

Zusammenfassung

Der Prozess der Weiterleitung von Signalen ist einer der fundamentalsten Prozesse in der Natur überhaupt. Ohne die Fähigkeit, dass Zellen innerhalb eines Organismus miteinander kommunizieren können, wäre die Entstehung komplexer Lebensformen nicht möglich gewesen. Dieser defiziente Steuerungsapparat ermöglicht es erst, dass Lebewesen und deren Zellen auf äußere und innere Reize reagieren können und sich so an ihre Umwelt und Veränderungen in ihrer Umgebung anpassen können. Diesem, auch als Signaltransduktion bezeichneten Prozess, wird seit einigen Jahren große Aufmerksamkeit geschenkt. Allein die Anzahl der auf diesem Gebiet in Medizin und Chemie vergebenen Nobelpreise und die Anzahl an Veröffentlichungen, spiegeln die zentrale Bedeutung solcher Regulationsprozesse wider. Auf dem naturwissenschaftlichen Gebiet der künstlichen Signalleitung gibt es bisher nur einige wenige Beispiele, die diesen enorm wichtigen Prozess imitieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die ersten künstlichen Systeme zur Botenstoff-induzierten Signaltransduktion etabliert werden. Hierbei konnten alle drei Kriterien, die einen echten Signaltransduktionsprozess ausmachen, erfüllt werden. Die Erkennung eines primären Botenstoffs im extrazellulären Medium einer (künstlichen) Zelle, die Weiterleitung des Signals über die Doppelmembran in das Innere des abgeschlossenen Vesikels und die Antwort des Systems durch Freisetzung eines sekundären Botenstoffs in das intrazelluläre Kompartiment. Hierbei wurde das natürliche Vorbild der Rezeptortyrosinkinasen imitiert, bei dem es durch Annäherung zweier Transmembranrezeptoren, vermittelt durch Bindung eines primären Botenstoffs, zum Auslösen eines Signals im Inneren der Zelle kommt.

Das erste Ziel war die Synthese von Transmembranrezeptoren auf Basis von Lithocholsäure-Dimeren in Anlehnung an die Systeme von *Hunter* und *Maue*.^[1,2] Als Erkennungseinheiten wurden die literaturbekannten Bisphosphonatpinzetten der Arbeitsgruppe *Schrader* verwendet, die in der Lage sind, in gepufferter wässriger Lösung Amine im Mikromolaren Bereich zu binden. Auf Grundlage dieser Motive konnte ein membrandurchspannender Gerüstbaustein **65** synthetisiert werden, der nachfolgend mit verschiedenen *second messenger* Einheiten auf der intrazellulären Seite funktionalisiert werden konnte (Abbildung 1).

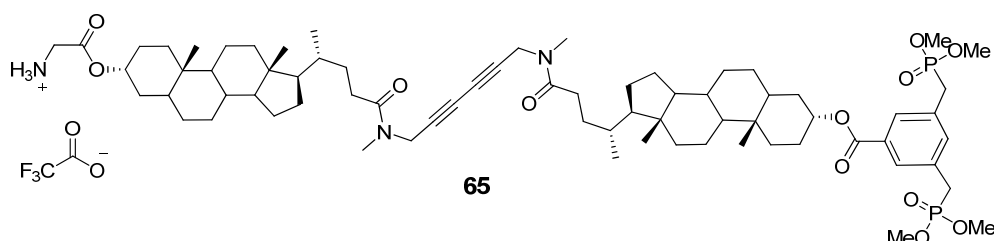


Abbildung 1: Lewissäurestruktur des transmembranen Gerüstbausteins **65** mit Bisphosphonat-Erkennungseinheit.

Als sekundäre Botenstoffe dienen verschiedene FRET-Paare (Abbildung 4), die nach Komplexierung des primären Botenstoffs im extrazellulären Medium und Verringerung des räumlichen Abstands der Rezeptoren in der Membran, die Weiterleitung des Signals in Form eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers detektierbar machen (Abbildung 2).

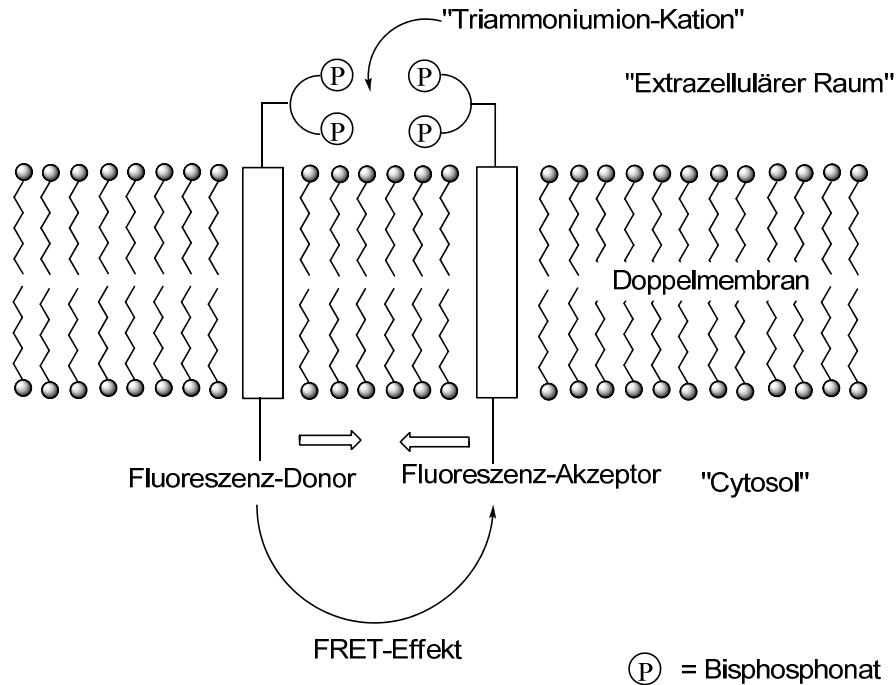


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Amin-induzierten transmembranen Signaltransduktion.

Erste Experimente wurden mit den Transmembranrezeptoren 83 und 67 mit einer Dotierung von je 2.5 % in DPPC-Liposomen durchgeführt. Durch dieses Rezeptorsystem konnte die allgemeine Anwendbarkeit des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers als *Read out* für die Botenstoff-induzierte Signaltransduktion bestätigt werden. Weiterführende Experimente zur Optimierung der Signalleitung und detaillierte Untersuchungen, die eine unidirektionale und transmembrane Natur der Signaltransduktion nachweisen konnten, wurden mit dem optimierten Rezeptorpaar 66 und 67 und DET als primärem Botenstoff durchgeführt (Abbildung 3).

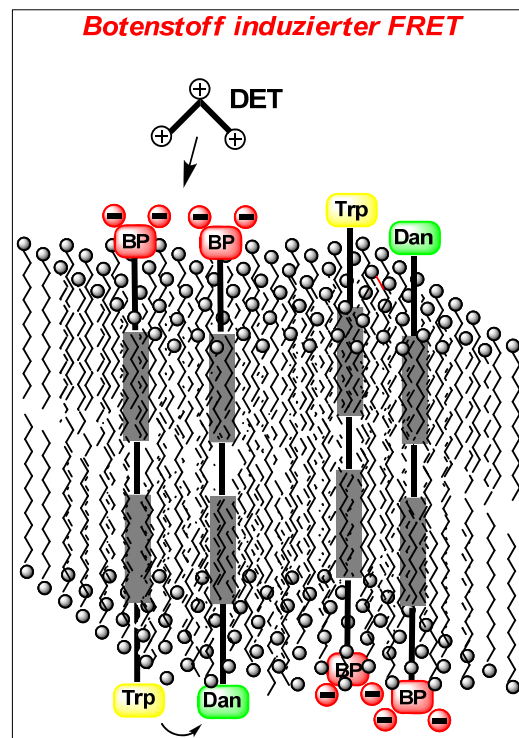


Abbildung 3: Signaltransduktion mit den Transmembranrezeptoren 66 und 67 in einer Lipiddoppelschicht

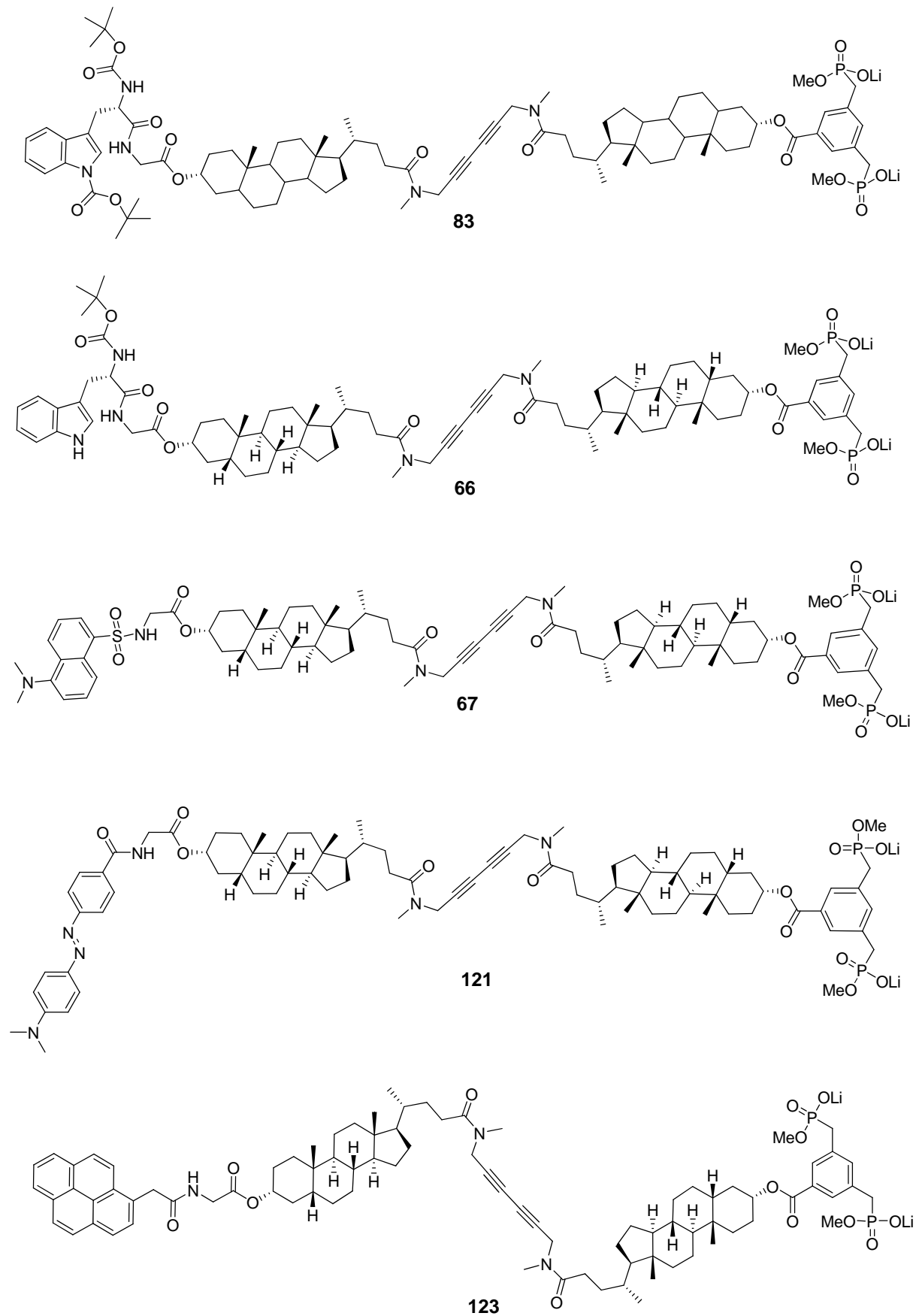


Abbildung 4: Lewissäurestrukturen der synthetisierten Transmembranrezeptoren der 1. Generation.

Durch die Verwendung von Gemischen unterschiedlicher Phosphatidylcholine (DMPC und DPPC) konnte für die Rezeptoren **66** und **67** eine optimierte Umgebung, bezüglich der Mobilität und Vororientierung, in der Membran geschaffen werden. Bei einem Mischungsverhältnis von DMPC/DPPC = 3:1 konnte für dieses System die maximale Signalleitung erreicht werden. Detaillierte Untersuchungen der Phasenübergangstemperaturen der verwendeten Lipidgemische mit Hilfe der Fluoreszenzsonde Laurdan (**24**) bestätigten, dass bei dem vorliegenden Mischungsverhältnis eine optimale Mobilität der Rezeptoren **66** und **67** in den Liposomen gewährleistet ist. Des Weiteren konnten detaillierte Informationen über den Einfluss der Rezeptoren auf die Doppelmembran der Liposomen erhalten werden.

Einer der kritischsten Punkte, der das Scheitern der transmembranen Signaltransduktion bedeutet hätte, ist in der konformativen Einlagerung der Rezeptoren auf Basis des dimeren Lithocholsäure-Grundgerüsts **65** in Lipiddoppelschichten begründet. Das Design der Rezeptoren ist zwar durch die starre Dialkinzentraleinheit auf eine gestreckte Konformation ausgelegt, doch bietet die Pentanamid-Seitenkette der Lithocholsäure-Derivate die Möglichkeit zur freien Rotation um die vorhandenen Einfachbindungen. Neben der favorisierten gestreckten Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** in die Lipiddoppelschicht (Abbildung

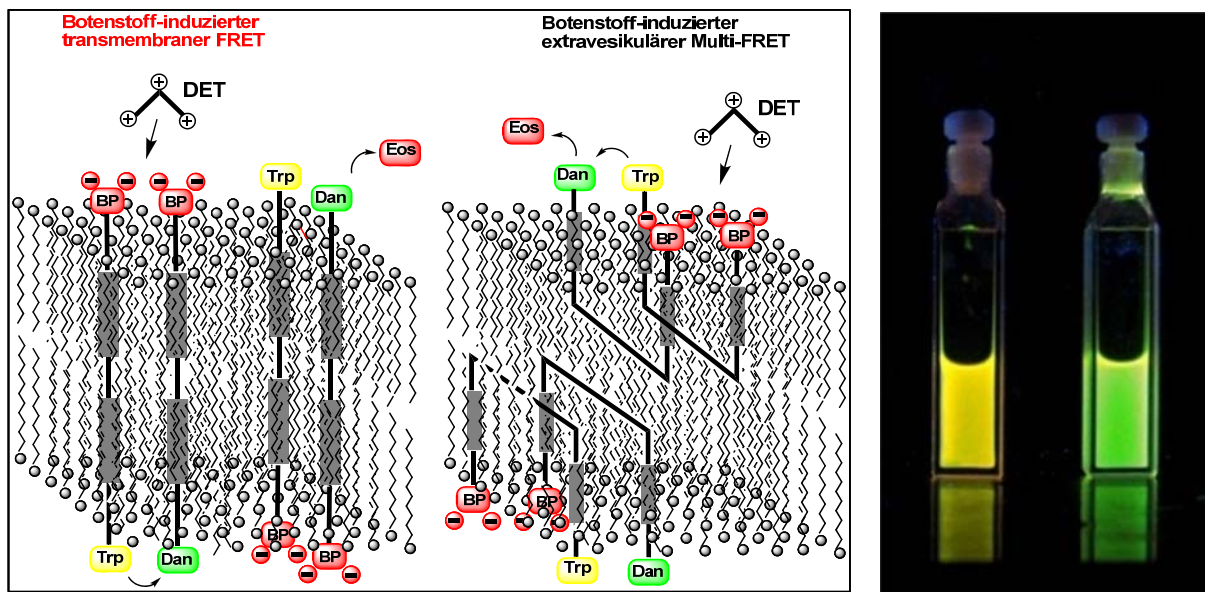


Abbildung 5: links: gestreckte Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** in die Doppelmembran; mitte: "U-förmige" Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** in die Doppelmembran; rechts: Naked Eye Detection des Signaltransduktionsprozess.

5 links) ist ebenfalls eine „U-förmige“ Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** in nur ein Blatt der Lipiddoppelschicht denkbar (Abbildung 5 mitte). Dieser Umstand hätte bedeutet, dass die Signalleitung nur auf der Außenseite der Membran stattfindet. Die gestreckte Einlagerung der Rezeptoren **66** und **67** und die damit verbundene transmembrane Natur der Signalleitung konnte durch den Einsatz einer zusätzlichen Fluoreszenzsonde, Eosin Y **112**, im extrazellulären Medium nachgewiesen werden. Eosin Y **112** bildet mit dem Rezeptor **67** ein wei-

teres FRET-Paar. Bei einer „U-förmigen“ Einlagerung der Transmembransegmente hätte es durch Zugabe des Botenstoffs DET zum Auftreten eines Multi-FRET-System kommen müssen (Abbildung 5 mitte). Im realen Experiment konnte ausschließlich die transmembrane Signalleitung, ohne Veränderung der Eosin Y-Emission, nach Zugabe des Botenstoffs DET, beobachtet werden. Als positiver Nebeneffekt dieses Experiments konnte die transmembrane Signalleitung durch einen Farbwechsel der Liposomenlösung für das bloße Auge sichtbar gemacht werden (Abbildung 5 rechts).

Der Nachweis, dass es sich bei der beobachteten Signalweiterleitung nicht nur um eine transmembrane, sondern auch um eine unidirektionale, d.h. die Erkennung des primären Botenstoffs erfolgt ausschließlich im extrazellulären Medium, Signaltransduktion handelt (Abbildung 6 links), konnte durch ein Experiment mit Liposomen erbracht werden, in die der Botenstoff DET eingeschlossen wurde (Abbildung 7). Durch Zusatz von Ninhydrin in

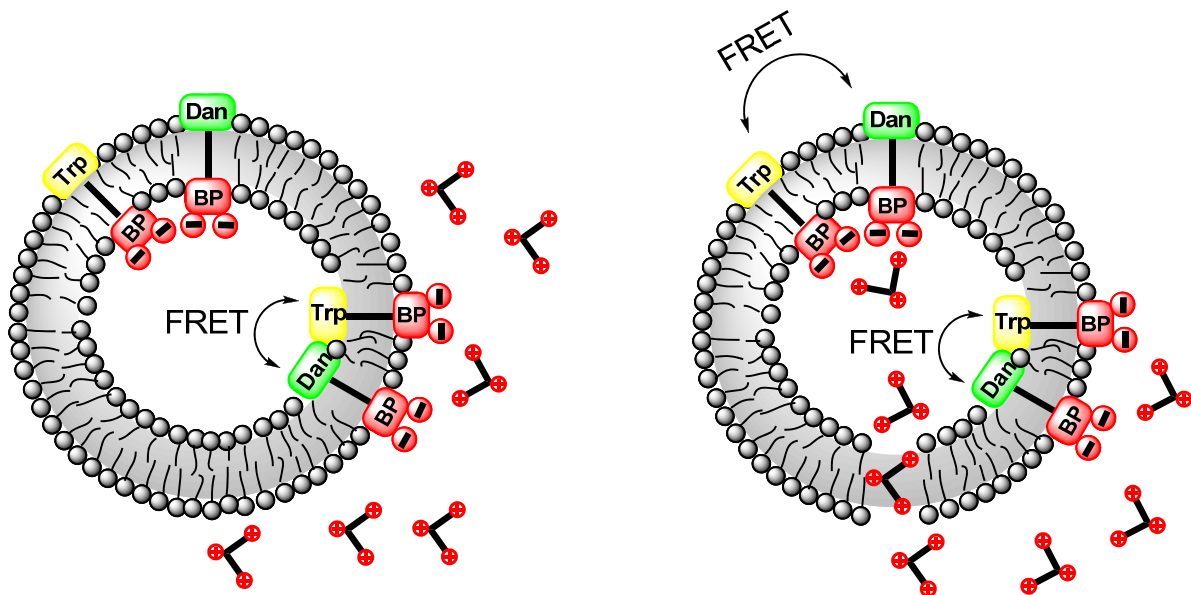


Abbildung 6: links: Unidirektionale Signalleitung bei einer für den Botenstoff nicht permeablen Membran; rechts: Ungerichtete Signaltransduktion im Fall eines membrangängigen Botenstoffs.

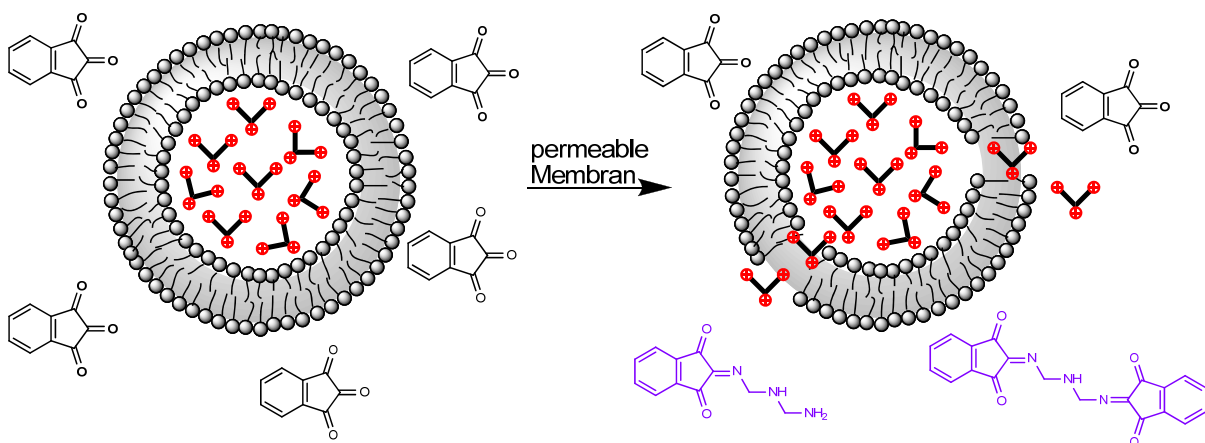


Abbildung 7: Nachweis der möglichen Membranpermeabilität von DPPC-Liposomen für den Botenstoff DET.

das extrazelluläre Medium der Botenstoff-gefüllten DPPC-Liposomen, hätte eine Permeabilität der Membran für den Botenstoff DET durch Bildung eines farbigen Komplexes sichtbar machen können (Abbildung 7). Diese hätte im Umkehrschluss bedeutet, dass auch die intrazellulären Bisphosphonatpinzetten zur Ausbildung des ternären Komplexes mit dem Botenstoff befähigt wären und die Signalleitung somit in beide Richtungen hätte stattfinden können.

Abschließend wurde noch ausgeschlossen, dass ein intervesikulärer Energie-Transfer eine erfolgreiche Signaltransduktion mit den Rezeptoren **66** und **67** vortäuscht (Abbildung 8). Durch eine chelatartige Verbrückung zweier unterschiedlicher Liposomen durch den Botenstoff DET sind theoretisch auf der Außenseite der Membran lokalisierte Fluorophore zu einem Energietransfer befähigt. Durch Separierung der Rezeptoren **66** und **67** auf zwei unterschiedliche Liposomen und anschließende Zugabe des primären Botenstoffs konnte dieser Umstand durch Detektion unveränderter Emissionsmaxima der Fluorophore ausgeschlossen werden.

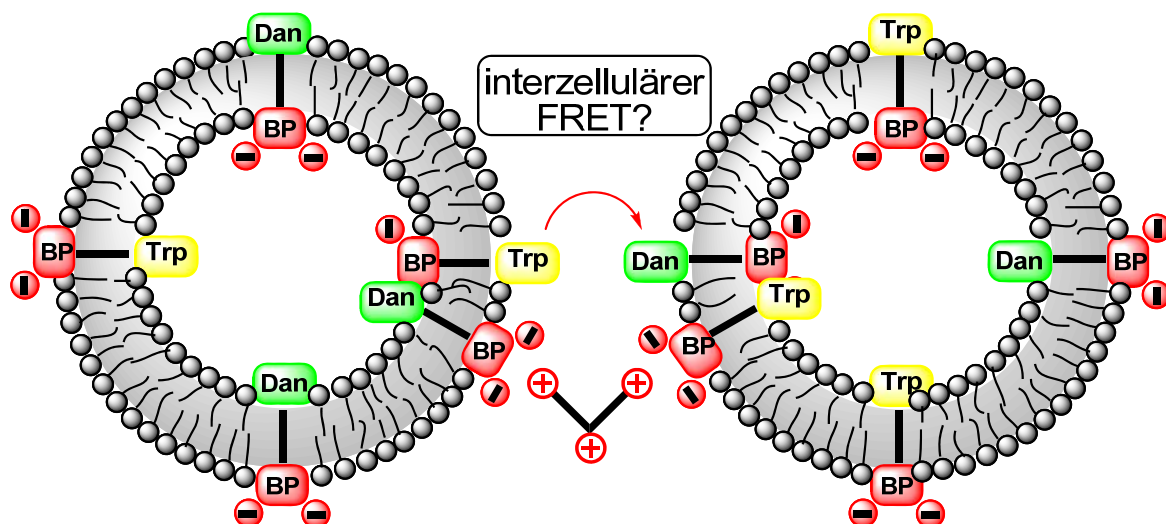


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines möglichen interzellulären Energie-Transfers.

Durch die gesamten Ergebnisse, die mit dem Modellsystem der Rezeptoren **66** und **67** erzielt wurden, ist das hochgesteckte Ziel, ein System zur ersten künstlichen, unidirektionalen und transmembranen Signaltransduktion zu etablieren, erfolgreich bewältigt worden. Diese positiven Ergebnisse konnten in zwei weiteren, unabhängigen Systemen, bestehend aus den Rezeptoren **67** und **121** bzw. dem Rezeptor **123** belegt und reproduziert werden (Abbildung 4). Beide Systeme gründen sich ebenfalls auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Energie-Transfers. Das System aus **67** und **121** nutzt allerdings die Löschung der Fluoreszenz-emission von **67** als Signaldetektion (Abbildung 9 links), da der Rezeptor **121** mit einem Fluoreszenz-Quencher funktionalisiert ist und das System, welches einzig aus dem Rezep-

tor 123 aufgebaut ist, die Bildung von Excimeren (angeregte Dimere) als Detektionsmethode (Abbildung 9 rechts).

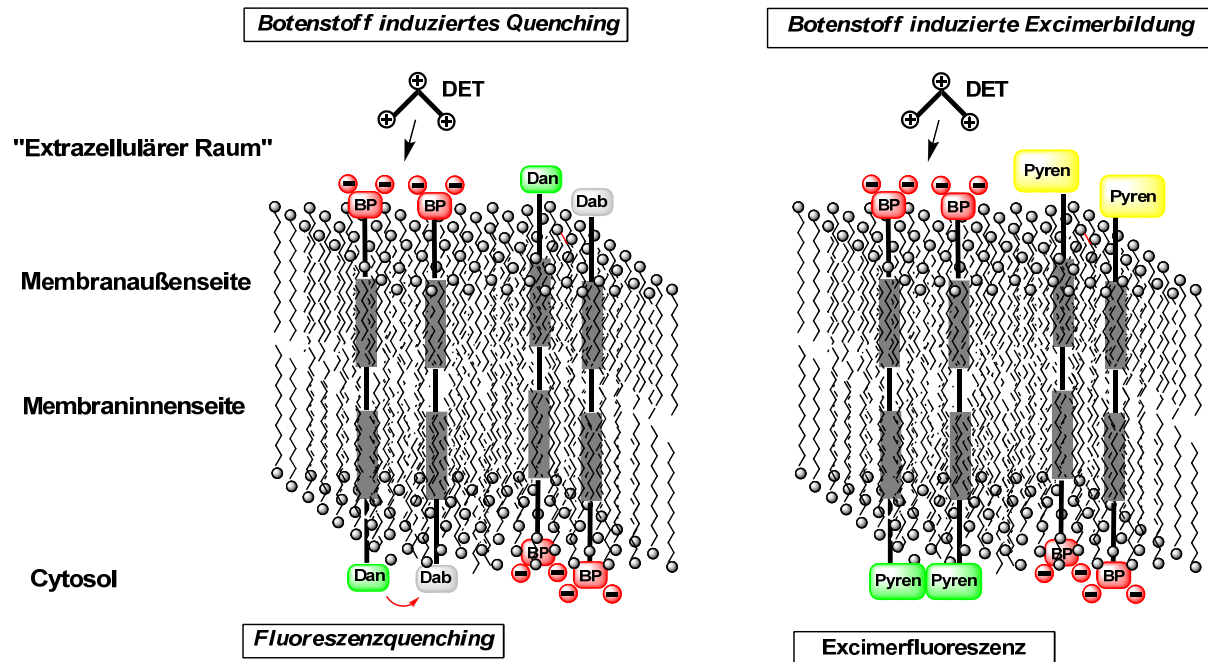


Abbildung 9: Alternative Rezeptorsysteme zur transmembranen Signalleitung; links: Donor-Quencher System mit den Rezeptoren 67 und 121; rechts: Excimer-System, aufgebaut aus dem Rezeptor 123.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte die allgemeine Anwendbarkeit der zuvor beschriebenen Modellsysteme auf ein System zu echten künstlichen Signaltransduktion, unter Abspaltung eines sekundären Botenstoffs, übertragen werden (Abbildung 10). Nach dem Vorbild von *Maue* wurden im ersten Teil dieses Projekts die Rezeptoren 138 und 139 synthetisiert. [1,3]

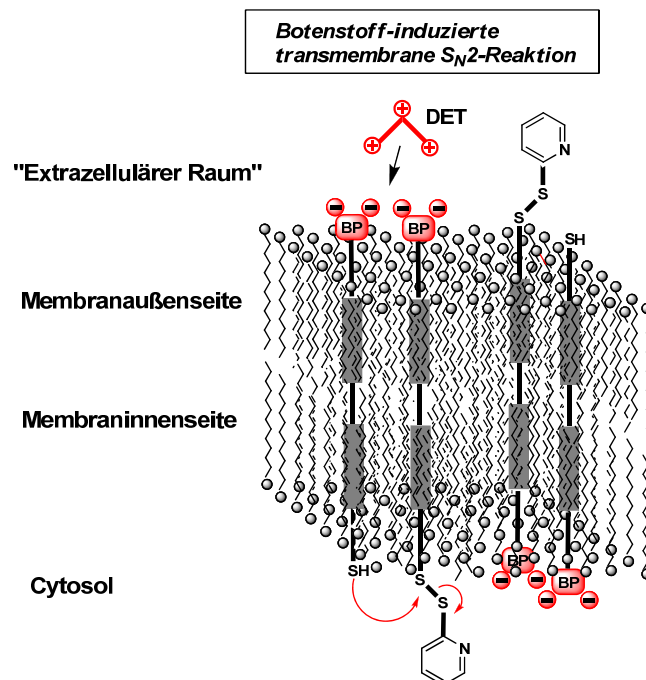


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Signaltransduktion mit den Rezeptoren 138 und 139.

Diese Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Analoga **138** und **139** der Transmembranrezeptoren nach *Maue*^[1,2] konnten, durch eine modifizierte Methode zur Liposomenpräparation unter Minimierung einer vorzeitigen Desaktivierung während der Liposomenpräparation, erfolgreich in Liposomen eingelagert werden (Abbildung 11). In dieser modifi-

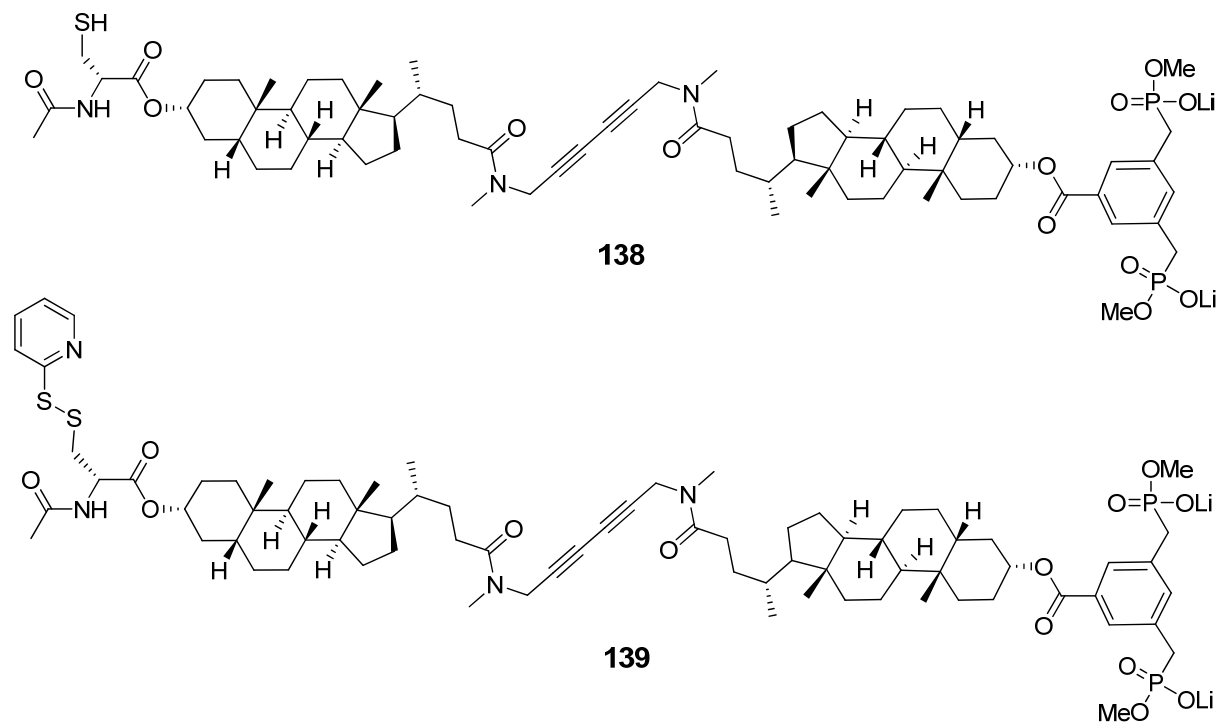


Abbildung 11: Lithocholsäure-*N*-methylpropargylamid-Analoga **138** und **139** der Transmembranbausteine **59** und **60** nach *Maue*^[1,3]

zierten Methode wurden die Bausteine **138** und **139** erst im eigentlichen Liposom vor der Extrusion vereinigt. Auch für das weiterentwickelte Rezeptorsystem **138-DET-139** konnte eine gerichtete, transmembrane Signaltransduktion durch Freisetzung des UV-aktiven sekundären Botenstoffs 2-Thiopyridin (341 nm) in das intrazelluläre Medium der Liposomen eindeutig nachgewiesen werden. Die ausschließlich extrazelluläre Erkennung des Botenstoffs DET konnte in dem vorangegangenen Experiment, unabhängig von den eingelagerten Rezeptoren, bewiesen werden. Der Nachweis, dass auch die Rezeptoren **138** und **139** in einer gestreckten Geometrie in das Liposom eingelagert sind, erfolgte über die Zugabe des Reduktionsmittels Triphenylphosphin-3,3,3-trisulfonsäure-trinatriumsalz (**146**) vor Zugabe des primären Botenstoffs DET. Durch das Reduktionsmittel **146** wurden im ersten Schritt die, durch die statistische Einlagerung der Rezeptoren **138** und **139**, auf der Außenseite der Membran befindlichen 2-Thiopyrineinheiten abgespalten. Bei einer „U-förmigen“ Einlagerung der Rezeptoren **138/139** in nur ein Blatt der Lipiddoppelschicht hätte dieser Schritt zu einer Desaktivierung des Systems führen müssen (Abbildung 12). Da auf Zugabe von DET

ein weiterer Signalanstieg durch Freisetzung von 2-Thiopyridin detektiert werden konnte, ist somit eine transmembrane Signalleitung auf direktem Wege bewiesen.

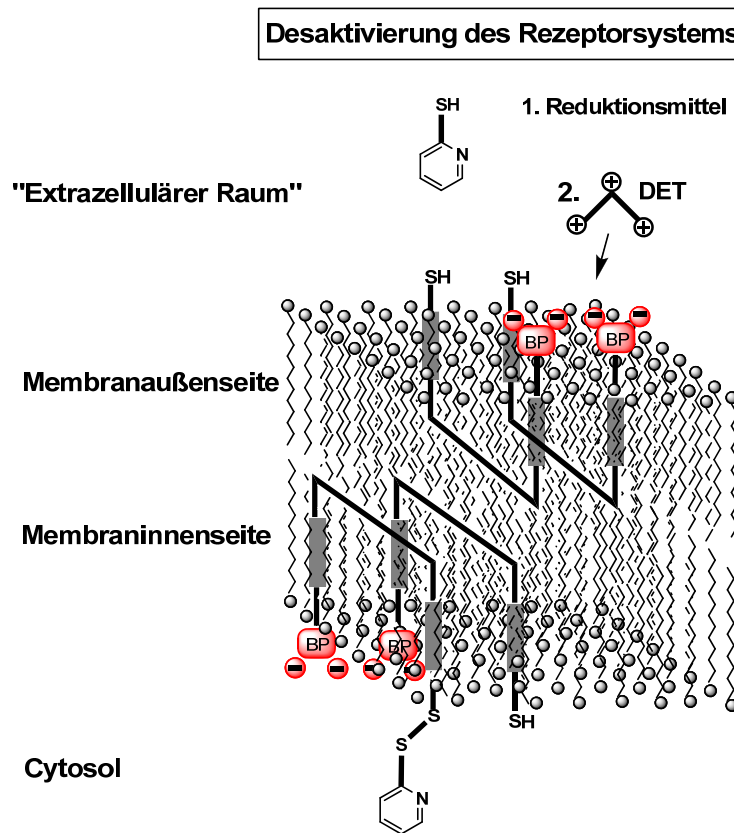


Abbildung 12: Bei "U-förmiger" Einlagerung der Rezeptoren 138 und 139 erfolgt durch Zugabe des Reduktionsmittels 146 eine Desaktivierung des Signaltransduktionssystems.

Der Ausschluss einer interzellulären Reaktion der Rezeptoren 138 und 139, aufgrund der statistischen Einlagerung in die Doppelmembran, konnte in einem analogen Experiment zu den Rezeptoren 66 und 67 erbracht werden. Die Zugabe des primären Botenstoffs DET zu einer Liposomenmischung, die jeweils nur mit einem der Rezeptoren 138/139 dotiert sind, führt zu keinem induzierten Signal (Abbildung 13).

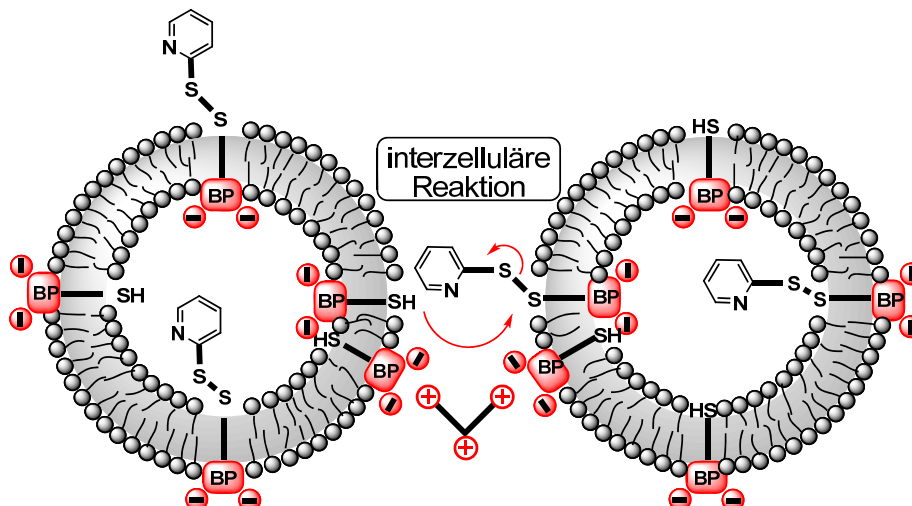


Abbildung 13: Mögliche interzelluläre Reaktion der Rezeptoren 138 und 139.

Alle vier, im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten Rezeptorsysteme weisen eine hohe Selektivität für kleine, kompakte nicht biogene Botenstoffe auf. Neben DET (Diethylentriamin), sind auch die Oligoamine EDA (**113**) (Ethylendiamin) und TREN (**114**) (Triethyltetramin) in der Lage die Signalleitung zu induzieren. Für sämtliche getesteten natürlichen Oligoamine, wie Spermin (**116**) und Spermidin (**115**), sowie auch die biogenen Peptide Di-, Tri-, Tetraarginine (**118**), (**119**), (**120**), Tetralysin (**117**) und Adrenalin (**10**) konnte in allen Fällen kein Signal detektiert werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit konnten Grundlagen für die Entwicklung einer neuen Generation von Transmembranrezeptoren gelegt werden. Um die Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion und das eigentliche Ziel der Botenstoff-induzierten Abspaltung eines sekundären Botenstoffs in einem System vereinen zu können, wurden nach Vorarbeiten von A. Dasgupta, die in Abbildung 14 dargestellten Rezeptormotive entwickelt.

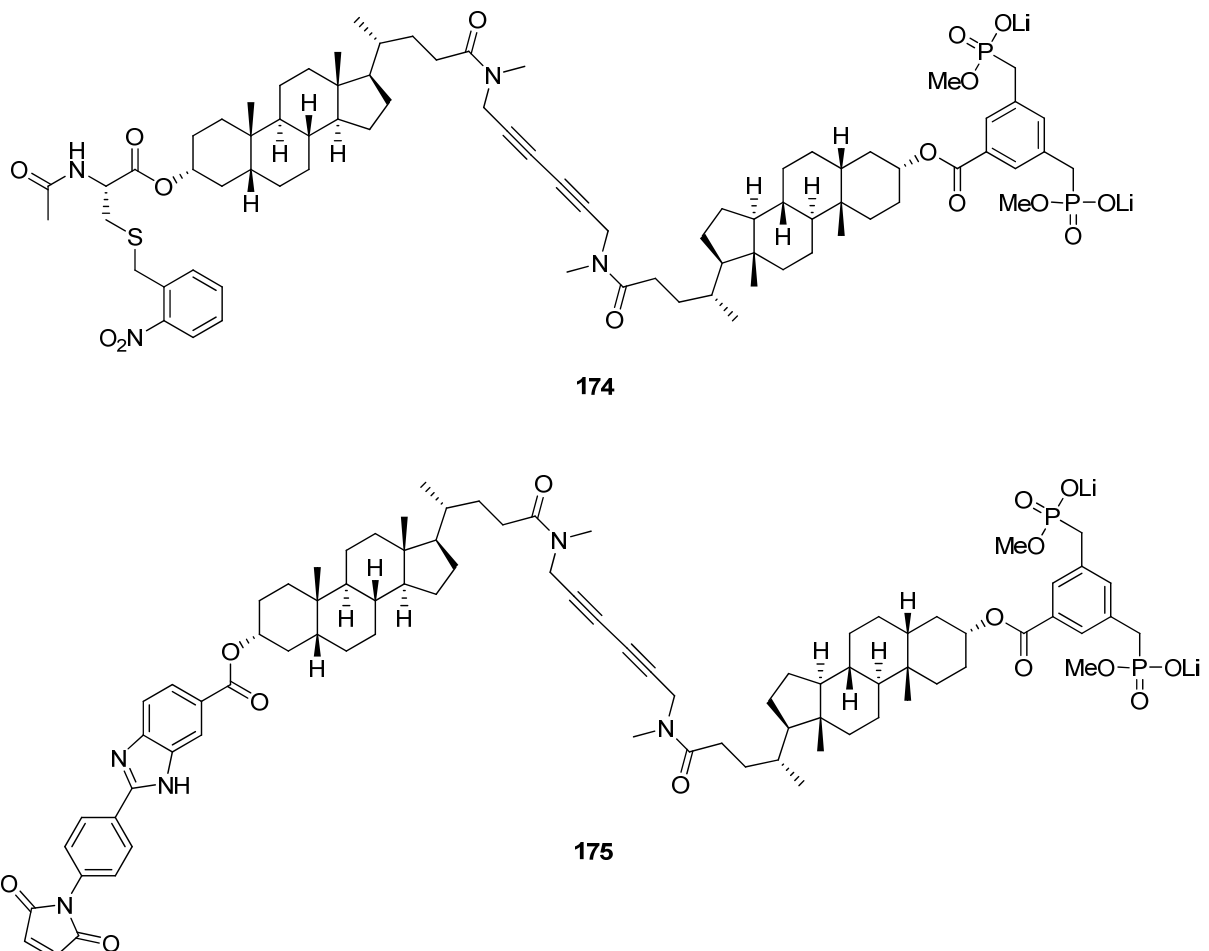


Abbildung 14: Rezeptormotive 174 und 175 einer neuen Generation von Transmembranrezeptoren.

Durch Einführung einer photolabilen Schutzgruppe am Rezeptor **174** kann eine vorzeitige Reaktion des Systems während der Liposomenpräparation vollständig unterbunden werden. Nach Freisetzung der freien Thiofunktion durch Bestrahlung mit UV-Licht kann dieser, nach Zugabe eines primären Botenstoffs, mit dem Michael-System des Rezeptors **175**,

unter Anschalten einer starken Fluoreszenz, reagieren. Die Synthese der Rezeptoren **174** und **175** konnte aufgrund synthetischer Probleme in den letzten Stufen der Synthese nicht bewerkstelligt werden.

Allerdings konnte ein Photolyse-Assay mit Hilfe der Modellverbindung **173**, nach dem Vorbild von *Smith et al.*, etabliert werden, mit dem es möglich ist, die *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe unter milden Bedingungen und kurzen Bestrahlungszeiten mit einer handelsüblichen UV-Lampe im Liposom abzuspalten (Abbildung 15).^[4,5]

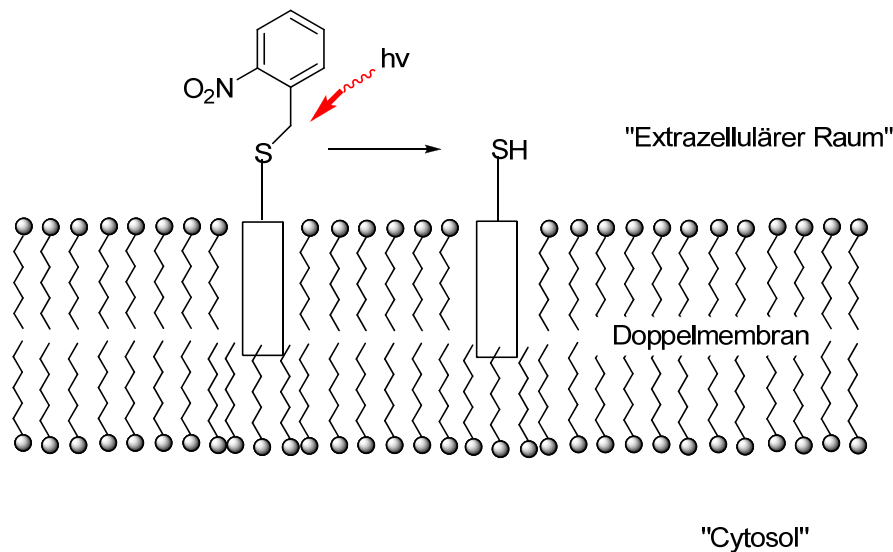


Abbildung 15: Milde Abspaltung der *o*-Nitrobenzyl-Photoschutzgruppe **173** im Liposom.

Zudem konnte eine effiziente Synthese der BIPM-Kopfgruppe der Rezeptors **175** entwickelt und im Grammmaßstab etabliert werden. Durch Untersuchungen der Modellverbindung **171** konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Anwesenheit von freien Thiolfunktion zu einer starken Fluoreszenzaktivierung führt und in Kombination mit der Photoschutzgruppe **173** ein für Folgearbeiten auf diesem Gebiet, vielversprechendes neues Rezeptorsystem darstellt (Abbildung 16).

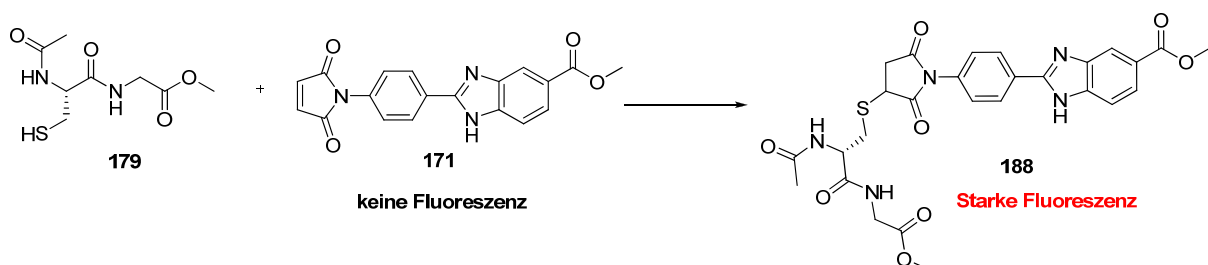


Abbildung 16: Fluoreszenzaktivierung der Rezeptorkopfgruppe **171**.

- [1] P. Barton, C. A. Hunter, T. J. Potter, S. J. Webb, N. H. Williams, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3878.
 - [2] M. Maue, Doktorarbeit, Philipps-Universität (Marburg), **2005**.
 - [3] T. Schrader, M. Maue, M. Ellermann, *J. Recept. Signal Transduction* **2006**, *26*, 473.
 - [4] A. B. Smith, III, S. N. Savinov, U. V. Manjappara, I. M. Chaiken, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4041.
 - [5] A. Dasgupta, (Essen), **2010**.
-

