufnahmen, kann auf eine schlechte Löslichkeit und schlechte Diffusion zurückgeführt werden, weshalb ebenfalls von einer Aggregation der Moleküle ausgegangen werden muss. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation der HeLa Zellen mit Tweezer-Nanopartikelkonstrukten zu eindeutigen Fluoreszenzsignalen innerhalb der Zelle, wodurch die erfolgreiche Zellaufnahme der Nanopartikelkonstrukte bewiesen werden konnte. Unter den Partikeln selbst zeichnen sich keine Unterschiede ab, womit alle Partikel, unabhängig von den jeweils tragenden Ligandenkonstrukten, fähig sind die Zellmembran zu durchdringen. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich interessanterweise, dass die funktionalisierten Nanopartikelkonstrukte in diskreten Vesikeln im Zytoplasma gefunden werden können. Sie reichert sich somit nicht an der Membran oder im Zellkern an. Mit hoher Wahrscheinlichkeit erfolgt die Aufnahme durch Endozytose, mit einer nachfolgenden Einkapselung in Lysosomen.

Für zukünftige Arbeiten bleibt noch die Klärung des Transports der TMs und der NP-Konjugate in den Zellkern. Eine mögliche Herangehensweise liefert der Einbau von Peptidsegmenten, von welchen bekannt ist, dass sie die Kernlokalisierung fördern.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war das Design und die Synthese multivalenter Tweezer-Konjugate auf Basis von sequenzdefinierten Makromolekülen. Die erhaltenen Liganden wurden anschließend auf ihre Bindung an Survivin bzw. als Inhibitoren der Survivin-CRM1 Interaktion in biologischen Assays untersucht werden. Unterstützt wurde diese Arbeit durch den Beitrag der Kooperationspartner\*innen *Antonio Bietti* und *Dr. Inesa Hadrović* aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Schrader*, von *Dr. Annika Meiners* und *Katrin Hommel* aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Shirley Knauer*, von *Dr. Kai Klein* und *Dr. Sebastian Kollenda* aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Matthias Epple*, von *Dr. Kristian Juul-Madsen* und *Prof. Dr. Thomas Vorup-Jensen* sowie von *Dr. Christine Beuck* und *Prof. Dr. Peter Bayer*.

Im ersten Schritt wurde die Kristallstruktur des Zielproteins Survivin, insbesondere die der Protein-Protein-Grenzfläche, das NES, und in der unmittelbaren Nähe, hinsichtlich gut zugänglicher Lysinseitenketten untersucht. Durch Bestimmung der Abstände der im Homodimer vorliegenden verfügbaren vier Lysinen ergaben sich die Mindestabstände für die divalenten Tweezer-Makromoleküle. Synthetisiert wurden anschließend mittels Polymerfestphasensynthese nach *Hartmann* drei makromolekulare Grundgerüste, die sich vor allem im Ligandenabstand, und somit in der Konturlänge und Wasserlöslichkeit unterscheiden. Der Platzhalterbaustein EDS wurde in unterschiedlichen Anzahlen eingesetzt, welcher den Abstand zwischen den Tweezer-Einheiten reguliert und zeitgleich für eine bessere Hydrophilie der Gerüste verantwortlich ist, da eine gute Wasserlöslichkeit für biologische Anwendungen in wässrigen Umgebungen unabdingbar ist. Als funktioneller Baustein wurde BADS verwendet, welcher in seiner Seitenkette ein Azid trägt, sodass die Anbringung des Alkynyl-Tweezers mittels Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition erfolgen konnte. Zusätzlich wurden die drei Grundgerüste mit einem endständigen Fluorophor synthetisiert, um einen farblichen Read-out für biologische Assays einzuführen. Da der Alkynyl-Tweezer eine wertvolle Ressource, durch seine aufwendige Synthese darstellt wurde die CuAAC nicht auf der Festphase, sondern in Lösung durchgeführt. Hierbei wurde eine sequenzielle Zugabe des von den Kooperationspartnern *Antonio Bietti* und *Inesa Hadrović* zur Verfügung gestellten Tweezerliganden verwendet, um eine vollständige Funktionalisierung zu erreichen. Besonders herausfordernd war hingegen die Aufarbeitung, welche final mittels aufeinander folgende Wasch- und Zentrifugationsschritten durchgeführt wurde.

Im weiteren Schritt wurden die so erfolgreich synthetisierten divalenten Tweezer-Makromoleküle auf ihre Bindungsfähigkeit an das Zielprotein Survivin untersucht. Hierfür wurden zuerst Messungen durchgeführt, bei welchen die beiden Interaktionspartner in Lösung vorliegen. In einem von *Dr. Christine Beuck* durchgeführten NMR-Titrations-Versuch sollte durch  $^{15}\text{N}$ -markiertes Survivin die genaue Interaktionsstelle herausgefunden werden. Durch Verbrückung mehrerer Proteine durch mehrere Ligandensysteme kam es zur Aggregation und Ausfallen der Interaktionspartner, wodurch eine Auswertung nicht weiter möglich war.

In einem darauffolgenden ITC-Titrationsexperiment (durchgeführt von *Inesa Hadrović* und *Annika Lennartz*) sollte anschließend die Bindungsstärke ermittelt werden. Sowohl direkte als auch indirekte Titration zeigen starke Bindungsereignisse, wie den Erhalt von exothermen Peaks. Diese könnten ebenfalls ein Hinweis auf eine Aggregation sein, welche bereits bei der NMR-Titration eingetreten ist. Aus dem Bindungskurvenprofil lässt sich ein sequenzielles Bindungsereignis ableiten, allerdings konnte kein geeigneter Fit für das Bindungsereignis gefunden werden, um finale thermodynamische Daten zu erhalten. Als weiteres Experiment zur Untersuchung der Bindung in Lösung wurde zusammen mit *Dr. Annika Lennartz* ein Fluoreszenzanisotropie Assay durchgeführt. Alle Liganden zeigen hierbei eine Bindung an Survivin. Durch die Komplexität der Bindung der divalenten Systeme wurde hierbei auf ein Single-Site Bindungsmodell zurückgegriffen, dass die reale Bindung nur geringfügig abbildet, dennoch einen Vergleich der Liganden untereinander ermöglicht. So zeigt der mittlere Ligand Medium-TM-F die stärkste Bindung hinsichtlich des Zielproteins Survivin, wobei das längste Konstrukt mit einem hohen Bindungswert dem Trend nicht folgt.

Zur weiteren Untersuchung der Interaktionspartner wurde anschließend ein SPR-Assay entwickelt. Hierbei besteht der größte Unterschied zu den bisher durchgeführten Assays, dass das Protein fest auf einem Trägermaterial immobilisiert ist. Die Liganden hingegen werden in einer Pufferlösung anschließend über das immobilisierte Protein gegeben und die Bindungsaffinität wird gemessen. In einer ersten Auswertung wurden Gleichgewichtskonstanten  $K_D$  ermittelt. Da auch hier die Grundlage eine 1:1 Bindung ist und die Kinetik damit nicht erfasst werden kann, gibt diese Konstante nicht den realen Bindungszustand wieder, lässt aber den Vergleich der divalenten Systeme untereinander zu. Hier zeigt die längste Verbindung Long-TM mit  $75 \mu\text{M}$  den besten Affinitätswert. Für eine multivalente Auswertung der erhaltenen Bindungskurven wurde mit den Kooperationspartnern *Dr. Kristian Juul-Madsen* und *Prof. Dr. Thomas Voruop-Jensen* der Universität Aarhus eine individuell Auswertung nach dem Modell von *Kitov und Bundle*<sup>270</sup> vorgenommen. Während der monovalente Tweezer eine recht schwache Interaktion mit einem Durchschnitts  $K_D$  von  $3,36 \pm 6,0 \times 10^{-2} \text{ M}$  und einer schnellen Dissoziationsrate von

0.5–0.01 s<sup>-1</sup> zeigt, zeigen die divalenten Systeme im Gesamten eine definiertere Interaktion mit langsameren Dissoziationskonstanten. Eine Auswertung der kumulativen Häufigkeiten gegen den K<sub>D</sub> zeigt eine Anordnung von monovalent über kurz, mittel und lang. Somit steigt die Affinität mit der Valenz und Gesamtlänge der Konstrukte, wodurch sich hier ebenfalls das Konstrukt Long-TM als bester Binder ermitteln lässt.

Um anschließend die Inhibitionsfähigkeit der divalenten Tweezer-Makromoleküle auf die Survivin-CRM1 Interaktion zu untersuchen, wurden Pull-Down Assays von *Dr. Annika Lennartz* durchgeführt. Für alle Konstrukte konnte eine Inhibierung der Interaktion nachgewiesen werden. Auch die Messung des monovalenten Tweezers stimmt mit vorausgegangenen Ergebnissen überein.<sup>74</sup> Besonders auffällig ist die erneute Inhibitionstärke des längsten divalenten Tweezer-Makromoleküls, das die stärkste Inhibitionsfähigkeit aufzeigt. Bereits bei einer Konzentration von weniger als 10 µM kann dieses Konstrukt effektiv in die CRM1-Survivin-Interaktion eingreifen. Diese Dominanz ist trotz der Schwierigkeit der Quantifizierung und der Bestimmung der absoluten Werte in den Western Blots deutlich zu erkennen. Die Zunahme des inhibitorischen Potenzials ist zum Teil auf die größere Struktur im Vergleich zu den anderen TMs und die potenziell verbesserte räumliche Abschirmung der NES-Region nach der Bindung an das Protein zurückzuführen. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse der Untersuchung von Tweezer-Peptiden auf die Inhibierung der Survivin-CMR1 Interaktion vorausgegangener Arbeit unterstützt.<sup>74</sup> Abschließend ist darauf hinzuweisen, dass bisherige Pull-Down Assays mit freiem Survivin durchgeführt wurden. Somit zeigt dieses Pull-Down Experiment die Funktionsfähigkeit der divalenten TM auch in komplexen Proteingemischen, wie Zelllysaten.

Um das Konzept der Multivalenz auf eine weitere Ebene zu heben, wurde anschließend das divalente Tweezer-Makromolekül als auch der monovalente Tweezer auf die Oberfläche von ultrakleinen Goldnanopartikeln aufgebracht. Diese weisen eine Größe von ca. 2 nm auf, wodurch sie im Bereich anderer kleiner Biomoleküle liegen. Neben ihren besonderen physikalischen Eigenschaften weisen sie die Fähigkeit die Zellmembran zu durchdringen auf, wodurch sie sich somit als hervorragendes Trägermaterial eignen.<sup>291, 303, 307</sup> Durch die Ausbildung einer (pseudo-)kovalenten Bindung zwischen Gold und Schwefel eignen sich thiol-haltige Liganden zur Anbringung auf die Goldoberfläche. Hierfür wurde in die Struktur des mittleren Makromolekülgerüsts die Aminosäure Cystein integriert. Darüber hinaus wurde für nachfolgende biologische Assays der Fluorophor Fluorescein endständig angebracht. Da freie Thiole zur Oxidation zu Disulfiden neigen musste auf eine zügige, sauerstoffarme Aufarbeitung geachtet werden. Da

die Konjugation des Tweezermoleküls auf Grund der möglichen Störung durch freie Thiole und der Disulfidbildung erst nach der Anbringung an die Goldoberfläche erfolgt, wurde bei der Aufarbeitung des Makromoleküls ebenfalls auf ein Reduktionsmittel verzichtet, da die Gefahr der Reduktion, der notwendigen Azide zu Aminen bestand. Die Synthese der ultrakleinen Tweezernanopartikel wurde von *Dr. Kai Klein* an der Universität Duisburg-Essen nach der Brust Synthese durchgeführt, bei welcher die funktionalisierten Nanopartikel in-situ generiert werden. Für die Anbringung des monovalenten Tweezers wurden GSH-funktionalisierte Nanopartikel hergestellt und nachfolgend das Amin zum Azid umgewandelt. Die Anbringung der Tweezer-Moleküle erfolgte durch CuAAC. Mittels DCS wurden die hydrodynamischen Durchmesser bestimmt, die mit ca 1,5 nm für die Nanopartikel AuGSH, AuGSH-N<sub>3</sub> und Au-TW sehr ähnlich ausfällt. Lediglich der Au-F-TM zeigt einen größeren  $d_H$  von 1,9 nm, was auf die Makromolekülhülle um den Goldkern hinweist. Mittels UV-Vis wurde als indirekter Beweis durch Ausbleiben der Plasmonenbande größerer Partikel, durchgeführt. Ebenso wurde durch Integration der Fluorophorabsorptionsbande und anschließender Kalibrierungskurve der Funktionalisierungsgrad auf ca. 75 Makromoleküle bestimmt werden. Da durch Überlapp der Tweezerabsorptionsbande und der Untergrundbande der Nanopartikel keine ausreichende Grundline zur Integration vorhanden ist, kann diese Methode zur Quantifizierung der Tweezermoleküle nicht herangezogen werden. Hierfür wurde die Probe anschließend mittels ICP-MS/ICP-OES auf die Elemente Au und P nach Mikrowellenaufschluss untersucht. Durch die Umrechnung der Massenverhältnisse in die molare Elementkonzentration und der Konzentration der Nanopartikel pro Probe wurde die Phosphormenge pro Nanopartikel bestimmt. Dadurch, dass jedes Tweezer-Molekül zwei Phosphorsäureanteile besitzt, ist die Phosphorkonzentration doppelt so hoch, wie die Anzahl der gebundenen Tweezer-Moleküle. Durch Heranziehen dieser Gegebenheit konnte die Menge an gebundenen monovalenten Tweezer-Molekülen auf 16 Stück pro Au-TW und auf 10 pro Au-F-TM bestimmt werden. Zwar ist in beiden Fällen die Anzahl an konjugierten Tweezern viel geringer als die Anzahl der zur Verfügung stehenden Azidgruppen, dennoch konnte die Anzahl gegenüber der divalenten Systeme bis um den Faktor acht erhöht werden. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf die räumliche Verdrängung von großen Tweezermolekülen auf der Oberfläche der ultrakleinen Nanopartikel.

Anschließend wurden mit den Tweezer-Nanopartikel-Konjugaten Au-TW und Au-TM-F ebenfalls Bindungs- und Inhibitionsassays mittels SPR und Pull-Down durchgeführt, wie für die divalenten Tweezer-Makromoleküle bereits beschrieben. Da nicht alle verfügbaren Azide mit Tweezer zur Reaktion gebracht wurden und für eine mögliche unspezifische Bindung sorgen

könnten wurde zum einen das unfunktionalisierte Makromolekül cys-Medium-F-MM als auch die Verbindung Au-F-MM im SPR-Assay vermessen. Während erstere keine Bindung zeigt, konnte für letztere eine schwache Bindung gemessen werden, die von der lokalen Dichte des Fluorophors auf dem Goldnanopartikel resultiert und von unspezifischer Natur ist. Für beide Nanopartikelkonstrukte kann eine steil ansteigende Assoziationskurve und eine nur langsam abfallende Dissoziationskurve detektiert werden, wodurch bereits auf potente Binder zu schließen ist. Bereits die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten zeigt Bindungskonstanten im nM-Bereich und damit deutlich höhere Affinitäten für die Nanopartikelkonstrukte. Die multivalente Auswertung bestätigt dies in deutlich geringeren  $k_{\text{off}}$ -Werten und  $K_D$ -Werten um mindestens zwei Größenordnungen kleineren Werten als für die divalenten Konstrukte mit  $0,69 \times 10^{-6} \pm 0,03 \times 10^{-6} \text{ M}$  für Au-TW und  $1,24 \times 10^{-6} \pm 0,22 \times 10^{-6} \text{ M}$  für Au-TM-F. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand handelt es sich somit um die Liganden mit der höchsten Affinität auf Tweezer-Basis, die aus einer multivalenten Präsentation und ohne Hinzufügung anderer Bindungsmotive abgeleitet wurden.

Vielmehr profitiert das Bindungsereignis von den kompakten Abmessungen der us-AuNPs, die eine dichte Anordnung von molekularen Pinzetten für multiple Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche darstellen. Auf der SPR-Chip-Oberfläche könnte dies auch zur Überbrückung von zwei Proteinen führen, wenn zwei Tweezer-Motive desselben Nanopartikel-Liganden gleichzeitig an Lysinreste von zwei verschiedenen Proteinen binden, je nach Dichte der Proteinimmobilisierung. Die Berechnung des Abstands von immobilisiertem Survivin auf der Chipoberfläche anhand der gemessenen RU-Werte ergibt einen mittleren Abstand von 3,6 nm. Basierend auf der hydrodynamischen Größe der Tweezer-Nanopartikel-Konjugate ist eine solche Überbrückung von zwei Proteinen durchaus möglich. Dies würde auch mit der beobachteten Zunahme der Bindung sowie der verlangsamten Dissoziation übereinstimmen, die in ähnlicher Weise bei einer chelatartigen Bindung der Liganden an mehrere Lysine eines Proteins auftritt.

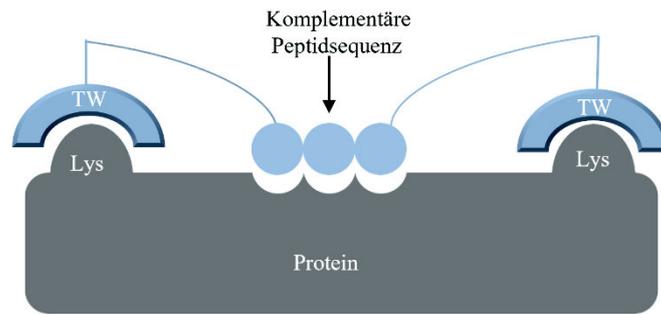
Im nachfolgenden Pull-Down Assay wurden die potenten Binder Au-TW und Au-TM-F auf ihre hemmende Wirkung hinsichtlich der Survivin/CRM1 Bindung untersucht. Tatsächlich beeinträchtigten beide Konjugate, Au-TW und Au-TM-F, die CRM1-Bindung bereits bei niedrigen Konzentrationen von  $0,125 \mu\text{M}$  bzw.  $0,25 \mu\text{M}$  effizient. Dies ist im Gegensatz zu den divalenten Konstrukten eine 100-fache stärkere Inhibition. Die Verringerung der Bindung aus der

desiometrischen Quantifizierungen der Western-Blot-Daten kann um bis zu 75 % bestimmt werden.

Der Vorteil der Nanopartikel Konstrukte durch Zellmembranen dringen zu können, wurde in einem Zellaufnahme Experiment genauer untersucht. Hierfür wurde die Lokalisierung des Makromolekularen Gerüsts Cys-Medium-F-MM, des Nanopartikel mit angebrachten Makromolekül Au-F-MM und des finalen Tweezer-Makromolekul-Nanopartikel Au-TM-F in mit Markern angefärbten HeLa-Zellen durch konfokale Mikroskopie überwacht. Wie postuliert, wurden nur Nanopartikel Konstrukte in die Zellen aufgenommen. Sie konnten in Vesikeln im Zytosol gefunden werden. In zukünftigen Untersuchungen gilt es den Transport der Konstrukte in den Zellkern zu fokussieren, da dort die Interaktion der Partnerprotein Survivin/Cmr1 stattfindet. Ebenfalls ist Implementierung von Segmenten, wie Peptiden, die die Kernlokalisierung fördern, zu überlegen.

Insgesamt konnte durch verschiedene biochemische Experimente gezeigt werden, dass die Avidität durch das Konzept der Multivalenz systematisch gesteigert werden konnte. Das lange, flexible divalente Tweezer-Makromolekül zeigt die besten Bindungs- als auch Inhibitions-werte. Durch die Konjugation an us-AuNPs konnte das System weiter verbessert werden. Zum einen konnte die Valenz der Tweezerliganden, von zwei auf 10 bzw. 16 Liganden erhöht werden, was in einer weiteren Verstärkung der Bindung- als auch Inhibition resultiert. Zum andern lösen sie das Problem der Zellaufnahme und ermöglichen den Transport der Konstrukte in das Innere von HeLa Zellen. Dies zeigt gut, wie die maßgeschneiderte Kombination verschiedener multivalenter Gerüste (Makromoleküle und Nanopartikel) ein supramolekulares Erkennungsmotiv in einen leistungsstarken Protein-Protein Modulator weiterentwickelt.

Eine weitere Idee für zukünftige Untersuchungen hinsichtlich der weiteren Verbesserung der Spezifität und Bindungsaffinität ist die Verknüpfung des multivalenten Ansatzes dieser Arbeit und die Verknüpfung mit zusätzlichen Erkennungseinheiten, wie sie bereits in vorausgegangener Arbeit von Meiner et al. angewandt wurde.<sup>74</sup> So würde die bereits auf die NES-Sequenz abgestimmte Peptidkette herangezogen werden und neben dem C-Terminus ebenfalls der N-Terminus mit einer Azidgruppe funktionalisiert werden. Nach anschließender, bereits etablierter, CuAAC wird ein divalentes Tweezer-Peptid-Konstrukt erhalten, welches durch zusätzliche Erkennungseinheiten eine Spezifität als auch Avidität aufweist (Abbildung 56).



**Abbildung 56:** Schematische Darstellung eines Konzepts zur weiteren Erhöhung der Avidität. Hierfür wird neben dem divalenten Tweezer eine komplementäre Peptidsequenz zur weiteren Erkennung in das Liganden System integriert.

Eine weitere Möglichkeit stellt das Design eines Tetramers dar. Um die Spezifität als auch die Avidität weiter zu erhöhen, ist ein passgenaues Design weiterhin unabdingbar. Da die vier verfügbaren Lysine des Homodimers unterschiedlich auseinanderliegen, ist die genaue Prüfung der Abstände zum Design der Strukturen wichtig. Hier kann ebenso auf die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zurückgegriffen werden, dass eine gewisse Flexibilität der Konstrukte einen positiven Effekt auf die gewünschten Parameter auswirkt. Eine weitere mögliche Umsetzung besteht im Design eines dynamischen Konstrukts beispielsweise durch pH-Schaltung. Ein divalentes System, das zum Tetramer beispielsweise über Disulfidbildung oxidiert wird und gezielt durch Veränderung des pH-Wertes in die divalente Form gebracht werden kann und somit dynamisch ist, wie Zielproteine in ihrer biologischen Umgebung.



## 5 EXPERIMENTELLER TEIL

### 5.1 Chemikalien und analytische Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien kommerziell erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Trockene HPLC- und Peptid-Grad Lösungsmittel wurden von *Sigma Aldrich* oder *Merck* erworben und ebenso ohne weitere Aufreinigung verwendet. Wasser als Lösungsmittel wurde in Reinstform, gewonnen durch Wasseraufbereitung einer Milli-Q Anlage, verwendet.

Alle in Lösung stattfindenden Reaktionen der Bausteine wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt, wobei Silikagel Platten 60 F<sub>254</sub> (0.25 mm Schichtdicke) verwendet wurden. Zur säulenchromatographischen Aufreinigung wurde 60 Å (0.040-0.063 mm) Kieselgel von *Alfa Aesar* verwendet.

Alle manuell durchgeführten Festphasenreaktionen wurden in 10 mL Polypropylen Chromatonspritzen, welche am Boden durch eine Polypropylen Fritte und B7 Septum versiegelt sind, durchgeführt. Das mit einem Trityllinker funktionalisierte *TentaGel® S RAM* Festphasenharz (Beladung 0.25 mmol/g) wurde von *Rapp Polymere* erworben.

#### <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie

<sup>1</sup>H-NMR wurden mit einem Bruker Avance III 300 (300 MHz) und 600 (600 MHz) bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemische Verschiebung ( $\delta$ ) wurde in parts per million (ppm), die Kopplungskonstante  $J$  wurde in Hertz (Hz) angegeben. Alle <sup>1</sup>H-Spektren sind auf ihre Lösungsmittelpeaks (CDCl<sub>3</sub>:  $\delta$  = 7.26 ppm, DMSO-d<sub>6</sub>:  $\delta$  = 2.50 ppm, D<sub>2</sub>O:  $\delta$  = 4.79 ppm) standardisiert. Multiplizitäten sind wie folgt angegeben s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett und m = Multipllett.

An allen Spektren der Oligomere wurden zur Auswertung eine automatische Phasenkorrektur vorgenommen.

#### Umgekehrte Phase - Hochdruckflüssigkeitschromatographie - Massenspektrometrie (RP-HPLC-MS)

RP-HPLC-MS Analyse wurde an einem Agilent 1260 Infinity Gerät, welches mit einem Wellenlängendetektor (VWD, auf 214 nm gesetzt) und einem 6120 Quadrupole LC/MS

Elektronenspray Ionisierungsquelle (ESI) (positive mode,  $m/z = 200$  bis  $2000$ ) gekoppelt wurde, durchgeführt. Als Säule wurde eine MZ-AquaPerfekt C18 ( $3.0 \times 50$  mm,  $3 \mu\text{m}$ ) RP (reverse phase) Säule von Mz-Analysentechnik mit einer Flussrate von  $0.4$  mL/min bei  $25$  °C verwendet. Als Eluent kam ein mit  $0.1$  % Ameisensäure versetztes Wasser/Acetonitril-Gemisch zum Einsatz. Alle ermittelten Reinheiten wurden durch Integration des RP-HPLC-Spektrums bestimmt.

ESI-MS wurde mit den bereits genannten Geräten und Quadrupole Detektor durchgeführt.

Die Makromolekül Aufreinigung wurde mittels präparativen HPLC an einem Agilent 1260 Infinity Instrument, gekoppelt an einen Wellenlängen Detektor (gesetzt auf  $240$  nm) und automatisiertem Fraktionssammler, durchgeführt. Für die Isolierung der Oligomere wurde als Säule eine CAPCELL PAK C18 ( $20 \times 250$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) von *Shiseido*, mit einer Flussrate von  $20$  mL/min bei  $25$  °C verwendet. Als Eluent wurde ein Wasser/Acetonitril Gemisch eingesetzt.

### **Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)**

HR-ESI-MS Messungen wurden an einem Bruker UHR-QTOF maXis 4G mit einem direkten Spritzenpumpeneinlass, ESI Quelle, Quadrupol mit darauffolgendem time off flight (QTOF) Massenanalysator, durchgeführt.

### **Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisierung - Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)**

Für die Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisierung - Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) wurden die Verbindungen mit einem Bruker MALDI-TOF Ultraflex I (Bruker Daltonics) System mit  $2,5$  Dihydroxybenzoesäure (DHB) und  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizimtsäure (CHCA) als Matrix analysiert. Das Verhältnis von Matrix zur Verbindung war  $10:1$ . Die Spektren wurden sowohl im linearen Modus für einen  $m/z$ -Bereich von  $1000-4000$  als auch im Reflektormodus für einen  $m/z$ -Bereich von  $2000-20000$ . Der Reflektormodus wurde mit einer Proteinmischung kalibriert, während der lineare Modus nicht kalibriert wurde.

### **Gefriertrocknung**

Lyophilisiert wurden sämtliche Proben mit einem Alpha 1-4 LD plus Instrument von *Martin Christ Freeze Dryers GmbH*. Als Parameter während des Vorgangs sind  $-52$  °C und  $0.1$  mbar gewählt worden.

### Ligandenvorbereitung und 3D-Docking

Für die Ligandenvorbereitung und 3D-Docking wurden die Liganden mit LigPrep in der Schrödinger-Suite hergestellt. Die Tweezer-Makromoleküle wurden an die gut zugänglichen Lysine 90 und 103 in der Nähe der der Survivin-Bindungsfurche in einer 3D-Anordnung ange-dockt. Nach der Minimierung der molekularen Pinzetten und der anschließenden Optimierung mit dem LigPrep-Modul wurde die endgültige Ligandenstruktur mit Hilfe des Builder-Panels in Maestro erstellt. Dieses Tool ermöglichte die Erstellung von Brücken-Linkern in Form von Triazolringen zwischen der Alkin-Einheit auf der Pinzette und den beiden Azid-Einheiten auf dem Oligomer.

### Molekulardynamische Simulation

Für die Molekulardynamische Simulation wurde das OPLS\_2005-Kraftfeld für die Optimierung und die Erzeugung von energiearmen Konformeren der Liganden verwendet (Kraftfeld: OPLS\_2005; Monte Carlo: 1000 Schritte, GBA Solvation). Die sich daraus ergebende Struktur wurde dann ebenfalls für die Durchführung von Molekulardynamiksimulationen mit Desmond-GPU ausgewählt (MD: Desmond-GPU, 100 ns, NPT, 150 mM NaCl, explizites Wasser, 300 K).

### Diffusionsgesteuerte NMR-Spektroskopie

<sup>1</sup>H-DOSY-NMR-Proben enthielten 100 μM kurzes, mittleres oder langes TM in PBS-Puffer (pH 7,4) mit 10 % D<sub>2</sub>O. Nanopartikel-Proben wurden in H<sub>2</sub>O mit 10 % D<sub>2</sub>O hergestellt. 1H-DOSY-Spektren wurden als Pseudo-2D-DOSY-Datensatz bei 25°C aufgenommen. Die Gradientenstärke wurde schrittweise linear von 5 bis 95 % der maximalen Gradientenstärke (50,4 G cm<sup>-1</sup> für einen geglätteten quadratischen Gradientenimpuls) erhöht. Die Wasserunterdrückung wurde durch Hinzufügen eines Vorsättigungspulses zur 1H-DOSY-Pulssequenz aus der Bruker-Bibliothek erreicht. Die DOSY-Diffusionszeit Δ betrug für alle Proben 100 ms, mit einer gepulsten Gradientendauer δ von 2 ms für die TW-Moleküle und 4 ms für Nanopartikel. Die linearisierten Diffusionsdaten wurden nach der Stejskal-Tanner-Gleichung aufgetragen und angepasst.<sup>308, 309</sup>

(Gleichung 2)

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\gamma^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) \cdot D \cdot G^2$$

mit  $I$  = Signalintensität,  $I_0$  = Signalintensität ohne Gradient,  $\gamma$  = gyromagnetisches Verhältnis von  $^1\text{H}$ ,  $\delta$  = Impulslänge des Diffusionsgradienten,  $\Delta$  = Diffusionsverzögerung,  $G$  = Gradientenstärke,  $D$  = translatorischer Diffusionskoeffizient.

Die Stejskal-Tanner-Plots von 7-9 gut erkennbaren Protonensignalen der TM-Liganden und 6 Signalen für die Nanopartikel wurden zunächst getrennt analysiert. Wenn sich der gleiche Diffusionskoeffizient innerhalb der Fehlermarge ergab, wurden die relativen Intensitäten  $I/I_0$  aller Signale gemittelt. Die Fehlerbalken der gemittelten Datenpunkte geben die Standardabweichung an. Die angegebene Genauigkeit des Diffusionskoeffizienten ist die Standardabweichung der Stejskal-Tanner-Anpassung.

Der hydrodynamische Durchmesser  $d_H$  wurde nach der Stokes-Einstein-Gleichung berechnet:

(Gleichung 3) 
$$d_H = \frac{k_B \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D}$$

mit  $d_H$  = hydrodynamischer Durchmesser,  $k_B$  = Boltzmann-Konstante,  $T$  = Temperatur in K,  $\eta$  = dynamische Viskosität von  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $25\text{ }^\circ\text{C}$  ( $8,95 \cdot 10^{-4}\text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $D$  = translatorischer Diffusionskoeffizient.

### **Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)**

Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Messungen wurden mit einem Biacore X100 von Cytiva (ehemals GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden) wie zuvor beschrieben durchgeführt.<sup>152</sup>

Die Oberfläche des C1-Sensorchips (Cytiva) wurde vor der Immobilisierung durch eine zweifache Injektion von  $0,1\text{ M}$  Glycin-NaOH +  $0,3\%$  Triton X100, pH 12, aktiviert und anschließend mit HBS- $\text{P}^+$ -Puffer gewaschen.

Survivin120 wurde auf der C1-Sensorchip-Oberfläche der Messzelle 2 über Thiol-Kopplung durch die Wizard-Vorlage für die Immobilisierung immobilisiert.

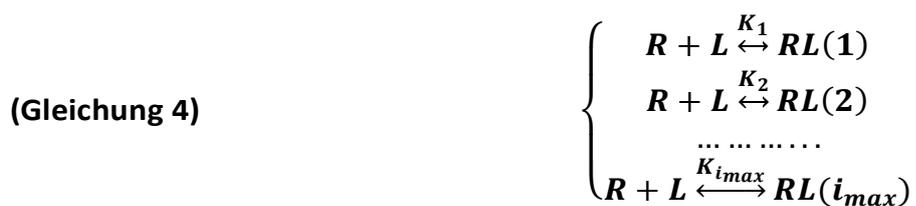
Dazu wurde eine  $126\text{ }\mu\text{M}$  Stammlösung von Survivin120 in PBS-Puffer in  $10\text{ mM}$  Acetatpuffer (pH 5,5, Cytiva) verdünnt, um eine endgültige Proteinkonzentration von  $1,26\text{ }\mu\text{M}$  zu erhalten. Eine  $260\text{ mM}$  Cysteaminlösung in Wasser wurde als reaktives Disulfid verwendet. Die Deaktivierung nicht umgesetzter Disulfidgruppen erfolgte mit  $50\text{ mM}$  L-Cystein,  $1\text{ M}$  NaCl in  $0,1\text{ M}$  Formiatpuffer bei pH 4,3. Bei Fließzelle 2 wurde ein Immobilisierungsgrad von  $2118,6\text{ RU}$  erreicht. Fließzelle 1 erreichte nach Blockierung mit einer Ethanolamin-HCl-Lösung ( $1\text{ M}$ , pH 8,5, Cytiva) einen Immobilisierungsgrad von  $34,7\text{ RU}$ . Als Laufpuffer wurde HBS- $\text{P}^+$  (pH 7,4, Cytiva) mit einer Durchflussrate von  $5\text{ }\mu\text{l min}^{-1}$  verwendet. Nach der Immobilisierung wurde

das System mit dem Laufpuffer (HBS-P<sup>+</sup>-Puffer) geprint, und es wurden zwei Startzyklen durchgeführt.

Die (Pinzetten-)Moleküle wurden in Konzentrationen von 400-0,1953125 µM bzw. 0,5-0,000244141 µM in einen Laufpuffer mit einem Verdünnungsfaktor von 2 injiziert. Es wurden eine Flussrate von 10 µL min<sup>-1</sup> sowie Kontakt- und Dissoziationszeiten von 240 s bzw. 360 s verwendet. Nach jeder Messung wurde der Sensorchip durch Injektion von 0,1 M l-Lysin bzw. 0,5 M l-Lysin für Au-Sonden in Laufpuffer mit einer Flussrate von 10 µL min<sup>-1</sup> und einer Kontaktzeit von 90 s regeneriert, gefolgt von der Injektion von Laufpuffer mit einer Flussrate von 10 µL min<sup>-1</sup> und einer Kontaktzeit von 30 s, um sicherzustellen, dass alle Proben ausgewaschen wurden und um eine stabile Basislinie für die folgenden Messungen zu erhalten. Für jede Probe wurden die Messungen dreimal wiederholt, außer zweimal für das zweiwertige TW-F-Makromolekül. Um die Reproduzierbarkeit zu testen, wurde der Test auf einem zweiten Chip durchgeführt, der wie oben beschrieben vorbereitet wurde, was zu einem Immobilisierungsgrad von 8,0 RU für Messzelle 1 und 1855,8 RU für Messzelle 2 führte. Aufgrund der unterschiedlichen Immobilisierungsgrade wurden unterschiedliche absolute Werte ermittelt, die jedoch im gleichen Bereich liegen und für die verschiedenen Liganden den gleichen Trend zeigen, wie er für den ersten Chip beobachtet wurde.

### Analyse der Kinetik multivalenter Bindungen anhand von SPR-Daten

Analyse der Kinetik multivalenter Bindungen anhand von SPR-Daten nach dem Modell von Kitov & Bundle<sup>270</sup> lässt sich das Reaktionsschema für die multivalente Bindung wie folgt beschreiben:



Der Anteil eines einzelnen i-ten gebundenen Niveaus,  $w_i$ , wird aus der Gibbs'schen Energie,  $G_i^0$ , als partieller Durchschnitt über alle gebundenen Zustände berechnet

(Gleichung 5)

$$w_i = \frac{e^{-G_i^0/RT}}{\sum_1^{i_{max}} e^{-G_i^0/RT}} = \frac{K_i}{\sum_1^{i_{max}} K_i}$$

In dieser Beschreibung impliziert die mathematische Symmetrie von R und L keinen Unterschied in der Zuordnung von multivalentem Liganden und multivalentem Rezeptor. In unseren Fällen wird einer der Reaktanten (mit L bezeichnet) für die SPR-Experimente auf einer Oberfläche immobilisiert. Diese Bedingungen erlauben eine feste Konzentration des freien Analyten (R). Jede der Reaktionen in Gleichung 2 kann dann durch eine Pseudo-Reaktion erster Ordnung nach der Langmuir-Bindungskinetik angenähert werden. Außerdem treten die Unterschiede zwischen den Reaktionen erst nach der Bildung der ersten intermolekularen Bindung auf. Wichtig ist, dass aus Gleichung 3 hervorgeht, dass der Anteil des i-ten gebundenen Niveaus nicht von der Konzentration von R abhängt. Zusammengenommen ähneln die Reaktionsschemata in Gleichung 2 denen einer einzelnen Klasse von Analyten, die an eine heterogene Zusammensetzung von Bindungsstellen an der Oberfläche binden.

Dieses Problem wurde von Svitel et al.<sup>271</sup> mit Lösungen angegangen, die die minimale Verteilung in der Bindungskinetik mehrerer, nicht konkurrierender Pseudo-Reaktionen erster Ordnung darstellen, die erforderlich sind, um die beobachtete Bindungskinetik zu erklären. Die Mehrfachreaktionen werden als Fraktionen P gewichtet mit

**(Gleichung 6)** 
$$S_{max} = \int_{K_D, min}^{K_D, max} \int_{k_{off, min}^{k_{off, max}} P dk_{off} dK_D$$

über ein voreingestelltes 2D-Gitter von Gleichgewichts-(Dissoziations-)Konstanten,  $K_{D, min}$ - $K_{D, max}$ , und Dissoziationsraten,  $k_{off, min}$ - $k_{off, max}$ , sondiert.  $S_{max}$  ist die Gesamtbindungskapazität in SPR-Resonanzeinheiten. Zur Bestimmung von P beschreiben Svitel et al. die Lösung von Gleichung 5

**(Gleichung 7)** 
$$s_{tot}(c_{tot}, t) = \int_{K_D, min}^{K_D, max} \int_{k_{off, min}^{k_{off, max}} s(k_{off}, K_D, c_{tot}, P, t) P(k_{off}, K_D) dk_{off} dK_D$$

wobei t der Zeitpunkt im aufgezeichneten Sensorgramm,  $c_{tot}$  die Gesamtkonzentration des Analyten R und  $s_{tot}$  das aufgezeichnete SPR-Signal in Abhängigkeit von diesen Variablen ist. Im Modell von Svitel et al. spiegelt P die auf der Oberfläche vorhandenen Bindungsstellen wider, bevor sie dem Liganden ausgesetzt werden. Daher ist P unabhängig von der Konzentration des Analyten R. Wie in Gleichung 3 gezeigt, ist die Verteilung der Pseudo-Reaktionen

erster Ordnung, die multivalente Wechselwirkungen definieren, ebenfalls konzentrationsunabhängig. Daher scheint die Modellierung von P gemäß Gleichung 5 eine angemessene Beschreibung dieser Verteilung zu sein.

Für die vorliegenden Analysen haben wir jede Versuchsbedingung dreimal durchgeführt und jeweils mit EVILFIT3 analysiert. Survivin wurde auf die Goldoberfläche aufgetragen und CLR, TW-Short, TW-Medium, TW-Long und TW-Medium-F wurden in Konzentrationen von 0,2 bis 400  $\mu\text{M}$  injiziert, während Au-TW und Au-TW-Medium in Konzentrationen von 0,2 nM bis 0,5  $\mu\text{M}$  injiziert wurden. Die Parameter für EVILFIT wurden für alle Analysen im Bereich zwischen  $10^{-2}$  M und  $10^{-7}$  M für den  $K_D$ -Wert und zwischen  $100 \text{ s}^{-1}$  und  $105 \text{ s}^{-1}$  für den koff-Wert konstant gehalten. Für jede Achse wurden 15 Rasterpunkte und 7 Bins mit gleichem Abstand verwendet, um die Veränderung der  $K_D$ -Verteilung zwischen den Proben zu bewerten. Das Signal in jedem dieser Bins wurde auf das Gesamtsignal normiert. Das normalisierte Signal wurde als Funktion der  $K_D$  mit SD aus den drei einzelnen Experimenten mit jedem Analyten aufgetragen.

### **Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)**

Isotherme Titrationskalorimetrie Messungen wurden mit dem Malvern MicroCal 200 VP-ITC-Kalorimeter durchgeführt. wurde mit einem MicroCal iTC200 von Malvern Panalytical in PBS, pH 7,4 bei 25 °C durchgeführt. Das Protein wurde über Nacht bei 4 °C gegen den PBS-Puffer dialysiert. Die Liganden wurden in dem jeweiligen Dialysepuffer aufgelöst. Dann wurden 400  $\mu\text{M}$  TM mit 200  $\mu\text{M}$  Survivin120 titriert. Bei umgekehrten Titrationsen wurden entweder 40  $\mu\text{M}$  Survivin120 in der Zelle mit 2 - 3 mM TM je nach Verbindung in der Spritze titriert. Alle Titrationsen wurden in PBS, pH 7,4, bei 25 °C durchgeführt. Dann wurden 1  $\mu\text{l}$  Injektionen mit einem Abstand von 120 s zwischen den Injektionen verwendet. Die Injektionsrate wurde auf 0,5  $\mu\text{L/s}$  und die Referenzleistung auf 5  $\mu\text{cal/s}$  eingestellt. Die ITC-Thermogramme und thermodynamischen Daten wurden mit der Affinimeter-Software ausgewertet (Cloud-Version) ausgewertet bzw. mit der Software Origin (v7.0552), die mit dem Gerät geliefert wurde, an ein Modell mit einem Satz von Stellen angepasst. Die Verdünnungswärme wurde als Konstante von jedem Datenpunkt subtrahiert.

### **Plasmid**

Plasmide wurden erhalten durch bakterielle Expressionsvektoren, die für Survivin120-Varianten, CRM1 und RanQ69L kodieren, sowie der eukaryotische Expressionsvektor pc3-Survivin142-HA wurden bereits beschrieben.<sup>74</sup>

### **Zellkultur und Transfektion**

HEK 293T Zellen wurden in 10 cm Platten (Sarstedt) in 10 ml Dulbecco's modified eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) (Life Technologies GmbH) und Antibiotika-Antimykotika (Life Technologies GmbH) ausgesät. Die Zellen wurden dann 24 Stunden lang im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Kalziumphosphat mit 13,75 µg pC3-Survivi-NHA-Plasmid transfiziert und weitere 24 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer und Sonikation lysiert. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurde der proteinhaltige Überstand bis zur Verwendung in Pull-down-Assays bei -20 °C gelagert.

### **Reinigung der rekombinanten Proteine**

Die Proteine wurden als GST-Fusionen in *Escherichia coli* solubl21 exprimiert. Die Bakterien wurden in LB-Medien mit 50 µg/mL Kanamycin kultiviert. Für RanQ69L und CRM1 wurde die Expression mit 1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 induziert. Die Bakterien wurden pelletiert, mit Lysozym lysiert und anschließend in TRIS/NaCl (pH 7,4), ergänzt mit 1 mM PMSF, sonifiziert. Die GST-markierten Proteine wurden dann auf GSTrap 4B-Säulen von Cytiva immobilisiert. Je nach den durchgeführten Experimenten wurde der GST-Tag optional über Nacht mit der Protease PreScission gespalten. Die Proteine wurden dann auf eine HiTrap Q HP-Säule von Cytiva geladen und mit einem 0,025-1 M NaCl-Gradienten in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, mit 1 mM DTT eluiert.

Die Expression von Survivin120 wurde mit 0,2 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0-1,2 induziert. Die Bakterien wurden pelletiert, mit Lysozym lysiert und anschließend in PBS (pH 7,4), ergänzt mit 1 mM PMSF, sonifiziert. Das GST-markierte Survivin120 wurde dann über eine GSTrap 4B-Affinitätssäule gereinigt. Der GST-Tag wurde mit PreScission-Protease über Nacht bei 4 °C gespalten. Die anschließende präparative Größenausschlusschromatographie wurde mit einer HiLoad 26/600 Superdex 75 pg-Säule von Cytiva und einer nachgeschalteten GSTrap-Säule in 50 mM KP<sub>i</sub> pH 6,5 mit 150 mM KCl und 2 mM DTT durchgeführt.

### HeLa-Zellen und Aufnahme von Molekülen und Nanopartikeln

Alle Experimente zur zellulären Aufnahme von Nanopartikeln wurden in einer  $2 \times 4$  Well-Platte mit einer ibiTreat-modifizierten Oberfläche durchgeführt. Die Vertiefungen wurden mit 20.000 Zellen pro Vertiefung besiedelt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  in einer 5 %-igen  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre mit DMEM bebrütet. Nach dieser ersten Inkubation wurden die Zellen 24 Stunden lang mit  $200\ \mu\text{l}$  der Probenlösung/Dispersion behandelt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und mit 4 Vol% Formaldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden dann gefärbt und mit dem CLSM abgebildet.

### Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Zum Erhalt der CLSM-Bilder wurde Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP8 AOBS von Leica mit einem HCX PL Apo 63x/1,4 Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. Die Zellen wurden in mehreren Ebenen entlang der z-Achse gescannt, um die Aufnahme der Probe innerhalb des Lysosoms zu untersuchen.

### Fluoreszenz-Anisotropie

Für das Fluoreszenz-Anisotropie Experiment wurden Fluoreszenzmarkierte (Tweezer) Moleküle ( $200\ \text{nM}$ ) mit Survivin120 titriert, bis eine Endkonzentration von  $150\ \mu\text{M}$  erreicht war. Die Daten wurden auf die gemessene Anisotropie  $A_0$  in Abwesenheit des Proteins normiert. Die Fluoreszenz-anisotropie-Daten wurden anhand eines Single-Site-Bindungsmodells mit der folgenden Gleichung angepasst:

(Gleichung 6)

$$y = A \cdot \frac{(L + x + K_D) - \sqrt{(L + x + K_D)^2 - 4 \cdot x \cdot L}}{2 \cdot L}$$

wobei  $A$  die Anisotropie bei Sättigung,  $L$  die Konzentration des fluoreszierenden Stoffes (Tweezers),  $x$  die Konzentration des Proteins und  $K_D$  die Dissoziationskonstante ist.

### Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) wurde von MikroLap Kolbe in Oberhausen durchgeführt. Die Elemente Au, S und P wurden mit einem ICP-OES von Spectro Model Spectro Arcos nach Auflösung der Nanopartikel in einer Mikrowelle in

Königswasser gemessen. Die Massenanteile der Elemente wurden mit ihrer molaren Masse in molare Konzentrationen umgerechnet. Anschließend wurden die molaren Konzentrationen auf die Goldkonzentration der Probe normiert, um die Anzahl der Liganden auf den Nanopartikeln zu ermitteln (Einzelheiten siehe KLEIN 2021)<sup>303</sup>.

### **Scheibenzentrifugalsedimentation**

Die Scheibenzentrifugalsedimentation wurde mit einem DC24000-Gerät von CPS durchgeführt. Zunächst wurde ein Gradient aus Saccharoselösung (24 Gew.-% bis 8 Gew.-%) bei 24000 U/min in die rotierende Scheibe eingespritzt und mit 0,5 mL n-Dodekan verschlossen. Dann wurde ein Kalibrierungsstandard aus PVC-Perlen mit 483 nm injiziert, um die Sedimentationszeit auf den hydrodynamischen Radius zu kalibrieren. Schließlich wurde die Nanopartikelsuspension eingespritzt und ihre Kalibrierungszeit gemessen, um den hydrodynamischen Durchmesser anhand der Stokes-Einstein-Gleichung zu berechnen.

### **UV-Spektroskopie zur Quantifizierung**

UV-Vis-Spektroskopien zur Bestimmung des Grads der Funktionalisierung mit Azidgruppen oder der durchschnittlichen Anzahl der an die Oberfläche der usAuNPs gebundenen Makromoleküle wurden mit einem Cary Bio300-Gerät von Varian durchgeführt. Die Küvette wurde für eine erste Hintergrundmessung mit Wasser gefüllt, und anschließend wurden 600 µl der Probedispersion in einem Bereich von 200 nm bis 800 nm mit einer bekannten Partikelkonzentration gemessen. Das Integral des Fluorophorsignals wurde bestimmt, und die Konzentration wurde anhand einer zuvor aufgenommenen Kalibrierung mit dem reinen Farbstoff berechnet.

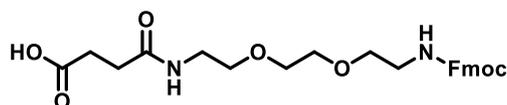
### **Atomabsorptionsspektroskopie**

Atomabsorptionsspektroskopie wurde mit einem Spektrometer der Electron M-Serie von Thermo Fischer durchgeführt. 10 µl der Probensuspension wurden in 990 µl Königswasser gelöst und mit 4 mL Wasser verdünnt, um einen Endverdünnungsfaktor von 500 zu erhalten. Die Konzentration wurde nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet und in die Goldkonzentration in der Probe umgerechnet.

## 5.2 Synthese und Charakterisierung

### 5.2.1 Building Block Synthese

#### 1-(9H-Fluoren-9-yl)-3,14-dioxo-2,7,10-trioxa-4,13-diazaheptadecan-17-yl Säure, EDS



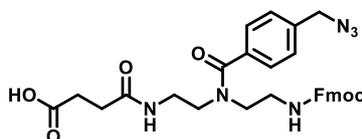
EDS wurde nach einer bereits etablierten vierstufigen Synthese hergestellt. Das Endprodukt wurde als gelblich, weißer Feststoff mit einer Endausbeute von 58 % und in einer Reinheit von 99 % erhalten.<sup>161</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.01 (br, 1H, -OH), 7.93-7.86 (m, 3H, -NH, Aryl-H), 7.69 (d, 3J = 7.52 Hz, 2H, Aryl-H), 7.69 (t, 3J = 7.52 Hz, 2H, Aryl-H), 7.36-7.29 (m, 3H, H13, -NH), 4.30 (d, 3J = 6.70 Hz, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.21 (t, 3J = 6.76 Hz 1H, CH-Fmoc), 3.50 (s, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.43-3.35 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.23-3.09 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 2.45-2.38 (m, 2H, Bernsteinsäure), 2.35-2.28 (m, 2H, Bernsteinsäure) ppm.

RP-HPLC (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C): t<sub>R</sub> = 25.9 min.

ESI-MS: berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 471.2; gefunden 471.2; [M+Na]<sup>+</sup> 493.2, gefunden 493.2.

#### 7-(4-(azidomethyl)benzoyl)-1-(9H-fluoren-9-yl)-3,11-dioxo-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-oic Säure BADS



BADS wurde weitestgehend nach einer bereits etablierten Syntheseroute hergestellt.<sup>154</sup> Die Kupplung zwischen Linkermolekül und Grundgerüst wurde mit Zugabe von PyBOP und HoBt durchgeführt. Das Endprodukt wurde als weißer Feststoff mit einer Endausbeute von 73 % (5,57g, 9,5 mmol) und in einer Reinheit von >95 % erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.08 – 7.98 (m, 1H, amide), 7.91 – 7.84 (m, 2H, aryl-H), 7.68 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, aryl-H), 7.50 – 7.45 (m, 1H, amide), 7.43 – 7.22 (m, 4H, aryl-H), 4.51 – 4.41 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-N}_3$ ), 4.35 – 4.26 (m, 1H,  $-\text{CH-Fmoc}$ ), 4.25 – 4.16 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 3.52 – 3.17 (m, 6H,  $-\text{CH}_2\text{-alkyl}$ , overlap with  $\text{H}_2\text{O}$ ), 3.12 – 3.06 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{-alkyl}$ ), 3.05 – 2.96 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{-alkyl}$ ) 2.47 – 2.19 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{-succinyl}$ ) ppm.

RP-HPLC (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C):  $t_{\text{R}} = 22,0$  min.

ESI-MS: berechnet für  $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  585,64; gefunden 585,25;  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  607,22, gefunden 607,2.

## 5.2.2 Festphasensynthese und Aufreinigung der Präzisionsmakromoleküle

Die nachfolgend aufgelisteten Oligomere wurden in einem 0.3 bzw. 0.2 mmol Ansatz nach Standard Kupplungs- und Fmoc-Protokollen an der Festphase durchgeführt. Alle Ansätze wurden am TentaGel® S RAM Harz (Beladung von 0.25 mmol/g) synthetisiert. Vor Beginn jeder Synthese wurde das Harz 20 min mit DCM gequollen und anschließend durch fünffinales Waschen auf das jeweilige Reaktionsmedium eingestellt. Alle Reaktionen wurden unter Schütteln durchgeführt.

### Allgemeines Kupplungsprotokoll

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch Zugabe einer 25 vol% Piperidin in DMF-Lösung. Nach doppelter Abspaltung für jeweils 2x15 min wurde das Harz zwanzigmal mit DMF gewaschen. Bausteine (5 Äq.) wurden zusammen mit PyBOP (5 Äq.) in 8 mL DMF gelöst und die Lösung anschließend für eine Minute mit N<sub>2</sub>-entgast. Kurz bevor die Lösung in das Reaktionsgefäß überführt wurde, wurde DIPEA (10 Äq.) hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 1 h wurde das Harz zehnmal mit DMF gewaschen.

Das für den ersten und alle ab dem sechsten Baustein folgende ‚double coupling‘ wurde wie die oben genannte Kupplung durchgeführt, allerdings wurde die Entschützung nach der ersten Kupplung ausgelassen.

### Kappen des N-Terminus

Nach erfolgreichem Aufbau der makromolekularen Sequenz wurde der reaktive N-Terminus mit einer Acetylgruppe gekappt. Hierfür wurde das Harz komplett mit Essigsäureanhydrid bedeckt und für 20 min zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Harz zehnmal mit DMF gewaschen. Dieser Zyklus wurde zweimal durchgeführt.

### Anbringung des Fluoreszenzfarbstoffs

Für die Bindung des Fluorophors wurde FITC-Isothiocyanat (1,1 Äq.) in 6 mL DMF gelöst, bevor DIPEA (10 Äq.) zugegeben wurde. Die Lösung wurde danach eine Minute lang mit Stickstoff gespült. Anschließend wurde das Gemisch zum Harz gegeben und 18 h lang unter Lichtausschluss geschüttelt. Der Harz wurde mit DMF gewaschen und die Kupplung wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde das Harz 20 mal abwechselnd mit DMF und DCM gewaschen.

### **Finale Abspaltung**

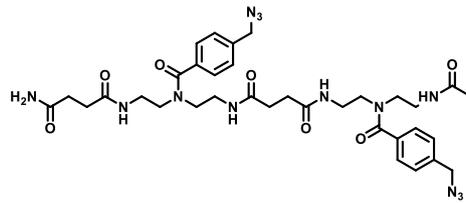
Für die finale Abspaltung des Makromoleküls vom Harz wurden 13 mL eines 95%igen TFA-, 5%igen TIPS-Gemisch ins Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung in eisgekühlten Diethylether (4 x 20 mL) gefällt. Die Suspension wurde zentrifugiert, der Ether abdekantiert und zwei weitere Male wurde der Rückstand mit Ether gewaschen. Nachdem der Rückstand über Nacht getrocknet wurde, wurde er in je 4 mL Wasser gelöst, vereinigt und lyophilisiert.

### **TFA-Entfernung**

Die TFA-Entfernung wurde nach einem literaturbekannten Protokoll, nach der finalen Abspaltung, durchgeführt. Hierfür wurden 1.5 g eines Anionenaustauscher-Harzes für je 0.1 mmol Oligomer verwendet. Vor Zugabe der Probe wurde das Harz dreimal mit einer 1.6 N essigsaurer Lösung und anschließend dreimal mit einer 0.16 N essigsaurer Lösung gewaschen. Das jeweilige Oligomer wurde in 12 mL Wasser gelöst und zum gewaschenen Harz ins Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde wurde die Reaktionslösung abfiltriert und das Harz fünfmal mit 4 mL Wasser gewaschen. Nach anschließender Vereinigung und Lyophilisierung konnten die jeweiligen, von TFA-befreiten Oligomere erhalten werden.

### **Präparative HPLC**

Alle nach der TFA-Entfernung erhaltenen Oligomere wurden durch präparative HPLC von ihren Unreinheiten separiert. Als Eluent wurde ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril verwendet. Die Hauptfraktionen der jeweiligen Läufe wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurden die Proben in 6-7 mL Wasser gelöst und lyophilisiert.

Short-MM

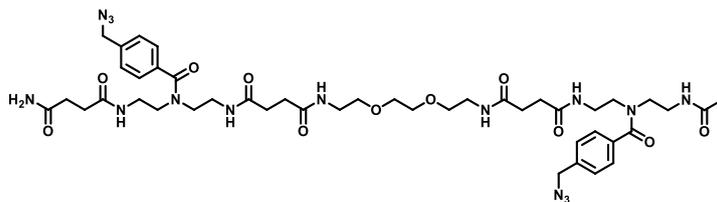
Short-MM wurde in einem 0,3 mmol Ansatz synthetisiert. 159.7 mg (0.21 mmol, 70%) eines farblosen Feststoffes wurden nach präparativer HPLC gewonnen.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.54 – 7.31 (m, 8H, *aryl-H*), 4.52 – 4.41 (m, 4H, *CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>*), 3.74 – 3.63 (m, 8H, *N-CH<sub>2</sub>*), 3.58 – 3.47 (m, 8H, *N-CH<sub>2</sub>*), 3.30 – 3.15 (m, 4H, *N-CH<sub>2</sub>*), 2.61 – 2.50 (m, 3H, *succinyl-CH<sub>2</sub>*), 2.49 – 2.34 (m, 4H, *succinyl-CH<sub>2</sub>*), 2.29 (s, 1H, *succinyl-CH<sub>2</sub>*), 1.99, 1.85 (2m, *backbone-Ac*) ppm.

HR-ESI-MS für C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>N<sub>13</sub>O<sub>7</sub> (ESI-TOF) *m/z*: [M + H<sup>+</sup>]<sup>+</sup> berechnet: 748.3638; gefunden: 748.3633.

RP-HPLC (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C): *t<sub>R</sub>* = 15,5 min.

Medium-MM

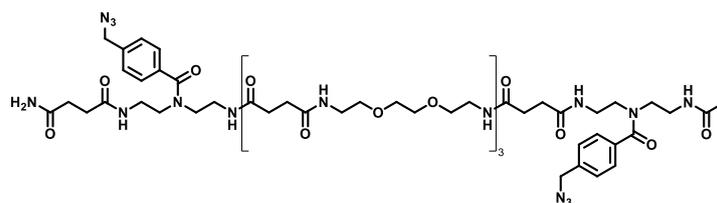


Medium-MM wurde in einem 0,3 mmol Ansatz synthetisiert. 214.5 mg (0.22 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffes wurden nach präparativer HPLC gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.54-7.49 (m, 4H, 4x *aryl-H*), 7.43 – 7.37 (m, 4H, 4x *aryl-H*), 4.49 (s, 4H, 2x  $\text{CH}_2\text{-N}_3$ ), 3.71 – 3.63 (m, 8H, 4x  $\text{O-CH}_2$ ), 3.62- 3.57 (m, 4H, 2x  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ), 3.56 – 3.50 (m, 8H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.39 – 3.32 (m, 4H,  $\text{N-CH}_2$ ), 3.27 – 3.20 (m, 4H,  $\text{N-CH}_2$ ), 2.58 – 2.51 (m, 6H, *succinyl-CH<sub>2</sub>*), 2.47 – 2.37 (m, 6H, *succinyl-CH<sub>2</sub>*), 2.02 – 1.82 (2s, 3H, *backbone-Ac*) ppm.

HR-ESI-MS für  $\text{C}_{44}\text{H}_{63}\text{N}_{15}\text{O}_{11}$  (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M} + 2\text{H}^+]^{2+}$  berechnet: 489.7489; gefunden: 489.7487.

RP-HPLC (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C):  $t_{\text{R}} = 16,6$  min.

Long-MM

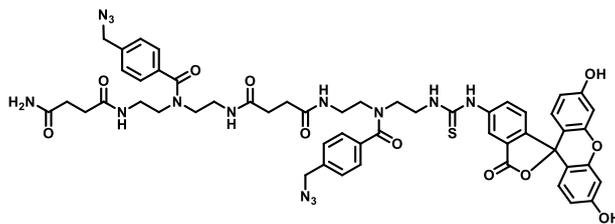
Long-MM wurde in einem 0,3 mmol Ansatz synthetisiert. 295.3 mg (0.20 mmol, 68%) eines farblosen Feststoffes wurden nach präparativer HPLC gewonnen

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.53-7.48 (m, 4H, 4x *aryl-H*), 7.43 – 7.37 (m, 4H, 4x *aryl-H*), 4.49 (s, 4H, 2x *CH*<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.71 – 3.65 (m, 16H, O-*CH*<sub>2</sub>), 3.63- 3.58 (m, 12H, O-*CH*<sub>2</sub>-*CH*<sub>2</sub>-N), 3.56 – 3.51 (m, 8H, N-*CH*<sub>2</sub>), 3.41 – 3.34 (m, 12H, N-*CH*<sub>2</sub>), 3.27 – 3.20 (m, 4H, N-*CH*<sub>2</sub>), 2.58 – 2.50 (m, 14H, succinyl-*CH*<sub>2</sub>), 2.47 – 2.38 (m, 6H, succinyl-*CH*<sub>2</sub>), 2.02 – 1.83 (2s, 3H, backbone-*Ac*) ppm.

HR-ESI-MS für C<sub>64</sub>H<sub>99</sub>N<sub>19</sub>O<sub>19</sub> (ESI-TOF) *m/z*: [M + 2H<sup>+</sup>]<sup>2+</sup> berechnet: 719.8755; gefunden: 719.8754.

RP-HPLC (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C): t<sub>R</sub>= 16,6 min.

Short-F-MM

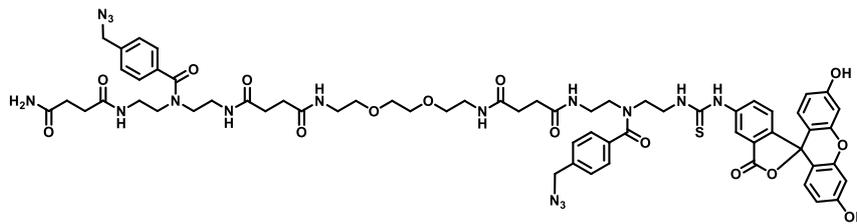


Short-F-MM wurde in einem 0,3 mmol Ansatz synthetisiert. 142.5 mg (0.13 mmol, 43 %) eines gelblichen Feststoffes wurden nach präparativer HPLC gewonnen.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.11 (s, 3H, -OH, -COOH), 8.26 -7.63 (m, 8H, aryl-H), 7.54 – 7.23 (m, 7H, -NH), 7.21 – 7.12 (m, 1H, FITC-H), 6.75 – 6.46 (m, 7H, FITC-H, -NH), 4.53 - 4.41 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-BADS), 3.91 – 3.41 (m, 56H, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>- ((BADS)) H<sub>2</sub>O), 2.44-2.16 (m, 8H, succinyl-CH<sub>2</sub>) ppm.

HR-ESI-MS für C<sub>53</sub>H<sub>56</sub>N<sub>14</sub>O<sub>11</sub>S (ESI-TOF) *m/z*: [M + 2H<sup>+</sup>]<sup>2+</sup> berechnet: 548.1981; gefunden 548.1978.

RP-HPLC (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C): t<sub>R</sub>= 24,5 min.

Medium-F-MM

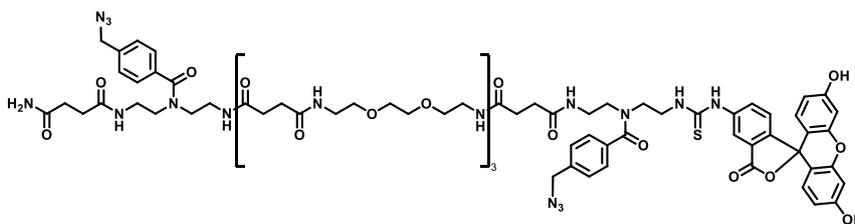
Medium-F-MM wurde in einem 0,2 mmol Ansatz synthetisiert. 201.9 mg (0.15 mmol, 76%) eines gelblichen Feststoffes wurden nach präparativer HPLC gewonnen.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.28 – 9.83 (m, 3H, -OH, -COOH), 8.37 -7.81 (m, 7H, FITC-H,-NH), 7.80 – 7.65 (m, 1H, FITC-H), 7.45 – 7.24 (m, 8H, aryl-H, -NH), 7.17 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, FITC-H), 6.77 – 6.52 (m, 7H, FITC-H, -NH), 4.57 - 4.41 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-BADS), 3.87 – 3.03 (m, 54H, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>- ((BADS)) H<sub>2</sub>O), 2.40-2.16 (m, 12H, succinyl-CH<sub>2</sub>) ppm.

HR-ESI-MS für C<sub>63</sub>H<sub>74</sub>N<sub>16</sub>O<sub>15</sub>S (ESI-TOF) *m/z*: [M + 2H<sup>+</sup>]<sup>2+</sup> berechnet: 663.2615; gefunden: 663.2613.

RP-HPLC (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C): t<sub>R</sub> = 22,6 min.

Long-F-MM

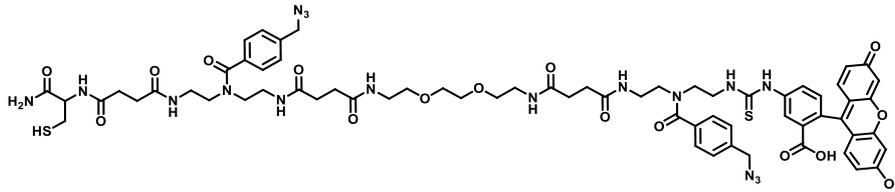


Long-F-MM wurde in einem 0,2 mmol Ansatz synthetisiert. 251.6 mg (0.14 mmol, 47%) eines gelblichen Feststoffes wurden nach präparativer HPLC gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.57 -7.72 (m, 9H, FITC-H,-NH), 7.54 – 7.06 (m, 1H, FITC-H), 7.45 – 7.24 (m, 10H, aryl-H, -NH, FITC-H), 6.83 – 6.47 (m, 8H, FITC-H, -NH), 4.55 - 4.41 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-BADS), 3.90 – 2.93 (m, 76H, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>- ((BADS)) H<sub>2</sub>O), 2.44-2.13 (m, 20H, succinyl-CH<sub>2</sub>) ppm.

HR-ESI-MS für  $\text{C}_{83}\text{H}_{110}\text{N}_{20}\text{O}_{23}\text{S}$  (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M} + 2\text{H}^+]^{2+}$  berechnet: 893.3881; gefunden: 893.3877.

RP-HPLC (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C):  $t_{\text{R}} = 21,7$  min.

Cys-Medium-F-MM

Cys-Medium-F-MM wurde in einem 0,1 mmol Ansatz synthetisiert. Um die Bildung von Disulfiden zu verhindern, wurde die Aufarbeitung schnell durchgeführt, um die Struktur durch Gefriertrocknung in einen stabileren trockenen Zustand zu bringen. Um die Bildung von Disulfiden zu verhindern, wurde keine Aufreinigung mittels Prep-HPLC durchgeführt. So wurden 89,7 mg (62,7  $\mu\text{mol}$ , 63 %) eines gelb-orangen Feststoffs erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.11 (s, 2H, -OH), 10.04 (br s, 1H, -OH), 9.87 (br s, 1H, -COOH), 8.284 -7.97(m, 4H, FITC-H,-NH), 7.94-7.84 (m, 3H, -NH), 7.76 – 7.64 (m, 1H, FITC-H), 7.47 – 7.36 (m, 8H, aryl-H), 7.35 -7.29 (m,-NH), 7.21 – 7.12 (m, 2H, FITC-H, -NH), 6.70 – 6.53 (m, 2H, FITC-H), 6.62-6.52 (m, 4H, FITC-H), 4.52 - 4.44 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-BADS), 4.31 – 4.24 (m, 1H, -CH-CH<sub>2</sub>-SH (Cys)), 3.91 – 3.41 (m, 47H, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>- ((BADS)) H<sub>2</sub>O), 3.40-3.05 (m, 16H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- ((BADS))), 2.84-2.75 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-SH (Cys)), 2.72-2.63 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-SH (Cys)), 2.42-2.20 (m, 12H, succinyl-CH<sub>2</sub>) ppm.

HR-ESI-MS for  $\text{C}_{66}\text{H}_{77}\text{N}_{17}\text{O}_{16}\text{S}_2$  (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M} + 2\text{H}^+]^{2+}$  berechnet: 714.7664; gefunden: 714.7661.

MALDI-TOF-MS  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{66}\text{H}_{77}\text{N}_{17}\text{O}_{16}\text{S}_2$  (molecular weight: 1428.57):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  berechnet: 1428.57 gefunden: 1428.65,  $[\text{Disulfide}+\text{H}]^+$  berechnet: 2855.03 gefunden: 1428.65.

RP-HPLC (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C):  $t_{\text{R}} = 23,4$  min.

### 5.2.3 Synthese der Tweezermakromoleküle

Monobutynyl-Tweezer wurde von *Antonio Bietti* und *Dr. Inesa Hadrović* aus dem Arbeitskreis Schrader der Universität Duisburg-Essen zur Verfügung gestellt.

#### Protokoll zur Kupfer-Klick-Reaktion für Tweezermakromoleküle ohne Fluorophor

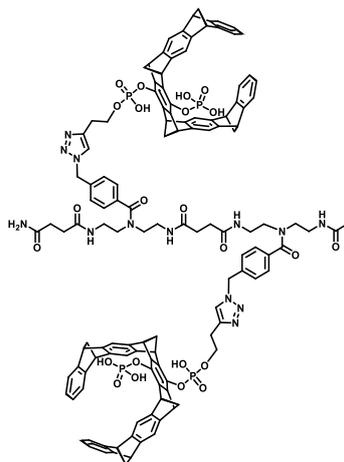
Das jeweilige Makromolekül (1 Äq.) wurde in 3 mL einer 1:1-Mischung aus THF/H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurden 1.1 Äq. pro Azidgruppe des Monobutynyl-Tweezers zur Reaktionslösung gegeben. Nachdem die Lösung entgast wurde, wurden 5 Äq. DIPEA zugegeben. Anschließend wurde die katalytische Lösung von CuSO<sub>4</sub> (3 Äq.) und Natriumascorbat (4 Äq.) in 1 mL H<sub>2</sub>O sofort in das Reaktionsgemisch gegeben. Die Reaktion wurde 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Verbrauch des Katalysators (die Lösung färbt sich aufgrund der Cu(II)-Spezies blau) wurde erneut DIPEA und die katalytische Lösung zugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde erneut 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Auftreten der Cu(II)-induzierten Blaufärbung wurde mit 2,5% HCL gequenchet. Die Suspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf dem Rotationsverdampfer konzentriert und mit 2,5 % HLC verdünnt. Die Suspension wurde zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, die Rückstände wurden vereinigt und anschließend mit 2,5%iger HCl und Wasser gewaschen. Das Produkt wurde nach abschließender Zentrifugation und Lyophilisierung als Feststoff isoliert. Für die Deprotonierung wurde der Feststoff in einer 1:1:1-Mischung aus THF/MeOH/aq gelöst. Anschließend wurden 6Äq. NaOH zugegeben und die Reaktionslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die organischen Lösungsmittel wurden entfernt, und die verbleibende wässrige Lösung wurde lyophilisiert. Das Produkt wurde als Natriumsalz gewonnen.

#### Protokoll zur Kupfer-Klick-Reaktion für Tweezermakromoleküle ohne Fluorophor

Das jeweilige Makromolekül (1 Äq.) wurde in 3 mL einer 1,5:1-Mischung aus THF/H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurden 1.1 Äq. des Monobutynyltweezers zur Reaktionslösung gegeben. Nachdem die Lösung für 10 min mit Argon entgast wurde, wurden 5 Äq. DIPEA zugegeben. Anschließend wurde die katalytische Lösung von CuSO<sub>4</sub> (3 Äq.) und Natriumascorbat (4 Äq.) in 1 mL H<sub>2</sub>O sofort in das Reaktionsgemisch gegeben. Die Reaktion wurde 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Verbrauch des Katalysators (die Lösung färbt sich aufgrund der Cu(II)-Spezies blau) wurden erneut 1.1 Äq. des Monobutynyltweezers sowie DIPEA und die katalytische Lösung zugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde erneut 8 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Auftreten der Cu(II)-induzierten

Blaufärbung wurde ein drittes mal eine kleine Menge des Katalysatormischs zugegeben und erneut für 18h gerührt. Anschließend wurde mit 2,5% HCL gequenchet. Die Suspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf dem Rotationsverdampfer konzentriert und mit 2,5 % HCL verdünnt. Die Suspension wurde zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, die Rückstände wurden vereinigt und anschließend mit 2,5%iger HCl und Wasser gewaschen. Das Produkt wurde nach abschließender Zentrifugation und Lyophilisierung als Feststoff isoliert und in dieser Form charakterisiert. Für die Deprotonierung wurde der Feststoff in einer 1:1:1-Mischung aus THF/MeOH/aq gelöst. Anschließend wurden 6Äq. NaOH zugegeben und die Reaktionslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die organischen Lösungsmittel wurden entfernt, und die verbleibende wässrige Lösung wurde lyophilisiert. Das Produkt wurde als Natriumsalz gewonnen.

Short-TM

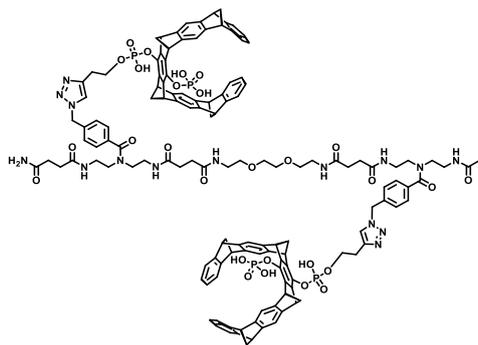


8.1 mg (3.51  $\mu\text{mol}$ , 52%) Short-TM wurden als farbloser Feststoff gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 8.13 – 8.06 (m, 2H, triazol), 8.05 – 7.98 (m, 2H, -NH), 7.93 – 7.85 (m, 2H, -NH), 7.38 – 7.28 (m, 8H, aryl-H (BADS)), 7.12 – 7.01 (m, 18H, aryl-H ((tweezer))), 6.79 – 6.71 (m, 10H, aryl-H ((tweezer)) -NH), 5.65 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>- (BADS)), 4.34 – 4.27 (m, 8H, (tweezer)), 4.11 – 4.04 (m, 12H, (tweezer)), 3.49 – 3.42 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>- (BADS)), 3.31 – 3.27 (m, 3H, N-CH<sub>2</sub>- (BADS)), 3.24 – 3.19 (m, 3H, N-CH<sub>2</sub>- (BADS)), 3.10 – 3.04 (m, 3H, N-CH<sub>2</sub>- (BADS)), 2.95 – 2.88 (m, 3H, N-CH<sub>2</sub>- (BADS)), 2.34 – 2.15 (m, 28H, succinyl-CH<sub>2</sub>, Tweezer-H), 1.79, 1.71 (2s, 3H, backbone-Ac) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$  (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = - 5.42, - 5,76 ppm.

MALDI-TOF-MS  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{126}\text{H}_{117}\text{N}_{13}\text{O}_{23}\text{P}_4$  (molecular weight: 2305.29):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  berechnet: 2306.29 gefunden: 2305.90.

Medium-TM

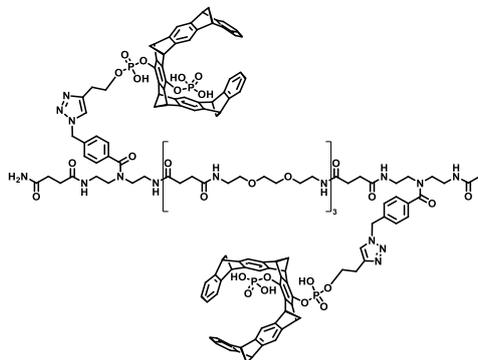
5.76 mg (2.54  $\mu\text{mol}$ , 50%) Medium-TM wurden als farbloser Feststoff gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 8.11 - 8.06$  (m, 2H, triazole),  $8.04 - 7.96$  (m, 1H, -NH),  $7.93 - 7.84$  (m, 1H, -NH),  $7.44 - 7.28$  (m, 9H, aryl-H (BADS), -NH),  $7.16 - 6.99$  (m, 19H, aryl-H (tweezer), -NH),  $6.82 - 6.70$  (m, 10H, aryl-H, -NH),  $5.65$  (s, 4H, -CH<sub>2</sub>- (BADS)),  $4.35 - 4.27$  (m, 8H, (tweezer)),  $4.11 - 4.05$  (m, 12H, (tweezer)),  $3.41 - 3.34$  (m, 5H, -CH<sub>2</sub>- backbone (BADS)),  $3.32 - 3.14$  (m, 14H, -CH<sub>2</sub>- backbone (BADS)),  $3.11 - 3.04$  (m, 4H, -CH<sub>2</sub>- backbone (BADS)),  $2.96 - 2.87$  (m, 4H, -CH<sub>2</sub>- backbone (BADS)),  $2.34 - 2.16$  (m, 32H, succinyl-CH<sub>2</sub>, (tweezer)),  $1.80, 1.71$  (2s, 3H, backbone-Ac) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$  (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = - 5.42, - 5.78$  ppm.

MALDI-TOF-MS  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{136}\text{H}_{135}\text{N}_{15}\text{O}_{27}\text{P}_4$  (molecular weight: 2535.55):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  berechnet: 2558.58 gefunden: 2558.01.

Long-TM

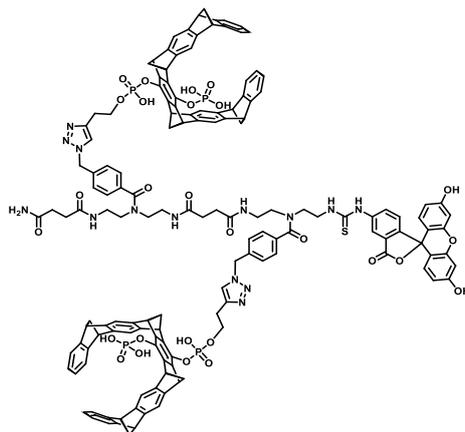


6.71 mg (2.24  $\mu\text{mol}$ , 64%) Long-TM wurden als farbloser Feststoff gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 8.16\text{-}7.99$  (m, 2H, triazole), 7.97-7.83 (m, 1H, -NH), 7.43-7.28 (m, 8H, aryl-H (BADS)), 7.15 – 6.97 (m, 20H, aryl-H (tweezer), -NH), 6.82 – 6.69 (m, 10H, aryl-H (tweezer),-NH ), 5.65 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>- (BADS)), 4.38 – 4.23 (m, 9H, (tweezer)), 4.15 – 4.01 (m, 13H (tweezer)), 3.57-3.44 (m, 194H, overlap  $\text{H}_2\text{O}^+$  -CH<sub>2</sub>- backbone (BADS)), 3.41-3.35 (m, 13H, -CH<sub>2</sub>- backbone (BADS)), 3.31 – 3.14 (m, 21H, -CH<sub>2</sub>- backbone (BADS)), 3.11 - 3.01 (m, 4H), 2.94-2.85 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>- backbone (BADS))), 2.36 – 2.14 (m, 40H, succinyl-CH<sub>2</sub>, tweezer-H), 1.80, 1.70 (2s, 3H, backbone-Ac) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$  (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = - 4.33, - 4.72$  ppm.

MALDI-TOF-MS  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{156}\text{H}_{171}\text{N}_{19}\text{O}_{35}\text{P}_4$  (molecular weight: 2996.08):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  berechnet: 3019.07 gefunden: 3019.05.

Short-TM-F

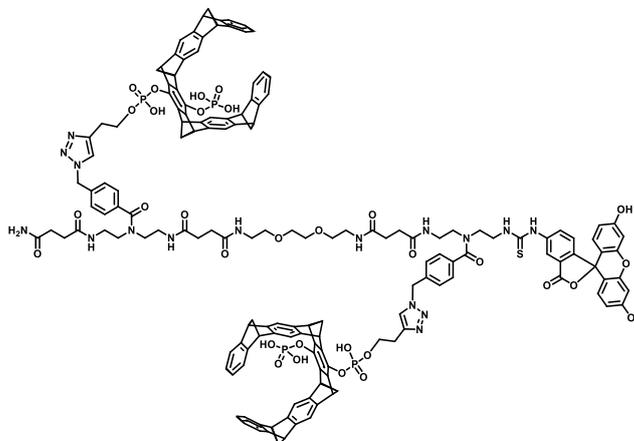
3.80 mg (1.48  $\mu\text{mol}$ , 31%) Short-TM-F wurden als gelber Feststoff gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 8.23 - 7.63$  (m, 10 H, FITC-H, triazole, -NH),  $7.51 - 6.92$  (m, 25H, Aryl-H (BADs), -NH, Aryl-H (tweezer), FITC-H),  $6.82 - 6.47$  (m, 14H, Aryl-H (tweezer), FITC-H),  $5.76-5.50$  (m, 4H,  $-\text{CH}_2-$  (BADs)),  $4.38 - 4.19$  (m, 8H, (tweezer)),  $4.17 - 3.92$  (m, 12H, (tweezer)),  $3.69 - 2.85$  (m, 287H, overlap  $\text{H}_2\text{O}^+$   $-\text{CH}_2-$  backbone (BADs)),  $2.38 - 2.06$  (m, 28H, succinyl- $\text{CH}_2$ , tweezer-H) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$  (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = - 5.41, - 5.32$  (overlap due to low concentration) ppm.

MALDI-TOF-MS  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{146}\text{H}_{126}\text{N}_{14}\text{O}_{27}\text{P}_4\text{S}$  (molecular weight: 2652.63):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   
 berechnet: 2653.54 gefunden: 2653.87

Medium-TM-F

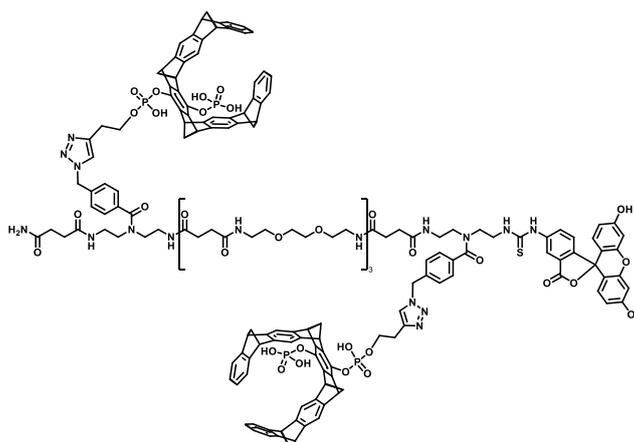


4,92 mg (1,85  $\mu\text{mol}$ , 48%) Medium-TM-F wurden als gelber Feststoff gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 8.22 - 8.83$  (m, 6H, FITC-H, triazole, -NH), 7.79-7.68 (m, 1H, FITC-H) 7.47 – 7.27 (m, 9H, aryl-H (BADS), -NH), 7.23 – 6.96 (m, 19H, aryl-H (tweezer), FITC-H, -NH), 6.81 – 6.52 (m, 16H, aryl-H+ FITC-H, -NH), 5.71-5.53 (m, 4H, - $\text{CH}_2$ - (BADS)), 4.39 – 4.21 (m, 10H, (tweezer)), 4.17 – 3.97 (m, 15H, (tweezer)), 3.86 – 2.89 (m, 287H, overlap  $\text{H}_2\text{O}^+$  - $\text{CH}_2$ - backbone (BADS)), 2.34 – 3.15 (m, 33H, succinyl- $\text{CH}_2$ , tweezer-H) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$  (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = - 5.41, - 5.32$  (overlap due to low concentration) ppm.

MALDI-TOF-MS  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{155}\text{H}_{144}\text{N}_{16}\text{O}_{31}\text{P}_4\text{S}$  (molecular weight: 2652.63):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  berechnet: 2883.90 gefunden: 2883.82.

Long-TM-F

3.12 mg (1.78  $\mu\text{mol}$ , 32%) Long-TM-F wurden als gelber Feststoff gewonnen.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.22 – 7.79 (m, 11 H, FITC-H, triazole, -NH), 7.54 – 7.28 (m, 11H, aryl-H (BADS), -NH), 7.22 – 6.97 (m, 18H, aryl-H (tweezer), FITC-H, -NH), 6.85 – 6.50 (m, 15H, aryl-H, FITC-H, -NH), 5.76-5.50 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>- (BADS)), 4.39 – 4.25 (m, 8H, (tweezer)), 4.17 – 3.97 (m, 12H, (tweezer)), 3.45 – 2.22 (m, 351H, overlap H<sub>2</sub>O + -CH<sub>2</sub>- backbone (BADS)), 2.35 – 2.15 (m, 44H, succinyl-CH<sub>2</sub>, + tweezer-H) ppm.

$^{31}\text{P}$ -NMR (243 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = - 5.44, - 5.32 (overlap due to low concentration) ppm.

MALDI-TOF-MS  $m/z$  berechnet für C<sub>175</sub>H<sub>180</sub>N<sub>20</sub>O<sub>39</sub>P<sub>4</sub>S (molecular weight: 3343.42): [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 3344.15 gefunden: 3344.67.

#### 5.2.4 Synthese der funktionalisierten usAuNPs

Die Synthese wurde vom Kooperationspartner *Dr. Kai Klein* aus der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Die funktionalisierten us-AuNPs wurden durch eine modifizierte einphasige Brust-Synthese hergestellt.<sup>290, 299</sup> Au-TW wurde entsprechend der Literatur synthetisiert.<sup>303</sup> Zunächst wurden AuGSH-Partikel durch Zugabe von 5 mL einer 100 mM eiskalten wässrigen Natriumborhydridlösung (200  $\mu\text{mol}$ ) zu einer zuvor entgasten Lösung von 350 mL 0,72 mM Tetrachlorsäure (254  $\mu\text{mol}$ ) und Glutathion (10 mL, 0,1 mM, 1 mmol) hergestellt, gefolgt von kontinuierlichem Rühren für 30 Minuten. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 0,2 M wässriger NaOH extrahiert und 40 Minuten lang bei 2500 g durch eine Ultrafiltrations-Spinsäule (3 kDa Molekulargewichtsgrenze; Amicon; Merck) geleitet, um alle nicht umgesetzten Verbindungen zu entfernen. Die verbleibenden AuGSH-Partikel wurden zurückgewonnen, und ihre sekundäre Aminogruppe wurde in ein Azid umgewandelt. Dazu wurden 15 mg der Partikel (gemessen nur an der Masse des Au) in 17 mL Wasser verdünnt und zu 54 mL MeOH gegeben. Imidazolsulfonylazid-Dihydrogensulfat (578  $\mu\text{mol}$ , 157 mg) wurde in 5 mL Wasser gelöst und zu der Suspension gegeben. Unmittelbar danach wurde eine Lösung von 80 mg  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 5 mL Wasser zugegeben. Unmittelbar danach wurde eine Lösung von 80 mg  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 5 mL Wasser zugegeben. Die Diazotransferreaktion wurde durch Zugabe von 1 mL einer wässrigen 5 mM  $\text{CuSO}_4$ -Lösung zu der Suspension gestartet. Nach 72 Stunden wurden die Nanopartikel 40 Minuten lang bei 2500 g durch eine Ultrafiltrationsschleudersäule (3 kDa Molekulargewichtsgrenze; Amicon; Merck) geleitet, um alle nicht umgesetzten Verbindungen zu entfernen. Alkin-funktionalisierte Pinzettenmoleküle wurden durch kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) an die Azid-terminierten Goldnanopartikel konjugiert, analog zur Kopplung von Alkin-funktionalisierten Farbstoffen. Die Makromoleküle, bestehend aus zwei BADS mit Cystein und freien Aziden, wurden in 10 mL Methanol gelöst. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 0,1 M Natriumhydroxidlösung unter ständigem Rühren auf 7 eingestellt. Diese Lösung wurde zu der zuvor entgasten Lösung von 50 mL 0,5 mM Tetrachlorsäure (25  $\mu\text{mol}$ ) gegeben. Nachdem die gelbe Farbe der Tetrachlorweissäure verschwunden war, wurde 1 mL einer 100 mM eiskalten wässrigen Natriumborhydridlösung (100  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben, wodurch sich die Lösung rasch braun färbte mit einem kleinen Hauch von Grün, der durch das Fluorophor verursacht wurde, und die Dispersion wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Nanopartikeldispersion wurde 20 Minuten lang bei 2500 g durch eine Ultrafiltrations-Spinsäule (10 kDa Molekulargewichtsgrenze; Amicon; Merck) geleitet, um alle nicht umgesetzten Verbindungen

zu entfernen. Die Nanopartikel blieben auf dem Filter zurück. Nach der Zentrifugation wurde der Filter fünfmal mit Kaliumphosphatpuffer (pH 8) gespült. Durch Rückwärtszentrifugation wurden die konzentrierten Gold-Nanopartikel ( $\sim 70 \mu\text{L}$ ) vom Filter zurückgewonnen. Alkin-funktionalisierte Pinzettenmoleküle wurden durch kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) analog zur Kopplung von Alkin-funktionalisierten Farbstoffen mit den Azid-terminierten Goldnanopartikeln konjugiert.<sup>304</sup>

## 6 VERZEICHNIS

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Definition</i>
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AuGSH	Ultrakleine Goldnanopartikel mit Glutathion
Au-TW	Ultrakleine Goldnanopartikel mit Tweezer-Motiven funktionalisiert
Au-TM-F	Ultrakleine Goldnanopartikel mit Tweezermakromolekülen funktionalisiert
Au-N <sub>3</sub>	Ultrakleine Goldnanopartikel mit azidiertem Glutathion
Au	Gold
Äq.	Äquivalent
BADS	p-(azidomethyl)benzoyl diethylenetriamin succinic acid
BOC	<i>Tert</i> -Butyloxycarbonyl Schutzgruppe
C	Cystein
CDCl <sub>3</sub>	deuteriertes Chloroform
CLR01	Monovalenter Tweezer
CLSM	Konfokale Laserrastermikroskopie (confocal laserscanning microscopy)
Cu	Kupfer
CuAAC	Kupfer (I) katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
CRC	Collaboration Research Center
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
CPC	Chromosomaler Passenger Complex
Cys	L-Cystein
D <sub>2</sub> O	deuteriertes Wasser
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan
DCC	N,N-Dicyclohexylcabodiimid

---

DCM	Dichlormethan
DCS	Analytische Scheibenzentrifuge (engl.: differential centrifugal sedimentation)
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMPA	2,2 Dimethoxy-2-phenylacetophenon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d <sub>6</sub>	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOSY	Diffusionsaufgelöste NMR-Spektroskopie (diffusion ordered spectroscopy)
DSC	Analytische Scheibenzentrifuge (engl.: differential centrifugal sedimentation)
DVB	Divinylbenzol
EDS	Platzhaltender Baustein, abgeleitet von Ethylendioxybisethylamin mit Bernsteinsäureanhydridrest (succinyl rest)
ESI-MS	Elektrosprayionisations Massenspektrometrie (electrospray ionization mass spectroscopy)
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor alpha
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
et al.	und anderen (et alii)
Fmoc-(Cl)	9-Fluorenylmethoxycarbonyl(-chlorid)
GSH	Glutathion
GCP	Guanidiniocarbonylpyrrol
HBr	Bromwasserstoff
HeLa-Zellen	Zelllinie von Gebärmutterhalskrebs, benannt nach Henrietta Lachs (verstorben 1949)
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)

HR-ESI-MS	Hochaufgelöste Elektrosprayionisations Massenspektrometrie (high resolution electrospray ionization mass spectroscopy)
HRTEM	Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (engl.: high-resolution transmission electron microscopy)
H <sub>2</sub> O	Wasser
ICP-OES	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
ISA	Imidazolsulfonylazid Dihydrogensulfat
K	Lysin
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kaliumcarbonat
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Milli-Q	ultrareines Wasser (mittels Milli-Q-Anlage aufbereitet)
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie Massenspektrometrie (liquid chromatography mass spectrometry)
LS	Lichtstreuung (light scattering)
MeCN	Acetonitril
MM	Makromolekül
NaBH <sub>4</sub>	Natriumborant
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
HSAB	Harte und weiche Säuren und Basen (Hard and soft Acides and Bases)
NES	Nukleares Exportsignal
NDS	Norboren-funktionalisierter Baustein, abgeleitet von Ethylendioxybisethylamin mit Bernsteinsäureanhydridrest (succinyl rest)
NP	Nanopartikel

---

usNP	Ultrakleine Nanopartikel (ultrasomal nanoparticle)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Natriumsulfat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
RAFT	Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragung- (reversible addition fragmentation chain transfer)
P	Phosphor
PEG	Polyethylenglykol
PS	Polystyrol
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RI	Brechungsindex (refraction index)
RP-HPLC	Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (reverse phase - high performance liquid chromatography)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
STATs-technologie	signal transducers and activators of transcription-Technologie
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz-Assay (surface plasmon resonance)
SPPoS	Polymerfestphasensynthese (solid phase polymer synthesis)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TDS	Alkin-funktionalisierter Baustein (triple bond), abgeleitet von Ethylendioxybisethylamin mit Bernsteinsäureanhydridrest (succinyl rest)
TFA	Trifluoressigsäure
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
TIPS	Triisopropyl
TM	Tweezermakromolekül

TPO	Thrombopoietin
UV-Vis	UV-Vis UV-Vis-Spektroskopie
VWD	variabler Wellenlängen Detektor
WW	Wechselwirkung

Einheiten und Symbole

<i>Abkürzung</i>	<i>Definition</i>
°C	Grad Celsius
$\delta$	chemische Verschiebung
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hz	Hertz
L	Liter
M	Molarität (Mol pro Liter)
m/z	Masse/Ladung
min	Minute(n)
mM	Millimolar
mL	Milliliter
ppm	Teile pro Million (parts per million)
RT	Raumtemperatur
t	Zeit (time)
t <sub>R</sub>	Retentionszeit

## 6.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht der nicht-kovalenten Wechselwirkungen und ihre zugehörigen Bindungsstärken in [kcal/mol]. <sup>19, 22</sup> .....	4
<b>Tabelle 2:</b> Pinzettenabstände der divalenten Pinzettenmakromoleküle. Die Abstände sind mittels MD-Simulation ermittelt.....	43
<b>Tabelle 3:</b> Analytische Daten der Verbindungen Short-MM, Medium-MM und Long-MM. Reinheit in %, bestimmt durch Integration des detektierten UV-Signal bei 214 nm des HPLC-Elugramm. Elutionszeit erhalten aus RP-HPLC-Messungen bei einem Lauf von 30 min, 25°C und einem Eluenten 0-50 Vol.% MeCN in H <sub>2</sub> O. HR-ESI-MS Daten berechnet sowie gefunden.....	48
<b>Tabelle 4:</b> Analytische Daten zu den Verbindungen Short-F-MM, Medium-F-MM und Long-F-MM. Reinheit in %, bestimmt durch Integration des detektierten UV-Signals bei 214 nm des HPLC-Elugramms. Elutionszeit erhalten aus RP-HPLC-Messungen bei einem Lauf von 30 min, 25°C und einem Eluenten von 0-50 Vol.% MeCN in H <sub>2</sub> O. HR-ESI-MS Daten berechnet sowie gefunden. ....	54
<b>Tabelle 5:</b> Tweezerabstände und hydrodynamische Durchmesser $d_H$ von zweiwertigen TMs, bestimmt durch MD-Simulation und DOSY-NMR. *Als Referenzpunkt wurde das erste aromatische Proton (an welchem der Linker covalent gebunden ist) des Tweezers verwendet. ....	70
<b>Tabelle 6:</b> Durchmesser der verschiedenen Nanopartikel aufgelistet nach Methoden. HRTEM, DCS und DOSY-NMR. ....	94
<b>Tabelle 7:</b> Grad der Funktionalisierung (Anzahl der funktionellen Gruppen pro Partikel), abgeleitet durch UV-Signal (Anzahl der Azide für Au-F-MM) und ICP-MS (Anzahl der Pinzetten für Au-TW und Au-TM-F).....	95

<b>Abbildung 1:</b> Konzeptübersicht: Entwicklung multivalenter Liganden mit dem Bindungsmotiv des aminosäurespezifischen molekularen Tweezers (n=1). <sup>1</sup> .....	XIV
<b>Abbildung 2:</b> Veranschaulichung der Komplexbildung aus zwei Carbonsäuren zum Dimer durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. <sup>11</sup> .....	2
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des Verlaufs von Molekularer Chemie zu Supramolekularer Chemie. <sup>19</sup> .....	2
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Komplexbildungsmöglichkeiten: A) Bildung eines Wirt-Gast-Komplex, B) Einschluss von Gastmolekülen in Hohlräume, in einem von Wirtsmolekülen gebildetem Gitter, C) Bildung eines selbstassemblierten Aggregats, das nicht der klassischen Wirt-Gast-Beschreibung entspricht. <sup>19</sup> .....	7
<b>Abbildung 5:</b> Komplex, der zwischen dem bakteriellen Zellteilungsprotein ZipA (blau) und dem FtsZ-Fragment (rot) gebildet wird, mit Hervorhebung der mutierten Reste nach Alanin-Scanning-Mutagenese der gesamten Protein-Protein-Grenzfläche mittels einer van-der-Waals-Darstellung. In gelb sind die Reste mit einer relativen freien Bindungsenergie von weniger als 2,0 kcal/mol und in orange die Reste mit einer relativen Bindungsenergie von mehr als 2,0 kcal/mol dargestellt. Die PDB-ID lautet 1F47. Für die Erstellung dieser Abbildung wurde die VMD-Software <sup>83</sup> verwendet. <sup>44</sup> .....	8
<b>Abbildung 6:</b> Zusammenfassung der drei Strategien der Proteinerkennung nach Hamachi und Mitarbeitern. i) Erkennung von Protein-Substrukturen, ii) Erkennung von Proteinoberflächen wie Hot-Spots oder Protein-Protein-Interaktionsstellen, iii) Erkennung durch typische Protein-Ligand Wechselwirkung. <sup>52</sup> .....	10
<b>Abbildung 7:</b> Vereinfachte schematische Darstellung eines molekularen Tweezers und Bildung eines Sandwich-Modells durch Einschluss eines kleinen Gastmoleküls. ....	11
<b>Abbildung 8:</b> Chemische Struktur der di- und tetramethylenverbrückten aromatischen Clips (links) und Tweezers (rechts). <sup>66</sup> .....	12
<b>Abbildung 9:</b> Darstellung von Alkylkette-Tweezer-Komplex. Die Alkylketten werden wie ein Faden durch den Hohlraum der Pinzette 9a gezogen und halten das Stickstoffatom des Ammoniumions in der zentralen Position. Die Alkylkette wird durch mehrfache Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen die vorherrschen fixiert. <sup>70</sup> .....	13
<b>Abbildung 10:</b> Asymmetrische funktionelle Monobutinyolphosphatmonophosphat-Pinzette. <sup>73</sup> .....	15

- Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Effekte, die bei einer multivalenten Präsentation von Liganden und Rezeptoren auftreten und zur Erhöhung der Bindungsavidität führen. Dargestellt ist die Statistische Effekt, bei der der gebundene Ligand durch einen anderen Liganden ersetzt wird, weil sie sich in der Nähe befinden. Der Chelat-Effekt zeigt die Bindung von zwei Liganden, die auf demselben Gerüst präsentiert werden, an denselben Rezeptor. Unter Rezeptorcluster-Effekt ist die Bindung von mehr als einem Rezeptor an die Liganden auf einem Gerüst zu verstehen. Sterische Abschirmung ist die Abstoßung zwischen den Rückgraten und ungebundenen Liganden, die die Verdrängung der gebundenen Liganden durch einen ungebundenen Liganden verhindert. Beim Subsite-Effekt bindet ein weiterer Ligand zusätzlich an einer anderen „Seite“ des Rezeptors.<sup>87, 88</sup> ..... 17
- Abbildung 12:** Schematisch dargestellte Ausschnitte des klassischen Merrifield Harzes (A), links) und des TentaGel® Harzes (B), rechts). ..... 23
- Abbildung 13:** Exemplarische Darstellung an Schutzgruppen und dem Entschützungsschema mit Fmoc (links) sowie Aktivierungsreagenzien und dem Aktivierungsschema für BOP/PyBOP (rechts). ..... 25
- Abbildung 14:** Beispielhafte, schematische Darstellung der Festphasenpolymersynthese von präzisions Makromolekülen sowie exemplarische Darstellung von funktionellen Bausteinen (links) und spacer Bausteinen (rechts). Als funktionelle Bausteine sind TDS<sup>151</sup>, DDS<sup>155</sup>, MDS<sup>158</sup> und BADS<sup>154</sup> genannt. Als spacer Bausteine sind EDS<sup>151</sup>, SDS<sup>159</sup>, CDS<sup>151</sup> und ODS<sup>160</sup> genannt. .... 27
- Abbildung 15:** Abbildungen der Strukturformeln der bereits in der Medizin als Medikament eingesetzten niedermolekularen Molekülen. A) Eltrombopag, ein nicht-peptid-Agonisten des menschlichen Thrombopoietin (TPO, B) Maraviroc, ein niedermolekularer allosterischer CCR5-Chemokin-Antagonist, C) Plerixafor, ein partieller Antagonist des Chemokinrezeptors CXCR4 und ein allosterischer Agonist von CXCR7.<sup>177</sup> ..... 30
- Abbildung 16:** Chemische Struktur des supramolekularen Stabilisators mit trivalenter Präsentation des bindenden GCP-Motivs.<sup>197</sup> ..... 31
- Abbildung 17:** Kristallstruktur des Survivin-Dimers (PDB ID: 1F3H). Beide Monomere sind in grau eingefärbt. Das NES ist rot eingefärbt. .... 32
- Abbildung 18:** Darstellung der Struktur der niedermolekularen Verbindung YM-155.<sup>220</sup> ..... 33
- Abbildung 19:** A) Chemische Struktur des supramolekularen GCP-Liganden 1 (L1) mit zwei Guanidiniumcarbonylpyrrol-Gruppen (blau). B) Docking von L1 (türkis) an die Histone H3-Bindestelle von Survivin. Die gepunkteten Linien (orange) zeigen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein. Interaktionsstellen des Liganden sind rot hervorgehoben.<sup>222</sup> .... 34

- Abbildung 20:** A) Vereinfachte Darstellung des Survivin-Dimers und die daraus resultierenden Abstände der Lysinreste K90/K90' und K103/K103'. B) Schematische Darstellung von multivalenten Tweezer-Konstrukten (dunkelgrau), die die Bindung der NES-Region von Survivin (PDB1E31) (blauer Kreis) an die offene NES-Spalte (rot gefärbter Bereich/roter Kreis) des Exportrezeptors CRM1 (PDB3GJX) stören.<sup>1</sup> Darstellungen nicht maßstabsgetreu gezeichnet. Erstellt von Inesa Hadrović aus der Universität Duisburg-Essen. .... 41
- Abbildung 21:** Darstellung einer Tweezermakromolekül-Struktur sowie schematische Darstellung aller drei sich in der Länge und im Interligandenabstand unterscheidenden Tweezermakromoleküle.<sup>1</sup> ..... 42
- Abbildung 22:** Darstellung des kürzesten Pinzettenmoleküls Short-TM in gestreckter Version (Erstellt mittels Schrödinger Maestro Software). .... 43
- Abbildung 23:** A) Survivin-Monomer und B) Dimer mit hervorgehobenen Lysinen in der NES-Region (blau und rosa) sowie die Verbrückung der Lysinreste K90/90' durch den exemplarisch verwendeten Liganden Medium-TM. Nach PDB 1XOX modifiziert.<sup>1</sup> Erstellt von der Kooperationspartnerin Inesa Hadrović ..... 44
- Abbildung 24:** Schematischer Verlauf der Festphasenpolymersynthese der Makromoleküle unter der Verwendung der Bausteine EDS und BADS.<sup>1</sup> .... 46
- Abbildung 25:** Vergleichende Darstellung der <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O, RT) Spektren der Verbindungen Short-MM (oben, türkis) und Medium-MM (unten, rot). Farbliche Zuordnung der Signale der H-Protonen in den jeweiligen Strukturen. .... 49
- Abbildung 26:** Vergleichende Darstellung der <sup>1</sup>H-NMR Spektren (600 MHz) der Verbindungen Short-MM (oben) und Medium-MM (unten). Die Spektren wurden in 10 Grad Schritten bis 100 °C in DMSO-d<sub>6</sub> vermessen. .... 51
- Abbildung 27:** Ionische Formen von Fluorescein entsprechend den pH-Bereichen und ihren relativen Fluoreszenzintensitäten. Bei neutralem pH-Wert und unter Anregung bei 490 nm überwiegt die am stärksten fluoreszierende dianionische Form von Fluorescein gegenüber anderen Formen. Unterhalb von pH = pK<sub>a</sub>~6,4 zeigt das monoanionische Fluorescein eine blauverschobene Absorption, gefolgt von einer drastischen Abnahme der Fluoreszenz. Bei einem noch niedrigeren pH-Wert werden neutrale und weitere kationische Formen von Fluorescein bei einer Bestrahlung von 490 nm nicht fluoreszierend.<sup>246</sup> ..... 52
- Abbildung 28:** Schematische Darstellung der Synthese zur FITC-Anbringung mittels SPPoS. .... 53
- Abbildung 29:** <sup>1</sup>H-NMR Stack der Verbindungen Medium-MM (oben, türkis) und Medium-F-MM (unten, rot) (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, RT). Farbliche Zuordnung der Signale der H-Protonen in den jeweiligen Strukturen. .... 55
- Abbildung 30:** Schematische Darstellung der Festphasensynthese zur Implementierung von L- Cystein und dem anschließenden Erhalt der Verbindung Cys-Medium-F-MM. .... 58

- Abbildung 31:** RP-HPLC-Spektren der Verbindung Cys-Medium-F-MM im Rohzustand (schwarzes Elugramm) sowie nach der Aufreinigung mit TCEP (blau, links) und dem Elugramm nach versetzten der Struktur mit TCEP nach drei Tagen (rotes Elugramm, rechts). Die jeweiligen Peaks der Produkte, der Disulfide und des reduzierten Nebenproduktes wurden zugeordnet. Elutionszeiten wurden aus den RP-HPLC-Messungen bei einem Lauf von 30 min, 25 °C und einem Eluenten 0-50 Vol.% MeCN in H<sub>2</sub>O erhalten. .... 60
- Abbildung 32:** RP-HPLC-Chromatogramm (B) und HR-ESI-MS-Spektrum (A) der Verbindung Cys-Medium-F-MM. Peaks mit beschrifteten Produkt- und Disulfidpeak. RP-HPLC-Messung wurde bei 25 °C und einem Eluenten von 0-50 vol.% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min durchgeführt..... 62
- Abbildung 33:** Bindung eines Lysinrestes in der Kavität des molekularen Tweezers (CLR01). Die Abbildung wurde mit Hilfe von Maestro 11.5 Schroedinger erstellt..... 63
- Abbildung 34:** Strukturen und schematische Darstellung der final synthetisierten Tweezer-Makromoleküle Short-TM, Medium-TM, Long-TM. .... 65
- Abbildung 35:** <sup>1</sup>H-NMR der Verbindungen Medium-MM (blau, Oben) und Medium-TM (grün, Mitte) und Medium-F-TM (rot, Unten) übereinandergelegt. Die Spektren wurden jeweils auf das Lösungsmittelrestsignal von DMSO-d<sub>6</sub> gelockt..... 69
- Abbildung 36:** Darstellung des Survivin Homodimers und die gemessenen Abstände zwischen den Lysinresten K90/K90' und K103/K103'. (PDB ID: 1XOX). ..... 70
- Abbildung 37:** Struktur des monovalenten Tweezers CLR01. .... 72
- Abbildung 38:** ITC Thermogram und Bindungsisotherme aus der Bindung der Verbindungen Short-TM, Medium-TM und Long-TM an Survivin. Erhalten wurden die Thermogramme und Bindungsisothermen durch umgekehrte Titration..... 73
- Abbildung 39:** Speziesverteilungsdiagramme (links) aus direkter Titration der jeweiligen divalenten Tweezer-Makromoleküle basierend auf einem Modell, dass neben einem zweiwertigen Liganden einen ebenso zweiwertigen Rezeptor enthält. Aufgetragen ist hierbei die Konzentration gegen das molare Verhältnis von Titrant zu Titrat ( $A_t/M_t$ ). Mögliche Bindungsereignisse der divalenten Liganden und eines zweiwertigen Rezeptors sind rechts in der Abbildung dargestellt..... 75
- Abbildung 40:** Störung der chemischen Verschiebung und relative Signalintensitäten der NMR-Titration von Survivin mit 500 M (oben) und 750 M (unten) Short-TM. .... 76
- Abbildung 41:** Schematische Darstellung der Verbrückung mehrerer Survivin-Proteine durch divalente Tweezer-Makromoleküle. .... 77

- Abbildung 42:** Fluoreszenzanisotropie-Experimente zeigen eine verstärkte Bindung an Survivin120 für bivalente Tweezer-Makromoleküle. Fluoreszenzmarkierte monovalente oder bivalente Tweezer-Makromoleküle ( $0,2 \mu\text{M}$ ) wurden mit Survivin120 auf bis zu  $150 \mu\text{M}$  titriert. Die Daten wurden an ein Eins-zu-Eins-Bindungsmodell angepasst und sind als Mittelwerte  $\pm$  SD mit  $n=3$  unabhängigen Experimenten dargestellt..... 78
- Abbildung 43:** Vereinfachter Versuchsaufbau des SPR (A) und exemplarisches SPR-Sensogram. Abbildungen sind angelehnt an  $^{262}$  und  $^{263}$ . ..... 80
- Abbildung 44:** SPR-Bindungsaffinität. Sensorgramme für das Bindungsereignis zwischen dem monovalenten Tweezer CLR01, den Tweezer-Makromolekülen Short-TM, Medium-TM, Long-TM und Medium-F-TM und immobilisiertem Survivin120, gemessen mittels SPR (links). Die Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, und für jede Verbindung ist ein repräsentatives Beispiel abgebildet. In allen Fällen waren die Konzentrationen der Verbindungen von oben nach unten  $400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125, 0,390625$  und  $0,1953125 \mu\text{M}$ . Kurvenregressionen der Gleichgewichtsreaktionen als Funktion der Konzentration werden mit Hilfe eines Steady-State-Modells angepasst, aus dem  $K_D$ -Werte abgeleitet werden können. Die Fehler stellen die Standardabweichung aus drei Messungen dar. Die Analyse der Gleichgewichts-Affinität in Form eines  $K_D$ -Wertes kann durch Auftragen der RUs im Gleichgewichtszustand gegen die Konzentration als entsprechende Kurve für die Verdünnungsreihe erhalten werden. Dies führt zu einer Sättigungskurve. Nach Durchführung eines Fits wird der jeweilige  $K_D$ -Wert, der der Konzentration bei halbem Maximum entspricht, erhalten.<sup>1</sup> ..... 81
- Abbildung 45:** Beispielhafte SPR-Bindungskurve von Long-TM. Die in Türkistönen gefärbten Anpassungskurven sind den experimentellen Daten überlagert, wobei zwischen den Assoziations- und Dissoziationsphasen  $5 \text{ s}$  Abstand liegen, um eine optimale Anpassung zu gewährleisten. Das untere Feld zeigt, wie gut die Anpassung war. (B) SPR-Bindungskurven bei  $400 \mu\text{M}$  für den monovalenten Tweezer CLR01 und die divalenten Tweezer-Konjugate (Short-TM, Medium-TM und Long-TM). (C) EVILFIT 2D-Diagramme für den monovalenten Tweezer CLR01 und die divalenten Tweezer-Konjugate (Short-TM, Medium-TM und Long-TM) zeigen verschiedene Ensembles unterschiedlicher  $k_{\text{on},i}/k_{\text{off},i}$ - und somit  $K_{D,i}$ -Werte, die auf unterschiedliche mono- und multivalente Bindungsmodi hinweisen.<sup>1</sup> ..... 83
- Abbildung 46:** Die kumulative Verteilung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) wurde aus den 2D-Diagrammen abgeleitet, was einen direkten Vergleich der ein- und zweiwertigen Liganden ermöglichte..... 85

- Abbildung 47:** Divalente TMs unterbrechen die Survivin/CRM1-Interaktion. HEK 293T-Zelllysate mit überexprimiertem Survivin142-HA wurden mit CLR01 oder kurzen, mittleren sowie langen TM in Konzentrationen von 0,5 bis 50  $\mu\text{M}$  vorinkubiert. GST-CRM1 wurde zusammen mit rekombinantem RanQ69L und dGTP entweder mit nicht oder mit vorinkubierten Zelllysaten gemischt, um den Aufbau des Proteinkomplexes zu ermöglichen. Sowohl GST-CRM1 als auch das interagierende Survivin142-HA wurden von GSH-beschichteten Beads gezogen. Die Proteine in der Inputfraktion und in den Beads-Proben wurden mittels Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern für GST oder HA analysiert. Beispielhafte Blots aus Pull-down-Assays (links). Densitometrische Quantifizierung von Pull-down-Assays, bestehend aus dem Mittelwert von zwei oder drei Wiederholungen (rechts).<sup>1</sup>..... 86
- Abbildung 48:** Modifikation von AuNPs in einer Vielzahl von Varianten. Aufgeführt sind die Parameter Oberfläche, Größe und Form, die variiert werden können.<sup>280</sup>..... 88
- Abbildung 49:** Konzeptübersicht: Erhöhung der Multivalenz durch Anbringung des aminosäurespezifischen molekularen Tweezers ( $n=1$ ) an ultrakleine Goldnanopartikel (A) als auch der Anbringung von des divalenten Tweezermakromolekül an ultrakleine Goldnanopartikel (B)...... 90
- Abbildung 50:** Schematische Darstellung der Syntheseroute von Cystein-tragenden Makromolekül über Makromolekül-funktionalisierten Goldnanopartikel (Au-F-MM) bis zum finalen Tweezer-Makromolekül-funktionalisierten Goldnanopartikel (Au-F-TM)...... 91
- Abbildung 51:** Synthese von TW-funktionalisierten us-AuNPs: (A) Direkte Bindung von TW-Alkynyl an Azid-funktionalisierte us-AuNPs zu Au-TW. (B) Zweistufige Synthese von Au-TM-F-Nanopartikeln. Anbringung der Azid-funktionalisierten Makromolekülen, gefolgt von CuAAC-Konjugation von TW-Alkynyl. Reaktionsbedingungen: (A) (a)  $\text{NaBH}_4$  in Wasser; (b) Imidazolsulfonylazid-Dihydrogensulfat,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH/Wasser; (c) CuAAC mit TW-Alkin; (B) (a)  $\text{NaBH}_4$  in MeOH/Wasser; (b) CuAAC mit TW-Alkin.<sup>1</sup>..... 93

- Abbildung 52:** SPR-Bindungsaffinität. Sensorgramme für das Bindungsereignis zwischen Tweezer-Nanopartikel Au-TW bzw. Au-F-TM und immobilisiertem Survivin120, gemessen mittels SPR (links). Die Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, und für jede Verbindung ist ein repräsentatives Beispiel abgebildet. In allen Fällen waren die Konzentrationen der Verbindungen von oben nach unten 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015625, 0,007812, 0,003906, 0,001953, 0,000976, 0,000488 und 0,000244  $\mu\text{M}$ . Kurvenregressionen der Gleichgewichtsreaktionen als Funktion der Konzentration werden mit Hilfe eines Steady-State-Modells angepasst, aus dem  $K_D$ -Werte abgeleitet werden können. Die Fehler stellen die Standardabweichung aus drei Messungen dar. Die Analyse der Gleichgewichts-Affinität in Form eines  $K_D$ -Wertes kann durch Auftragen der RUs im Gleichgewichtszustand gegen die Konzentration als entsprechende Kurve für die Verdünnungsreihe erhalten werden. Dies führt zu einer Sättigungskurve. Nach Durchführung eines Fits wird der jeweilige  $K_D$ -Wert, der der Konzentration bei halbem Maximum entspricht, erhalten.<sup>1</sup> ..... 97
- Abbildung 53:** EVILFIT 2D-Diagramme, die aus direkten SPR-Messungen für die Bindung von Au-TW, Au-TM-F und Au-F-MM an immobilisiertes Survivin abgeleitet wurden (A) sowie Durchschnitts  $K_D$ -Werte im Vergleich der Verbindungen CLR01, Medium-Tm, Au-TW und Au.TM-F (B).<sup>226</sup> ..... 99
- Abbildung 54:** Tweezer-Nanopartikel-Konjugate (Au-TW, Au-TM-F) inhibieren die Survivin-CMR1 Interaktion. Darstellung der densitometrischen Quantifizierung von Pull-Down Assay, bestehend aus dem Mittelwert von zwei oder drei Wiederholungen.<sup>226</sup> ..... 100
- Abbildung 55:** CLSM-Aufnahmen der Makromolekülverbindung cys-Medium-F-MM und der beiden Nanopartikelkonstrukte Au-F-TM und Au-F-MM-Tweezer mit HeLa-Zellen (aufgenommen von Dr. S. Kollenda) nach einer Inkubationszeit von 24 h. Der Maßstab beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Die Verbindungen tragen Fluorescein als Fluoreszenzfarbstoff. Die Lysosome wurden mit LysoTracker Red, die Zellkerne mit Hoechst und die Zellmembranen mit CellMask Deep Red eingefärbt.<sup>1</sup> ..... 101
- Abbildung 56:** Schematische Darstellung eines Konzepts zur weiteren Erhöhung der Avidität. Hierfür wird neben dem divalenten Tweezer eine komplementäre Peptidsequenz zur weiteren Erkennung in das Liganden System integriert. .... 109
- Abbildung 57:** <sup>1</sup>H-NMR des Bausteins EDS (2) (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>). ..... XIX
- Abbildung 58:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) des Bausteins EDS.  $t_R = 25,9$  min. .... XIX
- Abbildung 59:** ESI-MS-Spektrum (ESI+, single quadrupole) des Bausteins EDS..... XX
- Abbildung 60:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) des finalen Bausteins BADS.... XX
- Abbildung 61:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) des Bausteins BADS.  $t_R = 22,0$  min. .... XXI
- Abbildung 62:** ESI-MS-Spektrum (ESI+, single quadrupole) des Bausteins BADS..... XXI

- Abbildung 63:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) der Verbindung Short-MM. ....XXII
- Abbildung 64:** HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Short-MM. ....XXII
- Abbildung 65:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Short-MM.  $t_{\text{R}} = 15,5$  min. .... XXIII
- Abbildung 66:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) der Verbindung Medium-MM. .... XXIII
- Abbildung 67:** HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Medium-MM. .... XXIV
- Abbildung 68:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Medium-MM.  $t_{\text{R}} = 16,9$  min. .... XXIV
- Abbildung 69:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) der Verbindung Long-MM. .... XXV
- Abbildung 70:** HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Long-MM. .... XXV
- Abbildung 71:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Long-MM.  $t_{\text{R}} = 16,6$  min. .... XXVI
- Abbildung 72:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Short-F-MM. .... XXVI
- Abbildung 73:** HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Short-F-MM. ....XXVII
- Abbildung 74:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Short-F-MM.  $t_{\text{R}} = 24,5$  min. ....XXVII
- Abbildung 75:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Medium-F-MM. ....XXVII
- Abbildung 76:** HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Medium-F-MM. .... XXVIII
- Abbildung 77:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Medium-F-MM.  $t_{\text{R}} = 22,6$  min. . XXVIII
- Abbildung 78:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Long-F-MM. .... XXVIII
- Abbildung 79:** HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Long-F-MM. .... XXIX
- Abbildung 80:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Long-F-MM.  $t_{\text{R}} = 21,7$  min. .... XXIX
- Abbildung 81:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Cys-Medium-F-MM. .... XXIX
- Abbildung 82:** HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung cys-Medium-F-MM. XXX
- Abbildung 83:** MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung cys-Medium-F-MM. .... XXX
- Abbildung 84:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C) der Verbindung cys-Medium-F-MM.  $t_{\text{R}} = 23,4$  min. .... XXX
- Abbildung 85:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Short-TM. .. XXXI
- Abbildung 86:**  $^{31}\text{P-NMR}$  Spektrum (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Short-TM. . XXXI
- Abbildung 87:** MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Short-TM. ....XXXII

<b>Abbildung 88:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Medium-TM. ....	XXXII
<b>Abbildung 89:</b> $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum (243 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Medium-TM. ....	XXXII
<b>Abbildung 90:</b> MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Medium-TM. ....	XXXIII
<b>Abbildung 91:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Long-TM. ....	XXXIII
<b>Abbildung 92:</b> $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum (243 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Long-TM. ....	XXXIII
<b>Abbildung 93:</b> MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Long-TM. ....	XXXIV
<b>Abbildung 94:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Short-TM-F. ....	XXXIV
<b>Abbildung 95:</b> $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum (243 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Short-TM-F. ....	XXXV
<b>Abbildung 96:</b> MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Short-F-TM. ....	XXXV
<b>Abbildung 97:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Medium-TM-F. ....	XXXVI
<b>Abbildung 98:</b> $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum (243 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Medium-TM-F. ....	XXXVI
<b>Abbildung 99:</b> MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Medium-F-TM. ....	XXXVII
<b>Abbildung 100:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (600 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Long-TM-F. ....	XXXVIII
<b>Abbildung 101:</b> $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum (243 MHz, DMSO- $d_6$ ) der Verbindung Long-TM-F. ....	XXXVIII
<b>Abbildung 102:</b> MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Long-F-TM. ....	XXXVIII
<b>Abbildung 103:</b> Direkte Titration von 60 $\mu\text{L}$ a 200 $\mu\text{M}$ Survivin zu 200 $\mu\text{L}$ a 400 $\mu\text{M}$ Liganden. ....	XXXIX
<b>Abbildung 104:</b> DOSY-NMR Übersicht der divalenten Tweezer-Konjugate Short-TM, Medium-TM und Long-TM sowie deren daraus resultierenden Translationale Diffusions Koeffizienten, Hydrodynamische Radien und Hydrodynamischen Durchmesser. Die Daten wurden von Dr. Christine Beuck erzeugt und zur Verfügung gestellt. ....	XL
<b>Abbildung 105:</b> SPR-Sensogramme für das Bindungsereignis zwischen Au-F-MM, sowie den negativ Kontrollen Au-GSH, Au-GSH- $\text{N}_3$ und Medium-F-MM und immobilisiertem Survivin120. Die Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, und für jede Verbindung ist ein repräsentatives Beispiel abgebildet. ....	XLI
<b>Abbildung 106:</b> Die kumulative Verteilung der Dissoziationskonstanten (KD) wurde aus den 2D-Diagrammen abgeleitet. ....	XLI
<b>Abbildung 107:</b> Direkte SPR-Bindungskurven und EVILFIT-2D-Diagramme für den monovalenten Tweezer (CLR01) und die divalenten Tweezer-Konjugate, sowie Goldnanopartikel – Tweezer Konjugate. ....	XLII

- 
- Abbildung 108:** Übersicht der drei Tweezer-Makromolekülkonstrukte Short-TM, Medium-TM und Long-TM in ihrer jeweils gestreckten Konformation erhalten durch MD Simulation. .... XLII
- Abbildung 109:** HRTEM-Aufnahmen der ultrakleinen Goldnanopartikelenaufnahmen der Verbindungen AuGSH, AuGSH-N<sub>3</sub>, Au-F-MM-N<sub>3</sub> und Au-TM-F. Erstellt von Dr. K. Loza im Forschungszentrum Jülich. Zur Verfügung gestellt durch Dr. Kai Klein.<sup>304</sup> ..... XLIII
- Abbildung 110:** Normierte Anzahlverteilung der DCS von ultrakleinen Goldnanopartikeln der Konstrukte AuGSH, AuGSH-N<sub>3</sub>, Au-F-MM-N<sub>3</sub>, Au-TM-F und Au-TW. Zur Verfügung gestellt durch Dr. Kai Klein.<sup>304</sup> ..... XLIII
- Abbildung 111:** UV-Vis Spektren der ultrakleinen Goldnanopartikelkonstrukte AuGSH, AuGSH-N<sub>3</sub>, Au-F-MM-N<sub>3</sub>, Au-TM-F und Au-TW. Zur Verfügung gestellt durch Dr. Kai Klein.<sup>304</sup> ..... XLIV



## APPENDIX

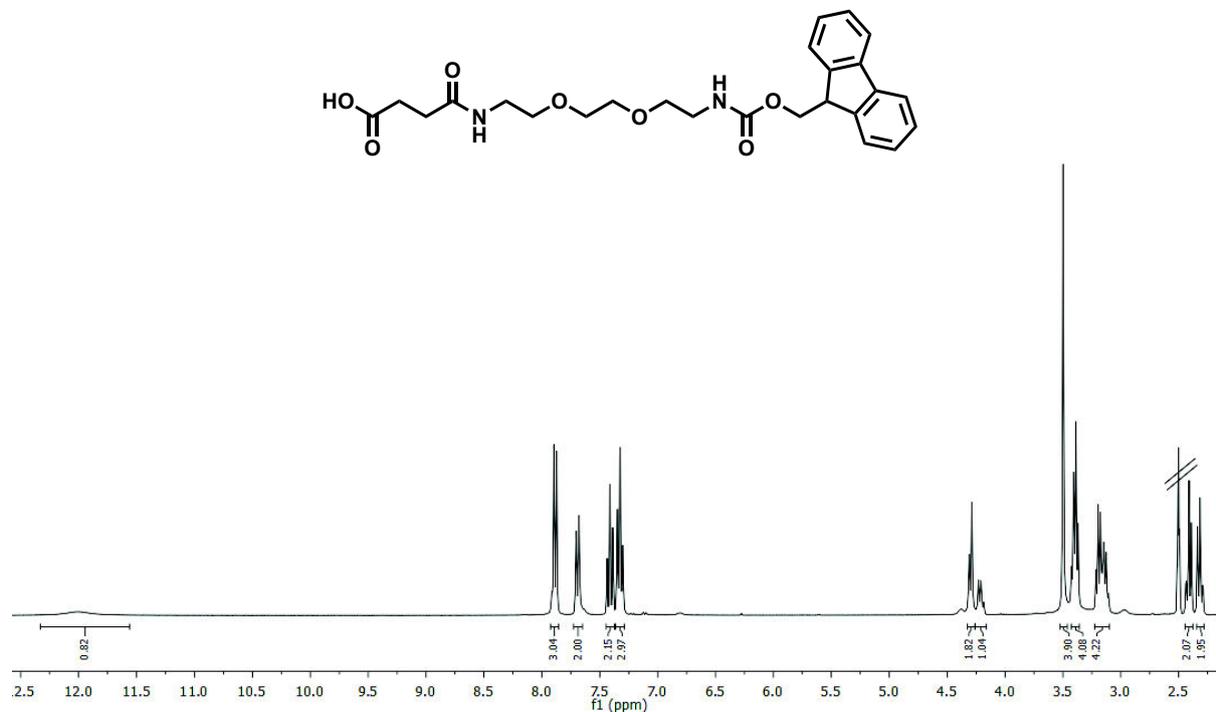


Abbildung 57:  $^1\text{H-NMR}$  des Bausteins EDS (2) (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

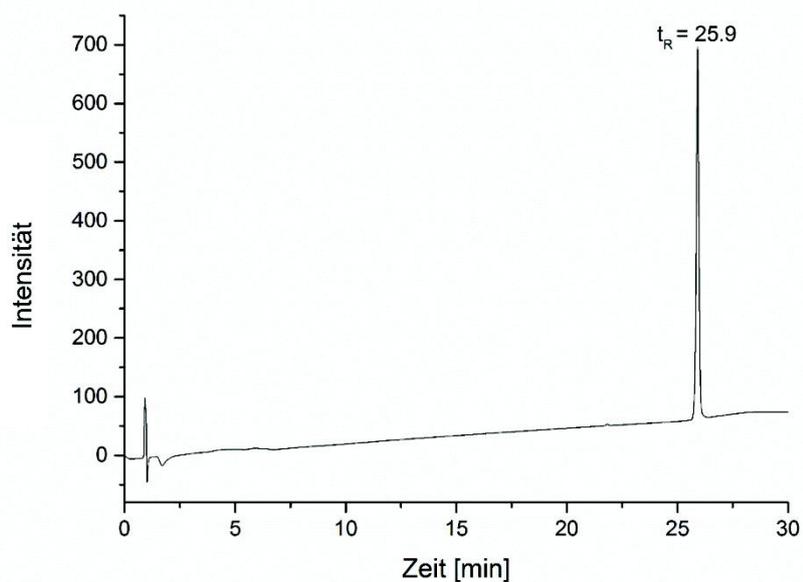


Abbildung 58: RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in  $\text{H}_2\text{O}$  in 30 min bei 25 °C) des Bausteins EDS.  $t_R = 25,9$  min.

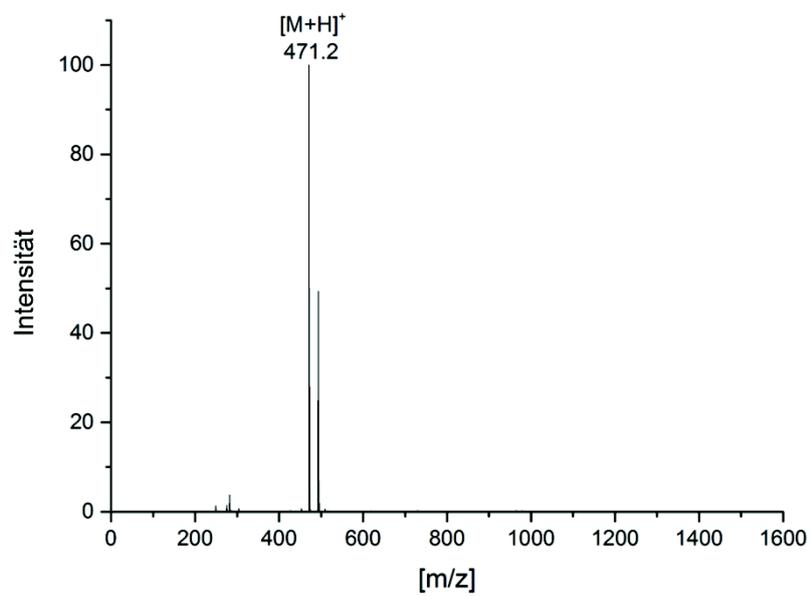


Abbildung 59: ESI-MS-Spektrum (ESI+, single quadrupole) des Bausteins EDS.

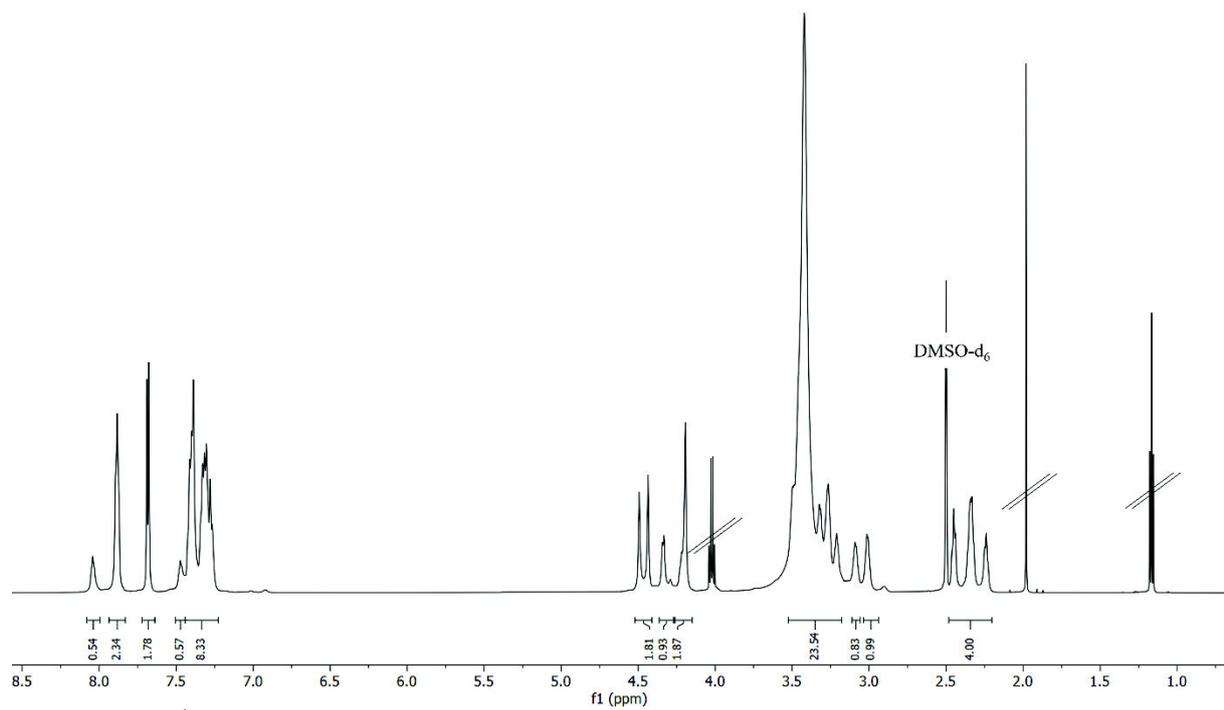
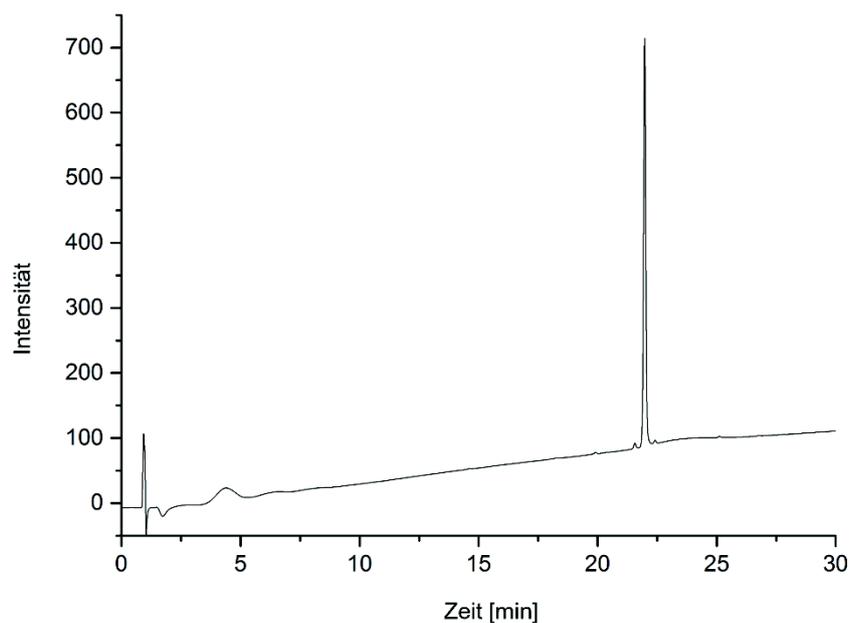
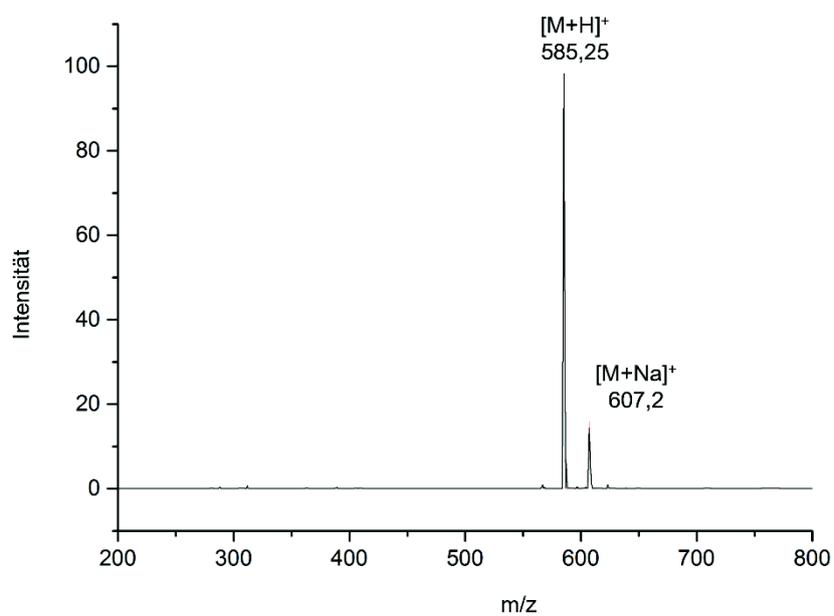


Abbildung 60: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) des finalen Bausteins BADS.



**Abbildung 61:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) des Bausteins BADS.  $t_R = 22,0$  min.



**Abbildung 62:** ESI-MS-Spektrum (ESI+, single quadrupole) des Bausteins BADS.

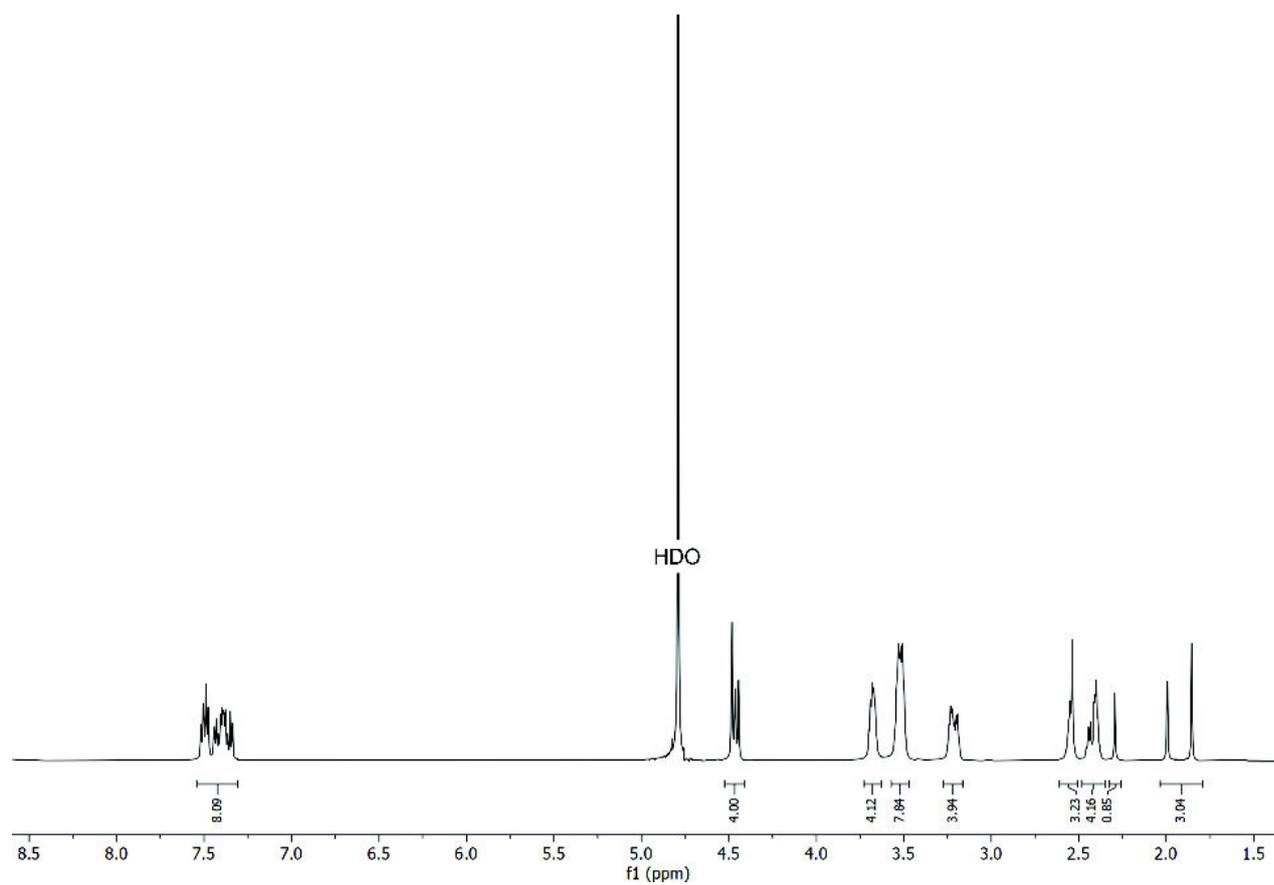


Abbildung 63:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) der Verbindung Short-MM.

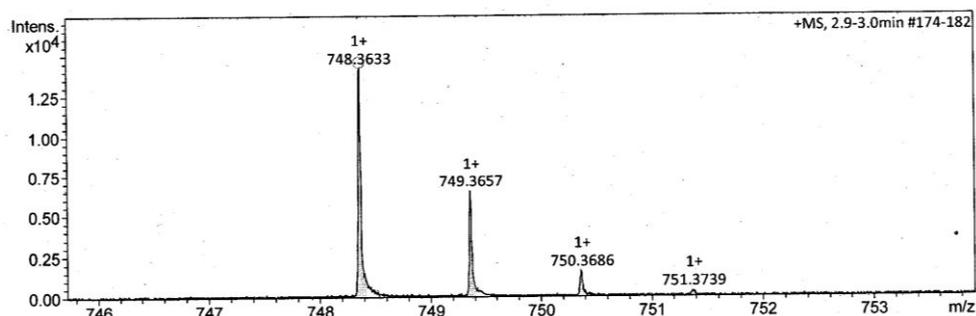
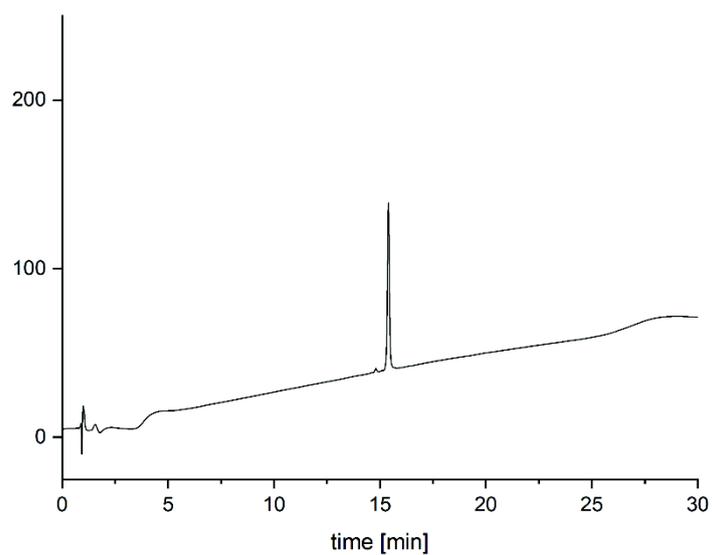
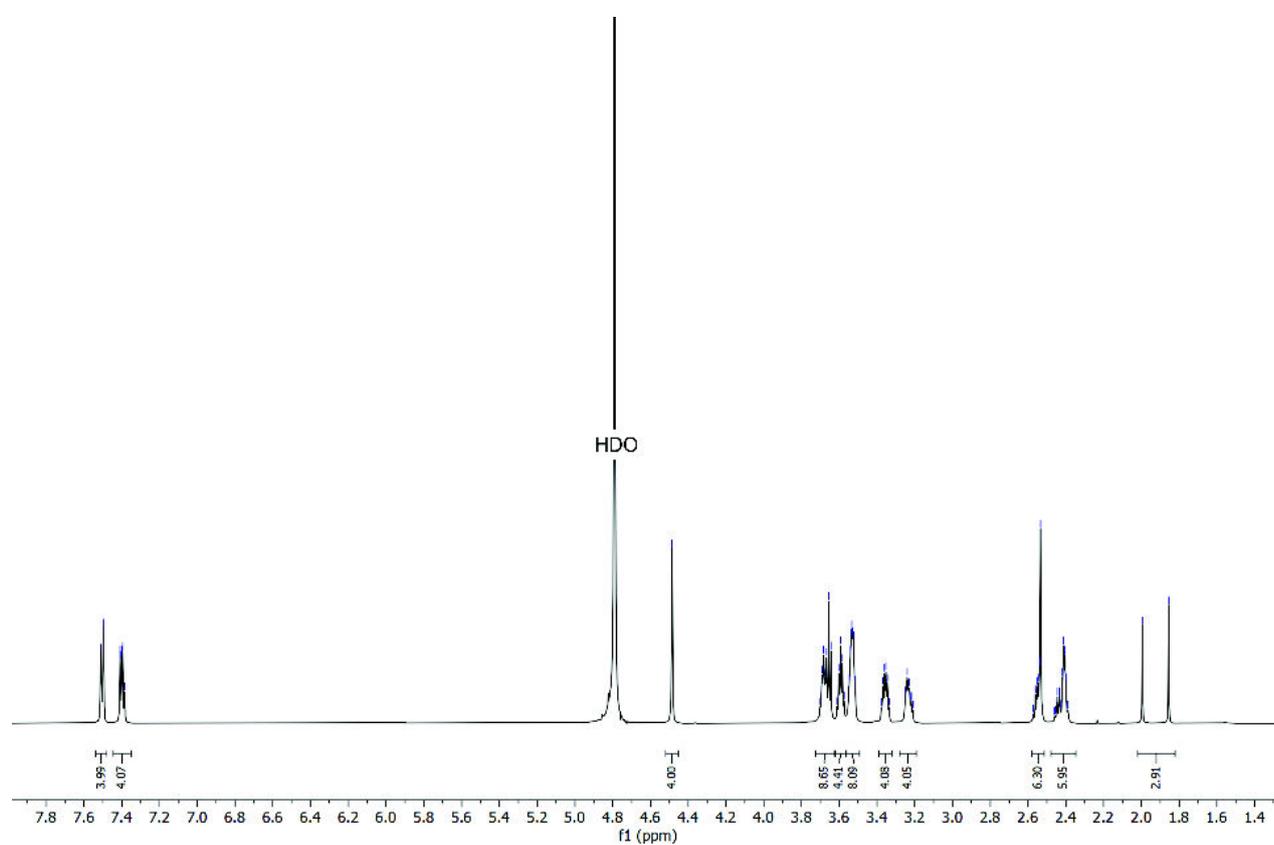


Abbildung 64: HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Short-MM.



**Abbildung 65:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Short-MM.  $t_R = 15,5$  min.



**Abbildung 66:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (600 MHz, D<sub>2</sub>O) der Verbindung Medium-MM.

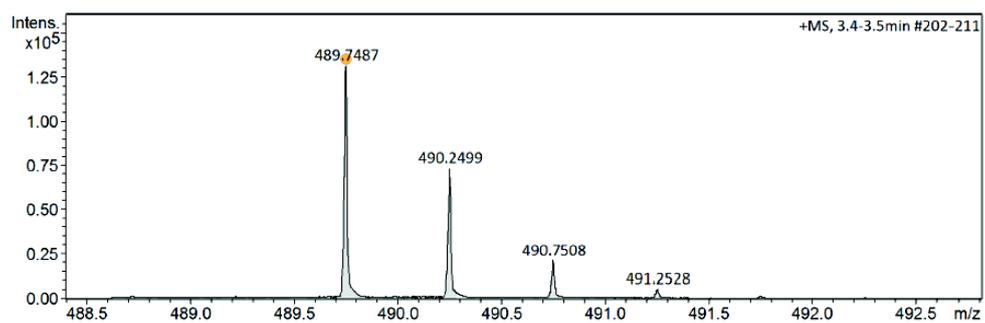


Abbildung 67: HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Medium-MM.

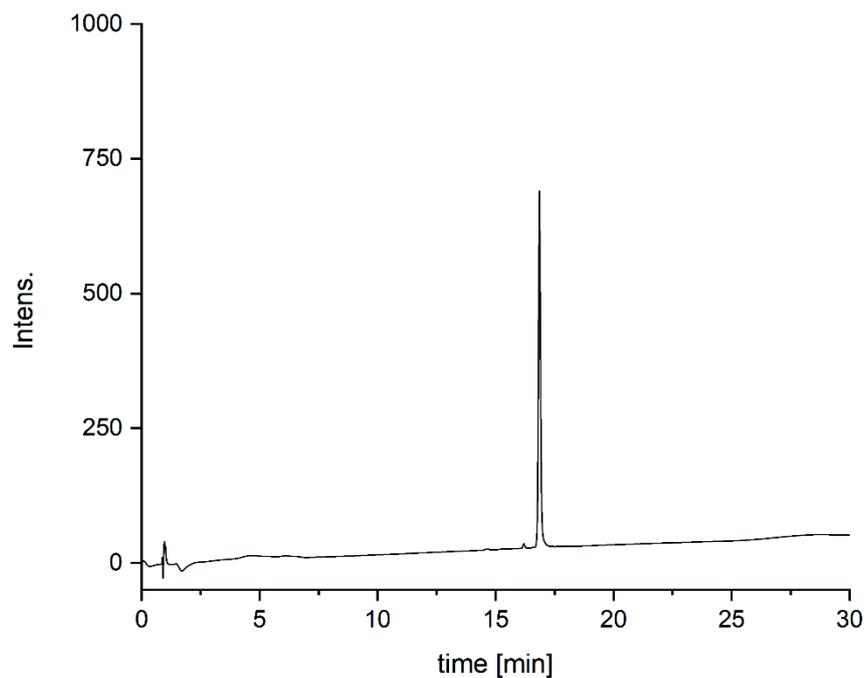


Abbildung 68: RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Medium-MM.  $t_R = 16,9$  min.

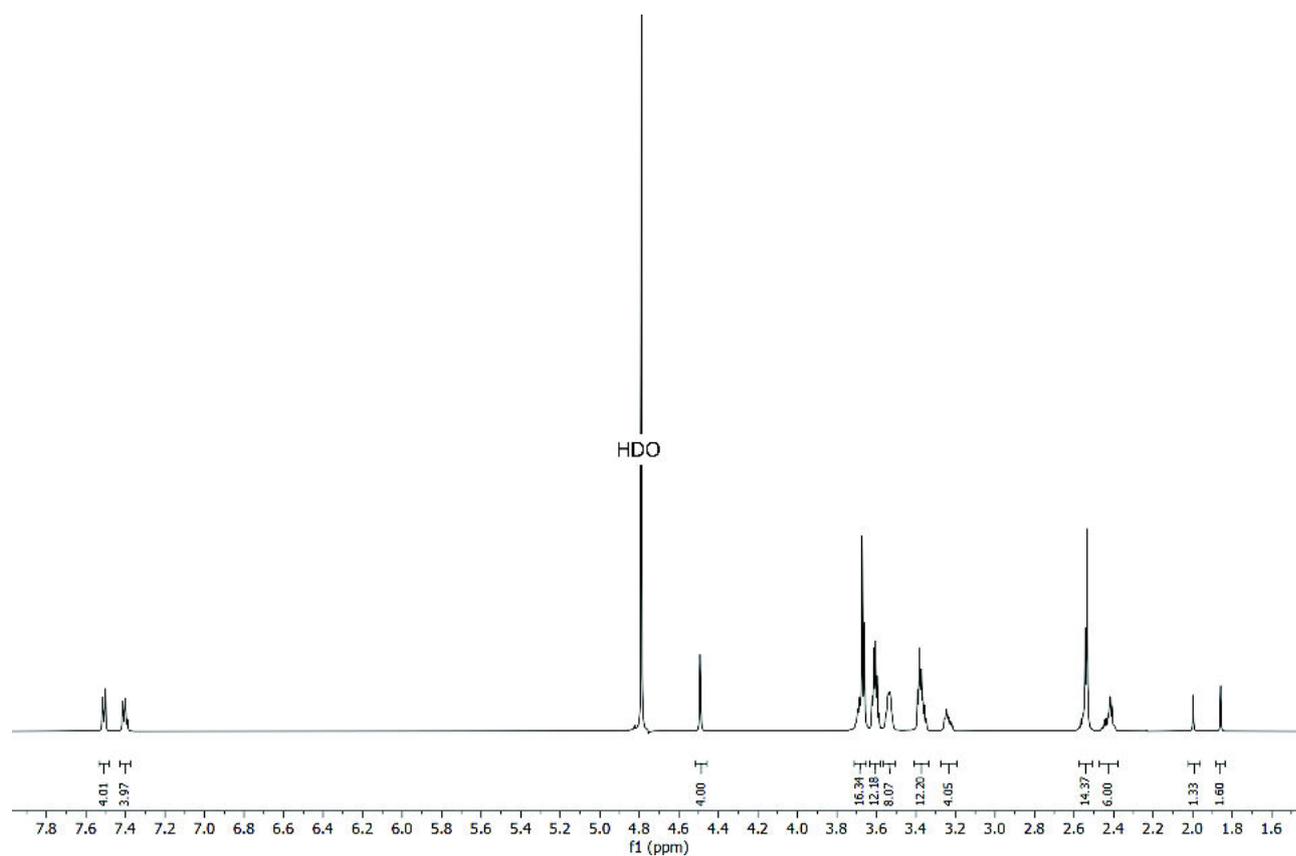


Abbildung 69: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (600 MHz, D<sub>2</sub>O) der Verbindung Long-MM.

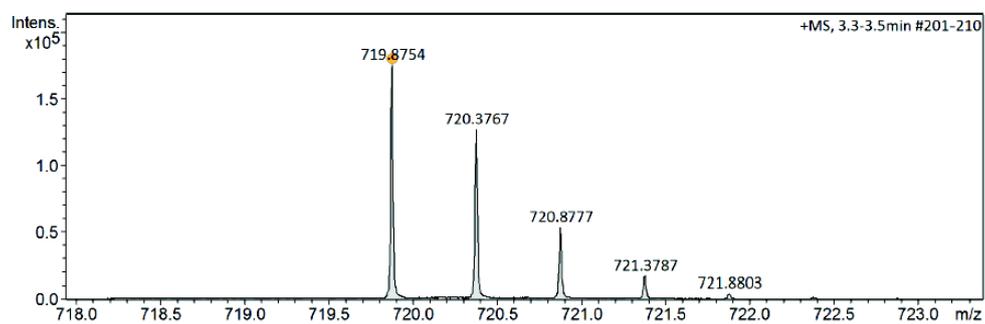
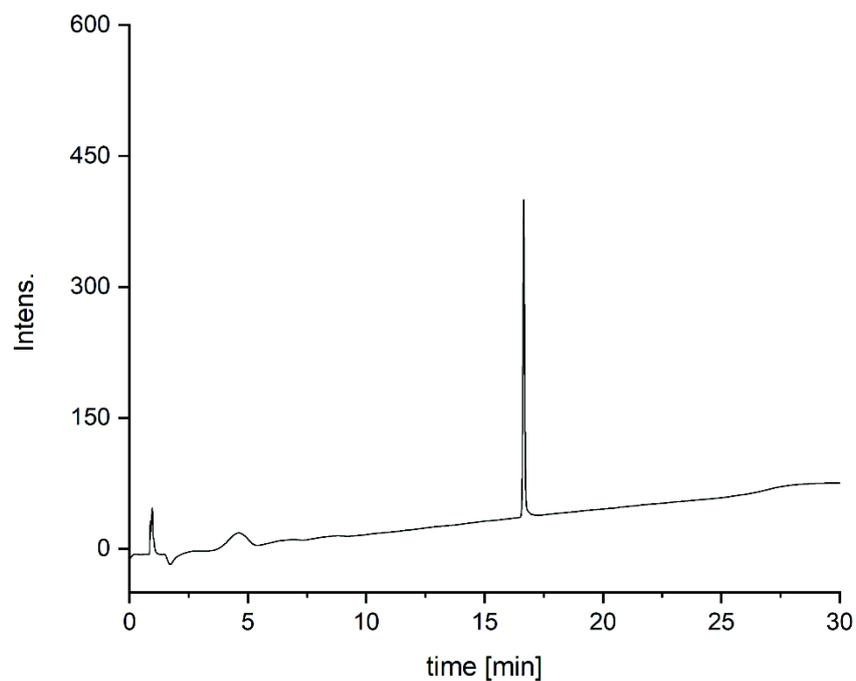
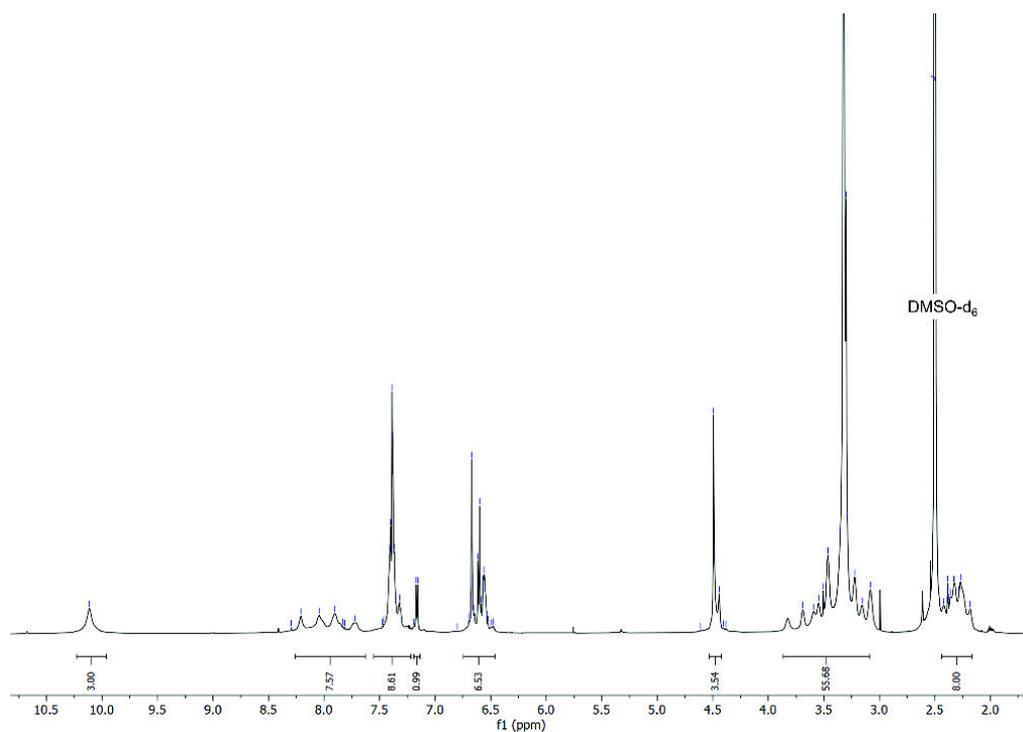


Abbildung 70: HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Long-MM.



**Abbildung 71:** RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Long-MM.  $t_R = 16,6$  min.



**Abbildung 72:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) der Verbindung Short-F-MM.

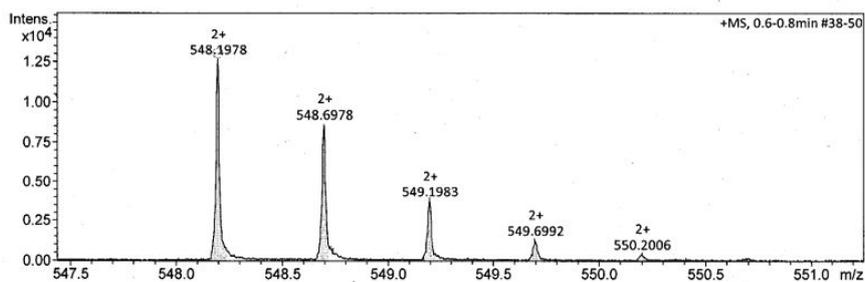


Abbildung 73: HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Short-F-MM.

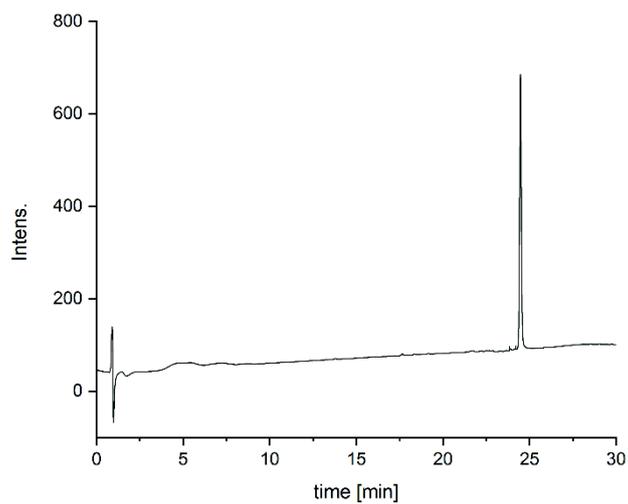


Abbildung 74: RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Short-F-MM.  $t_R = 24,5$  min.

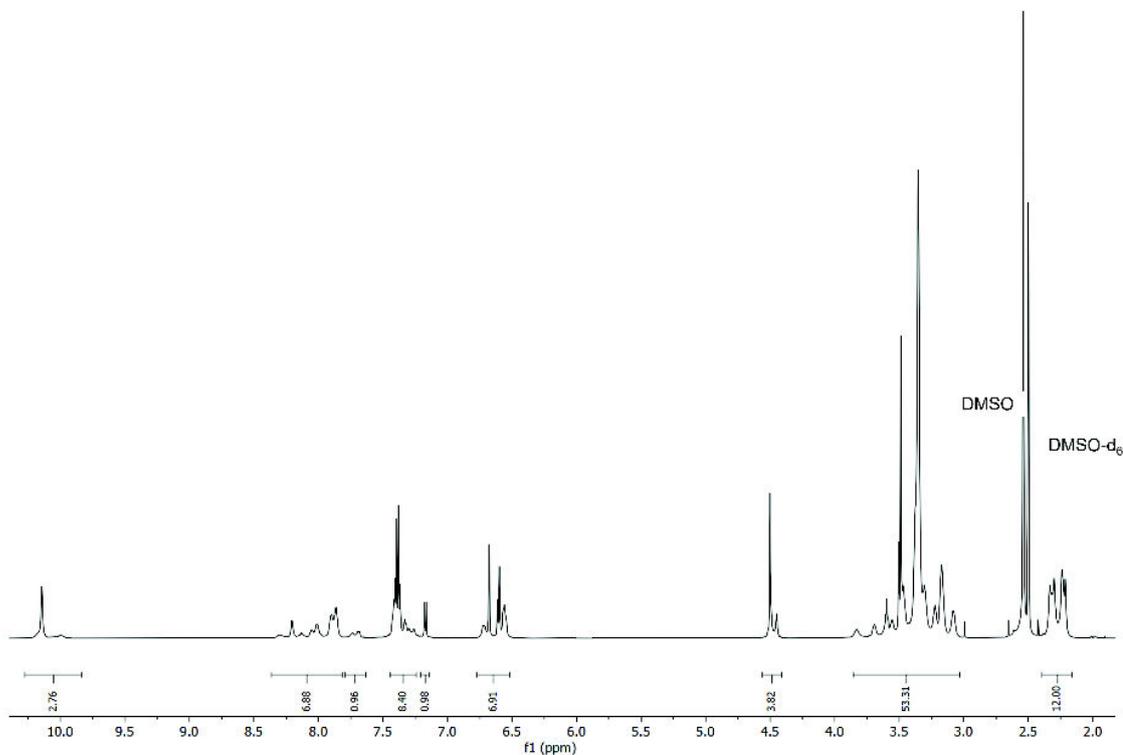


Abbildung 75: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) der Verbindung Medium-F-MM.

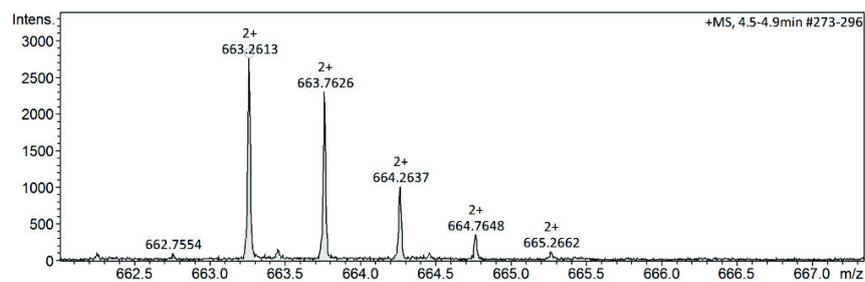


Abbildung 76: HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Medium-F-MM.

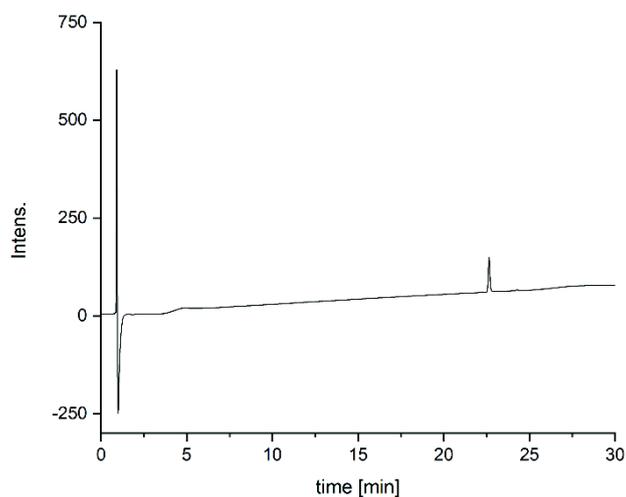


Abbildung 77: RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Medium-F-MM.  $t_R = 22,6$  min.

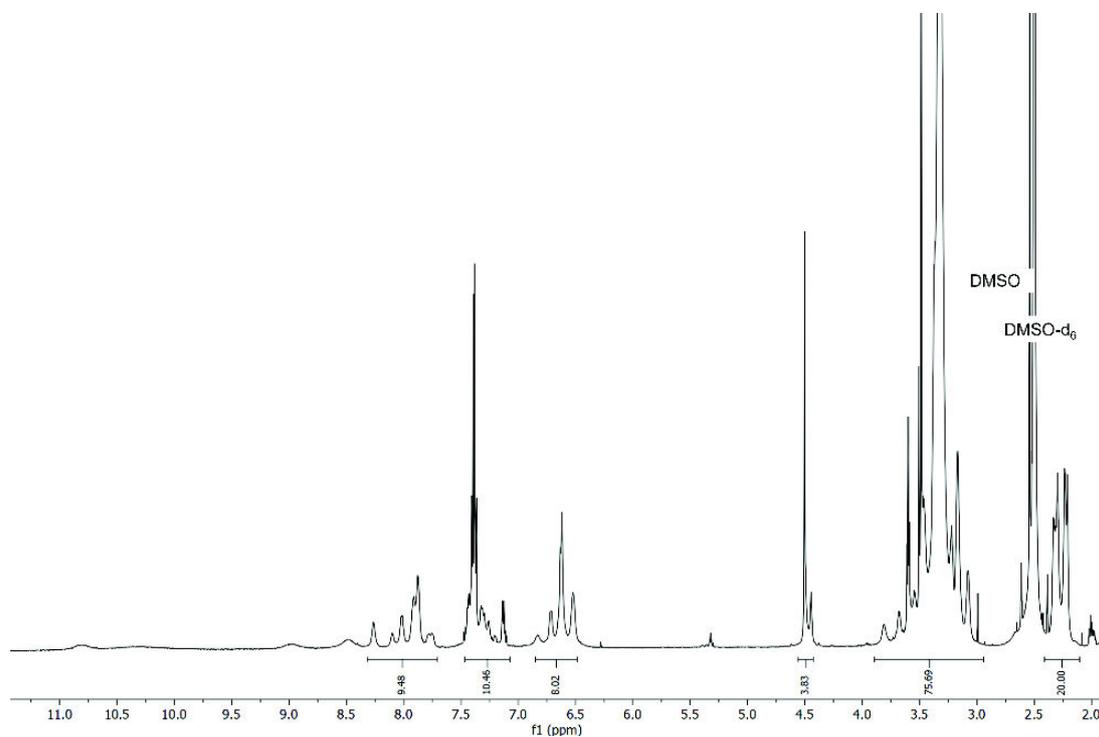


Abbildung 78: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) der Verbindung Long-F-MM.

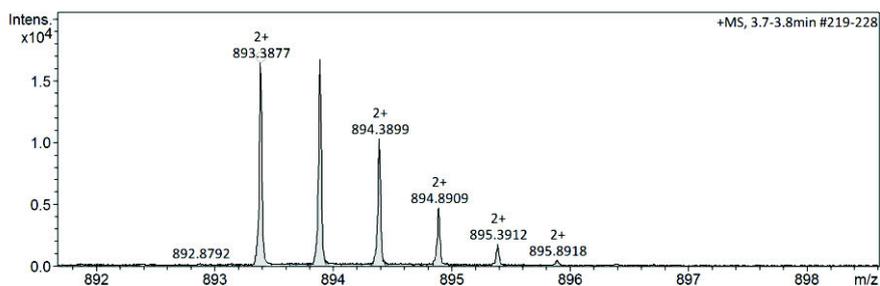


Abbildung 79: HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung Long-F-MM.

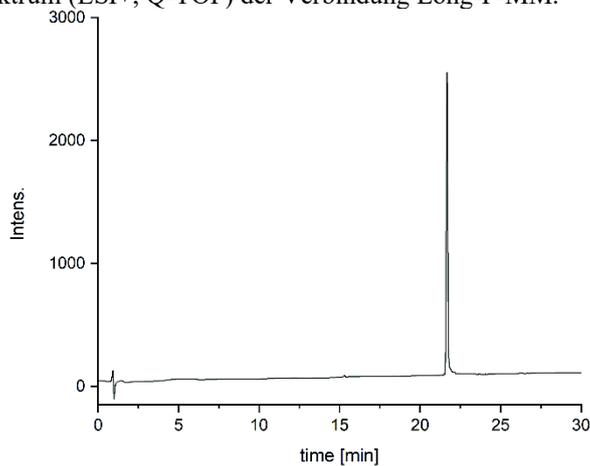


Abbildung 80: RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) der Verbindung Long-F-MM.  $t_R = 21,7$  min.

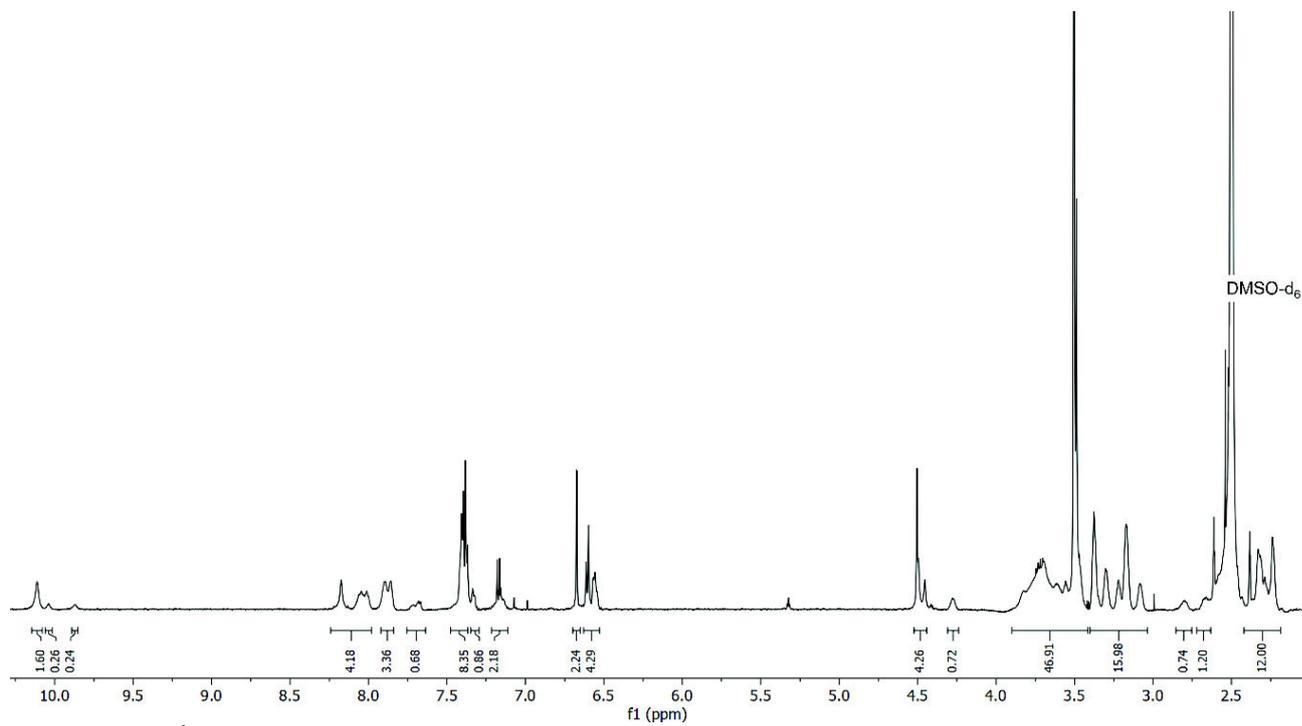


Abbildung 81: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) der Verbindung Cys-Medium-F-MM.

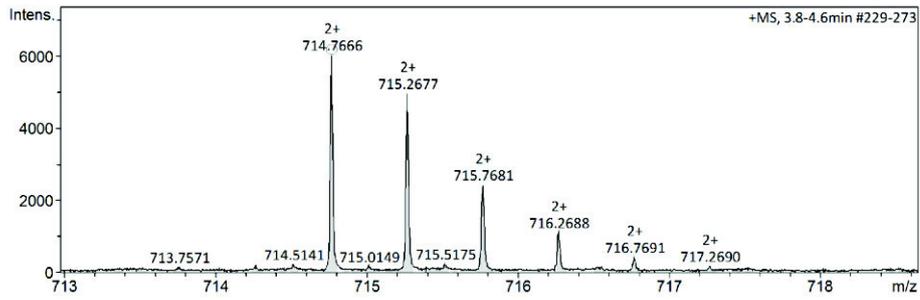


Abbildung 82: HR-MS-Spektrum (ESI+, Q-TOF) der Verbindung cys-Medium-F-MM.

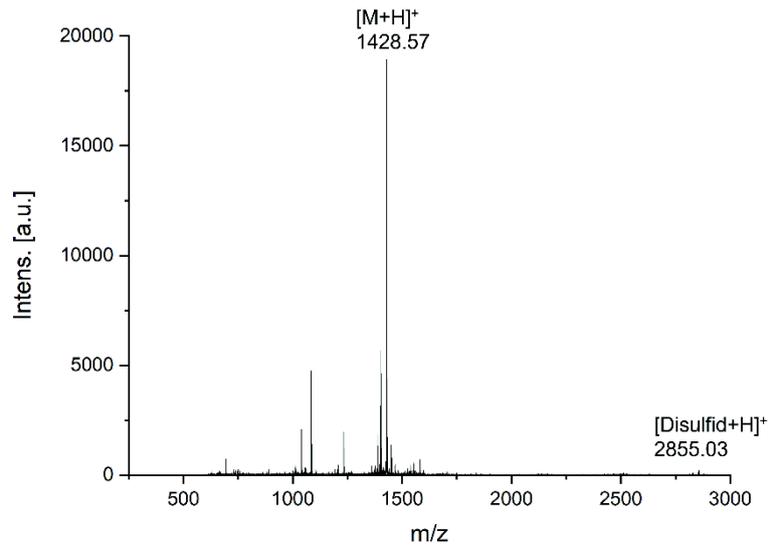


Abbildung 83: MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung cys-Medium-F-MM.

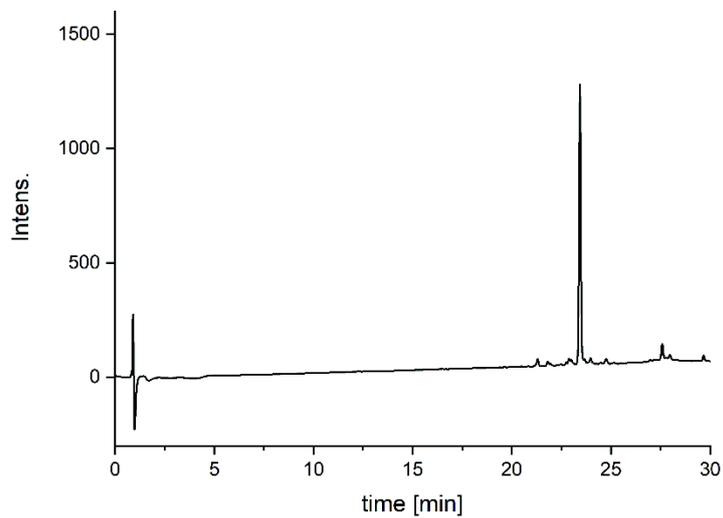


Abbildung 84: RP-HPLC-Chromatogramm (linearer Gradient von 0-50% MeCN in H<sub>2</sub>O in 30 min bei 25 °C) der Verbindung cys-Medium-F-MM.  $t_R = 23,4$  min.

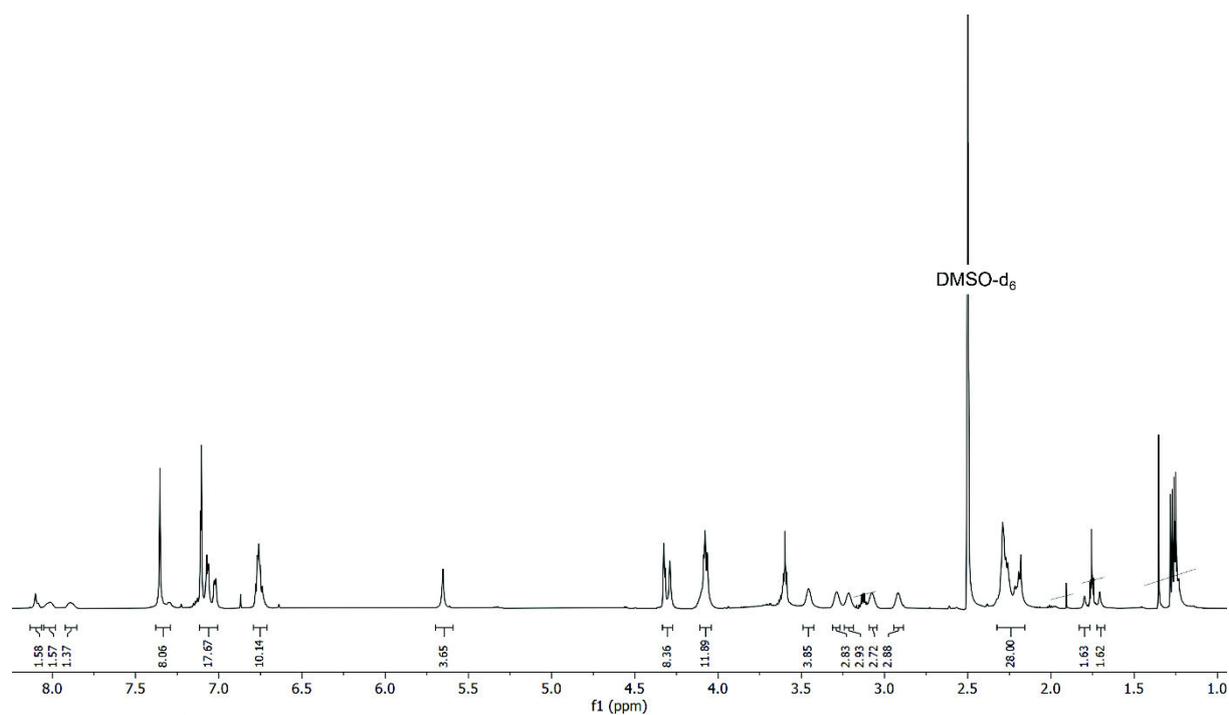


Abbildung 85: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) der Verbindung Short-TM.

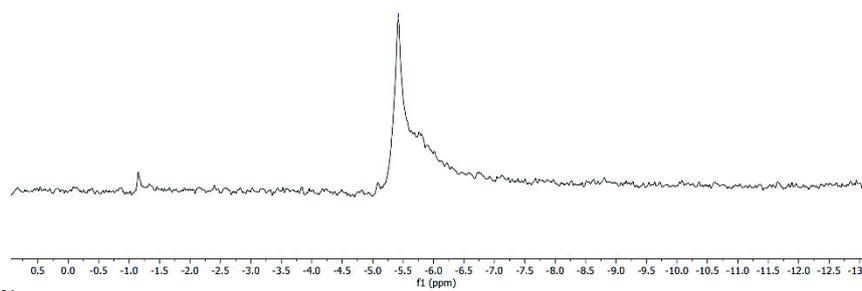


Abbildung 86: <sup>31</sup>P-NMR Spektrum (243 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) der Verbindung Short-TM.

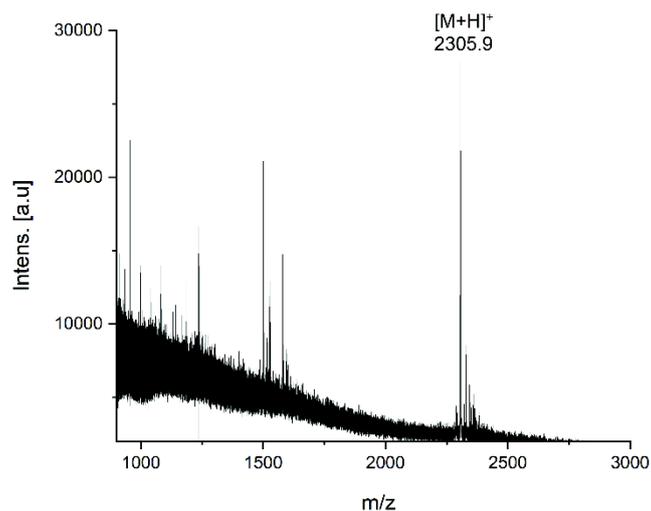


Abbildung 87: MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Short-TM.

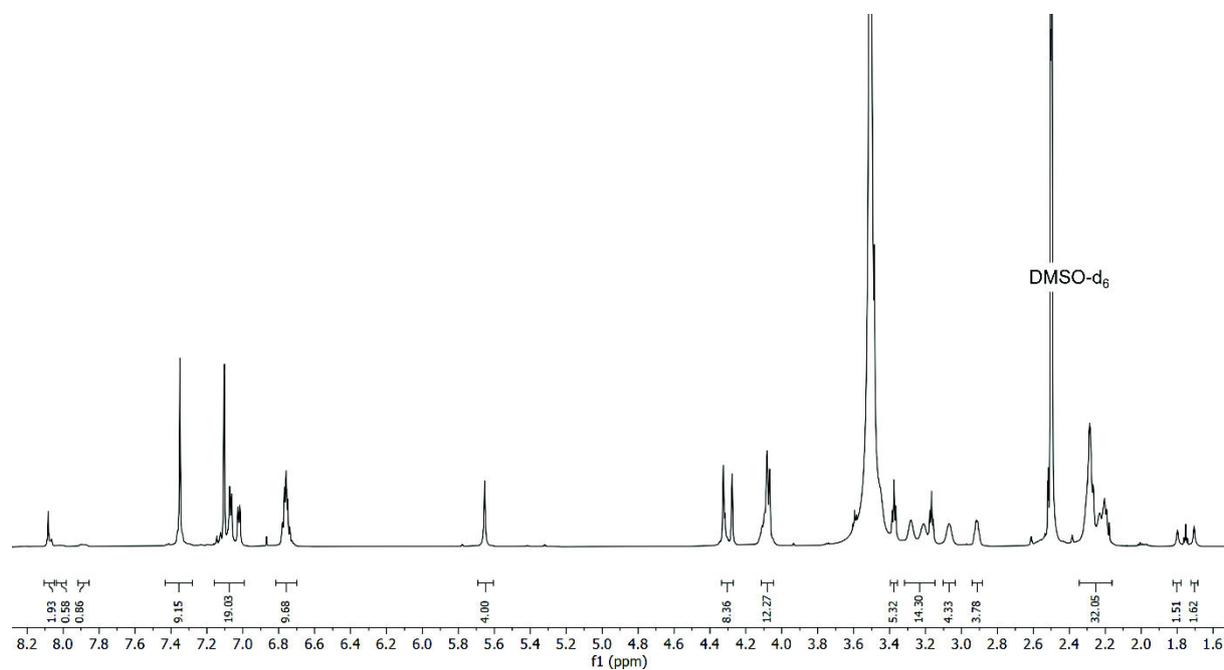


Abbildung 88:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) der Verbindung Medium-TM.

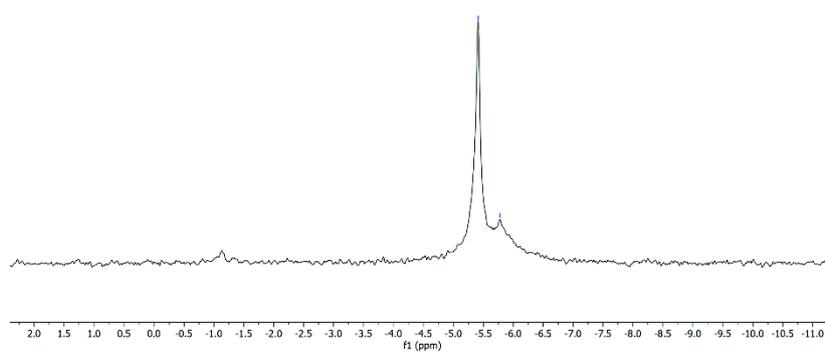


Abbildung 89:  $^{31}\text{P-NMR}$  Spektrum (243 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) der Verbindung Medium-TM.

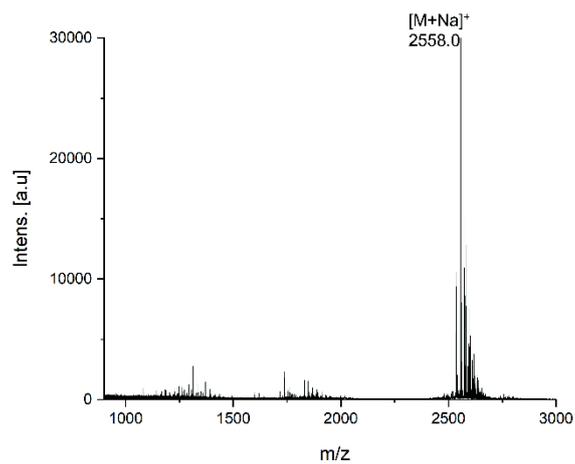


Abbildung 90: MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Medium-TM.

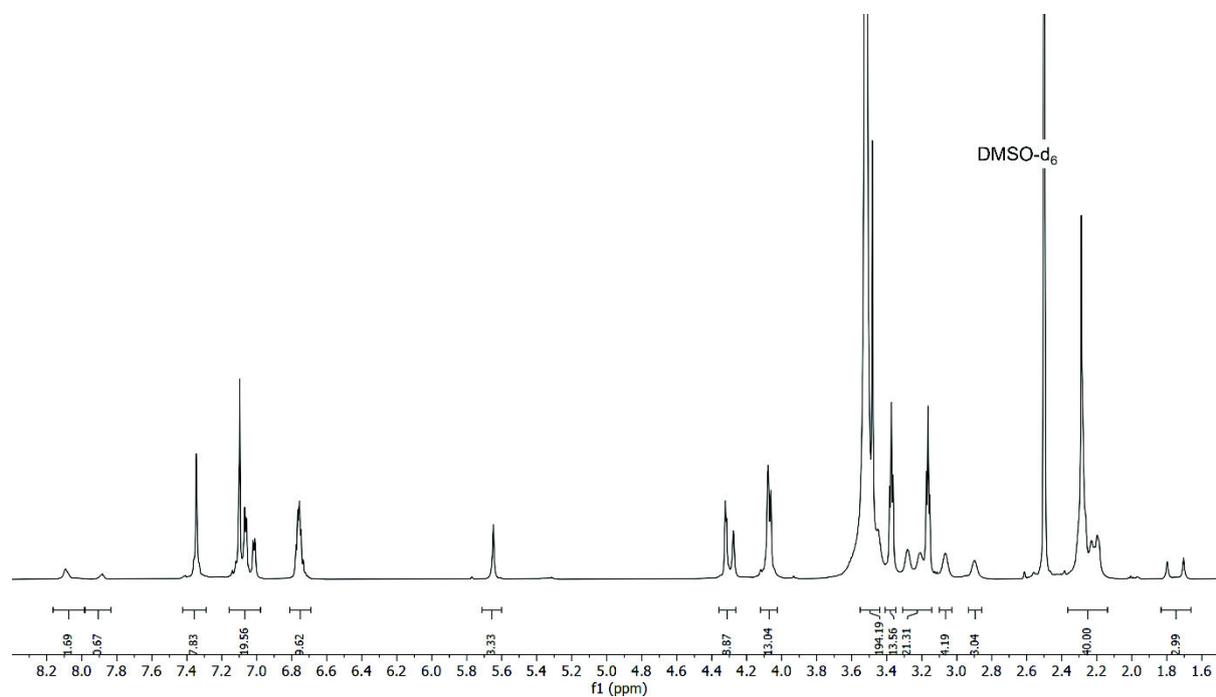


Abbildung 91:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Long-TM.

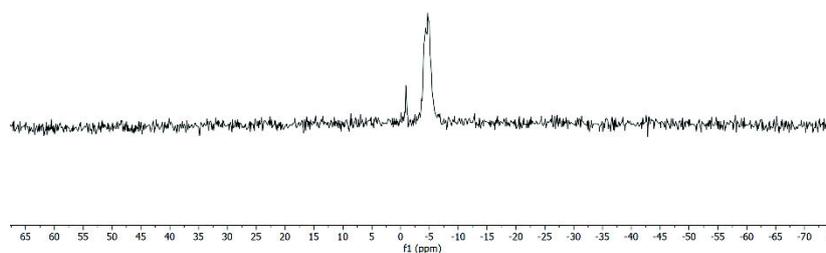


Abbildung 92:  $^{31}\text{P-NMR}$  Spektrum (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Long-TM.

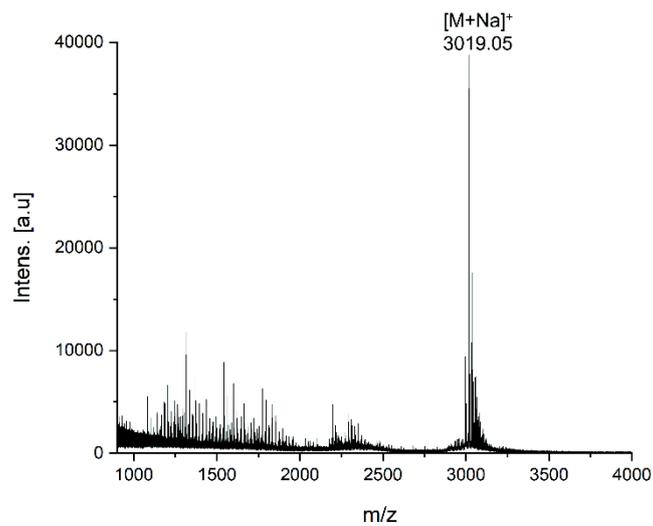


Abbildung 93: MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Long-TM.

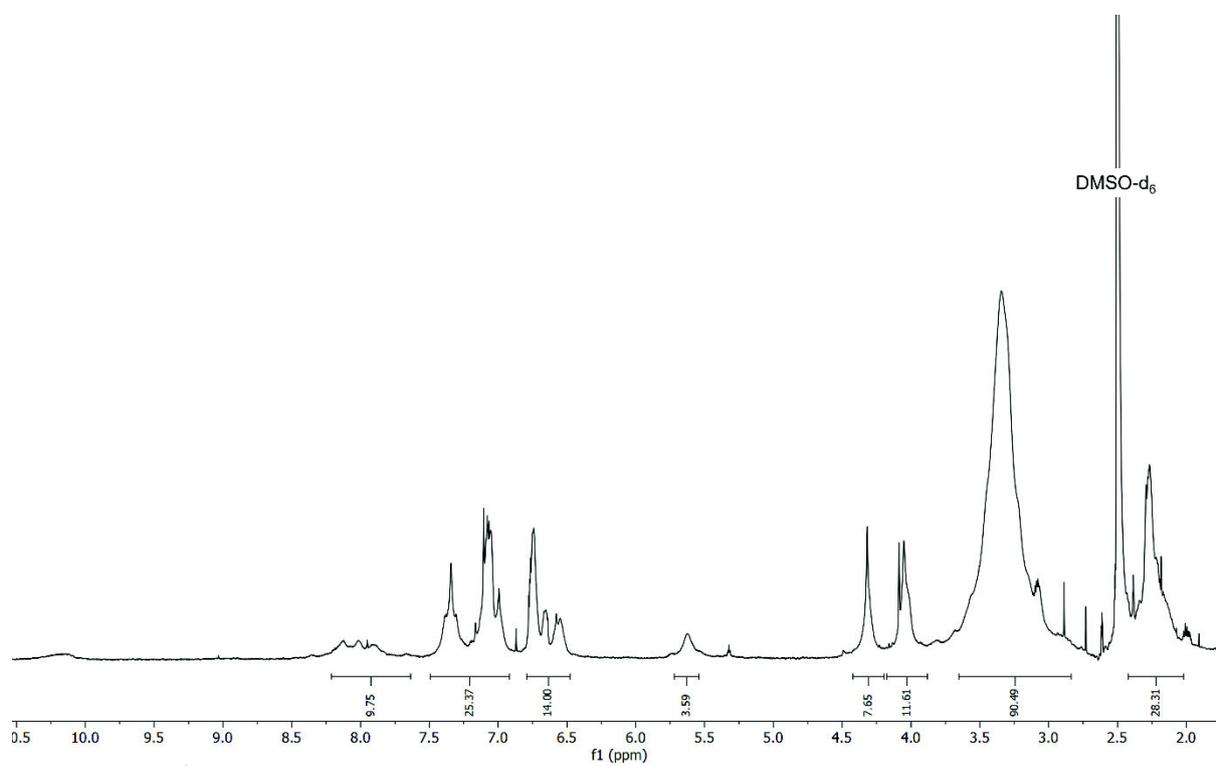


Abbildung 94:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) der Verbindung Short-TM-F.

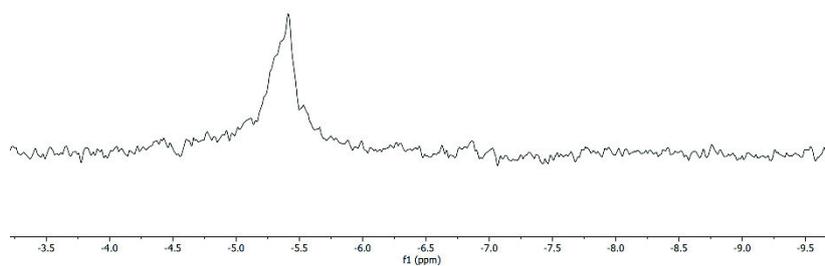


Abbildung 95:  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Short-TM-F.

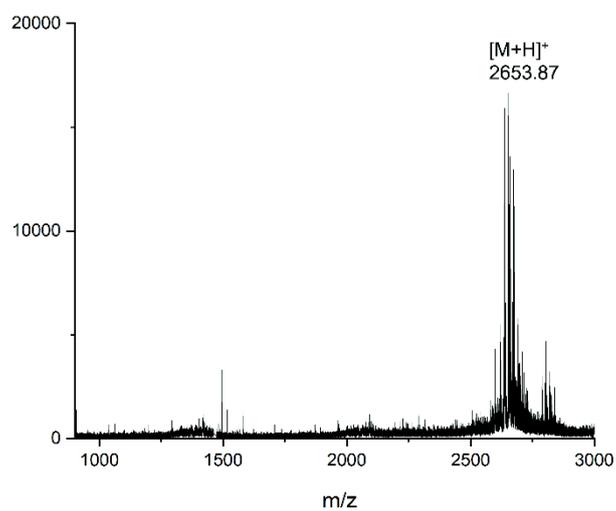


Abbildung 96: MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Short-F-TM.

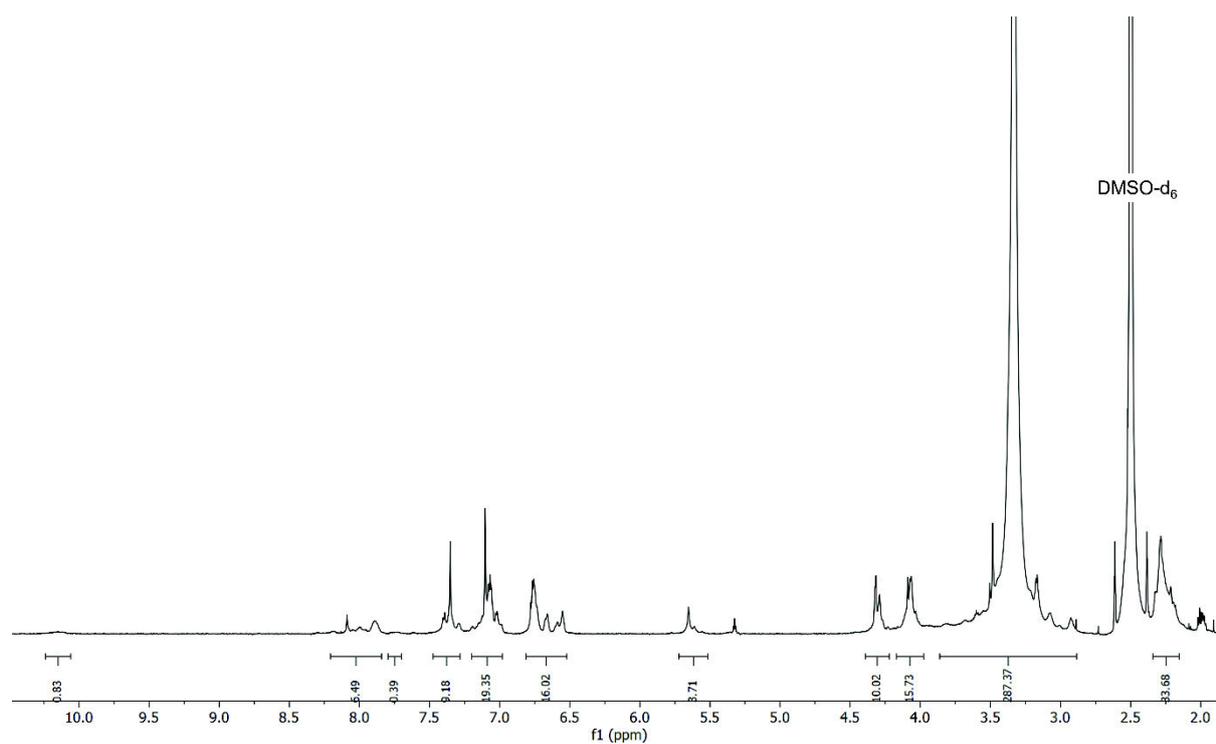


Abbildung 97:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Medium-TM-F.

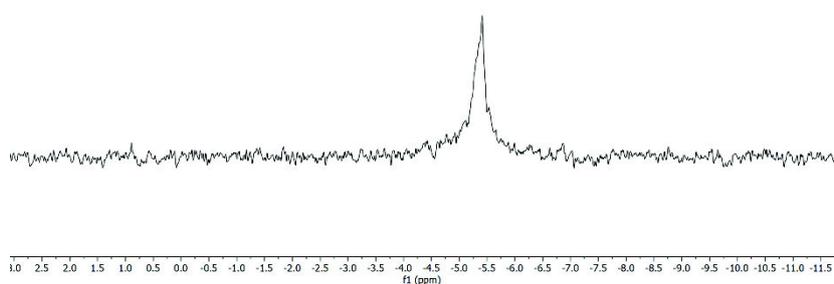
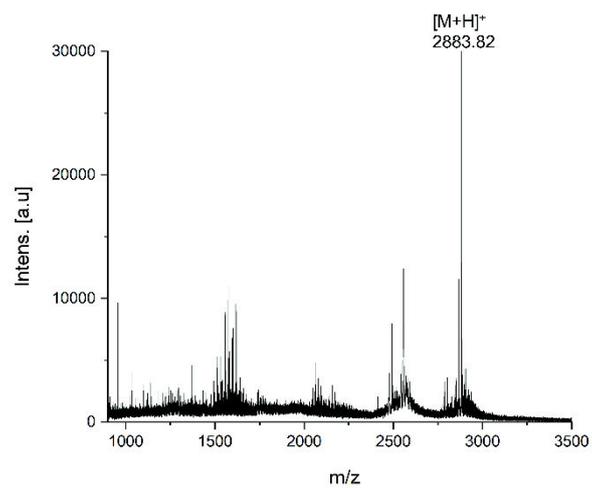


Abbildung 98:  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Medium-TM-F.



**Abbildung 99:** MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Medium-F-TM.

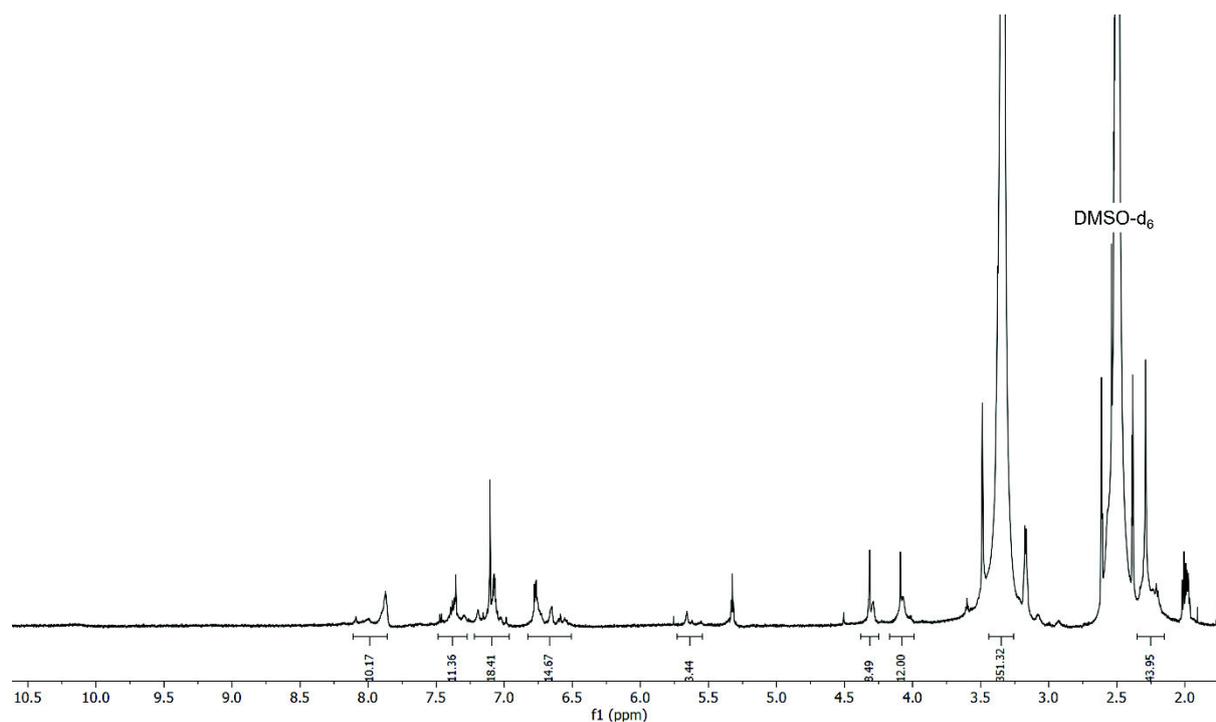


Abbildung 100:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Long-TM-F.

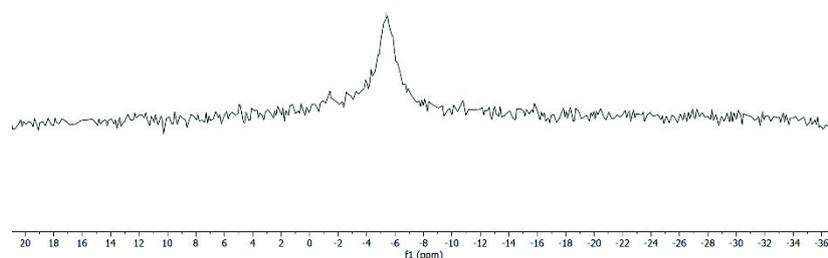


Abbildung 101:  $^{31}\text{P-NMR}$  Spektrum (243 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) der Verbindung Long-TM-F.

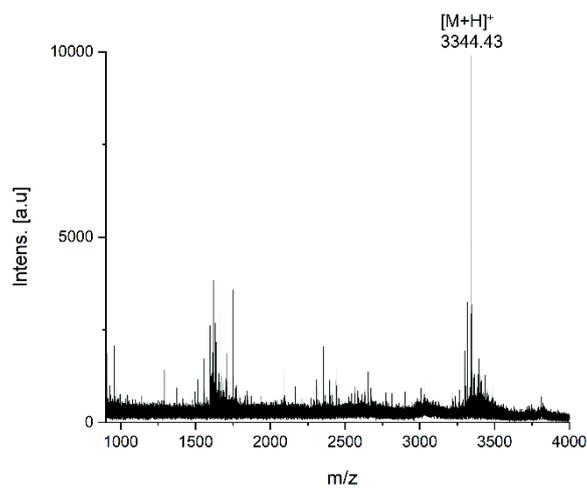


Abbildung 102: MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung Long-F-TM.

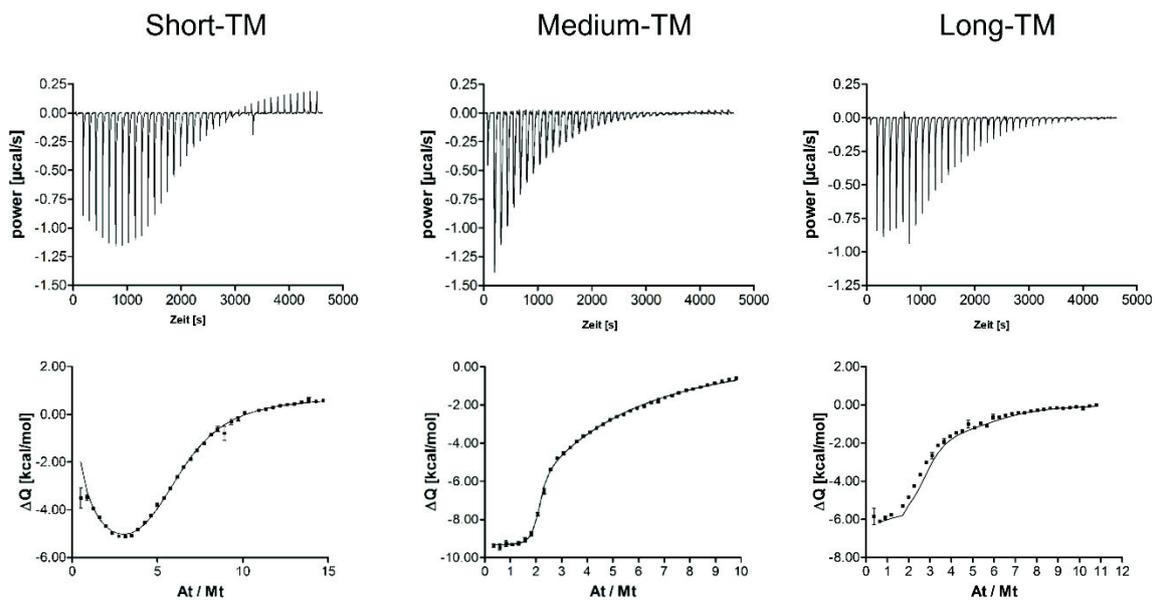
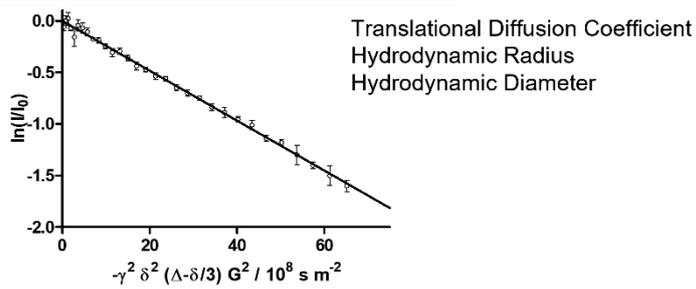
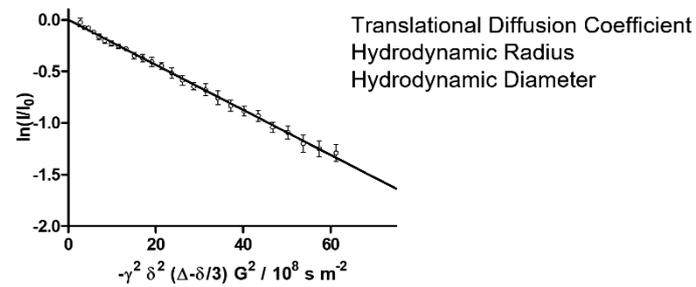


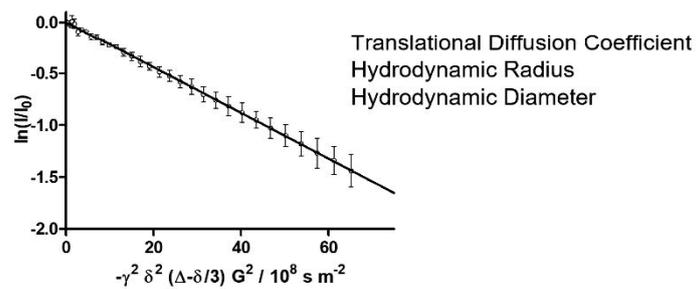
Abbildung 103: Direkte Titration von 60  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{M}$  Survivin zu 200  $\mu\text{L}$  a 400  $\mu\text{M}$  Liganden.

Short-TM  $\ln(I/I_0)$  Durchschnitt

$$D = (2.42 \pm 0.03) 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$$
$$r_H = (1.01 \pm 0.01) 10^{-9} \text{ m}$$
$$d_H = (2.02 \pm 0.03) 10^{-9} \text{ m}$$

Medium-TM  $\ln(I/I_0)$  Durchschnitt

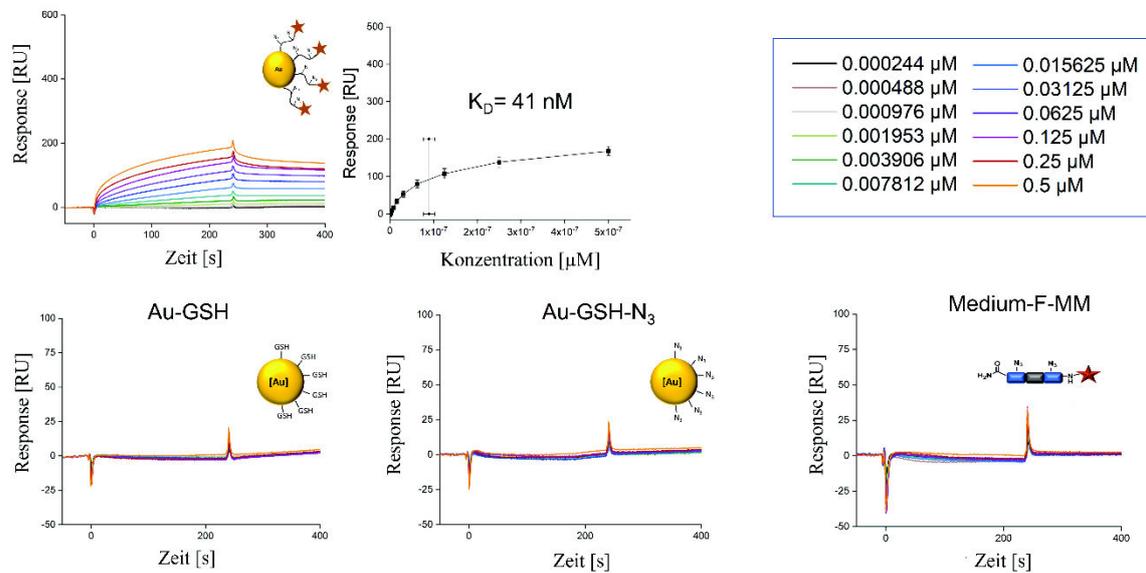
$$D = (2.18 \pm 2.00) 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$$
$$r_H = (1.12 \pm 0.01) 10^{-9} \text{ m}$$
$$d_H = (2.24 \pm 0.02) 10^{-9} \text{ m}$$

Long-TM  $\ln(I/I_0)$  Durchschnitt

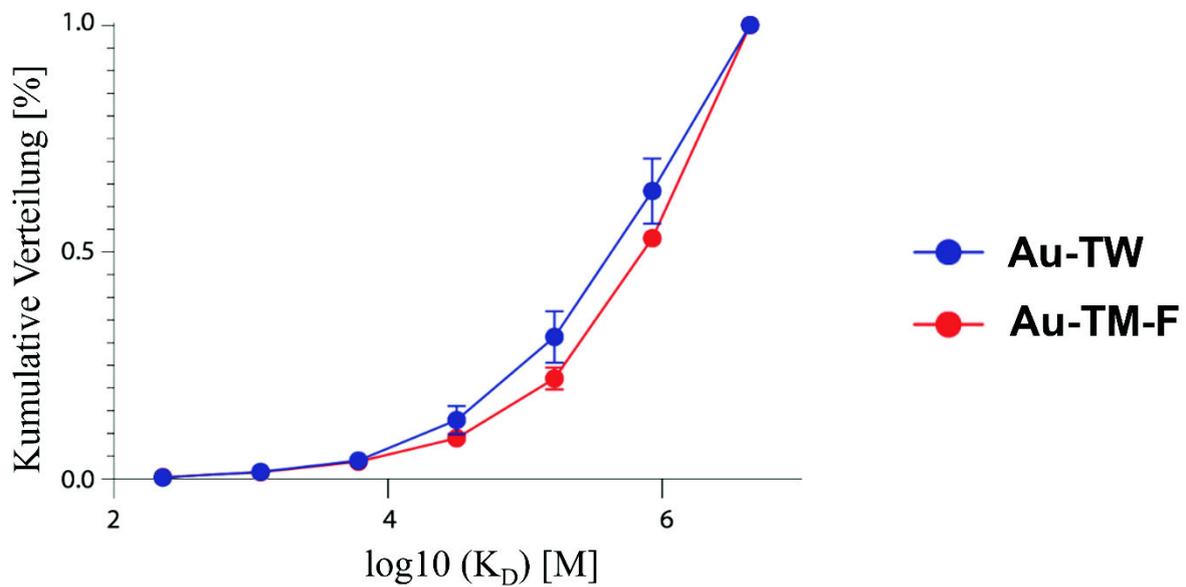
$$D = (2.20 \pm 0.01) 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$$
$$r_H = (1.11 \pm 0.01) 10^{-9} \text{ m}$$
$$d_H = (2.22 \pm 0.01) 10^{-9} \text{ m}$$

**Abbildung 104:** DOSY-NMR Übersicht der divalenten Tweezer-Konjugate Short-TM, Medium-TM und Long-TM sowie deren daraus resultierenden Translationale Diffusions Koeffizienten, Hydrodynamische Radien und

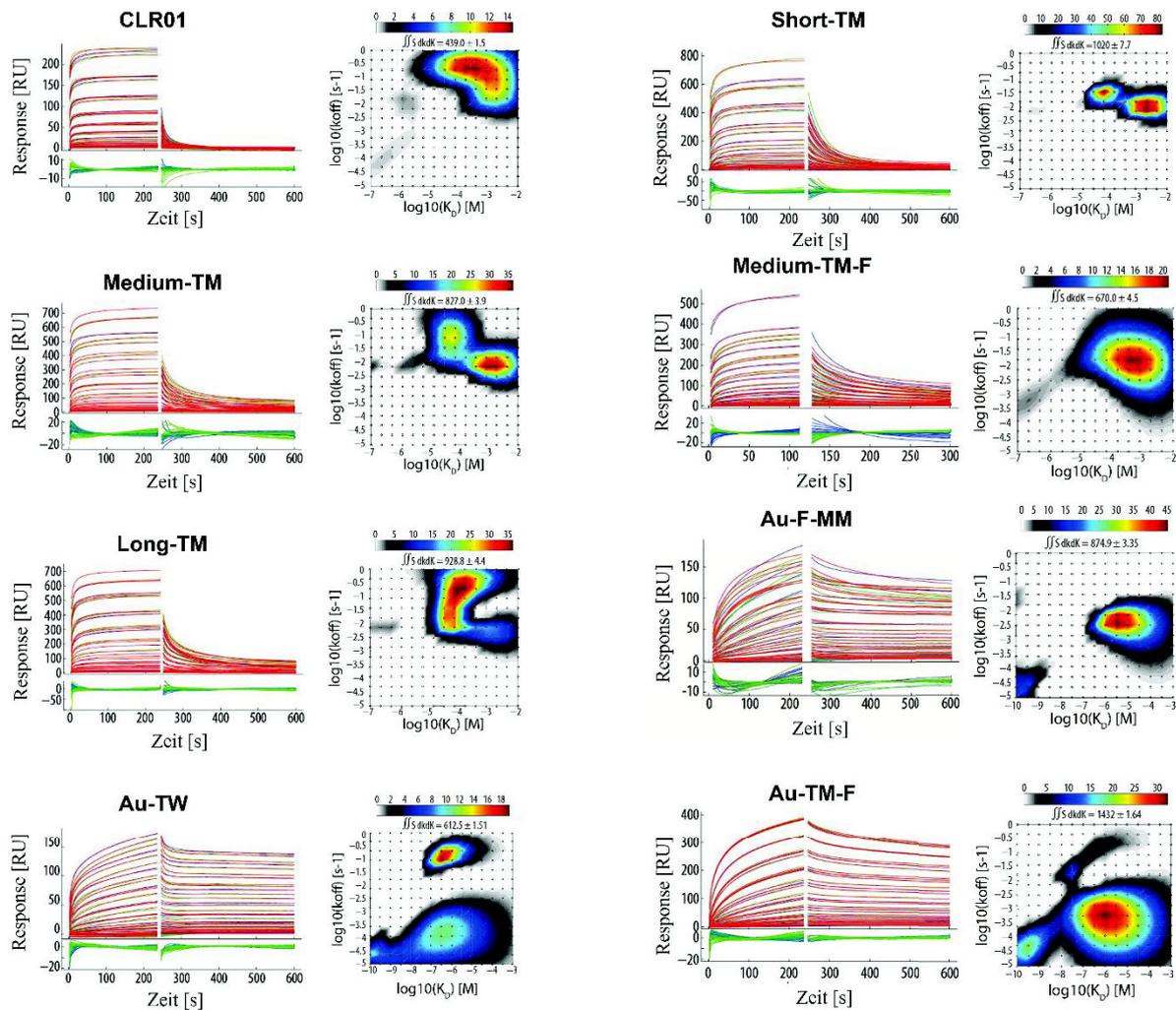
Hydrodynamischen Durchmesser. Die Daten wurden von Dr. Christine Beuck erzeugt und zur Verfügung gestellt.



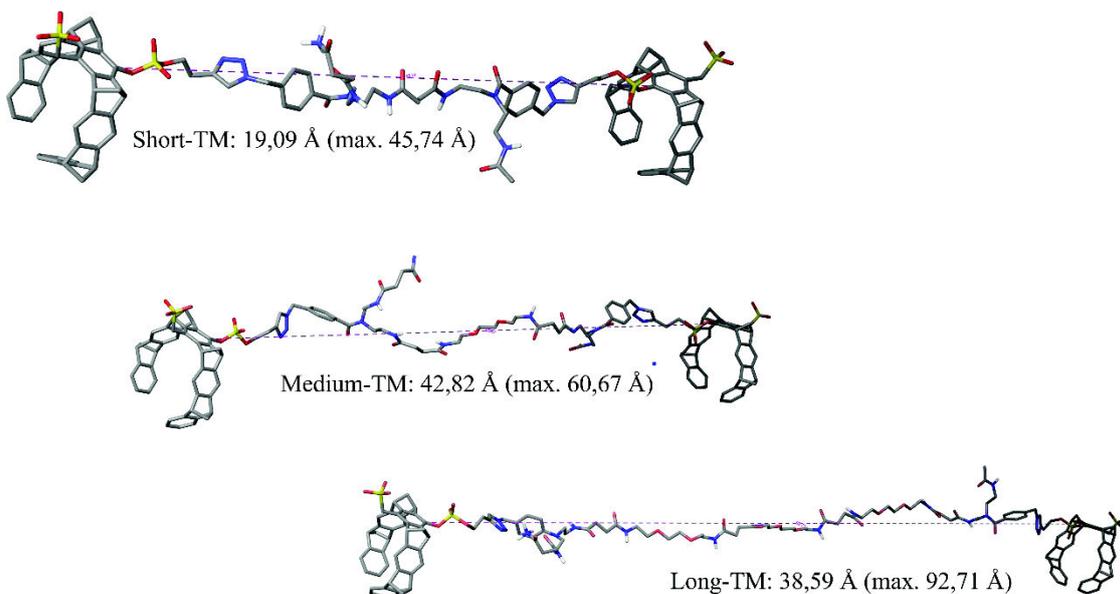
**Abbildung 105:** SPR-Sensogramme für das Bindungsereignis zwischen Au-F-MM, sowie den negativ Kontrollen Au-GSH, Au-GSH-N<sub>3</sub> und Medium-F-MM und immobilisiertem Survivin120. Die Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, und für jede Verbindung ist ein repräsentatives Beispiel abgebildet.



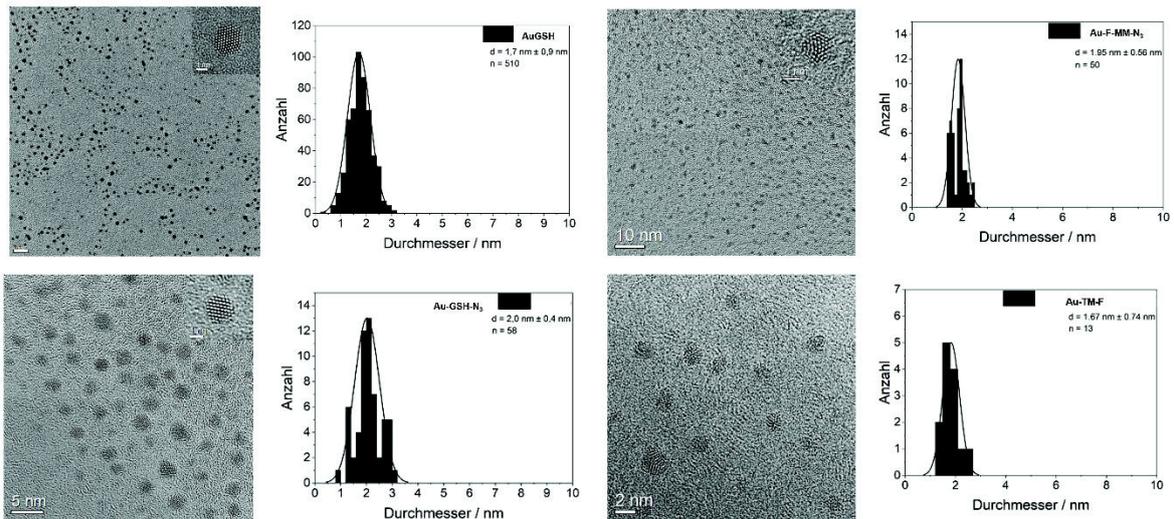
**Abbildung 106:** Die kumulative Verteilung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) wurde aus den 2D-Diagrammen abgeleitet.



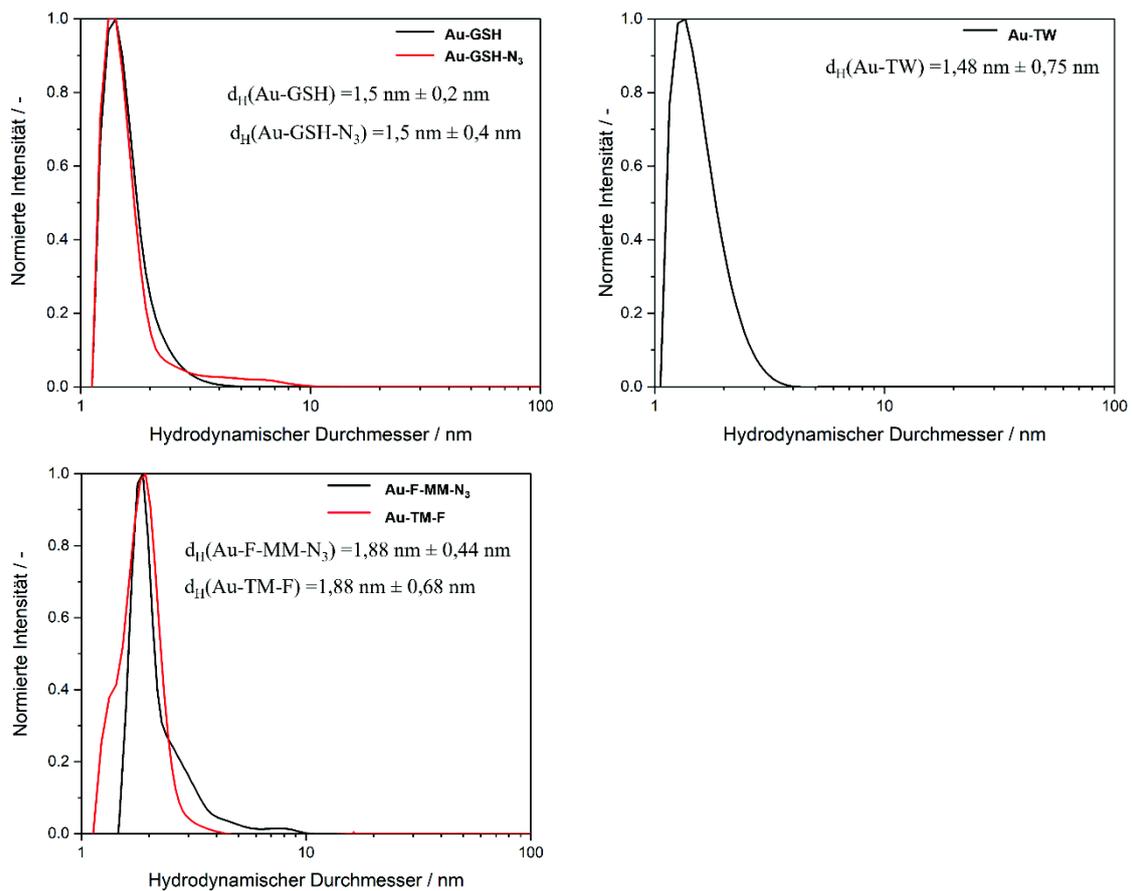
**Abbildung 107:** Direkte SPR-Bindungskurven und EVILFIT-2D-Diagramme für den monovalenten Tweezer (CLR01) und die divalenten Tweezer-Konjugate, sowie Goldnanopartikel – Tweezer Konjugate.



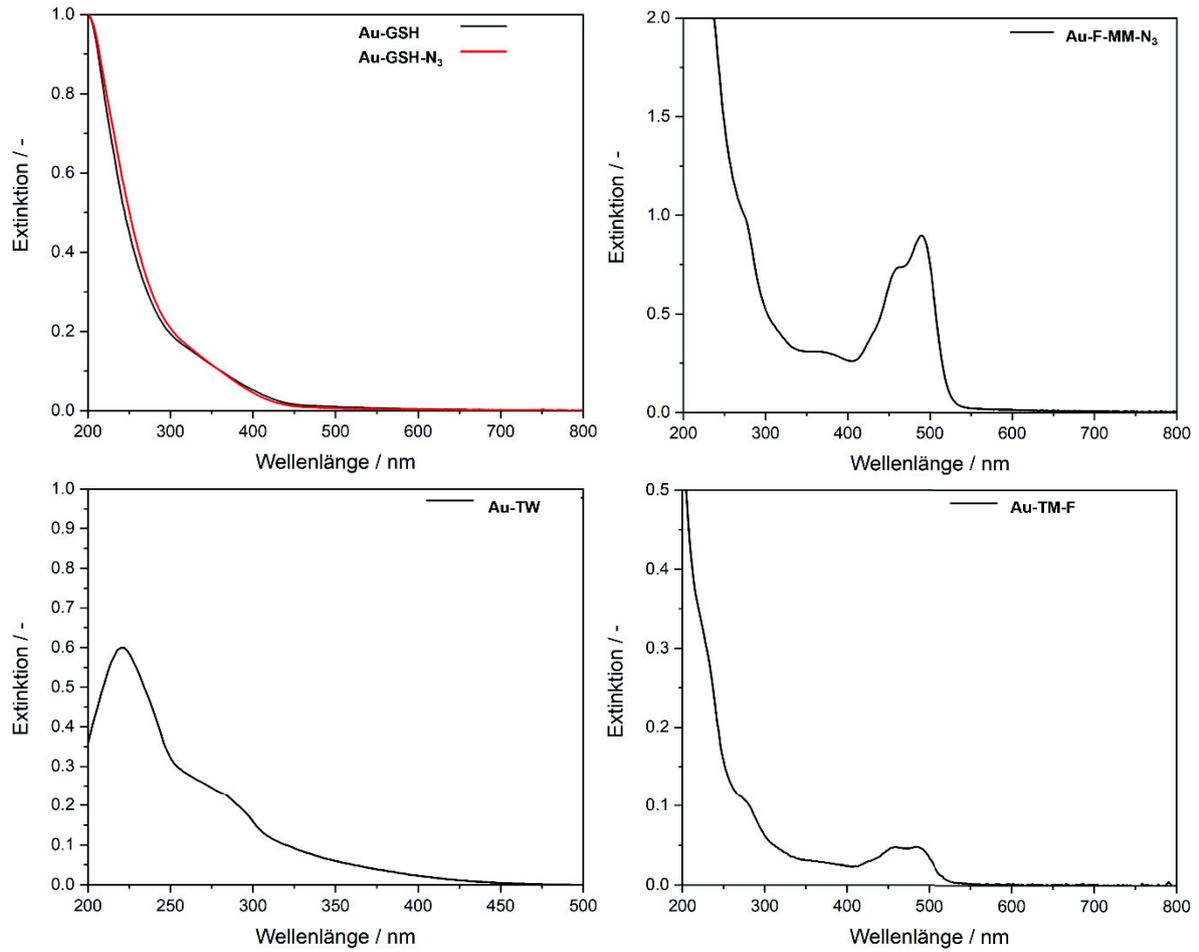
**Abbildung 108:** Übersicht der drei Tweezer-Makromolekülkonstrukte Short-TM, Medium-TM und Long-TM in ihrer jeweils gestreckten Konformation erhalten durch MD Simulation.



**Abbildung 109:** HRTEM-Aufnahmen der ultrakleinen Goldnanopartikel der Verbindungen AuGSH, AuGSH-N<sub>3</sub>, Au-F-MM-N<sub>3</sub> und Au-TM-F. Erstellt von Dr. K. Loza im Forschungszentrum Jülich. Zur Verfügung gestellt durch Dr. Kai Klein.<sup>304</sup>



**Abbildung 110:** Normierte Anzahlverteilung der DCS von ultrakleinen Goldnanopartikeln der Konstrukte AuGSH, AuGSH-N<sub>3</sub>, Au-F-MM-N<sub>3</sub>, Au-TM-F und Au-TW. Zur Verfügung gestellt durch Dr. Kai Klein.<sup>304</sup>



**Abbildung 111:** UV-Vis Spektren der ultrakleinen Goldnanopartikelkonstrukte AuGSH, AuGSH-N<sub>3</sub>, Au-F-MM-N<sub>3</sub>, Au-TM-F und Au-TW. Zur Verfügung gestellt durch Dr. Kai Klein.<sup>304</sup>

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Seiler, T.; Lennartz, A.; Klein, K.; Hommel, K.; Figueroa Bietti, A.; Hadrovic, I.; Kollenda, S.; Sager, J.; Beuck, C.; Chlosta, E.; Bayer, P.; Juul-Madsen, K.; Vorup-Jensen, T.; Schrader, T.; Epple, M.; Knauer, S. K.; Hartmann, L., Potentiating Tweezer Affinity to a Protein Interface with Sequence-Defined Macromolecules on Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2023**, *24* (8), 3666-3679.
2. Kolesnichenko, I. V.; Anslyn, E. V., Practical applications of supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews* **2017**, *46* (9), 2385-2390.
3. Solladié, N.; Nierengarten, J. F., Supramolecular Chemistry: Applications and Prospects. In *Nanomaterials and Nanochemistry*, Bréchnignac, C.; Houdy, P.; Lahmani, M., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; pp 335-345.
4. Lehn, J. M., CRYPTATES: INCLUSION COMPLEXES OF MACROPOLYCYCLIC RECEPTOR MOLECULES. In *Chemistry for the Welfare of Mankind*, Tsuruta, T.; Tamaru, K.; Tamai, Y.; Takahashi, N.; Kitano, Y.; Echigoya, E., Eds. Pergamon: 1979; pp 871-892.
5. Lehn, J.-M., Supramolecular chemistry: Where from? Where to? *Chemical Society Reviews* **2017**, *46* (9), 2378-2379.
6. Remane, H.; Remane, Y., Meilensteine der Chemie. *Nachrichten aus der Chemie* **2019**, *67* (1), 8-19.
7. Ehrlich, P.; Bolduan, C., *Collected studies on immunity / by Professor Paul Ehrlich, privy councilor and director of the Royal institute for experimental therapy, Frankfurt, Germany, and by his collaborators; with several new contributions, including including a chapter written expressly for this edition by Professor Ehrlich; tr. by Dr. Charles Bolduan*. 1st, 1st thousand. ed.; J. Wiley & sons; [etc., etc.]: New York, 1906.
8. Piro, A.; Tagarelli, A.; Tagarelli, G.; Lagonia, P.; Quattrone, A., Paul Ehrlich: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1908. *International Reviews of Immunology* **2008**, *27* (1-2), 1-17.
9. Fischer, E., Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27* (3), 2985-2993.
10. Werner, A., Beitrag zur Konstitution anorganischer Verbindungen. *Zeitschrift für anorganische Chemie* **1893**, *3* (1), 267-330.
11. Wolf, K. L.; Prahm, H.; Harms, H., Über den Ordnungszustand der Moleküle in Flüssigkeiten. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1937**, *36B* (1), 237-287.
12. Wolf, K. L.; Danken, H.; Merkel, K., Über Übermolekülbildung. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1940**, *46B* (1), 287-312.
13. Lehn, J.-M., Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English* **1988**, *27* (1), 89-112.
14. Concepts. In *Supramolecular Chemistry*, 2009; pp 1-48.
15. Pedersen, C. J., Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89* (26), 7017-7036.
16. Pedersen, C. J., The Discovery of Crown Ethers (Noble Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English* **1988**, *27* (8), 1021-1027.
17. Ariga, K., 2.2 - Supermolecules. In *Biomaterials Nanoarchitectonics*, Ebara, M., Ed. William Andrew Publishing: 2016; pp 25-40.
18. Cram, D. J.; Cram, J. M., Host-Guest Chemistry: Complexes between organic compounds simulate the substrate selectivity of enzymes. *Science* **1974**, *183* (4127), 803-809.
19. Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. J., *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*. John Wiley & Sons: 2007.

20. Kyba, E. P.; Helgeson, R. C.; Madan, K.; Gokel, G. W.; Tarnowski, T. L.; Moore, S. S.; Cram, D. J., Host-guest complexation. 1. Concept and illustration. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99* (8), 2564-2571.
21. König, B., Molecular recognition. The principle and recent chemical examples. *Journal für Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung* **1995**, *337* (1), 339-346.
22. Goshe, A. J.; Steele, I. M.; Ceccarelli, C.; Rheingold, A. L.; Bosnich, B., Supramolecular recognition: On the kinetic lability of thermodynamically stable host-guest association complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (8), 4823-4829.
23. Grote, Z.; Scopelliti, R.; Severin, K., Adaptive behavior of dynamic combinatorial libraries generated by assembly of different building blocks. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (32), 3821-3825.
24. Albrecht, M., Supramolecular chemistry—general principles and selected examples from anion recognition and metallosupramolecular chemistry. *Naturwissenschaften* **2007**, *94* (12), 951-966.
25. Zayed, J. M.; Nouvel, N.; Rauwald, U.; Scherman, O. A., Chemical complexity—supramolecular self-assembly of synthetic and biological building blocks in water. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (8), 2806-2816.
26. Lydon, J., The lock and key principle: The state of the art—100 years on: Edited by Jean Paul Behr. pp 325. John Wiley, Chichester. 1994. £ 85 ISBN 0-471-93902-1. Wiley Online Library: 1995.
27. Lavigne, J. J.; Anslyn, E. V., Sensing A Paradigm Shift in the Field of Molecular Recognition: From Selective to Differential Receptors. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (17), 3118-3130.
28. Eckel, R.; Ros, R.; Decker, B.; Mattay, J.; Anselmetti, D., Supramolecular Chemistry at the Single-Molecule Level. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (3), 484-488.
29. Jean-Marie, L., Supramolecular chemistry: from molecular information towards self-organization and complex matter\*. *Reports on Progress in Physics* **2004**, *67* (3), 249.
30. Lehn, J.-M., Perspectives in Supramolecular Chemistry—From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1990**, *29* (11), 1304-1319.
31. Powell, H. M., 15. The structure of molecular compounds. Part IV. Clathrate compounds. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1948**, (0), 61-73.
32. Powell, H. M.; Rayner, J. H., Clathrate Compound Formed by Benzene with an Ammonia-Nickel Cyanide Complex. *Nature* **1949**, *163* (4145), 566-567.
33. Philp, D.; Stoddart, J. F., Self-Assembly in Natural and Unnatural Systems. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, *35* (11), 1154-1196.
34. Lawrence, D. S.; Jiang, T.; Levett, M., Self-assembling supramolecular complexes. *Chemical Reviews* **1995**, *95* (6), 2229-2260.
35. Hamacek, J.; Borkovec, M.; Piguet, C., A Simple Thermodynamic Model for Quantitatively Addressing Cooperativity in Multicomponent Self-Assembly Processes—Part 2: Extension to Multimetallic Helicates Possessing Different Binding Sites. *Chemistry—A European Journal* **2005**, *11* (18), 5227-5237.
36. Lindsey, J. S., Self-assembly in synthetic routes to molecular devices. Biological principles and chemical perspectives: a review. *New journal of chemistry (1987)* **1991**, *15* (2-3), 153-180.
37. McLaughlin, C. K.; Hamblin, G. D.; Sleiman, H. F., Supramolecular DNA assembly. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (12), 5647-5656.

38. Surin, M.; Ulrich, S., From Interaction to Function in DNA-Templated Supramolecular Self-Assemblies. *ChemistryOpen* **2020**, *9* (4), 480-498.
39. Peczu, M. W.; Hamilton, A. D., Peptide and Protein Recognition by Designed Molecules. *Chemical Reviews* **2000**, *100* (7), 2479-2494.
40. Viswanathan, R.; Fajardo, E.; Steinberg, G.; Haller, M.; Fiser, A., Protein-protein binding supersites. *PLoS Comput Biol* **2019**, *15* (1), e1006704.
41. Wells, J. A.; McClendon, C. L., Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **2007**, *450* (7172), 1001-1009.
42. Chakrabarti, P.; Janin, J., Dissecting protein-protein recognition sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2002**, *47* (3), 334-343.
43. Guo, W.; Wisniewski, J. A.; Ji, H., Hot spot-based design of small-molecule inhibitors for protein-protein interactions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (11), 2546-2554.
44. Moreira, I. S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J., Hot spots—A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2007**, *68* (4), 803-812.
45. Clackson, T.; Wells, J. A., A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **1995**, *267* (5196), 383-386.
46. Bogan, A. A.; Thorn, K. S., Anatomy of hot spots in protein interfaces<sup>11</sup>Edited by J. Wells. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *280* (1), 1-9.
47. Yugandhar, K.; Gromiha, M. M., Protein-protein binding affinity prediction from amino acid sequence. *Bioinformatics* **2014**, *30* (24), 3583-3589.
48. Keskin, O.; Tuncbag, N.; Gursoy, A., Predicting protein-protein interactions from the molecular to the proteome level. *Chemical reviews* **2016**, *116* (8), 4884-4909.
49. Cukuroglu, E.; Engin, H. B.; Gursoy, A.; Keskin, O., Hot spots in protein-protein interfaces: Towards drug discovery. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2014**, *116* (2), 165-173.
50. Kar, G.; Kuzu, G.; Keskin, O.; Gursoy, A., Protein-protein interfaces integrated into interaction networks: implications on drug design. *Curr Pharm Des* **2012**, *18* (30), 4697-705.
51. Milroy, L.-G.; Grossmann, T. N.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C., Modulators of Protein-Protein Interactions. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (9), 4695-4748.
52. Kubota, R.; Hamachi, I., Protein recognition using synthetic small-molecular binders toward optical protein sensing in vitro and in live cells. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (13), 4454-4471.
53. Lee, C. C.; Maestre-Reyna, M.; Hsu, K. C.; Wang, H. C.; Liu, C. I.; Jeng, W. Y.; Lin, L. L.; Wood, R.; Chou, C. C.; Yang, J. M., Crowning proteins: modulating the protein surface properties using crown ethers. *Angewandte Chemie* **2014**, *126* (48), 13270-13274.
54. Crowley, P. B.; Ganji, P.; Ibrahim, H., Protein surface recognition: structural characterisation of cytochrome c-porphyrin complexes. *ChemBioChem* **2008**, *9* (7), 1029-1033.
55. Aachmann, F. L.; Otzen, D.; Larsen, K. L.; Wimmer, R., Structural background of cyclodextrin-protein interactions. *Protein Engineering* **2003**, *16* (12), 905-912.
56. Hou, C.; Huang, Z.; Fang, Y.; Liu, J., Construction of protein assemblies by host-guest interactions with cucurbiturils. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15* (20), 4272-4281.
57. Zadmand, R.; Alavijeh, N. S., Protein surface recognition by calixarenes. *RSC Advances* **2014**, *4* (78), 41529-41542.

58. Schrader, T.; Bitan, G.; Klärner, F.-G., Molecular tweezers for lysine and arginine—powerful inhibitors of pathologic protein aggregation. *Chemical communications* **2016**, 52 (76), 11318-11334.
59. van Dun, S.; Ottmann, C.; Milroy, L.-G.; Brunsveld, L., Supramolecular Chemistry Targeting Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, 139 (40), 13960-13968.
60. Chen, C. W.; Whitlock, H. W., Jr., Molecular tweezers: a simple model of bifunctional intercalation. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, 100 (15), 4921-4922.
61. Hardouin-Lerouge, M.; Hudhomme, P.; Sallé, M., Molecular clips and tweezers hosting neutral guests. *Chemical Society Reviews* **2011**, 40 (1), 30-43.
62. Harmata, M., Chiral Molecular Tweezers. *Accounts of Chemical Research* **2004**, 37 (11), 862-873.
63. Leblond, J.; Petitjean, A., Molecular Tweezers: Concepts and Applications. *ChemPhysChem* **2011**, 12 (6), 1043-1051.
64. Zimmerman, S. C., Rigid molecular tweezers as hosts for the complexation of neutral guests. In *Supramolecular Chemistry I — Directed Synthesis and Molecular Recognition*, Canceill, J.; Chambron, J. C.; Collet, A.; Dietrich-Buchecker, C.; Durst, H. D.; Dutasta, J. P.; Kohnke, F. H.; Lozach, B.; Mathias, J. P.; Misumi, S.; Sauvage, J. P.; Stoddart, J. F.; Tomalia, D. A.; Zimmerman, S. C., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1993; pp 71-102.
65. Rowan, A. E.; Elemans, J. A. A. W.; Nolte, R. J. M., Molecular and Supramolecular Objects from Glycoluril. *Accounts of Chemical Research* **1999**, 32 (12), 995-1006.
66. Klärner, F.-G.; Kahlert, B., Molecular Tweezers and Clips as Synthetic Receptors. Molecular Recognition and Dynamics in Receptor-Substrate Complexes. *Accounts of Chemical Research* **2003**, 36 (12), 919-932.
67. Pérez, E. M.; Martín, N., Molecular tweezers for fullerenes. **2010**, 82 (3), 523-533.
68. Feringa, B. L., In control of motion: from molecular switches to molecular motors. *Accounts of chemical research* **2001**, 34 (6), 504-513.
69. Klärner, F.-G.; Benkhoff, J.; Boese, R.; Burkert, U.; Kamieth, M.; Naatz, U., Molecular Tweezers as Synthetic Receptors in Host-Guest Chemistry: Inclusion of Cyclohexane and Self-Assembly of Aliphatic Side Chains. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, 35 (10), 1130-1133.
70. Kamieth, M.; Klärner, F.-G., Molecular tweezers as synthetic receptors: molecular recognition of cationic substrates; an insight into the mechanism of complexation. *Journal für praktische Chemie* **1999**, 341 (3), 245-251.
71. Fokkens, M.; Schrader, T.; Klärner, F.-G., A molecular tweezer for lysine and arginine. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (41), 14415-14421.
72. Dutt, S.; Wilch, C.; Gersthagen, T.; Talbiersky, P.; Bravo-Rodriguez, K.; Hanni, M.; Sánchez-García, E.; Ochsenfeld, C.; Klärner, F.-G.; Schrader, T., Molecular Tweezers with Varying Anions: A Comparative Study. *The Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78 (13), 6721-6734.
73. Heid, C.; Sowislok, A.; Schaller, T.; Niemeyer, F.; Klärner, F.-G.; Schrader, T., Molecular Tweezers with Additional Recognition Sites. *Chemistry – A European Journal* **2018**, 24 (44), 11332-11343.
74. Meiners, A.; Bäcker, S.; Hadrović, I.; Heid, C.; Beuck, C.; Ruiz-Blanco, Y. B.; Mieres-Perez, J.; Pörschke, M.; Grad, J.-N.; Vallet, C., Specific inhibition of the Survivin-CRM1 interaction by peptide-modified molecular tweezers. *Nature communications* **2021**, 12 (1), 1-13.

75. Badjić, J. D.; Cantrill, S. J.; Grubbs, R. H.; Guidry, E. N.; Orenes, R.; Stoddart, J. F., The exclusivity of multivalency in dynamic covalent processes. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (25), 3273-3278.
76. Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M., Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37* (20), 2754-2794.
77. Cloninger, M. J.; Bilgiçer, B.; Li, L.; Mangold, S. L.; Phillips, S. T.; Wolfenden, M. L., Multivalency. In *Supramolecular Chemistry*, 2012.
78. Li, Y.; Wang, Y.; Huang, G.; Gao, J., Cooperativity Principles in Self-Assembled Nanomedicine. *Chem Rev* **2018**, *118* (11), 5359-5391.
79. Zumbro, E.; Alexander-Katz, A., Influence of Binding Site Affinity Patterns on Binding of Multivalent Polymers. *ACS Omega* **2020**, *5* (19), 10774-10781.
80. Lallemand, M.; Yu, L.; Cai, W.; Rischka, K.; Hartwig, A.; Haag, R.; Hugel, T.; Balzer, B. N., Multivalent non-covalent interactions lead to strongest polymer adhesion. *Nanoscale* **2022**, *14* (10), 3768-3776.
81. Guo, J.; Tian, C.; Xu, B., Biomaterials based on noncovalent interactions of small molecules. *Excli j* **2020**, *19*, 1124-1140.
82. Fasting, C.; Schalley, C. A.; Weber, M.; Seitz, O.; Hecht, S.; Koksche, B.; Dornedde, J.; Graf, C.; Knapp, E.-W.; Haag, R., Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (42), 10472-10498.
83. Ashwell, G.; Morell, A. G., The Role of Surface Carbohydrates in the Hepatic Recognition and Transport of Circulating Glycoproteins. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1974; pp 99-128.
84. Lee, R. T.; Lee, Y. C., Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconjugate Journal* **2000**, *17* (7), 543-551.
85. Schwarzenbach, v. G., Der chelateffekt. *Helvetica Chimica Acta* **1952**, *35* (7), 2344-2359.
86. Pieters, R. J., Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions. *Organic & biomolecular chemistry* **2009**, *7* (10), 2013-2025.
87. Chittasupho, C., Multivalent Ligand: Design Principle for Targeted Therapeutic Delivery Approach. *Therapeutic Delivery* **2012**, *3* (10), 1171-1187.
88. Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L., Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (50), 14922-14933.
89. Lundquist, J. J.; Toone, E. J., The Cluster Glycoside Effect. *Chemical Reviews* **2002**, *102* (2), 555-578.
90. Kiessling, L. L.; Young, T.; Gruber, T. D.; Mortell, K. H., Multivalency in Protein-Carbohydrate Recognition. In *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 2483-2523.
91. Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3* (2), 97-130.
92. Kitov, P. I.; Sadowska, J. M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Bundle, D. R., Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature* **2000**, *403* (6770), 669-672.
93. Kiessling, L. L.; Strong, L. E.; Gestwicki, J. E., Chapter 29. Principles for multivalent ligand design. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Academic Press: 2000; Vol. 35, pp 321-330.
94. Bhatia, S.; Ziem, B.; Haag, R., Blocking Pathogens by Multivalent Inhibitors. In *Multivalency*, 2018; pp 205-228.

95. Krishnamurthy, V. M.; Semetey, V.; Bracher, P. J.; Shen, N.; Whitesides, G. M., Dependence of Effective Molarity on Linker Length for an Intramolecular Protein–Ligand System. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (5), 1312-1320.
96. Kane, R. S., Thermodynamics of multivalent interactions: influence of the linker. *Langmuir* **2010**, *26* (11), 8636-40.
97. Martos, V.; Castreño, P.; Valero, J.; de Mendoza, J., Binding to protein surfaces by supramolecular multivalent scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12* (6), 698-706.
98. Templeton, A. C.; Wuelfing, W. P.; Murray, R. W., Monolayer-Protected Cluster Molecules. *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33* (1), 27-36.
99. Drechsler, U.; Erdogan, B.; Rotello, V. M., Nanoparticles: Scaffolds for Molecular Recognition. *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10* (22), 5570-5579.
100. Papp, I.; Sieben, C.; Ludwig, K.; Roskamp, M.; Böttcher, C.; Schlecht, S.; Herrmann, A.; Haag, R., Inhibition of Influenza Virus Infection by Multivalent Sialic-Acid-Functionalized Gold Nanoparticles. *Small* **2010**, *6* (24), 2900-2906.
101. Voit, B.; Appelhans, D., Glycopolymers of various architectures—more than mimicking nature. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, *211* (7), 727-735.
102. Davis, B. G., Recent developments in glycoconjugates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1999**, (22), 3215-3237.
103. Bhatia, S.; Camacho, L. C.; Haag, R., Pathogen Inhibition by Multivalent Ligand Architectures. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (28), 8654-8666.
104. Arsiwala, A.; Castro, A.; Frey, S.; Stathos, M.; Kane, R. S., Designing Multivalent Ligands to Control Biological Interactions: From Vaccines and Cellular Effectors to Targeted Drug Delivery. *Chemistry – An Asian Journal* **2019**, *14* (2), 244-255.
105. Gupta, A.; Ray, M.; Rotello, V. M., Multivalent Protein Recognition Using Synthetic Receptors. In *Multivalency*, 2018; pp 229-261.
106. Fischer, E.; Fischer, E.; Fourneau, E., *Ueber einige derivate des Glykocolls*. Springer: 1906.
107. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85* (14), 2149-2154.
108. Merrifield, R. B., Solid phase synthesis (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English* **1985**, *24* (10), 799-810.
109. Merrifield, B., Solid phase synthesis. *Science* **1986**, *232* (4748), 341-347.
110. Jensen, K. J.; Shelton, P. T.; Pedersen, S. L., *Peptide synthesis and applications*. Springer: 2013.
111. Fields, G. B.; Noble, R. L., Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International journal of peptide and protein research* **1990**, *35* (3), 161-214.
112. Chan, W.; White, P., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press: 1999.
113. Coin, I.; Beyermann, M.; Bienert, M., Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature Protocols* **2007**, *2* (12), 3247-3256.
114. Kimmerlin, T.; Seebach, D., ‘100 years of peptide synthesis’: ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to  $\beta$ -peptide assemblies\*. *The Journal of Peptide Research* **2005**, *65* (2), 229-260.
115. Mitchell, A. R., Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment. *Peptide Science* **2008**, *90* (3), 175-184.

116. Blackwell, H. E.; Pérez, L.; Stavenger, R. A.; Tallarico, J. A.; Cope Eatough, E.; Foley, M. A.; Schreiber, S. L., A one-bead, one-stock solution approach to chemical genetics: part 1. *Chemistry & Biology* **2001**, *8* (12), 1167-1182.
117. Vaino, A. R.; Janda, K. D., Solid-Phase Organic Synthesis: A Critical Understanding of the Resin. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2000**, *2* (6), 579-596.
118. Li, W.; Yan, B., Effects of polymer supports on the kinetics of solid-phase organic reactions: a comparison of polystyrene- and TentaGel-based resins. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (12), 4092-4097.
119. Moss, J. A., Guide for Resin and Linker Selection in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Current Protocols in Protein Science* **2005**, *40* (1), 18.7.1-18.7.19.
120. Atherton, E.; Clive, D.; Sheppard, R., Polyamide supports for polypeptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, *97* (22), 6584-6585.
121. Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G., Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology* **2006**, *33* (3), 239-254.
122. Bayer, E., Towards the Chemical Synthesis of Proteins. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1991**, *30* (2), 113-129.
123. Zalipsky, S.; Chang, J. L.; Albericio, F.; Barany, G., Preparation and applications of polyethylene glycol-polystyrene graft resin supports for solid-phase peptide synthesis. *Reactive Polymers* **1994**, *22* (3), 243-258.
124. Meldal, M., Properties of solid supports. *Methods Enzymol* **1997**, *289*, 83-104.
125. Li, W.; Yan, B., Effects of Polymer Supports on the Kinetics of Solid-Phase Organic Reactions: A Comparison of Polystyrene- and TentaGel-Based Resins. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (12), 4092-4097.
126. Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F., Amino Acid-Protecting Groups. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (6), 2455-2504.
127. Carpino, L. A., The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl family of base-sensitive amino-protecting groups. *Accounts of Chemical Research* **1987**, *20* (11), 401-407.
128. Behrendt, R.; White, P.; Offer, J., Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J Pept Sci* **2016**, *22* (1), 4-27.
129. Protection for the Amino Group. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 2006; pp 696-926.
130. BODANSZKY, M.; BEDNAREK, M. A.; BODANSZKY, A., Coupling in the absence of tertiary amines. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1982**, *20* (4), 387-395.
131. Barlos, K.; Mamos, P.; Papaioannou, D.; Patrianakou, S.; Sanida, C.; Schäfer, W., Einsatz von Trt- und Fmoc-Gruppen zum Schutz polyfunktioneller  $\alpha$ -Aminosäuren. *Liebigs Annalen der Chemie* **1987**, *1987* (12), 1025-1030.
132. Anderson, G. W.; McGregor, A. C., t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79* (23), 6180-6183.
133. Lundt, B. F.; Johansen, N. L.; Vølund, A.; Markussen, J., REMOVAL OF t-BUTYL AND t-BUTOXYCARBONYL PROTECTING GROUPS WITH TRIFLUOROACETIC ACID. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1978**, *12* (5), 258-268.
134. Dessolin, M.; Guillerez, M.-G.; Thieriet, N.; Guibé, F.; Loffet, A., New allyl group acceptors for palladium catalyzed removal of allylic protections and transacylation of allyl carbamates. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36* (32), 5741-5744.
135. Fernández-Forner, D.; Casals, G.; Navarro, E. s.; Ryder, H.; Albericio, F., Solid-phase synthesis of 4-aminopiperidine analogues using the Alloc protecting

- group: an investigation of Alloc removal from secondary amines. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42 (27), 4471-4474.
136. Han, S.-Y.; Kim, Y.-A., Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, 60 (11), 2447-2468.
137. El-Faham, A.; Albericio, F., Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chemical Reviews* **2011**, 111 (11), 6557-6602.
138. Montalbetti, C. A.; Falque, V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827-10852.
139. Varnava, K. G.; Sarojini, V., Making Solid-Phase Peptide Synthesis Greener: A Review of the Literature. *Chemistry – An Asian Journal* **2019**, 14 (8), 1088-1097.
140. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C., Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Letters* **1975**, 16 (14), 1219-1222.
141. Hudson, D., Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures. *The Journal of organic chemistry* **1988**, 53 (3), 617-624.
142. Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B., PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* **1990**, 31 (2), 205-208.
143. Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A., Use of onium salt-based coupling reagents in peptide Synthesis<sup>1</sup>. *The Journal of organic chemistry* **1998**, 63 (26), 9678-9683.
144. Albericio, F.; El-Faham, A., Choosing the Right Coupling Reagent for Peptides: A Twenty-Five-Year Journey. *Organic Process Research & Development* **2018**, 22 (7), 760-772.
145. Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F., Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, (2), 201-203.
146. Carpino, L. A., 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115 (10), 4397-4398.
147. Bonkowski, B.; Wieczorek, J.; Patel, M.; Craig, C.; Gravelin, A.; Boncher, T., Basic concepts of using solid phase synthesis to build small organic molecules using 2-chlorotriyl chloride resin. *Mod Chem Appl* **2013**, 1 (113), 2.
148. Roy, B.; Depaix, A.; Périgaud, C.; Peyrottes, S., Recent trends in nucleotide synthesis. *Chemical Reviews* **2016**, 116 (14), 7854-7897.
149. Bennett, C. S., Principles of modern solid-phase oligosaccharide synthesis. *Organic & biomolecular chemistry* **2014**, 12 (11), 1686-1698.
150. Hartmann, L.; Krause, E.; Antonietti, M.; Börner, H. G., Solid-phase supported polymer synthesis of sequence-defined, multifunctional poly (amidoamines). *Biomacromolecules* **2006**, 7 (4), 1239-1244.
151. Ponader, D.; Wojcik, F.; Beceren-Braun, F.; Dervedde, J.; Hartmann, L., Sequence-Defined Glycopolymer Segments Presenting Mannose: Synthesis and Lectin Binding Affinity. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (6), 1845-1852.
152. Pasch, P.; Höing, A.; Ueclue, S.; Killa, M.; Voskuhl, J.; Knauer, S. K.; Hartmann, L., PEGylated sequence-controlled macromolecules using supramolecular binding to target the Taspase1/Importin  $\alpha$  interaction. *Chemical Communications* **2021**, 57 (25), 3091-3094.
153. Wojcik, F.; Mosca, S.; Hartmann, L., Solid-Phase Synthesis of Asymmetrically Branched Sequence-Defined Poly/Oligo(amidoamines). *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, 77 (9), 4226-4234.

154. Baier, M.; Giesler, M.; Hartmann, L., Split-and-Combine Approach Towards Branched Precision Glycomacromolecules and Their Lectin Binding Behavior. *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24* (7), 1619-1630.
155. Wojcik, F.; O'Brien, A. G.; Götze, S.; Seeberger, P. H.; Hartmann, L., Synthesis of Carbohydrate-Functionalised Sequence-Defined Oligo (amidoamine) s by Photochemical Thiol–Ene Coupling in a Continuous Flow Reactor. *Chemistry–A European Journal* **2013**, *19* (9), 3090-3098.
156. Gerke, C.; Ebbesen, M. F.; Jansen, D.; Boden, S.; Freichel, T.; Hartmann, L., Sequence-Controlled Glycopolymers via Step-Growth Polymerization of Precision Glycomacromolecules for Lectin Receptor Clustering. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (3), 787-796.
157. Boden, S.; Wagner, K. G.; Karg, M.; Hartmann, L., Presenting precision glycomacromolecules on gold nanoparticles for increased lectin binding. *Polymers* **2017**, *9* (12), 716.
158. Freichel, T.; Eierhoff, S.; Snyder, N. L.; Hartmann, L., Toward Orthogonal Preparation of Sequence-Defined Monodisperse Heteromultivalent Glycomacromolecules on Solid Support Using Staudinger Ligation and Copper-Catalyzed Click Reactions. *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82* (18), 9400-9409.
159. Ponader, D. Synthesis of Sequence-defined Glycooligomers for Studying Multivalent Interactions. Freie Universität Berlin, Freie Universität Berlin, 2014.
160. Boden, S.; Reise, F.; Kania, J.; Lindhorst, T. K.; Hartmann, L., Sequence-Defined Introduction of Hydrophobic Motifs and Effects in Lectin Binding of Precision Glycomacromolecules. *Macromolecular Bioscience* **2019**, *19* (4), 1800425.
161. Ebbesen, M. F.; Gerke, C.; Hartwig, P.; Hartmann, L., Biodegradable poly(amidoamine)s with uniform degradation fragments via sequence-controlled macromonomers. *Polymer Chemistry* **2016**, *7* (46), 7086-7093.
162. Wojcik, F.; Lel, S.; O'Brien, A. G.; Seeberger, P. H.; Hartmann, L., Synthesis of homo- and heteromultivalent carbohydrate-functionalized oligo(amidoamines) using novel glyco-building blocks. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2013**, *9*, 2395-2403.
163. Banger, A.; Sindram, J.; Otten, M.; Kania, J.; Wilms, D.; Strzelczyk, A.; Miletic, S.; Marlovits, T. C.; Karg, M.; Hartmann, L., Synthesis and self-assembly of amphiphilic precision glycomacromolecules. *Polymer Chemistry* **2021**, *12* (33), 4795-4802.
164. Hoffmann, M.; Snyder, N. L.; Hartmann, L., Polymers Inspired by Heparin and Heparan Sulfate for Viral Targeting. *Macromolecules* **2022**, *55* (18), 7957-7973.
165. Arkin, M. R.; Tang, Y.; Wells, J. A., Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. *Chem Biol* **2014**, *21* (9), 1102-14.
166. Scott, D. E.; Bayly, A. R.; Abell, C.; Skidmore, J., Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein–protein interaction challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, *15* (8), 533-550.
167. Uhlenheuer, D. A.; Petkau, K.; Brunsveld, L., Combining supramolecular chemistry with biology. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (8), 2817-2826.
168. McGovern, R. E.; Fernandes, H.; Khan, A. R.; Power, N. P.; Crowley, P. B., Protein camouflage in cytochrome c–calixarene complexes. *Nature Chemistry* **2012**, *4* (7), 527-533.
169. Venkatesan, K.; Rual, J.-F.; Vazquez, A.; Stelzl, U.; Lemmens, I.; Hirozane-Kishikawa, T.; Hao, T.; Zenkner, M.; Xin, X.; Goh, K.-I.; Yildirim, M. A.; Simonis, N.; Heinzmann, K.; Gebreab, F.; Sahalie, J. M.; Cevik, S.; Simon, C.; de Smet, A.-

- S.; Dann, E.; Smolyar, A.; Vinayagam, A.; Yu, H.; Szeto, D.; Borick, H.; Dricot, A.; Klitgord, N.; Murray, R. R.; Lin, C.; Lalowski, M.; Timm, J.; Rau, K.; Boone, C.; Braun, P.; Cusick, M. E.; Roth, F. P.; Hill, D. E.; Tavernier, J.; Wanker, E. E.; Barabási, A.-L.; Vidal, M., An empirical framework for binary interactome mapping. *Nature Methods* **2009**, *6* (1), 83-90.
170. Nero, T. L.; Morton, C. J.; Holien, J. K.; Wielens, J.; Parker, M. W., Oncogenic protein interfaces: small molecules, big challenges. *Nature Reviews Cancer* **2014**, *14* (4), 248-262.
171. Milroy, L.-G.; Brunsveld, L.; Ottmann, C., Stabilization and Inhibition of Protein–Protein Interactions: The 14-3-3 Case Study. *ACS Chemical Biology* **2013**, *8* (1), 27-35.
172. Giordanetto, F.; Schäfer, A.; Ottmann, C., Stabilization of protein–protein interactions by small molecules. *Drug Discovery Today* **2014**, *19* (11), 1812-1821.
173. Santos, R.; Ursu, O.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Donadi, R. S.; Bologa, C. G.; Karlsson, A.; Al-Lazikani, B.; Hersey, A.; Oprea, T. I., A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature reviews Drug discovery* **2017**, *16* (1), 19-34.
174. Conte, L. L.; Chothia, C.; Janin, J., The atomic structure of protein-protein recognition sites. Edited by A. R. Fersht. *Journal of Molecular Biology* **1999**, *285* (5), 2177-2198.
175. Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N., Structure-Based Design of Inhibitors of Protein–Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (31), 8896-8927.
176. Lu, H.; Zhou, Q.; He, J.; Jiang, Z.; Peng, C.; Tong, R.; Shi, J., Recent advances in the development of protein–protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2020**, *5* (1), 213.
177. Mabonga, L.; Kappo, A. P., Protein-protein interaction modulators: advances, successes and remaining challenges. *Biophysical Reviews* **2019**, *11* (4), 559-581.
178. Erickson-Miller, C. L.; DeLorme, E.; Tian, S.-S.; Hopson, C. B.; Stark, K.; Giampa, L.; Valoret, E. I.; Duffy, K. J.; Luengo, J. L.; Rosen, J., Discovery and characterization of a selective, nonpeptidyl thrombopoietin receptor agonist. *Experimental hematology* **2005**, *33* (1), 85-93.
179. Kalota, A.; Gewirtz, A. M., A prototype nonpeptidyl, hydrazone class, thrombopoietin receptor agonist, SB-559457, is toxic to primary human myeloid leukemia cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **2010**, *115* (1), 89-93.
180. Kapoor, S.; Champion, G.; Olnes, M. J., Thrombopoietin receptor agonists for marrow failure: A concise clinical review. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **2021**, *34* (2), 101274.
181. Dorr, P.; Westby, M.; Dobbs, S.; Griffin, P.; Irvine, B.; Macartney, M.; Mori, J.; Rickett, G.; Smith-Burchnell, C.; Napier, C., Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2005**, *49* (11), 4721-4732.
182. G Xu, G.; Guo, J.; Wu, Y., Chemokine receptor CCR5 antagonist maraviroc: medicinal chemistry and clinical applications. *Current topics in medicinal chemistry* **2014**, *14* (13), 1504-1514.
183. Kalatskaya, I.; Berchiche, Y. A.; Gravel, S.; Limberg, B. J.; Rosenbaum, J. S.; Heveker, N., AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Molecular pharmacology* **2009**, *75* (5), 1240-1247.
184. Davies, S.; Serradell, N.; Bolos, J.; Bayes, M., Plerixafor hydrochloride. *Drug Today* **2007**, *32*, 123-136.

185. Ivanov, A. A.; Khuri, F. R.; Fu, H., Targeting protein–protein interactions as an anticancer strategy. *Trends in pharmacological sciences* **2013**, *34* (7), 393-400.
186. Buchwald, P., Small-molecule protein–protein interaction inhibitors: Therapeutic potential in light of molecular size, chemical space, and ligand binding efficiency considerations. *IUBMB life* **2010**, *62* (10), 724-731.
187. Rubinstein, M.; Niv, M. Y., Peptidic modulators of protein-protein interactions: progress and challenges in computational design. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* **2009**, *91* (7), 505-513.
188. Vanhee, P.; van der Sloot, A. M.; Verschueren, E.; Serrano, L.; Rousseau, F.; Schymkowitz, J., Computational design of peptide ligands. *Trends in biotechnology* **2011**, *29* (5), 231-239.
189. Rothe, A.; Hosse, R. J.; Power, E. B., In vitro display technologies reveal novel biopharmaceutics. *The FASEB Journal* **2006**, *20* (10), 1599-1610.
190. Chinta, J. P.; Acharya, A.; Kumar, A.; Rao, C. P., Spectroscopy and microscopy studies of the recognition of amino acids and aggregation of proteins by Zn (II) complex of lower rim naphthylidene conjugate of calix [4] arene. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113* (35), 12075-12083.
191. Pathak, R. K.; Dessingou, J.; Rao, C. P., Multiple sensor array of Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> complexes of a triazole linked imino-phenol based calix [4] arene conjugate for the selective recognition of Asp, Glu, Cys, and His. *Analytical chemistry* **2012**, *84* (19), 8294-8300.
192. Wei, Y.; McLendon, G. L.; Hamilton, A. D.; Case, M. A.; Purring, C. B.; Lin, Q.; Park, H. S.; Lee, C.-S.; Yu, T., Disruption of protein–protein interactions: design of a synthetic receptor that blocks the binding of cytochrome c to cytochrome c peroxidase. *Chemical Communications* **2001**, (17), 1580-1581.
193. Lopes, D. H.; Attar, A.; Nair, G.; Hayden, E. Y.; Du, Z.; McDaniel, K.; Dutt, S.; Bravo-Rodriguez, K.; Mittal, S.; Klärner, F.-G., Molecular tweezers inhibit islet amyloid polypeptide assembly and toxicity by a new mechanism. *ACS chemical biology* **2015**, *10* (6), 1555-1569.
194. Vöpel, T.; Bravo-Rodriguez, K.; Mittal, S.; Vachharajani, S.; Gnutt, D.; Sharma, A.; Steinhof, A.; Fatoba, O.; Ellrichmann, G.; Nshanian, M., Inhibition of huntingtin exon-1 aggregation by the molecular tweezer CLR01. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (16), 5640-5643.
195. Aschmann, D.; Vallet, C.; Tripathi, S. K.; Ruiz-Blanco, Y. B.; Brabender, M.; Schmuck, C.; Sanchez-Garcia, E.; Knauer, S. K.; Giese, M., Selective Disruption of Survivin's Protein-Protein Interactions: A Supramolecular Approach Based on Guanidiniocarbonylpyrrole. *ChemBioChem* **2022**, *23* (5), e202100618.
196. Giese, M.; Niemeyer, J.; Voskuhl, J., Guanidiniocarbonyl-Pyrroles (GCP) – 20 Years of the Schmuck Binding Motif. *ChemPlusChem* **2020**, *85* (5), 985-997.
197. Gigante, A.; Sijbesma, E.; Sánchez-Murcia, P. A.; Hu, X.; Bier, D.; Baecker, S.; Knauer, S.; Gago, F.; Ottmann, C.; Schmuck, C., A Supramolecular Stabilizer of the 14-3-3 $\zeta$ /ER $\alpha$  Protein-Protein Interaction with a Synergistic Mode of Action. *Angewandte Chemie International Edition* **2020**, *59* (13), 5284-5287.
198. Sah, N. K.; Khan, Z.; Khan, G. J.; Bisen, P. S., Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Letters* **2006**, *244* (2), 164-171.
199. Li, F.; Ambrosini, G.; Chu, E. Y.; Plescia, J.; Tognin, S.; Marchisio, P. C.; Altieri, D. C., Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **1998**, *396* (6711), 580-584.
200. Ambrosini, G.; Adida, C.; Altieri, D. C., A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine* **1997**, *3* (8), 917-921.

201. Adida, C.; Haioun, C.; Gaulard, P.; Lepage, E.; Morel, P.; Briere, J.; Dombret, H.; Reyes, F.; Diebold, J.; Gisselbrecht, C., Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **2000**, *96* (5), 1921-1925.
202. Capalbo, G.; Rödel, C.; Stauber, R. H.; Knauer, S. K.; Bache, M.; Kappler, M.; Rödel, F., The role of survivin for radiation therapy. *Strahlentherapie und Onkologie* **2007**, *183* (11), 593-599.
203. Xu, C.; Yamamoto-Ibusuki, M.; Yamamoto, Y.; Yamamoto, S.; Fujiwara, S.; Murakami, K.; Okumura, Y.; Yamaguchi, L.; Fujiki, Y.; Iwase, H., High survivin mRNA expression is a predictor of poor prognosis in breast cancer: a comparative study at the mRNA and protein level. *Breast Cancer* **2014**, *21*, 482-490.
204. Li, D.; Hu, C.; Li, H., Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells. *Biomedical reports* **2018**, *8* (5), 399-406.
205. Wheatley, S. P.; Altieri, D. C., Survivin at a glance. *Journal of cell science* **2019**, *132* (7), jcs223826.
206. Verdecia, M. A.; Huang, H.; Dutil, E.; Kaiser, D. A.; Hunter, T.; Noel, J. P., Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* **2000**, *7* (7), 602-8.
207. Chantalat, L.; Skoufias, D. A.; Kleman, J.-P.; Jung, B.; Dideberg, O.; Margolis, R. L., Crystal Structure of Human Survivin Reveals a Bow Tie–Shaped Dimer with Two Unusual  $\alpha$ -Helical Extensions. *Molecular Cell* **2000**, *6* (1), 183-189.
208. Garg, H.; Suri, P.; Gupta, J. C.; Talwar, G.; Dubey, S., Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer cell international* **2016**, *16* (1), 1-14.
209. Pavlyukov, M. S.; Antipova, N. V.; Balashova, M. V.; Vinogradova, T. V.; Kopantzev, E. P.; Shakhparonov, M. I., Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation. *J Biol Chem* **2011**, *286* (26), 23296-307.
210. Jeyapakash, A. A.; Klein, U. R.; Lindner, D.; Ebert, J.; Nigg, E. A.; Conti, E., Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell* **2007**, *131* (2), 271-85.
211. Knauer, S. K.; Krämer, O. H.; Knösel, T.; Engels, K.; Rödel, F.; Kovács, A. F.; Dietmaier, W.; Klein-Hitpass, L.; Habtemichael, N.; Schweitzer, A., Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *The FASEB Journal* **2007**, *21* (1), 207-216.
212. Hill, R.; Cautain, B.; de Pedro, N.; Link, W., Targeting nucleocytoplasmic transport in cancer therapy. *Oncotarget* **2014**, *5* (1), 11-28.
213. Newlands, E. S.; Rustin, G. J.; Brampton, M. H., Phase I trial of elactocin. *Br J Cancer* **1996**, *74* (4), 648-9.
214. Sun, Q.; Carrasco, Y. P.; Hu, Y.; Guo, X.; Mirzaei, H.; Macmillan, J.; Chook, Y. M., Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (4), 1303-1308.
215. Daelemans, D.; Afonina, E.; Nilsson, J.; Werner, G.; Kjems, J.; De Clercq, E.; Pavlakis, G. N.; Vandamme, A.-M., A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (22), 14440-14445.
216. Nakahara, T.; Kita, A.; Yamanaka, K.; Mori, M.; Amino, N.; Takeuchi, M.; Tominaga, F.; Hatakeyama, S.; Kinoyama, I.; Matsuhisa, A.; Kudoh, M.; Sasamata, M., YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res* **2007**, *67* (17), 8014-21.

217. Chang, C. C.; Heller, J. D.; Kuo, J.; Huang, R. C., Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces growth arrest and cellular apoptosis by inhibiting Cdc2 and survivin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (36), 13239-44.
218. Ling, X.; Cao, S.; Cheng, Q.; Keefe, J. T.; Rustum, Y. M.; Li, F., A Novel Small Molecule FL118 That Selectively Inhibits Survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-Independent Manner, Shows Superior Antitumor Activity. *PLOS ONE* **2012**, *7* (9), e45571.
219. Shi, X.; Wang, D.; Ding, K.; Lu, Z.; Jin, Y.; Zhang, J.; Pan, J., GDP366, a novel small molecule dual inhibitor of survivin and Op18, induces cell growth inhibition, cellular senescence and mitotic catastrophe in human cancer cells. *Cancer biology & therapy* **2010**, *9* (8), 640-650.
220. Rafatmanesh, A.; Behjati, M.; Mobasseri, N.; Sarvizadeh, M.; Mazoochi, T.; Karimian, M., The survivin molecule as a double-edged sword in cellular physiologic and pathologic conditions and its role as a potential biomarker and therapeutic target in cancer. *Journal of Cellular Physiology* **2020**, *235* (2), 725-744.
221. Martínez-García, D.; Manero-Rupérez, N.; Quesada, R.; Korrodi-Gregório, L.; Soto-Cerrato, V., Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer. *Medicinal Research Reviews* **2019**, *39* (3), 887-909.
222. Vallet, C.; Aschmann, D.; Beuck, C.; Killa, M.; Meiners, A.; Mertel, M.; Ehlers, M.; Bayer, P.; Schmuck, C.; Giese, M.; Knauer, S. K., Functional Disruption of the Cancer-Relevant Interaction between Survivin and Histone H3 with a Guanidiniocarbonyl Pyrrole Ligand. *Angewandte Chemie International Edition* **2020**, *59* (14), 5567-5571.
223. Knauer, S. K.; Krämer, O. H.; Knösel, T.; Engels, K.; Rödel, F.; Kovács, A. F.; Dietmaier, W.; Klein-Hitpass, L.; Habtemichael, N.; Schweitzer, A.; Brieger, J.; Rödel, C.; Mann, W.; Petersen, I.; Heinzl, T.; Stauber, R. H., Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *The FASEB Journal* **2007**, *21* (1), 207-216.
224. Sonzini, S.; Marcozzi, A.; Gubeli, R. J.; van der Walle, C. F.; Ravn, P.; Herrmann, A.; Scherman, O. A., High Affinity Recognition of a Selected Amino Acid Epitope within a Protein by Cucurbit[8]uril Complexation. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (45), 14000-14004.
225. Bier, D.; Rose, R.; Bravo-Rodriguez, K.; Bartel, M.; Ramirez-Anguaita, J. M.; Dutt, S.; Wilch, C.; Klärner, F.-G.; Sanchez-Garcia, E.; Schrader, T.; Ottmann, C., Molecular tweezers modulate 14-3-3 protein-protein interactions. *Nature Chemistry* **2013**, *5* (3), 234-239.
226. Höing, A.; Kirupakaran, A.; Beuck, C.; Pörschke, M.; Niemeyer, F. C.; Seiler, T.; Hartmann, L.; Bayer, P.; Schrader, T.; Knauer, S. K., Recognition of a Flexible Protein Loop in Taspase 1 by Multivalent Supramolecular Tweezers. *Biomacromolecules* **2022**, *23* (11), 4504-4518.
227. Engelsma, D.; Rodriguez, J. A.; Fish, A.; Giaccone, G.; Fornerod, M., Homodimerization antagonizes nuclear export of survivin. *Traffic* **2007**, *8* (11), 1495-1502.
228. Knauer, S. K.; Bier, C.; Schlag, P.; Fritzmann, J.; Dietmaier, W.; Rödel, F.; Klein-Hitpass, L.; Kovács, A. F.; Döring, C.; Hansmann, M.-L., The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell Cycle* **2007**, *6* (12), 1501-1508.
229. Knauer, S. K.; Mann, W.; Stauber, R. H., Survivin's Dual Role: An Export's View. *Cell Cycle* **2007**, *6* (5), 518-521.

230. Rodríguez, J. A.; Span, S. W.; Ferreira, C. G.; Kruyt, F. A.; Giaccone, G., CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin. *Experimental cell research* **2002**, *275* (1), 44-53.
231. Krishnamurthy, V. M.; Estroff, L. A.; Whitesides, G. M., Multivalency in Ligand Design. In *Fragment-based Approaches in Drug Discovery*, 2006; pp 11-53.
232. Dubacheva, G. V.; Curk, T.; Auzély-Velty, R.; Frenkel, D.; Richter, R. P., Designing multivalent probes for tunable superselective targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (18), 5579-5584.
233. Guillory, X.; Hadrović, I.; de Vink, P. J.; Sowislok, A.; Brunsveld, L.; Schrader, T.; Ottmann, C., Supramolecular Enhancement of a Natural 14–3–3 Protein Ligand. *Journal of the American Chemical Society* **2021**, *143* (34), 13495-13500.
234. van der Meer, S. B.; Hadrovic, I.; Meiners, A.; Loza, K.; Heggen, M.; Knauer, S. K.; Bayer, P.; Schrader, T.; Beuck, C.; Epple, M., New Tools to Probe the Protein Surface: Ultrasmall Gold Nanoparticles Carry Amino Acid Binders. *The Journal of Physical Chemistry B* **2021**, *125* (1), 115-127.
235. Jacobi, F.; Camaleño de la Calle, A.; Boden, S.; Grafmüller, A.; Hartmann, L.; Schmidt, S., Multivalent Binding of Precision Glycooligomers on Soft Glycocalyx Mimicking Hydrogels. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (8), 3479-3488.
236. Wittmann, V.; Pieters, R. J., Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (10), 4492-4503.
237. Igde, S.; Röblitz, S.; Müller, A.; Kolbe, K.; Boden, S.; Fessele, C.; Lindhorst, T. K.; Weber, M.; Hartmann, L., Linear Precision Glycomacromolecules with Varying Interligand Spacing and Linker Functionalities Binding to Concanavalin A and the Bacterial Lectin FimH. *Macromolecular Bioscience* **2017**, *17* (12), 1700198.
238. Hill, S. A.; Gerke, C.; Hartmann, L., Recent Developments in Solid-Phase Strategies towards Synthetic, Sequence-Defined Macromolecules. *Chemistry – An Asian Journal* **2018**, *13* (23), 3611-3622.
239. Loganathan, D.; Osborne, S. E.; Glick, G. D.; Goldstein, I. J., Synthesis of high-affinity, hydrophobic monosaccharide derivatives and study of their interaction with concanavalin A, the pea, the lentil, and fava bean lectins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1992**, *299* (2), 268-274.
240. Poretz, R.; Goldstein, I. J., Protein-carbohydrate interaction: On the mode of binding of aromatic moieties to concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. *Biochemical pharmacology* **1971**, *20* (10), 2727-2739.
241. Ahmad, A.; Madhusudanan, K. P.; Bhakuni, V., Trichloroacetic acid and trifluoroacetic acid-induced unfolding of cytochrome c: stabilization of a native-like folded intermediate11CDRI communication number 5877. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2000**, *1480* (1), 201-210.
242. Cornish, J.; Callon, K. E.; Lin, C. Q.-X.; Xiao, C. L.; Mulvey, T. B.; Cooper, G. J. S.; Reid, I. R., Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **1999**, *277* (5), E779-E783.
243. Boden, S. Precision Glycomacromolecules with Hydrophobic Main Chain Motives. Heinrich-Heine-University Düsseldorf, 2020.
244. Sun, W.-C.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P., Synthesis of fluorinated fluoresceins. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (19), 6469-6475.
245. Klonis, N.; Sawyer, W. H., Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution. *Journal of fluorescence* **1996**, *6*, 147-157.
246. Le Guern, F.; Mussard, V.; Gaucher, A.; Rottman, M.; Prim, D., Fluorescein Derivatives as Fluorescent Probes for pH Monitoring along Recent Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (23), 9217.

247. Song, L.; Hennink, E.; Young, I. T.; Tanke, H. J., Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical journal* **1995**, *68* (6), 2588-2600.
248. Sellers, H.; Ulman, A.; Shnidman, Y.; Eilers, J. E., Structure and binding of alkanethiolates on gold and silver surfaces: implications for self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (21), 9389-9401.
249. Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M., Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews* **2012**, *112* (5), 2739-2779.
250. Nairn, N. W.; Bariola, P. A.; Graddis, T. J.; VanBrunt, M. P.; Wang, A.; Li, G.; Grabstein, K., Cysteine as a Monothiol Reducing Agent to Prevent Copper-Mediated Oxidation of Interferon Beta During PEGylation by CuAAC. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26* (10), 2070-2075.
251. Talbiersky, P.; Bastkowski, F.; Klärner, F.-G.; Schrader, T., Molecular Clip and Tweezer Introduce New Mechanisms of Enzyme Inhibition. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (30), 9824-9828.
252. Wilch, C.; Talbiersky, P.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Schaller, T.; Kirsch, M.; Klärner, F. G.; Schrader, T., Molecular Tweezers Inhibit PARP-1 by a New Mechanism. *European Journal of Organic Chemistry* **2017**, *2017* (16), 2223-2229.
253. Kolb, H. C.; Finn, M.; Sharpless, K. B., Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004-2021.
254. Wu, P., The Nobel Prize in Chemistry 2022: Fulfilling Demanding Applications with Simple Reactions. *ACS Chemical Biology* **2022**, *17* (11), 2959-2961.
255. Mobahat, M.; Narendran, A.; Riabowol, K., Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15* (2).
256. Knauer, S. K.; Bier, C.; Habtemichael, N.; Stauber, R. H., The Survivin–Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO reports* **2006**, *7* (12), 1259-1265.
257. Vallet, C.; Aschmann, D.; Beuck, C.; Killa, M.; Meiners, A.; Mertel, M.; Ehlers, M.; Bayer, P.; Schmuck, C.; Giese, M., Functional Disruption of the Cancer-Relevant Interaction between Survivin and Histone H3 with a Guanidiniocarbonyl Pyrrole Ligand. *Angewandte Chemie International Edition* **2020**, *59* (14), 5567-5571.
258. Schmidtchen, F. P., Isothermal Titration Calorimetry in Supramolecular Chemistry. In *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, 2006; pp 55-78.
259. Sulak, O.; Lameignère, E.; Wimmerovaw, M.; Imberty, A., Specificity and affinity studies in lectin/carbohydrate interactions. *Carbohydrate Chemistry: Volume 35* **2009**, *35*, 356-371.
260. Dam, T. K.; Brewer, C. F., Thermodynamic Studies of Lectin–Carbohydrate Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Chemical Reviews* **2002**, *102* (2), 387-430.
261. Bhalla, V., Supramolecular chemistry: From molecule to molecular machines. *Resonance* **2018**, *23*, 277-290.
262. Brogioni, B.; Berti, F., Surface plasmon resonance for the characterization of bacterial polysaccharide antigens: a review. *MedChemComm* **2014**, *5* (8), 1058-1066.
263. Kamal Eddin, F. B.; Fen, Y. W., The Principle of Nanomaterials Based Surface Plasmon Resonance Biosensors and Its Potential for Dopamine Detection. *Molecules* **2020**, *25* (12), 2769.
264. Jana, M.; Bandyopadhyay, S., Conformational flexibility of a protein–carbohydrate complex and the structure and ordering of surrounding water. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14* (18), 6628-6638.

265. Wilcox, D. S.; Rankin, B. M.; Ben-Amotz, D., Distinguishing aggregation from random mixing in aqueous t-butyl alcohol solutions. *Faraday Discussions* **2013**, *167* (0), 177-190.
266. Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *Journal of the American Chemical Society* **1916**, *38* (11), 2221-2295.
267. Gjelstrup, L. C.; Kaspersen, J. D.; Behrens, M. A.; Pedersen, J. S.; Thiel, S.; Kingshott, P.; Oliveira, C. L. P.; Thielens, N. M.; Vorup-Jensen, T., The Role of Nanometer-Scaled Ligand Patterns in Polyvalent Binding by Large Mannan-Binding Lectin Oligomers. *The Journal of Immunology* **2012**, *188* (3), 1292-1306.
268. Vorup-Jensen, T., On the roles of polyvalent binding in immune recognition: Perspectives in the nanoscience of immunology and the immune response to nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64* (15), 1759-1781.
269. Kapinos, Larisa E.; Schoch, Rafael L.; Wagner, Raphael S.; Schleicher, Kai D.; Lim, Roderick Y. H., Karyopherin-Centric Control of Nuclear Pores Based on Molecular Occupancy and Kinetic Analysis of Multivalent Binding with FG Nucleoporins. *Biophysical Journal* **2014**, *106* (8), 1751-1762.
270. Kitov, P. I.; Bundle, D. R., On the Nature of the Multivalency Effect: A Thermodynamic Model. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (52), 16271-16284.
271. Svitel, J.; Balbo, A.; Mariuzza, R. A.; Gonzales, N. R.; Schuck, P., Combined Affinity and Rate Constant Distributions of Ligand Populations from Experimental Surface Binding Kinetics and Equilibria. *Biophysical Journal* **2003**, *84* (6), 4062-4077.
272. Gorshkova, I. I.; Svitel, J.; Razjouyan, F.; Schuck, P., Bayesian Analysis of Heterogeneity in the Distribution of Binding Properties of Immobilized Surface Sites. *Langmuir* **2008**, *24* (20), 11577-11586.
273. Pillai-Kastoori, L.; Schutz-Geschwender, A. R.; Harford, J. A., A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical biochemistry* **2020**, *593*, 113608.
274. Fan, M.; Han, Y.; Gao, S.; Yan, H.; Cao, L.; Li, Z.; Liang, X. J.; Zhang, J., Ultrasmall gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. *Theranostics* **2020**, *10* (11), 4944-4957.
275. Zarschler, K.; Rocks, L.; Licciardello, N.; Boselli, L.; Polo, E.; Garcia, K. P.; De Cola, L.; Stephan, H.; Dawson, K. A., Ultrasmall inorganic nanoparticles: State-of-the-art and perspectives for biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2016**, *12* (6), 1663-1701.
276. Sokolova, V.; Westendorf, A. M.; Buer, J.; Überla, K.; Epple, M., The potential of nanoparticles for the immunization against viral infections. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3* (24), 4767-4779.
277. Rotello, V. M., Organic chemistry meets polymers, nanoscience, therapeutics and diagnostics. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2016**, *12*, 1638-1646.
278. Giner-Casares, J. J.; Henriksen-Lacey, M.; Coronado-Puchau, M.; Liz-Marzán, L. M., Inorganic nanoparticles for biomedicine: where materials scientists meet medical research. *Materials Today* **2016**, *19* (1), 19-28.
279. Wolfbeis, O. S., An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (14), 4743-4768.
280. Hammami, I.; Alabdallah, N. M.; jomaa, A. A.; kamoun, M., Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of King Saud University - Science* **2021**, *33* (7), 101560.
281. Nejati, K.; Dadashpour, M.; Gharibi, T.; Mellatyar, H.; Akbarzadeh, A., Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. *Journal of Cluster Science* **2022**, *33* (1), 1-16.

282. Compostella, F.; Pitirollo, O.; Silvestri, A.; Polito, L., Glyco-gold nanoparticles: synthesis and applications. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2017**, *13*, 1008-1021.
283. Yang, X.; Yang, M.; Pang, B.; Vara, M.; Xia, Y., Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (19), 10410-10488.
284. Absorption and Scattering by an Arbitrary Particle. In *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, 1998; pp 57-81.
285. Richards, S.-J.; Fullam, E.; Besra, G. S.; Gibson, M. I., Discrimination between bacterial phenotypes using glyco-nanoparticles and the impact of polymer coating on detection readouts. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2* (11), 1490-1498.
286. Peng, H.; Tang, H.; Jiang, J., Recent progress in gold nanoparticle-based biosensing and cellular imaging. *Science China Chemistry* **2016**, *59* (7), 783-793.
287. Kang, X.; Li, Y.; Zhu, M.; Jin, R., Atomically precise alloy nanoclusters: syntheses, structures, and properties. *Chemical Society Reviews* **2020**, *49* (17), 6443-6514.
288. Zhao, J.; Jin, R., Heterogeneous catalysis by gold and gold-based bimetal nanoclusters. *Nano Today* **2018**, *18*, 86-102.
289. Du, X.; Jin, R., Atomic-precision engineering of metal nanoclusters. *Dalton Transactions* **2020**, *49* (31), 10701-10707.
290. van der Meer, S. B.; Loza, K.; Wey, K.; Heggen, M.; Beuck, C.; Bayer, P.; Epple, M., Click Chemistry on the Surface of Ultrasmall Gold Nanoparticles (2 nm) for Covalent Ligand Attachment Followed by NMR Spectroscopy. *Langmuir* **2019**, *35* (22), 7191-7204.
291. Sokolova, V.; Nzou, G.; van der Meer, S. B.; Ruks, T.; Heggen, M.; Loza, K.; Hagemann, N.; Murke, F.; Giebel, B.; Hermann, D. M.; Atala, A. J.; Epple, M., Ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) can penetrate and enter cell nuclei in an in vitro 3D brain spheroid model. *Acta Biomaterialia* **2020**, *111*, 349-362.
292. Sokolova, V.; Mekky, G.; van der Meer, S. B.; Seeds, M. C.; Atala, A. J.; Epple, M., Transport of ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) across the blood-brain barrier in a six-cell brain spheroid model. *Scientific Reports* **2020**, *10* (1), 18033.
293. Zhang, X.; Shastry, S.; Bradforth, S. E.; Nadeau, J. L., Nuclear uptake of ultrasmall gold-doxorubicin conjugates imaged by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) and electron microscopy. *Nanoscale* **2015**, *7* (1), 240-251.
294. Daniel, M.-C.; Astruc, D., Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews* **2004**, *104* (1), 293-346.
295. Leifert, A.; Pan-Bartnek, Y.; Simon, U.; Jahnen-Dechent, W., Molecularly stabilised ultrasmall gold nanoparticles: synthesis, characterization and bioactivity. *Nanoscale* **2013**, *5* (14), 6224-6242.
296. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55-75.
297. Shah, M.; Badwaik, V.; Kherde, Y.; Waghvani, H. K.; Modi, T.; Aguilar, Z. P.; Rodgers, H.; Hamilton, W.; Marutharaj, T.; Webb, C., Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. *Front. Biosci* **2014**, *19* (8), 1320.
298. Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R., Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, (7), 801-802.
299. Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C., Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, (16), 1655-1656.

300. Negishi, Y.; Takasugi, Y.; Sato, S.; Yao, H.; Kimura, K.; Tsukuda, T., Magic-Numbered Aun Clusters Protected by Glutathione Monolayers (n = 18, 21, 25, 28, 32, 39): Isolation and Spectroscopic Characterization. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (21), 6518-6519.
301. Ruks, T.; Loza, K.; Heggen, M.; Prymak, O.; Sehnem, A. L.; Oliveira, C. L. P.; Bayer, P.; Beuck, C.; Epple, M., Peptide-Conjugated Ultrasmall Gold Nanoparticles (2 nm) for Selective Protein Targeting. *ACS Applied Bio Materials* **2021**, *4* (1), 945-965.
302. Sokolova, V.; Ebel, J.-F.; Kollenda, S.; Klein, K.; Kruse, B.; Veltkamp, C.; Lange, C. M.; Westendorf, A. M.; Epple, M., Uptake of Functional Ultrasmall Gold Nanoparticles in 3D Gut Cell Models. *Small* **2022**, *18* (31), 2201167.
303. Klein, K.; Loza, K.; Heggen, M.; Epple, M., An Efficient Method for Covalent Surface Functionalization of Ultrasmall Metallic Nanoparticles by Surface Azidation Followed by Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (Click Chemistry). *ChemNanoMat* **2021**, *7* (12), 1330-1339.
304. Klein, K. Kovalente Oberflächenfunktionalisierung von ultrakleinen metallischen Nanopartikeln. 2022.
305. Aziz, Z.; Daugherty, M.; de la Torre, J.; Demeler, B.; Douady, C.; Durchschlag, H.; Fleming, K.; Fried, M.; Furtado, P.; Gilbert, H., *Analytical ultracentrifugation: techniques and methods*. Royal Society of Chemistry: 2007.
306. Fissan, H.; Ristig, S.; Kaminski, H.; Asbach, C.; Epple, M., Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization. *Analytical Methods* **2014**, *6* (18), 7324-7334.
307. Klein, K.; Hayduk, M.; Kollenda, S.; Schmiedtchen, M.; Voskuhl, J.; Epple, M., Covalent Attachment of Aggregation-Induced Emission Molecules to the Surface of Ultrasmall Gold Nanoparticles to Enhance Cell Penetration. *Molecules* **2022**, *27* (6), 1788.
308. Stejskal, E. O.; Tanner, J. E., Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *The Journal of Chemical Physics* **1965**, *42* (1), 288-292.
309. Altieri, A. S.; Hinton, D. P.; Byrd, R. A., Association of Biomolecular Systems via Pulsed Field Gradient NMR Self-Diffusion Measurements. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (28), 7566-7567.