

**Entwicklung neuer Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP) -  
Systeme für biologische und materialwissenschaftliche  
Anwendungen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Master of Science

**Dennis Aschmann**

geboren in Düsseldorf

Institut für Organische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

**2023**

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/78539

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230627-145012-3

Alle Rechte vorbehalten.

Die experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertationsschrift haben von Januar 2017 bis Juli 2020 in dem Institut für Organische Chemie an der Duisburg-Essen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Carsten Schmuck und Prof. Dr. Michael Giese stattgefunden.

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Essen, März 2023

---

Dennis Aschmann

Teile der Ergebnisse, die in dieser Dissertation diskutiert werden, wurden bereits publiziert:

- [1]** D. Aschmann, S. Riebe, T. Neumann, D. Killa, J.-E. Ostwaldt, C. Wölper, C. Schmuck, J. Voskuhl, *Soft matter* **2019**, *15*, 7117.
- [2]** C. Vallet, D. Aschmann, C. Beuck, M. Killa, A. Meiners, M. Mertel, M. Ehlers, P. Bayer, C. Schmuck, M. Giese et al., *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2020**, *59*, 5567.
- [3]** D. Aschmann, C. Vallet, S. K. Tripathi, Y. B. Ruiz-Blanco, M. Brabender, C. Schmuck, E. Sanchez-Garcia, S. K. Knauer, M. Giese, *Chembiochem: a European journal of chemical biology* **2022**, *23*, e202100618.

Gutachter: Prof. Dr. Michael Giese  
Prof. Dr. Jens Voskuhl

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Jochen Gutmann

Datum der Disputation: 01.06.2023



# DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof Dr. Carsten Schmuck, ohne ihn wäre all dies nicht möglich gewesen. Seine Gespräche und seinen Rat habe ich immer sehr geschätzt, sie haben meine Begeisterung für die Forschung maßgeblich geprägt. Des Weiteren möchte ich mich auch noch einmal dafür bedanken, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte und ihm auch das Zwischenmenschliche wichtig war.

Prof Dr. Michael Giese danke ich aus tiefsten Herzen dafür, dass er mich als Doktorand übernahm und die Rolle des Doktorvaters ausübte, als es Carsten nicht mehr möglich war. Ich habe den respektvollen Umgang, sowie die großartigen wissenschaftlichen Gespräche und Meetings sehr genossen. Immer wenn ich einen Rat brauchte, war er für mich da. Gerne denke ich an diese Zeit zurück.

Prof. Dr. Jens Voskuhl danke ich für unzählige Dinge. Ich bin dankbar dafür, dass er immer an mich geglaubt hat und dass er immer ein offenes Ohr hatte, wenn ich einen Rat brauchte, egal ob wissenschaftlich oder zwischenmenschlich. Darüber hinaus danke ich dafür, dass er mich in meinem weiteren Werdegang tatkräftig unterstützt hat. Auch danke ich ihn dafür, dass er das Zweitgutachten dieser Arbeit übernommen hat.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Shirley Knauer für ihre offene und herzliche Art und für die tollen Projekte, die wir zusammen publizieren durften.

Dr. Cecilia Vallet danke ich für eine fantastische Zusammenarbeit, die auf diese Art und Weise nicht selbstverständlich ist. Wir hatten viele konstruktive und wissenschaftliche Diskussionen. Ich kann nur sagen, dass ich die Zusammenarbeit sehr genossen habe und die freundschaftlichen Gespräche auch vermisse.

Ich danke Dr. Torsten Schaller für die Messung und Interpretationshilfe verschiedener NMRs, sowie Gudrun Heinrich und Werner Karow, die mich bei der Aufnahme, sowie MS-Analysen unterstützt haben. Viel Dank gilt auch Elisabeth Verheggen die mir immer im Labor ausgeholfen hat, wenn es nötig war. Besonderer Dank gilt all denen, die meine Tage über die Zeit mit tollen Konversationen erhellt haben, dazu zählen: Matthias Killa, Toni Hättasch, Pascal Naschenweng, Matthias Spengler, Michael Pfltscher, Maike Thiele, Elio Zellermann, Marcel Mertel, Steffen Riebe, Matthias Hayduk und Jan Balzuweit. Ebenfalls danke ich Tobias Hartung, der mich als Laborant zuverlässig im Labor unterstützt hat und durch seine positive Einstellung zu einem Freund geworden ist. Thorben Neumann und Dennis Killa danke ich für ihren Beitrag im Rahmen eines analytischen Praktikums und einer Vertiefungsarbeit. Tobias Hartung danke ich für die Arbeit die er als Azubi während meiner promotion geleistet hat.

Ein großer Dank geht ebenfalls an Ullrich Müller und Johanna Müller, die mit viel Geduld meine Arbeit Korrektur gelesen und mich immer wieder aufgebaut haben. Auch Alexander Höing danke ich für das Korrekturlesen des biologischen Teils meiner Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner ganzen Familie, meiner Mutter Marion Aschmann und meinem Vater Dirk Aschmann, die immer Vertrauen in mich hatten. Ebenso danke ich meiner Schwester Nadine Aschmann, die ebenfalls stets zur Seite stand. Ohne euch hätte ich all dies nie geschafft.



*„Im Grunde sind es doch die  
Verbindungen mit Menschen,  
die dem Leben seinen Wert  
geben.“*

**Wilhelm von Humboldt**





# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Modulation von Protein-Protein-Interaktionen.....	1
1.2	Hydrogele mit AIE-Eigenschaften.....	2
2	Stand der Forschung.....	4
2.1	Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP).....	4
2.1.1	Allgemein.....	4
2.1.2	Adressierung von Aminosäuren und kurzen Peptiden.....	5
2.1.3	Adressierung von Proteinoberflächen.....	8
2.2	Survivin.....	16
2.2.1	Struktur und funktionell relevante Bindungsstellen.....	17
2.2.2	Survivin als Mitglied des CPC und der Familie der IAPs.....	18
2.2.3	Survivin als Ziel in der Krebstherapie.....	20
2.3	Hydrogele.....	22
2.3.1	Supramolekulare Hydrogele: Klassifizierung.....	22
2.3.2	Supramolekulare Hydrogele: Mechanismen der Polymerisation.....	23
2.3.3	Anwendungen von supramolekularen Hydrogelen.....	26
2.3.4	Hydrogele mit AIE Eigenschaften.....	30
3	Zielsetzung.....	36
3.1	Modulation von Survivins Protein-Protein-Interaktionen.....	36
3.2	Entwicklung AIE basierter Hydrogelatoren.....	38
4	Ergebnisse und Diskussion.....	40
4.1	Entwicklung eines Inhibitors für die krebsrelevante Survivin-Histon H3-Interaktion.....	40
4.1.1	Synthese des GCP Bindungsmotives.....	40
4.1.2	Synthese des supramolekularen Liganden für die Adressierung des Histon H3-Bindestelle.....	41
4.1.3	Bindungsstudien.....	42
4.1.4	Biologische Studien.....	45
4.2	Unterscheidung zwischen der NES- und Histon-H3-Bindungsstelle von Survivin durch Modifikationen eines hemmenden Guanidiniocarbonylpyrrol-Liganden.....	50
4.2.1	Synthese des tetrakationischen supramolekularen Liganden für die Adressierung des Histon H3-Bindestelle.....	50
4.2.2	Synthese des tetrakationischen supramolekularen Liganden für die Adressierung des NES.....	51
4.2.3	Bindungsstudien.....	52

4.2.4	Biologische Studien .....	56
4.3	Responsiver supramolekularer Zweikomponenten-Hydrogelator mit AIE-Effekt .....	61
4.3.1	Synthese des AIE Hydrogelators.....	61
4.3.2	Bildung und Charakterisierung des Hydrogels .....	62
4.4	Entwicklung eines C <sub>3</sub> -symmetrischen lumineszenten Hydrogelators.....	76
4.4.1	Synthese des hexakationischen Hydrogelators.....	76
4.4.2	Untersuchung des Hydrogelators <b>53</b> .....	77
4.4.3	Untersuchung des Zwei-Komponenten Gels.....	79
5	Zusammenfassung und Ausblick .....	84
5.1	Entwicklung eines Inhibitors für die krebisrelevante Survivin-Histon H3-Interaktion.....	84
5.2	Unterscheidung zwischen der NES- und Histon-H3-Bindungsstelle von Survivin durch Modifikationen eines hemmenden Guanidiniocarbonylpyrrol-Liganden.....	85
5.3	Ein auf Stimuli ansprechender supramolekularer Zweikomponenten-Hydrogelator mit AIE-Effekt.....	86
5.4	Entwicklung eines C <sub>3</sub> -symmetrischen lumineszenten Hydrogelators .....	87
6	Summary and outlook .....	89
6.1	Development of an inhibitor for the cancer-relavant survivin-histone H3 interaction .....	89
6.2	Differentiation between the NES and histone H3 binding sites of survivin by modifications of an inhibitory guanidiniocarbonyl-pyrrole ligand.....	90
6.3	A stimuli-responsive supramolecular two-component hydrogelator with AIE effect .....	91
6.4	Development of a C <sub>3</sub> -symmetric luminescent hydrogelator .....	92
7	Experimenteller Teil .....	94
7.1	Allgemeine Anmerkungen .....	94
7.2	Methoden und Geräte.....	94
7.3	Biologische Methoden und Geräte .....	97
7.4	MD-Simulationen .....	99
7.5	Synthesen .....	101
7.5.1	Synthese des supramolekularen Liganden <b>48</b> .....	101
7.5.2	Synthese der supramolekularen Liganden <b>49</b> und <b>50</b> .....	107
7.5.3	Synthese des zweiarmigen Hydrogelators <b>51</b> .....	114
7.5.4	Synthese des dreiarmigen Hydrogelators <b>53</b> .....	119
8	Literatur.....	124
9	Curriculum Vitae .....	137
10	Anhang.....	140
10.1	Abkürzungsverzeichnis .....	140
10.2	<sup>1</sup> H-NMR-Spektren .....	144
10.3	<sup>13</sup> C-NMR-Spektren .....	148



# 1 Einleitung

Bereits im Jahr 1967 veröffentlichte Charles J. Pedersen einen Artikel, in dem er die Komplexierung von Metall-Ionen durch Kronenether beobachtete und beschrieb.<sup>[1]</sup> 20 Jahre später erhielten Charles J. Pedersen, Donald J. Cram und Jean-Marie Lehn den Nobelpreis "für ihre Entwicklung und Verwendung von Molekülen mit strukturspezifischen Wechselwirkungen von hoher Selektivität".<sup>[2]</sup>

Dies legte den Grundstein für ein neues Zeitalter der Chemie der nicht-kovalenten Wechselwirkungen, was dazu führte, dass eine Vielzahl neuer supramolekularer Systeme entwickelt wurde und sich so das Verständnis stetig verbesserte. Dadurch war es möglich, unzählbare Anwendungen für supramolekulare Moleküle zu erschließen, die auf dynamische Weise mit sich selbst oder anderen Verbindungen assemblieren können. Ebenso wurden auch Moleküle entwickelt, die höchst spezifisch andere Substanzen erkennen und binden können.<sup>[3]</sup>

Durch einfache und vielseitige Modifikationsmöglichkeiten solcher Verbindungen können verschiedene funktionelle Gruppen, wie Urea, Guanidin, Carbonsäuren und viele Andere in supramolekulare Systeme eingeführt werden. So sind Urea-haltige Verbindungen dafür bekannt Wasserstoffbindungen auszubilden und Guanidin dafür bekannt Carbonsäuren zu komplexieren.<sup>[4]</sup> Dies ermöglicht, für jegliches Anwendungsgebiet maßgeschneiderte Verbindungen zu entwickeln. Diese können spezifisch andere Strukturen erkennen, binden und durch Selbstassemblierung übergeordnete Strukturen bilden, welche in funktionalen Materialien enden können.<sup>[5]</sup>

## 1.1 Modulation von Protein-Protein-Interaktionen

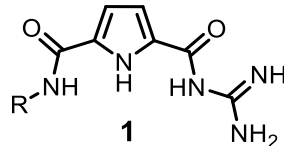
Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) sind an fast allen zellulären Prozessen (z.B. Zellproliferation, Zellteilung und programmierter Zelltod) beteiligt und für das menschliche Leben essentiell.<sup>[6]</sup> Sie spielen eine entscheidende Rolle bei verschiedenen pathologischen Zuständen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Neurodegeneration und Krebs<sup>[7,8]</sup> und stellen somit ein attraktives Ziel mit enormen therapeutischem Potenzial für die Behandlung von Krankheiten mit molekularen Ursachen dar.<sup>[9]</sup>

Proteine die katalytische Zentren aufweisen können durch modifizierte Substrate adressiert werden und diese irreversibel Binden, wodurch die Funktion des Proteins dauerhaft inhibiert wird. Da allerdings eine Vielzahl an Proteinen kein katalytisches Zentrum aufweist, mussten für die Modulation dieser Interaktionen neue Strategien entwickelt werden. Zu diesen zählen die Verwendungen von Gen- und Immuntherapien, Antisense-Oligonukleotide und siRNAs, wobei diese die Expression der Proteine reduzieren und somit nicht spezifisch eine Protein-Protein-Interaktion inhibieren.<sup>[10]</sup>

Zu diesem Zweck ist ein Ansatz aus der supramolekularen Chemie besonders vielversprechend, nämlich die Adressierung von Proteinoberflächen durch kleine supramolekulare Liganden. Vor mehr als 20 Jahren galt dies noch als unmöglich, da die Interaktionsdomänen aus großen hydrophoben und flachen Flächen ( $1500\text{--}3000 \text{ \AA}^2$ ) bestehen.<sup>[11]</sup> Mittlerweile hat dieses junge Feld schon einige vielversprechende Ergebnisse hervorgebracht, die eindeutig zeigen, dass es möglich ist, durch die Oberflächenadressierung spezifisch einzelne Protein-Protein-Interaktionen zu Partnerproteinen zu modulieren.<sup>[12,13]</sup>

Besonders aussichtsreich ist bei diesem Konzept die Adressierung sogenannter *Hot Spots*, diese sind meist an der Interaktionsdomäne der Proteinoberfläche lokalisiert und setzen sich aus einer Vielzahl

azidischer oder basischer Aminosäure zusammen.<sup>[14,15,16]</sup> Für die Adressierung anionischer *Hot Spots* (bestehend aus azidischen Aminosäuren) kann das von Schmuck *et al.* entwickelte Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP)-Bindungsmotiv verwendet werden. Dieses stellt ein mimetisches Arginin-Motiv dar, welches starke Bindungsaffinität zu Carboxylaten und Phosphaten in wässrigen Lösungen aufweist. Unter physiologischen Bedingungen ist das GCP-Motiv positiv geladen, was zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und verstärkten Ionenpaaren führt, die wesentlich stärker und spezifischer sind als die Bindung durch einfache Guanidinium-Kationen wie in Arginin.<sup>[17–19]</sup>



**Abb. 1:** Struktur des Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP)-Bindungsmotives (**1**).

In dieser Arbeit wird die Adressierung negativ geladener *Hot Spots* untersucht, um geeignete Leitstrukturen für die Adressierung von Proteinoberflächen zu entwickeln, sowie den Einfluss des Bindungsabstandes zwischen den GCP-Motiven zu untersuchen, und zu prüfen, ob durch *Fine Tuning* dieser Abstände eine Selektivität zwischen verschiedenen *Hot Spots* erreicht werden kann.

## 1.2 Hydrogele mit AIE-Eigenschaften

Ein weiteres Gebiet der supramolekularen Chemie befasst sich mit der Selbstorganisation kleiner Moleküle.<sup>[20]</sup> So können Verbindungen mit selbstkomplementären Bindungseinheiten diese erkennen, mit ihnen wechselwirken und nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip übergeordnete Strukturen bilden.<sup>[21]</sup> Diese bestimmen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, den äußeren Reizen und der Konzentration die Eigenschaften des gebildeten Materials auf makroskopischer Ebene.<sup>[22]</sup>

Diese Strukturen nehmen Größen im Micro- oder Nanogrößenbereich ein und sind in der Lage, große Mengen an organischen Lösungsmitteln (Organogele) oder wässrigen Medien (Hydrogele)<sup>[23,24]</sup> einzuschließen.<sup>[25]</sup> Solche Gele gehören der Klasse der *Soft Materials* an und finden Anwendung in der Pharmazie<sup>[26–28]</sup>, Biologie<sup>[29–32]</sup> und Materialchemie.<sup>[33–35]</sup> In diesem Zusammenhang spielen insbesondere Hydrogele eine entscheidende Rolle, da sie eine hohe Biokompatibilität aufweisen.<sup>[36,37]</sup>

Seit jüngster Zeit ist die Kombination von Hydrogelatoren mit Emissionseigenschaften von Relevanz (z.B. für zelluläre Bildgebung, Sensor-Materialien und optische Anwendungen)<sup>[38,39]</sup>, da klassischerweise die Einführung großer emissiver aromatischer Systeme in ein Hydrogel-Netzwerk aufgrund geringer Löslichkeit und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zu einer schnellen Auslöschung der Emission führt, die als *Aggregation Caused Quenching* (ACQ) bezeichnet wird.<sup>[40]</sup> Ein Ansatz zur Überwindung dieses Problems ist die Verwendung eines Phänomens, das von Tang *et al.* im Jahr 2001 beschrieben wurde.<sup>[41]</sup> Hier wird eine neue Klasse von emissiven Verbindungen beschrieben, die sich invers zu klassischen Luminophoren verhalten und nur im festen oder aggregierten Zustand eine erhöhte Emission zeigen, was als *Aggregation Induced Emission* (AIE) bezeichnet wird.<sup>[42]</sup>

Der Grund für dieses Verhalten ist die Einschränkung der intramolekularen Bewegung (RIM) oder intramolekularen Schwingung (RIV).<sup>[43]</sup> In Lösung sind die Verbindungen molekular gelöst und liegen hauptsächlich als Monomere mit vielen Freiheitsgraden vor, die absorbierte Energie in Bewegung und Schwingung umwandeln, was zu einem Verlust der Emissionseigenschaften führt. Im aggregierten oder

festen Zustand wirken diese Verbindungen als klassische Emitter, ohne die Emission aufgrund von  $\pi$ - $\pi$ -Kontakten zu quenchen. Diese so genannten AIE-Emitter waren seit mehr als einem Jahrzehnt Gegenstand von Studien und wurden für verschiedene Zwecke wie Lumineszenzvorrichtungen<sup>[44]</sup>, *Bio-Imaging*<sup>[45]</sup>, Sensorik sowie für supramolekulare Strukturen verwendet.<sup>[46]</sup>

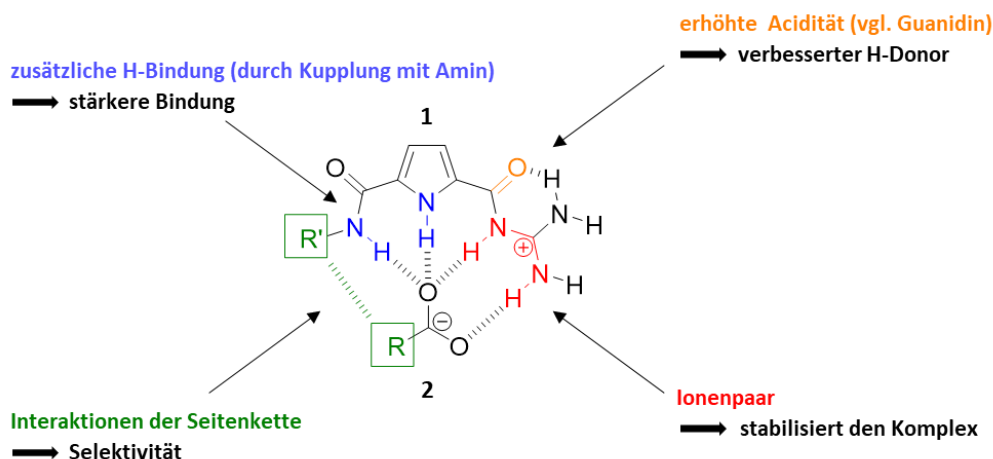
Allerdings gibt es nur wenige Beispiele für Hydrogel-Systeme mit AIE-Eigenschaften, die auf der Basis von zwei Komponenten hergestellt wurden und somit einen größeren Einfluss für die Modulation der makroskopischen Eigenschaften ermöglichen. Hier erweitern wir unseren Anwendungsbereich auf hocheffiziente Hydrogelatoren, indem wir das GCP-Bindungsmotiv mit aromatischen Thioethern (*AIE-Scaffold*) aus der Gruppe von Voskuhl kombinieren.<sup>[47]</sup> So wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich kationische Strukturen bilden, die in der Lage sind, weitere Carbonsäuren oder Metalle auf Grund der Vielzahl freier Koordinationsstellen zu binden. Daher erwarten wir, dass durch Zugabe von di- oder trivalenten Carbonsäuren oder Metall-Ionen die Strukturen quervernetzt werden, oder es zu strukturellen Änderungen führt. Da es bisher nur sehr wenige Beispiele für zwei Komponenten-Hydrogele gibt, hoffen wir so zu dem Verständnis beizutragen, wie eine zweite Komponente die Eigenschaften eines resultierenden Gels beeinflusst.

## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP)

#### 2.1.1 Allgemein

In physiologischen Systemen sind viele biologisch funktionell relevante Makromoleküle anionischer Natur, wie DNA oder auch Proteinoberflächen. Des Weiteren ist die Membran von Zellen ebenfalls negativ geladen. Daher ist die Entwicklung neuartiger kationischer Rezeptoren/Liganden für die selektive Komplexierung von Phosphaten, Sulfaten, sowie Carboxylaten von großem Interesse.<sup>[48]</sup> Ein prominentes Beispiel für eine relativ starke Komplexierung von Oxo-Anionen wird durch Guanidin repräsentiert, welches natürlich in der Aminosäure Arginin enthalten ist.<sup>[49]</sup> Die Bildung eines Komplexes findet über elektrostatische Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen statt.<sup>[50]</sup> Der dabei geformte Komplex zwischen Guanidin und Anion dissoziiert allerdings relativ leicht in DMSO und Wasser.<sup>[51]</sup> Um dieses Problem zu überwinden, entwickelte *Schmuck et al.* im Jahr 1999 erstmals eine neue Substanzklasse, das Guanidiniocarbonylpyrrol (kurz GCP), um Anionen effizienter binden zu können.<sup>[52,53]</sup> Dieses Bindungsmotiv ist relativ rigide und planar, was es ermöglicht, vor allem planare Anionen wie zum Beispiel Carboxylate besonders gut in wässrigen Medien zu komplexieren (Abb. 1).<sup>[53,54]</sup>



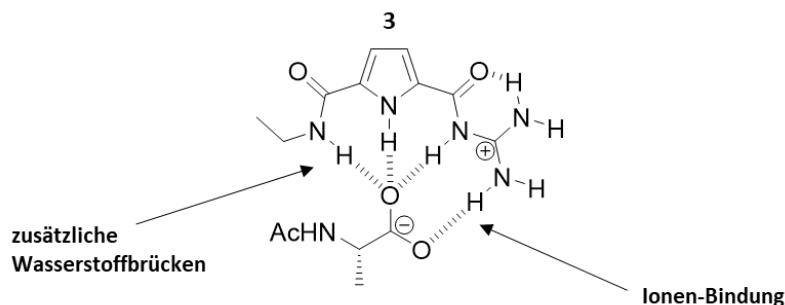
**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Bindung zwischen GCP 1 und eines Carboxylates 2.

In dem von *Schmuck et al.* entwickelten Bindungsmotiv GCP ist Guanidin über eine Acetyl-Gruppe mit dem Pyrrol-Kern verbunden, was zu einer Reduzierung des  $pK_s$  Wertes des freien Guanidines von 13.5 zu 6-7 ermöglicht. Dies verstärkt die Eigenschaft des Guanidines, als Wasserstoff-Donator zu fungieren.<sup>[55]</sup> Des Weiteren ermöglicht die zusätzliche intramolekulare Wasserstoffbrücke des Guanidines und der Acetyl-Gruppe eine Präorganisation, welche das Bindungsmotiv in die korrekte Konformation für die Bindung von Oxoanionen bringt. Zuletzt sei noch zu erwähnen, dass durch Variation des Restes ( $R'$ ) weitere attraktive Wechselwirkungen für beliebige Substrate eingeführt werden können, was zu einer erhöhten Spezifität führt. Dies führte in DMSO zu Bindungskonstanten von  $10^5 \text{ M}^{-1}$  zwischen GCP und Carboxylaten, und in wässrigen Medien konnten so ebenfalls starke Bindungen von  $10^3 \text{ M}^{-1}$  erzielt werden.<sup>[56,57]</sup>

## 2.1.2 Adressierung von Aminosäuren und kurzen Peptiden

In der supramolekularen Chemie ist die Guanidin-Gruppe bekannt, um spezifische nicht-kovalente Bindungen zu Substraten wie Aminosäuren, Enzymen, DNA und Proteinoberflächen auszubilden.<sup>[58]</sup> Daher wurde auch GCP hinsichtlich seiner überlegenen Bindungsaffinitäten zu Anionen als künstlicher Rezeptor sowie als Ligand für Biomoleküle untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten im Hinblick auf biologische Anwendungen unter physiologischen Bedingungen.

Dafür studierte *Schmuck et al.* im Jahr 1999 erstmals die Bindung des GCP Motives zu *N*-acetylierten Aminosäuren, welche Bindungskonstanten im Bereich von  $K_{\text{ass}} = 360 - 1700 \text{ mol}^{-1}$  in 40%  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ -Lösung aufwiesen (Abb. 2).<sup>[59]</sup> Dabei wurde festgestellt, dass die Selektivität für die Erkennung einzelner Aminosäuren von der Seitenkette der Aminosäuren abhängig ist. So wurde Phenylalanin wesentlich stärker gebunden als Alanin oder Lysin. Molekulares *Modelling* deutete darauf hin, dass der aromatische Ring des Phenylalanins durch Stapelwechselwirkungen mit dem Pyrrol-Ring stabilisierend wirkt.

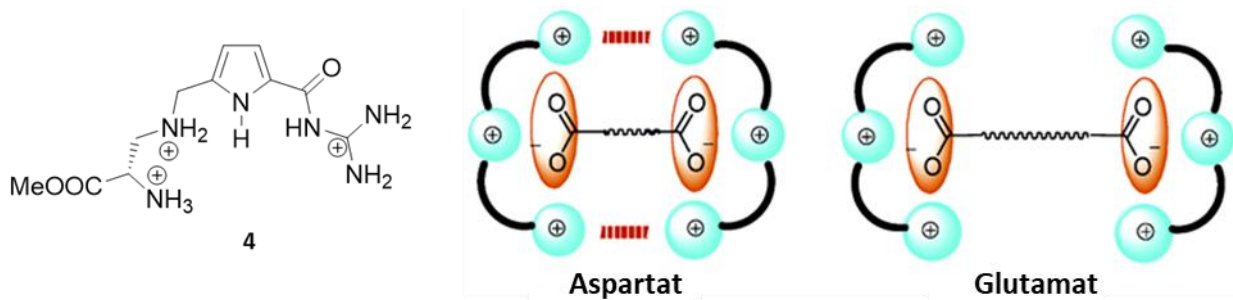


**Abb. 3:** Bindungsselektivität von **3** durch die Seitenkette von *N*-Acetylierten Aminosäuren.

Um ein besseres Verständnis über die Stärke der attraktiven Bindungsbeiträge zu erhalten, wurden nachfolgend systematische Variationen der GCP Struktur hergestellt.<sup>[53]</sup> Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Amidprotonen unmittelbar neben dem Pyrrol-Ring notwendig für eine starke Bindung zu den Carboxylaten sind, der Beitrag des Pyrrolprotons selbst ist hingegen schwächer. Zusätzlich sei zu erwähnen, dass ein Austausch des Pyrrol-Ringes gegen eine Pyridin-Einheit die Bindungsstärke stark schwächt, da ungünstige elektrostatische und sterische Effekte zum Tragen kommen. Dabei wird durch elektrostatische Repulsion zwischen dem freien Elektronenpaar des Stickstoffatoms im Pyridin und des Carboxylates der resultierende Komplex destabilisiert.<sup>[60]</sup>

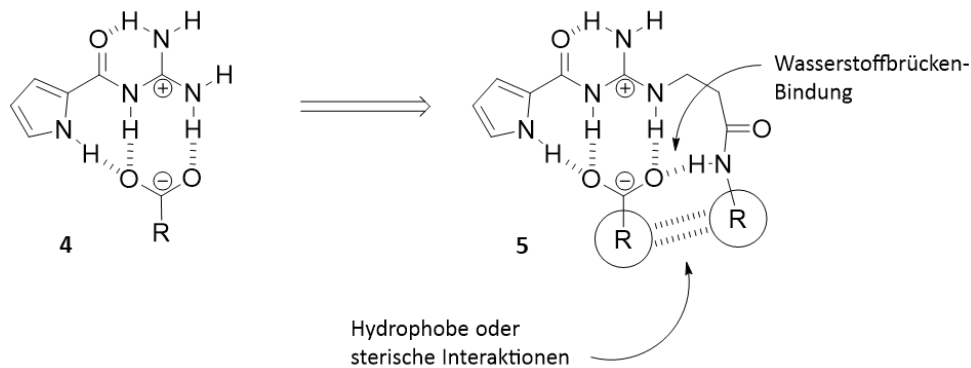
Durch die Einführung weiterer positiver Ladungen in **3** sollte gezeigt werden, dass dies zu einer zusätzlichen Stabilisierung des gebildeten Komplexes führt. So weist das nachfolgend entwickelte Tri-Kation **4** verbesserte Bindungseigenschaften zu Carboxylaten (von Aminosäuren) in wässrigen Puffersystemen im millimolaren Bereich auf.





**Abb. 4:** Seitenkettenselektive Bindung von N-acetyl Aminosäure Carboxylaten durch **4**. (Adapted with permission from C. Schmuck, L. Geiger, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 10486. Copyright 2005 American Chemical Society).<sup>[56]</sup>

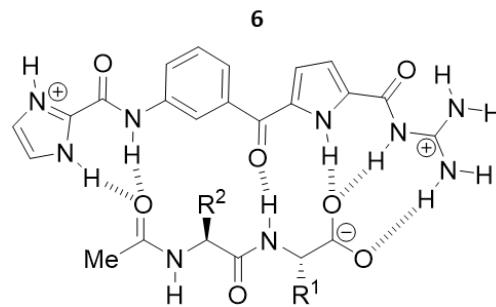
Dies führte zu einer Erhöhung der Bindungsstärke zu  $K_{\text{ass}} = 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Des Weiteren wurde für die Bindung zwischen N-Acetyl Glutamat und **4** festgestellt, dass eine kooperative 2:1 Komplexbildung vorliegt, wohin gegen für N-Acetyl Aspartat dieser Effekt nicht auftritt. Dies ist durchaus beachtlich, da sich die Struktur der beiden Aminosäuren lediglich in der Länge der Seitenkette um 1 Kohlenstoffatom unterscheiden. Erklärt wird dies über intermolekulare repulsive ionische Wechselwirkungen des Rezeptors **4** selbst, welche bei kurzen Kettenlängen wie bei Aspartat, aber nicht bei Glutamat auftreten können.



**Abb. 5:** Bindung von Carbonsäuren mit N'-substituierten guanidiniocarbonyl pyrrole **5**.

Außerdem sei noch erwähnt, dass zusätzliche Wechselwirkungen ebenfalls an der Rückseite von **3** eingeführt werden können, sowie durch N'-Substitution am Guanidin **5** (Abb. 5). N'-substituierte Guanidiniocarbonyl-pyrrole sind ebenfalls hervorragend geeignet, um Carboxylate zu komplexieren.

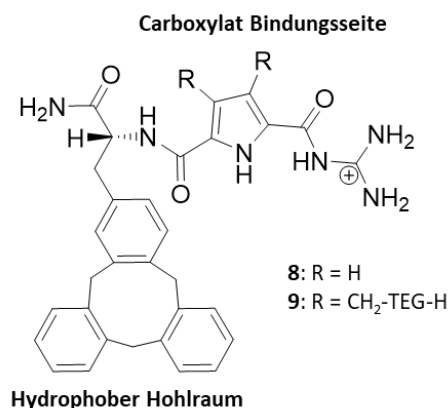
Nachdem gezeigt werden konnte, dass es möglich ist, biologisch relevante Carboxylate wie Aminosäuren komplexieren zu können, wurde in nachfolgenden Arbeiten die Adressierung von kurzen Peptiden realisiert. Kurze Peptide besitzen viele wichtige Funktionen in biologischen Systemen wie z.B. Bildung von Amyloiden, Zellsignalisierung und als Modulatoren von regulatorischen Prozessen usw. Die Entwicklung solcher neuartigen Rezeptoren für kurze Peptide könnte das Verständnis von biologischen Phänomenen, sowie die Wirkstoffentwicklung stark verbessern. So publizierte Schmuck *et al.* bereits im Jahr 2004 den ersten kationischen GCP-Prototypen **6** welcher in der Lage ist, verschiedene Dipeptide in wässriger Lösung 10 mal stärker zu komplexieren als einfache Aminosäuren ( $K_{\text{ass}} \approx (5-7) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) (Abb. 6).<sup>[61]</sup>



**Abb. 6:** Bindung eines Dipeptides durch den künstlichen Rezeptor **6**.

Dabei wurde zwischen dem Dipeptid Val-Val und **6** eine Bindungskonstante von  $54,300 \text{ M}^{-1}$  erzielt, wohingegen das Dipeptid Gly-Gly nur eine Affinität von  $15,900 \text{ M}^{-1}$  zu **6** aufwies. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass die Stabilitätssteigerung der gebildeten Komplexe von der Länge der Seitenkette abhängt und die Stabilität bei Gly < Ala < Val ist. Dies erscheint zunächst erstaunlich, da der Rezeptor keine spezifischen Bindungstaschen für die Interaktion zu den Seitenketten der Aminosäuren aufweist. Die Zunahme der Stabilität in dieser Reihenfolge steht jedoch in guter Übereinstimmung sowohl mit der abnehmenden Flexibilität des Peptids als auch mit der zunehmenden Hydrophobie der Seitenketten. Zum Beispiel ist bekannt, dass Valin Peptidkonformationen induziert, welche die Bildung von  $\alpha$ -Faltblattstrukturen begünstigt.<sup>[62]</sup> Da die Interaktionen innerhalb des Komplexes mit **6** denen einer  $\alpha$ -Faltblattstruktur ähnlich sind, ist es nicht überraschend, dass Val-Val besser gebunden ist als Ala-Ala bzw. Gly-Gly. Darüber hinaus schirmen die Isopropyl-Seitenketten innerhalb des Komplexes die H-Bindungen zwischen den Hauptkettenamiden wirksam vom umgebenden Lösungsmittel ab, wodurch die Stärke der H-Brücken erhöht wird.

Die weitere Einführung einer hydrophoben Gruppe wie Naphthyl und zusätzliche Aminosäurereste zeigten eine bevorzugte Komplexierung von *N*-Acetyldipeptid-Carboxylaten, die Alanin am C-Terminus enthalten.<sup>[63]</sup> Dafür verbanden Schmuck *et al.* cyclotribenzylen-substituiertes Alanin mit dem GCP-basierten Rezeptor (Abb. 7). Dabei spannt das Cyclotribenzylen einen hydrophoben schüsselförmigen Hohlraum auf, welcher gerade groß genug ist, um eine Methylgruppe zu binden, aber keine sterisch anspruchsvolleren Seitenketten, wie z.B. von Valin. Dies hatte zur Konsequenz, dass Ac-D-Ala-D-Ala-OH 10-mal stärker komplexiert wurde als das Dipeptid Ac-D-Val-D-Val-OH. Dies ist durchaus beachtlich, da der synthetisierte Rezeptor durch *de novo design* und nicht durch ein Screening einer Bibliothek von Rezeptoren entstanden ist.

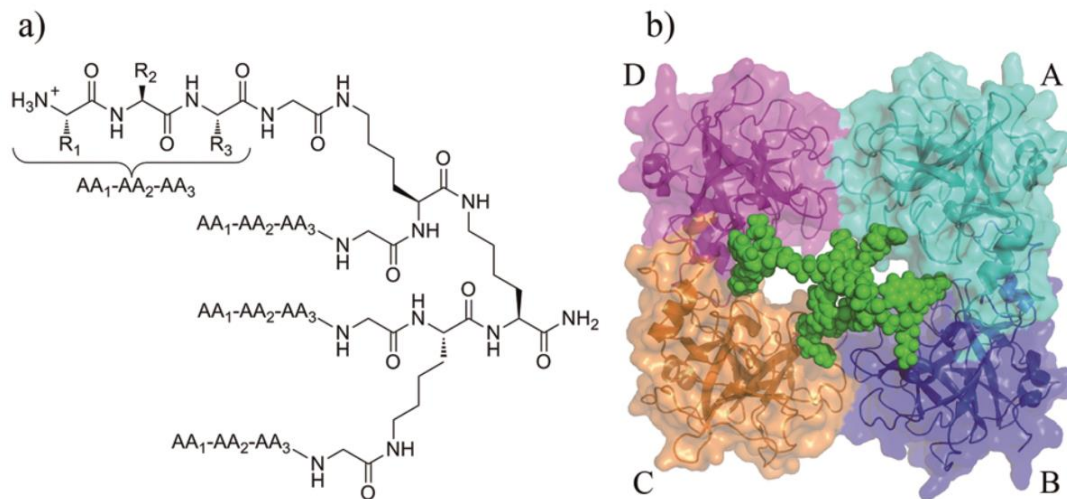


**Abb. 7:** Künstliche Rezeptoren **8** und **9** für die Bindung von Peptiden mit der Aminosäure Alanin.

### 2.1.3 Adressierung von Proteinoberflächen

Zu den wichtigsten biologischen Makromolekülen einer Zelle gehören neben DNS, RNS, Lipiden und Kohlenhydraten auch Proteine.<sup>[64]</sup> Proteine spielen eine zentrale Rolle in allen Aspekten der zellulären Funktion einschließlich des Stoffwechsels, der Informationsverarbeitung, der Entscheidungsfindung, des Transports und der strukturellen Organisation.<sup>[65]</sup> Dabei üben Sie meist ihre biologische Rolle als Bestandteile von Komplexen aus, da ihre Funktion durch spezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen bestimmt wird. Diese Wechselwirkungen werden als Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) bezeichnet und wurden im Jahr 1906 von *Hedin* zwischen Trypsin und Antitrypsin erstmals beschrieben.<sup>[65,66]</sup> Die Anzahl aller PPIs im menschlichen Körper wird als humanes Interaktom wiedergegeben, welches geschätzte 650000<sup>[67]</sup> Interaktionen umfasst und sich aus 20000<sup>[68]</sup> nichtmodifizierten Proteinen (Wert könnte 100-fach größer sein, wenn modifizierte Proteine berücksichtigt werden)<sup>[69]</sup> zusammensetzt. Da PPIs an fast allen zellulären Prozessen (z.B. Zellproliferation, Zellteilung und programmierter Zelltod)<sup>[6-8,70]</sup> beteiligt sind, stellen sie ein attraktives Ziel mit massivem therapeutischem Potenzial für die Behandlung von Krankheiten mit molekularen Ursachen dar.<sup>[9]</sup>

Auch Proteinoberflächen weisen negativ geladene Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure, Phosphorthreonin) auf, weshalb das kationische GCP Motiv exzellent geeignet ist, um diese zu adressieren. Der Ansatz, mit kleinen supramolekularen Liganden Proteinoberflächen zu adressieren, rückt dabei immer mehr in den Fokus aktueller Forschungen.<sup>[6,16,71]</sup> Auch Schmuck *et al.* berichteten daher über eine Reihe von GCP-haltigen Verbindungen, die durch unterschiedliche Ansätze identifiziert wurden und interessante Eigenschaften bei der Adressierung von Proteinoberflächen zeigten.



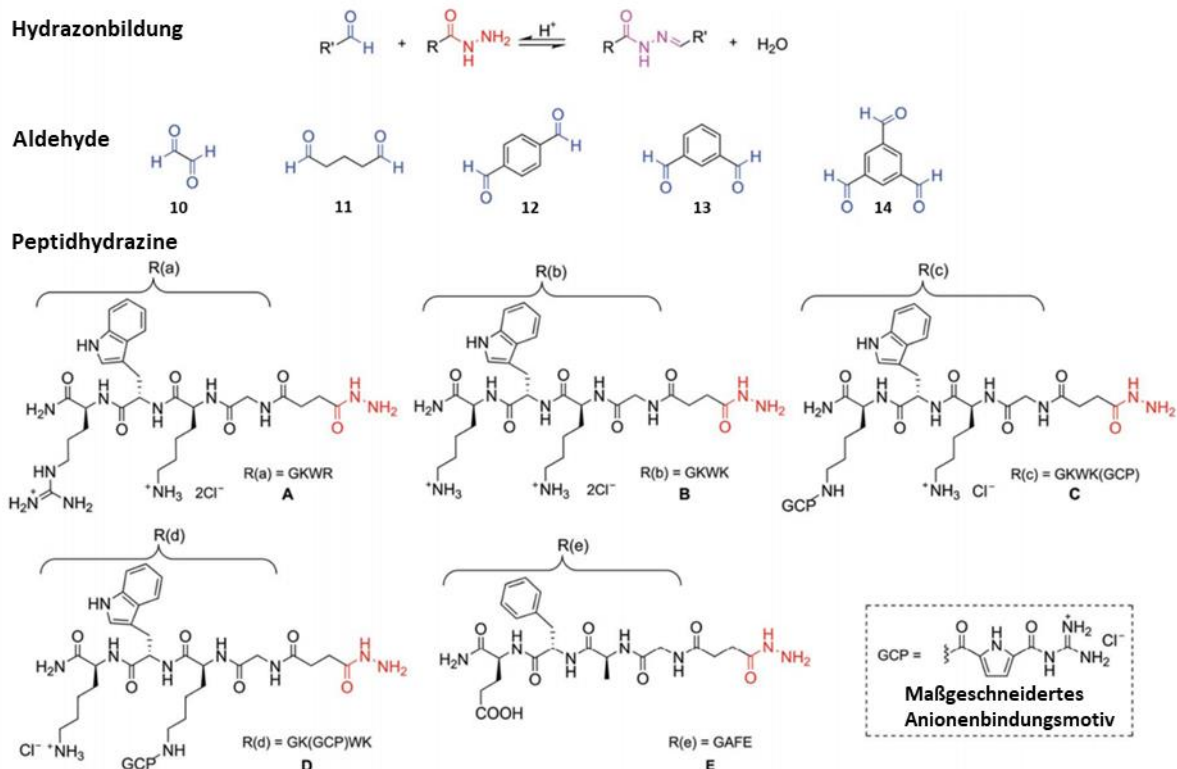
**Abb. 8:** (a) Eine kombinatorische Bibliothek von 216 tetraivalenten Peptid-Inhibitoren. Sechs verschiedene Aminosäuren (Ala, Arg, Glu, Lys, Phe, Trp) wurden in den variablen Tripeptidpositionen verwendet, und potente Inhibitoren wurden in einem Hochdurchsatz-Screening identifiziert. (b) Tetramerische Struktur der  $\beta$ -Trypsin (PDB-Code: 1AOL). Jeweils zwei Monomere (A und C, B und D) sind in der gleichen Orientierung angeordnet. Kraftfeldberechnungen bestätigten, dass der Inhibitor (RWKG)<sub>4</sub> (grün) an die Oberfläche des Proteins binden kann und als dichter "molekularer Pfropfen" fungiert, der die zentrale Pore verschließt und so den Zugang zu den aktiven Zentren blockiert.<sup>[74]</sup>

Zu diesem Zweck wurde GCP erstmalig eingesetzt, um das Protein  $\beta$ -Trypsin zu adressieren. Es handelt sich um ein tetramerisches Enzym, welches die vorherrschende Serinprotease in menschlichen Mastzellen ist und wird für mehrere allergische sowie entzündliche Erkrankungen verantwortlich

gemacht.<sup>[72]</sup>  $\beta$ -Tryptase setzt sich aus vier identischen Untereinheiten zusammen, die durch Heparin stabilisiert werden.<sup>[73]</sup> Die Untereinheiten nehmen dabei eine  $A_2B_2$ -Anordnung ein, wobei sich A und B lediglich in ihrer Orientierung im Proteinkomplex unterscheiden (Abb. 8B).

Dafür entwickelte Jiang *et al.* eine Reihe von sechs neuen tetravalenten Liganden mit zwei verschiedenen Peptidarmen, welche an die Oberfläche von  $\beta$ -Tryptase binden (Abb. 8 (a)). Neben proteinogenen Aminosäuren wurde auch das GCP-Kation als künstliches Argininanalogon in die Arme der Liganden eingeführt, um seinen Einfluss auf die Proteinoberflächenbindung und die Enzymhemmung zu untersuchen. Des Weiteren wurden vier Liganden mit vier identischen Armen, die ebenfalls die GCP-Gruppe enthielten, zusätzlich synthetisiert, um den Einfluss des GCP-Anteils auf die Inhibitionseigenschaften im Vergleich zu verwandten Liganden zu untersuchen. Der beste Ligand aus dieser Serie  $(RWKG)_2(GCP-LFG)_2$  enthält die künstliche GCP-Gruppe und ist tatsächlich mit einem  $K_i$ -Wert von 67 nM um zwei Größenordnungen effizienter als der analoge Ligand  $(RWKG)_2(RLFG)_2$ , der ausschließlich von proteinogenen Aminosäuren abgeleitet ist.<sup>[74]</sup> Daher sind vierarmige Liganden mit zwei verschiedenen Armen effiziente Inhibitoren für  $\beta$ -Tryptase, und die künstliche GCP-Gruppe kann die Bindungsaffinität dieses Ligandentyps an das Protein verbessern, was den Vorteil maßgeschneiderter Bindungsmotive zur Erhöhung der Affinität demonstriert.

Um noch effizientere Inhibitoren für das Protein  $\beta$ -Tryptase zu finden, verwendeten Jiang *et al.* eine vor-equilbrierte dynamische kombinatorische Bibliotheken, die auf dem Acylhydrazon-Austausch von Peptid-abgeleiteten Hydraziden und Di- und Tri-Aldehyden basieren, um potente Inhibitoren mit nanomolaren Affinitäten für  $\beta$ -Tryptase zu entwickeln (Abb. 9).<sup>[75]</sup>

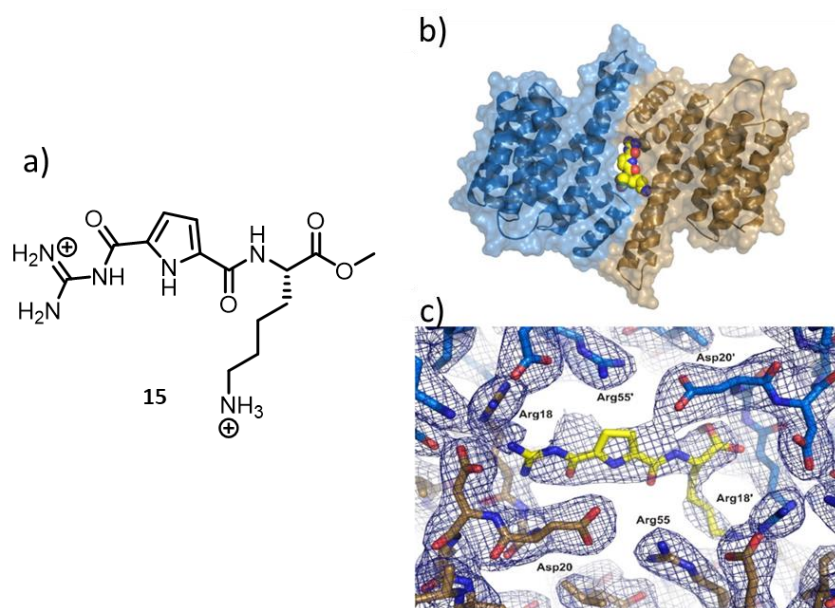


**Abb. 9:** Molekülstrukturen der Aldehyde (10-14) und der von Peptiden abgeleiteten Hydrazide (A-E, einschließlich der Kurznamen der Peptidarme), die als Bausteine für die auf Hydrazon basierenden dynamischen kombinatorischen Bibliotheken ausgewählt wurden. Die fünf Quasi-Peptidarme werden mit R abgekürzt, mit den verwandten Verbindungsbezeichnungen R(a)-R(e).<sup>[75]</sup>

Um potente Inhibitoren zu identifizieren, wurde die Aktivität der gesamten Bibliothek, welche 95 Mitgliedern enthält, mit Subbibliotheken verglichen, in denen jeweils einzelne Bausteine fehlten. Die aktivsten Bibliotheksmitglieder enthalten ein starres zentrales aromatisches Gerüst mit drei kationischen Peptidarmen. Die Arme der besten Inhibitoren enthielten auch ein maßgeschneidertes GCP-Oxoanion-Bindungsmotiv, das an eine Lysinseitenkette gebunden war. Die stärksten dreiarmligen Hydrazone mit den Peptidarmen GKWR oder GKWK(GCP) inhibierten die  $\beta$ -Tryptase ( $K_i$  ca. 10-20 nM) reversibel, nicht kompetitiv und selektiv (im Vergleich zu verwandten Serinproteasen, z.B. Trypsin und Chymotrypsin), höchstwahrscheinlich durch Bindung an die Proteinoberfläche, was in Übereinstimmung mit molekularen Modellrechnungen steht.<sup>[75]</sup> Diese neuen Inhibitoren sind um eine Größenordnung effizienter als verwandte tetravalente Inhibitoren, die aus früheren Arbeiten<sup>[74]</sup> durch eine split-mixkombinatorischen Bibliothek gewonnen wurden und mit wesentlich geringerem Aufwand identifiziert werden konnten. Ebendies demonstriert die Nützlichkeit dieses Ansatzes für die Identifizierung von Enzyminhibitoren.<sup>[76]</sup>

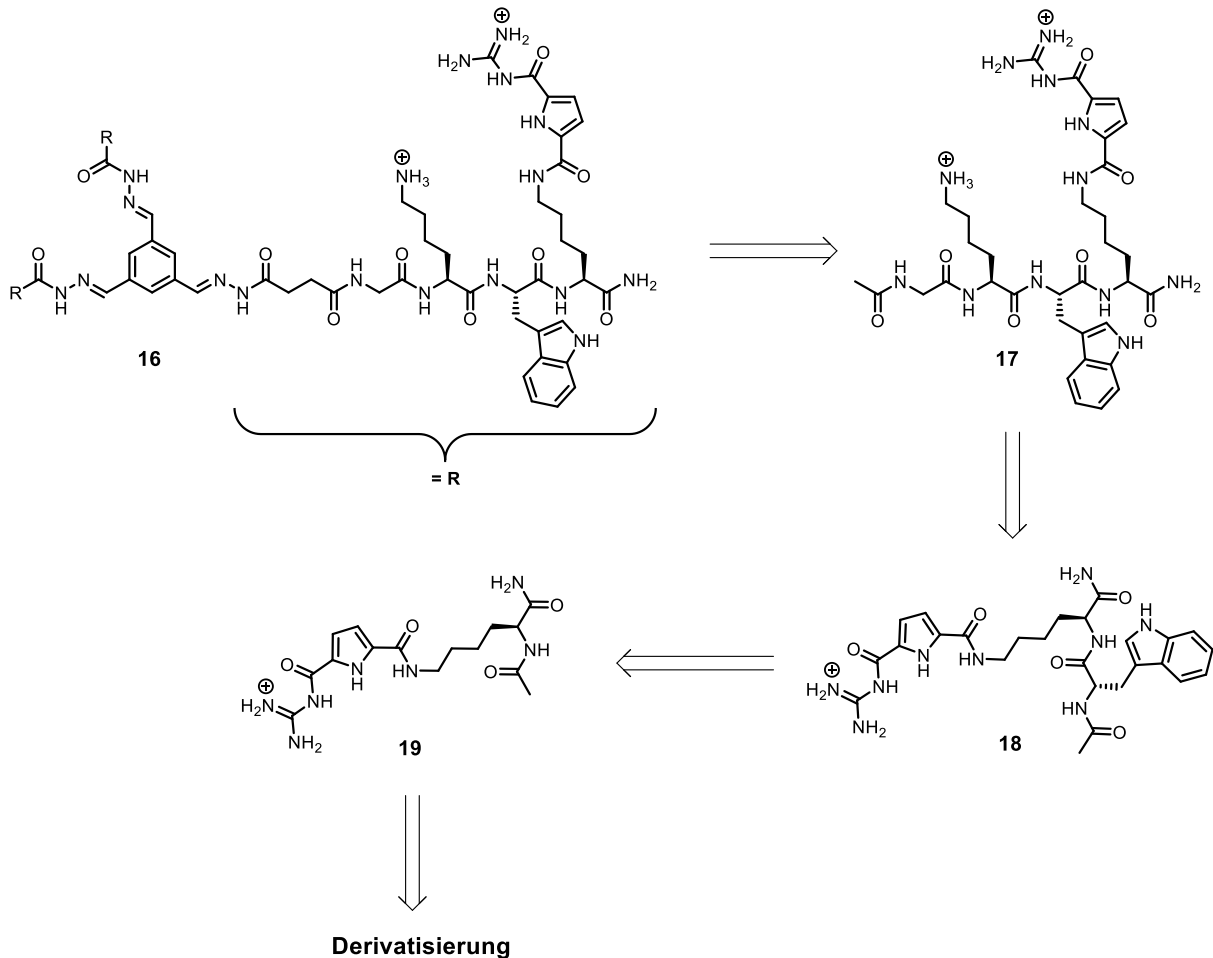
Ein weiteres Protein welches erfolgreich von der Schmuck-Gruppe adressiert werden konnte ist das 14-3-3 Protein. 14-3-3 Proteine sind kleine Proteine, die Homo- oder Heterodimere mit ihren verschiedenen Isoformen ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\delta$  und  $\tau$  bei Säugetieren) bilden. Es wird angenommen, dass eine Überexpression, Fehlfunktion, oder Mutation von 14-3-3-Proteinen für eine Vielzahl von Krankheiten (u.a. der Parkinson-Krankheit, Alzheimer-Krankheit sowie verschiedene Krebsarten) ursächlich ist.<sup>[15,77]</sup> Die entscheidende Funktion der 14-3-3-Dimere besteht darin, Interaktionen zwischen anderen Proteinen zu ermöglichen, indem eine Plattform bereitgestellt wird, an welche potenziell interagierende Proteine gemeinsam andocken können.<sup>[78]</sup> In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt das es möglich ist 14-3-3 Proteine zu adressieren, so identifizierte die Gruppe von Yao einen 14-3-3 $\delta$  PPI-Inhibitor mit Hilfe eines Hochdurchsatz-Mikroarrays<sup>[79]</sup>, auch Fu<sup>[80]</sup> und Botta<sup>[81]</sup> veröffentlichten ebenfalls Inhibitoren für 14-3-3 PPIs.

Ehlers *et al.* gingen in ihrer Veröffentlichung einen Schritt weiter und entwickelten mit Hilfe von „*in silico*“ Design den ersten bekannten Liganden **15**, der mit beiden Monomereinheiten gleichzeitig direkt an der Dimerisierungsgrenzfläche des 14-3-3 $\zeta$ -Homodimerkomplexes interagiert (Abb. 10).<sup>[82]</sup>



**Abb. 10:** Kristallstruktur des Liganden **15**, der an das 14-3-3-Proteindimer bindet. A) Struktur des Liganden B) Der Ligand (gelb) befindet sich in der zentralen Pore des Dimers. C) Elektronendichte der Kristallstruktur.<sup>[82]</sup>

Dazu wurden 70 multivalente Liganden gegen das 14-3-3 $\zeta$ -Dimer untersucht und Verschiebungen im UV/Vis- oder Fluoreszenzspektrum beobachtet, um eine potentielle Leitstruktur für das nachfolgende *in silico design* zu identifizieren. Einige der getesteten Liganden zeigten signifikante spektrale Veränderungen, was auf eine Wechselwirkung mit dem Proteindimer hindeutet. Verbindung **16** wurde bei dem Screening als vielversprechendster Kandidat identifiziert (Schema 1).

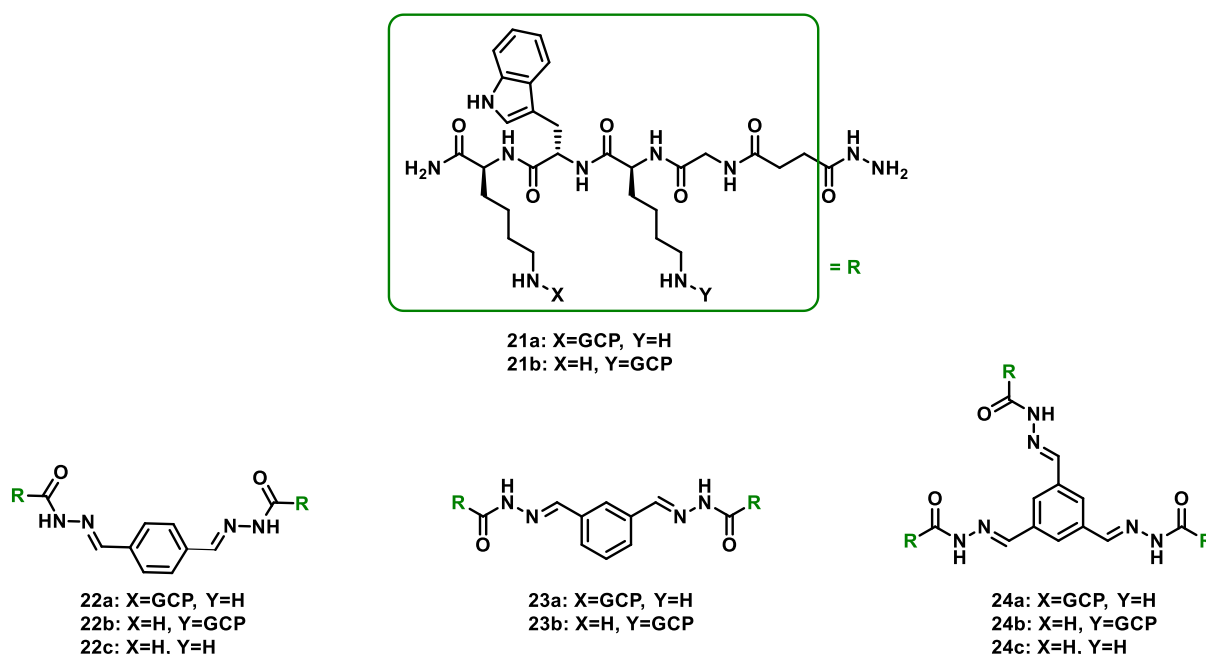


**Schema 1:** In silico-Design eines vereinfachten Liganden **19** aus dem anfänglich komplexeren Liganden **16**, der in einem zufälligen UV/Vis-Screening identifiziert wurde, um an das Protein 14-3-3 zu binden.

Da die Größe und Flexibilität dieser Verbindung jedoch ihre Anwendbarkeit einschränken, wurde *in silico Design* genutzt, um eine vereinfachte Struktur abzuleiten. Dazu wurde die gesamte Struktur von **16** auf einen einzelnen Arm beschränkt, welcher sich aus einem Tripeptid **17** zusammensetzt. Bemerkenswerterweise deuteten die Docking Studien darauf hin, dass die bevorzugten Bindungsstellen an der zentralen Pore des 14-3-3-Dimers lokalisiert sind und nicht an den bekannten Bindungstaschen, an denen die Proteinpartner von 14-3-3 oder die Naturprodukte wie Ascotylenin A binden.<sup>[83]</sup> Um das Tripeptid **17** weiter zu vereinfachen wurden verschiedene Abschnitte gewählt und mit einander via Docking verglichen, dabei wurde festgestellt das Ac-Trp-Lys(GCP)-NH<sub>2</sub> (**18**) tiefer in der zentralen Pore bindet als Ac-Gly-Lys-NH<sub>2</sub>. Um auch diese Struktur weiter zu vereinfachen wurde der Vorgang wiederholt, wodurch Ligand **19** identifiziert wurde. Ligand **19** besteht aus Lysin und ist an der Seitenkette mit dem GCP Motiv funktionalisiert. Daher wurde schließlich der vereinfachte Ligand Ac-Lys(GCP)-NH<sub>2</sub> (**19**) als vielversprechender Kandidat identifiziert (Schema 1). Dieser wurde anschließend systematisch derivatisiert durch Änderung der Ladungsverteilung, indem die

Funktionalisierung und Orientierung des Lysins innerhalb von **19** variiert wurden. Dies führte schließlich zum Design der Verbindung **15**, GCP-Lys-OMe, welche den Berechnungen zufolge direkt die Zentralpore an der 14-3-3ζ-Dimerisierungsgrenzfläche adressieren soll. Dies wurde durch eine X-Ray Analyse bestätigt, welche die Position des Liganden an der Dimer-Grenzfläche direkt zwischen den beiden Proteinmonomeren zeigt. Spätere in vitro Bindungsstudien ergaben eine Bindungskonstante im niedrigen mikromolaren bis nanomolaren Bereich, sowie eine Stöchiometrie von einem Liganden pro Proteindimer.

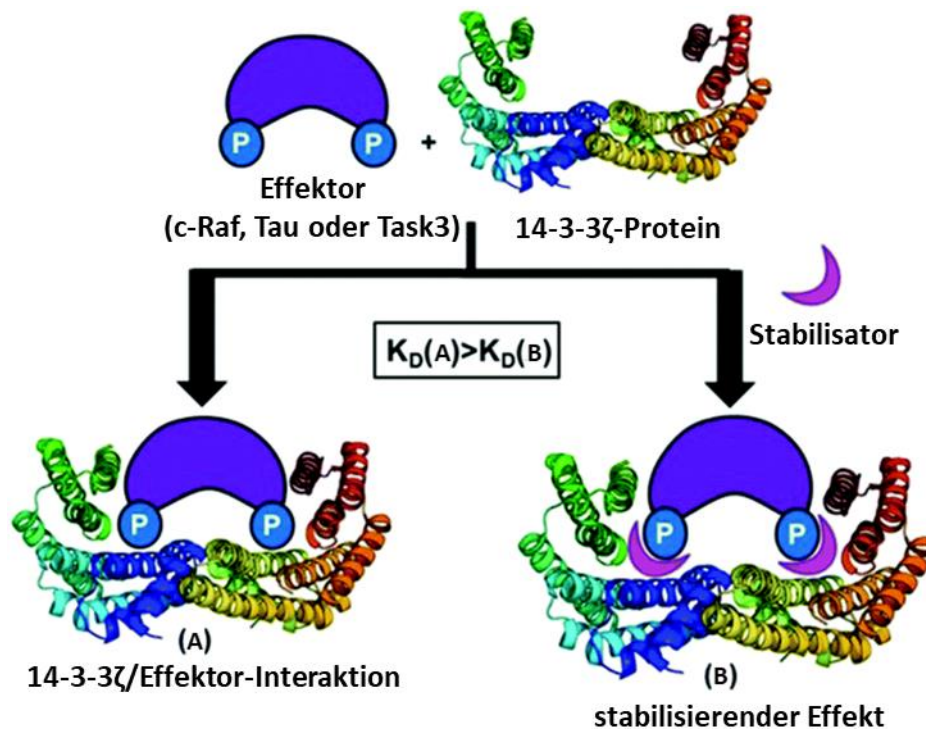
Nachdem die Schmuck-Gruppe erstmalig beweisen konnte das GCP geeignet ist um das 14-3-3ζ Protein zu adressieren, wurde in nachfolgenden Veröffentlichungen an der Identifizierung supramolekularer Liganden für die Stabilisierung/Inhibierung von PPIs gearbeitet. Bislang handelt es sich bei der überwiegenden Mehrheit der PPI-Modulatoren um PPI-Inhibitoren, welche es vermögen, Interaktionen zwischen Proteinen zu unterbinden. In vielen biologischen Zusammenhängen könnte jedoch eine verlängerte Lebensdauer einer PPI wünschenswert sein, was den ergänzenden Ansatz der PPI-Stabilisierung erforderlich macht.<sup>[84]</sup> Tatsächlich bietet die Natur beeindruckende Beispiele für dieses Konzept und einige PPI-stabilisierende Naturstoffe haben bereits als wichtige Arzneimittel Anwendung gefunden. Prominente Beispiele sind Paclitaxel<sup>[85]</sup> (ein Krebsmedikament, das Mikrotubuli stabilisiert), sowie Rapamycin<sup>[86]</sup> und FK506<sup>[87]</sup> (Immunsuppressiva die and das Immunophilin FKBP12 binden).<sup>[13]</sup> Daher untersuchte Gigante *et al.* den Einfluss GCP basierter Liganden auf die Interaktionen zwischen dem 14-3-3ζ Protein und den Partner Proteinen Tau, C-Raf und Task3.<sup>[17]</sup> Um Moleküle zu identifizieren, die diese physiologisch hoch relevanten 14-3-3 PPIs modulieren können, wurde ein Screening von kationischen supramolekularen Liganden aus einer hausgemachten Bibliothek durchgeführt. Bei der Peptidsequenz wurden zusätzlich die Positionen der GCP Gruppen an den Lysinseitenketten variiert und mit einer Hydrazingruppe funktionalisiert, was die Darstellung von zwei- und drei-armigen Hydrazon basierten Liganden ermöglicht (Abb. 11).



**Abb. 11:** Struktur der supramolekularen Liganden, welche die Interaktion des 14-3-3ζ Proteins zu Tau, C-Raf oder Task3 stabilisieren sollen.

Auf der Suche nach Stabilisatoren von 14-3-3 PPIs wurden Fluoreszenzpolarisationsmessungen (FP) durchgeführt, wobei 14-3-3ζ/Effektorsysteme verwendet wurden, in denen sich der Komplex noch nicht gebildet hatte. Die Bindungspartner waren Fluorescein-markierte, monophosphorylierte

synthetische Peptide. Die Bindung dieser Peptide wurde in Gegenwart und in Abwesenheit der Liganden getestet, dabei wurden mehrere Liganden, welche die GCP-Gruppe enthalten, als neue Stabilisatoren von 14-3-3 $\zeta$ /Effektor-Komplexen identifiziert, mit den besten Ergebnissen für die Bindungspartner C-Raf- und Tau. Verbindungen, die keine GCP-Gruppe besitzen, wie **22c** und **24c**, zeigen keine Stabilisierung der Wechselwirkung zwischen 14-3-3 $\zeta$ -Protein mit C-Raf, Tau und Task3, während die komplementären Verbindungen mit GCP-Gruppe, wie **22a**, **22b**, **24a** und **24b**, EC<sub>50</sub>-Werte im unteren mikromolaren Bereich aufweisen. Des Weiteren scheint die Multivalenz der Verbindungen mit ihrer PPI-stabilisierenden Aktivität zu korrelieren. So wurden EC<sub>50</sub> Werte von 1,4-30,9  $\mu$ M für die PPIs zwischen 14-3-3 und C-Raf oder Tau in Gegenwart von den dreiarmligen Liganden (**24a** und **24b**) ermittelt, mit abnehmenden Valenzen an Peptidarmen erhöhen sich die EC<sub>50</sub>-Werte. Anschließend wurden K<sub>D</sub>-Werte für die 14-3-3 $\zeta$ -Wechselwirkungen mit den Peptidderivaten von C-Raf und Tau in Abwesenheit und Anwesenheit der Verbindungen getestet. In Gegenwart von 50  $\mu$ M dieser mehrarmigen Verbindungen wurde eine Verbesserung der Stabilität dieser Wechselwirkungen beobachtet, die sich in niedrigeren K<sub>D</sub>-Werten widerspiegelt (Abb. 12).

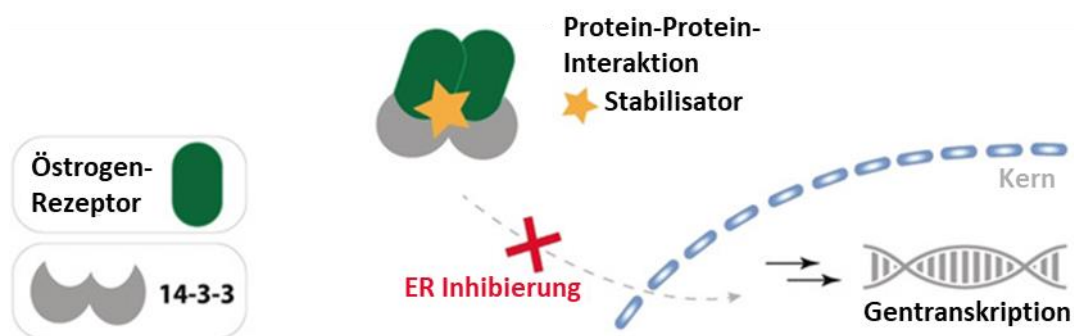


**Abb. 12:** Stabilisierende Wirkung zwischen dem Protein 14-3-3 $\zeta$  (PDB id: 4JDD) und einem Bindungspartner (C-Raf, Tau oder Task3).<sup>[17]</sup>

Verbindungen mit drei Armen zeigten eine höhere Stabilisierung als Verbindungen mit zwei Armen, während Liganden mit einem Arm wirkungslos waren. **24a**, die potenteste Verbindung, verstärkte die Wechselwirkung von 14-3-3 $\zeta$  mit C-Raf und Tau um etwa das 84-fache und 26-fache, so reduziert sich die K<sub>D</sub> von 16,00  $\mu$ M zu 0,19  $\mu$ M für den Bindungspartner C-Raf und von einer K<sub>D</sub> von 7,00  $\mu$ M zu 0,27  $\mu$ M für Tau. In ähnlicher Weise erhöhte **24b** die Stabilität dieser Wechselwirkungen, im Fall von C-Raf um das 56-fache und das 20-fache für Tau, von einer K<sub>D</sub> von 8,90  $\mu$ M bis 0,16  $\mu$ M für den Bindungspartner C-Raf und von einer K<sub>D</sub> von 3,50  $\mu$ M auf 0,17  $\mu$ M für Tau. Bindungsstudien mittels isothermaler Titrations-Kalorimetrie (ITC) bestätigen die ermittelten Bindungskonstanten.

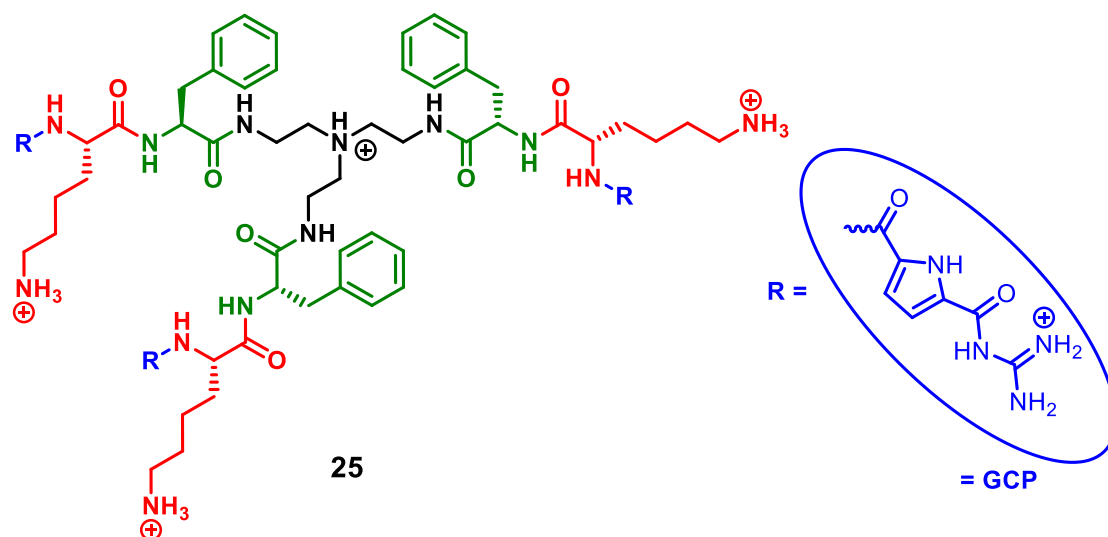


In der nachfolgenden Veröffentlichung von Gigante *et al.* wurde die PPI zwischen 14-3-3 $\zeta$  und dem Östrogenrezeptor alpha (ER $\alpha$ ) adressiert.<sup>[18]</sup> ER $\alpha$  ist eine treibende Kraft bei den meisten Brustkrebsarten, dabei sind 14-3-3 Proteine negative Regulatoren dieses nukleären Rezeptors, was die Stabilisierung dieser PPIs zu einer interessanten Strategie macht. Es konnte gezeigt werden das **25** die 14-3-3 $\zeta$ /ER $\alpha$ -Wechselwirkung synergistisch mit dem Naturprodukt Fusicoccin-A stabilisiert. Die Stabilisierung dieser Interaktion reduzierte die ER $\alpha$ -Dimerisierung und die ER $\alpha$ /DNA-Interaktion, was zu einer Herunterregulierung der ER $\alpha$ -kontrollierten Genexpression und einem verminderten Zellwachstum führte (Abb. 13).



**Abb. 13:** Vereinfachte Darstellung des zellulären Weges und der Begründung für die Stabilisierung der Interaktion zwischen 14-3-3 und dem Östrogenrezeptor (ER) in kleinen Molekülen.<sup>[18]</sup>

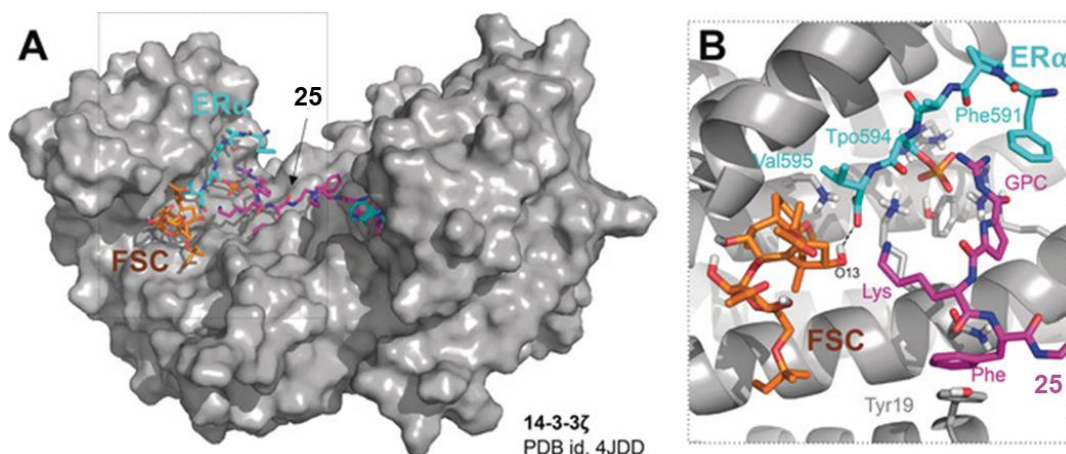
Da in der vorhergegangenen Veröffentlichung<sup>[17]</sup> festgestellt wurde, dass die Liganden mit 3 oder 4 Armen die PPIs am besten stabilisieren konnten wurde Verbindung **25** aus einer internen Bibliothek als potentieller Stabilisator von 14-3-3 PPIs ermittelt. Verbindung **25** besteht aus drei symmetrischen peptidischen Armen, welche jeweils eine GCP-Gruppe als Arginin-Mimetikum enthalten, dabei unterscheidet sich sein Gerüst sowie seine Peptidsequenz von den zuvor berichteten Stabilisatoren (Abb. 14).



**Abb. 14:** Stabilisator der PPI zwischen 14-3-3 $\zeta$  und dem Östrogenrezeptor alpha (ER $\alpha$ ), Verbindung **25**.

Die Stabilisierungsaktivität von **25** gegenüber 14-3-3 $\zeta$ /Effektor-Wechselwirkungen wurde durch Fluoreszenzanisotropie-Messungen bestimmt, bei einer Proteinkonzentration, bei der der Komplex zunächst nicht gebildet wird. Die Titration von **25** mit verschiedenen Effektoren zeigte eine bevorzugte

Stabilisierung der 14-3-3 $\zeta$ /ER $\alpha$ -Interaktion. Dabei wurde das ER $\alpha$  abgeleitete Phosphopeptid mit 14-3-3 $\zeta$  in Gegenwart steigender Konzentrationen von **25** titriert, was zu einer 100-fach höheren Affinität der PPI führte. Die 14-3-3 $\zeta$ /ER $\alpha$ -Interaktion besitzt einen  $K_D$  von 2,3 mM, wohin gegen in Präsenz von 50  $\mu$ M Ligand **25** der  $K_D$  auf 24 nM stabilisiert wurde. Ebenfalls wurde überprüft, ob **25** einen Einfluss auf andere 14-3-3 $\zeta$ /Effektor-Wechselwirkungen nimmt, so wurde in Gegenwart von **25** 14-3-3 $\zeta$  zu den Effektoren TASK3, C-Raf, Tau and Cdc25B titriert. Dabei wurde festgestellt das der Ligand **25** nur spezifisch die 14-3-3 $\zeta$ /ER $\alpha$ -Interaktion stabilisiert und keiner der Anderen. Des Weiteren wurde ein synergistischer Effekt für die Stabilisierung der 14-3-3 $\zeta$ /ER $\alpha$ -Interaktion durch **25** und FC-A beobachtet. Dazu wurde das ER $\alpha$ -Phosphopeptid mit 14-3-3 $\zeta$  in Gegenwart von **25**, FC-A oder beiden titriert. Die Anwesenheit von 20  $\mu$ M Verbindungen einzeln führte zu einer verbesserten Affinität des Proteinkomplexes um das 20- bzw. 37-fache, während eine Kombination eine signifikant erhöhte Stabilisierung um das 200-fache aufwies. Dies legt nahe, dass **25** und FC-A an verschiedene Stellen im Protein komplex binden, was eine synergistische Wirkungsweise ermöglicht. Um diese Annahme zu überprüfen wurde ein molekulares Modell entwickelt, indem automatisiertes *Docking* und mehrere unabhängige Simulationen der eingeschränkten Molekulardynamik (MD) kombiniert wurden. In dem Modell interagieren zwei der drei Arme von **25** mit jeweils einem ER $\alpha$ -Peptid, welche sich in jedem 14-3-3 $\zeta$ -Monomer befinden (Abb. 15).



**Abb. 15:** Molekulares Modell für den Komplex 14-3-3 $\zeta$ /ER $\alpha$ /FC-A/25. A) Arme von Verbindung **25** erstrecken sich zu beiden Effektorbindungsstellen. B) Detail einer Effektorbindungsstelle in 14-3-3 $\zeta$ .<sup>[18]</sup>

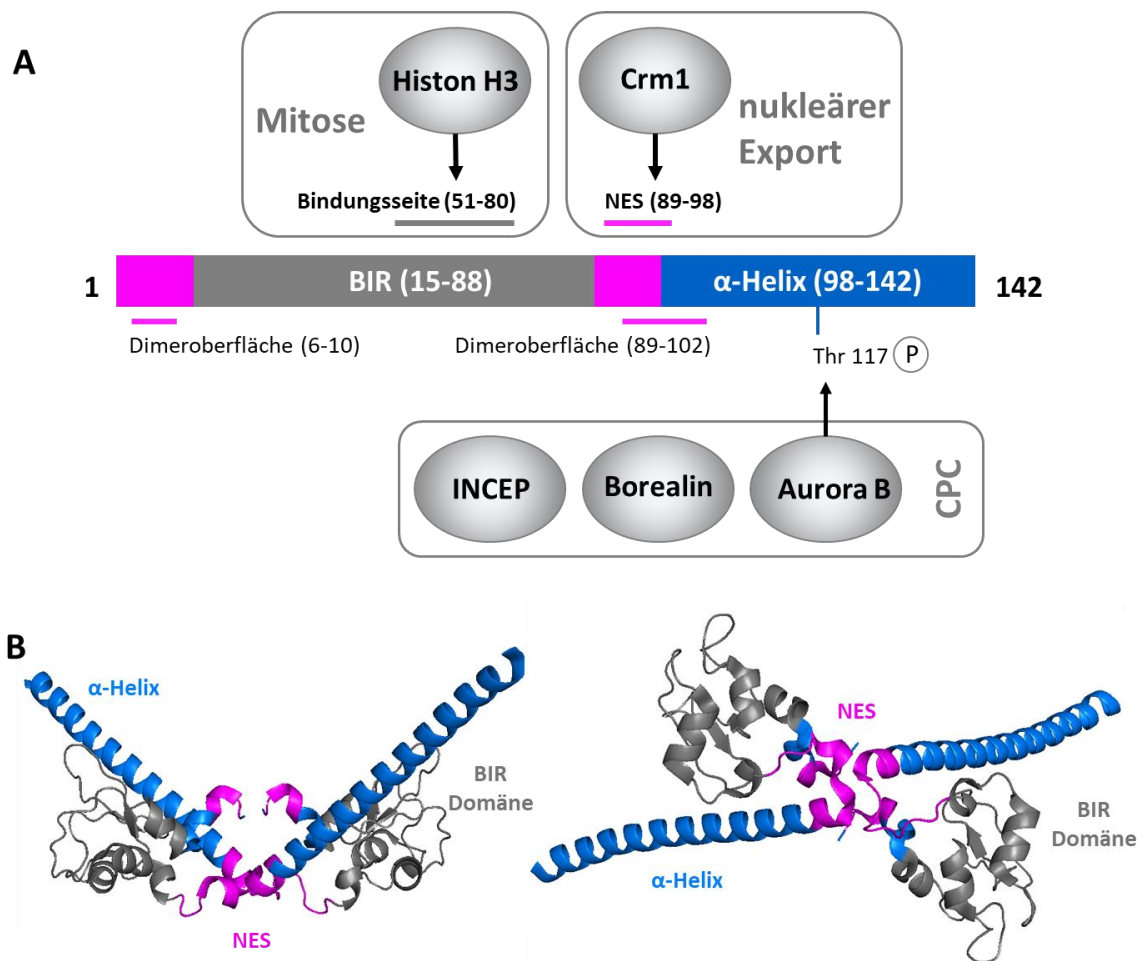
Dabei wurde festgestellt, dass die GCP-Gruppen mit zwei der Phosphat-Sauerstoffe des phosphorylierten Threoninrests von ER $\alpha$  (pThr594) interagieren. Bemerkenswert ist allerdings, dass sich der GCP-Guanidinium-Anteil in diesem Modell teilweise mit der Arg370-Seitenkette von TASK3 gebunden an 14-3-3 $\zeta$  partiell überlappt. Dies könnte erklären, warum **25** nicht die 14-3-3 $\zeta$ /Task3-Interaktion stabilisiert, während FC-A nicht differenziert. Dabei scheinen sich die Bindungsmodi von **25** und FC-A im Modell sich nicht gegenseitig auszuschließen. Zur Erklärung der beobachteten synergistischen Aktivität von **25** und FC-A wurden, zusätzliche MD-Simulationen des 14-3-3 $\zeta$ /ER $\alpha$ -Komplexes in der Anwesenheit von **25**, aber in Abwesenheit von FC-A durchgeführt. Keine direkte Interaktion zwischen **25** und FC-A wurde in den Simulationen entdeckt. ER $\alpha$  vermittelt jedoch das Zusammenspiel beider organischen Verbindungen durch seinen C-Terminus. Der synergistische Effekt, der für die Stabilisierung durch **25** und FC-A gegenüber dem PPI-Komplex 14-3-3 $\zeta$ /ER $\alpha$  beobachtet wurde, stammt daher sowohl von einer direkten Interaktion zwischen **25**, ER $\alpha$  und FC-A als auch von der Konformationsrestriktion, hervorgerufen durch FC-A das mit Peptid Rückständen wechselwirkt, was zu einer erhöhten Bindungsaffinität von ER $\alpha$  führt.

## **2.2 Survivin**

In dieser Arbeit ist die Adressierung der Protein-Protein-Interaktionen des Proteins Survivin von maßgeblicher Relevanz. Daher wird in diesem Kapitel genauer auf die Struktur, Bindungsstellen und die zugehörigen Partnerproteine eingegangen.

### 2.2.1 Struktur und funktionell relevante Bindungsstellen

Das Protein Survivin wurde im Jahr 1997 von Ambrosini *et al.* entdeckt. Es ist kodiert durch den *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 5* (BIRC5), das sich auf dem menschlichen Chromosom 17q25 befindet.<sup>[88]</sup> Neben dem Wildtyp (WT) Survivin gibt es zehn bekannte Spleißvarianten, deren Funktion noch nicht vollständig verstanden sind, die aber eine diagnostische Bedeutung bei Krebs haben.<sup>[89]</sup> Survivins WT besteht aus 142 Aminosäuren (AS), hat eine Größe von 16,5 kDa und setzt sich aus mehreren verschiedenen Domänen zusammen (Abb. 16).



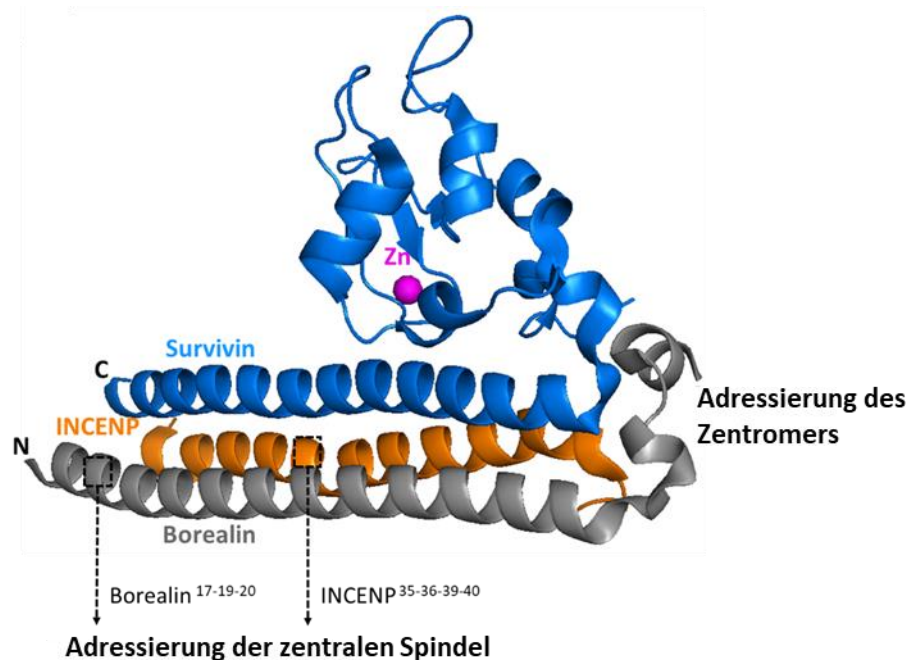
**Abb. 16:** Struktur und Domänenorganisation von Survivin. A) Survivin besteht aus einer N-terminalen BIR-Domäne (grau), welche die Histon-H3-Bindungsstelle enthält, und einer C-terminalen α-Helix (hellblau), die während der Mitose mit dem CPC interagiert. Das NES (magenta) von Survivin überlappt sich mit seiner Dimer-Grenzfläche. B) Survivin bildet in Lösung ein Homodimer mit einem Winkel von 110° zwischen den beiden α-Helices.<sup>[90]</sup> (PDB: 1E31)

Die N-terminale *Baculovirus IAP-Repeat* (BIR)-Domäne (AS 15-88) ist ein Strukturmotiv, das in allen Proteinen der *inhibitors of apoptosis protein* (IAP)-Familie vorkommt und für die antiapoptotischen Funktionen von Survivin verantwortlich ist.<sup>[91]</sup> Die Histon H3-Bindungsstelle von Survivin (AS 51-80) befindet sich innerhalb der BIR-Domäne und ist für die Bindung des phosphorylierten T3-Histons H3 während der Mitose unerlässlich.<sup>[92,93]</sup> Die C-terminale α-Helix bildet zusammen mit dem inneren

Zentromerprotein (INCENP) und Borealin als Teil des *chromosomal passenger complex* (CPC) während der Mitose ein dreigeteiltes Helixbündel.<sup>[94]</sup> Darüber hinaus besitzt Survivin ein *nuclear export signal* (NES) (<sup>89</sup>VKKQFEELTL<sup>98</sup>), das mit dem Exportrezeptor Crm1 interagiert und nicht nur den nukleären Export von Survivin in das Zytoplasma vermittelt, sondern auch den CPC in der frühen Mitose und die Zentrosomen rekrutiert.<sup>[95,96]</sup> Die Survivin-Dimer-Schnittstelle (AS 6-10 und 89-102) überschneidet sich partiell mit dem NES, weshalb die Survivin-Homodimerisierung und ihre Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1 als kompetitive Prozesse angesehen werden.<sup>[97]</sup> Survivin bildet ein Homodimer in Lösung mit beiden  $\alpha$ -Helices, die in einem Winkel von  $110^\circ$  angeordnet sind (Abb. 16).<sup>[90]</sup>

## 2.2.2 Survivin als Mitglied des CPC und der Familie der IAPs

Als Mitglied des CPC nimmt Survivin die Funktion als Schlüsselregulator während der Mitose ein.<sup>[98]</sup> Der CPC spielt eine Rolle bei der Chromosomenkondensation, der Anheftung von Kinetochor-Mikrotubuli, der Aktivierung des Kontrollpunktes der Spindelanordnung und der Bildung des kontraktiven Rings während der Zytokinese. Neben Survivin als Schlüsselregulator besteht der CPC aus der Kinase Aurora B und den beiden Proteinen INCENP und Borealin, mit denen die C-terminale  $\alpha$ -Helix von Survivin ein Bündel von drei Helices bildet (Abb. 17).<sup>[94]</sup> Im CPC liegt Survivin als Monomer vor, da seine Dimerisierungsdomäne (verantwortlich für antiapoptotische Funktion) mit Borealin besetzt ist.

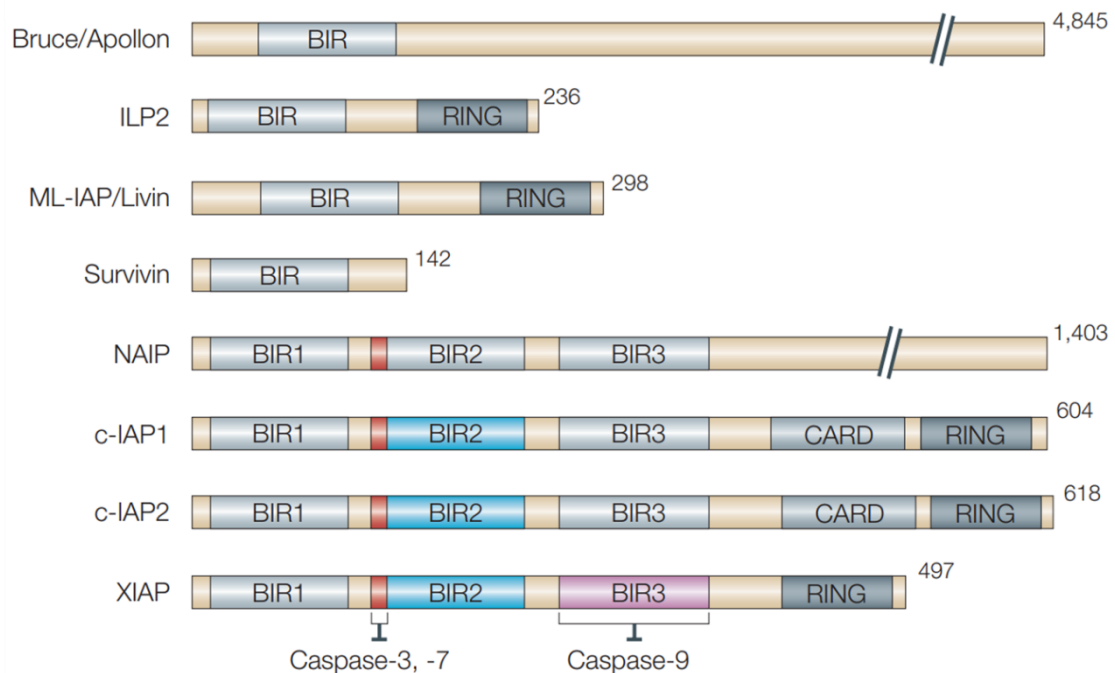


**Abb. 17:** Der *chromosomal passenger complex* (CPC) ohne Aurora B. Struktur eines dreifach-helikalen Komplexes von Survivin (blau) in voller Länge mit Fragmenten von INCENP (orange) und Borealin (grau). (PDB: 2QFA)

Neben Survivin's Funktion im CPC gehört es ebenfalls zu der IAP-Familie, diese greifen in die Apoptose (programmierter Zelltod) ein und wirken dabei inhibierend auf den Prozess. Die Familie der IAPs besteht aus acht Proteinen: Bruce/Apollon, neuronales Apoptose-Inhibitor-Protein (NAIP), zelluläres IAP1 (c-IAP1), zelluläres IAP2 (c-IAP2), X-gebundener Inhibitor des Apoptose-Proteins (XIAP), Livin, Inhibitor des Apoptose-Protein-ähnlichen Proteins 2 (ILP2) und Survivin.<sup>[99]</sup> Sie zeichnen sich vornehmlich durch eine Domäne von  $\sim 70$  Aminosäuren aus, die als baculovirale IAP-Wiederholung (BIR) bezeichnet wird und in der Lage ist Zink zu binden.<sup>[100]</sup> Bis zu drei Sequenzen der BIR-Domäne

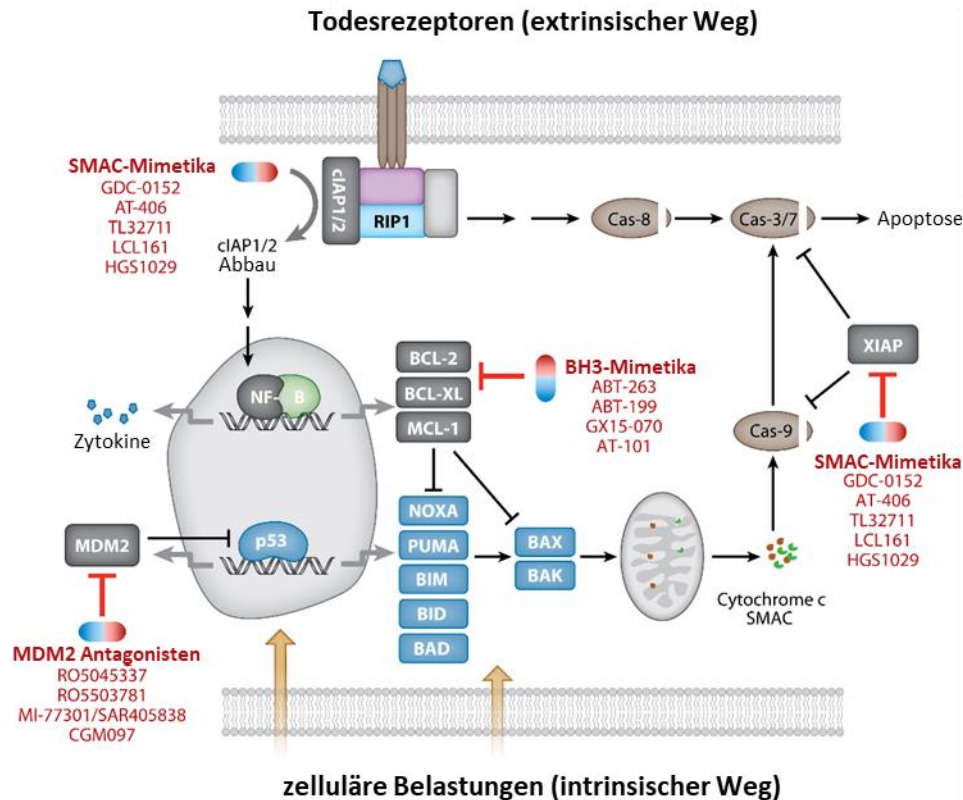
können innerhalb der bekannten Proteine der humanen IAP-Familie vorkommen. Einige IAPs besitzen ebenfalls C-terminal eine *really interesting new gene* (RING)-Domäne mit einer E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität und einer *caspase-associated recruitment domain* (CARD).<sup>[99,101]</sup> NAIP, c-IAP1, c-IAP2 und XIAP besitzen außerdem eine zusätzliche Linker-Region die zwischen BIR1 und BIR2 lokalisiert ist, wodurch diese mit den Caspasen 3 und 7 interagieren können. XIAP ist der einzige IAP, der in der Lage ist, die Initiator-Caspase 9 über seine BIR3-Domäne zu hemmen (Abb. 18).<sup>[101,102]</sup>

### Säugetiere



**Abb. 18:** Die Mitglieder der Familie der IAPs. Die IAP-Familie besteht aus den Proteinen Bruce/Apollon, ILP2, Livin, Survivin, NAIP, c-IAP1, c-IAP2 und XIAP. Alle IAPs besitzen eine bis drei N-terminalen BIR-Domänen und in einigen Fällen eine zusätzliche CARD und RING-Domäne. Caspase 3 und 7 wird durch den vorgeschalteten Linker (rot) der BIR2-Domäne gebunden. Die BIR3-Domäne von XIAP (violett) ist in der Lage, die Caspase 9 zu hemmen.<sup>[99]</sup>

Survivin ist das kleinste Mitglied der IAP-Familie und enthält nur eine BIR-Domäne und keine CARD- oder RING-Domäne. Die antiapoptotische Funktion basiert nicht auf der direkten Interaktion mit Caspasen, sondern durch mehrere indirekte Hemmung durch Interaktion mit Partnerproteinen.<sup>[101,103]</sup> So führt die Interaktion mit XIAP zu einer erhöhten Stabilität von XIAP, was seinen proteasomalen Abbau verhindert und seine antiapoptotische Aktivität erhöht.<sup>[104]</sup> Bei einer weiteren Interaktion mit Smac/DIABLO behindert Survivin die Interaktion von Smac/DIABLO und XIAP, wodurch XIAP in der Lage ist, die Caspasen 3, 7 und 9 zu hemmen.<sup>[105]</sup> Survivin ist auch in der Lage, einen Komplex mit dem Hepatitis B X-interagierenden Protein (HBXIP) zu bilden, das in der Lage ist, an Procaspase 9 zu binden und die Rekrutierung von Apaf-1 und damit die Apoptosomenbildung zu verhindern.<sup>[106]</sup>



**Abb. 19:** Der extrinsische und intrinsische Apoptoseweg. <sup>[107]</sup>

Der extrinsische (Todesrezeptor-basierte) apoptotische Weg wird an der Zellmembran durch die Bindung von Zelltodliganden an ihre jeweiligen Rezeptoren initiiert, was die Bildung eines Tod-induzierenden Signalkomplexes auslöst, der die Caspase-Aktivierungskaskade in Gang setzt. Der intrinsische (mitochondriale) apoptotische Weg kann durch zellulären Stress ausgelöst werden, z.B. durch verschiedene Stimuli wie Chemotherapeutika, was zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Membranintegrität und zur Freisetzung von Cytochrom c und SMAC in das Zytosol führt. Cytochrom c stimuliert die Bildung des Apoptosomkomplexes zur Aktivierung der Initiator-Caspase-9 und die anschließende Aktivierung der Effektor-Caspasen. <sup>[107]</sup>

### 2.2.3 Survivin als Ziel in der Krebstherapie

Survivin ist direkt in zwei krebsrelevante Prozesse involviert: Als Mitglied der IAP-Familie wirkt es dem Zelltod entgegen und als Teil des *chromosomal passenger complex* fördert es die Zellproliferation. <sup>[108]</sup> Survivin liegt praktisch bei allen menschlichen Krebsarten überexprimiert vor, aber fehlt meist im differenzierten Gewebe erwachsener Menschen, daher gilt es als eines der krebsspezifischsten Proteine, die bisher bekannt sind. <sup>[109]</sup> Da Survivin in fast allen malignen Tumoren überexprimiert wird, gilt es als früher diagnostischer sowie prognostischer Biomarker. <sup>[110,111]</sup> Die Expression von Survivin ist zudem mit einer Resistenz gegen Chemo- und Strahlentherapie und schlechten klinischen Ergebnissen assoziiert, was dieses Protein zu einem attraktiven Ziel für die Krebstherapie macht. <sup>[108,112]</sup> Allerdings weist Survivin keine enzymatische Aktivität auf und stellt daher ein schwierig zu adressierendes Wirkstoffziel dar. <sup>[111]</sup> Daher wurden in der Vergangenheit verschiedene Strategien (Gen- und Immuntherapien, Antisense-Oligonukleotiden, siRNAs, *small molecule*-Inhibitoren,) zur Inhibierung von Survivin entwickelt. <sup>[113]</sup>

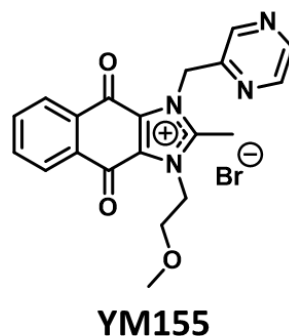
Gentherapeutische Strategien als Ansatz zur Hemmung von Survivin basieren darauf, die Expression von zytotoxischen Genen zu induzieren, welche durch Survivins Promotor gesteuert werden. Da in Tumorzellen die Expression von Survivin hochreguliert ist, ist auch der Promotor, unter dessen Kontrolle Survivin steht, viel aktiver. In der Folge exprimieren die Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen vermehrt zytotoxische Gene und sterben.<sup>[114]</sup>

Immuntherapien stellen ebenfalls eine Option dar, seitdem die Immunogenität von Survivin beim Menschen sowohl *in vivo* (auf klinischer Ebene) als auch *ex vivo* durch den Nachweis von humanen Survivin-reaktiven Antikörpern<sup>[115]</sup> und zytolytischen T-Zell-Klonen erbracht wurde.<sup>[116,117]</sup> Mittlerweile befinden sich aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der Phase-I-Studien einige Präparate bereits in klinische Phase-II-Studien für Patienten mit fortgeschrittenen Pankreas-, Dickdarm- und Gebärmutterhalskarzinomen, sowie für kutane Melanome im Stadium IV.<sup>[115]</sup>

Ein weiterer Ansatz sind Antisense-Oligonukleotide, sie bestehen aus kurzkettigen einzelsträngigen Nucleinsäuren mit einer invertierten Basensequenz zu einer funktionalen mRNA. Diese können den Abbau der mRNA von Survivin induzieren, was die Expression so hemmt und zu einer geringeren Zellproliferation, sowie einer Aktivierung der Apoptose führt. Das erste Medikament auf Basis von Oligonukleotiden **LY2181308** befindet sich mittlerweile in Phase II der klinischen Prüfung.<sup>[118]</sup> Als alternative Antisense-Strategie wurden auch Ribozyme generiert, die auf die Survivins mRNA abzielen und so die Survivin Konzentration in der Zelle senken.<sup>[119]</sup> Auch *Small interfering RNA* (siRNA) zielt auf die mRNA von Survivin ab und ist in der Lage die Survivin-Expression zu verringern. Dieser Ansatz wird derzeit in präklinischen Studien untersucht und zeigt bisher vielversprechende Ergebnisse.<sup>[120]</sup>

Weitere Strategien basieren auf der Inhibierung des Survivin-Hsp90-Komplexes, oder auf der pharmakologischen Hemmung der mitotischen Phosphorylierung von Survivin an Position T34, was zu einem beschleunigten Abbau des Proteins führt und seiner Funktion entgegenwirkt.<sup>[116,121]</sup>

Darüber hinaus gibt es mehrere niedermolekulare Inhibitoren für Survivin, die derzeit in klinischen Studien untersucht werden. Einer der prominentesten ist **YM155 (26)** (Abb. 20), der an Survivins Promotor bindet, so die Expression von Survivin hemmt, wodurch Apoptose induziert und die Zellproliferation herunterreguliert wird. **YM155 (26)** hat bereits in mehreren Phase-II-Studien signifikante Wirkungen gezeigt.<sup>[93,122,123,124]</sup>



**Abb. 20:** **YM155 (26)** inhibiert Survivins Promotor und hemmt die Expression von Survivin.<sup>[124]</sup>

Im Gegensatz dazu basiert der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz darauf, spezifisch die relevanten Bindungsseiten für Partnerproteine zu inhibieren und nicht die Expression des gesamten Proteins herunterzuregulieren. Durch diesen maßgeschneiderten Eingriff würden auch potentielle Nebenwirkungen eliminiert, was ihn zu einem attraktiven Ansatz zur Behandlung von Krebs macht.

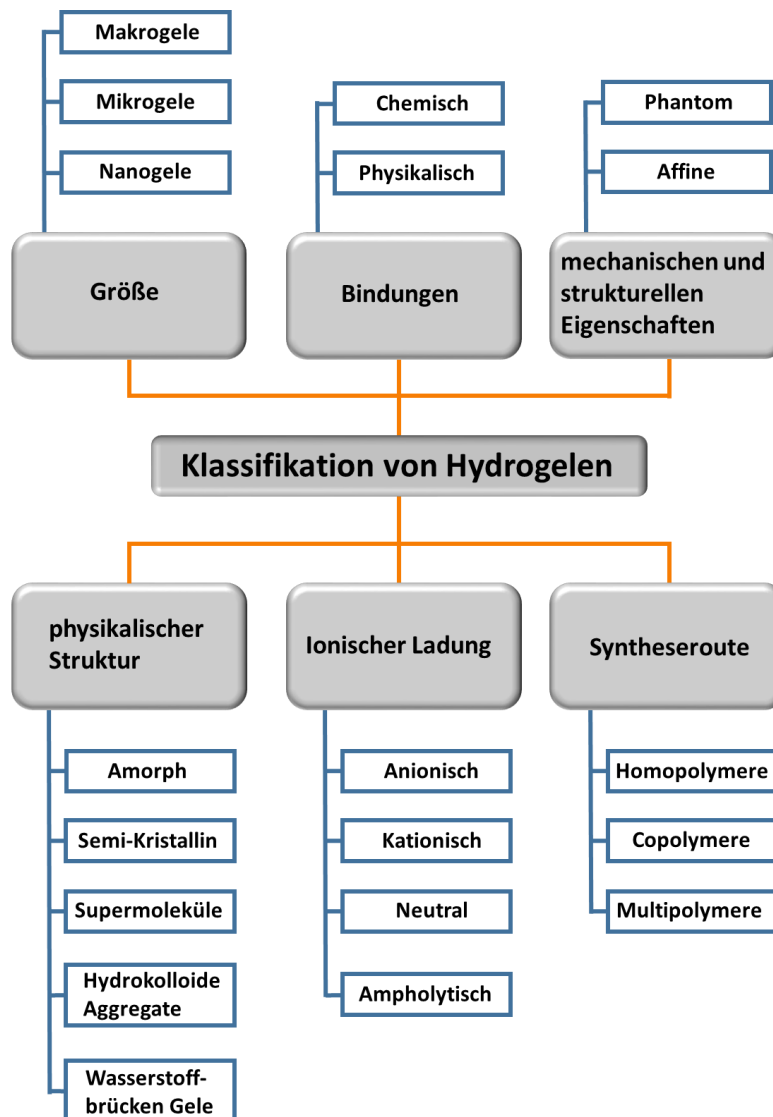


## 2.3 Hydrogele

### 2.3.1 Supramolekulare Hydrogele: Klassifizierung

Supramolekulare Gele sind eine faszinierende Klasse der *Soft Materials*. So kann eine einzige Verbindung (Gelator) durch Selbstorganisation übergeordnete Strukturen bilden und so zur Bildung von 3D-Netzwerken führen.<sup>[125]</sup> Diese Strukturen nehmen Größen im Micro- oder Nanogrößenbereich ein und sind in der Lage, große Mengen an wässrigen Medien (Hydrogelen)<sup>[23,24]</sup>, oder organischen Lösungsmitteln (Organogele) einzuschließen.<sup>[25]</sup> Die Wechselwirkungen zwischen den Lösungsmitteln haben einen signifikanten Einfluss auf die Selbstorganisation der Gele, da das Lösungsmittel etwa ~99% des Gewichts im Systems ausmacht.<sup>[126]</sup>

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Hydrogele zu klassifizieren. Abb. 21 zeigt die wichtigsten Parameter für die Klassifizierung von Hydrogelen. Der Unterschied in den Eigenschaften kann als Folge von Veränderungen in einem der aufgeführten Merkmale auftreten.



**Abb. 21:** Klassifizierung von Hydrogelen basierend auf verschiedenen Parametern.<sup>[33]</sup>

Hydrogele können je nach Syntheseweg in Homopolymere, Copolymere oder Multipolymere unterteilt werden. Homopolymere Hydrogele werden aus nur einer Art von Monomer hergestellt; copolymere

Hydrogele umfassen zwei unterschiedliche Arten von Monomeren; und multipolymere Hydrogele setzen sich aus drei oder mehr Monomeren zusammen.<sup>[127]</sup>

Basierend auf physikalischen übergeordneten Strukturen können Hydrogele amorph<sup>[128]</sup>, Semi-Kristallin<sup>[129]</sup>, Hydrogele mit Wasserstoffbrückenbindungsstrukturen<sup>[130]</sup>, Supermoleküle, oder Hydrokolloidaggregate<sup>[131]</sup> sein.<sup>[33]</sup> Durch ionischen Ladungen in einem Polymernetzwerk können Hydrogele weiter als anionische<sup>[132]</sup>, kationische<sup>[133]</sup>, neutrale<sup>[134]</sup>, oder ampholitische Hydrogele<sup>[135]</sup> eingestuft werden.

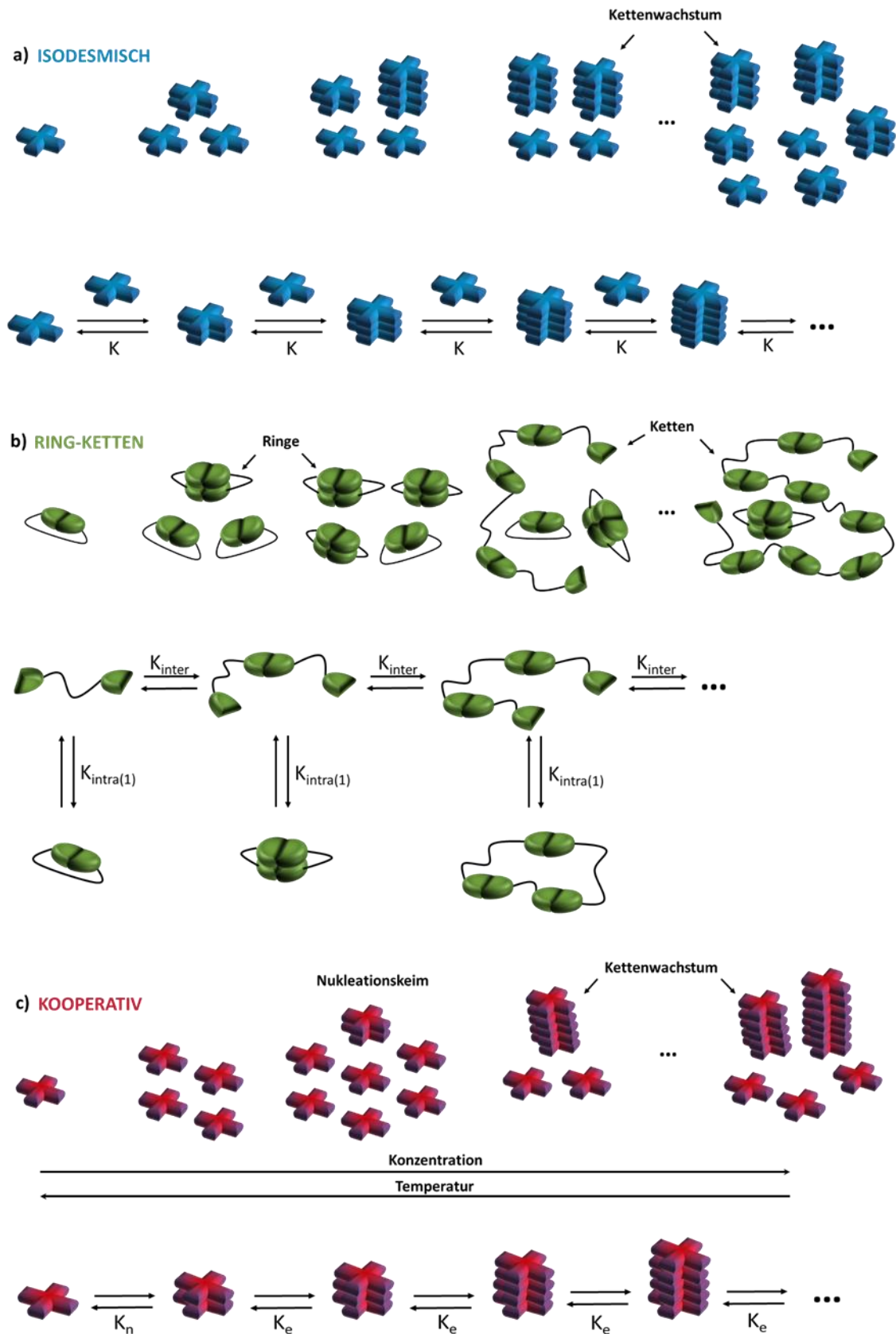
Eine andere Methode der Klassifizierung basiert auf mechanischen und strukturellen Eigenschaften. Dementsprechend können Hydrogele affine Netzwerke oder Phantomnetzwerke ausbilden. Bei affinen Netzwerken hat eine Deformation des Polymers einen Einfluss auf die Abstände der einzelnen Fasern, wohingegen bei Phantomnetzwerken dies nicht der Fall ist. Hydrogele als komplexe Polymerstrukturen können auch ein quellendes Verhalten zeigen, das von der Umgebung abhängt. Auch ein einzelner Stimulus kann Veränderungen hervorrufen, wie der pH-Wert, die Ionenstärke, die Temperatur, die elektromagnetischen Strahlung und einige andere.<sup>[136]</sup>

Basierend auf den Bindungsarten die zwischen den Polymerketten existieren, können Hydrogele klassifiziert werden in physikalische und chemische Gele. In physikalischen Gelen werden die Polymere durch Verschlingung der Polymerkette oder durch nicht-kovalente Bindungen wie Wasserstoff induzierte Anziehungskräfte oder hydrophobe Kräfte zusammengehalten. In chemischen Gelen sind die Polymerketten über kovalente Bindungen miteinander verbunden.<sup>[137]</sup>

Im Bezug auf ihre Größe werden Hydrogele in Makrogele, Mikrogele und Nanogele eingeteilt. Mikrogele und Nanogele sind sphärische Hydrogelpartikel welche eine Größe von Mikrometern bis Nanometern aufweisen. Makroskopische Hydrogele haben in der Regel Größen von Millimetern bis Zentimetern.<sup>[138]</sup> Dies ist stark abhängig vom Polymerisationstyp and Polymerisationsgrad.

### **2.3.2 Supramolekulare Hydrogele: Mechanismen der Polymerisation**

Polymerisationsreaktionen mit kovalenter Bindungsbildung laufen meist unter kinetischer Kontrolle ab, da die Energiebarriere für die Rückreaktion (Depolymerisation) meist viel größer als bei der Hinreaktion ist. So unterliegen kovalent vernetzte Polymere keiner Abnahme der Molmasse durch Verdünnung, oder Temperaturerhöhung. Im Gegensatz dazu können supramolekulare Polymerisationen als die Bildung von polymeren Materialien via nicht-kovalenter Wechselwirkungen durch Selbstorganisation definiert werden.<sup>[139]</sup> Aufgrund des reversiblen Reaktionsverlaufes sind diese direkt mit thermodynamischen Größen wie Konzentration, Temperatur und Druck verknüpft. Des Weiteren kann die Bildung supramolekularer Polymere über drei verschiedene Wachstums-Mechanismen stattfinden: Isodesmisches, Ringketten- und kooperatives Wachstum (Abb. 22).



**Abb. 22: Die Bildung von supramolekularen Polymeren wird in drei verschiedene Mechanismen unterteilt. a)** isodesmische Polymerisation **b)** ringkettenvermittelte Polymerisation;  $K_{inter}$  ist die intermolekulare Bindungskonstante für die Assoziation eines weiteren Moleküls.  $K_{intra}$  ist die dimensionslose intramolekulare Gleichgewichtskonstante für den Ringschluss. **c)** kooperative Polymerisation ( $K_n < K_e$ ).  $K$  stellt die Bindungskonstante dar. <sup>[139]</sup>

Die isodesmische Polymerisation kann als die reversible Bildung einer einzigen nicht-kovalenten Bindung angesehen werden, die in allen Schritten des Polymerisationsprozesses identisch ist. Dies setzt voraus, dass sich die Reaktivität der Endgruppen nicht während des supramolekularen Polymerisationsprozesses durch Nachbargruppeneffekte ändert, oder zusätzliche Wechselwirkungen zwischen nicht benachbarten Gruppen auftreten.<sup>[139]</sup> Dieser supramolekulare Polymerisationsmechanismus wird auch als *multistage open associaten mode*<sup>[140]</sup> oder *free association mode*<sup>[141]</sup> bezeichnet. Des Weiteren zeichnet sich dieser Mechanismus durch das Fehlen von zyklischen Zwischenprodukten im Selbstorganisationsweg aus. Bei einer isodesmischen supramolekularen Polymerisation führt die sukzessive Zugabe von Monomer zu einer wachsenden Kette, dabei nimmt die freie Energie linear ab, was anzeigt, dass die Affinität einer Untereinheit zu einem Polymer unabhängig von der Länge der Kette ist (Abb. 22A).

Aufgrund der Äquivalenz der einzelnen Schritte während der Polymerisation sind isodesmische supramolekulare Polymerisationen außerdem durch das Fehlen einer kritischen Konzentration oder einer kritischen Temperatur für die Selbstorganisation gekennzeichnet.<sup>[140,141,142]</sup>

Die zweite Klasse der supramolekularen Polymerisationen findet über einen Ring-Ketten-Mechanismus statt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass die Polymerisation eines Monomers, zu linearen Ketten führt die wiederum im direkten Gleichgewicht mit ihren zyklischen Pendant stehen (Abb. 22B)

Die Assoziation eines neuen Monomers an eine Kette ( $K_{inter}$ ) und der zyklische Ringschluss ( $K_{intra}$ ) besitzen unterschiedliche Gleichgewichtskonstanten. Die Bildung der Aggregate ist dabei stark Konzentrationsabhängig. Bei geringen Konzentrationen kommt es überwiegend zum intramolekularen Ringschluss was zu zyklischen Oligomeren führt. Ab einer kritischen Konzentration öffnen sich die Ringe und es bilden sich über intermolekulare Wechselwirkungen lineare Polymerketten aus.<sup>[143]</sup> Dieses Phänomen tritt allerdings vornehmlich nur für supramolekulare Verbindungen auf die Assoziationskonstanten von  $> 10^5 \text{ M}^{-1}$  aufweisen.<sup>[144]</sup>

Um das Verhältnis zwischen den Strukturen zu beschreiben kann das empirische Konzept der effektiven Molarität genutzt werden (Formel 1).<sup>[144,145]</sup>

$$EM_i = \frac{K_{intra(i)}}{K_{inter}} = EM_1 i^{-5/2} \quad (1)$$

$K_{intra(i)}$  stellt dabei die intramolekulare Bindungskonstante für den  $i$ -ten Ringschluss dar,  $K_{inter}$  die Bindungskonstante für die intermolekulare Kettenerweiterung und der Grad der Polymerisierung wird durch  $i$  angegeben. Wenn alle gebildeten Zyklen als spannungsfrei betrachtet werden und der Gaußschen Statistik gehorchen, können die  $EM_i$ -Werte für  $i > 1$  als Funktion von  $EM_1$  (der effektiven Molarität des supramolekularen Monomers) beschrieben werden. Der Term  $i^{-5/2}$  berücksichtigt dabei die Abnahme der intramolekularen Gleichgewichtskonstante, da sich das zyklisierte Polymer auf  $i$  verschiedene Weisen öffnen kann.<sup>[144]</sup> Das EM hat die Einheit einer Konzentration (mol/L) und gibt somit die Grenzkonzentration des Monomers an, unterhalb dieser ist die Zyklisierung gegenüber der linearen Oligomerisierung stärker begünstigt.

Die dritte Klasse der supramolekularen Polymerisationsmechanismen befasst sich mit dem kooperativen Wachstum der Polymerketten und erfolgt mindestens über zwei verschiedene Stadien. Der Erste Schritt dieses Mechanismus besteht in der Bildung eines Polymers durch eine isodesmische Polymerisation wo jeder Schritt die Assoziationskonstante  $K_n$  aufweist. Dieser Prozess setzt sich so

lange fort, bis sich ein Keim mit dem Polymerisationsgrad  $s$  gebildet hat. Durch diesen entstehen kooperative Effekte, welche die Assoziation weiterer Moleküle begünstigt und die Polymerisation mit einer größeren Assoziationskonstante  $K_e$  ablaufen lassen. Anschließend läuft die Polymerisation wie zuvor nach dem isodesmischen Mechanismus ab, jedoch mit der der Assoziationskonstante  $K_e$  (Abb. 22C).

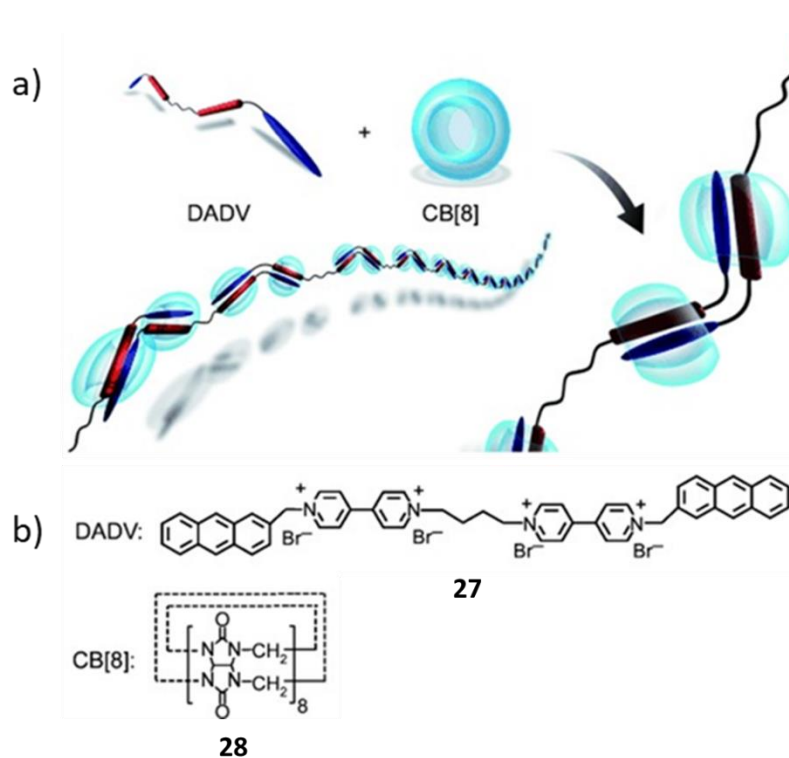
Ferrone<sup>[146]</sup> klassifizierte die kooperative supramolekulare Polymerisation auch als nukleierte supramolekulare Polymerisation, wenn in den Anfangsstadien der Polymerisation die Gibbs'sche freie Energie der Oligomere gegenüber dem Monomer zunimmt. Bei einer kooperativen supramolekularen Polymerisation ist der Kern am wenigsten stabil, daher auch die am wenigsten vorherrschende Spezies in der Reaktion und wirkt so als Flaschenhals gegen die Bildung neuer supramolekularer Polymere. In fast allen Beispielen der kernhaltigen supramolekularen Polymerisation wird angenommen, dass die Kernbildung durch homogene Nukleierung des Monomers in Lösung erfolgt. Heterogene Nukleation kann auf einem Fremdsubstrat<sup>[139]</sup> erfolgen, wie z.B. Fremdmoleküle<sup>[147]</sup> (Verunreinigungen), externe Oberflächen<sup>[148]</sup>, Staubpartikel, oder durch sekundäre Nukleation. Sekundäre Nukleation beschreibt die Bildung eines Polymers auf einem vorhandenen Polymer und ist ein verbreiteter Mechanismus für mehrere biologische supramolekulare Polymerisationen, wie z.B. die supramolekulare Polymerisation von Sichelzell-Hämoglobin<sup>[149]</sup>, Inselzellen-Amyloid-Polypeptiden<sup>[150]</sup> und Mikroglobuline.<sup>[151]</sup>

### 2.3.3 Anwendungen von supramolekularen Hydrogelen

Das Phänomen der Gelbildung ist seit mehr als 100 Jahren bekannt und dennoch sind Anwendungen für Verbindungen, die effizient Gele formen nach wie vor großem Interesse und werden derzeit in der Pharmazie<sup>[26–28]</sup>, Biologie<sup>[29–32]</sup> und Materialchemie verwendet werden.<sup>[33–35]</sup> In diesem Zusammenhang spielen insbesondere Hydrogele eine entscheidende Rolle, da sie eine hohe Biokompatibilität aufweisen.<sup>[36,37]</sup>

Eine Vielzahl supramolekularer Wechselwirkungen, wie z.B. mehrfache Wasserstoffbrückenbindungen<sup>[152]</sup>, hydrophobe Wechselwirkungen<sup>[153]</sup>,  $\pi$ - $\pi$  Stacking<sup>[154]</sup>, Metall-Liganden-Koordination<sup>[155]</sup>, und weitere nichtkovalente Wechselwirkungen<sup>[156]</sup>, können genutzt werden um supramolekulare Polymere zu bilden. Die Art der nicht-kovalenten Wechselwirkungen und die Strukturen der Bausteine, die in supramolekularen Polymersystemen verwendet werden, bestimmen die Eigenschaften des Polymers und können diesem ermöglichen auf externe Stimuli zu reagieren.<sup>[157]</sup>

Eine prominente Klasse der Hydrogele sind Systeme die Wirt-Gast-Interaktionen nutzen, um übergeordnete Strukturen zu bilden und so Wasser zwischen den Ketten einkapseln, was letztendlich zu dem resultierenden Hydrogel führt. So stellten Liu *et al.* ein supramolekulares Polymer mit einem hohen Polymerisationsgrad her, welches auf der Basis von *host-stabilized charge transfer* (HSCT)-wechselwirkungen konstruiert wurde (Abb. 23).<sup>[158]</sup>

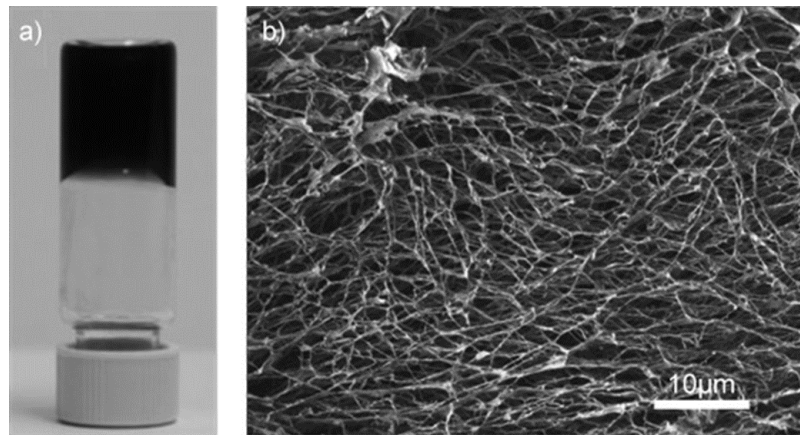


**Abb. 23:** a) Darstellung der Bildung des supramolekularen Polymers, basierend auf *host-stabilized charge transfer* (HSCT)-Wechselwirkungen, b) Struktur der Monomere DADV (**27**) und CB[8] (**28**).<sup>[158]</sup>

Da *charge transfer*-Wechselwirkungen (CT-WW) nur geringe Bindungskonstanten im Vergleich zu Wasserstoffbrückenbindungen<sup>[159–161]</sup> und Metall-Ligand-Wechselwirkungen<sup>[162]</sup> aufweisen wurden mehrere HSCT-Wechselwirkungen für die Herstellung des Hydrogels verwendet. In HSCT-Komplexen befinden sich sowohl Donor als auch Akzeptor in einem Hohlraum (CB[8], **28**) dies führt zu einem verkürzten Abstand von Donor und Akzeptor was zu einer verstärkten CT-Interaktion führt.<sup>[163]</sup> Da eine einzelne HSCT Interaktion allerdings nicht ausreicht um ein langkettiges Polymer zu bilden wurden in DADV (**27**) zwei Viologen-Einheiten als Elektronenakzeptoren und zwei Anthracen-Einheiten als Elektronendonatoren eingebaut. Außerdem wurde ein Butyl-Linker verwendet, welcher die Bildung eines 1:1-Zykluskomplexes aufgrund der kurzen Länge hemmt. Auch ein 2:2-Zykluskomplex kann sich nicht bilden, da es durch die beiden Viologenhälften zu einer repulsiven Abstoßung kommen würde.

Mittels Job Plot konnte festgestellt werden, dass sich das Polymer wie erwartet in einer Stöchiometrie von 2:1 zwischen DADV (**27**) und CB[8] (**28**) ausbildet. Bei diesem Verhältnis erhöht sich die Löslichkeit, da im gebildeten Komplex sich die Anthracen-Gruppen im CB[8] (**28**) befinden, wodurch sich die Lösung stark violett färbt.

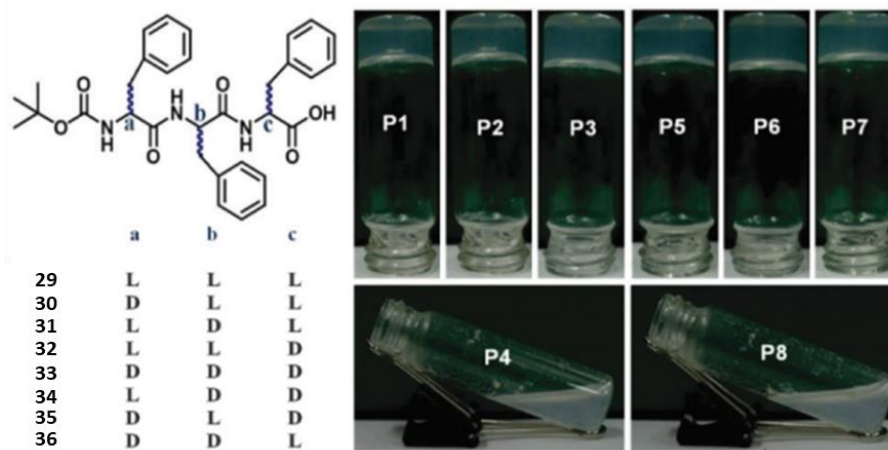
Ab einer Konzentration von 4 mM DADV (**27**) und 2 Äq. CB[8] (**28**) wurde beobachtet dass sich ein violettes Hydrogel bildet (Abb. 24). Erklärt wird dies dadurch, dass ab 4 mM Monomerenkonzentration sich der Polymerisationsgrad steigert, was in letzter Konsequenz zur Gelbildung führt. Dabei wurde angenommen, dass die Haupttriebkraft für die Gelierung durch intermolekulare Wechselwirkungen von CB[8] (**28**) selbst zustande kommt. Carbonylgruppen am CB[8] (**28**) binden dabei Hydroniumionen, dies wurde auch schon bereits für CB[7]-Systeme beobachtet. Zugabe von  $K^+$  überführt das Gel wieder in den Sol Zustand, da die Kaliumionen an die Carbonylgruppen binden und dadurch nicht kovalente Wechselwirkungen geschwächt werden können.



**Abb. 24:** a) Gel gebildet aus DADV (**27**) und 2Äq. CB[8] (**28**). b) REM-Aufnahme des Gels.<sup>[158]</sup>

Ebenso gibt es eine Vielzahl an Hydrogelen die auf die auf Wasserstoffbrückenbindungen, sowie auf  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen basieren. Da diese Interaktionen auch in Peptiden zu finden sind gibt es eine Vielzahl von Hydrogelen die auf diesen basieren. Peptidmoleküle sind nicht nur gute Gelbildner aufgrund des Vorhandenseins verschiedener selbstorganisierender Einheiten in ihren Strukturen, sondern besitzen auch eine inhärente Biokompatibilität, die ihre Anwendbarkeit verbessert.<sup>[160,161]</sup>

Basu *et al.* entwickelte auf Basis synthetischer Tripeptide nicht-zytotoxische Hydrogelatoren, die bei physiologischem pH-Wert und Temperatur ein Krebsmedikament freisetzen können.<sup>[164]</sup> Interessanterweise wurde die Gelsteifigkeit, die Wirkstofffreisetzungskapazität und die proteolytische Stabilität dieser Hydrogele erfolgreich durch den Einbau von D-Aminosäureresten moduliert, was auf eine potenzielle Verwendung für die Wirkstofffreisetzung in der Zukunft hinweisen könnte (Abb. 25).



**Abb. 25:** A) Chemische Aufbau der Tripeptide B) Stereogene Ausrichtung der Chiralitätszentren C) Fotos der Gele bei einem pH-Wert von 7,46 in Phosphatpuffer.<sup>[164]</sup>

Da das Ausgangsgelatormolekül Boc-(L)Phe-(L)Phe-(L)Phe-COOH (**29**) drei chirale Zentren in seiner Struktur aufweist, könnte daher eine Änderung der Chiralität des Phe-Restes die Orientierung des entsprechenden aromatischen Rings und somit die Richtung der  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkung ändern. Dies kann signifikanten Einfluss auf die makroskopischen Eigenschaften des entsprechenden Gels haben, daher ist es von großem Interesse zu untersuchen, wie sich die Veränderung der chiralen Zentren auf die Selbstorganisation, die Gelierung, die mechanische Festigkeit und die Wirkstofffreisetzungskapazität dieser Gele auswirkt.

Interessanterweise zeigte Verbindung **29** (und sein Enantiomer **33**), sowie **30** (und sein Enantiomer **34**) eine augenblickliche Gelierung, während **31** (und sein Enantiomer **35**) 12 Stunden benötigt, um ein Gel zu bilden. Für **32** und sein Enantiomer **36** konnte hingegen keine Gelbildung beobachtet werden. Somit hat die Chiralität einen weitreichenden Einfluss auf die Gelbildung oder Nicht-Gelbildung dieser Tripeptide.

Des Weiteren zeigten Messungen des Zirkulardichroismus (CD), das chiroptische Verhalten aller Verbindungen im aggregierten Zustand. **29**, **30** und ihre Enantiomere zeigen zwei Peaks bei 203 nm und 223 nm, während **31** und **32** nur einen schwachen Peak bei 220 nm aufweisen, was darauf hindeutet, dass **29** und **30** eine etwas geordnetere Struktur haben im Vergleich zu **31** und **32**.

Interessanterweise wurde festgestellt, dass die Intensität des Peaks bei etwa 220 nm allmählich von **29** zu **32** abnimmt. Dies deutet darauf hin, dass die Stärke der  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung in der Reihenfolge **29** > **30** > **31** > **32** abnimmt. Darüber hinaus bestimmt die Chiralität des terminalen Aminosäurerests (ob es sich um "D" oder "L" handelt) das Vorzeichen der CD-Signale bei 220 nm (positiv oder negativ).

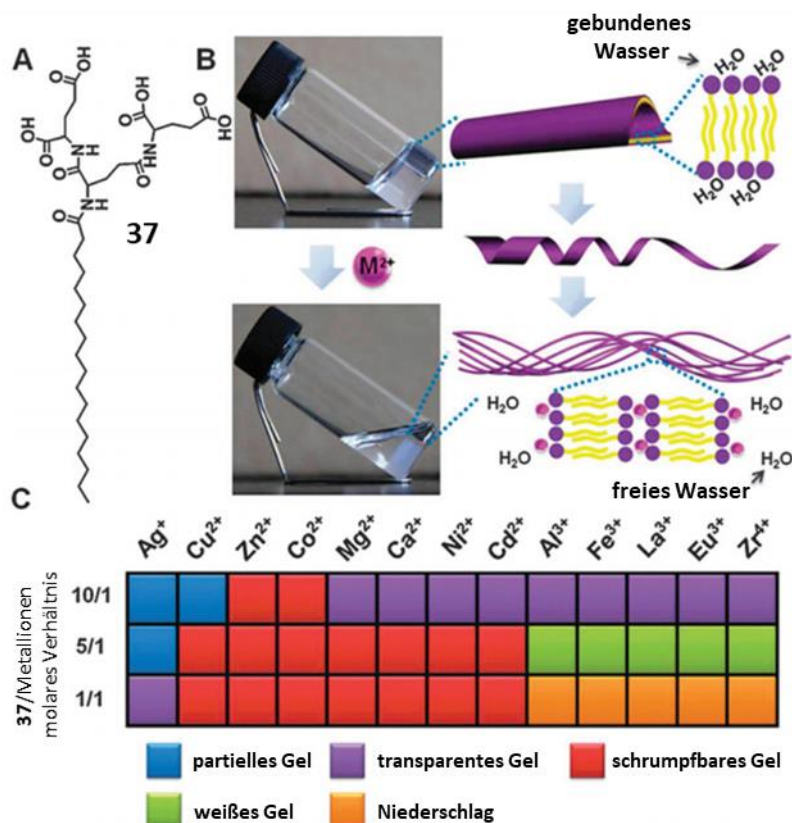
Auch Qin *et al.* berichtete über ein supramolekulares Hydrogel, welches sich durch Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet und durch viele verschiedene Metall-Ionen zum Quellen oder Schrumpfen gebracht werden kann.

Das Gelatormolekül **37** besteht aus einem amphiphilen Dendron das durch hierarchische Selbstassemblierung über Wasserstoffbrückenbindungen Nanoröhren bildet und dies über einen großen pH-Bereich (Abb. 26).<sup>[165]</sup> Da das Gelatormolekül viele carboxylische Säuregruppen aufweist, die das Selbstorganisationsverhalten des Gelators bestimmen wurde der Einfluss durch Metallionen weitergehend untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Gelierungskapazität durch das Vorhandensein der Metallionen erheblich gefördert wird, obwohl das Ausmaß von der Art der Metallionen und dem Verhältnis von Ionen zu **37** abhängig war. Die kritische Gelierungskonzentration (CGC), konnte dabei von 0,3 Gew.-% auf 0,08 Gew.-% reduziert werden, dieser Effekt ist eindeutig mit der Anwesenheit von Metallionen zu begründen und führte zur Bildung eines Supergelators.<sup>[166]</sup> Die CGC lag in Gegenwart von Silberionen sogar nur 0,03 Gew.-%.

Interessanter ist, dass die aus den zweiwertigen Ionen gewonnenen Hydrogele eine kontinuierliche Schrumpfung zeigten, nachdem die Gele mehrere Stunden lang ruhen mussten (Abb. 26B). Insbesondere die zweiwertigen Metallionen mit einem Verhältnis von 5/1 bis 1/1 (**37**/ $Mg^{2+}$ ) konnten alle eine solche Schrumpfung auslösen (Abb. 26C). Der UV-Nachweis des ausgetriebenen Wassers und die rheologischen Eigenschaften des geschrumpften Hydrogels deuteten darauf hin, dass der Volumen-Phasenübergang auf einer Anreicherung des Gelators **37** beruht.

Die Schrumpfung ist ein kontinuierlicher und reversibler Phasen-Übergangsprozess. Bei sanfter Erwärmung kann es in den Sol-Zustand übergehen und bei anschließender Abkühlung wieder in den Gel-Zustand und schließlich bei Raumtemperatur wieder auf das Ausgangsvolumen schrumpfen. Dabei wurde festgestellt, dass das Schrumpfungsverhältnis in der Reihenfolge von  $Mg^{2+}$  >  $Co^{2+}$  >  $Zn^{2+}$  >  $Cd^{2+}$  >  $Ca^{2+}$  >  $Ni^{2+}$  >  $Cu^{2+}$  abnimmt und der Prozess des Schrumpfens der Kinetik erster Ordnung folgt.<sup>[167]</sup>

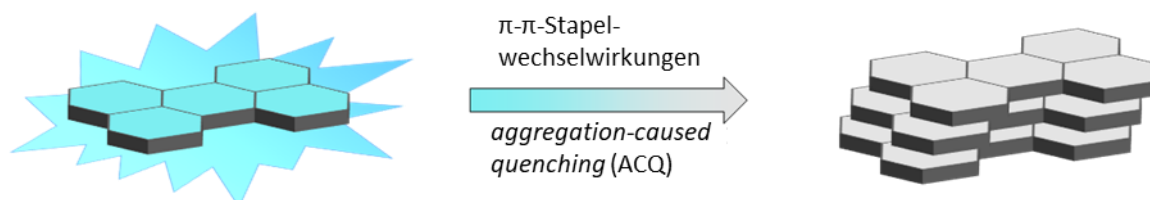




**Abb. 26:** (A) Molekulare Struktur von **37**. (B) Fotografien, veranschaulichen von Metallionen ausgelöste Schrumpfung des supramolekularen Hydrogels. Die Doppelschichtstrukturen bilden zunächst Nanoröhren. Die hinzugefügten Metallionen bewirken eine Vernetzung der Nanoröhren was zur Bildung von Nanofasern führt und das Gel schrumpfen lässt. (C) Einfluss verschiedener Metallionen auf die Gelierungseigenschaften bei unterschiedlichen **37**-Metall-Molverhältnissen. Der Gelator **37** macht in jedem Ansatz 0,13 Gew.-% aus.<sup>[168]</sup>

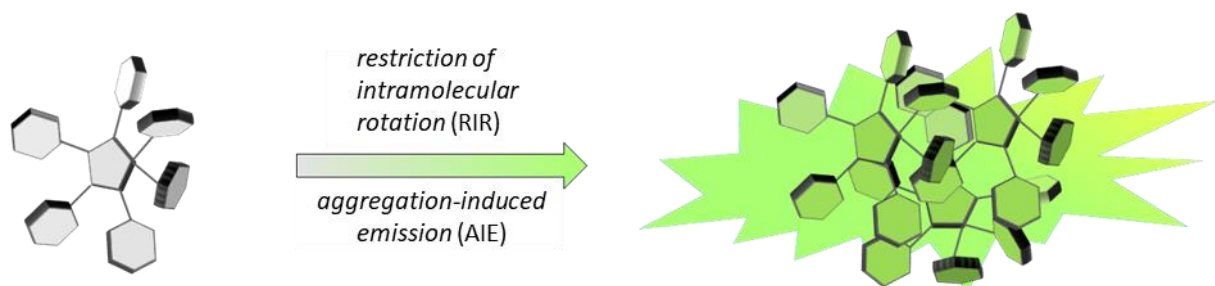
### 2.3.4 Hydrogele mit AIE Eigenschaften

Seit jüngster Zeit ist die Kombination von Hydrogelatoren mit Emissionseigenschaften ein aktuelles Thema<sup>[39,169]</sup>, da klassischerweise die Einführung großer emissiver aromatischer Systeme in ein Hydrogel-Netzwerk aufgrund geringer Löslichkeit und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zu einer schnellen Löschung der Emission führt, was als *Aggregation Caused Quenching* (ACQ) bezeichnet wird (Abb. 27).<sup>[40]</sup>



**Abb. 27:** Schematische Darstellung des Verhaltens klassischer Luminophore, die einem *aggregation-caused quenching* (ACQ) unterliegen.

Um dieses Problem zu überwinden kann eine Klasse emissiver Verbindungen verwendet werden, die sich genau entgegengesetzt zu klassischen Luminophoren verhält, da sie ausschließlich im festen, bzw. aggregierten Zustand eine erhöhte Emission aufweisen. Dieses Phänomen wurde als *aggregation induced emission* (AIE) beschrieben und wurde erstmals im Jahr 2001 von Tang et. al. beobachtet (Abb. 28).<sup>[42,170,171]</sup>



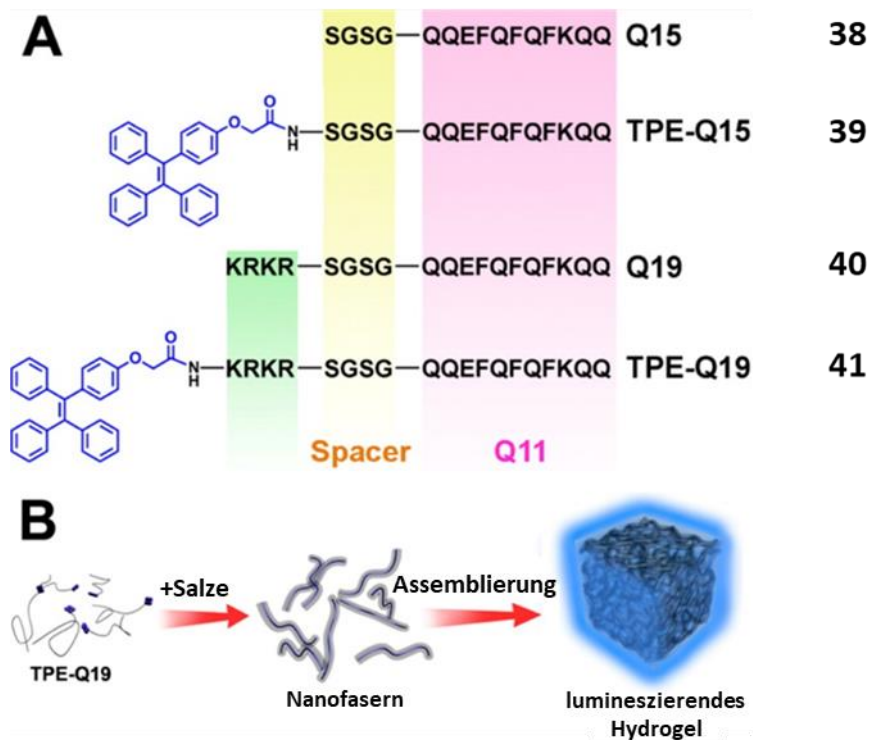
**Abb. 28:** Schematische Darstellung des Verhaltens von Luminophoren, die ein *aggregation-induced emission* (AIE)-Effekt aufweisen.

Dieses Verhalten wird zurückgeführt auf die Einschränkung der intramolekularen Bewegung (RIM), oder intramolekularen Schwingung (RIV).<sup>[43]</sup> Die Verbindungen liegen in Lösung hauptsächlich als Monomere vor, welche die absorbierte Energie in Bewegung und Schwingung umwandeln, was zu einem Verlust der Emissionseigenschaften führt. Aggregieren hingegen die Verbindungen wirken sie als klassische Emittier, ohne einen Verlust der Emission, aufgrund von  $\pi$ - $\pi$ -Kontakten. Solche AIE-Emittier sind seit über einem Jahrzehnt Gegenstand von Studien und finden u.a. Anwendung in Dioden, Photovoltaic-Systemen, bei *Bio-Imaging*, Sensorik, sowie in supramolekularen Strukturen.<sup>[172]</sup>

Mittlerweile können AIE-Motive gezielt in selbstassemblierende Systeme integriert werden um den AIE-Effekt zu begünstigen und je nach Zusammenspiel der nicht-kovalenten Wechselwirkungen ein potentes lumineszentes Gel zu bilden.

Ein bekanntes Beispiel für ein solches AIE-Luminogen ist das Tetraphenylethylen (TPE)-Motiv und wurde bereits in zahlreichen Publikationen verwendet, in denen durch unterschiedliche Ansätze lumineszente Hydrogele gebildet wurden.<sup>[173-176]</sup>

Zhang et. al entwickelten ein solches Hydrogel indem Sie das TPE-Motiv mit unterschiedlichen selbstkomplementären Peptidsequenzen funktionalisierten (Abb. 29).<sup>[176]</sup> Interessanterweise sind die Verbindungen (0,5 gew.-%) zunächst molekular gelöst und beginnen erst in Gegenwart von NaCl (>1 mM) zu gelieren.



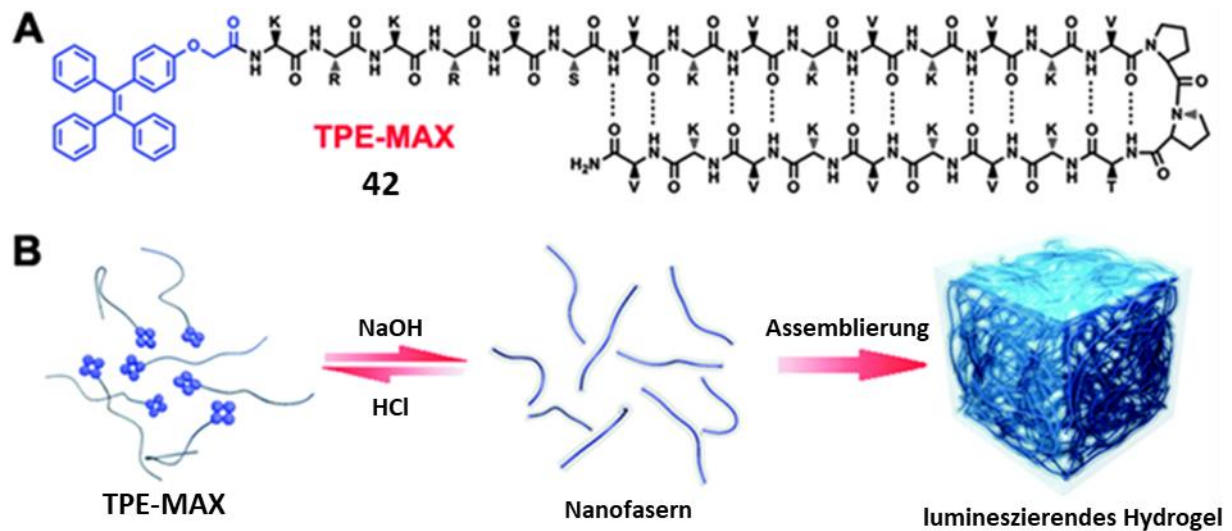
**Abb. 29:** A) Chemische Strukturen von TPE-Peptiden, die für molekulare Hydrogelationsreaktionen verwendet wurden. B) Schematische Darstellung des Gelierungsprozesses zum lumineszierendem Hydrogel durch TPE-Q19.<sup>[176]</sup>

Die so erhaltenen Gele zeigten die typischen Eigenschaften eines AIE-Luminophors, welche sich durch einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe einer NaCl-Lösung kennzeichnet. Des Weiteren wurden Nanofasern, die ein 3D-Netzwerk formen mittels TEM Messungen visualisiert. Ebenfalls konnten  $\beta$ -Faltblattstrukturen nachgewiesen werden, indem eine verstärkte Fluoreszenz in Gegenwart von Thioflavine T (ThT) gemessen wurde.<sup>[177]</sup>

Bei den gebildeten Gelen handelt es sich um weiche Hydrogele, so zeigen die rheologischen Messungen, dass die Module ( $G'$ ) des TPE-Q19-Hydrogels größer als die seiner entsprechenden dynamischen Verlustmodule ( $G''$ ) waren.

Da biologisch abbaubare, lumineszierende Hydrogele, die eine 3D-Verkapselung von Zellen ermöglichen, von großem Interesse im Bereich des *Tissue Engineering* sind, wurde das Hydrogel TPE-Q19 (**41**) hinsichtlich seiner biologischen Abbaubarkeit untersucht. Weil die Sequenz des Peptids Q19 (**40**) reich an Arginin- und Lysinresten ist, die für Trypsin als Restriktionsstellen dienen, wurde die biologische Abbaubarkeit durch enzymatische Hydrolyse getestet. Diese zeigte, dass nach 12-stündiger Inkubation mit 0,025% Trypsin die Transformation vom Gel zum Sol abgeschlossen war, dabei aber nicht die fluoreszenten Eigenschaften verlor.

In einer nachfolgenden Publikation beschreiben Zhang et. al eine Weiterentwicklung des TPE-Peptidsystems, indem Sie eine neuartige Peptidsequenz verwenden, die sensibel auf pH-Änderungen reagiert (Abb. 30).<sup>[178]</sup> Die Peptidsequenz (NH<sub>2</sub>-KRKRGSVKVKVKVDPPTVKVKVKV-Am) ist eine verlängerte Version eines bekannten Peptides MAX1 (Ac-VKVKVKVKVDPPTVKVKVKV-Am).<sup>[179]</sup> Dieses ist in der Lage, ähnlich wie alle Peptide die alternierende polare und unpolare Gruppen aufweisen,  $\beta$ -Faltblattstrukturen durch Selbstassemblierung zu bilden.<sup>[180]</sup> Dies geschieht über intermolekulare Wechselwirkungen der polaren Reste, wenn der pH Werte zwischen 6 und 9 liegt.



**Abb. 30:** A) Chemische Struktur von TPE-MAX und B) schematische Darstellung der reversiblen Art und Weise der lumineszierenden Hydrogelbildung aus TPE-MAX.<sup>[178]</sup>

Der auf dieser Grundlage entwickelte Hydrogelator TPE-MAX (**42**) ist ebenfalls in der Lage ein lumineszentes Gel, in einem pH Bereich zwischen 6 und 10, zu bilden, was anhand von Fluoreszenzmessungen demonstriert wurde. Ebenfalls konnten auch  $\beta$ -Faltblattstrukturen durch Fluoreszenztitrationen in Gegenwart von Thioflavin T (ThT) nachgewiesen werden.<sup>[177]</sup> Des Weiteren sei zu erwähnen, dass das Hydrogel ebenfalls reversibel zwischen Gel und Sol geschaltet werden kann. Rheologische Messungen zeigten auch die typischen Eigenschaften eines weichen Gels ( $G' > G''$ ) und eine hervorragende mechanische Stärke ( $G' > 10\,000$  Pa).

Diese Eigenschaften machen ein solches Gel zu einer vielversprechenden Verbindung hinsichtlich einer Anwendung als 3D-Kulturmaterial.

Yeh et. al nutzte den gleichen Ansatz um neue Hydrogelatoren zu identifizieren, dabei reduzierten Sie jedoch die Peptidsequenz auf 2 Aminosäuren und variierten diese, um unterschiedliche Polaritäten in den Seitenketten zu erzeugen und diesen Einfluss zu studieren. Dabei identifizierten Sie den Tetraphenylethylendiglycin-(TPE-GG)-Hydrogelator (**43**) als effizientestes Gelbildner (Abb. 31).<sup>[174]</sup>

Sie fanden heraus, dass der Hydrogelator TPE-GG (**43**) supramolekulare bänderartige Nanostrukturen ausbildet, welche letztendlich zur Gelierung führen und so ein potentes lumineszentes Hydrogel ausbilden (Abb. 32). Dies machte ihn zu dem kleinsten Hydrogelator auf TPE-Basis, bevor Chu et. al 2018 ein Hydrogel mit nur einer Aminosäure publizierte.<sup>[174,181]</sup>

Bildung von selbstorganisierten Nanobändern und des supramolekularen Hydrogels

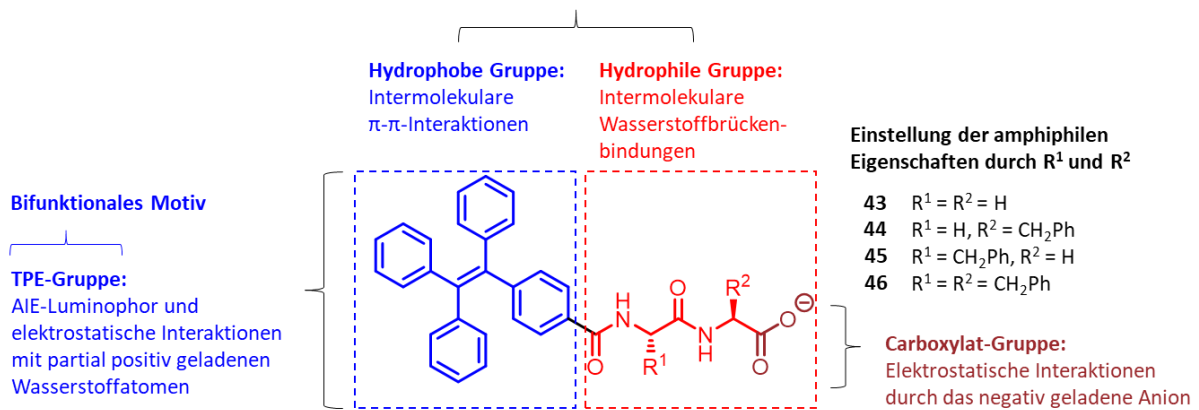


Abb. 31: Design der chemischen Struktur von TPE basierten Hydrogelen.<sup>[174]</sup>

Interessanterweise werden die neuartigen TPE-GG-Nanonänder durch die Aggregation von *nanosheets* gebildet, was sich von anderen aromatisch Dipeptidsystemen unterscheidet.<sup>[182]</sup> Eine kombinierte experimentelle und rechnerische Studie deutet darauf hin, dass die  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen, elektrostatische Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen die wichtigsten Triebkräfte hinter der Bildung von selbstorganisierten *nanosheets* sind. Ebenfalls sollte erwähnt werden, dass die intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Carboxylat- und teilweise positiv geladenen Wasserstoffatomen essentiell für die Bildung der *nanosheets* sind.

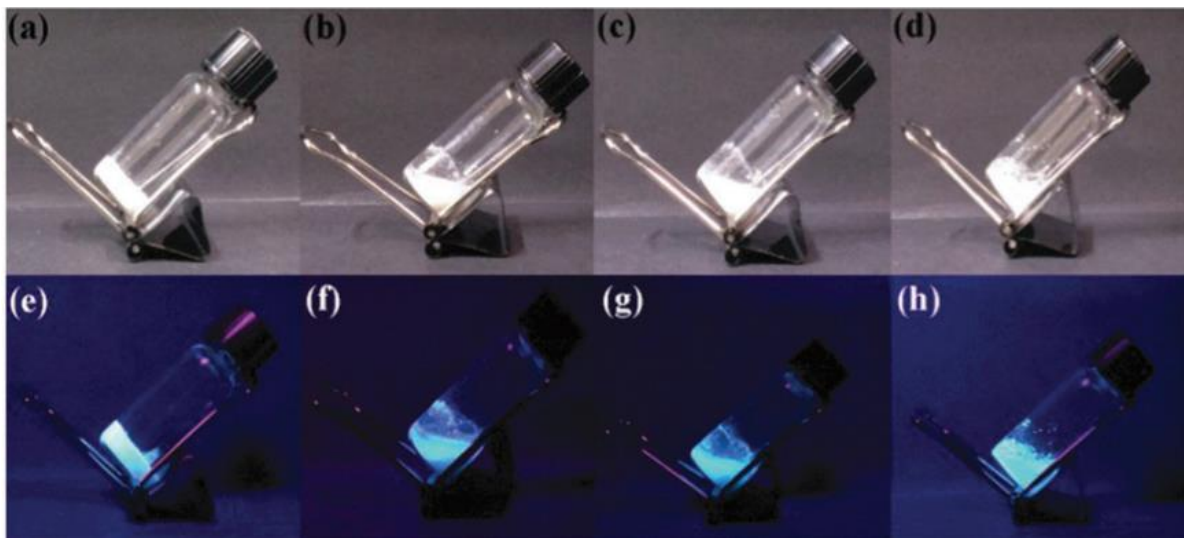
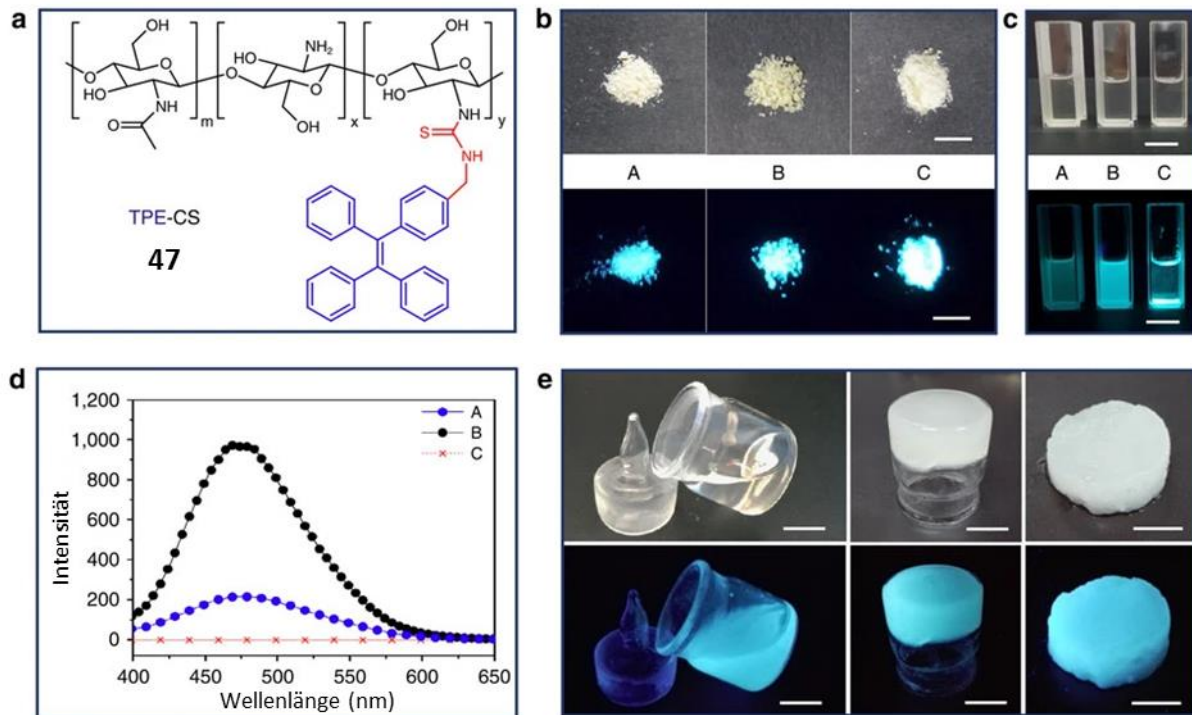


Abb. 32: (a-h) Fotografien von **43-46** mit 3 Gew.-% in Wasser (oben: unter Raumbelichtung; unten: unter 365 nm UV-Beleuchtung).<sup>[174]</sup>

Wang et. al nutzen einen anderen Ansatz zur Entwicklung eines neuen luminszenten Hydrogels. Sie nutzten eines der wichtigsten Polysaccharide Chitosan (CS), welches bereits breite Anwendung findet und funktionalisierten dieses mit dem TPE-Motiv. Die so erhaltene Verbindung TPE-CS (**47**) ermöglicht es so den Gelierungsprozess von CS zu visualisieren und diesen weiter zu untersuchen (Abb. 33).

So zeigt TPE-CS als Feststoff und als Gel eine starke Photolumineszenz unter UV-Beleuchtung (365 nm) (Abb. 33B und E). Des Weiteren wies TPE-CS (**47**) bei Messungen unterhalb der kritischen Gelierungskonzentration einen starken AIE-Effekt in den Fluoreszenzspektren auf, was auf

supramolekulare Aggregate hinweist, welche die Beweglichkeit des TPE-Motives einschränken (Abb. 33E).



**Abb. 33:** a) Chemische Struktur von TPE-CS (**47**). b) Digitale Bilder von Pulverproben; Maßstabsleiste, 1,0 cm. c) TPE-CS-Proben nach Behandlung durch *freeze thaw method* in wässriger LiOH-Harnstoff-Lösung; Maßstab 1,0 cm. d) Fluoreszenzspektren der TPE-CS-Lösung, die Intensität entsprechend der Probe C wurde als Baseline verwendet, da Probe C nicht im LiOH-Harnstoff-Lösungsmittel gelöst werden kann. e) Digitale Bilder der Bildung von Hydrogel mit TPE-CS: Lösung von TPE-CS (**47**), TPE-CS-Gel nach thermischer Gelierung und TPE-CS-Hydrogel nach vollständiger Entfernung von LiOH und Harnstoff; Maßstabsbalken, 5,0 mm. Die Fluoreszenzfotos wurden unter UV-Licht (365 nm) aufgenommen.<sup>[175]</sup>

Des Weiteren fanden Sie heraus, dass die Gelierungseigenschaften zwischen CS und TPE-CS (**47**) sich kaum unterscheiden, was durch rheologische Messungen nachgewiesen wurde. Der Gelierungsprozess konnte anschließend mittels Confocal Mikroskopie visualisiert werden und zeigte, dass vor der thermischen Behandlung der Probe keine Strukturen vorhanden waren und sich mit voranschreitender Zeit größere Strukturen ausbilden.

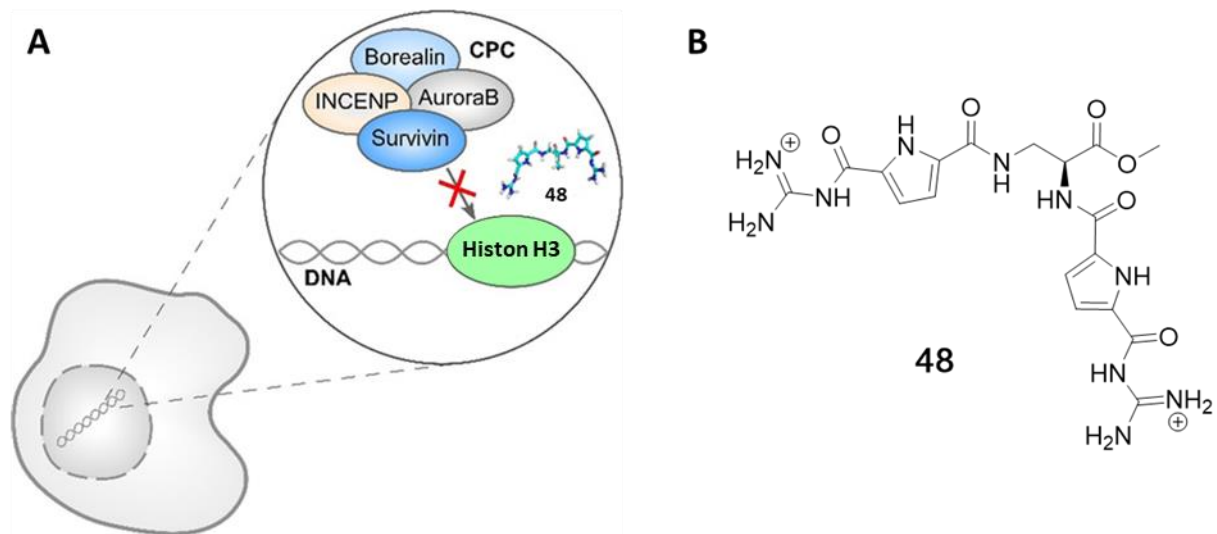
Daher ist dieser Ansatz hervorragend geeignet um den Gelierungsprozess neuer Verbindungen zu studieren und so neue Erkenntnisse zu gewinnen, was die zielgerichtete Entwicklung neuer Systeme erleichtert.

### 3 Zielsetzung

In der hier vorliegenden Dissertation soll das GCP-Bindungsmotiv sowohl für die Adressierung der Proteinoberfläche des Proteins Survivin und der damit einhergehenden Modulation von Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden, als auch für die Herstellung neuartiger AIE-basierter Hydrogele. Daher gliedert sich die Arbeit in einen biologischen und in einen materialwissenschaftlichen Teil.

#### 3.1 Modulation von Survivins Protein-Protein-Interaktionen

Dieser Teil der Dissertation befasst sich mit der Adressierung der Proteinoberfläche von Survivin und der daraus resultierenden Inhibierung der zugehörigen Protein-Protein-Interaktionen. Eine Methode um spezifisch in diese Interaktionen einzugreifen, ist die Verwendung kleiner supramolekularer Moleküle. Dieser Ansatz hat in den vergangenen Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen, vor allem die Adressierung von sog. *Hot Spots*, die sich aus einer Ansammlung von oberflächenexponierten Aminosäureresten zusammensetzen. Diese können anionischer (Asparagin- und Glutaminsäure) oder kationischer (Lysin, oder Arginin) Natur sein und durch spezifische Bindungsmotive erkannt und komplexiert werden. Da Survivin zwei negativ geladene Hot Spots an funktionell relevanten Bindungsregionen aufweist, ist das GCP Bindungsmotiv hervorragend geeignet, um diese zu adressieren. Zunächst soll auf Basis des GCP Bindungsmotives ein supramolekularer Ligand hergestellt werden, der spezifisch an die Histon H3 Bindestelle von Survivin bindet und die Survivin/Histon H3-Interaktion inhibiert (Abb. 34).

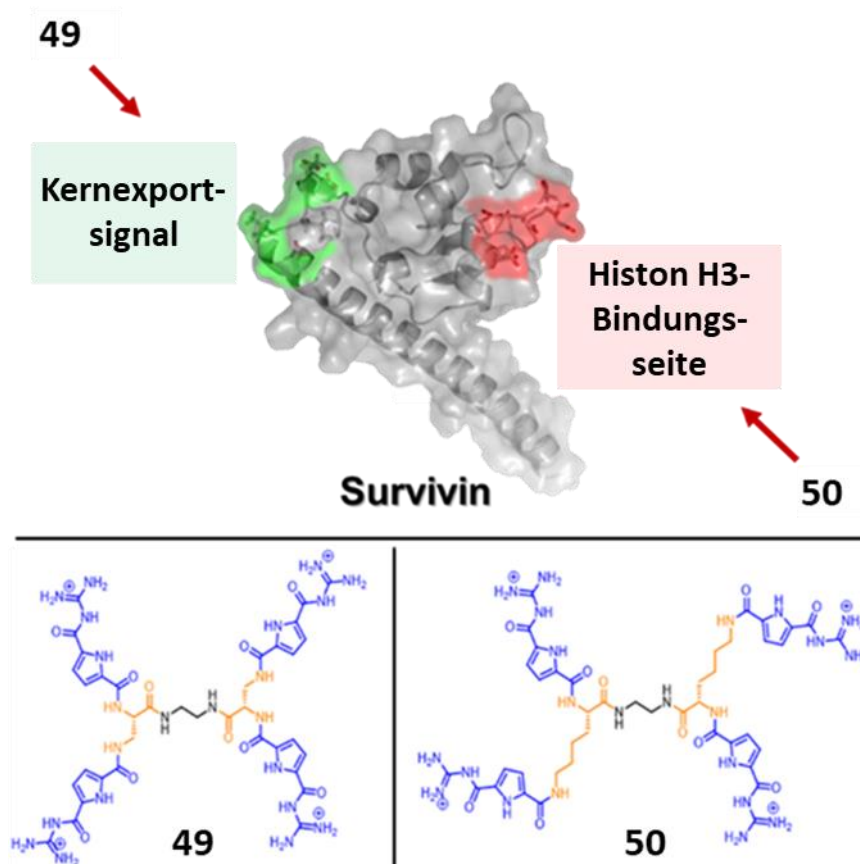


**Abb. 34:** A) Die Interaktion zwischen Survivin (blau) und Histon H3 (grün) ist essentiell, damit Survivin seine Rolle bei der Mitose als Mitglied des *chromosomal passenger complex* (CPC) erfüllen kann, der aus Survivin, Borealin (hellblau), AuroraB (grau) und INCENP (gelb) besteht. Der supramolekulare Guanidiniocarbonylpyrrol-Ligand Kation (GCP)-Ligand L1 (türkis) wurde entwickelt, um die Interaktion zwischen Survivin und Histon H3 zu hemmen und dadurch die Krebszellproliferation zu verringern. B) Chemische Struktur des supramolekularen Liganden **48**.<sup>[111]</sup>

Da die Survivin/Histon H3-Interaktion in Malignomen Zellen überexprimiert vorliegt und direkt in die Zellproliferation involviert ist, soll untersucht werden, welchen Einfluss Ligand **48** auf die Mortalität solcher Zellen hat. Des Weiteren soll überprüft werden, wie genau der Ligand **48** an der Histon H3-Bindungsstelle bindet und wie stark der inhibierende Effekt auf die Survivin/Histon-H3-Interaktion ist.

Im zweiten Teil der Dissertation sollen auf Basis von Ligand **48** neue Liganden entwickelt werden, die in der Lage sind, zwischen der Histon H3-Bindestelle und dem NES (*nuclear export signal*, <sup>89</sup>VKKQFEELTL<sup>98</sup>) zu differenzieren. Das NES wechselwirkt mit Crm1 und ist für den aktiven Transport von Survivin vom Zellkern ins Zytoplasma zuständig und erfüllt dort seine Rolle als Inhibitor der Apoptose. Daher wird erwartet, dass die Hemmung dieser Interaktion zu einem verminderten Kernexport führt und somit ebenfalls zu einer reduzierten Proliferation der Zellen (insbesondere malignome Zellen).

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden vorherige Docking Studien durchgeführt, welche darauf hinweisen, dass der supramolekulare Ligand **49** spezifisch an das NES bindet und Ligand **50** an die Histon H3-Bindestelle. Entscheidend dabei war, dass nur die Distanz zwischen den GCP-Gruppen durch unterschiedliche Linker (orange) variiert werden sollten (Abb. 35).



**Abb. 35:** Schematische Darstellung der Proteinoberfläche von Survivin mit zwei biologisch relevanten PPI-Hotspots: Das Kernexportsignal (NES, grün) und die Histon H3-Bindungsstelle (rot). Die Liganden **49** und **50** wurden so konzipiert, dass sie entweder auf die Histon-H3-Bindungsstelle (**50**) oder die NES (**49**) abzielen. Guanidiniocarbonylpyrrol (GCP)-Gruppen sind blau und Linkereinheiten orange dargestellt (unten).<sup>[183]</sup>

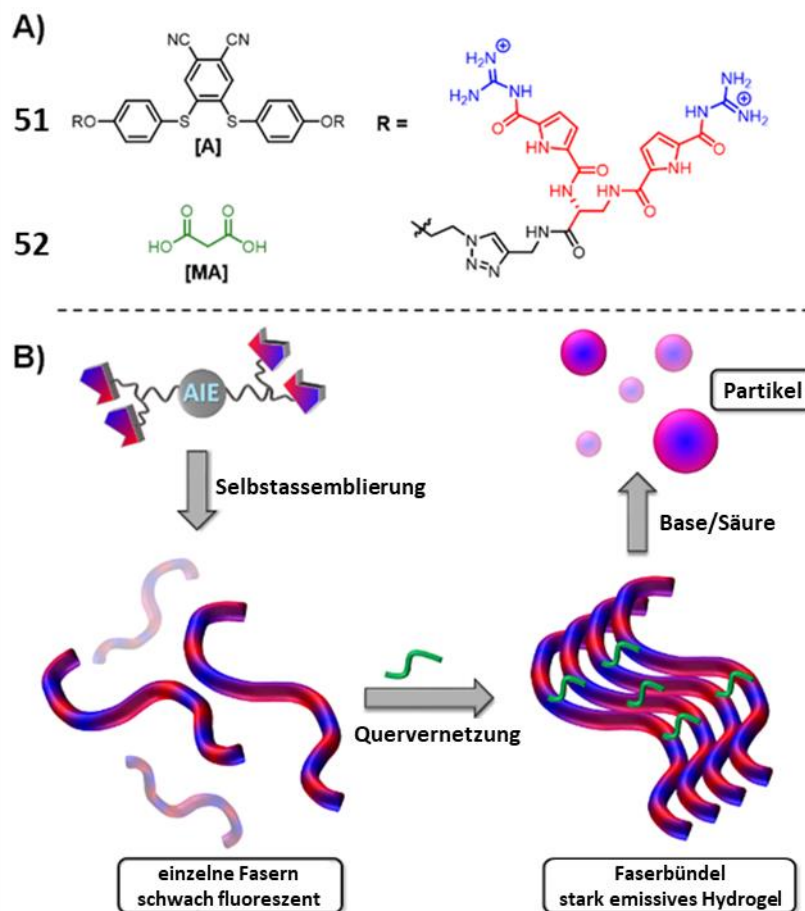
Auf dieser Basis wurde die Hypothese aufgestellt, dass *fine tuning* der Bindungsabstände zwischen den GCP-Einheiten zur Bevorzugung einer Bindungsseite führt. Durch die dadurch hervorgerufene/bedingte Modulation der damit zusammenhängenden PPI wird Einfluss auf deren biologische Funktionalität genommen. Zu diesem Zweck sollten die Liganden **49** und **50** synthetisiert und wie Ligand **48** hinsichtlich ihres biologischen Einflusses untersucht werden.



### 3.2 Entwicklung AIE basierter Hydrogelatoren

In diesem Teil der Dissertation wird die Entwicklung neuartiger Hydrogele behandelt, die auf verschiedene Stimuli reagieren, wodurch es möglich ist, zwischen Sol- und Gel-Zustand zu schalten. Des Weiteren soll im Gel-Zustand eine Fluoreszenz zu beobachten sein, die durch Überführung in den Sol-Zustand wieder gelöscht werden kann. Da klassische Luminophore innerhalb eines Hydrogelnetzwerkes aufgrund geringer Löslichkeit und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen rasch ihre emissiven Eigenschaften verlieren, ist dieses relativ neue Feld von hoher Relevanz.

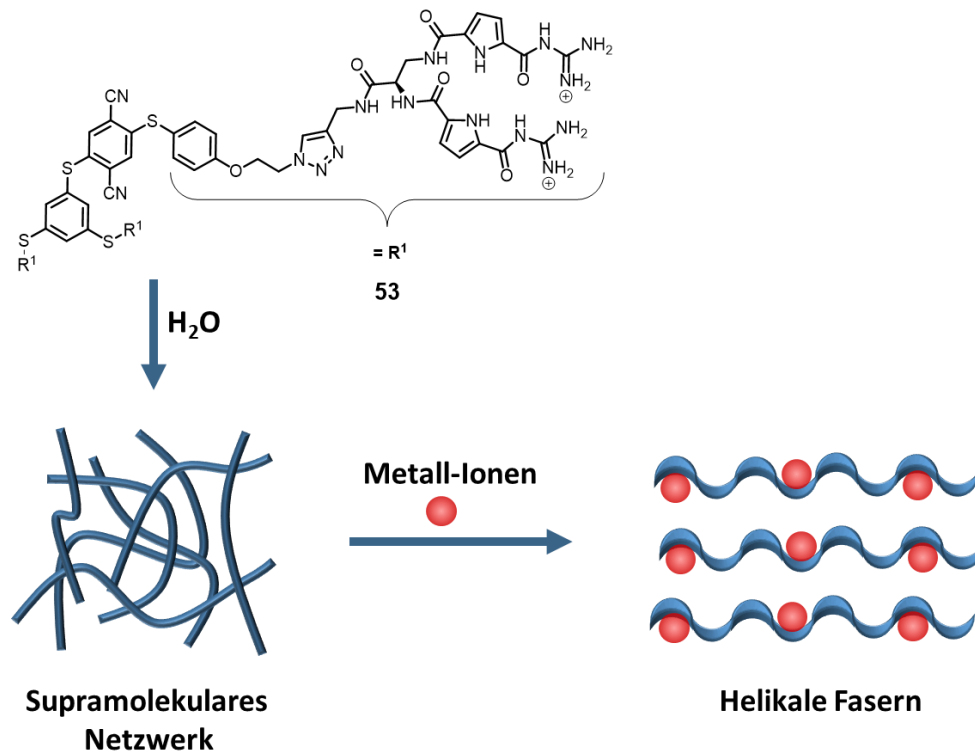
Ein Ansatz, dieses Problem zu überwinden, ist die Verwendung von AIE Luminophoren, wie sie erstmals 2001 von Tang *et al.* beschrieben wurden. Der große Vorteil ist, dass solche Verbindungen in Lösung kaum bis keine Emissionen aufweisen, nach Restriktion der Freiheitsgrade jedoch eine starke Fluoreszenz beobachtet werden kann. Dafür soll ein kürzlich beschriebenes AIE-System mit vier selbstkomplementären Guadiniumcarbonylpyrrol (GCP)-Einheiten funktionalisiert werden (Abb. 36).



**Abb. 36:** A) Chemische Struktur und Aufbau des Hydrogelator-Systems, B) Schematische Darstellung der supramolekularen Anordnung der einzelnen Komponenten zu lumineszierenden Faserbündeln unter Verwendung eines Zwei-Komponenten-Ansatzes sowie deren Stimuli-Reaktionsfähigkeit.<sup>[37]</sup>

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der supramolekulare Hydrogelator **51** kationische Fasern bildet, die durch anionische *Crosslinker* wie Malonsäure **52** quervernetzt werden können. Darüber hinaus soll das neuartige System auf verschiedene äußere Reize wie Wärme, Schütteln sowie pH-Änderungen untersucht werden, was im Rahmen der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse das erste Beispiel wäre, das diese Eigenschaften kombiniert.

Im letzten Teil der Dissertation soll der vorausgegangene Hydrogelator weiter modifiziert werden, um ein potenteres Gel bei einer geringen kritischen Gelierungskonzentration (CGC) zu formen. Dazu sollen weitere GCP-Valenzen in die Struktur eingeführt werden, um eine Quervernetzung des Hydrogelnetzwerkes zu erreichen. Da der neue Gelator **53** zusätzlich viele Koordinationsstellen aufweist, soll überprüft werden, inwiefern die Morphologie und die damit einhergehenden makroskopischen Eigenschaften durch Zusatz von Metallionen beeinflusst werden können (Abb. 41).



**Abb. 37:** Struktur des Hydrogelators **53** und schematische Darstellung struktureller Änderungen auf einer makroskopischen Ebene.

Sollte der Zusatz von Metallionen eine drastische Änderung der Gelierungseigenschaften (potenteres/schwächeres Gel) hervorrufen, wird angenommen, dass sich dies direkt in der Emission des erhaltenen Gels widerspiegelt. Dies wird erwartet, da ein stärkeres Gel die freie Rotation des AIE-Kerns ebenfalls stärker hindern wird. Somit sollen die vielversprechendsten Metallionen identifiziert und hinsichtlich des Einflusses auf die morphologischen Änderungen untersucht werden.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

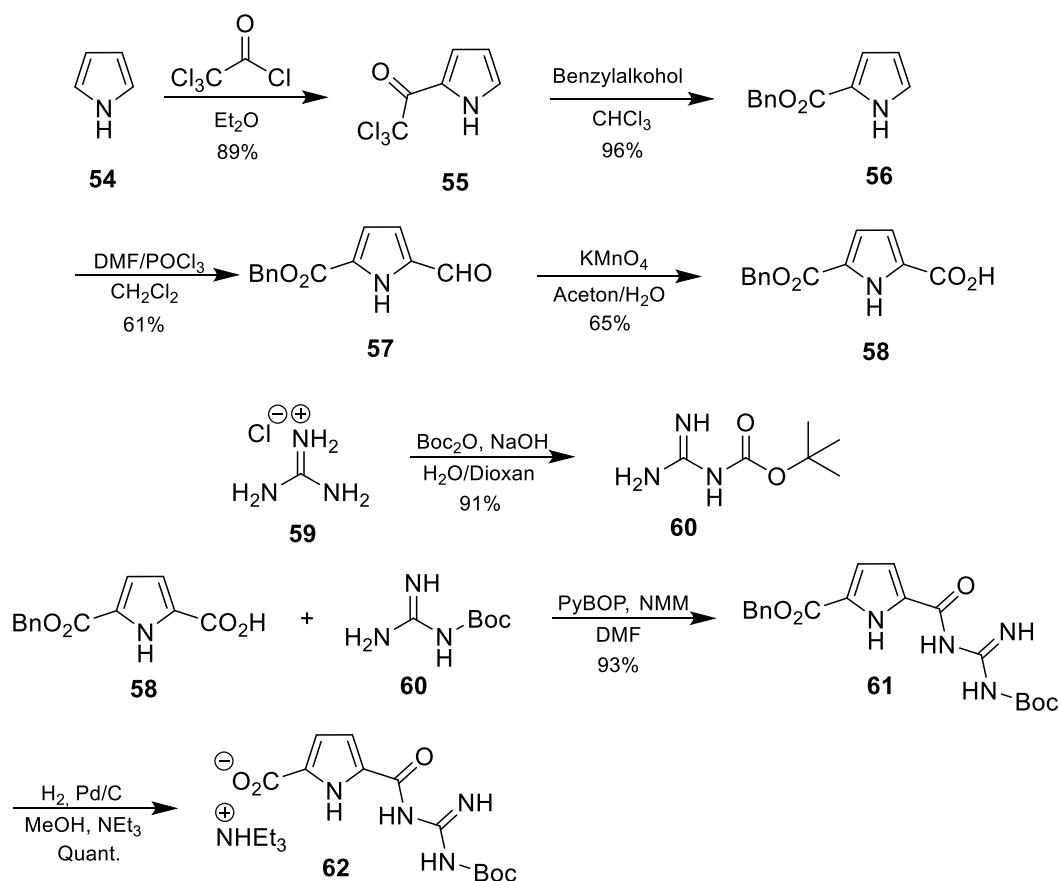
### 4.1 Entwicklung eines Inhibitors für die krebsrelevante Survivin-Histon H3-Interaktion

Die in diesem Kapitel diskutierten biologischen Messungen sind in Zusammenarbeit mit Dr. Cecilia Vallet aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Shirley K. Knauer (Universität Duisburg-Essen, Deutschland) entstanden. Details zu den Messmethoden können dort erfragt werden.

NMR-Titrationsmessungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Christine Beuck aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Bayer (Universität Duisburg-Essen, Deutschland) durchgeführt.

#### 4.1.1 Synthese des GCP Bindungsmotives

Um die nachfolgenden Verbindungen mit den überlegenen Oxo-Anionenbinder funktionalisieren zu können, musste dieser zunächst synthetisiert werden. Die Synthese des GCP Motives ist in der Schmuck-Gruppe gut etabliert<sup>[184]</sup> und erfolgte durch 6 konvergente Syntheseschritte (Schema 2).



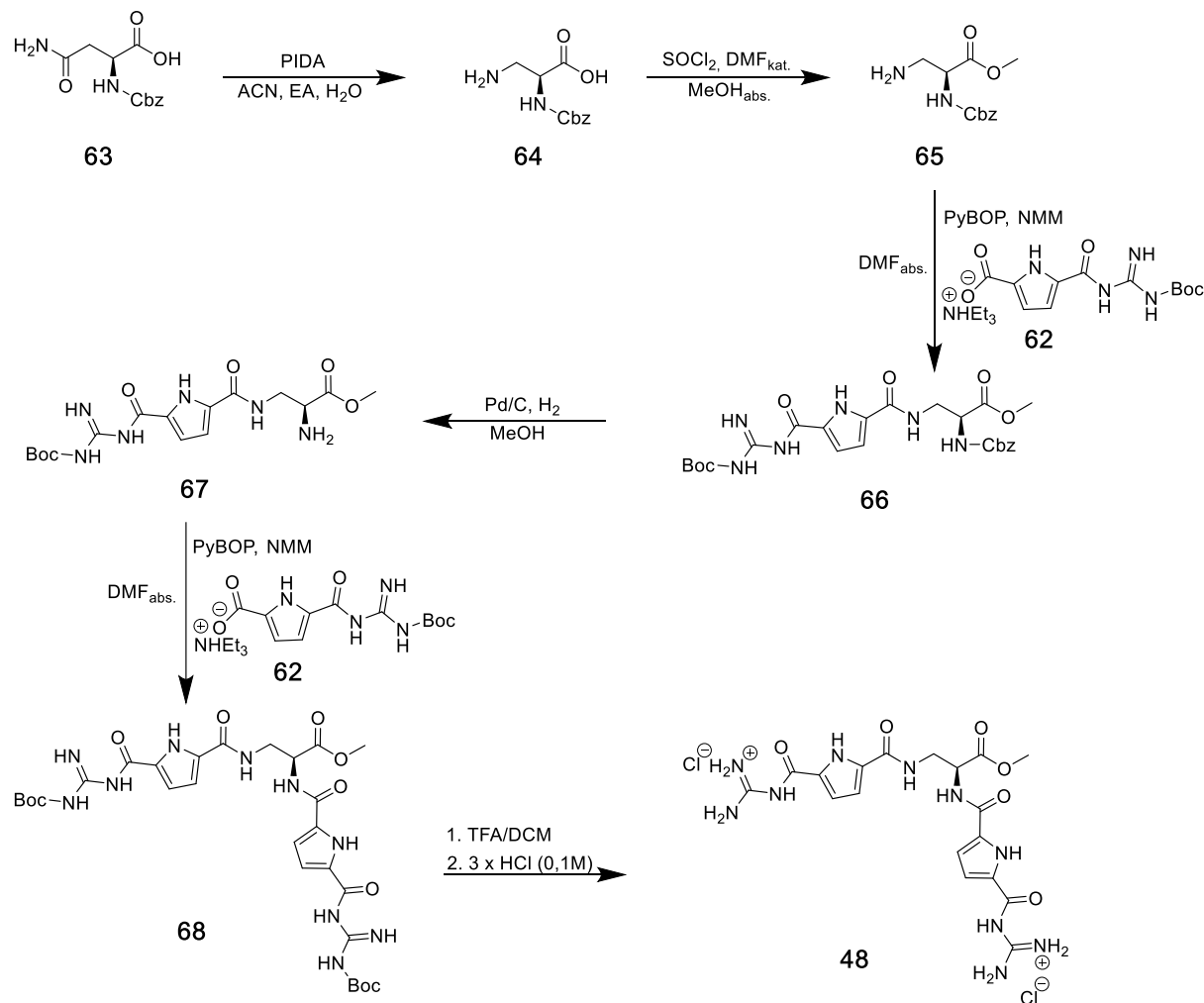
**Schema 2:** Syntheseroute des GCP-Bindungsmotives **62**.

Die Synthese startete ausgehend vom kommerziell erhältlichen Pyrrol (**54**). Dazu wurde dieses in Diethylether mit Trichloroacetylchlorid acetyliert, wodurch Trichloroacetylpyrrol (**55**) entstand. Trichloroacetylpyrrol (**55**) wurde anschließend mit Natrium-Benzylat umgesetzt, dieses greift die Carbonylgruppe nukleophil an und Haloform wird eliminiert, was Benzylester **56** ergab. Durch eine Vilsmeier-Haack-Formylierung von **56** wurde in der 5-Position des Pyrrols eine Aldehydgruppe eingeführt wodurch **57** erhalten wurde. Eine Oxidation des Aldehyds **57** mit Kaliumpermanganat

lieferte die Carbonsäure **58**. Die freie Carbonsäure **58** wurde anschließend in DMF mit PyBOP umgesetzt, wodurch *in situ* ein reaktiver Aktivester gebildet wird. Im Anschluss wurde Boc-Guanidin (**60**) hinzugegeben, welches mit dem Aktivester zum Kupplungsprodukt **61** führte. Eine Entschützung mit Pd/C unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre spaltete die Benzylschutzgruppe ab, die nachfolgende Zugabe von Triethylamin ergab das GCP-Bindungsmotiv als Triethylammonium-Salz **62**. Die Syntheseroute über alle Reaktionsschritte lieferte eine Ausbeute von 31,5% und kann problemlos im Multi-Gramm-Maßstab durchgeführt werden.

#### 4.1.2 Synthese des supramolekularen Liganden für die Adressierung des Histon H3-Bindestelle

Die Synthese des Inhibitors **48** startete ausgehend von der kommerziell erhältlichen Aminosäure Cbz-Asn-OH (**63**) und besteht aus 6 Syntheseschritten (Schema 3).



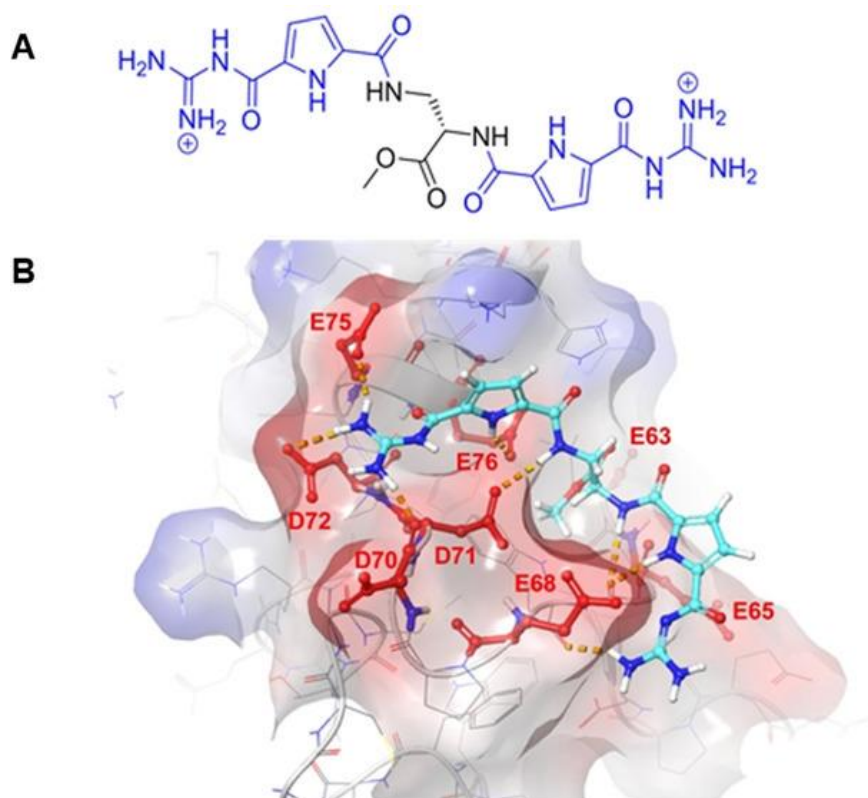
**Schema 3:** Syntheseroute des supramolekularen Liganden **48**.

Als erstes wurde Cbz-L-Asn-OH (**63**) mit PIDA in einer Mischung aus ACN, EA und H<sub>2</sub>O umgesetzt, wodurch ein Hoffman-Abbau stattfindet, dadurch lagert sich die Amid-Gruppe zu einem primären Amin um und die künstliche Aminosäure Cbz-L-DAP-OH entsteht (**64**). Anschließend wurde Cbz-L-DAP-OH (**64**) in MeOH mit Thionylchlorid und katalytischen Mengen DMF umgesetzt, wodurch die

Carbonsäure methyliert wurde und zu Cbz-*L*-DAP-OMe (**65**) führte. Nachfolgend wurde Cbz-*L*-DAP-OMe (**65**) mit PyBOP, NMM und GCP (**62**) umgesetzt, wodurch das freie Amin mit dem GCP-Bindungsmotiv funktionalisiert und **66** als weißer Feststoff hergestellt wurde. In Gegenwart einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre und katalytischen Mengen Pd/C wurde die Cbz-Schutzgruppe reaktiv gespalten, wodurch **67** entstand. Eine weitere Kupplungsreaktion mit PyBOP, NMM und GCP (**62**) führte schließlich zum geschützten Inhibitor **68**. Um die Boc-Schutzgruppen zu entfernen, wurde **68** in DCM und TFA gelöst, wodurch das Rohprodukt entstand. Abschließend wurde das Rohprodukt über MPLC gereinigt und 3-mal mit 0,1 M HCl umgesalzen, aus welchem der Ligand **48** als Hydrochloridsalz mit einer Reinheit von >95% hervorging.

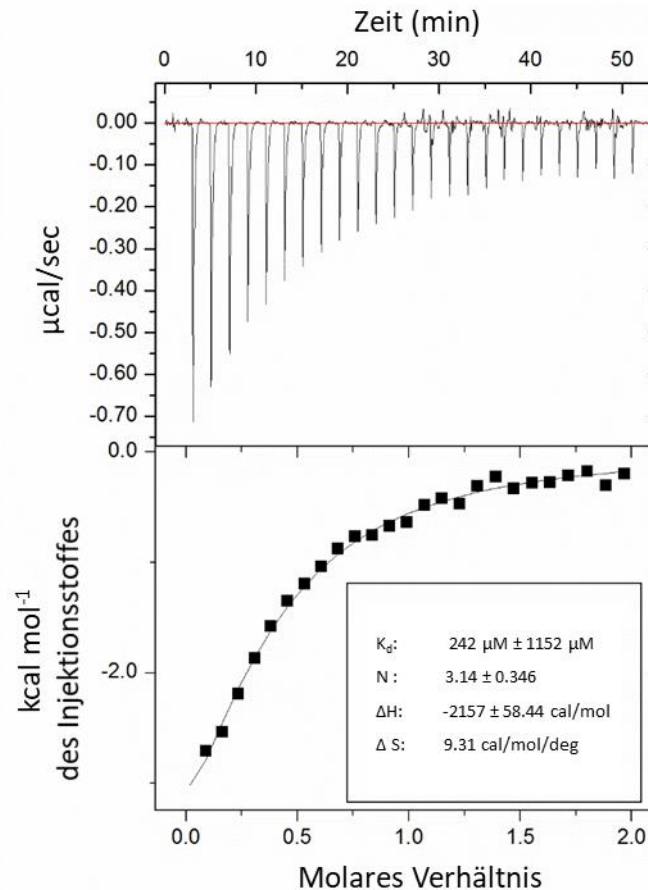
### 4.1.3 Bindungsstudien

Um einen potentiellen Liganden für die oberflächenexponierte anionische Histon H3-Bindestelle von Survivin zu identifizieren, wurden zunächst Docking-Studien mit einer fokussierten Bibliothek von Liganden durchgeführt. Kriterium war, dass die Verbindungen eine oder zwei GCP-Einheiten enthalten sollen, um die negativ geladenen Aminosäuren effizient komplexieren zu können und somit die Proteinoberfläche adressiert werden kann. Des Weiteren wurden die Linker variiert, um den Abstand zwischen den GCP-Einheiten zu verändern und so die beste Bindungsorientierung zwischen Liganden und Zielaminosäuren zu erzielen. Ligand **48** wurde dabei als vielversprechendster Kandidat mit dem besten Docking-Score identifiziert (Abb. 38).



**Abb. 38:** A) Struktur des supramolekularen Liganden (**48**), mit zwei GCP-Gruppen (blau). B) Docking von **48** (türkis) an die Histon H3-Bindestelle (rot) von Survivin. Die gestrichelten Linien (orange) veranschaulichen die attraktiven Wechselwirkungen zwischen dem Liganden **48** und den exponierten Aminosäuren von Survivin.<sup>[111]</sup>

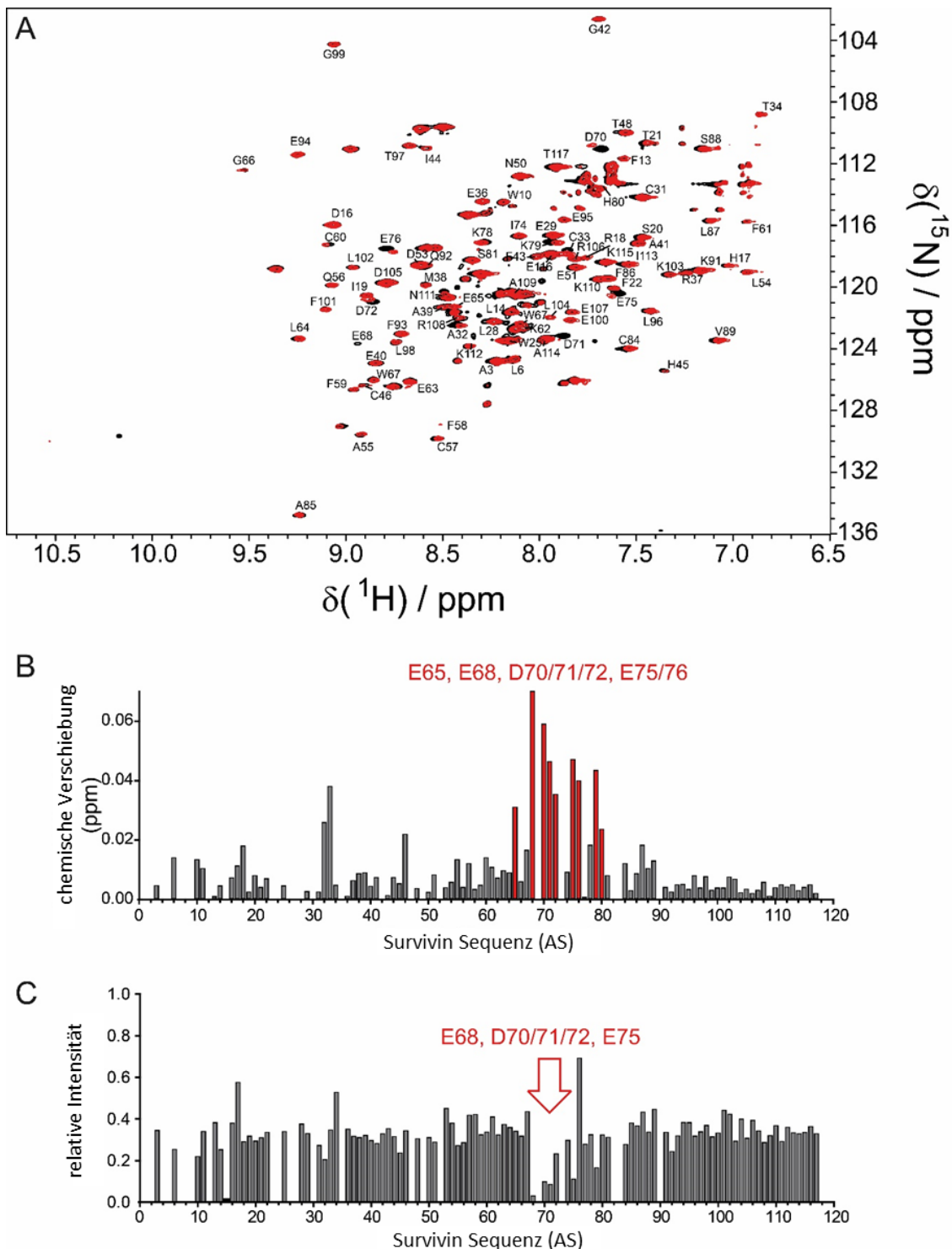
Um eine Bindungskonstante zwischen dem Liganden **48** und Survivin zu bestimmen, wurden zunächst ITC-Messungen durchgeführt. Dazu wurde der Ligand in der Messzelle vorgelegt und das Protein hinzutitriert. Dabei konnte eine stark exotherme Wärmetönung beobachtet werden, was für eine Bindung zwischen Ligand **48** und Survivin spricht (Abb. 39). Die Bestimmung einer Bindungskonstante war dabei nicht möglich, da Ligand und Protein in der Messzelle ausgefallen sind.



**Abb. 39:** ITC-Messungen von Survivin-120 mit Ligand **48** in Wasser mit HEPES (2,5 mM), NaCl (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM) und TCEP (0,05 mM), pH = 6,5. Titration von Survivin-120 zu Ligand **48**, Rohdaten aus den einzelnen Injektionen (oben), integrierte Peaks sowie der entsprechende Fit und die thermodynamischen Parameter (unten).<sup>[111]</sup>

Um festzustellen wo der Ligand **48** auf der Oberfläche bindet, wurden NMR-Titrationsexperimente durchgeführt, um Aminosäuren, die mit dem Liganden **48** wechselwirken, zuordnen zu können (Abb. 40). Für die NMR-Titration wurde ein Modellsystem für Survivins WT (1-142) verwendet. Diese Variante ist eine am C-Terminus verkürzte Version und besitzt 120 AS, ebenfalls wurde Survivin (1-120) <sup>15</sup>N gelabelt was es ermöglicht die chemische Verschiebung während der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-BEST-TROSY-HSQC Messungen zu ermitteln. Die NMR-Titration zeigte signifikante chemische Verschiebungen für die Glutaminsäuren (E) 65 und 68, Asparaginsäuren (D) 70, 71 und 72, sowie Glutaminsäuren (E) 75 und 76 (Abb. 40A). All diese Aminosäuren können der Histon H3-Bindestelle zugeordnet werden, welche die Aminosäuren 51-80 umfasst.<sup>[185]</sup> Des Weiteren lassen die NMR-Signalintensitäten darauf schließen, dass ein Bindungsgleichgewicht mit einer Kinetik im mittleren Zeitbereich (ms) vorliegt, was einer Dissoziationskonstante im µm-Bereich entspricht. Ebenfalls zeigten die relativen Intensitäten  $I/I_0$  eine signifikante Abnahme im Bereich der Histon H3-Bindestelle, was auf eine Ligandenbindung innerhalb dieser Region hinweist (Abb. 40C). Glutaminsäure (E) 68, Asparaginsäuren (D) 70, 71 und 72 und

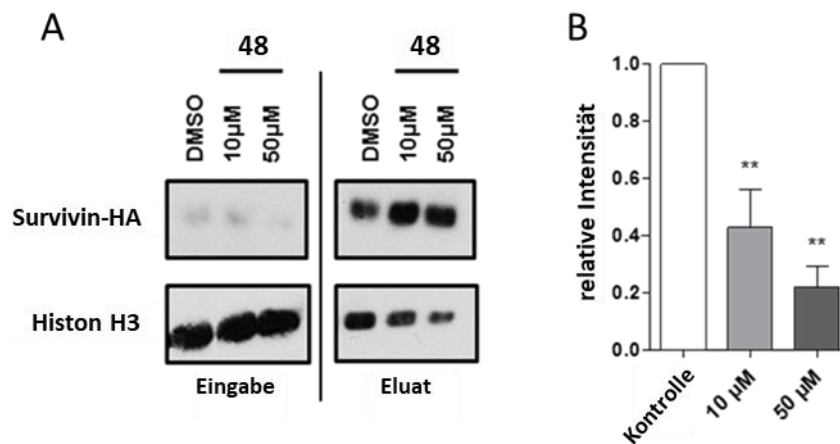
Glutaminsäure (E) 75 weisen eine starke Abnahme der Signalintensität auf (Abb. 40B). Diese Ergebnisse bestätigen die Docking Studien und zeigen deutlich, dass **48** an die Oberfläche der Histon H3-Bindestelle von Survivin bindet.



**Abb. 40:** A)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -BEST-TROSY-HSQC Spektrum einer  $300 \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -markierten Survivin 1-120 mit (rot) und ohne (schwarz)  $300 \mu\text{M}$  **48**. B) Auftragung der chemischen Verschiebung jedes Signals gegen die Survivin-Sequenz. Die Reste mit signifikanten chemischen Verschiebungen ( $>0,02$  ppm) sind rot hervorgehoben, darunter Asparaginsäure- und Glutaminsäurereste die an der Histon-H3-Bindestelle von Survivin lokalisiert sind. C) Auftragung der relativen Signalintensität jedes gegen die Survivin-Sequenz. Die ausgeprägte Abnahme der relativen Signalintensitäten innerhalb der Histon-H3-Bindestelle von Survivin, weist ebenfalls auf eine Ligandenbindung innerhalb dieser Region hin (roter Pfeil).<sup>[111]</sup>

#### 4.1.4 Biologische Studien

Da gezeigt werden konnte, dass Ligand **48** mit der Histon H3-Bindestelle von Survivin interagiert, wurde anschließend untersucht, wie **48** von den Zellen aufgenommen wird und ob dadurch die Interaktion zwischen Survivin und Histon H3 beeinflusst wird. Um den Einfluss und den Effekt des Liganden beurteilen zu können, wurde zunächst eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Dafür wurden HeLa-Zellen verwendet, bei denen es sich um Gebärmutterhalskrebs-Zellen handelt. Diese wurden mit HA markiertem Survivin transfiziert und mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen behandelt, als Kontrolle wurde die jeweilige Menge an DMSO verwendet. Die Zelllysate wurden nach 24 Stunden Inkubation hergestellt und mit magnetischen HA-Antikörpern gekoppelten Beads inkubiert. Dies ermöglicht die Elution von Survivin-HA zusammen mit allen Proteinen, die an Survivin gebundenen sind, einschließlich Histon H3. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Menge an Survivin gebundenem Histon H3 quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Ligand **48** die Survivin/Histon H3-Interaktion konzentrationsabhängig inhibiert. So führte eine Ligandenkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer Abnahme von 60% der Survivin/Histon H3-Interaktion, wobei eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eine Abnahme von 80% bewirkte (Abb. 41).

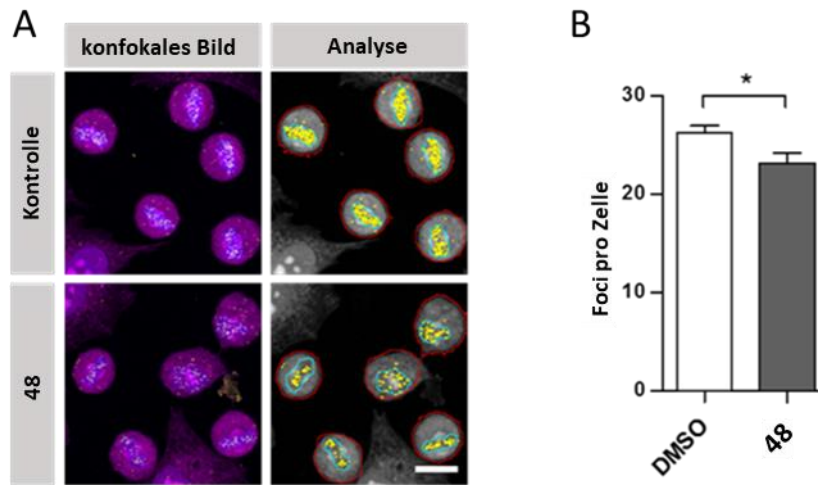


**Abb. 41:** **48** ist in der Lage, die Interaktion zwischen Survivin und Histon H3 in HeLa-Zellen zu hemmen. A) Immunpräzipitationsexperimente zeigen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Interaktion zwischen Survivin und Histon H3 durch **48**. B) Die quantitative Analyse des Western Blot zeigt die Intensität des Histon-H3-Signals im Eluat, normalisiert auf das jeweilige Survivin-HA-Signal von HeLa-Zellen, die entweder mit 10  $\mu\text{M}$  **48**, 50  $\mu\text{M}$  **48** oder DMSO (Kontrolle) behandelt wurden. Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Der Standardfehler des Mittelwertes wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Daten wurden mittels t-Test analysiert. Zwei Sternchen (\*\*) zeigen einen p-Wert kleiner als 0,01 an.<sup>[111]</sup>

Da die Western-Blot-Analyse als semi-quantitativ gilt und bei der Co-Immunpräzipitation das HA-markierte Survivin überexprimiert vorliegt, was nicht den natürlichen Bedingungen in der Zelle entspricht, wurde das Ergebnis mit einem *Proximity Ligation Assay* (PLA) überprüft. Ein PLA ermöglicht die Visualisierung von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb von Zellen auf einer endogenen Ebene. Dazu werden zuerst zwei Primärantikörper an die Zielproteine Survivin und Histon H3 gebunden. Diese werden durch Sekundärantikörper erkannt, die mit einem Paar kurzer einzelsträngiger Oligonukleotide verbunden sind. Sobald die Zielproteine miteinander interagieren und sich dabei näher als 40 nm kommen, hybridisieren und ligieren die Oligonukleotidstränge mit zwei weiteren Konnektoroligonukleotiden und bilden so eine zirkuläre DNA-Struktur. Eine DNA-Polymerase amplifiziert diese anschließend durch *Rolling Circle-Amplifikation* mit fluoreszierenden Nukleotiden, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie als PLA-Signale detektiert werden können. Der PLA zeigte eine



signifikante Hemmung der Survivin/Histon-H3-Interaktionen innerhalb der Zellen nach der Behandlung mit **48**, was die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitation bestätigt (Abb. 42).

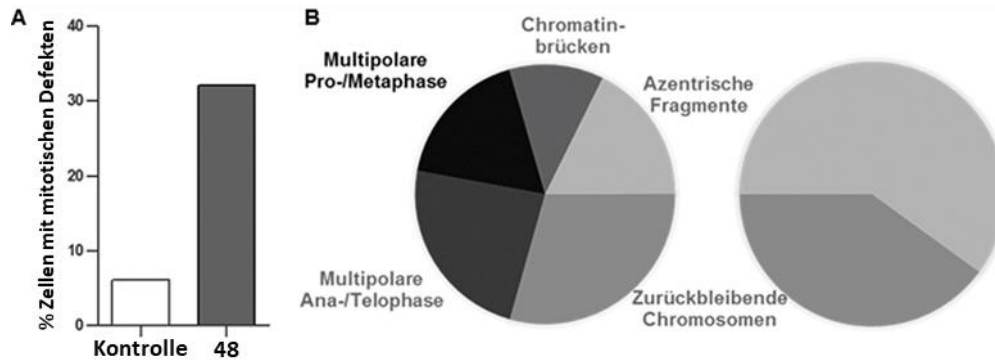


**Abb. 42:** Der inhibierende Effekt von **48** konnte mittels PLA bestätigt werden. A) PLA in HeLa-Zellen, die mit 50  $\mu\text{M}$  **48** oder der entsprechenden Menge DMSO (Kontrolle) behandelt wurden. PLA-Foci sind in Gelb, DNA in Blau und ganze Zellen sind in Magenta dargestellt. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ . B) Quantifizierung der PLAs. Der Standardfehler des Mittelwertes wird durch die Fehlerbalken angezeigt.  $N > 55$ . Die Daten wurden mittels t-Test analysiert. Ein Stern (\*) zeigt einen p-Wert kleiner als 0,05 an.<sup>[111]</sup>

Nachdem gezeigt werden konnte, dass **48** die Interaktion zwischen Survivin und Histon H3 reduzieren kann, wurde untersucht, ob **48** auch Survivins Rolle in der Zellproliferation beeinflusst. Dafür wurden HeLa-Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  **48** versetzt, synchronisiert und während der Mitose fixiert. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt, um die mitotischen Defekte identifizieren zu können. Die identifizierten mitotischen Defekte werden in 5 verschiedene Klassen kategorisiert:

- 1) **Chromatinbrücken:** Chromatinbrücken kommen in der Ana-/Telophase vor und weisen das Merkmal einer "DNA-Brücke" zwischen zwei Gruppen segregierender Chromosomen auf. Sie können mit beiden Gruppen segregierender Chromosomen verbunden oder an einem oder beiden Enden getrennt sein. In der Anaphase können Sie brechen und so in der Mitte getrennt erscheinen.<sup>[186,187]</sup>
- 2) **Azentrische Fragmente:** Azentrische Fragmente sind Reste von Chromosomen, denen ein Zentrosom fehlt und können in der Metaphase sowie Anaphase und Telophase gefunden werden.<sup>[187]</sup>
- 3) **Zurückgebliebene Chromosomen:** Zurückgebliebene Chromosomen verweilen in der Spindel-Mittelzone, während sich die restlichen Chromosomen in Richtung der Spindelpole bewegen. Außerdem weisen sie im Gegensatz zu azentrischen Fragmenten ein Zentrosom auf.<sup>[187,188]</sup>
- 4) **Multipolare Ana-/Telophase:** Eine Zelle, die mehr als zwei Spindelpole besitzt und bei der die Chromosomen in zwei oder mehr Gruppen segregiert sein können, kann während Ana- und Telophase beobachtet werden.<sup>[187]</sup>
- 5) **Multipolare Prometa-/Metaphase:** Eine Zelle während der Prometa- oder Metaphase mit mehr als zwei Spindelpolen.<sup>[187]</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass der supramolekulare Ligand **48** die Anzahl an mitotischen Defekten in HeLa-Zellen stark erhöht. So wiesen die Kontrollzellen lediglich 6% mitotische Defekte auf, während der Anteil für mit **48** behandelten Zellen 32% betrug (**Abb. 43A**). Außerdem war die Vielfalt an mitotischen Defekten in Zellen, die mit **48** behandelt wurden, ebenfalls größer. Identifiziert wurden Chromatinbrücken, zurückgebliebene Chromosomen, azentrische Fragmente und auch multipolare Spindeln (**Abb. 43B**).

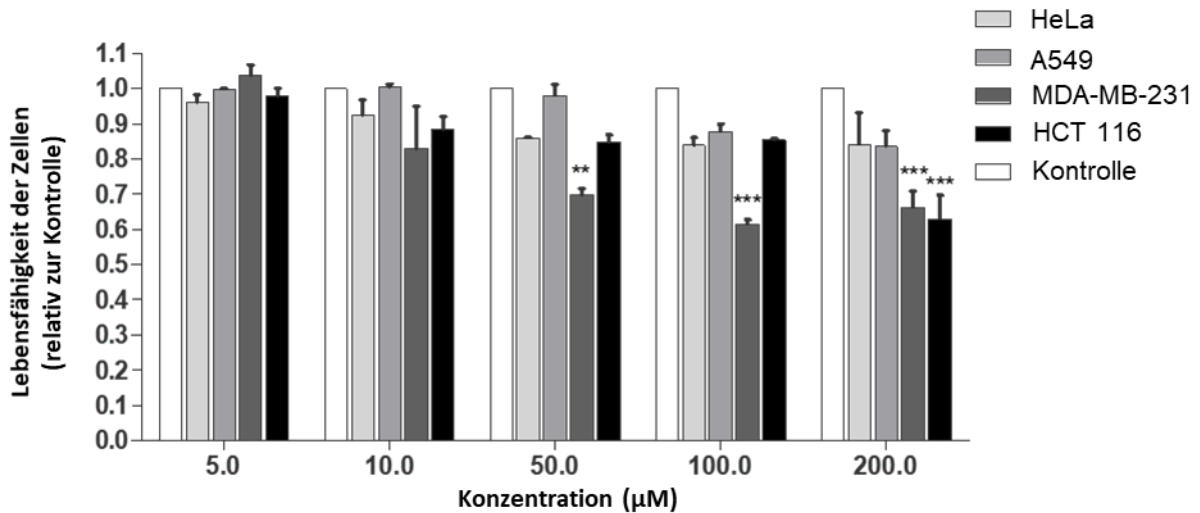


**Abb. 43:** **48** hemmt die Zellproliferation und induziert mitotische Defekte in HeLa-Zellen. A) Verhältnis von HeLa-Zellen mit mitotischen Defekten, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, nach 48 h nach Behandlung mit 50  $\mu\text{m}$  **48**. B) Die Anteile der gefundenen mitotischen Defekte werden in Tortendiagrammen dargestellt, dabei werden Zellen, die mit Inhibitor **48** behandelt wurden, mit DMSO-behandelten Zellen verglichen (Kontrolle).  $N > 100$ .<sup>[111]</sup>

Die Ergebnisse bestätigen, dass der Inhibitor **48** mit der mitotischen Funktion von Survivin interferiert. Daher wurden im Anschluss die antiproliferativen Eigenschaften des Liganden **48** untersucht.

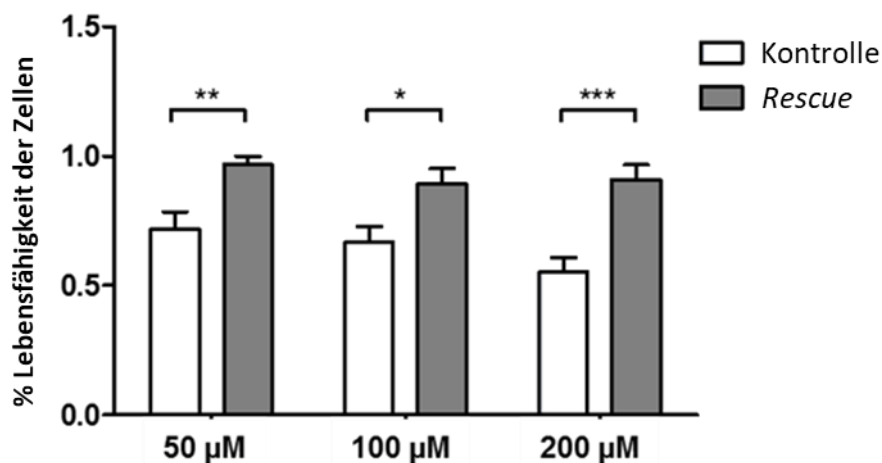
Um den Effekt zu quantifizieren, wurden Zellproliferationsassays mit verschiedenen Arten von Krebszellen durchgeführt: Gebärmutterhalskrebs-Zellen (HeLa-Zellen), Modell-Zellen für Lungenkrebs (A549-Zellen), Brustkrebs-Zellen (MB-231-Zellen) und Modell-Zellen für Darmkrebs (HCT-116-Zellen). In dem Assay werden die Zellen mit einer Tetrazoliumverbindung [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) versetzt, die in lebenden Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt reduziert wird. Anschließend wird die Absorption des Formazan-Produktes bei 490 nm gemessen und ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

Der Zellproliferationsassay zeigte, dass **48** in allen getesteten Krebszelllinien die Proliferation erfolgreich reduzierte (**Abb. 44**). Zwei von vier Zelllinien zeigten eine über 30% reduzierte Proliferation, dieser Effekt ist vergleichbar mit Zellen, bei denen die Expression von Survivin durch siRNA verringert wurde.<sup>[189]</sup> Der stärkste Effekt wurde für die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231, sowie bei der Darmkrebszelllinie HCT 116 beobachtet und erfolgte konzentrationsabhängig.



**Abb. 44:** HeLa-, A549-, MDA-MB-231- und HCT 116-Zellen wurden mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen und den entsprechenden Mengen DMSO 72 h inkubiert, anschließend wurde mittels eines MTS-Tests die Zellproliferation gemessen. Die Absorption der mit Ligand **48** behandelten Zellen wurde bei 490 nm bestimmt und auf die Absorption in DMSO-behandelten Zellen des jeweiligen Zelltyps (Kontrolle) normalisiert. Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Der Standardfehler des Mittelwertes wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Daten wurden mittels 1way ANOVA analysiert, gefolgt von einem Tukey's Multiple Comparison Test. Zwei Sterne (\*\*) zeigen einen p-Wert kleiner als 0,01 an. Drei Sterne (\*\*\*) zeigen einen p-Wert kleiner als 0,001 an.<sup>[111]</sup>

Um zu untersuchen, ob der supramolekulare Ligand **48** Survivin-spezifisch ist, wurde ein *Rescue-Assay* durchgeführt. Dafür wurden HCT 116-Zellen transient mit Survivin-HA (*Rescue*) oder als Kontrolle mit GFP transfiziert. Die Zellen wurden 72 Stunden mit Ligand **48** inkubiert und anschließend die Proliferation mittels MTS-Assay quantifiziert.



**Abb. 45:** Die Überexpression von Survivin-HA erhöht den antiproliferativen Effekt von **48** in HCT 116-Zellen und bestätigt damit, dass die beobachteten Effekte des Liganden Survivin-spezifisch sind. HCT 116 wurden transient mit Survivin-HA (*Rescue*) oder GFP (*Control*) transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von **48** für 72 h behandelt. Mittels MTS-Assays wurde die Zellproliferation gemessen. Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Der Standardfehler des Mittelwertes wird durch die Fehlerbalken angezeigt. Die Daten wurden mittels 1way ANOVA analysiert, gefolgt von einem Tukey's Multiple Comparison Test. Ein Stern (\*) zeigt einen p-Wert kleiner als 0,05 an. Zwei Sterne (\*\*) zeigen einen p-Wert kleiner als 0,01 an. Drei Sterne (\*\*\*) zeigen einen p-Wert kleiner als 0,001 an.<sup>[111]</sup>

Der Assay zeigte, dass durch eine Überexpression von Survivin-HA die antiproliferative Wirkung von Ligand **48** fast komplett aufgehoben wurde. Während für die Kontrollzellen eine Proliferation von 72% (50  $\mu$ M), 67% (100  $\mu$ M) und 55% (200  $\mu$ M) bestimmt wurde, konnte durch Überexpression von Survivin-HA, die Proliferation wieder auf 97% (50  $\mu$ M), 89% (100  $\mu$ M) und 91% (200  $\mu$ M) gesteigert werden (Abb. 45). Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition durch Ligand **48** spezifisch für Survivin ist.

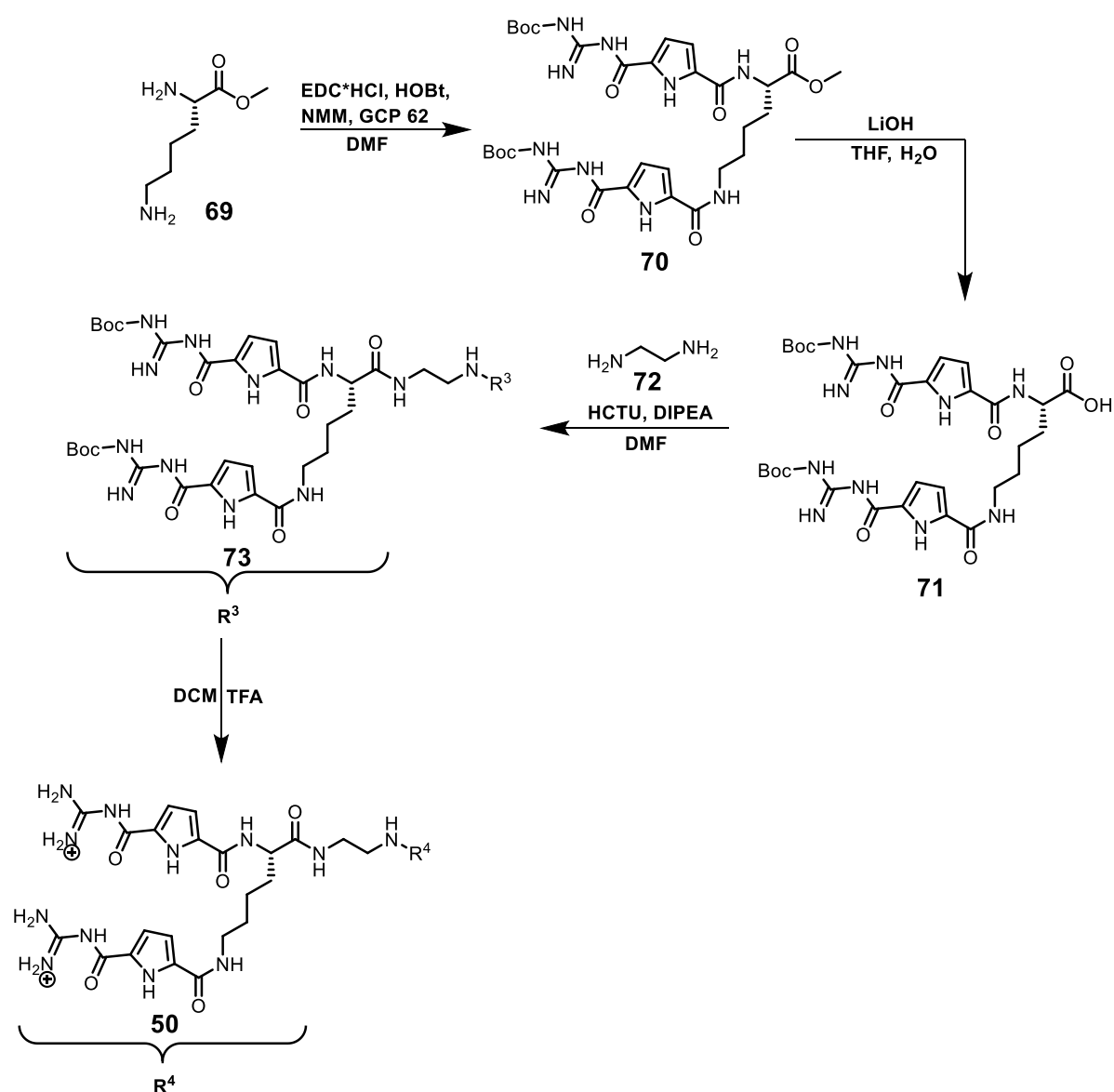
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ligand **48**, basierend auf einer fokussierten Bibliothek, als vielversprechender Kandidat identifiziert wurde, um die Survivin/Histon H3-Interaktion zu hemmen. NMR-Titrationsexperimente bestätigten die Bindung von Ligand **48** an die Histon H3-Bindestelle von Survivin. Außerdem konnte die Interaktion zwischen den beiden Proteinen in einer zellulären Umgebung erfolgreich verringert werden. Da die Histon H3-Bindestelle von Survivin in der Mitose involviert ist, führte Ligand **48** zu einer stark erhöhten Anzahl mitotischer Defekte und so zu einer Survivin-spezifischen Hemmung der Krebszellproliferation. Das nachfolgende Projekt befasst sich mit der Adressierung der Survivin/Crm1-Interaktion und der Weiterentwicklung von Ligand **48** durch die Verwendung von Multivalenzen.

## 4.2 Unterscheidung zwischen der NES- und Histon-H3-Bindungsstelle von Survivin durch Modifikationen eines hemmenden Guanidiniocarbonylpyrrol-Liganden

Das erste Projekt zeigte erfolgreich die Adressierung der Histon H3-Bindungsstelle von Survivin und damit die Inhibierung der Survivin/Histon H3-Interaktion. Daher soll die gleiche Strategie verwendet werden, um noch effizientere Inhibitoren herzustellen und ebenfalls einen Inhibitor für die Survivin/Crm1-Interaktion zu identifizieren.

### 4.2.1 Synthese des tetrakationischen supramolekularen Liganden für die Adressierung des Histon H3-Bindestelle

Die Synthese des tetrakationischen Liganden **50** startet ausgehend von der kommerziell erhältlichen Aminosäure H-Lys-OMe (**69**) und besteht aus 4 Syntheseschritten (Schema 4).

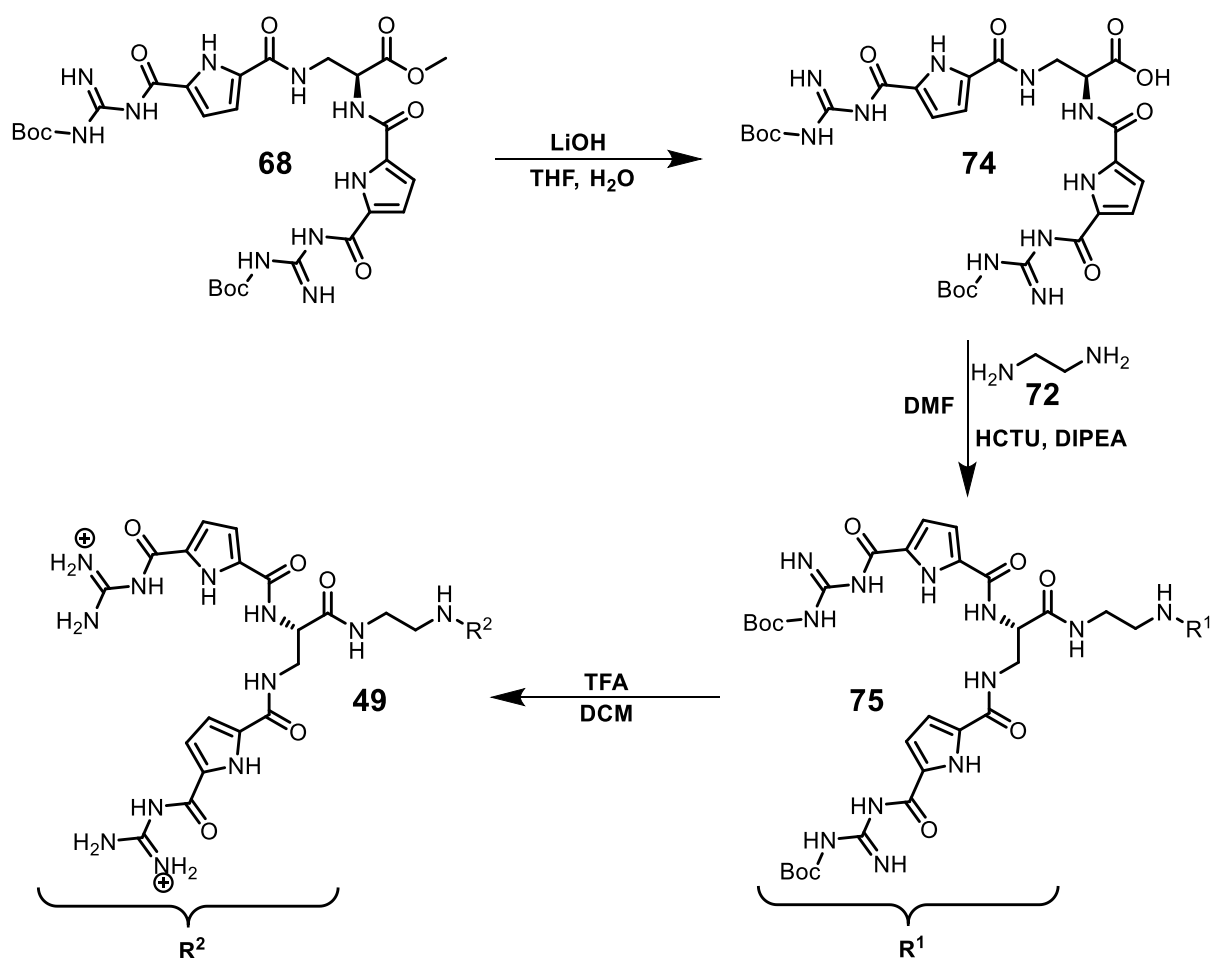


**Schema 4:** Syntheseroute des tetrakationischen supramolekularen Liganden **50**, der die Histon H3-Bindestelle adressiert.

Als erstes wurde H-Lys-OMe (**69**) mit EDC\*HCl, NMM und GCP (**62**) umgesetzt, wodurch die zwei freien Amine mit der GCP Gruppe funktionalisiert wurde, was zu **70** als weißen Feststoff führte. Anschließend wurde **70** mit LiOH versetzt und in einer Mischung aus THF und H<sub>2</sub>O gerührt, was zu einer Verseifung unter milden Bedingungen führt und die freie Carbonsäure **71** lieferte. Die freie Carbonsäure **71** wurde mit HCTU, DIPEA und Ethylendiamin umgesetzt, wodurch das freie Amin des Ethylamins (**72**) zweifach mit der freien Carbonsäure **71** gekuppelt wurde und Verbindung **73** lieferte. Um die Boc-Schutzgruppen von **73** zu entfernen, wurde es in einer Mischung aus DCM und TFA gerührt, wodurch das Rohprodukt entstand. Anschließend wurde das Rohprodukt über die MPLC gereinigt und 3-mal mit 0,1 M HCl umgesalzen, um das tetrakation **50** als Hydrochloridsalz zu erhalten.

#### 4.2.2 Synthese des tetrakationischen supramolekularen Liganden für die Adressierung des NES

Die Synthese des tetrakationischen Liganden **49**, der auf das NES abzielt, startet ausgehend von der zuvor beschriebenen Verbindung **68** und umfasst 3 Syntheseschritte (Schema 5).



**Schema 5:** Syntheseroute des tetrakationischen supramolekularen Liganden (**49**), der das NES adressiert.

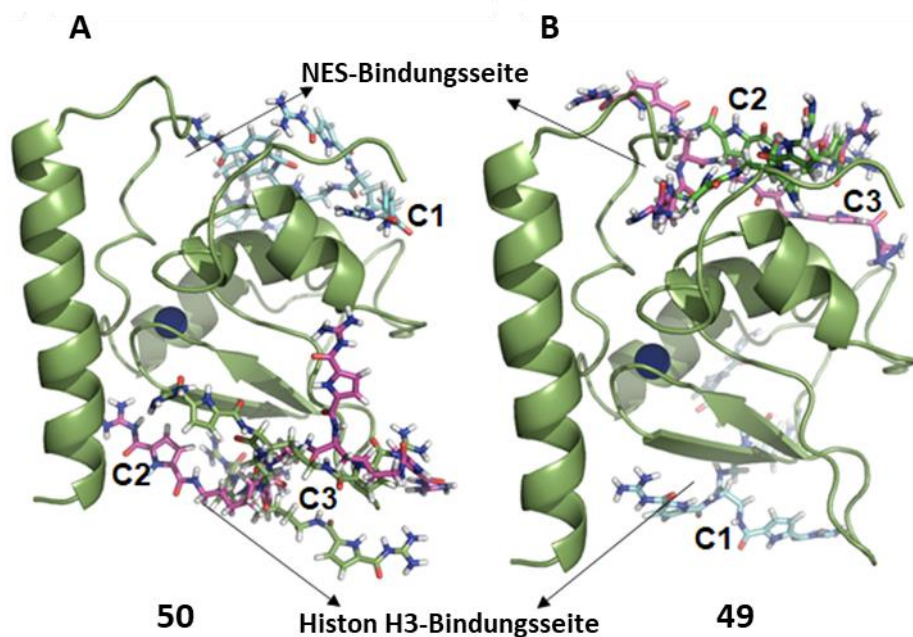
Verbindung **68** wurde mit LiOH versetzt und in einer Mischung aus THF und H<sub>2</sub>O gerührt, um den Methylester zu spalten und so die Carbonsäure **74** zu erhalten. Eine anschließende zweifache Kupplung von Ethylendiamin (**72**) mit der freien Carbonsäure **74** mit Hilfe von HCTU und DIPEA, lieferte den

geschützten Liganden **75**. Um die Boc-Schutzgruppen zu entfernen, wurde der geschützte Ligand **75** in einer Mischung aus DCM und TFA gerührt, wodurch das Rohprodukt entstand. Abschließend wurde das Rohprodukt mittels MPLC gereinigt und 3-mal mit 0,1 M HCl umgesalzen, wodurch der tetrakationische Ligand **49** als Hydrochloridsalz erhalten wurde.

### 4.2.3 Bindungsstudien

Um vielversprechende Liganden zu identifizieren, welche spezifisch die Histon H3-Interaktion oder das NES adressieren, wurde eine fokussierte Bibliothek von GCP-Liganden mit einer unterschiedlichen Anzahl von GCP-Gruppen und verschiedenen Linker-Gruppen in *Docking*-Studien getestet. Die vielversprechendsten Liganden bestehen aus zwei symmetrischen Peptidarmen, die vier GCP-Einheiten enthalten (Abbildung 1; blau hervorgehoben). Diese beiden Liganden unterscheiden sich in der Linkerlänge (Abbildung 1; orange hervorgehoben), **49** enthält einen kurzen C2-Linker und für **50** wurde ein C5-Linker (Lysin) verwendet. *Docking*-Studien haben gezeigt, dass **49** und **50** unterschiedliche Bereiche der Proteinoberfläche ansprechen. Für **49** wurde eine bevorzugte Bindung an der NES-Bindungsstelle vorhergesagt, während **50** die Histon H3-Bindungsstelle bevorzugt.

Um den **50**- und **49**-Bindungsmodus an Survivin zu erforschen, führten wir verschiedene biomolekulare *Modeling*-Studien durch, einschließlich des *Gaussian accelerated enhanced conformational sampling*.<sup>[190]</sup> Nach dem Clustering der Docking Positionen wurde der Fokus auf das NES und die Histon H3-Bindungsseite gesetzt (Abb. 46).



**Abb. 46:** Darstellung des Bindungsstellenvergleichs der bevorzugten Positionen (A) **50**- und (B) **49**-gedockten Clustern im Survivin-Protein. C1, C2 und C3 zeigen eine repräsentative Struktur der **50**- und **49**-Cluster in den Histon- und NES-Bindungsstellen von Survivin.<sup>[183]</sup>

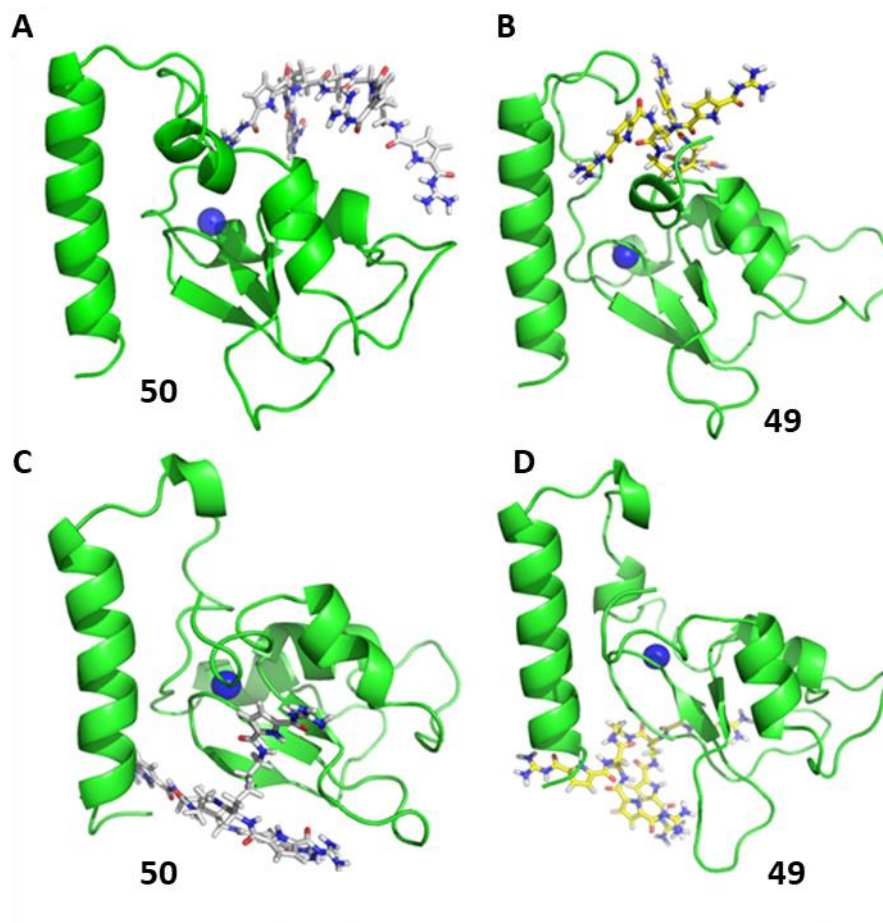
Insgesamt nehmen **50** und **49** den entgegengesetzten Bindungstrend an den Oberflächenregionen ein, so ist die NES-Bindungsstelle für **50** (12%) weniger bevorzugt als für **49** (28%), die Histon H3-Bindungsstelle wird hingegen von **50** (29%) bevorzugt im Vergleich zu **49** (17%). Die Clusteranalyse der kombinierten Trajektorien zeigte, dass **49** im Vergleich zur **50**, die weiter von der Bindungsstelle

entfernt ist, konformativ gut an die NES-Bindungsstelle angepasst ist (Abb. 55). Dieses Selektivitätsmuster wurde durch ortsspezifische Berechnungen der freien Bindungsenergie (Tabelle 1) bestätigt.

**Tabelle 1:** Berechnete Werte der freien Bindungsenergie für die Survivin-Komplexe mit den Liganden **49** und **50**, die entweder an die NES-Region oder die Histon-H3-Bindungsstelle gebunden sind.

Komplex	$\Delta G$ (kcal/mol)
50-NES	$-4,0 \pm 0,57$
50-Histon H3 Bindungsseite	$-7,3 \pm 0,57$
49-NES	$-13,7 \pm 0,83$
49-Histon H3 Bindungsseite	$-4,4 \pm 0,68$

Außerdem deuten die Ergebnisse des *Gaussian accelerated enhanced conformational sampling* darauf hin, dass die Bindung von **49** an der NES-Bindungsstelle auch die Konformation der NES-Schleife und folglich die Konfiguration der aktiven Stelle beeinflussen könnte.

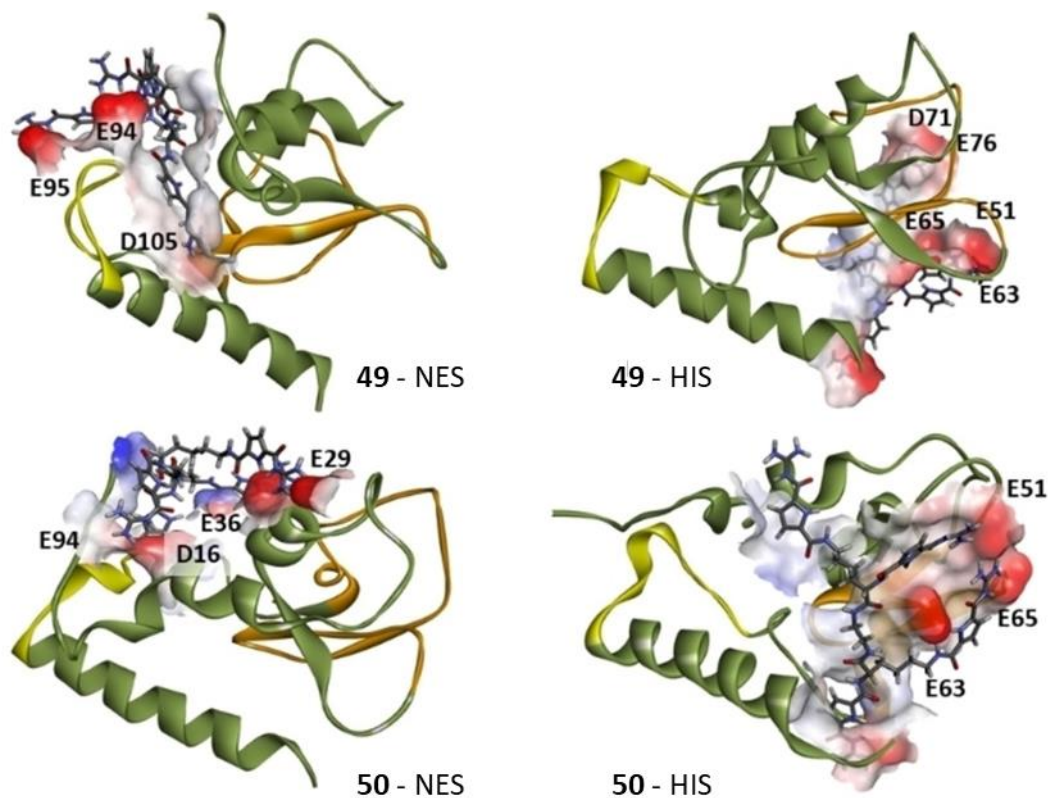


**Abb. 47:** Strukturelle Darstellung des (A) **50**-Bindungsmodus (grau) (B) **49**-Bindungsmodus (gelb) nach der Clusterbildung in der NES-Bindungsstelle bzw. (C und D) Histon-Bindungsstelle.<sup>[183]</sup>

Salzbrücken sind die wichtigsten Wechselwirkungen, die die Bindung von **49** und **50** an Survivin stabilisieren. Dies ist zurückzuführen auf die bemerkenswerte Fähigkeit der geladenen GCP-Einheiten, mittels zweizähliger H-Bindungen isolierte Ionenpaare mit Carboxylgruppen von Aspartaten und Glutamaten zu bilden.<sup>[191]</sup>



Insbesondere die Bindung von **49** an das NES zeigt sehr isolierte zweizählige H-Bindungen mit D105, mit Besetzungen (basierend auf erweiterten Molekulardynamiksimulationen) von 94% und 93%. Solche Wechselwirkungen stabilisieren die Bindung eines der Arme von **49**, der sich am Spalt zwischen dem NES und der N-terminalen Spitze von Survivin befindet, die die Schnittstelle zwischen den Protomeren im Dimer des nativen Proteins bilden. Folglich verzerrt dieser Bindungsmodus die NES-Region erheblich. Ebenfalls wurde festgestellt, dass **50** im Gegensatz zu **49** nicht mit D105 von Survivin interagiert (Abb. 48). Allerdings interagieren sowohl **49** als auch **50** mit E94 (Wasserstoffbrückenbindungen von 39% bzw. 42%), das Teil der NES-Region ist.<sup>[192]</sup> Somit könnte die konservierte Interaktion zwischen D105 und **49** der Hauptgrund für die höhere Affinität von **49** gegenüber des NES im Vergleich zu **50** sein.

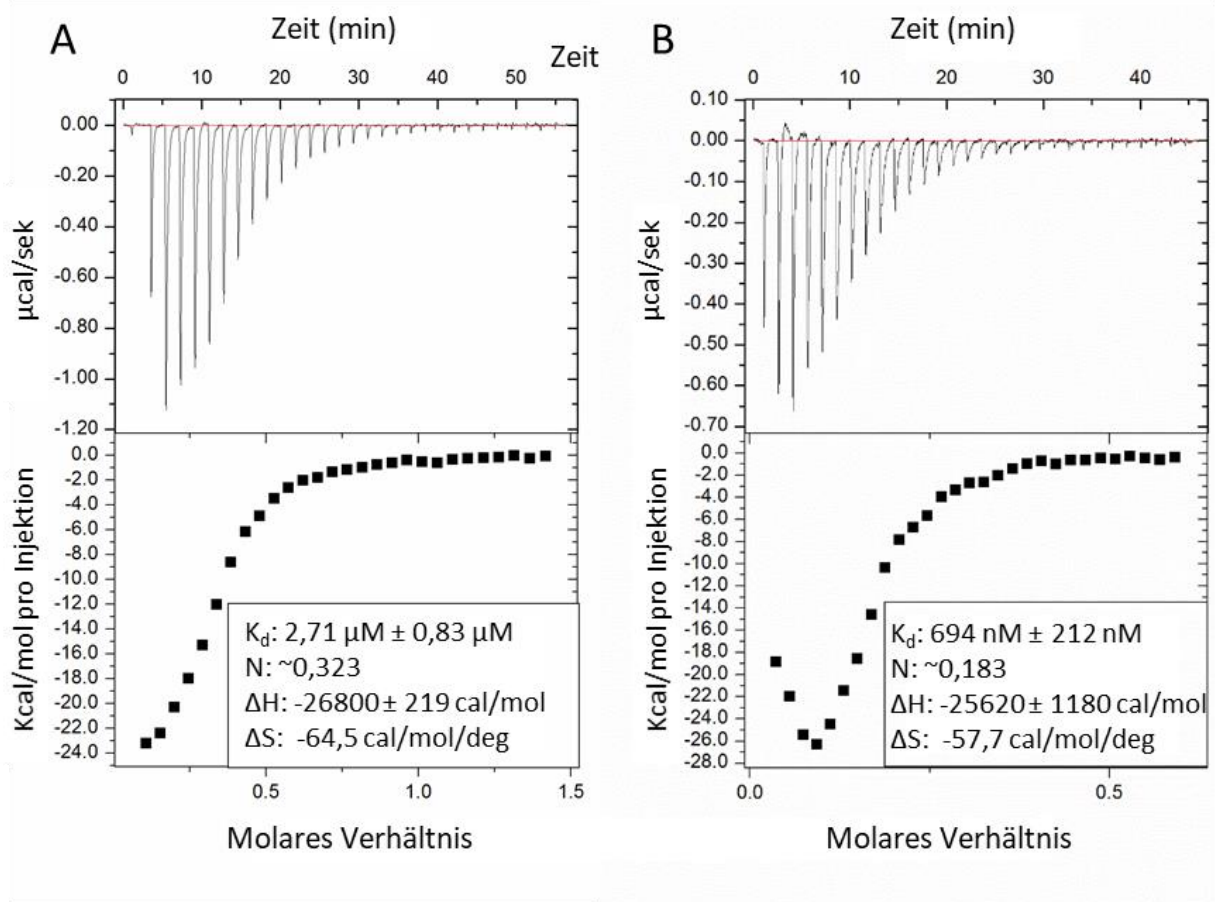


**Abb. 48:** Schematische Darstellung der Bindungsstellen und Interaktionspartner von **49** und **50** mit der NES (gelb) und der Histon-H3-Bindungsstelle (orange). Die interagierenden Reste sind schwarz markiert. Die molekulare Oberfläche der Bindungstasche ist nach der Ladung der Reste eingefärbt (rot (negativ) bis blau (positiv)). **49** und **50** sind in grau dargestellt.<sup>[183]</sup>

Die freie Bindungsenergie von **50** und **49** wurde unter Verwendung des CL-FEP-Ansatzes (*Central Limit Free Energy Perturbation*)<sup>[193]</sup> für ihre jeweiligen Komplexe mit Survivin verglichen (Abb. 47A und B). Die Ergebnisse dieser Berechnungen zeigen, dass **50** an der Histon H3-Bindungsstelle um etwa 3 kcal/mol favorisiert ist, während **49** an dem NES um mehr als 9 kcal/mol begünstigt ist (siehe Tabelle 1).

Um die vielversprechenden Ergebnisse der theoretischen Studien zu überprüfen, wurden experimentelle Messungen durchgeführt. Dazu wurde die direkte Bindung der Liganden (**49** und **50**) an Survivin durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) gemessen (Abb. 49). Ein stark exothermes Reaktionsprofil wurde beobachtet, wenn Survivin zu einer Lösung von **49** oder **50** titriert wurde, was auf ein Bindungsereignis hinweist. Dabei zeigt die Bestimmung der freien Gibbs-Energien ( $\Delta H - T\Delta S$ ) eine etwas stärkere Bindung von **49** (8,4 kcal/mol) als von **50** (7,6 kcal/mol) an Survivin. Verglichen mit den

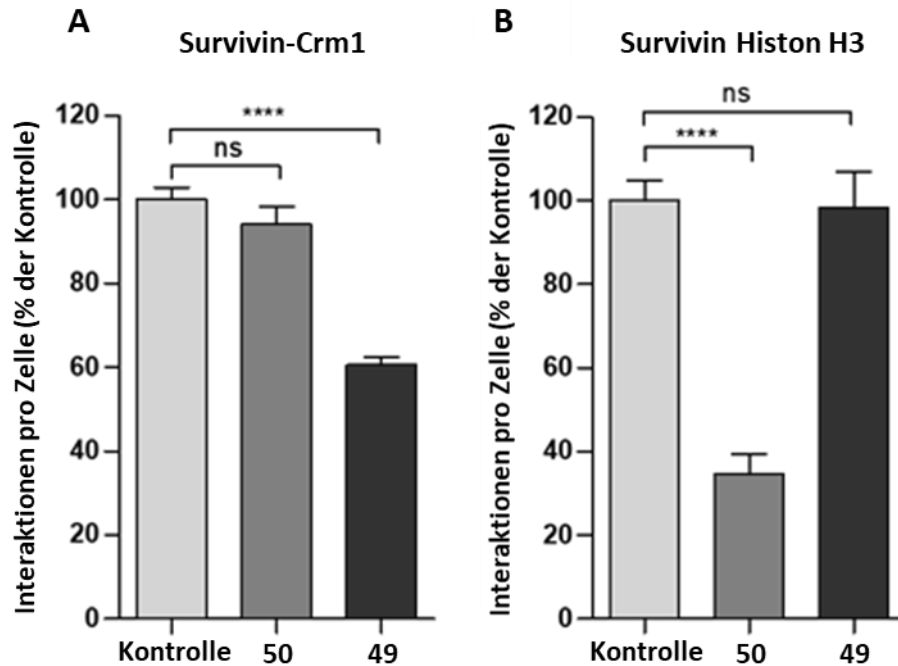
theoretischen Werten stimmt die freie Energie für die Bindung von **50** an die Histon H3-Bindungsstelle mit  $-7.3$  kcal/mol gut überein, lediglich die theoretische Bindungsstärke von **49** zum NES war mit  $-13,7$  kcal/mol stärker als experimentell bestimmt (Tabelle 1).



**Abb. 49:** ITC-Messungen von Survivin-120 mit Ligand **49** oder Ligand **50** in Wasser mit HEPES (2,5 mM), NaCl (10 mM),  $\text{MgCl}_2$  (1 mM) und TCEP (0,05 mM), pH = 6,5. A) Titration von Survivin-120 zu Ligand **50**, Rohdaten aus den einzelnen Injektionen (oben), integrierte Peaks sowie der entsprechende Fit und die thermodynamischen Parameter (unten). B) Titration von Survivin-120 zu Ligand **49**, Rohdaten aus den einzelnen Injektionen (oben), integrierte Peaks sowie der entsprechende Fit und die thermodynamischen Parameter (unten).<sup>[183]</sup>

#### 4.2.4 Biologische Studien

Nachdem festgestellt wurde, dass beide Liganden an das Protein Survivin binden und dabei vermeintlich unterschiedliche Bindungsregionen adressieren, wurden diese hinsichtlich ihrer biologischen Effekte untersucht. So wurde zunächst untersucht, ob die Liganden einen Einfluss auf die PPIs von Survivin in einer zellulären Umgebung haben. Dazu wurden *in situ Proximity Ligation Assays* (PLA) durchgeführt, um die PPI innerhalb von Zellen auf endogener Ebene zu visualisieren (Abb. 50).

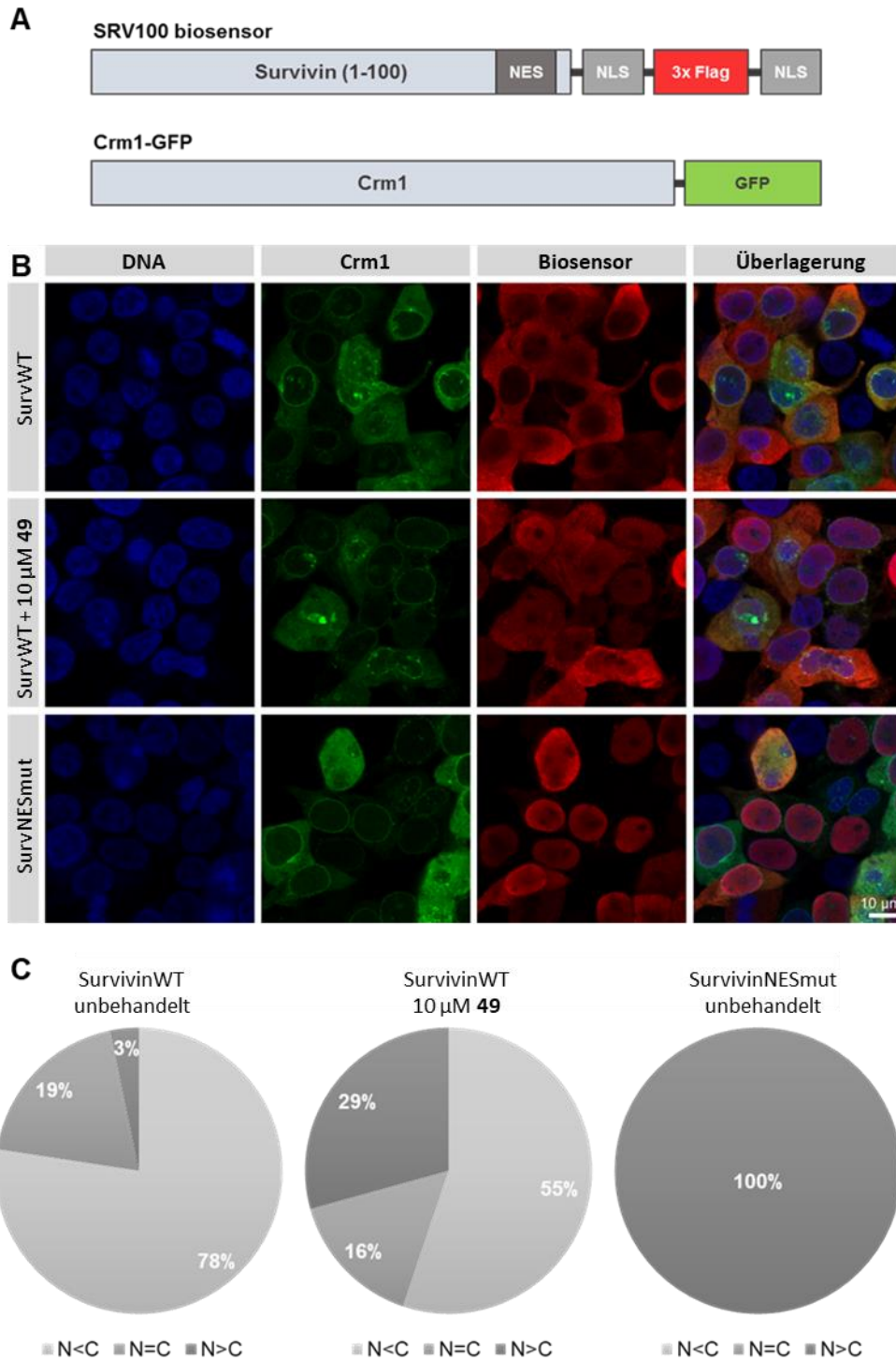


**Abb. 50:** Selektive Inhibierung der Survivin-Crm1- und Survivin-Histon H3-Interaktion in HeLa-Zellen, die mit 10  $\mu\text{M}$  **49**, oder **50** behandelt wurden. A) *In situ Proximity Ligation Assay* (PLA), der die Anzahl der Interaktionen zwischen Survivin und Crm1 in HeLa-Zellen mit oder ohne Zusatz von **49** (10  $\mu\text{M}$ ) oder **50** (10  $\mu\text{M}$ ) zeigt. N>97. B) PLA, der die Anzahl der Interaktionen zwischen Survivin und Histon H3 in HeLa-Zellen zeigt, die in den frühen Stadien der Mitose (Pro- und Metaphase) fixiert wurden, mit oder ohne Zusatz von **49** (10  $\mu\text{M}$ ) oder **50** (10  $\mu\text{M}$ ). N>30. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Die Daten wurden mittels t-Test analysiert. Vier Sterne (\*\*\*\*) zeigen einen p-Wert kleiner als 0,0001 an.<sup>[183]</sup>

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass **49** in der Lage war, die Anzahl der Interaktionen zwischen Survivin und Crm1 um fast 40% zu reduzieren, während **50** keinen signifikanten Einfluss auf die Survivin-Crm1-Interaktion hatte (Abb. 50A). Im Gegensatz dazu war die Interaktion zwischen Survivin und Histon H3 in den frühen Stadien der Mitose (Pro- und Metaphase) in Zellen die mit **50** behandelt wurden um 65% verringert, während in **49**-behandelten Zellen kein signifikanter Effekt beobachtet werden konnte (Abb. 50B). Dies bestätigt eine hochselektive Hemmung beider Bindungsstellen (Crm1 und Histon H3) durch die gewählten Liganden und bestätigt die theoretischen Berechnungen.

Da die Interaktion zwischen Survivin und Crm1 für den aktiven Transport von Survivin vom Zellkern in das Zytoplasma notwendig ist, wo das Protein als Apoptoseinhibitor wirkt, sollte die Hemmung der Interaktion den Kernexport von Survivin verhindern.<sup>[95,194]</sup> Dies wurde mit einem *SRV100-Biosensor-Assay* (Abb. 51) verifiziert, der die Analyse der Exportaktivität von Crm1 in Anwesenheit, oder Abwesenheit eines potenziellen Survivin-Crm1-Inhibitors ermöglicht.<sup>[195]</sup> Der Biosensor besteht aus

einer verkürzten Version von Survivin (1-100), die noch das NES enthält, das mit Crm1 interagiert (Abb. 51B).



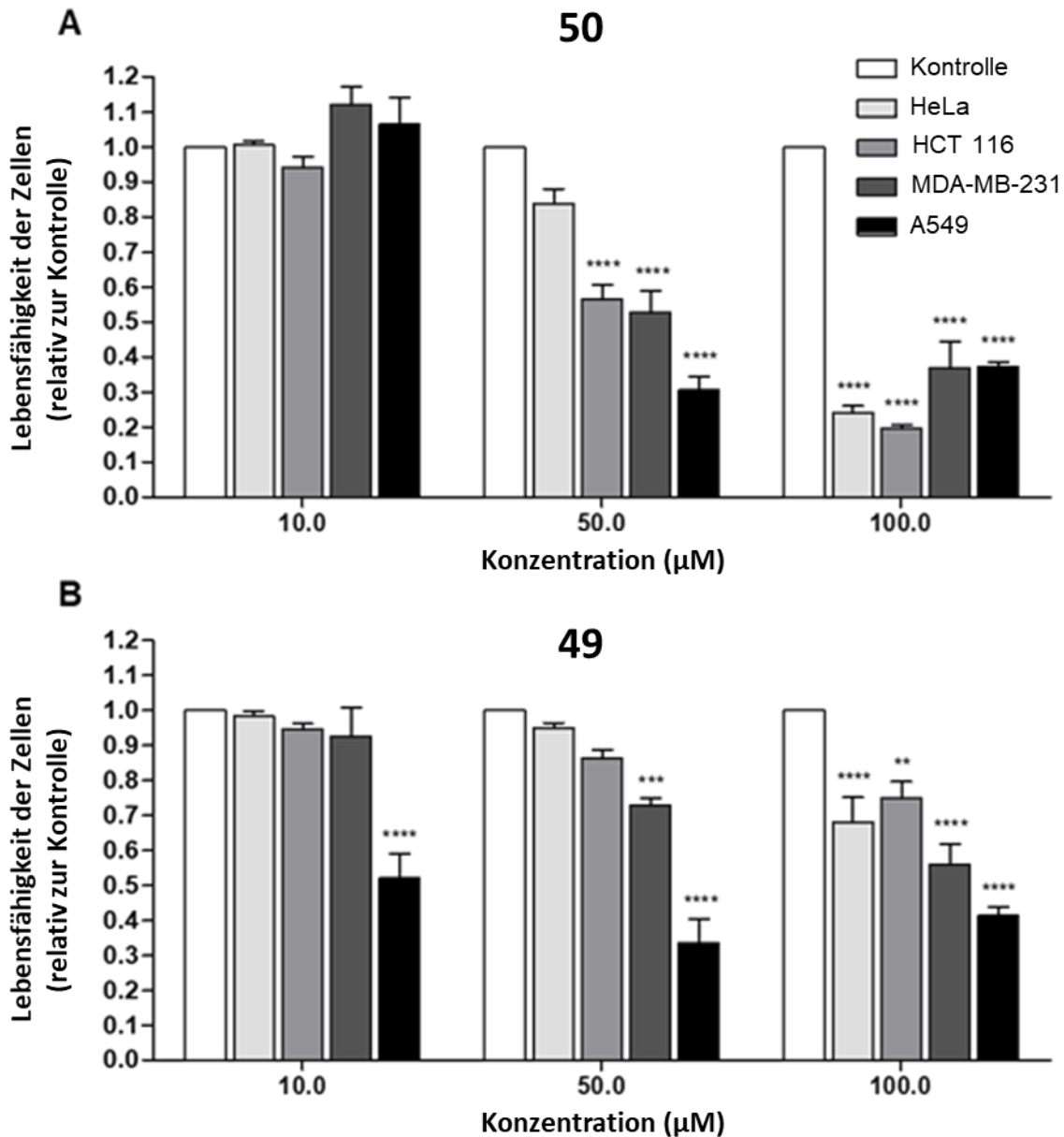
**Abb. 51:** A) Der Biosensor SRV100 besteht aus einer verkürzten Version von Survivin (1-100), zwei nuklearen Lokalisierungssignalen (NLS) und einem dreifachen *Flag-tag*. Er wurde mit Crm1-GFP co-transfiziert. B) Repräsentative Bilder des SRV100-Biosensor-Assays in HEK 293T-Zellen. Die Zellen wurden mit Crm1-GFP und dem SurvWT- oder SurvNESmut-Biosensor co-transfiziert. Eine der SurvWT-Proben wurde zusätzlich mit 10 µM **49** für 24 h behandelt, bevor die Proben fixiert und immungefärbt wurden. Die DNA ist in blau, Crm1-GFP in grün und der Biosensor in rot dargestellt. C) Prozentualer Anteil der nukleären oder zytoplasmatischen Lokalisierung in SurvWT-, SurvWT+ **49**- und SurvNESmut-Proben. N=Nukleus, C=Zytoplasma. N>50.<sup>[183]</sup>

Darüber hinaus enthält der Biosensor zwei NLS (nukleare Lokalisierungssignale), um eine nukleare Lokalisierung des Biosensors zu gewährleisten, wenn er nicht aktiv von Crm1 exportiert wird, sowie drei *Flag-tags* für die Immunfluoreszenzfärbung. HEK 293T-Zellen wurden mit Crm1-GFP und dem Survivin-Wildtyp-Biosensor (SurvWT) mit oder ohne 10  $\mu\text{M}$  **49** co-transfiziert. Als Kontrolle wurden sie mit Crm1-GFP und dem NESmut-Biosensor co-transfiziert, der eine bekannte export-defiziente NES-Mutante von Survivin (L96A, L98A) enthielt.

Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurden die Zellen einer von drei verschiedenen Gruppen zugeordnet: Zellen mit einer vorwiegend nukleären Lokalisierung des Biosensors, Zellen mit einem gleichmäßig verteilten Biosensor und Zellen mit einer vorwiegend zytoplasmatischen Lokalisierung des Biosensors. In 78% der mit dem SurvWT-Biosensor transfizierten Zellen hatte der Biosensor eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation, während er in 19% der Zellen gleichmäßig verteilt war und in nur 3% der Zellen überwiegend nukleär war. In **49**-behandelten Zellen reduzierte sich der Anteil der Zellen mit einer zytoplasmatischen Lokalisation des Biosensors auf nur 55%, während der Biosensor in 16% der Zellen gleichmäßig verteilt war und in 29% der Zellen überwiegend nukleär war. In Kontrollzellen, die mit dem NESmut Biosensor transfiziert wurden, war die Lokalisation ausschließlich nukleär. Die Ergebnisse bestätigen, dass **49** in der Lage ist, den Crm1-vermittelten Kernexport von Survivin teilweise zu verringern.

Da die PPI zwischen Survivin und Histon H3 während der Mitose essentiell ist und die PPI zwischen Survivin und Crm1 entscheidend dafür ist, dass Survivin seine Rolle als Inhibitor des Apoptose-Proteins erfüllen kann, sollte eine Wechselwirkung mit diesen PPIs zu einer verminderten Zellproliferation und Lebensfähigkeit führen. Daher wurde ein Zellproliferations-Assay in verschiedenen Arten von Krebszellen durchgeführt: HeLa-Zellen, die von Gebärmutterhalskrebs stammen, A549-Zellen als Modell für Lungenkrebs, MDA-MB-231-Zellen, die von Brustkrebs stammen und HCT 116-Zellen, die von Dickdarmkrebs stammen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Liganden, **49** und **50**, in der Lage waren, die Krebszellproliferation konzentrationsabhängig zu hemmen. Beide Liganden hatten einen starken Einfluss auf die Zellproliferation in A549-Zellen, wobei **49** die Zellviabilität bei einer Konzentration von nur 10  $\mu\text{M}$  um fast 50% und bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  um 66% senken konnte (Abb. 52).

**50** hatte ähnliche Auswirkungen und verringerte die Zellviabilität um 69% bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Insgesamt hatte **50** eine stärkere Wirkung auf die Zellproliferation als **49**. Der Ligand war in der Lage, die Krebszellproliferation in HCT 116 bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  um bis zu 80% zu verringern (76% in HeLa-Zellen und 63% in MDA-MB-231- und A549-Zellen). Bei dieser Konzentration verringerte **49** die Zellproliferation bei HeLa-Zellen um 32%, bei HCT 116-Zellen um 25%, bei MDA-MB-231-Zellen um 44% und bei A549-Zellen um 59%. Die stärkere Wirkung von **50** lässt sich darauf zurückführen, dass der Ligand direkt in die Zellproliferation eingreift, während **49** den Kernexport von Survivin und damit seine antiapoptotische Funktion reduziert.



**Abb. 52:** Die Behandlung mit **50**- und **49** führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Zellproliferation bei verschiedenen Arten von Krebszellen. HeLa-, A549-, MDA-MB-231- und HCT 116-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von **50** (A), **49** (B) oder den jeweiligen Mengen an DMSO (Kontrolle) behandelt und 72 h inkubiert, bevor die Zellproliferation mit dem CellTiter 96® AQueous One Cell Proliferation Assay (Promega) gemessen wurde. Die Absorptionen (490 nm) der Proben wurden durch eine reine Mediummessung subtrahiert und auf die jeweilige Kontrolle normiert. N=3. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Die Daten wurden durch einen 2-Wege-ANOVA-Test analysiert, gefolgt von einem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest. Zwei Sterne (\*\*) zeigen einen p-Wert kleiner als 0,01 an. Drei Sterne (\*\*\*) weisen auf einen p-Wert von weniger als 0,001 hin. Vier Sterne (\*\*\*\*) kennzeichnen einen p-Wert kleiner als 0,0001.<sup>[183]</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich auf der Grundlage von *Docking*-Studien und weiteren MD-Simulationen zwei Inhibitoren (**49** und **50**) für das Protein Survivin identifizieren ließen, die in der Lage sind, verschiedene biologisch relevante PPIs zu Partnerproteinen (Histon H3 und Crm1) selektiv zu inhibieren. Die Studie zeigt, dass an der **49**-Survivin-Grenzfläche stabilere Kontakte gebildet werden

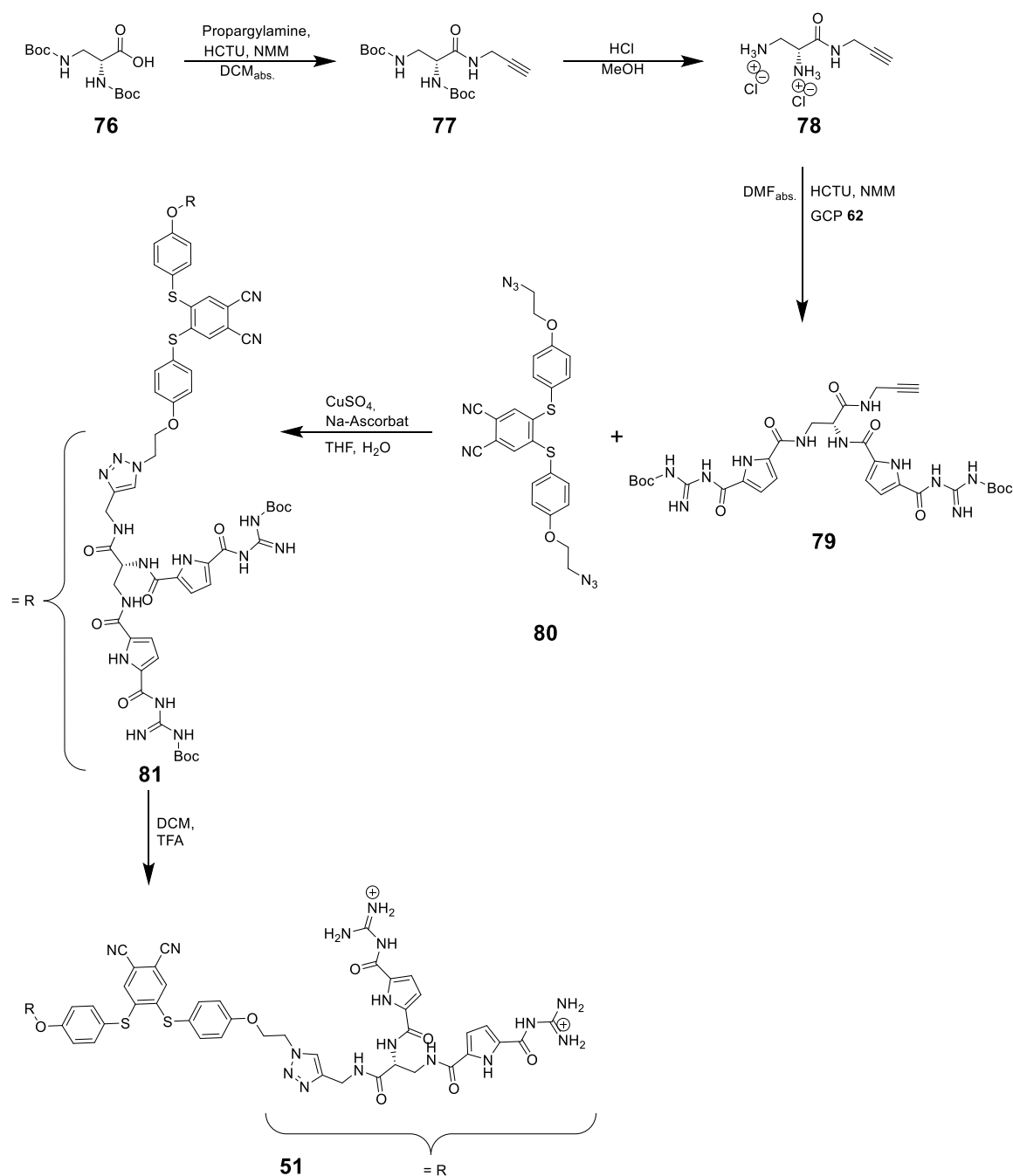
als am **50**-Survivin-Komplex. Darüber hinaus bestätigt die Analyse der freien Bindungsenergie eine verbesserte Bindung von **49** an das Survivin-Protein im Vergleich zu **50**, was durch ITC-Messungen experimentell gestützt wird. Die Fähigkeit der Liganden, zwischen der Histon H3- und Crm1-Bindungsstelle zu unterscheiden, was zu einer selektiven Hemmung von nur einem PPI führt, konnte mittels Proximity-Ligations-Assay (PLA) gezeigt werden. Mit einem Biosensor-Assay konnte demonstriert werden, dass **49** in der Lage war, die nukleare Exportaktivität von Survivin zu reduzieren. Da **49** und **50** beide in der Lage sind, zwei krebisrelevante PPIs von Survivin zu hemmen, konnten wir eine reduzierte Zellproliferation in verschiedenen Krebszelllinien nachweisen.

## 4.3 Responsiver supramolekularer Zweikomponenten-Hydrogelator mit AIE-Effekt

Die Arbeit in diesem Kapitel erfolgte in Kooperation mit Steffen Riebe aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jens Voskuhl (Universität Duisburg-Essen, Deutschland).

### 4.3.1 Synthese des AIE Hydrogelators

Die Syntheseroute des Hydrogelators **51** startete ausgehend von der kommerziell erhältlichen Aminosäure Boc-DAP(Boc)-OH (**76**) und erfolgte in 5 Syntheseschritten. Der AIE Scaffold **80** wurde von der Voskuhl Gruppe zur Verfügung gestellt (Schema 6).<sup>[37]</sup>



Schema 6: Syntheseroute des tetrakationischen Hydrogelators **51**.



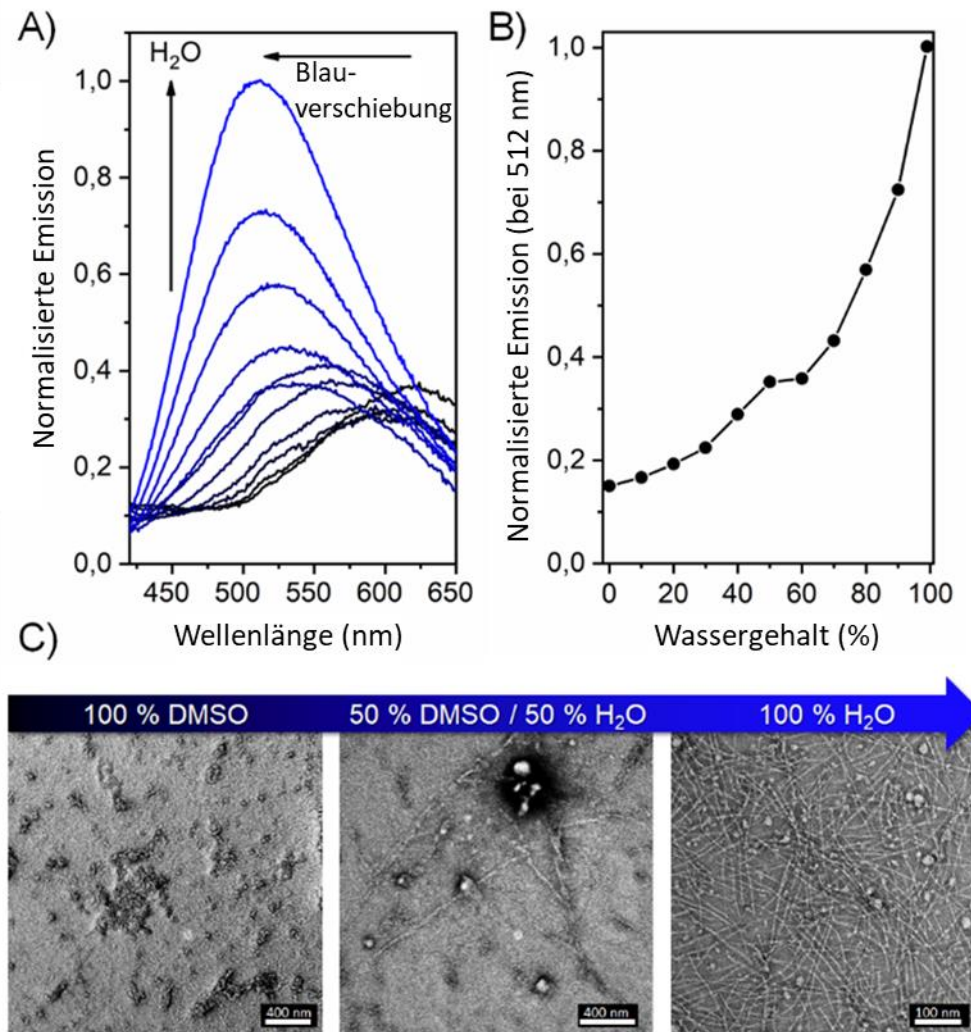
Als erstes wurde die Aminosäure Boc-DAP(Boc)-OH (**76**) mit HCTU, NMM und Propargylamin umgesetzt, bei der Kupplungsreaktion wurde so die mit Alkin funktionalisierte Aminosäure **77** erhalten. Für eine anschließende Boc-Entschützung wurde **77** in einer Mischung aus Methanol und HCl gerührt, wodurch die entschützte Aminosäure **78** als zweifaches Hydrochloridsalz erhalten wurde. Das Hydrochloridsalz **78** wurde dann zweifach mit dem GCP Bindungsmotiv **62** gekuppelt. Dazu wurden diese mit den Kupplungsreagenzien HCTU und NMM gerührt, wodurch **79** erhalten wurde. Anschließend wurde das Alkin **79**, Azid **80**, CuSO<sub>4</sub> und Natriumascorbat in einer Mischung aus THF und Wasser gerührt. Dabei findet eine kupferkatalysierte 1,3-dipolaren Cycloaddition von Alkin **79** und Azid **80** statt, die selektiv das 1,4-Disubstituierte Triazol **81** bildet. Anschließend mussten die Boc-Gruppen entfernt werden, dazu wurde die geschützte Verbindung **81** in einer Mischung aus DCM und TFA gerührt wodurch das Rohprodukt erhalten wurde. Dieses wurde abschließend mittels MPLC gereinigt, auf welche Weise der Hydrogelator **51** als gelber Feststoff erhalten wurde.

### 4.3.2 Bildung und Charakterisierung des Hydrogels

Der Hydrogelator **51** besteht aus einem AIE-System auf der Basis aromatischer Thioether<sup>[196]</sup>, die bereits zur Erkennung von Bioaminen<sup>[171]</sup>, Bakterien<sup>[197]</sup>, zur zellulären Bildgebung<sup>[198]</sup> sowie zur Bildung von Flüssigkristallen<sup>[199]</sup>, verwendet wurden. Dieses AIE-System wurde mit vier selbstkomplementären Guadiniumcarbonylpyrrol (GCP)-Einheiten funktionalisiert, was ihm die Fähigkeit verleiht, einzelne Fasern auszubilden, die durch Malonsäure zu Faserbündeln verbunden werden, welches in einem hocheffizienten Hydrogel mit AIE-Effekt resultiert.

Bisher wurden nur wenige Beispiele beschrieben bei denen zwei Komponenten zur Bildung eines Zweikomponenten-Hydrogels mit AIE-Eigenschaften verwendet wurden. Darüber hinaus reagiert das neuartige System auf verschiedene äußere Reize wie Wärme, Schütteln sowie pH-Änderungen, welches nach aktuellem Kenntnisstand das erste Beispiel darstellt, das diese Eigenschaften kombiniert. Dieser einzigartige Zusammenschluss nicht-kovalenter Wechselwirkungen, die zur Induktion von Emissionen führen, öffnet das Feld für die Materialwissenschaften und Biomaterialien. Unter Verwendung eines Zwei-Komponenten-Systems konnte neben pH-Änderungen und externem Stress ein weiterer Stimulus (Zugabe eines supramolekularen Crosslinkers) zur Beeinflussung der Selbstorganisation eines Gelatorsystems hinzugefügt werden.

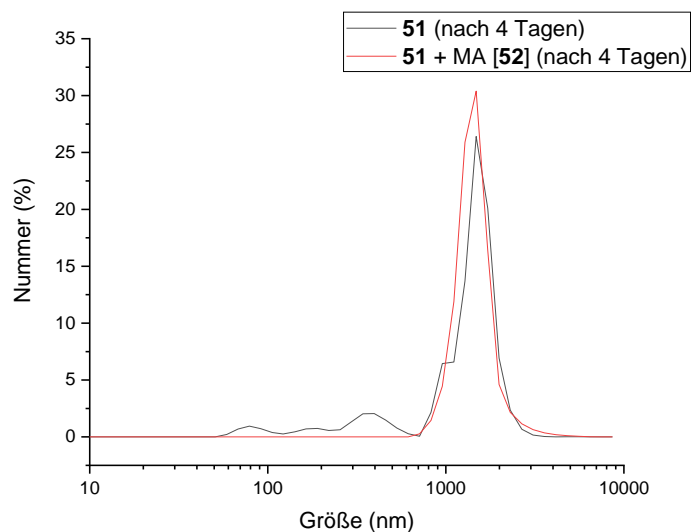
Um das neuartige Hydrogelatorsystem zu studieren, wurden zunächst die Selbstorganisation und die Emissionseigenschaften von **51** untersucht. Es stellte sich heraus, dass mit zunehmendem Wassergehalt (Abb. 53A) die Emission ansteigt und Blauverschiebungen (hypsochrom) auftreten, was auf den AIE-Effekt zurückgeführt wurde, und die Annahme zulässt, dass sich höher geordnete Strukturen bilden. Bei niedrigen Wassergehalten wurde eine schwache Emission bei etwa 600 nm beobachtet. Diese Tatsache wurde locker gepackten Strukturen zugeschrieben, die in der Lage sind, mit dem umgebenden polaren Lösungsmittel (DMSO) zu interferieren, während dicht gepackte Strukturen bei höheren Wassergehalten bei 512 nm ohne Interferenz der umgebenden Lösungsmittel emittieren. Diese Strukturen sollten einen erhöhten Grad der Bewegungsfixierung von **51** zeigen, der die Emission induziert (Abb. 53B). Zu diesem Zweck wurden TEM-Aufnahmen durchgeführt, bei denen kleine lose gepackte Partikel in reinem DMSO gezeigt wurden, die sich bei höheren Wassergehalten zu Einzelfasern mit einer Länge von mehreren hundert nm zu organisieren beginnen (Abb. 53C).



**Abb. 53:** A) Emissionsänderungen der Verbindung **51** bei steigenden Wassermengen, B) Normalisierte Emission bei 512 nm in Abhängigkeit vom Wassergehalt, C) TEM-Messungen der Verbindung **51** in reinem DMSO, 50% Wasser und 50% DMSO, sowie reinem Wasser. [**51**] = 25  $\mu\text{M}$ , TEM-Bild in reinem Wasser bei 50  $\mu\text{M}$ .<sup>[37]</sup>

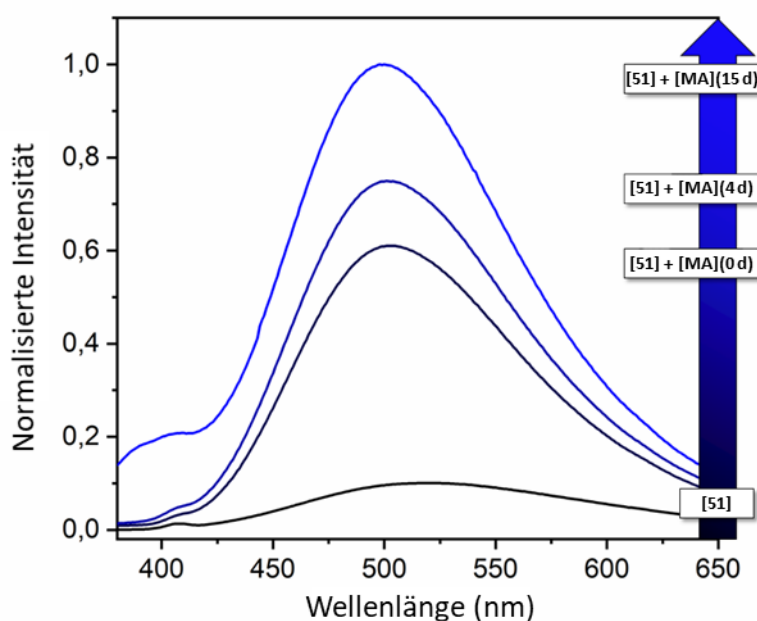
Diese Beobachtung wurde auch mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) verifiziert (Abb. 54). Dabei wurden Strukturen mit einem hydrodynamischen Radius von etwa 1  $\mu\text{m}$  gefunden. Obwohl Partikel in reinem DMSO beobachtet wurden, war eine vernachlässigbare Emission zu beobachten. Diese kann auf einen Verlust an hydrophoben Wechselwirkungen zurückgeführt werden, da diese weniger wahrscheinlich in organischen Lösungsmitteln vorkommen. Dieser Verlust der Wechselwirkung führt zu einem schwächeren Grad der Bewegungsfixierung und ist daher nicht in der Lage, die Emission des AIE-Bindungsmotivs zu induzieren. Diese Beobachtung deckt sich gut mit Systemen mit bathochromer Verschiebung, die bei reinem DMSO auf die Wechselwirkungen des AIE-Luminophors mit dem umgebenden organischen Lösungsmittel zurückzuführen sind.

Da GCP-Einheiten dafür bekannt sind, Sulfonsäuren, Phosphorsäuren sowie Carbonsäuren mit hoher Affinität zu binden, wurde der Lösung von **51** 2 Äquivalente Malonsäure (**52**) hinzugefügt, die in der Lage sein sollten, die einzelnen Fasern zu vernetzen, indem sie den Selbstaufbau der GCP-Einheiten teilweise unterbrechen.<sup>[200]</sup>



**Abb. 54:** DLS-Messungen von Verbindung **51** (50  $\mu\text{M}$ ) und Verbindung **51** (25  $\mu\text{M}$ ) + Malonsäure (**52**) (50  $\mu\text{M}$ ) nach 4 Tagen.<sup>[37]</sup>

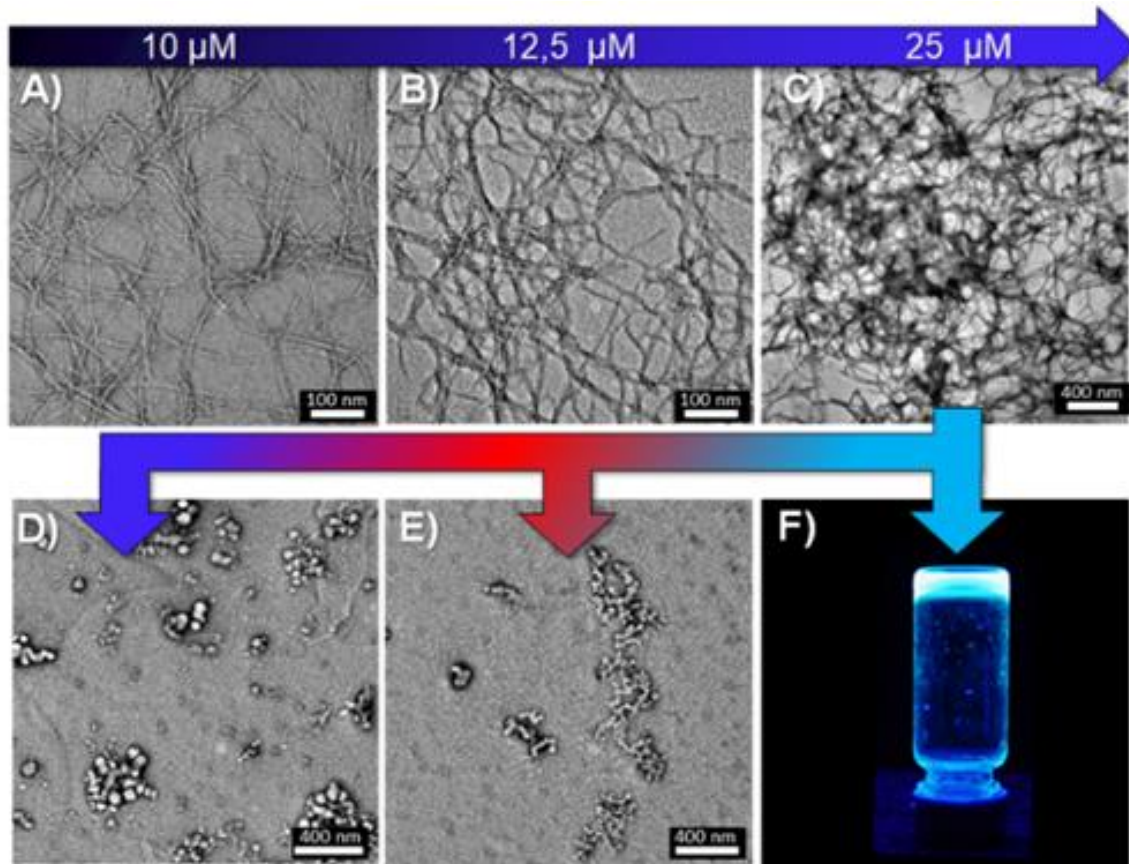
Zu diesem Zweck wurde einer vorgeformten Lösung von **52** zwei Äquivalente Malonsäure (**52**) zugesetzt, wodurch eine sofortige 10-fache Erhöhung der Emission bei 512 nm beobachtet wurde. Dies gab Anlass zur Annahme, dass die Packung der Monomere an Dichte zunahm und so zu einer zusätzlichen Bewegungseinschränkung des AIE-aktiven Kernmotivs führt (Abb. 55).



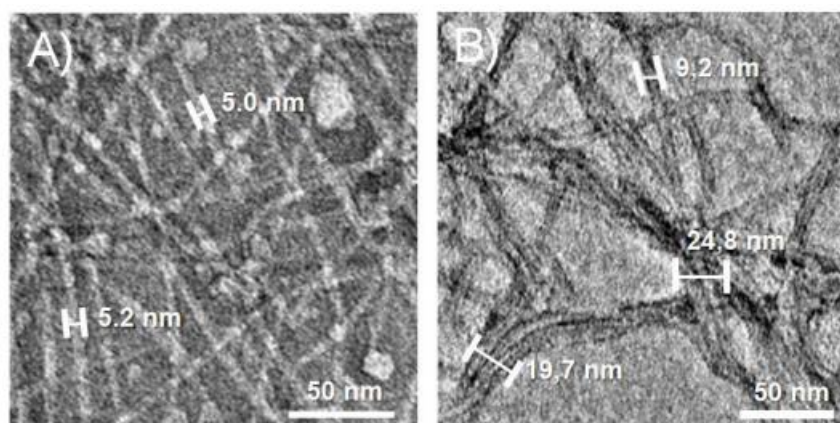
**Abb. 55:** Vergleich der Emissionsintensität von reiner Verbindung **51** sowie nach Zugabe von 2 Äq. Malonsäure (**52**) in verschiedenen Zeitintervallen.  $c = 100 \mu\text{M}$  in Wasser.<sup>[37]</sup>

Während Verbindung **51** dünne Fasern mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 4-5 nm aufweist (Abb. 53C), verändert die Zugabe von MA die Morphologie dramatisch. Aus Abb. 56 ist ersichtlich, dass die einzelnen Fasern durch die MA vernetzt werden, welches zu Faserbündeln mit einem Vielfachen des Durchmessers von 5 nm und einem dichten Fasernetzwerk führt, was durch

sorgfältige Messung der Faserdicken bestimmt wurde (Abb. 57). Darüber hinaus nimmt die Dichte des Netzwerks mit zunehmender Konzentration zu. Dies führt zu einer Gelierung bei 100  $\mu\text{M}$  (Abb. 56).



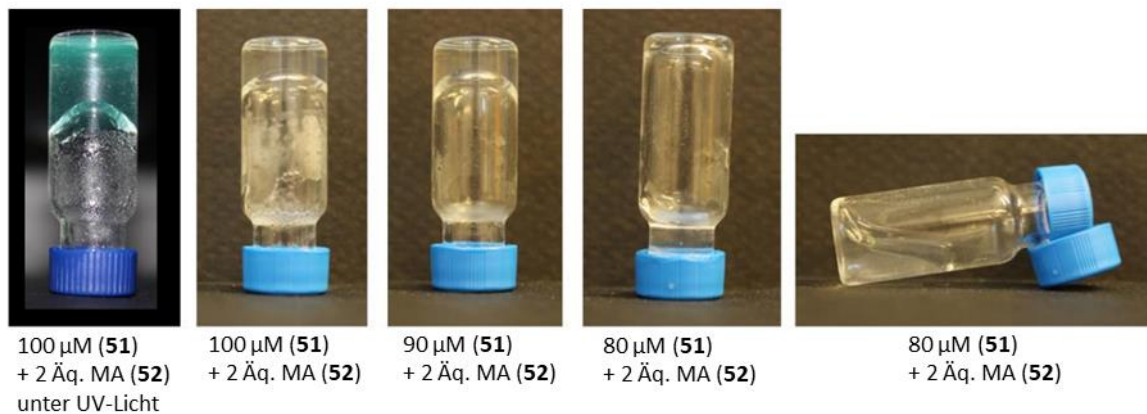
**Abb. 56:** (A-C) TEM-Messungen von **51** bei verschiedenen Konzentrationen in Gegenwart von 2 Äquivalenten MA (**52**), (D) TEM-Messungen von (C) nach Zugabe von  $\text{NEt}_3$ , (E) TEM-Messungen von (C) nach Zugabe von TFA und (F) Aufnahme des aus (A) gebildeten Hydrogels (100  $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart von 2 Äq. MA (**52**) in Wasser unter UV-Licht-Bestrahlung ( $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ).<sup>[37]</sup>



**Abb. 57:** Vergrößerte TEM-Bilder der Verbindung **51** ohne MA (**52**) und mit 2 Äq. von MA (**52**) einschließlich Messungen der Faserdicken.<sup>[37]</sup>

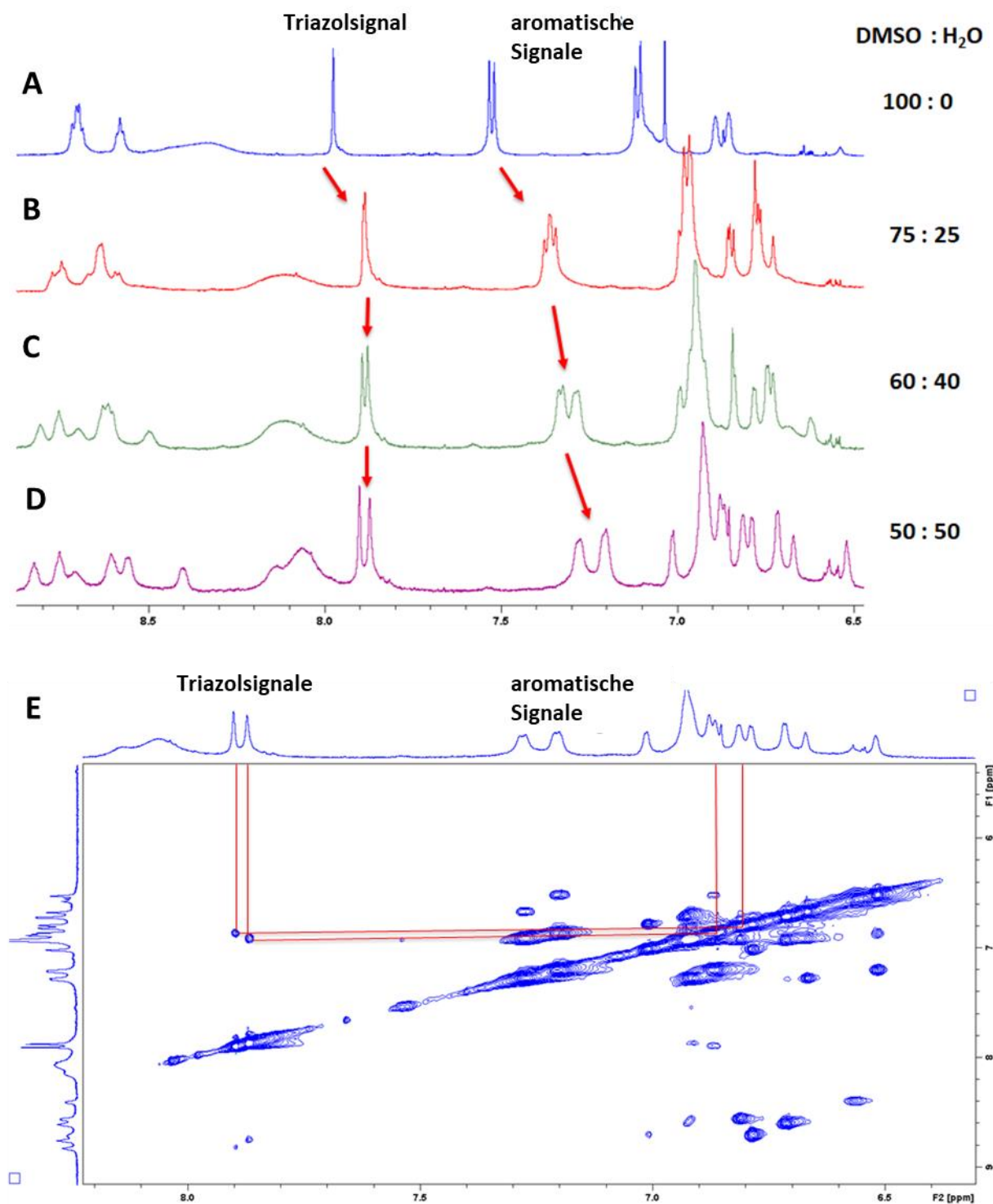
Interessanterweise wurde bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  von **51** keine Gelierung beobachtet und eine höchst bewegliche und transparente Lösung erzielt. Um die genaue kritische Gelierungskonzentration (CGC) zu bestimmen, wurde der *Inverted Vial Test* bei verschiedenen

Konzentrationen durchgeführt (Abb. 58). Dabei wurde bestimmt, dass die CGC bei nur 90  $\mu\text{M}$  (177  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) der Verbindung **51** mit 2 Äquivalenten MA (**52**) lag, was 0,02 wt% im Bezug auf das Gel darstellt. Dabei ist hervorzuheben, dass Verbindung **51** ein solch exzellenter Gelator ist, dass er in die Klasse der sog. Supergelatoren eingeordnet werden kann, welche eine CGC  $<0,1$  wt% aufweisen.<sup>[201]</sup> Bis heute sind nur wenige Beispiele in der Literatur beschrieben, die in diese Kategorie eingeordnet werden können und ebenfalls auf verschiedene Stimuli ansprechen. Dabei sind die meisten davon Gelatoren in organischen Lösungsmitteln.<sup>[202,203]</sup>



**Abb. 58:** Bestimmung der kritischen Gelierungskonzentration mit der *inverted vial method* unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von **51** in Gegenwart von 2 Äquivalenten MA (**52**).<sup>[37]</sup>

Um zusätzliche Informationen über den Selbstassemblierungsprozess zu erhalten, wurde Verbindung **51** mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Studien bei unterschiedlichen Wassergehalten untersucht.

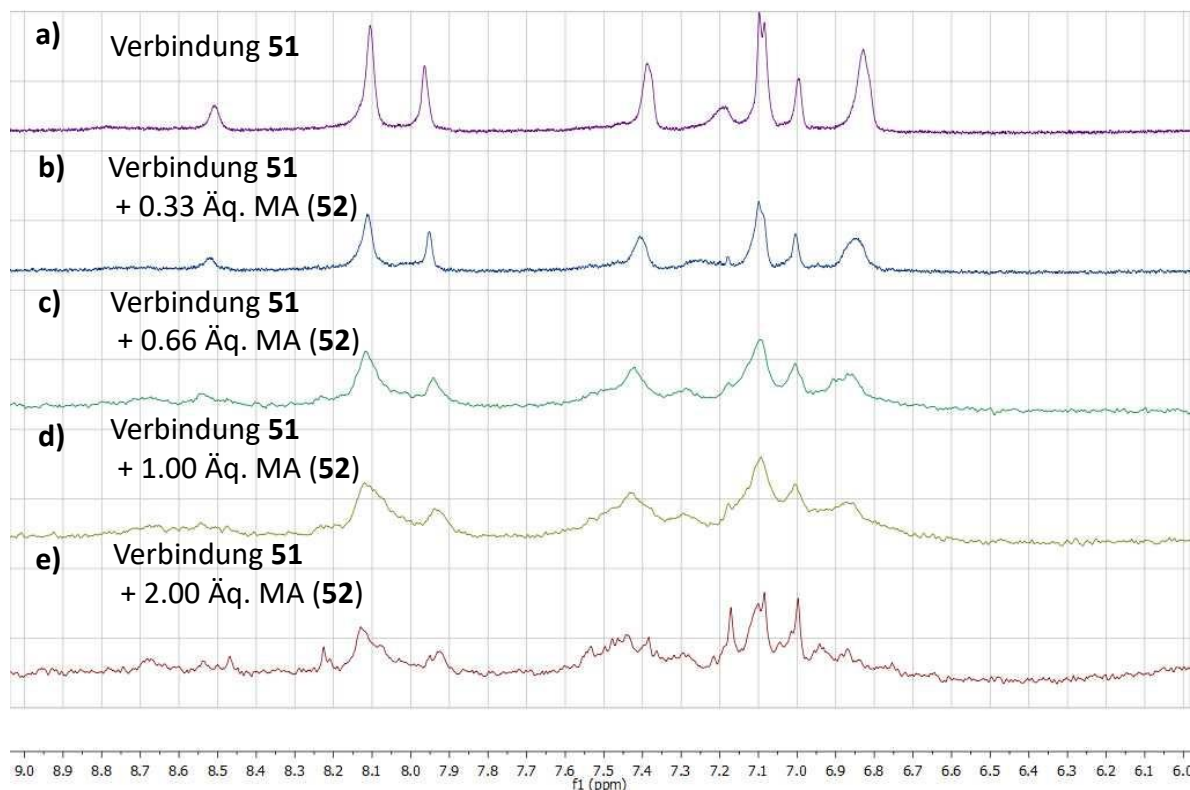


**Abb. 59:**  $^1\text{H-NMR}$  von Verbindung **51** zeigt eine Peakaufspaltung der aromatischen Signale durch Erhöhung des Wasserwertes. a) Verbindung **51** ( $c = 5 \text{ mM}$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ), die Zugabe von  $\text{D}_2\text{O}$  führt zu b) Verbindung **51** ( $c = 3,75 \text{ mM}$ , 25%  $\text{D}_2\text{O}$ ), c) Verbindung **51** ( $c = 3 \text{ mM}$ , 40%  $\text{D}_2\text{O}$ ), d) Verbindung **51** ( $c = 2,5 \text{ mM}$ , 50%  $\text{D}_2\text{O}$ ), e) NOESY von Verbindung **51** ( $c = 2.5 \text{ mM}$ ) in  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$  (50/50).<sup>[37]</sup>

Erkennbar aus Abb. 59A-D, führt eine Erhöhung des Wassergehaltes zu einer Aufspaltung sowohl der aromatischen Signale als auch der Triazol-Protonen, die vorher (in reinem  $\text{DMSO}$ ) äquivalent waren. Darüber hinaus zeigt Abb. 59E einen *nuclear Overhauser effect* (NOE) zwischen Triazol-Protonen und aromatischen Signalen, die eine unmittelbare Nähe ( $\leq 5,5 \text{ \AA}$ ) anzeigen. Dieser deutet auf einen

Selbstassemblierungsprozess, der zu einer asymmetrischen Packung in den gebildeten Morphologien der Verbindung **51** führt.

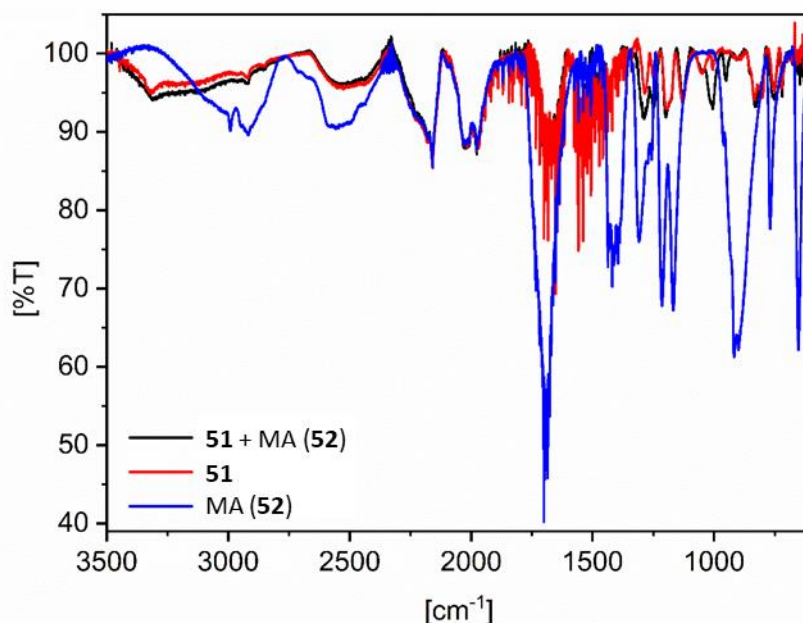
In einem weiteren  $^1\text{H}$ -NMR-Titrationsexperiment wurde MA (**52**) zu Verbindung **51** in wässriger Lösung titriert (Abb. 60A-E). Die Erhöhung des molaren Verhältnisses von MA/**51** auf 1:1 führte zu einer signifikanten Verbreiterung der NMR-Signale im Spektralbereich von 6 bis 9 ppm (Aromaten, Amide und Guanidine), das auf eine zunehmende Heterogenität hinweist. Wenn sich der MA-Gehalt dem Verhältnis 2:1 nähert (Abb. 60E), werden eine Reihe zusätzlicher Signale mit schmalere Linienbreiten beobachtet.



**Abb. 60:**  $^1\text{H}$ -NMR-Titration von Verbindung **51** (2,5 mM) mit Malonsäure (**52**) in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9/1) und 2%  $\text{DMSO-d}_6$ , a) Verbindung **51**, b) Verbindung **51** + 0,33 Äq. MA (**52**), c) Verbindung **51** + 0,66 Äq. MA (**52**), d) Verbindung **51** + 1 Äq. MA (**52**), e) Verbindung **51** + 2 Äq. MA (**52**).<sup>[37]</sup>

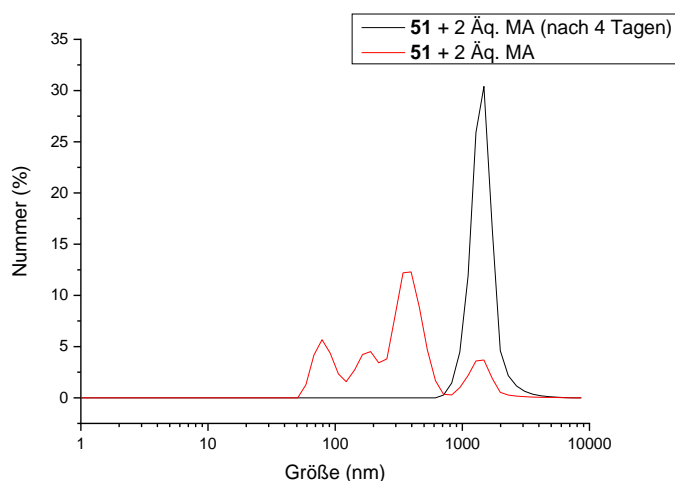
Dieser Effekt kann nicht durch eine höhere Mobilität des Komplexes erklärt werden; nur die Bildung von teilweise geordneten "Domänen" (d.h. mit ähnlicher oder sogar identischer chemischer Umgebung der betroffenen protonen tragenden Spezies) würde mit dieser Beobachtung übereinstimmen.

Dieser Befund wurde auch durch IR-Messungen gestützt, die ein Verschwinden der OH-Signale der MA (**52**) bei Zugabe zu Verbindung **51** zeigten, welches zu der Annahme führt, dass zusätzliche Wasserstoffbrücken zwischen MA (**52**) und **51** gebildet werden (Abb. 61).



**Abb. 61:** FT-IR Messungen von **51**, MA (**52**) und dem Komplex bestehend aus **52** und 2 Äq. MA (**52**).<sup>[37]</sup>

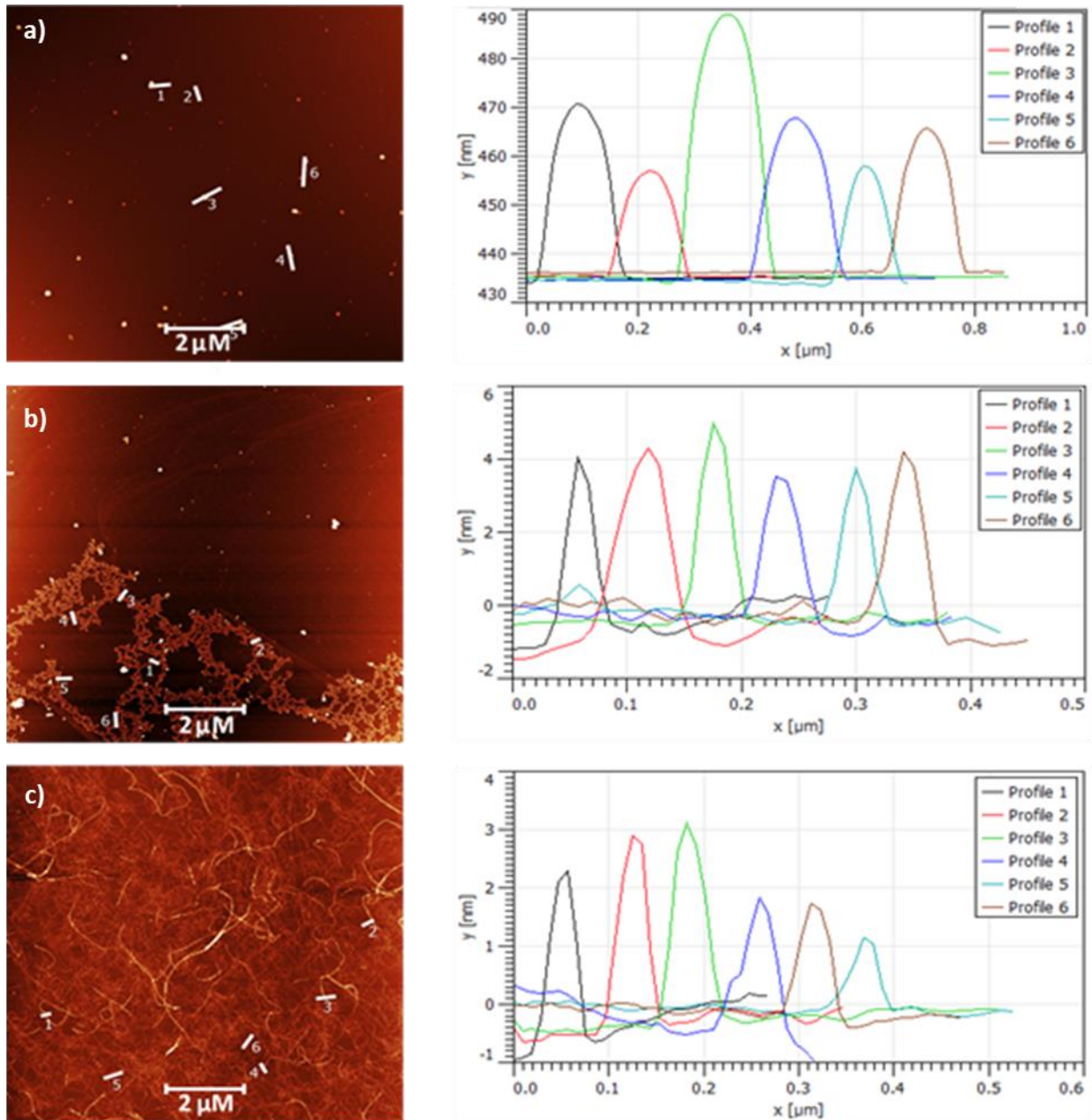
Um den zeitlichen Einfluss auf die Gelbildung zu untersuchen, wurden weitere DLS Messungen durchgeführt. Dazu wurden frisch angesetzte Proben von **51** mit 2 Äquivalenten MA versetzt und unmittelbar danach sowie nach 4 Tagen gemessen. Nach anfänglichem Mischen der Komponenten wurde eine sofortige Größenzunahme mit einer breiten Verteilung beobachtet, die kleinere und größere Aggregate zeigte, welche schließlich (nach 4 d) in großen Strukturen mit einer Größe von mehr als 1  $\mu\text{m}$  endeten (Abb. 62). Dies lässt die Schlussfolgerung zu dass die Kinetik der Gelbildung langsam verläuft und erst nach mehreren Tagen abgeschlossen ist.



**Abb. 62:** DLS-Messung von Verbindung **51** (25  $\mu\text{M}$ ) + MA (**52**) (50  $\mu\text{M}$ ) sofort (rot) und nach 4 Tagen (schwarz).<sup>[37]</sup>

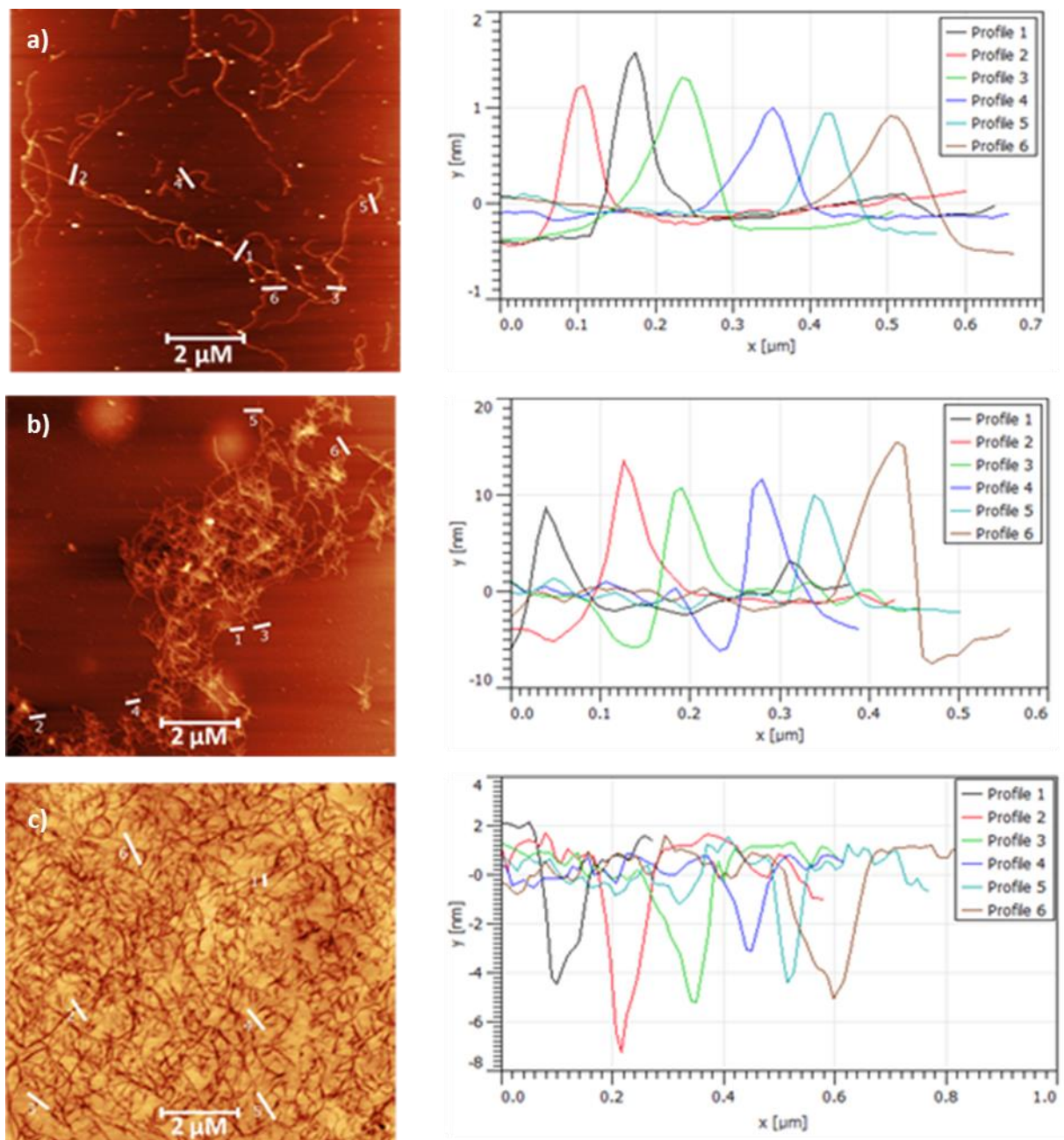
Um ebenfalls ein Höhenprofil der zuvor beschriebenen Strukturen zu gewinnen, wurden diese mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht. Die Messungen zeigten von **51** in reinem DMSO Partikel und in reinem Wasser Fasern mit einen Höhenprofil von etwa 3 nm. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der TEM-Bildgebung (Abb. 63).





**Abb. 63:** AFM-Höhenbilder (10 μm x 10 μm) und Höhenprofile von **51** (25 μM) bei verschiedenen Lösungsmitteln a) Partikel bei DMSO b) Bildung von fibrillärem Netzwerk bei DMSO/H<sub>2</sub>O (1/1) c) vollständig gebildetes fibrilläres Netzwerk bei H<sub>2</sub>O.<sup>[37]</sup>

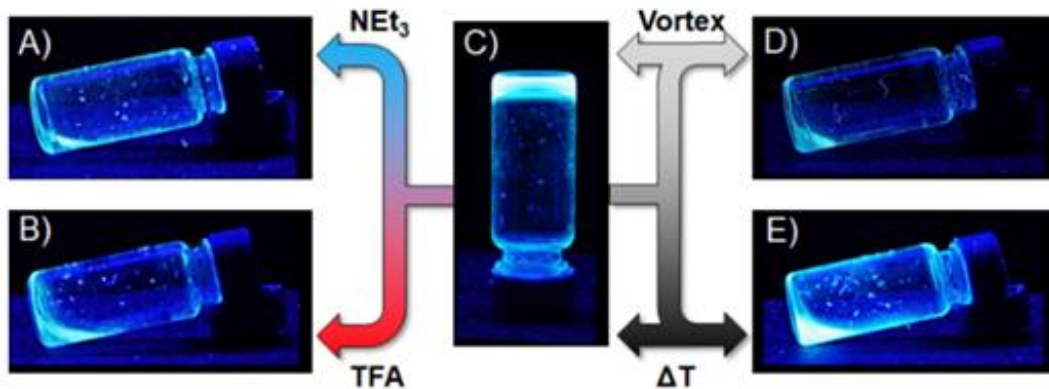
Durch Zugabe von MA (**52**) entstand ein dichtes Netzwerk, das Fasern mit einer Breite von 15 nm aufwies (Abb. 64). Darüber hinaus nimmt die Dichte des Netzwerkes mit zunehmender Konzentration zu (Abb. 56 und Abb. 64). Auch diese Beobachtungen stimmen mit den TEM-Aufnahmen überein.



**Abb. 64:** AFM-Höhenbilder ( $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ) und Höhenprofile von **51** (1 Äq.) + Malonsäure (2 Äq.) bei verschiedenen Konzentrationen in  $\text{H}_2\text{O}$  a) **51** ( $10\ \mu\text{M}$ ) + MA (**52**) b) **51** ( $12,5\ \mu\text{M}$ ) + MA (**52**) c) **51** ( $25\ \mu\text{M}$ ) + MA (**52**).<sup>[37]</sup>

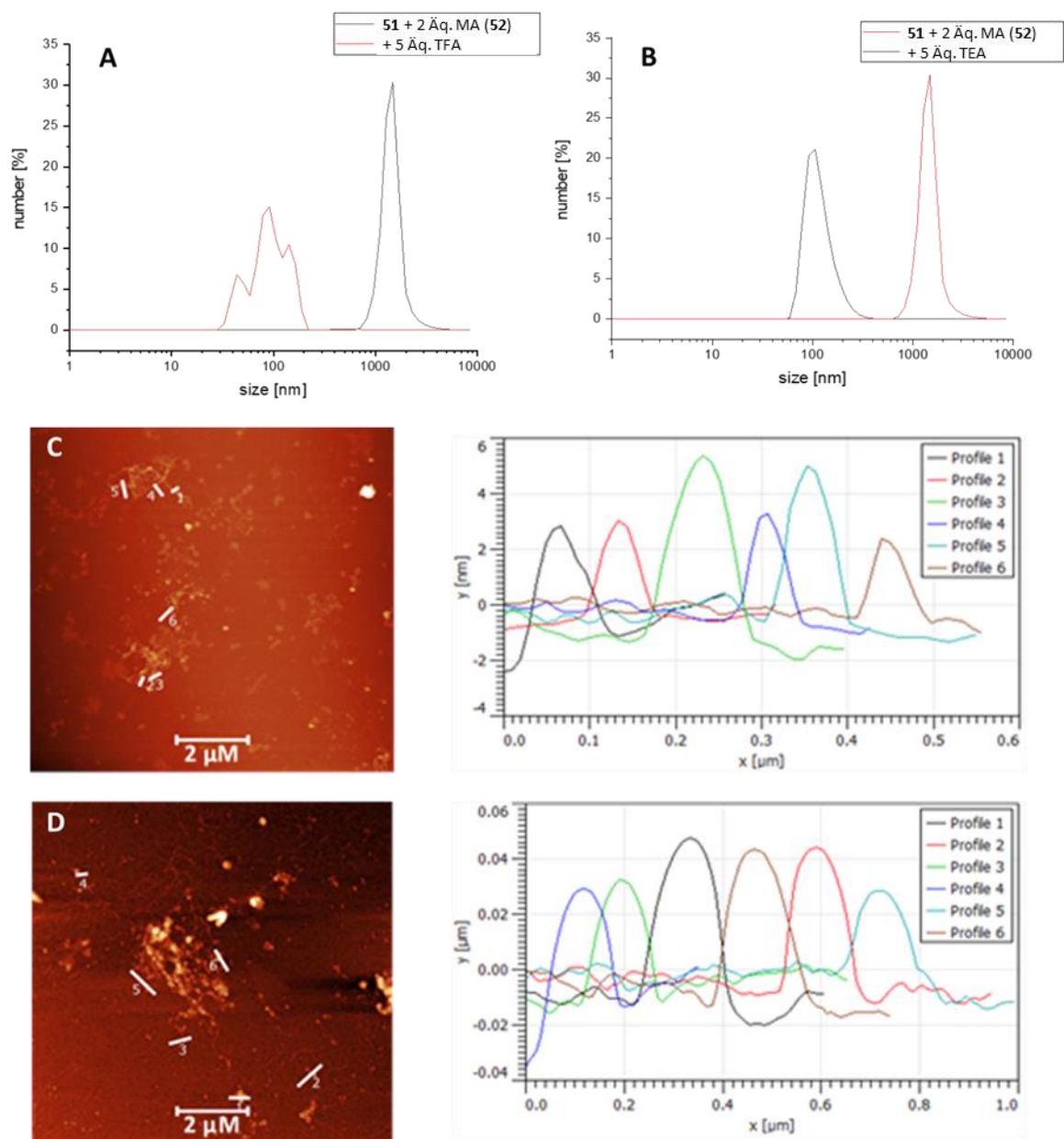
Wie zuvor beschrieben, wird von dem erhaltenen Hydrogel erwartet, dass es auf verschiedene Stimuli reagieren kann. Entsprechend wurde die Responsivität nachfolgend untersucht. Abb. 65 zeigt Fotografien der Schaltbarkeit des gebildeten Hydrogels. Es ist offensichtlich, dass das fluoreszierende Gel (Abb. 65C) seine Stabilität nach der Behandlung mit Wärme, durch mechanische Kraft, Säure und Base verliert, welches mit einer verringerten Intensität der Emission einhergeht. Dieses Verhalten wird auf einen Verlust und eine Fixierung von **51** innerhalb der gebildeten Strukturen zurückgeführt und wurde ebenfalls durch TEM-Bildgebung visualisiert (Abb. 56). Nach Zugabe eines Überschusses an Triethylamin (TEA) wurde ein schneller Gel-Sol-Übergang beobachtet, der mit einer Abnahme der Emission einherging. TEM- und AFM-Untersuchungen zeigten kollabierte Partikel mit einem

Durchmesser von weniger als 100 nm. Ein ähnliches Verhalten wurde nach der Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) festgestellt (Abb. 56 und Abb. 66).



**Abb. 65:** Fotografien des gebildeten lumineszierenden Hydrogels nach verschiedenen äußeren Reizen unter UV-Lichtbestrahlung. A) Zugabe von  $\text{NEt}_3$ , B) Zugabe von TFA, C) das so entstandene Zweikomponenten-Hydrogel, D) nach Schütteln und E) nach Erwärmung.<sup>[37]</sup>

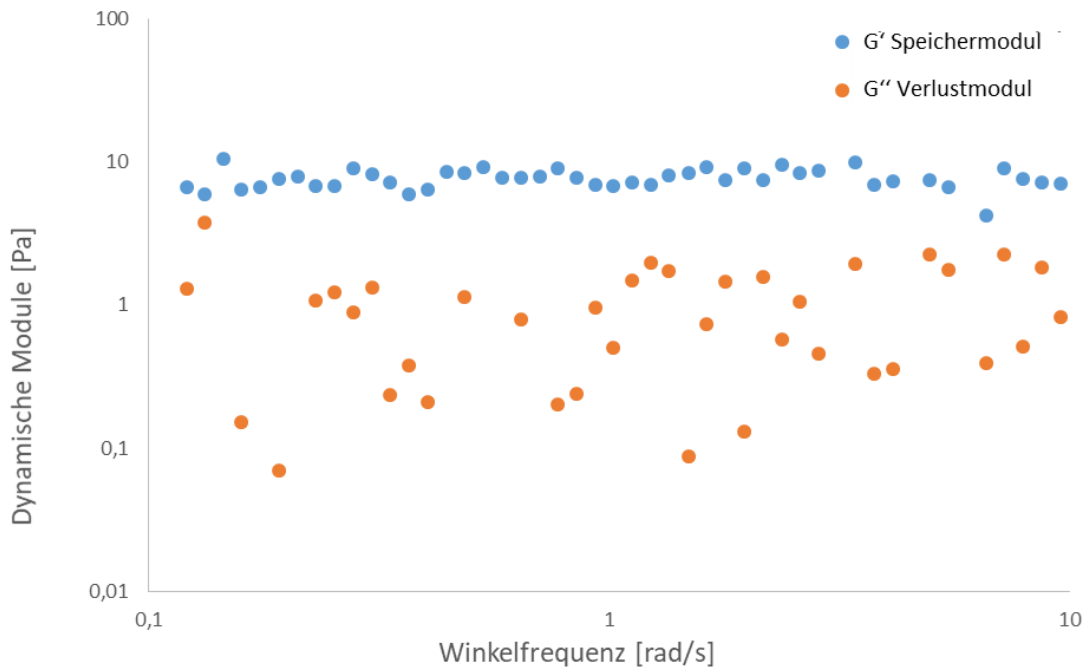
In beiden Fällen ist die Protonierung oder Deprotonierung der GCP-Einheiten destabilisierend für die Selbstorganisation in Fasern, die mit einer raschen Zerstörung des Hydrogelnetzwerkes einhergeht (Abb. 56D und E). Dieses Verhalten wurde ebenfalls mittels DLS untersucht. Hier wurde ein anfänglicher hydrodynamischer Radius von mehr als 1  $\mu\text{m}$  detektiert, der signifikant auf weniger als 100 nm abfiel, nachdem die Zugabe von Säure oder Base erfolgte. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus den TEM-Messungen (Abb. 56D und E, sowie Abb. 66A und B). Reformierung des Gels durch Einstellung eines neutralen pH-Werts führte nicht zu einer Neubildung des Gels aufgrund einer erhöhten Gesamtkonzentration des gebildeten Salzes von TEA und TFA. Diese zusätzlichen Salze verringern die Fähigkeit zur Induzierung der Selbstassemblierung, als Folge der Konkurrenz-Wechselwirkungen zwischen den GCP-Einheiten und zusätzlichen Carboxylaten sowie geladenen Aminen.



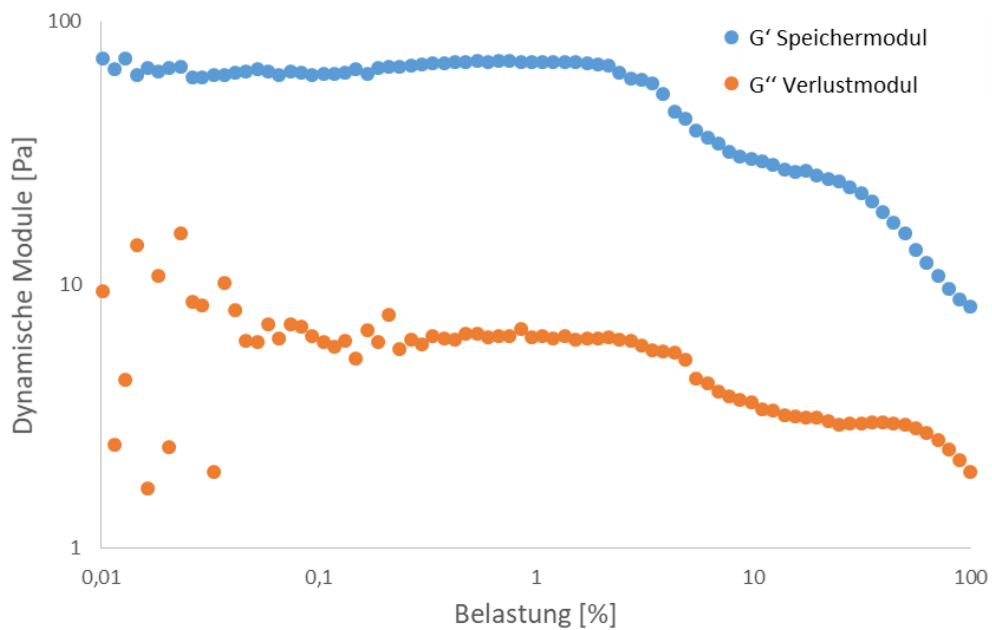
**Abb. 66:** A) DLS-Messung von Verbindung **51** (25 µM) + Malonsäure (**52**) (50 µM). (A) nach Zugabe von 5 Äq. TEA oder (B) 5 Äq. TFA. AFM-Höhenbilder (10 µm x 10 µm) und Höhenprofile von **51** (25 µM) + Malonsäure (50 µM) nach Zugabe von Säure/Base (C) nach Zugabe von 5 Äq. TFA (D) nach Zugabe von 5 Äq. TEA.<sup>[37]</sup>

Oszillatorische Rheologiemessungen des Hydrogels (100 µM) bei 25 °C gaben einen Hinweis auf die Bildung eines schwachen Gels. Bestätigt wird dies durch niedrige Werte der dynamischen Module in der linearen Region.<sup>[204]</sup> Die Viscoelastizität eines Gels wird durch die dynamischen Module charakterisiert: Das Speichermodul  $G'$  und das Verlustmodul  $G''$ . Der Frequenzdurchlauf (Abb. 67) bei einer konstanten niedrigen Dehnung (0,1%) weist im gesamten Frequenzbereich (0,1-10 rad/s) höhere Werte von  $G'$  als  $G''$  auf, und die Module sind nahezu unabhängig von der Schwingungsfrequenz. Außerdem sind die Werte von  $G'$  niedriger als 10 Pa und die Werte von  $G''$  ungefähr 1 Pa (von 0,1 bis 10 rad/s), außerdem ist der Wert für Verlustmodul/Speichermodul ( $G'/G''$ ) etwa 7-8, was darauf hindeutet, dass ein schwaches Gel gebildet wird.<sup>[205]</sup>

Darüber hinaus zeigt der *strain sweep* (Abb. 68) bei einer konstanten Frequenz (2 Hz) eine Plateuregion, gefolgt von einem Abfall der dynamischen Module bei einer kritischen Dehnung von 4%. Dieser deutet auf einen teilweisen Zusammenbruch der Gelstruktur hin. Allerdings kann innerhalb des untersuchten Bereiches bis zu einer Dehnung von 100% kein *crossover* von  $G'$  und  $G''$  (Fließpunkt) beobachtet werden, welches die vollständige Zerstörung des Gels bedeuten würde.<sup>[206]</sup>



**Abb. 67:** Oszillationstests des Hydrogels **52** (100  $\mu\text{M}$ ) + Malonsäure (200  $\mu\text{M}$ ), *frequency sweep* bei konstanter Dehnung ( $\gamma = 0,1\%$ ).<sup>[37]</sup>



**Abb. 68:** Oszillationstests des Hydrogels **51** (100  $\mu\text{M}$ ) + Malonsäure (**52**) (200  $\mu\text{M}$ ), *strain sweep* bei einer konstanten Frequenz ( $f = 2\text{ Hz}$ ).<sup>[37]</sup>

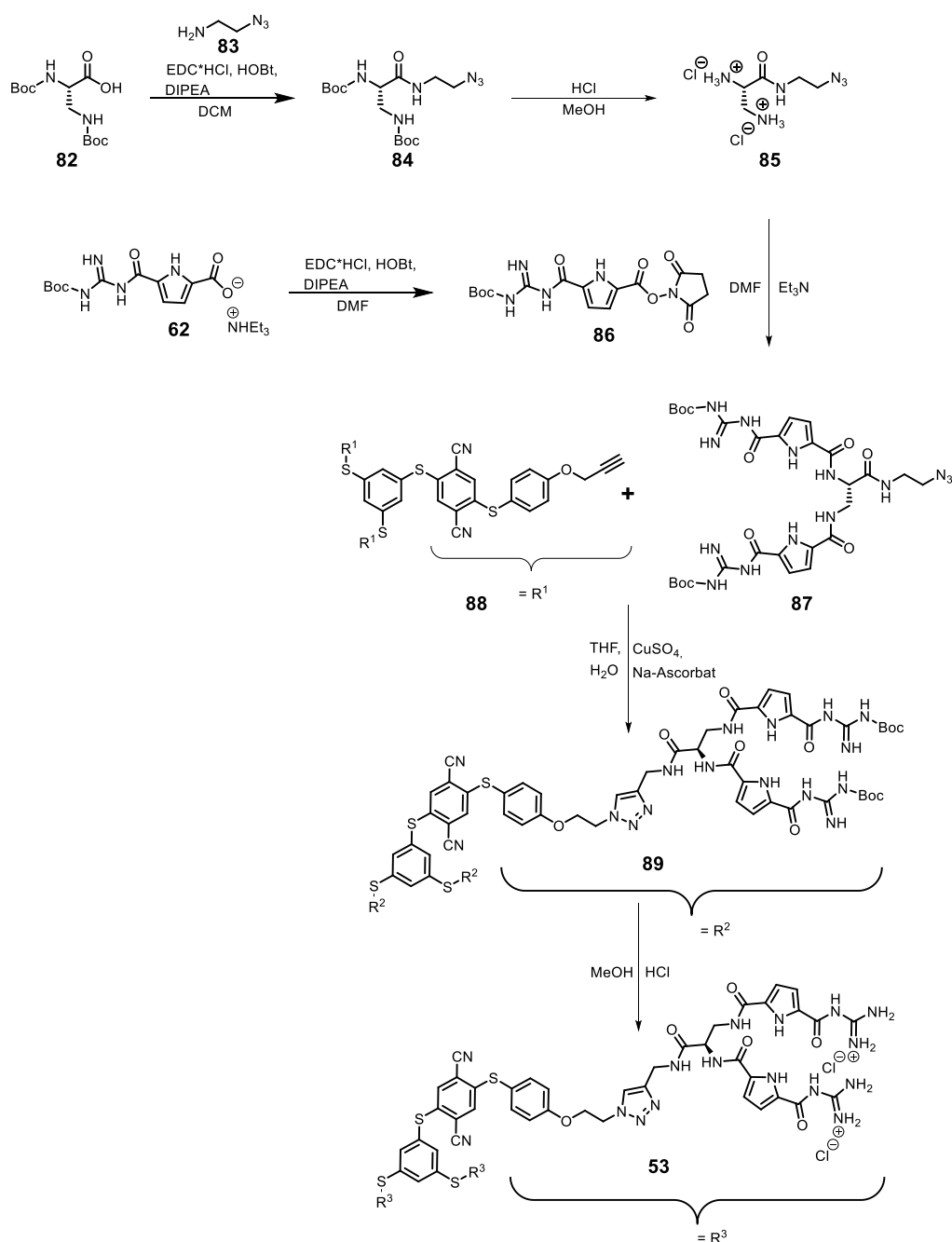
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein neues hochdynamisches Hydrogel auf Basis eines zwei-Komponenten-Systems hergestellt werden konnte. Das so erhaltene Hydrogel reagiert nicht nur auf eine Vielzahl von Stimuli (wie pH-Änderung oder mechanischen Stress), sondern geliert bereits effizient bei einer Konzentration von 90  $\mu\text{M}$  (0,02 wt%). Die Effizienz der Gelierung ist dabei so herausragend, dass Verbindung **51** in Gegenwart von 2 äq. Malonsäure der Klasse der *Supergelators* zugeordnet werden kann. Nach aktuellem Kenntnisstand ist dies das erste Beispiel eines zwei-Komponenten-Hydrogel mit AIE-Effekt, das auf verschiedene Stimuli reagiert und der Klasse der *Supergelators* zugeordnet wird. Zusätzlich konnte mittels AFM und TEM der Grund für das Auftreten der Gelierung veranschaulicht werden. Dieser ist eine Orchestrierung mehrerer nicht-kovalenter Wechselwirkungen, wie die Komplexbildung von Carbonsäuren (hier Malonsäure) durch die GCP-Einheiten, die zu einer Bildung von Faserbündeln führt und in einer effizienten Vernetzung endet. Die dabei entstehende Abnahme der Mobilität der AIE-aktiven Kernverbindung induziert dabei eine Fluoreszenzantwort, die für den Aggregations-induzierten Emissionsprozess klassisch ist. Dieses reaktionsfähige Hydrogel könnte zukünftig Anwendungen im Bereich *sensing applications* finden, wo die Reizantwort durch pH-Änderungen einen direkten Einfluss auf die Stabilität des gebildeten Gels haben könnte. Des Weiteren kann der hier studierte Gelator **51** als Leitstruktur dienen, um weitere noch effizientere Hydrogelatoren zu entwickeln, die im Zusammenspiel mit einer weiteren Verbindung assemblieren, um ein effizientes Gel zu bilden.

## 4.4 Entwicklung eines C<sub>3</sub>-symmetrischen lumineszenten Hydrogelators

Die Arbeit in diesem Kapitel erfolgte in Kooperation mit Matthias Hayduk aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jens Voskuhl (Universität Duisburg-Essen, Deutschland) und Thorben Neumann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Giese (Universität Duisburg-Essen, Deutschland).

### 4.4.1 Synthese des hexakationischen Hydrogelators

Die Synthese des hexakationischen Hydrogelators **53** erfolgte in 5 Schritten und startete ausgehend von der kommerziell erhältlichen künstlichen Aminosäure Boc-DAP(Boc)-OH (**82**) (Schema 7).



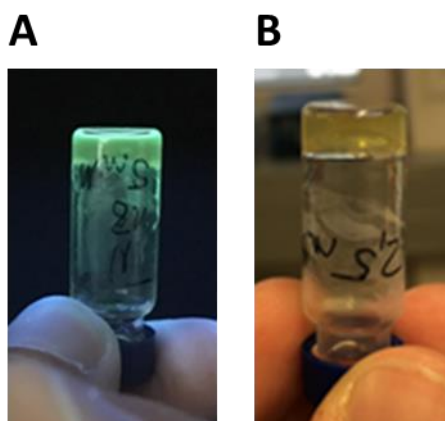
Schema 7: Syntheseroute des hexakationischen Gelators **53**.

Zuerst wurde die Aminosäure Boc-L-DAP(Boc)-OH (**82**) mit EDC\*HCl, HOBT, DIPEA und 2-Azidoethylamin (**83**) umgesetzt. So wurde durch die Kupplungsreaktion ein Azid in die künstliche Aminosäure **82** eingeführt, wodurch **84** erhalten wurde. Für eine anschließende Boc-Entschützung unter sauren Bedingungen wurde **84** in einer Mischung aus Methanol und HCl gerührt, dadurch wurde das zwei-fache Hydrochloridsalz **85** erhalten. Da der GCP-Succinimidaktivester in Kupplungsreaktionen erfahrungsgemäß gute Ausbeuten erzielt und die Reinigung des Rohproduktes leichter ist, wurde GCP (**62**) mit EDC\*HCl, HOBT, DIPEA und N-Hydroxysuccinimid zur Reaktion gebracht, wodurch der Aktivester **86** erhalten wurde. Nachfolgend wurde der isolierte Aktivester **86** mit der entschützten Aminosäure **85** unter basischen Bedingungen gerührt, wodurch eine Kupplungsreaktion stattfand und die zweifach GCP funktionalisierte Aminosäure **87** als weißer Feststoff erhalten wurde. Nachfolgend wurde das Alkin **88**, Azid **87**, CuSO<sub>4</sub> und Natriumascorbat in einer Mischung aus THF und Wasser gerührt. Dabei findet eine kupferkatalysierte 1,3-Dipolaren Cycloaddition von Alkin **88** und Azid **87** statt, die selektiv das 1,4-Disubstituierte Triazol **89** bildet. Der geschützte Ligand **89** wurde dann in einer Mischung aus MeOH und HCl gerührt, um die Boc-Schutzgruppen zu spalten und so den entschützten Liganden **53** als gelben Feststoff zu erhalten.

#### 4.4.2 Untersuchung des Hydrogelators 53

Der Hydrogelator **53** besteht aus einem AIE-System auf Basis aromatischer Thioether und wurde mit sechs selbstkomplementären GCP-Bindungsmotiven funktionalisiert. Daher wurde angenommen, dass auf Grund der höheren Valenzen der neue Gelator **53** in der Lage ist, auch ohne Crosslinker ein potentes Hydrogel zu bilden, welches einen AIE-Effekt aufweist.

Die neue Verbindung wurde zunächst hinsichtlich ihrer Fähigkeit, ein Gel ausbilden zu können untersucht. Dazu wurden mehrere Gele mit verschiedenen Konzentrationen angesetzt, um mittels *inverted vial test* die kritische Gelierungskonzentration bestimmen zu können. Dabei wurde festgestellt, dass die kritische Gelierungskonzentration 2,5 mM **53** in H<sub>2</sub>O beträgt. Ebenfalls konnte eine eindeutige Fluoreszenz bei UV-Bestrahlung ( $\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$ ) der Gel-Probe beobachtet werden (Abb. 69).

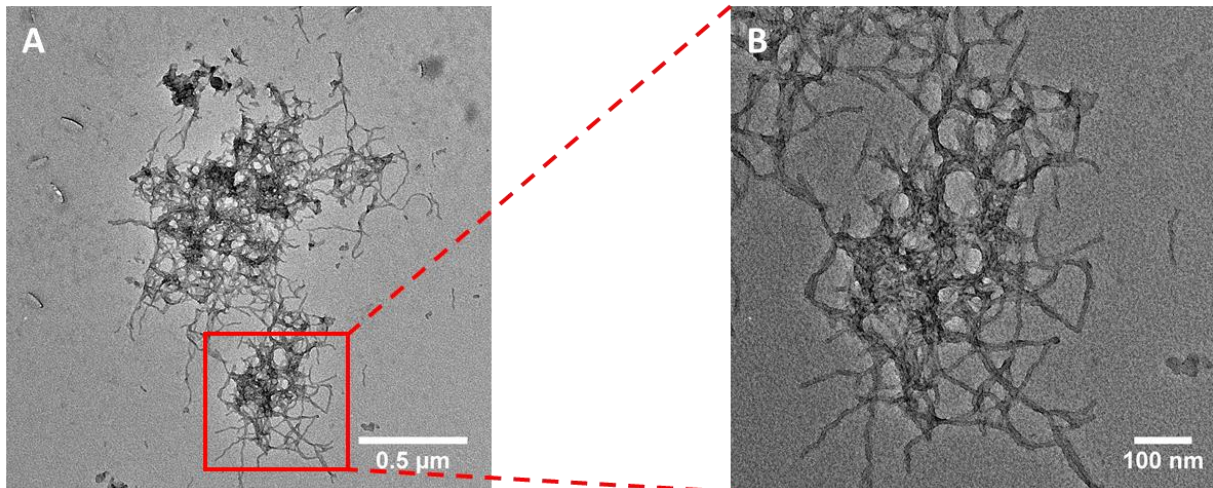


**Abb. 69:** A) Foto des Gels bei einer Konzentration von 5 mM **53** unter UV-Strahlung. B) Foto des Gels bei einer Konzentration von 2,5 mM **53** (kritische Gelierungskonzentration).



Um zu verstehen, welche übergeordneten Strukturen zu der Gelierung führen, wurden nachfolgend transelektronenmikroskopische Messungen durchgeführt, um die Morphologie genauer zu untersuchen.

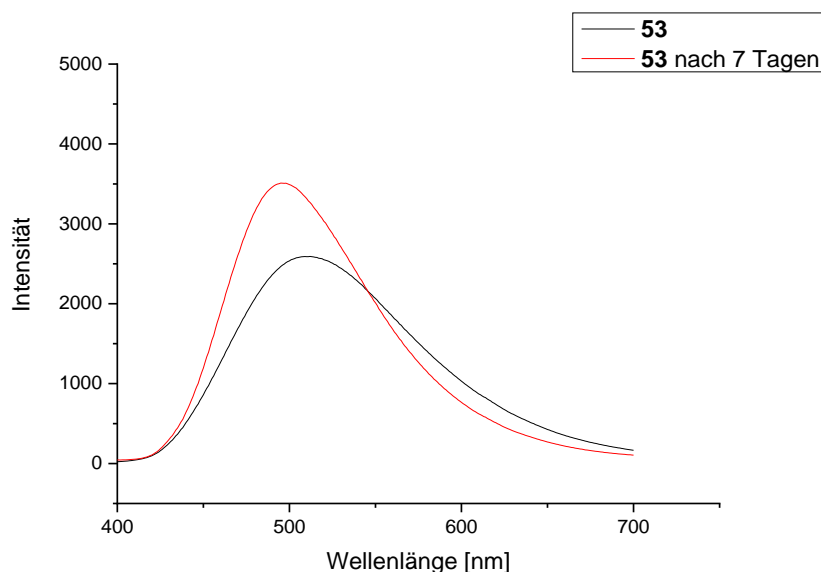
Die beobachteten Strukturen wiesen dabei netzwerkartige Strukturen ( $>1 \mu\text{m}$ ) auf, die sich anscheinend aus einzelnen Fasern zusammensetzen und eine durchschnittliche Breite von 9 nm aufwiesen (Abb. 70).



**Abb. 70:** Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) von A) 50  $\mu\text{M}$  Gelator **53** (mit staining) und B) vergrößerte Darstellung.

Des Weiteren wurden die Messungen bei 50  $\mu\text{M}$  **53** durchgeführt, welches darauf hindeutet, dass diese Konzentration auch gut geeignet ist, um die Emission des lumineszenten Gelators **53** zu bestimmen.

So wurde die Emission bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  **53** bestimmt, da bei dieser bereits Strukturen vorhanden sind welche die molekulare Rotation einschränken können und somit zu einem messbaren AIE-Effekt führen. Dazu wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen einer frisch angesetzten Probe und einer 7 Tage alten Probe gemessen (Abb. 71).



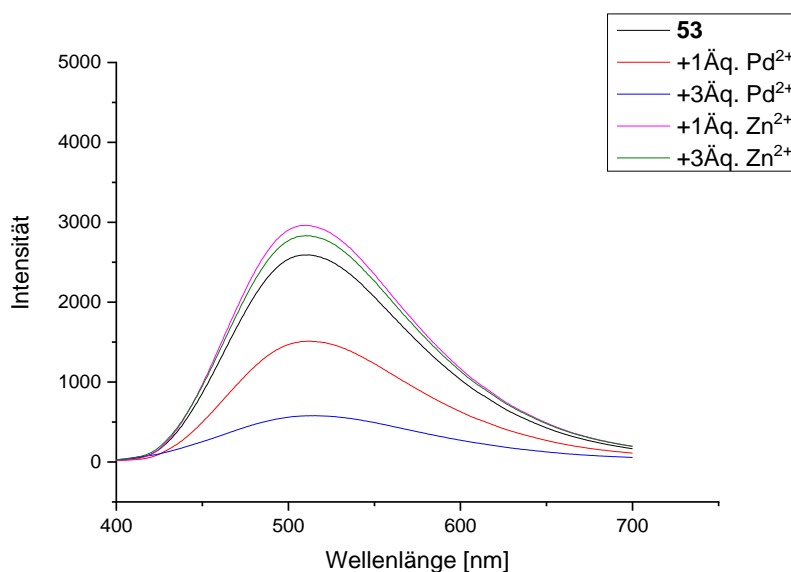
**Abb. 71:** Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung möglicher Alterungseffekte, die sich auf die Emission des Gels auswirken. Die Messungen erfolgten jeweils bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  **53** in  $\text{H}_2\text{O}$ .

Die Messungen zeigten, dass die frisch angesetzte Probe bereits eine ausgeprägte Emission aufweist. Des Weiteren wurde beobachtet, dass nach 7 Tagen die Emission weiter angestiegen ist, was darauf hindeutet, dass das Gel Alterungseffekten unterliegt. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die Bildung supramolekularer Systeme mit einer gewissen Kinetik ablaufen und erst als beendet angesehen werden, sobald das System das thermodynamische Gleichgewicht erreicht hat.

#### 4.4.3 Untersuchung des Zwei-Komponenten Gels

Um aus dem Ein-Komponenten Gel ein Zwei-Komponenten Gel zu realisieren, wurden diverse Koordinationstellen in den supramolekularen Gelator **53** integriert. So wurde die Verbindung **53** mit Triazolen, Guanidinen und Aminosäuren versehen, um ihr die Fähigkeit zu verleihen, Übergangsmetall-Ionen komplexieren zu können. Daher wurde das System hinsichtlich möglicher Wechselwirkungen mit Metall-Ionen untersucht. Dabei wurde erwartet, dass die Komplexbildung durch Metallionen zur Bildung differenzierter Morphologien führt, welches in letzter Konsequenz die Emission beeinflusst.

Daher wurde zunächst die Emissionsänderung nach Zugabe verschiedener Äquivalente an Pd<sup>2+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>-Ionen überprüft (Abb. 72).

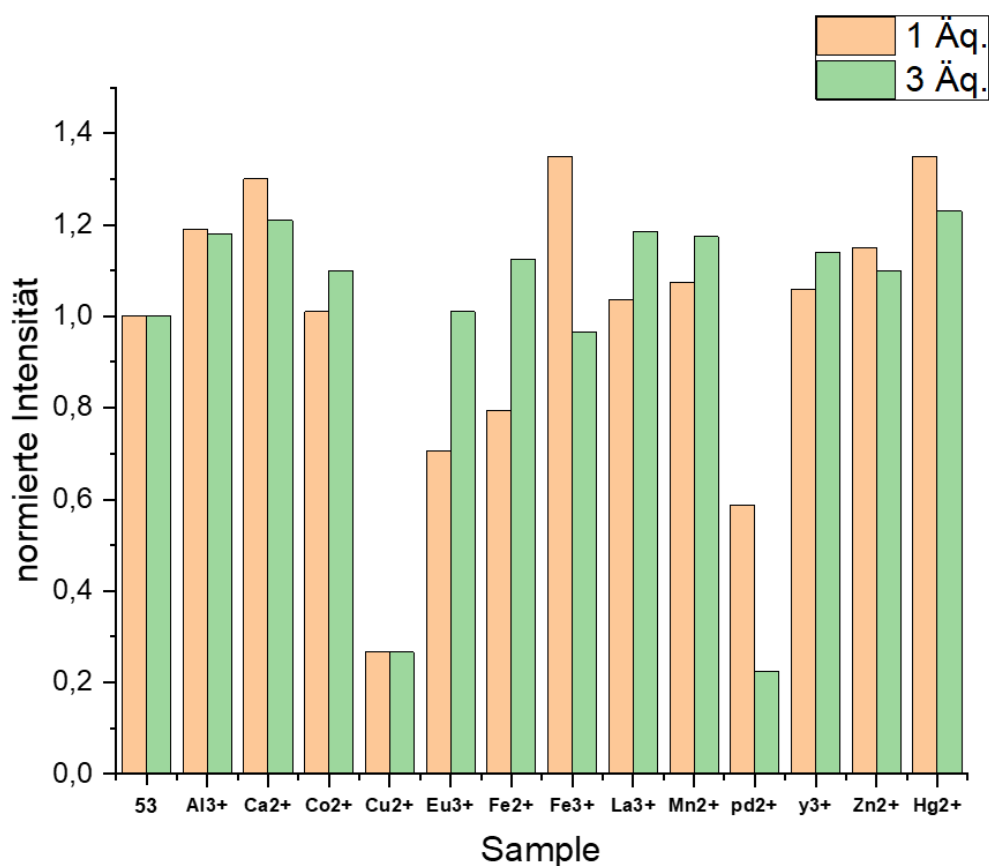


**Abb. 72:** Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung hinsichtlich möglicher Emissionsänderungen nach Zusatz von Pd- und Zn-Ionen. Die Messungen erfolgten jeweils bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  **53** in H<sub>2</sub>O sowie mit und ohne 1 oder 3 Äq. der entsprechenden Metall-Ionen.

Die Fluoreszenzspektroskopischen Messungen zeigten, dass durch Zugabe von Pd<sup>2+</sup>-Ionen die Emission von Verbindung **53** drastisch gequenchet wird. Dies kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass die zentralen Thiolgruppen des AIE Scaffolds die Pd<sup>2+</sup>-Ionen komplexieren, welches zum Quenchen der Fluoreszenz führt. Dieses Phänomen ist bereits bekannt und wurde schon für verschiedene AIE Systeme beobachtet.<sup>[207]</sup>

Die Zugabe von Zn<sup>2+</sup>-Ionen führte hingegen zu einer erhöhten Emission der Verbindung **53**. Dieses Phänomen tritt auf, wenn die Assemblate durch die zusätzliche Interaktion dichter gepackt sind und dadurch die Freiheitsgrade weiter eingeschränkt werden.<sup>[208]</sup>

Diese Ergebnisse gaben Anlass Untersuchungen mit weiteren Metall-Ionen durchzuführen. Daher wurden weitere Kationen ( $Al^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Pd^{2+}$ ,  $Y^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ) hinsichtlich ihrer Fähigkeit, durch Verbindung **53** komplexiert werden zu können, untersucht (Abb. 72).



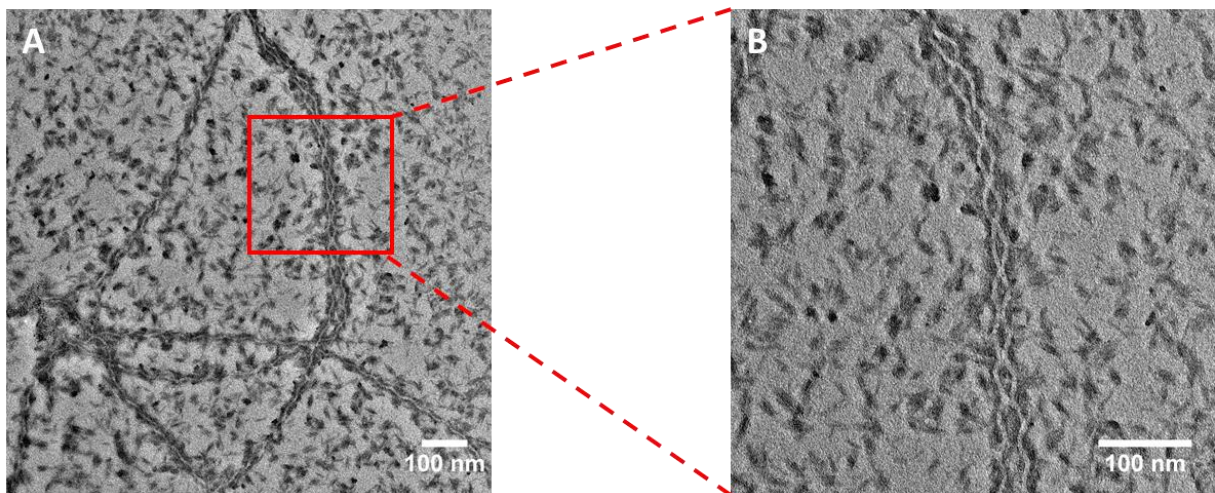
**Abb. 73:** Fluoreszenzspektroskopische Messungen von Gelator **53** + Metallionen ( $Al^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Pd^{2+}$ ,  $Y^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ). Die Messungen erfolgten bei einer Konzentration von  $100 \mu M$  **53**, von den Metallionen wurde jeweils 1 Äq. (orange) oder 3 Äq. hinzugegeben. Die Emission wurde auf  $100 \mu M$  **53** normiert.

Bei dem Screening der Kationen wurde festgestellt, dass von den untersuchten Ionen nur  $Cu^{2+}$ - und  $Pd^{2+}$ -Ionen zu einem *Quenching* der Fluoreszenz führt. Dabei ist dieser Effekt für  $Cu^{2+}$ -Ionen unabhängig von den eingesetzten Äquivalenten.  $Pd^{2+}$  scheint die Emission konzentrationsabhängig zu inhibieren, wobei weiterführende Messungen notwendig wären, da anhand der Messung nicht sicher gesagt werden kann, ob bei 3 Äq. eine maximale Löschung der Emission erreicht wird.

Auf der anderen Seite führt eine Vielzahl an Ionen ( $Al^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Y^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ) zu einer Verstärkung der Emission. Dabei wiesen  $Ca^{2+}$ -,  $Fe^{3+}$ - und  $Hg^{2+}$ -Ionen den stärksten Effekt auf.

Daher wurde versucht, in Gegenwart dieser Ionen ein potentes Gel zubilden. Interessanterweise waren die Versuche, ein Gel in Gegenwart von  $Ca^{2+}$ - und  $Hg^{2+}$ -Ionen zu bilden, vergeblich. Lediglich Zusatz von 1 Äq.  $Fe^{3+}$ -Ionen führte zur Bildung eines Gels. Dabei sei zu erwähnen, dass das so gebildete Gel eine kritische Gelierungskonzentration von 1 mM aufweist, was eine 2,5-fach geringere Konzentration darstellt als für den Gelator **53** allein.

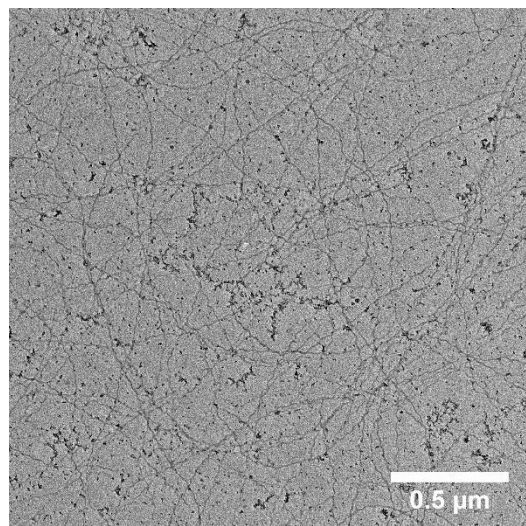
Um festzustellen, weshalb sich die Gelierungseigenschaften und die Emission nach Zugabe von  $Fe^{3+}$ -Ionen änderten, wurde zunächst die Morphologie mittel TEM analysiert (Abb. 74).



**Abb. 74:** Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) von A) 50  $\mu\text{M}$  Gelator **53** + 3  $\text{\AA}$ q.  $\text{Fe}^{3+}$  (mit staining) und B) vergrößerte Darstellung.

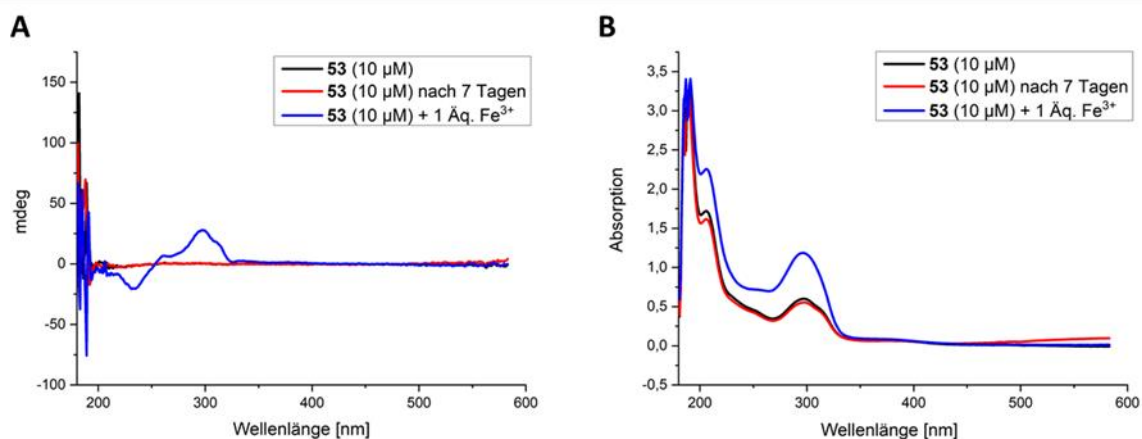
Interessanterweise wurde festgestellt, dass Verbindung **53** in Gegenwart von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen gewundene Strukturen ausbildet, die eine starke Ähnlichkeit zu helikalen Strukturen aufweisen. Die einzelnen Stränge weisen dabei eine Breite von 4-5 nm auf und sind in der Lage, partiell einen Doppelstrang zu bilden (Abb. 74B).

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen in den Strukturen eingelagert sein müssen, da TEM-Messungen ohne *Staining* (mit Uranylacetat) ebenfalls Strukturen zeigten (Abb. 75). Dies ist für gewöhnlich nur möglich, wenn Elemente mit höheren Ordnungszahlen präsent sind, da der Elektronenstreuung bei TEM-Messungen mit zunehmender Ordnungszahl der vorliegenden Elemente stärker mit der Probe wechselwirkt. So nimmt dieser Effekt mit dem Quadrat der Ordnungszahl zu.<sup>[209]</sup>



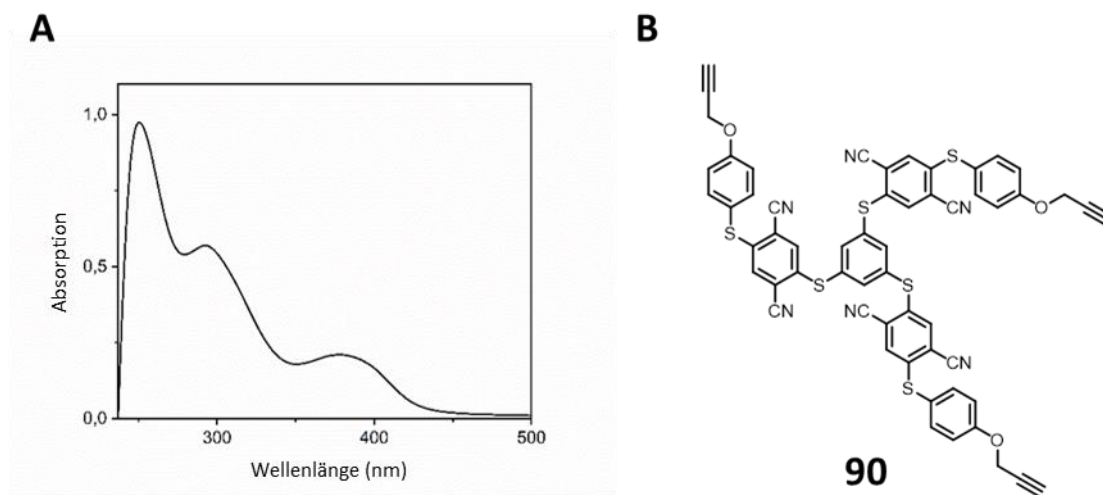
**Abb. 75:** Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) von 50  $\mu\text{M}$  Gelator **53** + 1  $\text{\AA}$ q.  $\text{Fe}^{3+}$  (ohne staining)

Um zu überprüfen, ob die im TEM beobachteten Strukturen helikaler Natur sind, wurden anschließend Messungen zur Bestimmung des Circular dichroismus (CD) der Verbindungen **53** durchgeführt. Dazu wurde Verbindung **53** sowohl direkt nach Ansetzen der Probe, sowie nach 7 Tagen als auch nach Zugabe von 1  $\text{\AA}$ q.  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen gemessen (Abb. 76).



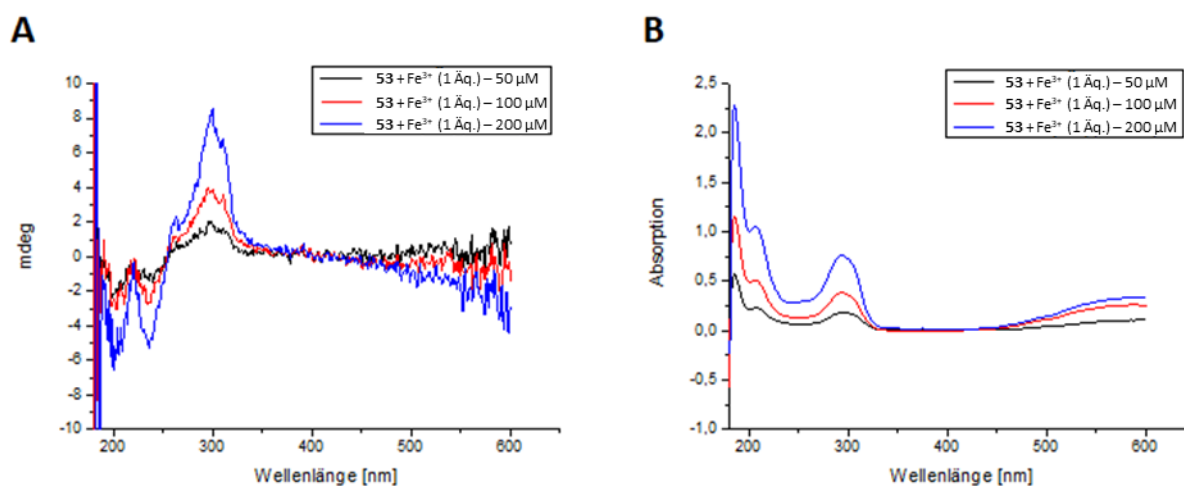
**Abb. 76:** A) CD-Spektren von **53** bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  (direkt nach Ansetzen der Probe), nach 7 Tagen und nach Zugabe von 1  $\text{\AA}q.$   $\text{Fe}^{3+}$ . B) Das zugehörige Absorptionsspektren.

Die CD-Messungen zeigten, dass Verbindung **53** für sich keine Cotton Effekte aufweist, weder nach sofortigem Ansetzen noch nach 7 Tagen. Dies weist auf ein ungeordnetes System mit vielen Freiheitsgraden hin. Nach Zugabe 1  $\text{\AA}q.$   $\text{Fe}^{3+}$  wurde hingegen ein negativer Cotton Effekt bei 231 nm und ein positiver Cotton Effekt bei 297 nm beobachtet. Die GCP-Chromophore (Pyrrol-Ringe) zeigen das Verhalten einer *bisignige CD cotton curve* mit einer positiven ersten (317 nm) und einer positiven zweiten Bande (276 nm; Abb. 76). Ein solches *Couplet* wird als positives *Couplet* definiert und ist ein Indikator für Exzitonenkopplung (sog. ECCD). Dieser Effekt steigt an, wenn ein Molekül zwei oder mehr Chromophore enthält, die in einer chiralen Umgebung durch den Raum miteinander interagieren.<sup>[210]</sup>



**Abb. 77:** A) Absorptionsspektrum von Verbindung **90** ( $\lambda_{\text{abs.}} = 250, 293, 378 \text{ nm}$ ). B) Chemische Struktur des AIE-Kerns **90**.

Um sicher zu stellen, dass bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  alle relevanten Signale sichtbar sind, wurden die Messungen bei verschiedenen Konzentrationen (50, 100 und 200  $\mu\text{M}$ ) wiederholt (Abb. 78).



**Abb. 78:** A) CD-Spektren von **53** bei verschiedenen Konzentrationen (50, 100 und 200 μM) und B) zugehörige Absorptionsspektren.

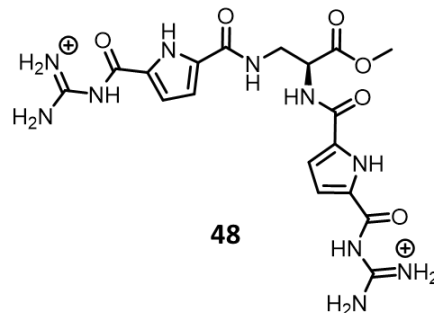
Die konzentrationsabhängigen CD-Messungen zeigten, dass mit steigender Konzentration neue Signale erscheinen (Abb. 78A). Dies liegt vermutlich daran, dass bei einer Konzentration von 10 μM sich die Strukturen, die bei 50 μM im TEM (Abb. 74) beobachtet wurden, noch nicht ausbilden. So ist in Abb. 78A zu erkennen, dass ab einer Konzentration von 100 μM neue Signale entstehen, die auf ein geordnetes System hindeuten. So sind alle Signale im Absorptionsspektrum einem Signal im CD-Spektrum zuzuordnen mit negativen Cotton-Effekten bei 200 nm, 236 nm und 598 nm sowie mit einem positiven Cotton-Effekt bei 300 nm. Somit steht das CD-Spektrum für **53**+Fe<sup>3+</sup> in guter Übereinstimmung mit den TEM Messungen, dabei können diese Messungen als Indiz für helikale Strukturen herangezogen werden, sind allerdings kein finaler Beweis.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch die Einführung einer weiteren Valenz eine Quervernetzung der übergeordneten Strukturen bereits ohne eine zweite Komponente stattfindet, wodurch **53** ausschließlich als Hydrogelator fungiert. Zusätzlich wurde festgestellt, dass der Hydrogelator **53** ebenfalls auf eine Vielzahl von Metallionen reagiert und in der Präsenz von Fe<sup>3+</sup>-Ionen eine drastische morphologische Änderung wiederfährt. Diese morphologische Änderung resultiert in einem Gel mit einer 2,5-fach geringeren kritischen Gelierungskonzentration, welches mit einem Emissionsanstieg einhergeht. CD-Messungen lassen vermuten, dass helike Strukturen gebildet werden. Im Rahmen dieser Dissertation war es aus zeitlichem Mangel nicht möglich, weitere Untersuchungen durchzuführen. So würde ein Höhenprofil durch AFM-Messungen weitere aufschlussreiche Erkenntnisse liefern, die für oder gegen die Hypothese von helikalen Strukturen sprechen könnten. Des Weiteren müsste für eine komplette Charakterisierung des erhaltenen Geles weiterführende rheologische Studien durchgeführt werden. Ebenso wäre es interessant zu untersuchen, welchen Einfluss die Einführung einer weiteren Valenz auf das System hätte, da bereits eine Steigerung von zwei auf drei Valenzen einen drastischen Einfluss auf das Gelierungsverhalten aufweist.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Entwicklung eines Inhibitors für die krebsrelevante Survivin-Histon H3-Interaktion

In diesem Projekt konnte auf Grundlage einer fokussierten Bibliothek, gekoppelt mit molekularen *Docking*-Studien, ein wirksamer Ligand **48** identifiziert werden, der das krebsrelevante Protein Survivin adressiert und dabei die Protein-Protein-Interaktion mit Histon H3 inhibiert (**Abb. 79**). Dieses Verfahren ermöglichte die Vorhersage, dass Ligand **48** an dem anionischen *Hot Spot* der Histon H3-Bindungsstelle von Survivin bindet, was gezielte Studien der PPI zwischen Survivin und Histon 3 ermöglichte.



**Abb. 79:** Chemische Struktur des supramolekularen Inhibitors **48** für die Survivin/Histon H3-Interaktion.

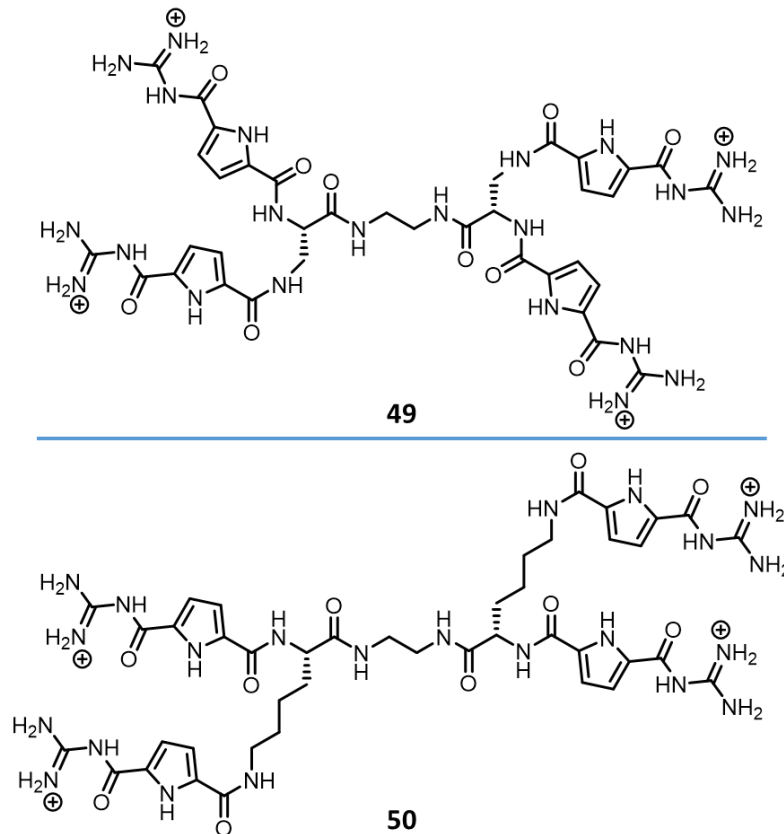
Die Bindungseigenschaften zu dem Protein Survivin wurden mittels ITC-Messungen und NMR-Titration untersucht und zeigten, dass **48** selektiv an die Histon H3-Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich bindet. Co-Immunpräzipitationsexperimente und *Proximity Ligation Assays* bestätigten, dass die Survivin/Histon H3-Interaktion inhibiert wird. Da Survivin in die Proliferation von Zellen involviert ist, wiesen mit Ligand **48** behandelte Zellen mitotische Defekte auf. Ebenfalls wurde beobachtet, dass in Proliferationsstudien mit Krebszelllinien **48** in der Lage ist, die Zellmortalität der Zellen zu erhöhen. Ebenso konnte mit einem *Rescue assay* gezeigt werden, dass dieser Effekt spezifisch auf das Protein Survivin zurückzuführen ist.

Da der Ansatz, PPI zu modulieren, hoch spezifisch ist und nicht darauf basiert, die Expression des gesamten Proteins zu reduzieren, ist die Wahrscheinlichkeit für ungewünschte Nebenwirkungen geringer, was attraktiv für die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist.<sup>[211]</sup> Da dieses Feld noch sehr jung, ist trägt dieses Projekt dazu bei, zu verstehen wie neue pharmazeutisch aktive Substanzen entwickelt werden können, die gezielt in PPI eingreifen, um diese wiederum zu modellieren.

Um eine Verbindung zu erhalten, die von klinischer Relevanz ist, sollte die Interaktion von Ligand **48** zu anderen Proteinen untersucht werden und gegebenenfalls die Selektivität sowie die Affinität der Verbindung durch Abwandlung der Ligandenstruktur erhöht werden.

## 5.2 Unterscheidung zwischen der NES- und Histon-H3-Bindungsstelle von Survivin durch Modifikationen eines hemmenden Guanidiniocarbonylpyrrol-Liganden

Basierend auf den Ergebnissen zu Ligand **48** wurden weitere Liganden (**49** und **50**) mit vier GCP-Gruppen synthetisiert (Abb. 80). Diese wurden durch *Docking*-Studien und weitere MD-Simulationen als vielversprechende Kandidaten für eine selektive Adressierung der Histon H3-Bindungsstelle oder des NES identifiziert.



**Abb. 80:** Chemische Struktur des supramolekularen Inhibitors (**49**) für die Survivin/Crm1-Interaktion und des Inhibitors (**50**) für die Survivin/Histon-H3-Interaktion.

Die Berechnungen postulierten, dass **50** bevorzugt die Histon H3-Bindungsstelle adressiert und **49** bevorzugt an das NES bindet. Die Bindung der Liganden an Survivin wurde durch ITC-Messungen bestätigt und zeigte  $K_d$ -Werte im nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich und stimmte gut mit den Werten aus den Simulationen überein. Die Fähigkeit der Liganden, zwischen der Histon H3- und der Crm1-Bindungsstelle zu unterscheiden, welche zu einer selektiven Hemmung von nur einer PPI führt, konnte mittels *Proximity-Ligations-Assay* (PLA) gezeigt werden. Mit einem Biosensor-Assay konnte nachgewiesen werden, dass **49** als erster bekannter Ligand in der Lage war, die nukleare Exportaktivität von Survivin zu reduzieren. Da sowohl **49** als auch **50** in der Lage sind, jeweils eine krebisrelevante PPI von Survivin zu hemmen, wurde eine reduzierte Zellproliferation in mehreren verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen.

Zusammengenommen scheint die gezielte Adressierung der anionischen *Hot Spots* von Survivin mit GCP-Liganden ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung neuer Krebstherapien zu sein. Im



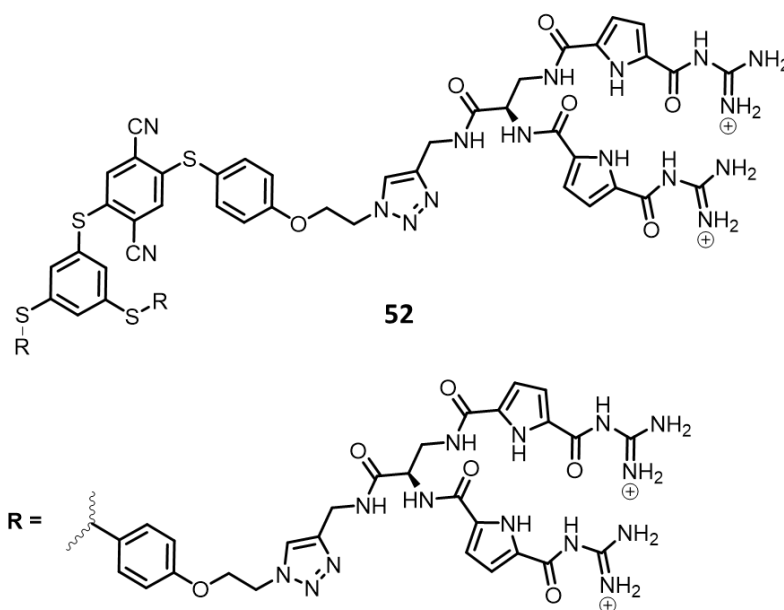


und pH-Änderungen reagiert und sich so zwischen Sol und Gel schalten lässt. Dies macht es zum ersten Zwei-Komponenten-Hydrogel, das AIE-aktiv und *multi responsive* ist und in die Klasse der Supergelatoren eingeordnet werden kann.

Mit diesem reaktionsfähigen Hydrogel kann in Zukunft auf Anwendungen im Bereich *sensing applications* abgezielt werden, wo die Reizantwort durch pH-Änderungen einen direkten Einfluss auf die Stabilität des gebildeten Gels haben könnte.

## 5.4 Entwicklung eines C<sub>3</sub>-symmetrischen lumineszenten Hydrogelators

Basierend auf Verbindung **51** wurde ein dreiarmer Hydrogelator **53** entwickelt, der auch ohne *Crosslinker* in der Lage ist, netzwerkartige Strukturen auszubilden, die es vermögen, Wasser einzukapseln und so ein potentes lumineszierendes Hydrogel zu formen (Abb. 82). Interessanterweise findet in Gegenwart von Fe<sup>3+</sup>-Ionen eine Transformation der Morphologie von netzwerkartigen zu helikalen Strukturen statt, wodurch die kritische Gelierungskonzentration um den Faktor 2,5 reduziert werden konnte.



**Abb. 82:** Chemische Struktur des dreiarmligen supramolekularen Gelators **53**.

Durch den modifizierten Aufbau des AIE-Hydrogelators **53** konnten zusätzliche attraktive nicht-kovalente Wechselwirkungen in das System eingeführt werden, was dazu führte, dass **53** bereits bei einer Konzentration von 2,5 mM ein lumineszentes Hydrogel bildet. Die geringe Gelierungskonzentration ist dabei auf ein stark vernetztes dreidimensionales Netzwerk aus einzelnen Fasern zurückzuführen, die durch TEM-Aufnahmen visualisiert wurden. Da Verbindung **53** eine Vielzahl an Koordinationsstellen aufweist, konnte in Gegenwart von Metallionen eine Erhöhung (Fe<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Al<sup>3+</sup>) der Emission oder ein *Quenching* (Cu<sup>2+</sup> und Pd<sup>2+</sup>) dieser beobachtet werden. Interessanterweise wurde durch die Präsenz der Fe<sup>3+</sup>-Ionen die kritische Gelierungskonzentration von **53** (2,5 mM) auf 1 mM gesenkt. Dieser Effekt konnte auf strukturelle Änderungen auf

makroskopischer Ebene zurückgeführt werden, da TEM Messungen zeigen konnten, dass sich gewundene Strukturen bildeten, wie sie auch bei helikalen Systemen beobachtet werden können. Gestützt wird dies dadurch, dass Verbindung **53** keine CD-Signale aufweist, wohingegen in Gegenwart von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen über das gesamte Absorptionsspektrum der Verbindung **53** Signale gemessen wurden.

Um das Projekt abzuschließen, sollten noch einige weitere Untersuchungen veranlasst werden. Zum einen sollten zusätzliche AFM Messungen durchgeführt werden, um das Höhenprofil der Strukturen zu erfassen, da diese für helikale Strukturen bestimmte Charakteristika aufweisen. Außerdem wäre zu erwarten, dass die strukturellen Änderungen auch Auswirkungen auf das Fließverhalten des resultierenden Gels haben könnten, weshalb rheologische Messungen als sinnvoll zu erachten sind.

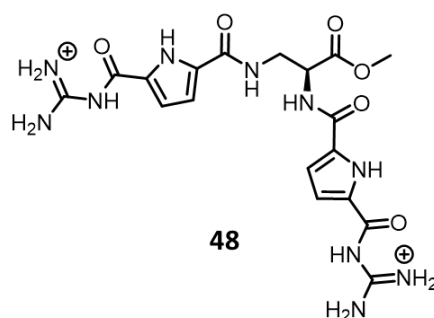
Durch diesen neuartigen Hydrogelator soll ein besseres Verständnis gewonnen werden, wie sich makroskopische Strukturen auf die Gelierungseffizienz auswirken und wie diese beeinflusst werden können, um die funktionellen Eigenschaften des resultierenden Gels zu modifizieren.

Darüber hinaus wäre es interessant, ein System mit mehr Valenzen zu entwickeln, da hierdurch Gele synthetisiert werden könnten, die noch geringere kritische Gelierungskonzentrationen aufweisen, wodurch sich letztendlich eine neue Klasse Supergelatoren ergeben könnte.

## 6 Summary and outlook

### 6.1 Development of an inhibitor for the cancer-relevant survivin-histone H3 interaction

In this project, based on a focused library coupled with molecular docking studies, a potent ligand **48** was identified that targets the cancer-related protein survivin, inhibiting the protein-protein interaction with histone H3 (Fig. 83). This approach allowed the prediction that ligand **48** binds to the anionic hot spot of the histone H3 binding site of survivin, which enabled targeted studies of the PPI between survivin and histone 3.



**Fig. 83:** Chemical structure of supramolecular inhibitor **48** for survivin/histone H3 interaction.

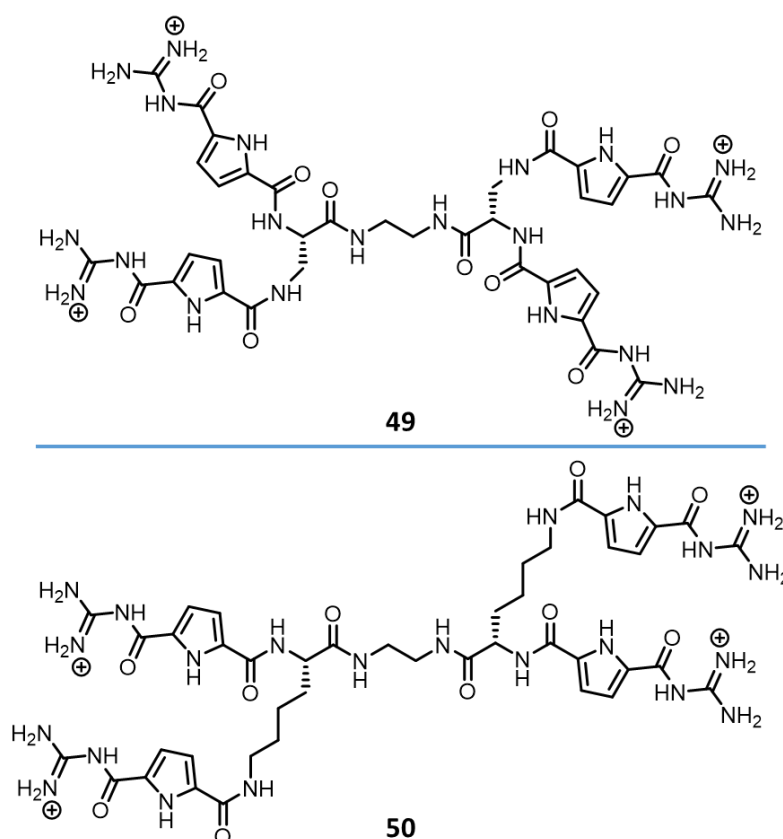
The binding properties to the protein survivin were investigated by ITC measurements and NMR titration and showed that **48** binds selectively to the histone H3 binding site with a dissociation constant in the micromolar range. Co-immunoprecipitation experiments and proximity ligation assays showed that the survivin/histone H3 interaction is inhibited. Since survivin is involved in cell proliferation, cells treated with ligand **48** showed mitotic defects. It was also observed that in proliferation studies with cancer cell lines, **48** is able to increase cell mortality of the cells. Furthermore, it could be shown with a rescue assay that this effect is specifically due to the protein survivin.

Since the approach to modulate PPI is highly specific and not based on reducing the expression of the entire protein, the likelihood of unwanted side effects is lower, which is attractive for new drug development.<sup>[211]</sup> As this field is still very young, this project contributes to understanding how new pharmaceutically active compounds can be developed that target PPIs in order to model them in turn.

In order to obtain a compound of clinical relevance, the interaction of ligand **48** with other proteins should be investigated and, if necessary, the selectivity and affinity of the compound should be increased by modifying the ligand structure.

## 6.2 Differentiation between the NES and histone H3 binding sites of survivin by modifications of an inhibitory guanidiniocarbonyl-pyrrole ligand

Based on the results on ligand **48**, further ligands (**49** and **50**) with four GCP groups were synthesised (Fig. 84). These were identified by docking studies and further MD simulations as promising candidates for selectively addressing the histone H3 binding site or the NES.



**Fig. 84:** Chemical structure of the supramolecular inhibitor **49** for the survivin/Crm1 interaction and the inhibitor **50** for the survivin/histone H3 interaction.

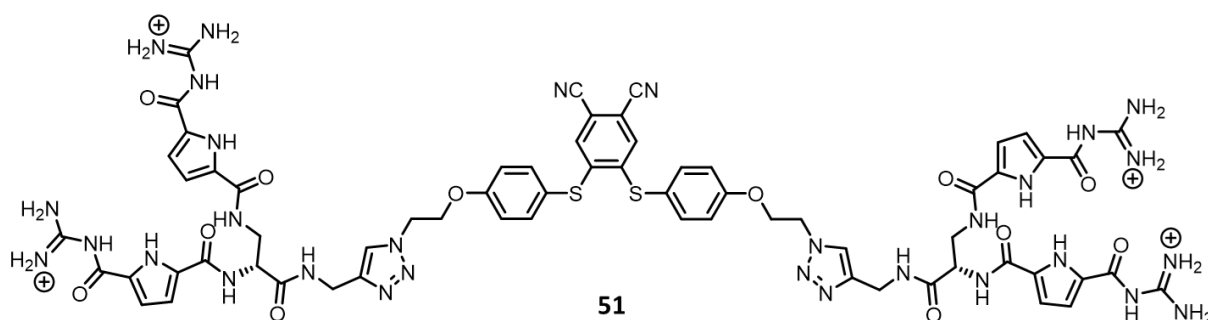
The calculations postulated that **50** preferentially addresses the histone H3 binding site and **49** preferentially binds to the NES. The binding of the ligands to survivin was confirmed by ITC measurements and showed  $K_d$  values in the nanomolar to low micromolar range and agreed well with the values from the simulations. The ability of the ligands to discriminate between the histone H3 and Crm1 binding sites, resulting in selective inhibition of only one PPI, was demonstrated by proximity ligation assay (PLA). Using a biosensor assay, it was demonstrated that **49** was the first known ligand capable of reducing the nuclear export activity of survivin. Since both **49** and **50** are each able to inhibit a cancer-relevant PPI of survivin, reduced cell proliferation was demonstrated in several different cancer cell lines.

Taken together, targeting the anionic hot spots of survivin with GCP ligands appears to be a promising approach for the development of new cancer therapies. In contrast to other strategies, the supramolecular ligands interfere with cancer-relevant protein-protein interactions of survivin rather than down-regulating its expression or inducing a survivin-targeted immune response.<sup>[123,212]</sup>

Future studies should aim to cover more extensively the range of anionic hot spots addressed by ligands **49** and **50**, thereby improving both the binding affinity and inhibitory potential of the ligands.

### 6.3 A stimuli-responsive supramolecular two-component hydrogelator with AIE effect

In this project a novel hydrogelator **51** consisting of an AIE core and four cationic GCP groups (Fig. 85) was successfully produced. The hydrogelator **51** is not capable of forming a stable gel on its own but it does form individual cationic fibres. Since the GCP groups are excellent for complexing carboxylates, the addition of 2 equivalents malonic acid (**52**) resulted in cross-linking of the fibres leading to the formation of a highly emissive hydrogel.



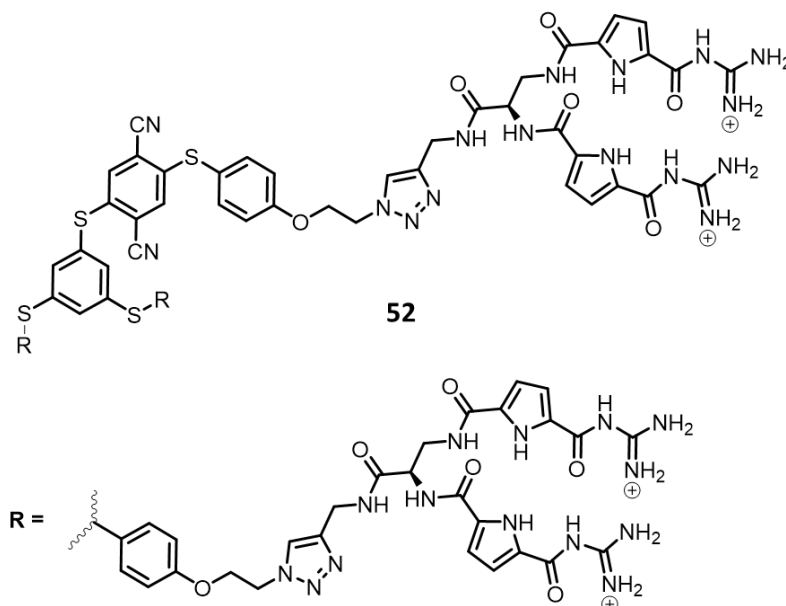
**Fig. 85:** Chemical structure of the two-armed supramolecular gelator **51**.

This system consists of two independent components which resulted in a highly dynamic hydrogel with a critical gelation concentration of 100  $\mu\text{M}$  and could be determined via inverted vial tests. This means that only 0.02 wt% is needed to form a stable hydrogel, making compound **51** a highly efficient gelator that must be classified as a supergelator.<sup>[201]</sup> To date, only a few examples have been described in the literature that can be classified in this category and also respond to various stimuli. Most of them are gelators in organic solvents.<sup>[203]</sup> The reason for the occurrence of gelation is an orchestration of several non-covalent interactions, such as the recognition of carboxylic acids (malonic acid in this case) by the GCP units, which leads to the formation of fibre bundles that end in efficient cross-linking. This was observed by AFM and TEM measurements, as well as NMR titrations and FT-IR measurements. The cross-linking led to a decrease in the mobility of the AIE-active core compound, which resulted in strong emission and is classical for aggregation-induced emission processes. This was demonstrated by fluorescence and DLS measurements, which are in good agreement with the rest of the measurements. The flow behaviour of the gel was determined by rheological measurements and showed characteristics of a weak gel. It was also found that the gel responds to many different stimuli, such as mechanical stress and pH changes, and can thus be switched between sol and gel. This makes it the first two-component hydrogel that is AIE-active and multi-responsive and can be classified as a supergelator.

This reactive hydrogel can be used in the future to target applications in the field of sensing applications, where the stimulus response through pH changes could have a direct influence on the stability of the gel formed.

## 6.4 Development of a C3-symmetric luminescent hydrogelator

In this project, a three-armed hydrogelator **53** was prepared that is able to form network-like structures even without crosslinkers, which are able to encapsulate water and thus form a potent luminescent hydrogel (Fig. 86). Interestingly, in the presence of  $\text{Fe}^{3+}$  ions, a transformation of the morphology from network-like to helical structures takes place, whereby the critical gelation concentration could be reduced by a factor of 2.5.



**Fig. 86:** Chemical structure of the three-armed supramolecular gelator **53**.

By modifying the structure of the AIE hydrogelator **53**, additional attractive non-covalent interactions could be introduced into the system, resulting in **53** forming a luminescent hydrogel already at a concentration of 5 mM. The low gelation concentration here is due to a highly interconnected three-dimensional network of individual fibres, which were visualised by TEM images. Since compound **53** has a large number of coordination sites, an increase ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$ ) in emission or quenching ( $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pd}^{2+}$ ) of these could be observed in the presence of metal ions. Interestingly, the presence of  $\text{Fe}^{3+}$  ions lowered the critical gelation concentration from **53** (2.5 mM) to 1 mM. This effect could be attributed to structural changes at the macroscopic level, as TEM measurements could show that sinuous structures formed, as can also be observed in helical systems. This is supported by the fact that compound **53** does not show any CD signals, whereas in the presence of  $\text{Fe}^{3+}$  ions signals were measured over the entire absorption spectrum of compound **53**.

In order to complete the project, some further investigations should be initiated. On the one hand, additional AFM measurements should be carried out in order to record the height profile of the structures, as these exhibit certain characteristics for helical structures. Furthermore, it would be expected that the structural changes could also have an impact on the flow behaviour of the resulting gel, which is why rheological measurements should be considered useful.

This novel hydrogelator will provide a better understanding of how macroscopic structures affect gelation efficiency and how these can be influenced to modify the functional properties of the resulting gel.

Furthermore, it would be interesting to develop a system with more valences, as this would allow the synthesis of gels with even lower critical gelation concentrations, which could eventually lead to a new class of supergelators.



## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeine Anmerkungen

Die verwendeten Lösungsmittel wurden wie erworben eingesetzt, falls nötig wurden diese nach Standardverfahren gereinigt und bei Bedarf getrocknet. Kommerziell erhältliche Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, Acros Organics, Alfa Aesar, Fluorochem, IRIS, Merck, Sigma Aldrich und VWR bezogen. Für die Messungen wurde Wasser mit dem Reinstwassersystem TKAMicroPure gereinigt.

Für Synthesen, die unter Schutzgasatmosphäre stattfinden müssen, wurde Argon (99,996%) der Firma AirLiquide verwendet, welches über Silicagel Orange getrocknet wurde.

### 7.2 Methoden und Geräte

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

500- und 300-MHz-NMR-Spektren in CDCl<sub>3</sub> und d<sub>6</sub>-DMSO wurden mit DRX 500 und DMX300 von Brukerat 298 K aufgenommen. Die Spektren wurden mit Restpeaks der deuterierten Lösungsmittel als interner Standard kalibriert: DMSO-d<sub>6</sub> ( $\delta$  [1H] = 2,50 ppm), CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  [1H] = 7,26 ppm). Die chemischen Verschiebungen werden als  $\delta$  Werte in ppm angegeben. Kopplungskonstanten werden in Hz angegeben. Für die Signalmultiplizität werden die folgenden Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br. = breit.

#### **Massenspektrometrie**

Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Proben wurde an einem amaZon SL (ESI) oder maXis 4G (ESI) der Firma Bruker analysiert. Anhand der Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) erfolgte die Beschreibung der Spektren.

#### **Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)**

Die IR-Spektren wurden mit einem Varian 3100 FT-IR-Spektroskop der Firma Varian aufgenommen. Die Verbindung wurde als Feststoff mit einem MIRacle (Diamant/Zinkselenit) ATR-Aufsatz der Firma Pike analysiert. Die Spektren werden anhand der Signalverschiebung in Wellenzahlen (cm<sup>-1</sup>) beschrieben und werden weitergehend definiert über die Intensitäten der Signale mit s (stark), m (mittel) und w (schwach).

#### **UV/Vis-Spektroskopie**

Aufnahmen der UV/Vis-Spektren erfolgten mit dem Gerät V-660 der Firma Jasco. Für die Messungen wurden Quarzküvetten unterschiedlicher Schichtdicke der Firma Hellma verwendet. Die Hintergrundabsorption der Küvetten wurde vor den Messungen bestimmt und die erhaltenen Ergebnisse korrigiert.

#### **CD-Spektroskopie**

Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie erfolgte an einem Spectropolarimeter J-810 der Firma Jasco. Für die Messungen wurden Quarzküvetten unterschiedlicher Schichtdicke der Firma Hellma verwendet. Um die Hintergrundabsorption der Küvette zu korrigieren, wurde im Vorfeld eine Messung ohne Verbindung durchgeführt.

### **Fluoreszenzspektroskopie**

Die Fluoreszenzspektren wurden mit dem Spectrofluorometer FP-6500 von JASCO aufgenommen. Die Quarzküvetten stammten von der Firma Hellma. Alle Lösungsmittel waren spektrometrischer Qualität und wurden von ACROS bezogen.

### **Schmelzpunkte**

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Büchi-Schmelzpunkt-B-540-Apparatur mit oben offenen Glaskapillarröhren ermittelt. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

### **Analytische HPLC**

Die Analyse der Verbindungen wurde mit einer HPLC-Apparatur von *Dionex* durchgeführt, die folgende Komponenten enthielt: P680 HPLC-Pumpe, ASI-100 automatischer Probeninjektor und UVD 340U-Detektor. Es wurde die YMC ODS-ARP18-Säule mit sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser von 5 µm und einer Porengröße von 12 nm genutzt. Für die Elution wurde Reinstwasser und kommerziell erhältliches HPLC Lösungsmittel verwendet.

### **Preparative MPLC**

Die Reinigung der Verbindungen erfolgte u.a. mit präparativer Umkehrphasen-MPLC über ein Flüssigchromatographie-Flash-Gerät von *Armen Instrument*. Die Glassäulen wurden mit YMC-Gel ODS-A RP18 Silica mit einer Porengröße von 12 nm und einem Durchmesser von 5 µm gepackt. Als Elutionsmittel wurde Reinstwasser und Lösungsmittel mit HPLC-Qualität verwendet. Ein UV-Detektor diente zum Nachweis der Produkte.

### **Preparative HPLC**

Geringe Mengen an Substanz wurden über ein präparatives HPLC-Gerät von MerckSepTech, bestehend aus einer dynamischen Mischkammer von Knauer und einem UV-Detektor SPD-10A von Shimadzu, gereinigt. Die YMC ODS-A RP18-Säule (15 cm × 3,0 cm, 5 µm) wurde verwendet und die Bedingungen wurden mittels analytischer HPLC auf der entsprechenden YMC-Säule optimiert.

### **Lyophilisation**

Die Gefriertrocknung von wässrigen Lösungen oder feuchten Feststoffen wurde mit einem Alpha 1-4 LD plus Trocknungsapparat von Christ durchgeführt.

### **pH-Messungen**

Die pH-Wert der Probenlösungen wurden mit dem pH-Meter 766 Calimatic von Knick eingestellt.

### **Isothermale Titrationskalometrie (ITC)**

Die ITC-Messungen wurden mit dem MicroCal iTC200-System von GE Healthcare Life Sciences durchgeführt. Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit der Origin-Software. Verwendete Lösungsmittel entsprechen analytischer Qualität von der Firma ACROS.

### **Dynamische Lichtstreuung (DLS)**

Alle Messungen wurden bei 25° C in UV-durchlässigen und mit Stopfen versehenen Mikroküvetten (1 cm) durchgeführt. Für die Messungen wurde ausschließlich Reinstwasser verwendet. Der pH-Wert wurde mit 0,1 und 0,01 M NaOH- oder HCl-Lösung entsprechend eingestellt. Die Auswertung der

Messungen erfolgte mit der Malvern Zetasizer Software 7.12. Dargestellt wurde der hydrodynamische Durchmesser (Z-Mittelwert), die Polydispersität und die Größenverteilung.

### **Rasterkraftmikroskop (AFM)**

Rasterkraftmikroskopische Analysen wurden mit einem Innova Raster-Kraft-Mikroskop und einem InnovaNanoDrive AFM-Kontroller der Firma Veeco/Bruker im Semikontakt-Modus durchgeführt. Es wurden n-dotierte Silizium-Cantilever des Typs OMCL-AC160TS-R3 von Olympus als Messnadeln eingesetzt. Zur Aufbringung der Proben wurden Mica-Oberflächen (V1-2,  $\varnothing$  9.9 mm, Höhe 0.1 mm) der Firma Plano verwendet, bei diesen wurde vor jeder Messung die oberste Schicht frisch abgespalten. Die Auftragung der Substanzen erfolgte durch Rotationsbeschichtung (*spin-coating*) oder Auftropfen (*drop casting*). Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm Gwyddion 2.42.

### **Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM)**

Die TEM-Messungen wurden am Interdisciplinary Center for Analytics on the Nanoscale in Duisburg durchgeführt. Gemessen wurde am JEM-2200FS der Firma JEOL mit 200 KV Beschleunigungsspannung und einer ZrO/W (100) Schottky Kathode. Die Analyse der Messdaten erfolgte mit der Software ImageJ 1.48v von Wayne Rasband.

### **Rheologie**

Die Bestimmung des Fließverhaltens der Gele wurde mit dem Rheometer Physica MCR 301 der Firma Anton Paar in der Messgeometrie Platte (Messplatte 15 mm (PP15)) durchgeführt. Der Abstand der Platten betrug 1 mm und die Temperatur 25 °C.

### **Protein NMR-Spektroskopie**

Die NMR-Experimente wurden bei 25°C auf einem 700 MHz Avance-Ultraschall-NMR-Spektrometer von Bruker (Bruker, Deutschland) aufgezeichnet, das mit einer 5 mm TCI  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$ -Kryosonde mit z-Gradienten ausgestattet war. Die  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -BEST-TROSY-Pulssequenz ist Teil der NMRLib 2.0-Pulssequenz-Tools von IBS (Grenoble, Frankreich; <http://www.ibs.fr/research/scientific-output/software/pulse-sequence-tools/>). Die Spektren wurden mit Topspin 3.5 bearbeitet und in CARA analysiert. Die Zuordnungen von Survivin (1-120) wurden aus der BMRB-Datenbank (BMRB # 6342) bezogen.

Die NMR-Proben wurden im NMR-Puffer (50 mM  $\text{KPi}$  pH 6,5, 90 mM KCl, 2 mM DTT), der 10%  $\text{D}_2\text{O}$  enthält, mit einer Proteinkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  hergestellt. Eine 10 mM Stammlösung der Verbindung in  $\text{DMSO-d}_6$  wurde schrittweise hinzugefügt, was eine endgültige Ligandenkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  in Gegenwart von höchstens 4%  $\text{DMSO-d}_6$  ergab. Für jeden Titrationsschritt wurden  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -BEST-TROSY-Spektren aufgezeichnet. Um eine leichte Verschiebung der Signale aufgrund der Anwesenheit von  $\text{DMSO}$  zu berücksichtigen, wurde eine Kontrolltitration mit den entsprechenden Volumina von  $\text{DMSO-d}_6$  ohne Ligand durchgeführt.

## 7.3 Biologische Methoden und Geräte

Die molekulare Zeldarstellung wurde von Dr. Cecilia Vallet in der Gruppe von Prof. Dr. Shirley Knauer, Institut für Molekularbiologie II, Universität Duisburg-Essen, durchgeführt.

### Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärennten eukaryotischen Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) kultiviert und mit 10% FCS und 1% Antibiotikum Antimykotikum (Life Technologies) bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% relativer Luftfeuchtigkeit ergänzt. Sie wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:20 passiviert, um die Zelldichte zu regulieren und die Zellen mit frischem Wachstumsmedium zu versorgen. Dazu wurde Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 mL DPBS gespült. Danach wurden die Zellen mit 2 mL TrypLE Express (Life Technologies) versetzt, um eine enzymatische Ablösung aus dem Zellkulturkolben zu ermöglichen. Die Zellen wurden auf einer Heizplatte inkubiert, bis sich alle Zellen gelöst hatten und 8 mL neues Wachstumsmedium hinzugefügt wurden. Dann wurden 0,5 mL der Zellsuspension zusammen mit 9,5 mL frischem gewachsenem Medium in einen neuen Kulturkolben gegeben.

### Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation wurde mit den *μMACS isolation kits* (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Eukaryotische Zellen wurden transient mit einem Plasmid transfiziert, das für das HA-gekennzeichnete Survivin kodiert ist. 24 h nach der Transfektion wurden Zelllysate durch chemische Lyse der Zellen mit Lysepuffer, der Natriumdesoxycholat und NP40 enthielt, erzeugt. Die Zellen wurden zunächst mit einem Zellschaber aus der 6 cm Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann bei 500 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und mit PBS gewaschen, bevor sie in 300 μL Lysepuffer resuspendiert wurde. Nachdem die Zellen 30 min auf Eis inkubiert worden waren, wurden sie zweimal mit einem Sonopuls mini20 Ultraschall-Homogenisator für 10 s und einer Amplitude von 90% beschallt. Nach Zentrifugation bei 20.000 x g für 20 min bei 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Vor der Zugabe von 50 μL *Tag antibody-coupled magnetic beads* zu den Lysaten, wurden Eingangspuren entnommen. Die Lysate wurden mit den *Beads* für 1 h auf Eis inkubiert und dann auf eine μ-Säule übertragen, die in einen μMACS-Separator gestellt und mit 200 μL Interaktionspuffer äquilibriert wurde. Die Säule wurde viermal mit 200 μL Lysepuffer und einmal mit 100 μL Waschpuffer 2 aus dem Kit gewaschen. Die Elution wurde durch Zugabe von 20 μL vorgewärmtem (95 °C) Elutionspuffer auf die Säule und 5-minütiger Inkubation erreicht, bevor weitere 50 μL vorgewärmter Elutionspuffer zugegeben wurden. Die Eluate wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen gesammelt und die Eingangs- und Eluatproben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen den HA-Tag von Survivin-HA (901501, BioLegend) und Histon H3 (ab195277, abcam) analysiert.

### Proximity Ligation Assay (PLA)

Der PLA wurde mit dem *Duolink® In Situ Orange PLA Kit Mouse/Rabbit* zusammen mit den Duolink® In Situ PLA®-Sonden und Detektionsreagenzien von Sigma-Aldrich durchgeführt. Die Zellen wurden in 35 mm Glasbodenschalen (MatTek) ausgesät und vor der PLA-Färbung mit 4% Roti®-Histofix (Carl Roth) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach drei Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen für 30 min bei 37 °C mit Blockierungspuffer aus TritonX-100 und normalem Ziegen Serum blockiert. Danach wurden die Zellen bei 4 °C über Nacht mit zwei primären Antikörpern aus Maus (anti-Survivin, NB500-205, Novus Biologicals) und Kaninchen

(anti-Histone H3 phospho T3, ab130940, abcam), die in Antikörperverdünnungspuffer verdünnt wurden, inkubiert. Duolink® In Situ-PLA-Sonden *Anti-Rabbit PLUS* und *Anti-Mouse MINUS* wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach drei zusätzlichen Waschschrritten wurde die Ligationslösung auf den Zellen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Amplifikationsreagenzien zugegeben und für 100 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 10 µg/ml Hoechst33342 und *HCS CellMask™ Deep Red Stain* (Thermo Scientific) in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS für 20 min bei RT im Dunkeln gefärbt, bevor sie bei 4 °C in 0,1% (w/v) Natriumazid/PBS gelagert und mikroskopisch analysiert wurden. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder wurden mit dem Rastermikroskop TCS SP8 (Leica Microsystems) aufgenommen, das mit vier Lasern (Argon: 458/476/488/496/514 nm; DPSS: 561 nm; Helium-Neon: 633 nm; UV-Diode: 405 nm), zwei PMT-Detektoren für konfokale Bildgebung und einem Hybriddetektor für empfindliche Bildgebung ausgestattet ist. Die Proben wurden mit einem Wasserobjektiv HCX PL APO CS 63,0 x / 1,20 oder einem Ölobjektiv HCX PL APO 63 x / 1,4-0,6 abgebildet. Das Mikroskop wurde mit der *Leica Application Suite X (LAS X) Software* (Leica Microsystems) betrieben. Anschließend wurden die maximalen Projektionsbilder der z-Stapel mit dem *Cell Profiler* analysiert. Die Umrisse der Kerne wurden auf Basis der Hoechst 33342-Färbung definiert (primäre Objekte) und die Umrisse der gesamten Zellen wurden auf Basis der Cell Mask-Färbung eingekreist und als sekundäre Objekte definiert. *PLA foci* in den Zellen werden dann detektiert, erkannt und dann den jeweiligen Elternzellen zugeordnet.

### **Zellproliferationsstudien**

Der *CellTiter 96® AQueous One Cell Proliferation Assay* (Promega) wurde verwendet, um die Zellproliferation nach der Behandlung mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen zu beobachten. Der Assay bestimmt die Anzahl der lebensfähigen Zellen pro Vertiefung unter Verwendung der Tetrazoliumverbindung [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), die durch NADPH oder NADH in lebenden Zellen zu einem gefärbten Formazan-Produkt bioreduziert wird. Die Zellen wurden in eine schwarze 96-Well-Glasbodenschale (Corning) ausgesät und mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen für 72 h inkubiert (Triplikate für jede Bedingung). Der Assay wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt, indem 20 µL des *CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent* direkt in jede Kulturvertiefung gegeben und 4 h inkubiert wurden. Danach wurde die Absorption bei 490 nm mit einem GloMax®-Multiplatten-Lesegerät (Promega) gemessen.

## 7.4 MD-Simulationen

Die theoretischen Rechnungen wurde von Dr. Sunil Tripathi in der Gruppe von Prof. Dr. Elsa Sánchez-García, Institut für theoretische Biochemie, Universität Duisburg-Essen, durchgeführt.

### ***Advanced conformational sampling***

250 ns Produktionsläufe von Gaussian Accelerated MD (GaMD) wurden in drei Replikaten [6,7] durchgeführt, um eine erweiterte Stichprobe der Konformationen von Liganden an die Bindungsstelle zu erhalten. Die GaMD-Simulation folgt der gleichen Konfigurationsanordnung wie die Molekulardynamik-Berechnungen. Die Berechnung wurde mit der Bindungsgeometrie begonnen, die zuvor mit der 50 ns konventionellen MD-Simulation optimiert worden war. Das Biasing-Potenzial wurde in zwei Schritten ausgeglichen: Zunächst in den ersten 5 ns der konventionellen MD, entlang derer die potenzielle Energieverteilung des Systems überwacht wird, und dann, während 20 ns, wird das Vorspannungspotenzial ausgeglichen, indem eine Energieschwelle auf den Maximalwert der potenziellen Energie festgelegt und dieser Wert nach jedem Simulationsschritt sukzessive aktualisiert wird. Die Konstante der harmonischen Vorspannung wird gleichzeitig ins Gleichgewicht gebracht, indem die maximale Standardabweichung des Vorspannungspotentials bei 10kT-Einheiten gehalten wird. Entlang der 250 ns des Produktionslaufs wurde bei jedem Schritt der Trajektorie eine durchschnittliche Vorspannung von 7,3 kcal/mol angewendet. Das Vorspannungspotential erzeugt eine geglättete potentielle Energieoberfläche, die es ermöglicht, dynamische Ereignisse zu erfassen, die bei einer konventionellen MD-Simulation Hunderte von Nanosekunden benötigen würden. Hier wird die fortschrittliche GaMD-Abtasttechnik verwendet, um eine energetisch bevorzugte Konformation der Liganden zu erhalten.

### ***Protein-Ligand Docking-Simulationen***

Die Simulation des Andockens von der Liganden an Survivin wurde mit *LeDock* durchgeführt. *LeDock* verwendet eine Kombination aus *simulated annealing* und evolutionärer Optimierung der Ligandenposition und -orientierung (Ligandenpose) mit seinen drehbaren Bindungen. Alle Parameter wurden für Konformationsstichproben auf die Standardeinstellung gesetzt, und die *Docking-Scores* wurden durch die Standard-Scoringfunktion berechnet. Das Protein Survivin wurde vorbehandelt, indem das *LePro*-Modul von *LeDock* verwendet wurde, um Moleküle zu entfernen, die nicht mit dem Andockvorgang in Zusammenhang stehen, einschließlich Coenzymen und Deletionen von Liganden, die nicht mit der Bindung in Zusammenhang stehen, um dann ein leeres Protein zum Andocken als *pro.pdb* zu erhalten. Alle dreidimensionalen (3D) Konformationen der Liganden wurden im *mol2*-Dateiformat gespeichert. Die Eingabe von *Xmin Xmax, Ymin Ymax* und *Zmin Zmax* wurden in '*dock.in*' als Bindungstasche definiert, an welche die Liganden-Konformationen andockt werden. Die *Min* und *Max* werden am Start- und Endpunkt der *X*-, *Y*- und *Z*-Dimension definiert. Die Abmessungen der Bindungstasche und die Cluster-Analyse wurden mit *VMD* durchgeführt.

Es erfolgen standardmäßig 20 Durchläufe von Bindungsposen, die *Docking*-Simulationen mit jeder Liganden-Konformation durchgeführt werden. Anschließend werden die 20 resultierenden Posen aus jedem Andocken mit einem Cutoff-Wert der mittleren quadratischen Abweichung (root mean square deviation) von 1 Å geclustert. Die Cluster werden entsprechend der Bindungsenergiewerte geordnet, die durch die Standard-Scoringfunktion gegeben sind. Alle andockten Konformationen aus dem Andock-Ergebnis in ihren Bindungsstellen wurden nacheinander mit Hilfe der *PyMOL*-Software verglichen. Die beste Pose wurde aus dem am stärksten bevölkerten, andockten Cluster der Liganden-Konformationen ausgewählt. Außerdem wurden ausgewählte Posen in ihren Bindungsstellen mit Hilfe der MD-Simulation optimiert.

### **Molekulardynamische Simulationen**

Zur Durchführung von MD-Simulationen wurde die Software NAMD 2.12 mit CHARMM36m Kraftfeld verwendet. Die Parameter und Topologien für die Liganden wurden von SwissParam erhalten. Die Liganden wurden in einem Lösungsmittelkasten mit 15 Å bzw. 20 Å in den drei Dimensionen platziert um die komplexen Strukturen herum. Zur Darstellung der Wassermoleküle wurde das Modell TIP3P verwendet. Zur Neutralisierung wurden in jedem System Gegenionen hinzugefügt. Weitreichende Coulomb-Wechselwirkungen wurden mit der Particle Mesh Ewald (PME)-Methode berechnet. Minimierte Systeme wurden schrittweise auf 300 K im NVT-Ensemble erwärmt und anschließend ins Gleichgewicht gebracht, bis Druck und Dichte im isotherm isobaren (NPT) Ensemble stabilisiert waren. Der Berendsen-Thermostat wurde im NPT-Ensemble für die Äquilibration und die nachfolgenden Schritte bei einem atmosphärischen Druck von 1 atm vor dem Produktionslauf der MD-Simulation verwendet. Um das Verhalten der Liganden bei verschiedenen angedockten Liganden-Komplexen an verschiedenen Bindungsstellen des Proteins Survivin zu untersuchen, wurde die Langevin-Dynamik zur Aufrechterhaltung der Temperatur und des Drucks des Systems verwendet. Aus den Andocksimulationen wurden fünf Komplexe der Liganden aus den Clustern der NES-Bindungs- und Histon-Bindungsstelle ausgewählt. Alle Simulationen wurden für eine Simulationszeit von 100 ns durchgeführt und ergaben 20 Simulationen und eine Gesamtsimulationszeit von 2000ns (2 $\mu$ s). Die resultierenden 500 ns der Simulation wurden kombiniert und geclustert, um den repräsentativsten Bindungsmodus für jede Stelle zu extrahieren.

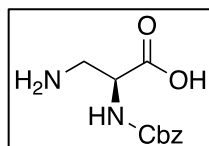
### **Simulation der freien Bindungsenergie**

Um die Affinität der Liganden innerhalb der identifizierten Bindungsstelle abzuschätzen, wurde ein neuartiger Ansatz für freie Energiestörungen (Free Energy Perturbation, FEP), genannt Central Limit FEP (CL-FEP), verwendet. CL-FEP ist ein End-Zustand-Ansatz, daher sind nur Proben von gebundenen und ungebundenen Zuständen erforderlich. In diesem Zusammenhang wurden vier Replikate von 50 ns molekulardynamischen Simulationen für die Systeme der Liganden in Wasser und gebunden an die Bindungsstelle durchgeführt. Nur drei Replikate (3 x 50 ns) der Molekulardynamik von Survivin in Wasser und den Systemen mit reinem Wasser verwendet, da hauptsächlich Interesse an dem Unterschied zwischen der freien Bindungsenergie und nicht an der absoluten Affinität der einzelnen Liganden besteht. Die Replikate unterschieden sich in den Anfangsgeschwindigkeiten der Trajektorien. Für alle Systeme wurden alle 10 ps Energieproben entnommen. Die Anzahl der Wassermoleküle war für alle Systeme gleich. CL-FEP wurde mit 50 Replikaten mit einem Oversampling-Verhältnis von 2 und maximal 2000 Bootstrap-Zyklen pro Replikat durchgeführt. Die 15 Kontrollpunkte mit allmählich zunehmendem Stichprobenumfang wurden analysiert, um konvergierende Schätzungen zu ermitteln. Die Konvergenz wurde durch zwei Kriterien bestimmt: i) das Erreichen einer Gaußschen Energiestichprobe und ii) sowohl die erwartete als auch die tatsächliche Standardabweichung der Schätzung der freien Energie liegen zwischen  $0,7 \cdot kT$  und  $kT$ . Von allen Kontrollpunkten mit konvergierten Schätzungen wurde derjenige mit dem größeren Stichprobenanteil ausgewählt, um den Endwert der Schätzung der freien Energie zuzuordnen.

## 7.5 Synthesen

### 7.5.1 Synthese des supramolekularen Liganden 48

#### *L*-Dap(Cbz)-OH (**64**)<sup>[111]</sup>

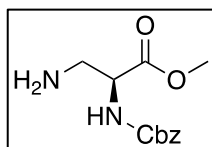


Cbz-*L*-Asn-OH (**63**) (10 g, 37.56 mmol) und (Diacetoxyiodo)benzol (15.28 g, 47.40 mmol) wurden in einer Mischung aus Ethylacetat (50 mL), Acetonitril (50 mL) und H<sub>2</sub>O (25 mL) für 30 min bei 0°C dispergiert. Anschließend wurde die Reaktion

über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Dispersion wurde auf 0 °C gekühlt und filtriert. Nach waschen mit Diethylether (20 mL) und Trocknen unter Vakuum wurde **64** (0.95 g, 3.79 mmol, 87%) als farbloser Feststoff erhalten.

<b>C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:</b>	238.24 g/mol
<b>Schmp.:</b>	230.1 °C (Zersetzung)
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	<b>(300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm]</b> = 2.98-3.18 (m, 2H, β-CH <sub>2</sub> ), 4.25 (m, 1H, α-CH), 5.04 (s, 2H, Cbz-CH <sub>2</sub> ), 7.35 (m, 5 H, Cbz-CH), 7.64 (d, 1H, <sup>3</sup> J(H, H) = 7.95 Hz, α-NH), 7.84-9.60 (br. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 11.35 (br. s, 1H, COOH).
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	<b>(75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm]</b> = 51.8, 65.6, 127.7, 127.8, 128.3, 136.7, 156.0, 171.0.
<b>FT-IR:</b>	<b>(ATR) ν̄ [cm<sup>-1</sup>]</b> = 3304, 2948, 2150, 1695, 1591, 1541, 1270, 1003, 696
<b>HR-MS:</b>	<b>(pos. ESI, MeOH) m/z</b> = 239.1030 ([M+H] <sup>+</sup> , ber.: 239.1026).



**L-Dap(Cbz)-OMe (65)<sup>[111]</sup>**

Cbz-L-Dap-OH (**64**) (1.1 g, 4.36 mmol) wurde in MeOH<sub>abs.</sub> (25 mL) dispergiert und mit katalytischen Mengen DMF (0,1 mL) versetzt, anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 30 min auf 0 °C gekühlt. Nachfolgend wurde langsam tropfenweise SOCl<sub>2</sub> (0.65 mL, 8.72 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand in MeOH/Et<sub>2</sub>O (1:1) kristallisiert. L-Dap(Cbz)-OMe (**65**) (0.95 g, 3.79 mmol, 87%) wurde als farblose kristalline Nadeln erhalten.

**C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:** 252.27 g/mol

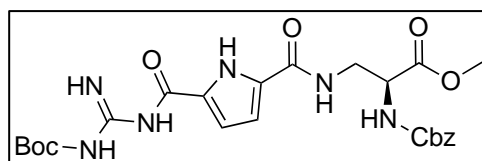
**Schmp.:** 170.5 °C

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 2.96-3.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.61 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) 4.43 (m, 1H, CH), 5.06 (s, 2H, Cbz-CH<sub>2</sub>), 7.36 (m, 5H, Cbz-CH), 7.93 (d, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 8.15 Hz, α-NH), 8.30 (s, 3H, β-NH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 51.7, 52.5, 65.8, 127.7, 127.9, 128.3, 136.6, 156.0, 169.8.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3315, 3034, 2875, 2013, 1736, 1692, 1541, 1308, 1266, 1228, 1013, 753.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 253.1194 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 253.1183).

**GCP-L-Dap(Cbz)-OMe (66)**<sup>[111]</sup>

GCP (**62**) (6.0 g, 15.1 mmol) und PyBOP (9.42 g, 18.1 mmol) wurden in DMF<sub>abs.</sub> (50 mL) gelöst, NMM (10 mL, 90.9 mmol) hinzugegeben und bei RT für 20 min gerührt. Anschließend wurde das freie Amin **65** (4.78 g, 16.6 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in MeOH aufgenommen und in H<sub>2</sub>O gefällt. Die Suspension wurde drei-Mal mit EtOAc (100 mL) extrahiert und die organischen Phasen kombiniert. Diese wurden mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>- und NaHSO<sub>4</sub>-Lösung (0.5 N) sowie H<sub>2</sub>O gewaschen. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/Acetone = 7/3) gereinigt, um **66** (5.60 g, 10.6 mmol, 70%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

**C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>:** 530.54 g/mol

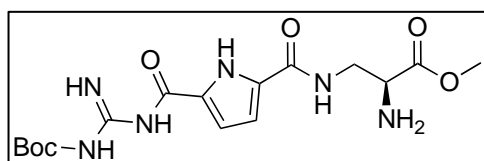
**Schmp.:** 103.1 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.63 (m, 5H, β-CH<sub>2</sub> & CH<sub>3</sub>), 4.30 (q, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 8.15 Hz, α-CH), 5.04 (s, 2H, Cbz-CH<sub>2</sub>), 6.77 (m, 2H, Py-CH), 7.34 (m, 5H, Cbz-CH), 7.73 (d, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 7.89 Hz, NH), 8.48 (m, 2H, NH), 9.34 (s, 1H, NH), 10.84 (s, 1H, NH), 11.36 (s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 27.7, 52.0, 53.8, 65.6, 112.0, 113.6, 127.7, 127.8, 128.3, 136.7, 155.9, 158.3, 160.1, 171.0.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3363, 2979, 2162, 2026, 1985, 1721, 1631, 1540, 1469, 1342, 1295, 1240, 1147, 1091, 1052, 842, 754, 697.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 531.2251 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 531.2198), 553.2044 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 553.2017).

**GCP-L-Dap-OMe (67)**<sup>[111]</sup>

**66** (180mg, 0.34mmol) wurde in MeOH (10mL) gelöst, Pd/C (kat.) hinzugegeben und die Mischung bei RT unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre über Nacht gerührt. Die Mischung wurde

über Celite filtriert, sowie das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC über C18-Silikagel gereinigt (gradient 10% → 100% methanol/water in 60 min), wodurch **67** (95 mg, 0.24 mmol, 70%) als weißer Feststoff erhalten wurde.

**C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>:** 396.40 g/mol

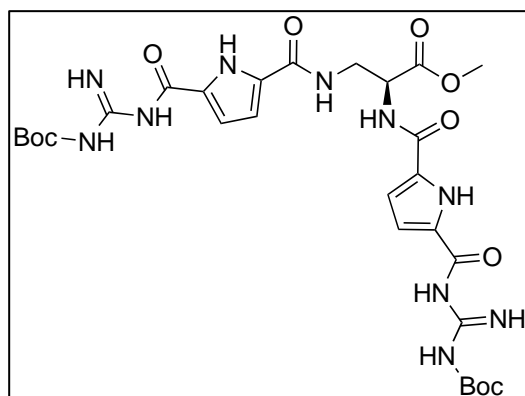
**Schmp.:** 93.5 °C

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.45 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.32 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.40 (t, 2H, <sup>3</sup>J(H,H) = 5.93 Hz, β-CH<sub>2</sub>), 3.51 (m, 1H, α-CH), 3.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.78 (m, 3H, Py-CH + NH), 8.57 (s, 1H, NH), 8.57 (s, 2H, NH), 9.32 (s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 27.7, 43.1, 51.6, 53.9, 112.0, 113.6, 158.3, 159.8, 174.5.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3749, 3673, 3650, 3614, 3309, 2977, 2937, 1719, 1631, 1540, 1459, 1394, 1368, 1290, 1236, 1144, 1050, 839, 753, 694.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 397.1829 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 397.1830), 419.1646 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 419.1650).

Geschützter supramolekularer Ligand **68**<sup>[111]</sup>

GCP (**62**) (12.68 g, 31.9 mmol) und PyBOP (19.61 g, 37.7 mmol) wurden in DCM<sub>abs.</sub> (50 mL) gelöst, NMM (19.13 mL, 0.17 mol) hinzugegeben und bei RT für 20 min gerührt. Anschließend wurde das freie Amin **67** (11.5 g, 29.0 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in MeOH aufgenommen und in H<sub>2</sub>O gefällt. Die Suspension wurde

filtriert, das Rohprodukt unter Vakuum getrocknet und mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/ACN/MeOH = 9/1/0.5) gereinigt, um **68** (16.04 g, 23.8 mmol, 82%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

**C**<sub>28</sub>**H**<sub>38</sub>**N**<sub>10</sub>**O**<sub>10</sub>: 674.67 g/mol

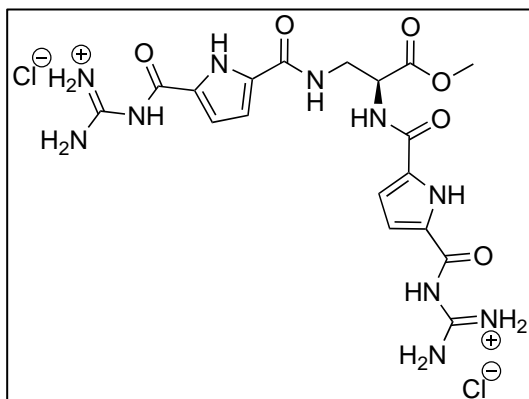
**Schmp.:** 181 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.45 (s, 18H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.57 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 3.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.76 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 6.77 (m, 4H, Py-CH), 8.59 (m, 4H, NH), 8.81 (s, 1H, NH), 9.33 (br. s, 2H, NH), 10.83 (br. s, 4H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 27.8, 52.1, 112.3, 48.8, 112.7, 113.4, 158.4, 170.9.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3749, 3374, 3287, 2979, 2941, 1731, 1630, 1540, 1469, 1395, 1368, 1291, 1237, 1145, 1049, 841, 755.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 675.2853 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 675.2845).

Supramolekularer Ligand **48**<sup>[111]</sup>

**68** (100 mg, 0.15 mmol) wurde in DCM (5 mL) gelöst, mit TFA (3 mL) versetzt und für 4 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC über C18 phase silica Gel (gradient 10% → 100% MeOH/H<sub>2</sub>O in 90 min, 0.1 % TFA) gereinigt, um **48** als TFA-Salz (93.5 mg, 0.13 mmol, 90%) zu erhalten. Das Hydrochlorid-Salz von **48** wurde als weißer Feststoff durch Zugabe von HCl (0.1 M, 2 mL)

gefolgt von Gefriertrocknung erhalten (drei Wiederholungen).

**C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>10</sub>O<sub>6</sub>:** 547.35 g/mol

**Schmp.:** 238 °C (Zersetzung)

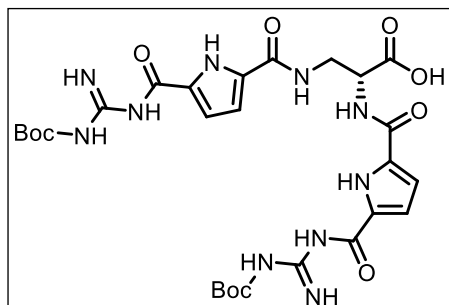
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 3.65 (m, 4H, β-CH<sub>2</sub> & CH<sub>3</sub>), 3.77 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 4.64 (q, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 6.18 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.88 (m, 2H, Py-CH), 7.10 (m, 2H, NH), 8.36 (br. s, 8H, NH<sub>2</sub>), 8.70 (m, 1H, NH), 11.20 (s, 2H, NH) 8.90 (m, 1H, NH), 12.25-12.73 (m, 2H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 52.2, 63.4, 112.7, 113.3, 115.8, 125.9, 131.9, 132.5, 155.4, 159.2, 159.6, 170.7.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 475.1806 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 475.1797), 497.1621 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 497.1616).

## 7.5.2 Synthese der supramolekularen Liganden 49 und 50

### GCP-L-DAP(GCP)-OH (**74**)<sup>[183]</sup>



GCP-L-Dap(GCP)-OMe (**68**) (0.89 g, 1.32 mmol) wurde in einer Mischung aus THF (10 mL) und H<sub>2</sub>O (5 mL) gelöst, LiOH (31.6 mg, 1.32 mmol) zugegeben und für 6 h gerührt. Anschließend wurde THF unter vermindertem Druck entfernt und der pH-Wert mittels Zugabe von Zitronensäure (1 M) auf 4 eingestellt. Der resultierende Niederschlag wurde filtriert und mit Wasser

gewaschen. Der Feststoff wurde am Gefriertrockner getrocknet, was zum Produkt **74** (0.81 g, 1.18 mmol, 93%) als weißes Pulver führte.

**C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub>:** 660.65 g/mol

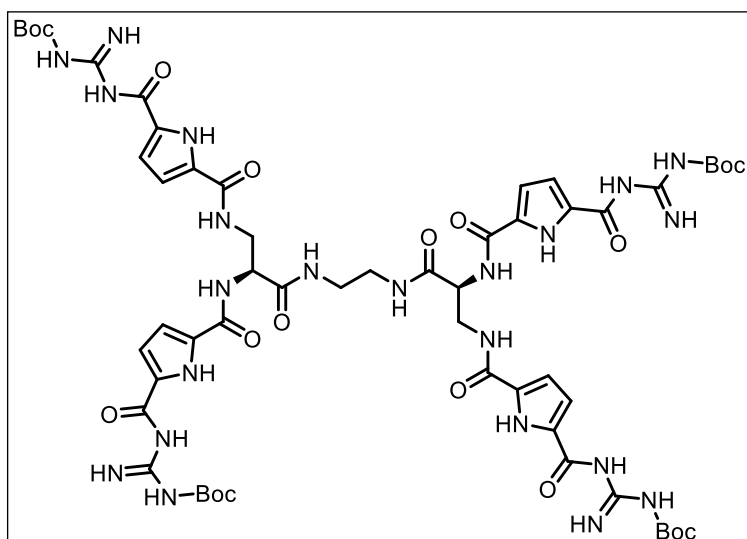
**Schmp.:** 256.0 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.45 (s, 18H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.54 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 3.77 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 4.56 (q, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 6.86 Hz, α-CH), 6.76 (m, 4H, Pyrrole-CH), 8.57-8.68 (m, 4H, NH), 9.32 (s, 2H, NH), 11.41 (br. s, 5H, Gua-NH & COOH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 27.6, 27.8, 30.4, 40.1, 40.2, 52.3, 112.2, 112.4, 113.6, 158.4, 159.6, 160.1, 171.9.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3325, 2979, 2928, 2167, 1699, 1621, 1541, 1467, 1395, 1368, 1287, 1238, 1143, 1047, 839, 753.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 661.2664 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 661.2689).

**Geschützter Ligand 75<sup>[183]</sup>**

GCP-*L*-DAP(GCP)-OH (**74**) (0.59 g, 0.89 mmol) und PyBOP (0.51 g, 0.98 mmol) wurden in DMF (10 mL) gelöst, mit NMM (165  $\mu$ L, 1.48 mmol) versetzt und für 15 min gerührt. Danach wurde Ethylenediamine (19.7  $\mu$ L, 0.29 mmol) hinzugegeben und für weitere drei Tage gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser (20 mL) gefällt, der Niederschlag filtriert und unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/ACN/MeOH = 9/1/0.5) gereinigt, dies ergab **75** (275 mg, 0.20 mmol, 69%) als farblosen Feststoff.

**C<sub>56</sub>H<sub>76</sub>N<sub>22</sub>O<sub>18</sub>:** 1345.36 g/mol

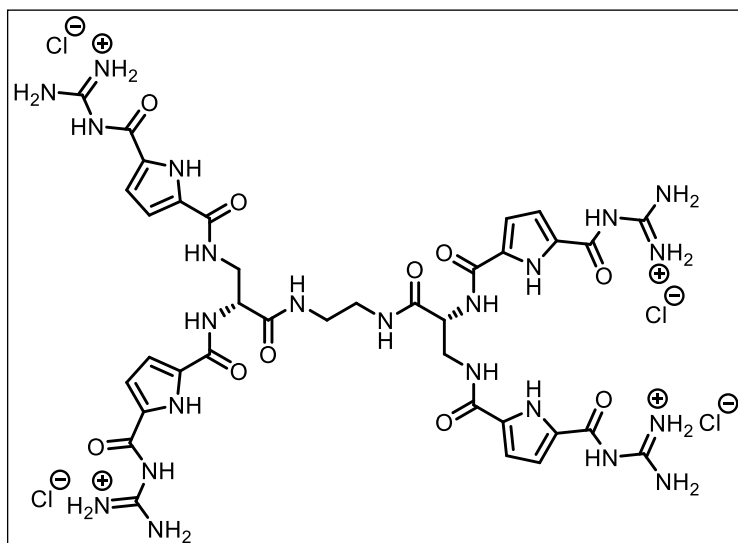
**Schmp.:** 247.0-248.0 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 1.45 (s, 36H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.13 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.56-3.66 (m, 4H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 4.55 (m, 2 H,  $\alpha$ -CH), 6.77 (m, 8H, Pyrrole-CH), 8.14 (s, 2H, NH), 8.47-8.53 (m, 8H, NH), 9.32 (s, 4H, NH), 10.32-11.37 (m, 8H, NH)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 27.8, 38.3, 40.1, 40.7, 53.4, 112.2, 112.6, 113.8, 158.4, 159.6, 160.3, 169.9

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3263, 2979, 2297, 1728, 1630, 1547, 1529, 1468, 1392, 1369, 1286, 1234, 1142, 1045, 841, 779, 754

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) *m/z* = 673.2910 ([M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 673.2927).

Supramolekularer Ligand **49**<sup>[183]</sup>

**75** (100 mg, 0.07 mmol) wurde in DCM (5 mL) und TFA (3 mL) gelöst und für 5 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels MPLC über C18 Silica-Gel (gradient 5% → 100% MeOH/H<sub>2</sub>O in 120 min, 0.1 % TFA) gereinigt, was **49** als TFA-Salz (98.9 mg, 0.07 mmol, 95%) ergab. Das Hydrochlorid-Salz von **49** wurde durch Zugabe von HCl (0.1 M, 2 mL) und Gefriertrocknung (drei Wiederholungen) als weißer Feststoff erhalten.

**C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>22</sub>O<sub>10</sub>**: 1090.72 g/mol

**Schmp.:** 259.4 °C (Zersetzung)

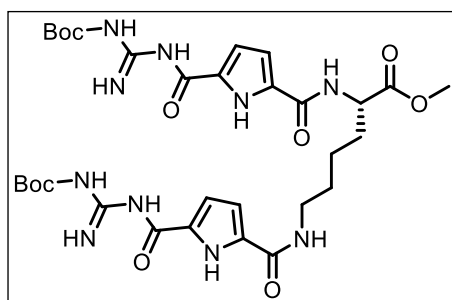
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 3.10-3.17 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.57 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 3.69 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 4.62 (q, 2H, <sup>3</sup>J(H, H) = 6.79 Hz, α-CH), 6.87-6.92 (m, 4H, Pyrrole-CH), 7.45-7.50 (m, 4H, Pyrrole-CH), 7.23 (s, 2H, NH), 8.41-8.66 (m, 18H, NH & Gua-NH<sub>2</sub>), 8.75 (d, 2H, <sup>3</sup>J(H, H) = 7.67 Hz, NH), 11.87 (m, 4 H, NH), 12.35-12.52 (m, 4H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 38.3, 40.1, 40.7, 53.2, 112.9, 113.4, 115.7, 115.8, 115.8, 125.5, 125.5, 125.6, 132.4, 132.5, 155.3, 155.4, 159.1, 159.5, 159.6, 159.7, 169.6.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3323, 2285, 1691, 1641, 1550, 1477, 1433, 1286, 1248, 1200, 1149, 1072, 1004, 957, 852, 814, 752, 665.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) *m/z* = 315.7915 ([M+3H]<sup>3+</sup>, ber.: 315.7943).



**GCP-L-Lys-(GCP)-OMe (70)**<sup>[183]</sup>

H-L-Lys-OMe 2xHCl (**69**) (0.49 g, 2.1 mmol) wurde in DMF (5 mL) gelöst, NMM (0,7 mL, 6.3 mmol) und GCP (**62**) (2.6 g, 6.5 mmol) hinzugegeben, die Reaktion auf 0 °C gekühlt und für 30 min gerührt. Anschließend wurde HOBt (170 mg, 1.26 mmol) und EDC HCl (1.28 g, 6.7 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 30 min bei 0°C gerührt,

abschließend wurde das Eisbad entfernt und zusätzlich über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in H<sub>2</sub>O (100 mL) getropft und der Niederschlag gefiltert. Das resultierende Rohprodukt wurde unter vermindertem Druck getrocknet und mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/ACN/MeOH = 9/1/0.5) gereinigt, um **70** (1.09 g, 1.52 mmol, 72 %) als weißen Feststoff zu erhalten.

**C**<sub>31</sub>**H**<sub>44</sub>**N**<sub>10</sub>**O**<sub>10</sub>: 716.75 g/mol

**Schmp.:** 146.1 °C (Zersetzung)

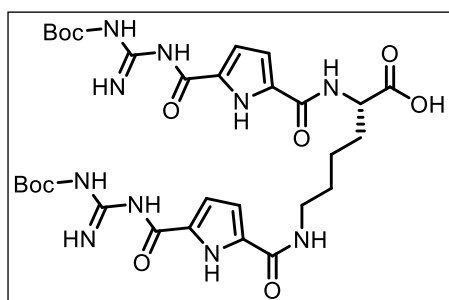
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.45 (m, 22H, Boc-CH<sub>3</sub> & Lys-CH<sub>2</sub>), 1.76-1.81 (m, 2H, Lys-CH<sub>2</sub>), 3.22 (q, 2H, <sup>3</sup>J(H, H) = 6.47 Hz, ε-CH<sub>2</sub>), 3.63 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 4.40 (m, 1H, α-CH), 6.75-6.83 (m, 4H, Pyrrole-CH), 8.33 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.48 Hz, NH), 8.60 (m, 3H, NH), 9.32 (s, 2H, NH), 10.84-11.51 (m, 4H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 23.1, 27.8, 28.7, 30.4, 38.4, 40.1, 51.9, 52.1, 111.6, 112.9, 125.6, 158.4, 159.5, 159.7, 172.7.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3373, 2979, 2267, 1786, 1726, 1691, 1628, 1547, 1529, 1468, 1392, 1369, 1286, 1232, 1142, 1045, 841, 779, 754.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 717.3303 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 717.3315).

**GCP-L-Lys-(GCP)-OH (71)<sup>[183]</sup>**



GCP-L-Lys(GCP)-OMe (**70**) (0.94 g, 1.31 mmol) wurde in einem Gemisch aus THF (20 mL) und H<sub>2</sub>O (10 mL) gelöst, anschließend LiOH (31.4 mg, 1.31 mmol) zugegeben und 6 h lang gerührt. Anschließend wurde THF unter vermindertem Druck entfernt und der pH-Wert durch Zugabe von Zitronensäure (1 M) auf 4 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und

mit Wasser gewaschen. Der Feststoff wurde mittels Gefriertrocknung getrocknet, wobei das Produkt **71** (0.87 g, 1.23 mmol, 94 %) als weißes Pulver erhalten wurde.

**C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub>:** 702.73 g/mol

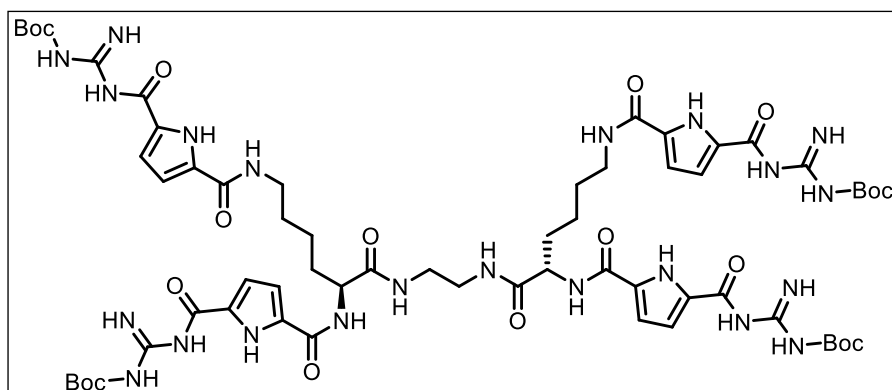
**Schmp.:** 228.9-260.1 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.45 (m, 22H, Boc-CH<sub>3</sub> & Lys-CH<sub>2</sub>), 1.73-1.81 (m, 2H, Lys-CH<sub>2</sub>), 3.22 (q, 2H, <sup>3</sup>J(H, H) = 6.19 Hz, ε-CH<sub>2</sub>), 4.33 (m, 1H, α-CH), 6.74-6.81 (m, 4H, Pyrrole-CH), 8.46-8.55 (m, 4H, NH), 9.33 (m, 2H, NH), 11.56 (br. s, 5H, NH & COOH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 23.1, 27.7, 27.8, 28.1, 28.4, 30.7, 38.4, 40.1, 52.3, 111.8, 112.6, 113.7, 158.4, 159.4, 159.5, 174.0.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3377, 2979, 2301, 1726, 1691, 1630, 1549, 1535, 1468, 1392, 1369, 1292, 1238, 1146, 1047, 841, 754, 631.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 703.3128 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 703.3158).

**Protected Ligand (73)**<sup>[183]</sup>

GCP-L-Lys(GCP)-OH (**71**) (0.62 g, 0.88 mmol) und Ethylendiamin (**72**) (19.6  $\mu$ L, 0.29 mmol) wurden in DMF (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von NMM (179  $\mu$ L, 1.61 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurden HOBt (23 mg, 0.18 mmol) und EDC\*HCl (186 mg, 0.97 mmol) zugegeben, das Reaktionsgemisch weitere 30 min bei 0°C gerührt, das Kühlbad entfernt und zusätzlich drei Tage lang gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser (50 mL) gefällt und unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/ACN/MeOH = 9/1/0.5) gereinigt, um **73** (261 mg, 0.18 mmol, 63%) als weißen Feststoff zu erhalten.

**C<sub>62</sub>H<sub>88</sub>N<sub>22</sub>O<sub>18</sub>:** 1429.52 g/mol

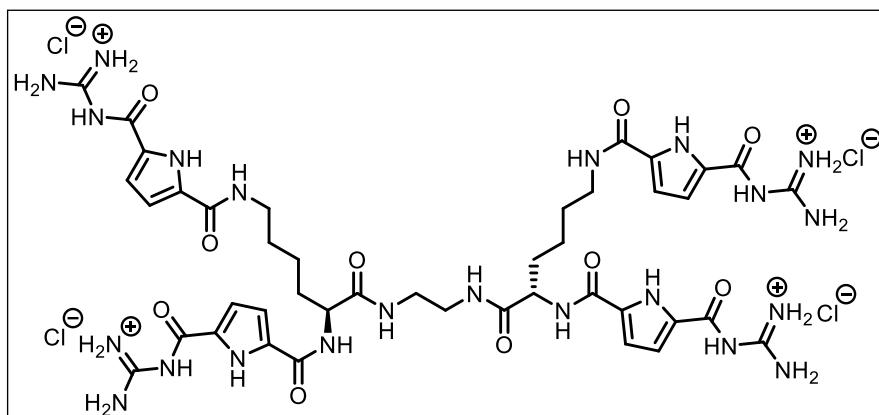
**Schmp.:** 235.5-272.3 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 1.25-1.58 (m, 44H, Boc-CH<sub>3</sub> & Lys-CH<sub>2</sub>), 1.65-1.72 (m, 4H, Lys-CH<sub>2</sub>), 3.11 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.20 (m, 4H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>), 4.34 (m, 2H,  $\alpha$ -CH), 6.75-6.82 (m, 8H, Pyrrole-CH), 8.08 (m, 2H, NH), 8.31 (t, 2H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.32 Hz, NH), 8.42 (m, 2H, NH), 8.56 (s, 4H, NH), 9.31 (s, 4H, NH), 10.84-11.63 (m, 8H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] = 23.2, 27.8, 28.9, 31.6, 38.3, 38.5, 40.1, 52.9, 111.6, 112.9, 158.4, 159.5, 171.9.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3377, 2979, 2299, 1726, 1689, 1630, 1547, 1529, 1468, 1392, 1369, 1288, 1236, 1144, 1045, 841, 779, 754.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 715.3367 ([M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 715.3396).

Supramolekularer Ligand **50**<sup>[183]</sup>

**73** (200 mg, 0,14 mmol) wurde in DCM (10 mL) gelöst und anschließend mit TFA (6 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h gerührt, dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC über C18-Silikagel (Gradient 5% → 100% MeOH/H<sub>2</sub>O in 120 min, 0.1% TFA) gereinigt, um **50** als TFA-Salz (195.4 mg, 0.13 mmol, 94%) als weißen Feststoff zu erhalten. Das Salz der Salzsäure **50** wurde als weißer Feststoff durch Zugabe von HCl (0.1 M, 2 mL) und Gefriertrocknung (dreimal) erhalten.

**C<sub>42</sub>H<sub>60</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>22</sub>O<sub>10</sub>:** 1174.89 g/mol

**Schmp.:** 257.4-281.6 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.31-1.37 (m, 4H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.50 (m, 4H, Lys-CH<sub>2</sub>), 1.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.73 (m, 2H, Lys-CH<sub>2</sub>), 3.11 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.20 (m, 4H, ε-CH<sub>2</sub>), 4.37 (m, 2H, α-CH<sub>2</sub>), 6.83-6.90 (m, 4H, Pyrrole-CH), 7.44-7.49 (m, 4H, Pyrrole-CH), 8.15 (m, 2H, NH), 8.21-8.83 (m, 20H, NH & Gua-NH<sub>2</sub>), 11.87-11.93 (m, 4H, NH), 12.28 (s, 2H, NH), 12.50 (s, 2H, NH).

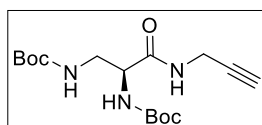
**<sup>13</sup>C-NMR:** (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 23.1, 28.7, 31.7, 38.3, 38.6, 40.1, 53.0, 112.3, 113.6, 115.7, 115.9, 125.3, 125.6, 132.4, 132.9, 155.4, 158.9, 159.0, 171.7.

**FT-IR:** (ATR)  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3299, 2347, 2305, 1685, 1658, 1630, 1550, 1479, 1442, 1400, 1286, 1207, 1144, 1003, 852, 746, 696, 606.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) *m/z* = 515.2329 ([M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 515.2348).

### 7.5.3 Synthese des zweiarmigen Hydrogelators 51

#### Boc-L-Dap(Boc)-propargylamine (**77**)<sup>[37]</sup>



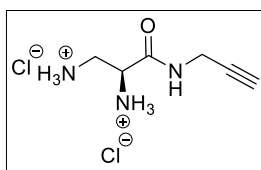
Boc-L-Dap(Boc)-OH (**76**) (2 g, 4.12 mmol) wurde in DCM (20 mL) gelöst, gefolgt von der Zugabe von HCTU (2.05 g, 4.94 mmol) und DIPEA (2.12 mL, 12.4 mmol). Nach 15 Minuten wurde Propargylamin (0.91, 16 mmol) zugegeben und über Nacht gerührt. Die resultierende Mischung wurde mit 0.5 N NaHSO<sub>4</sub> (3 x 30 mL) und Wasser (3 x 30 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, Cy/EA = 1/1) gereinigt, um **77** (989 mg, 2.90 mmol, 70.4 %) als weißen Feststoff zu erhalten.

**C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>:** 341.41 g/mol

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.36 (m, 18H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.09 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub> & alkyne-CH), 3.16 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 3.82 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.99 (m, 1 H, , α-CH ), 6.64 (d, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 8.22 Hz, α-NH), 6.70 (m, 1H, β-NH), 8.27 (m, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 28.1, 41.7, 54.6, 73.0, 77.9, 78.2, 80.9, 155.0, 155.7, 169.9.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 364.1872 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 364.1843), 705.3818 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 705.3794).

**L-Dap-propargylamin Hydrochlorid-Salz (78)**<sup>[37]</sup>

Boc-L-Dap(Boc)-Propargylamin (**77**) (935 mg, 2.74 mmol) wurde in MeOH (10 mL) gelöst und anschließend mit konz. HCl (2 mL) versetzt. Die Reaktion wurde 30 Minuten lang gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der entstandene Feststoff wurde mit einer kleinen Menge MeOH aufgenommen und in Et<sub>2</sub>O (30 mL) gefällt. Nach Trocknung unter vermindertem Druck wurde **78** (324 mg, 55.1%) als weißer Feststoff erhalten.

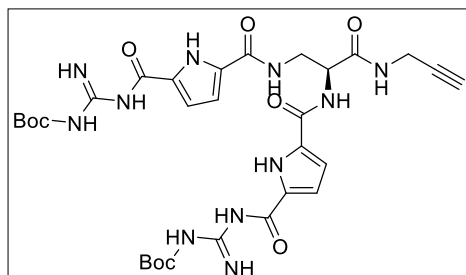
**C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** 214.09 g/mol

**Schmp.:** 198.1 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 3.23 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 5.00 Hz, alkyne-CH), 3.27 (d, 2H, <sup>3</sup>J(H,H) = 5.00 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.01 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 4.27 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 10.63 Hz, α-CH), 8.76 (br. s, 6H, R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 9.34 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 10.33 Hz, NH)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 28.7, 30.8, 50.0, 74.0, 79.7, 164.9

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 142.0975 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 142.0993).

**Alkin-funktionalisierter divalenter GCP-Baustein 79<sup>[37]</sup>**

GCP (**62**) (1.79, 4.51 mmol), HCTU (1.92, 4.65 mmol) und DIPEA (1.54 mL, 9 mmol) wurden in trockenem DMF (2 mL) gelöst. Nach 15 min wurde **78** (300 mg, 1.50 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser (20 mL) gefällt und im Vakuum getrocknet. Das

Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/ACN/MeOH = 9/1/0.5) gereinigt, um **79** (176 mg, 2.50 mmol, 18%) als weißen Feststoff zu erhalten.

**C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>:**

697.71 g/mol

**Schmp.:**

173.4 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

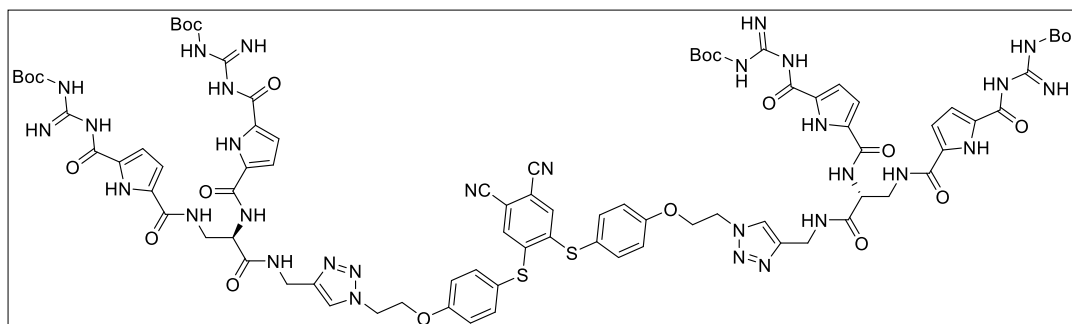
**(300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm]** = 1.44 (s, 18H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.06 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H,H) = 4.69 Hz, alkyne-CH), 3.64 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 3.85 (m, 2H, alkyne-CH<sub>2</sub>), 4.60 (m, 1H, α-CH), 6.79 (m, 4H, Py-CH), 8.52 (m, 5H, NH-Amid), 9.31 (s, 2H, NH-Gua), 10.82 (s, 2H, NH-Gua), 11.42 (s, 2H, Pyrrol-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:**

**(151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm]** = 28.1, 40.6, 53.0, 73.0, 80.9, 112.1, 112.3, 112.6, 158.4, 159.5, 160.1, 169.5.

**HR-MS:**

**(pos. ESI, MeOH) m/z** = 698.3007 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 698.3005), 720.2821 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 720.2824).

Geschützter zweiarmiger Hydrogelator **81**<sup>[37]</sup>

Verbindung **80** (57 mg, 0.11 mmol) und **79** (155 mg, 0.22 mmol) wurden in entgastem THF (2 mL) gelöst. Dann wurde eine Lösung aus CuSO<sub>4</sub> (19.4 mg, 0.07 mmol) und Na-L-Ascorbat (30.8 mg, 0.15 mmol), gelöst in H<sub>2</sub>O (0.5 mL), hinzugefügt. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur 48 h gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der resultierende Feststoff mit einer kleinen Menge THF aufgenommen und in MeOH (20 mL) gefällt. Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet und mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/ACN/MeOH/NH<sub>3</sub> = 10/1/1/0.1) gereinigt, um **81** (86.3 mg, 0.05 mmol, 41%) als gelben Feststoff zu erhalten.

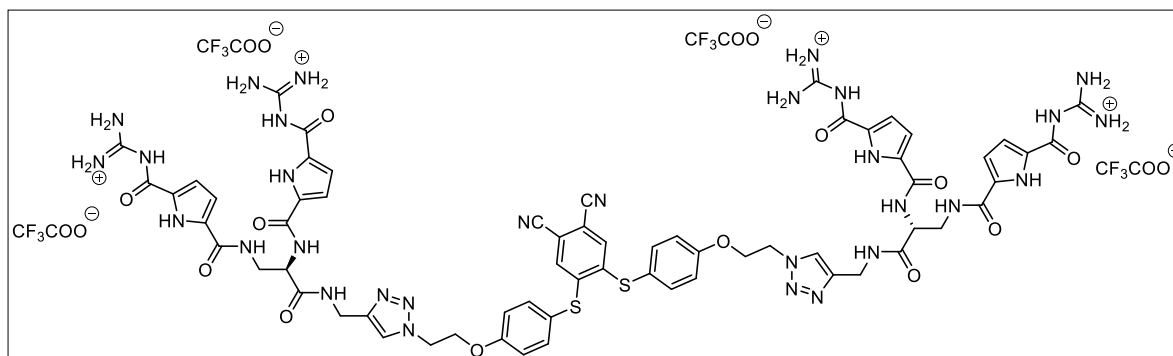
**C<sub>84</sub>H<sub>96</sub>N<sub>30</sub>O<sub>20</sub>S<sub>2</sub>:** 1909.98 g/mol

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.44 (s, 36H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.56 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 3.68 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 4.34 (d, 4H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.64 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.42 (t, 4H, <sup>3</sup>J(H, H) = 9.54 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.62 (q, 2H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.94 Hz, α-CH), 4.73 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 6.78 (m, 8H, Pyrrol-CH), 7.01 (s, 2H, Ar-CH), 7.08 (d, 4H, <sup>3</sup>J(H, H) = 8.88 Hz, Ar-CH), 7.50 (d, 4H, <sup>3</sup>J(H, H) = 8.76 Hz, Ar-CH), 7.91 (s, 2H, Triazol-CH), 8.45-8.70 (m, 10H, NH), 9.34 (s, 4H, Gua-NH), 10.60-11.50 (br. s, 8H, Gua-amide-NH & Py-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 27.7, 34.5, 40.7, 48.8, 53.3, 66.4, 111.0, 112.2, 112.6, 115.6, 116.7, 118.4, 123.3, 129.2, 131.6, 137.0, 143.5, 145.1, 158.4, 159.6, 160.2, 169.8.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 955.8535 [M+2H]<sup>2+</sup>, ber.: 955.8515).



Zweiarmer Hydrogelator **51**<sup>[37]</sup>

Verbindung **81** (81.3 mg, 0.04 mmol) wurde in MeOH (5 mL) gelöst und anschließend mit TFA (1 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 h lang gerührt, dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC über C18-Silikagel (Gradient 10% → 100% MeOH/H<sub>2</sub>O in 60 min, 0.1% TFA) gereinigt, um **51** (81.1 mg, 0.05 mmol, 79%) als gelben Feststoff zu erhalten.

**C<sub>72</sub>H<sub>68</sub>F<sub>12</sub>N<sub>30</sub>O<sub>20</sub>S<sub>2</sub>:** 1965.63 g/mol

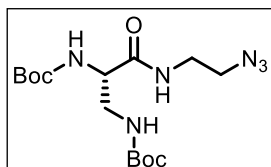
**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 3.57 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 3.69 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 4.34 (d, 4H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.64 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.45 (t, 4H, <sup>3</sup>J(H, H) = 9.53 Hz, Linker-CH<sub>2</sub>), 4.66 (q, 2H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.82 Hz, α-CH), 4.75 (t, 4H, <sup>3</sup>J(H, H) = 9.90 Hz, Linker-CH<sub>2</sub>), 6.85 (m, 4H, Pyrrol-CH), 7.03 (m, 10H, Ar-CH), 7.51 (d, 4H, <sup>3</sup>J(H, H) = 8.76 Hz, Ar-CH), 7.97 (s, 2H, Triazol-CH), 8.31 (br. s, 16H, Gua-NH), 8.57 (m, 2H, amide-NH), 8.69 (m, 4H, amide-NH), 11.20 (s, 4H, Pyrrol-NH), 12.40-12.54 (m, 4H, Gua-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 18.6, 27.0, 27.7, 34.5, 40.7, 48.9, 53.0, 56.0, 66.5, 111.1, 112.9, 113.4, 115.1, 115.3, 115.6, 116.8, 118.4, 123.4, 125.5, 125.6, 129.2, 132.4, 137.0, 143.5, 144.9, 155.0, 158.3, 158.6, 158.8, 159.0, 159.5, 159.7, 169.5.

**HR-MS:** (pos. ESI, MeOH) m/z = 387.1204 ([M+4H]<sup>4+</sup>, ber.: 387.1263).

## 7.5.4 Synthese des dreiarmligen Hydrogelators **53**

### Boc-L-DAP(Boc)-NH-Et-N<sub>3</sub> (**84**)<sup>[213]</sup>



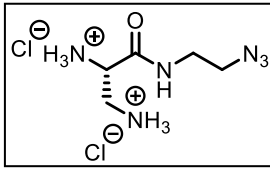
Boc-L-Dap(Boc)-OH **82** (2.6 g, 5.44 mmol), 2-Azidoethylamin (1 g, 8.16 mmol) und DIPEA (4 mL, 23.5 mmol) wurden in einer Mischung aus DCM (10 mL) und DMF (10 mL) gelöst und 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurden EDC·HCl (1.15 g, 5.98 mmol) und HOBT (0.22 g, 1.63 mmol) zugegeben, das Reaktionsgemisch für 1 h bei 0°C gerührt, dann wurde das Kühlbad entfernt und zusätzlich über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der resultierende Feststoff wurde in DMF gelöst und in Wasser gefällt. Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet, um **84** (1.2 g, 3.22 mmol, 59%) als weißen Feststoff zu erhalten.

**C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>:** 372.43 g/mol

**<sup>1</sup>H NMR:** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.35 (s, 18H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.00-3.20 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.77-3.85 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 3.99 (q, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.47 Hz, α-CH), 6.60-6.75 (m, 2H, NH), 8.26 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.15 Hz, NH).

**<sup>13</sup>C NMR:** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 28.1, 41.7, 54.6, 72.9, 77.8, 78.2, 80.8, 155.0, 155.6, 169.9.

**L-DAP-NH-Et-N<sub>3</sub> x 2 HCl (85)**



weißen Feststoff zu erhalten.

**84** (1.2 g, 3.22 mmol) wurde in einer Mischung aus MeOH (20 mL) und 1 M HCl (5 mL) gelöst und 3 h lang gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, um **85** (0.75 g, 3.05 mmol, 95%) als

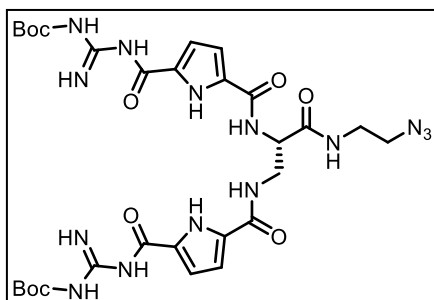
**C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O:**

245.11 g/mol

**<sup>1</sup>H NMR:**

**(300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 3.29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.25 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.31 Hz, α-CH), 8.76 (s, 6H, NH<sub>3</sub>), 9.16 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.31 Hz, NH).**

**GCP-L-DAP(GCP)-NH-Et-N<sub>3</sub> x 2 HCl (**87**)**



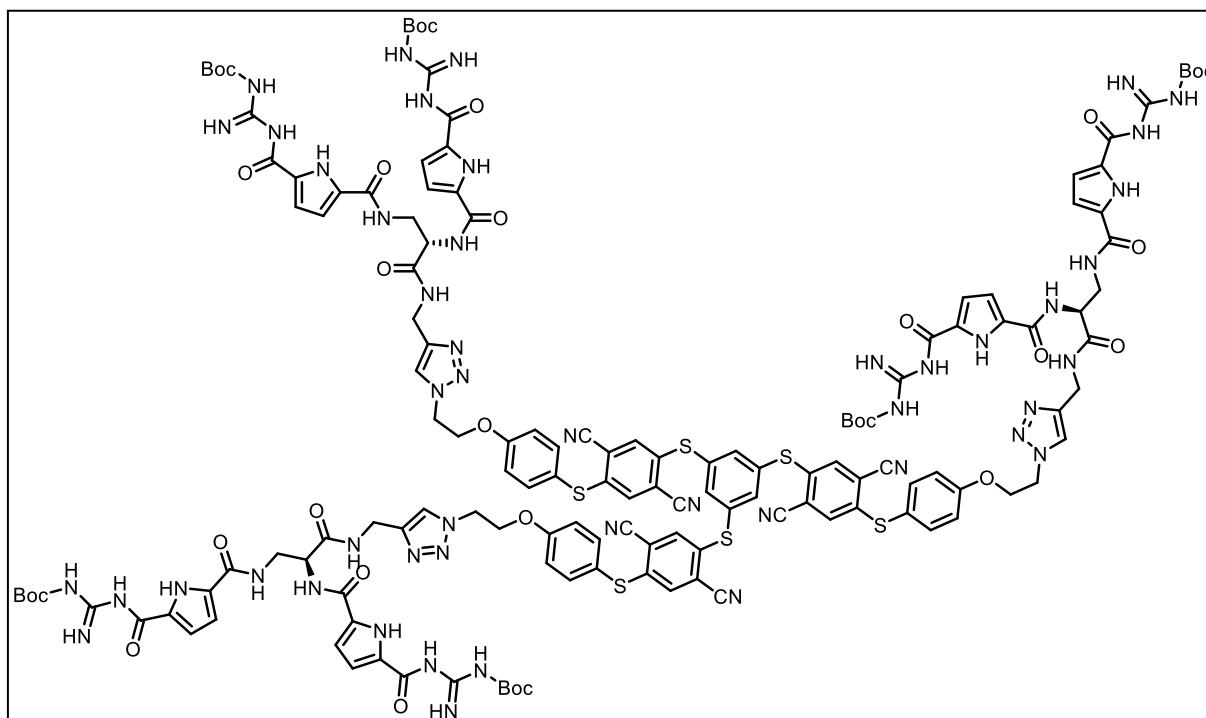
**85** (250 mg, 1.01 mmol), GCP-Aktiv-Ester **86** (1.4 g, 3.56 mmol) und Triethylamin (0.56 mL, 3.95 mmol) wurden in DMF (10 mL) gelöst und über Nacht gerührt. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde in Wasser gefällt und unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/ACN/MeOH = 9/1/0.5)

gereinigt, um **87** (350 mg, 0.48 mmol, 47%) als weißen Feststoff zu erhalten.

**C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>14</sub>O<sub>9</sub>**: 728.73 g/mol

**<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.46 (m, 18H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.54 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 3.66 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 4.60 (q, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.58 Hz, α-CH), 6.82 (m, 4H, Pyrrole-CH), 8.30 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.60 Hz, NH), 8.50 (t, 1H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.44 Hz, NH), 8.59 (m, 3H, NH), 9.35 (s, 2H, NH), 10.89 (s, 2H, NH), 11.49 (br. s, 2H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR:** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 28.3, 38.8, 50.2, 53.7, 112.8, 113.2, 158.9, 160.0, 160.6, 170.6, 112.9, 158.4, 159.5, 171.9.

Geschützter dreiarziger Hydrogelator (**89**)

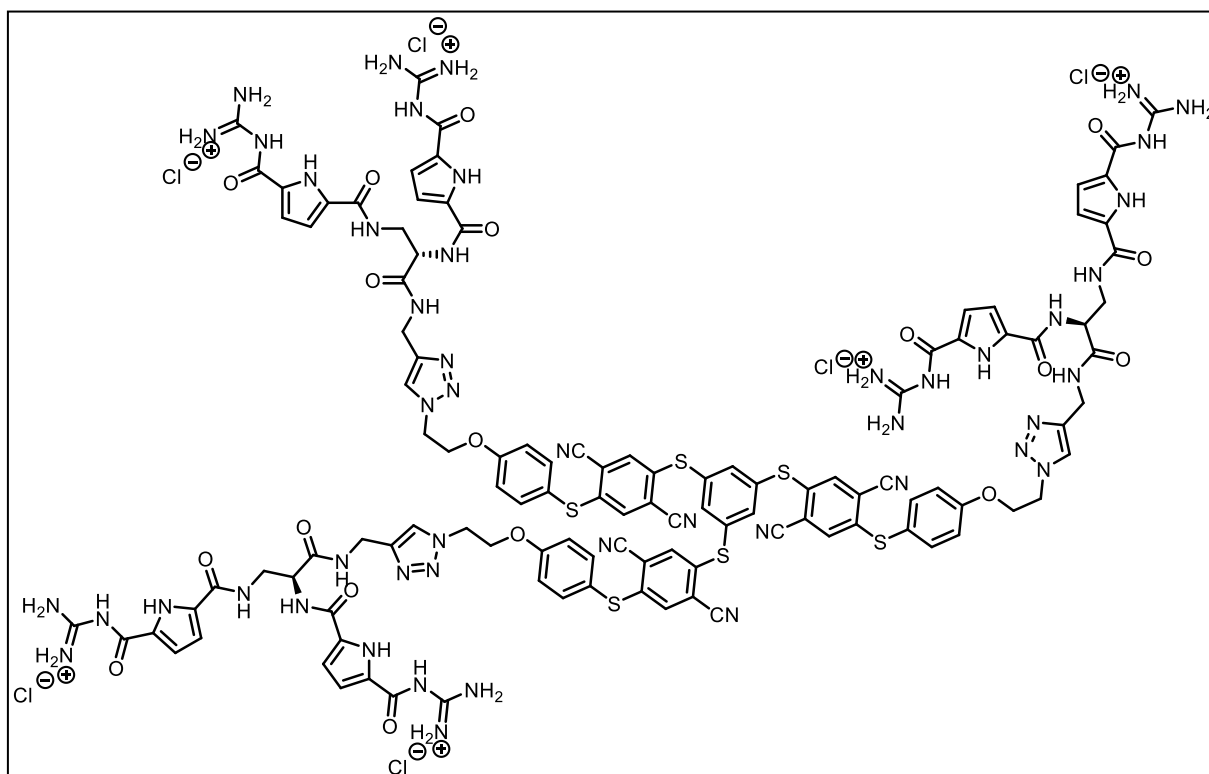
Alkin-Scaffold **88** (55 mg, 0.05 mmol) und **87** (146 mg, 0.20 mmol) wurden in entgastem THF (2 mL) gelöst. Dann wurde eine Lösung aus CuSO<sub>4</sub> (17.6 mg, 0.06 mmol) und Na-L-Ascorbat (28 mg, 0.14 mmol), gelöst in H<sub>2</sub>O (0.5 mL), hinzugefügt. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur 48 h gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der entstandene Feststoff mit einer kleinen Menge THF aufgenommen und in MeOH (20 mL) gefällt. Das Präzipitat wurde im Vakuum getrocknet und mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/ACN/MeOH/NH<sub>3</sub> = 10/1/1/0.1) gereinigt, um **89** (72.6 mg, 0.02 mmol, 45%) als weißen Feststoff zu erhalten.

**C**<sub>144</sub>**H**<sub>150</sub>**N**<sub>48</sub>**O**<sub>30</sub>**S**<sub>6</sub>: 3225.45 g/mol

<sup>1</sup>H NMR: (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 1.46 (m, 54H, Boc-CH<sub>3</sub>), 3.20-3.70 (m, 16H, β-CH<sub>2</sub> & N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.38-4.60 (m, 9H, CH<sub>2</sub>), 5.08 (s, 6H, CH<sub>2</sub>), 6.76-6.96 (m, 12H, Pyrrole-CH), 7.12-7.28 (m, 10H, Triazol-CH & NH), 7.43 (s, 3H, NH), 7.55 (d, 6H, <sup>3</sup>J(H, H) = 8.43 Hz, NH), 8.03 (s, 3H, NH), 8.19 (s, 3H, NH), 8.37 (m, 3H, NH), 8.50-8.75 (m, 10H, NH), 9.39 (br. s, 5H, NH), 10.38-12.23 (m, 10H, NH).

<sup>13</sup>C NMR: (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm] = 28.3, 49.3, 53.9, 61.7, 111.3, 113.3, 114.5, 115.4, 115.8, 117.3, 125.8, 132.9, 132.9, 134.9, 136.4, 137.2, 142.4, 145.4, 160.1, 160.4, 160.7, 170.7.

### Dreiarmer Hydrogelator (53)



**89** (50 mg, 0.02 mmol) wurde in einer Mischung aus MeOH (12 mL) und 1 M HCl (3 mL) gelöst und 3 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, um **53** (42.7 mg, 0.02 mmol, 97%) als weißen Feststoff zu erhalten.

**C<sub>114</sub>H<sub>108</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>48</sub>O<sub>18</sub>S<sub>6</sub>**: 2843.50 g/mol

**<sup>1</sup>H NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 3.16-3.71 (m, 29H, β-CH<sub>2</sub> & N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.36-4.59 (m, 10H, CH<sub>2</sub>), 5.11 (s, 6H, CH<sub>2</sub>), 6.63-6.80 (m, 12H, Pyrrole-CH), 7.19 (d, 8H, <sup>3</sup>J(H, H) = 8.86 Hz, Triazol-CH), 7.26 (s, 3H, NH), 7.43 (s, 6H, NH), 7.56 (d, 6H, <sup>3</sup>J(H, H) = 8.59 Hz, NH), 7.96 (m, 4H, NH), 7.96 (s, 3H, NH), 8.04 (s, 3H, NH), 8.20 (s, 3H, NH), 8.34 (t, 3H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.50 Hz, NH), 8.48 (t, 3H, <sup>3</sup>J(H, H) = 5.03 Hz, NH), 8.59 (d, 3H, <sup>3</sup>J(H, H) = 7.25 Hz, NH), 11.12-11.60 (m, 6H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR:** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ [ppm] = 49.3, 53.8, 61.8, 113.5, 113.9, 114.6, 115.6, 115.8, 117.3, 118.8, 119.6, 125.7, 126.0, 126.2, 132.8, 132.9, 135.0, 136.4, 137.2, 142.5, 145.3, 155.7, 159.6, 160.1, 160.2, 160.3, 160.4, 170.5.

## 8 Literatur

- [1] a) C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017; b) D. B. Amabilino, P. A. Gale, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2376.
- [2] a) R. M. Izatt, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 143; b) F. Huang, E. V. Anslyn, *Chemical reviews* **2015**, *115*, 6999.
- [3] a) J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304; b) J.-M. Lehn, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *67*, 249; c) J.-M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 151; d) J.-M. Lehn, *European Review* **2009**, *17*, 263.
- [4] U. S. Schubert, C. Eschbaumer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2892.
- [5] a) W. Xu, Q. Song, J.-F. Xu, M. J. Serpe, X. Zhang, *ACS applied materials & interfaces* **2017**, *9*, 11368; b) Z. Sun, Q. Huang, T. He, Z. Li, Y. Zhang, L. Yi, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **2014**, *15*, 2421; c) D. F. Stamatialis, B. J. Papenburg, M. Gironés, S. Saiful, S. N.M. Bettahalli, S. Schmitmeier, M. Wessling, *Journal of Membrane Science* **2008**, *308*, 1; d) N. Sahiner, O. Ozay, N. Aktas, *Water Air Soil Pollut* **2013**, *224*, 3720; e) O. Ozay, S. Ekici, Y. Baran, N. Aktas, N. Sahiner, *Water research* **2009**, *43*, 4403; f) O. Ozay, H. Ozay, *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2014**, *51*, 308; g) N. Kashyap, N. Kumar, M. N. V. R. Kumar, *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **2005**, *22*, 107; h) C. L. Esposito, P. Kirilov, V. G. Roullin, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2018**, *271*, 1.
- [6] A. J. Wilson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3289.
- [7] D. P. Ryan, J. M. Matthews, *Current opinion in structural biology* **2005**, *15*, 441.
- [8] D. C. Fry, L. T. Vassilev, *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **2005**, *83*, 955.
- [9] A. Barnard, K. Long, H. L. Martin, J. A. Miles, T. A. Edwards, D. C. Tomlinson, A. Macdonald, A. J. Wilson, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2015**, *54*, 2960.
- [10] H. Yin, A. D. Hamilton, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2005**, *44*, 4130.
- [11] a) M. R. Arkin, Y. Tang, J. A. Wells, *Chemistry & biology* **2014**, *21*, 1102; b) H. Hwang, T. Vreven, J. Janin, Z. Weng, *Proteins* **2010**, *78*, 3111; c) J. C. Fuller, N. J. Burgoyne, R. M. Jackson, *Drug discovery today* **2009**, *14*, 155.
- [12] a) T. Berg, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2003**, *42*, 2462; b) D. Bier, R. Rose, K. Bravo-Rodriguez, M. Bartel, J. M. Ramirez-Anguita, S. Dutt, C. Wilch, F.-G. Klärner, E. Sanchez-Garcia, T. Schrader et al., *Nature chemistry* **2013**, *5*, 234; c) G. Fischer, M. Rossmann, M. Hyvönen, *Current opinion in biotechnology* **2015**, *35*, 78; d) L. Nevola, E. Giralt, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3302; e) M. Skwarczynska, C. Ottmann, *Future medicinal chemistry* **2015**, *7*, 2195.
- [13] L.-G. Milroy, L. Brunsveld, C. Ottmann, *ACS chemical biology* **2013**, *8*, 27.
- [14] a) R. Kubota, I. Hamachi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4454; b) P. J. de Vink, S. A. Andrei, Y. Higuchi, C. Ottmann, L.-G. Milroy, L. Brunsveld, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 2869; c) N. Wang, C. Xin, Z. Li, G. Zhang, L. Bai, Q. Gong, C. Xu, X. Han, C. Yu, L. Li et al., *Dyes and Pigments* **2019**, *163*, 425.

- [15] L.-G. Milroy, T. N. Grossmann, S. Hennig, L. Brunsveld, C. Ottmann, *Chemical reviews* **2014**, *114*, 4695.
- [16] M. W. Peczuh, A. D. Hamilton, *Chemical reviews* **2000**, *100*, 2479.
- [17] A. Gigante, J.-N. Grad, J. Briels, M. Bartel, D. Hoffmann, C. Ottmann, C. Schmuck, *Chem. Commun.* **2018**, *55*, 111.
- [18] A. Gigante, E. Sijbesma, P. A. Sánchez-Murcia, X. Hu, D. Bier, S. Bäcker, S. Knauer, F. Gago, C. Ottmann, C. Schmuck, *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 5322.
- [19] M. Giese, J. Niemeyer, J. Voskuhl, *ChemPlusChem* **2020**, *85*, 985.
- [20] a) J. W. Steed, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3686; b) J. W. Steed, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1379; c) M. Liu, G. Ouyang, D. Niu, Y. Sang, *Org. Chem. Front.* **2018**, *5*, 2885.
- [21] C. M. A. Leenders, M. B. Baker, I. A. B. Pijpers, R. P. M. Lafleur, L. Albertazzi, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Soft matter* **2016**, *12*, 2887.
- [22] N. M. Sangeetha, U. Maitra, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 821.
- [23] E. M. Ahmed, *Journal of advanced research* **2015**, *6*, 105.
- [24] K. Varaprasad, G. M. Raghavendra, T. Jayaramudu, M. M. Yallapu, R. Sadiku, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2017**, *79*, 958.
- [25] A. Vintiloiu, J.-C. Leroux, *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* **2008**, *125*, 179.
- [26] T. R. Hoare, D. S. Kohane, *Polymer* **2008**, *49*, 1993.
- [27] J. Li, D. J. Mooney, *Nature reviews. Materials* **2016**, *1*.
- [28] N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang, *Advanced drug delivery reviews* **2010**, *62*, 83.
- [29] K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chemical reviews* **2001**, *101*, 1869.
- [30] J. L. Drury, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337.
- [31] J. Zhu, R. E. Marchant, *Expert review of medical devices* **2011**, *8*, 607.
- [32] R. Angelico, A. Ceglie, G. Colafemmina, F. Lopez, S. Murgia, U. Olsson, G. Palazzo, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, *21*, 140.
- [33] M. Mahinroosta, Z. Jomeh Farsangi, A. Allahverdi, Z. Shakoory, *Materials Today Chemistry* **2018**, *8*, 42.
- [34] J.-Y. Sun, X. Zhao, W. R. K. Illeperuma, O. Chaudhuri, K. H. Oh, D. J. Mooney, J. J. Vlassak, Z. Suo, *Nature* **2012**, *489*, 133.
- [35] E. Carretti, L. Dei, A. Macherelli, R. G. Weiss, *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **2004**, *20*, 8414.
- [36] S. Naahidi, M. Jafari, M. Logan, Y. Wang, Y. Yuan, H. Bae, B. Dixon, P. Chen, *Biotechnology advances* **2017**, *35*, 530.



- [37] D. Aschmann, S. Riebe, T. Neumann, D. Killa, J.-E. Ostwaldt, C. Wölper, C. Schmuck, J. Voskuhl, *Soft matter* **2019**, *15*, 7117.
- [38] a) J. Li, K. Liu, H. Chen, R. Li, M. Drechsler, F. Bai, J. Huang, B. Z. Tang, Y. Yan, *ACS applied materials & interfaces* **2017**, *9*, 21706; b) J. Li, J. Wang, H. Li, N. Song, D. Wang, B. Z. Tang, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 1144; c) L. Xu, D. Chen, Q. Zhang, T. He, C. Lu, X. Shen, D. Tang, H. Qiu, M. Zhang, S. Yin, *Polym. Chem.* **2018**, *9*, 399.
- [39] D. Yang, Y. Wang, Z. Li, Y. Xu, F. Cheng, P. Li, H. Li, *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6*, 1153.
- [40] M. Noh, T. Kim, H. Lee, C.-K. Kim, S.-W. Joo, K. Lee, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, *359*, 39.
- [41] J. Luo, Z. Xie, J. W. Lam, L. Cheng, H. Chen, C. Qiu, H. S. Kwok, X. Zhan, Y. Liu, D. Zhu et al., *Chem. Commun.* **2001**, 1740.
- [42] Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5361.
- [43] N. L. C. Leung, N. Xie, W. Yuan, Y. Liu, Q. Wu, Q. Peng, Q. Miao, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 15349.
- [44] a) Y.-T. Lee, Y.-T. Chang, C.-T. Chen, C.-T. Chen, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 7020; b) J. L. Banal, K. P. Ghiggino, W. W. H. Wong, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2014**, *16*, 25358; c) A. Pucci, *Isr. J. Chem.* **2018**, *58*, 837.
- [45] a) J. Qian, B. Z. Tang, *Chem* **2017**, *3*, 56; b) X. Wen, Q. Wang, Z. Fan, *Analytica chimica acta* **2018**, *1013*, 79; c) J. Lin, X. Zeng, Y. Xiao, L. Tang, J. Nong, Y. Liu, H. Zhou, B. Ding, F. Xu, H. Tong et al., *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 1219.
- [46] a) X. Yang, Y. Liu, J. Li, Q. Wang, M. Yang, C. Li, *New J. Chem.* **2018**, *42*, 17524; b) B. Li, T. He, X. Shen, D. Tang, S. Yin, *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 796.
- [47] S. Riebe, M. Saccone, J. Stelzer, A. Sowa, C. Wölper, K. Soloviova, C. A. Strassert, M. Giese, J. Voskuhl, *Chemistry, an Asian journal* **2019**, *14*, 814.
- [48] a) P. A. Gale, N. Busschaert, C. J. E. Haynes, L. E. Karagiannidis, I. L. Kirby, *Chemical Society reviews* **2014**, *43*, 205; b) S. Kubik, *Accounts of chemical research* **2017**, *50*, 2870; c) B. Tomapatanaget, T. Tuntulani, O. Chailapakul, *Organic letters* **2003**, *5*, 1539; d) M. Wenzel, J. R. Hiscock, P. A. Gale, *Chemical Society reviews* **2012**, *41*, 480.
- [49] a) P. Blondeau, M. Segura, R. Pérez-Fernández, J. de Mendoza, *Chemical Society reviews* **2007**, *36*, 198; b) C. Schmuck, *Coordination Chemistry Reviews* **2006**, *250*, 3053.
- [50] X. Fu, C.-H. Tan, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2011**, *47*, 8210.
- [51] M. Meot-Ner, *Chemical reviews* **2005**, *105*, 213.
- [52] C. Schmuck, J. Lex, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1779.
- [53] C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 709.
- [54] C. Schmuck, M. Heil, M. Dechantsreiter, U. E. Hackler, *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation* **2001**, *6*, 51.

- [55] D. D. Perrin, *Dissociation constants of organic bases in aqueous solution; Supplement*, Butterworths, London, **1972**.
- [56] C. Schmuck, L. Geiger, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 10486.
- [57] C. Schmuck, T. Rehm, K. Klein, F. Gröhn, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2007**, *46*, 1693.
- [58] a) J. S. Albert, M. S. Goodman, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1143; b) H. H. Zepik, S. A. Benner, *The Journal of organic chemistry* **1999**, *64*, 8080; c) L. Heys, C. G. Moore, P. J. Murphy, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 57; d) K. Ohara, M. Smietana, J.-J. Vasseur, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 283.
- [59] C. Schmuck, *Chem. Commun.* **1999**, 843.
- [60] C. Schmuck, U. Machon, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1109.
- [61] C. Schmuck, L. Geiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8898.
- [62] J. S. Nowick, S. Insaf, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10903.
- [63] a) C. Schmuck, D. Rupprecht, W. Wienand, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 9186; b) C. Schmuck, L. Hernandez-Folgado, *Organic & biomolecular chemistry* **2007**, *5*, 2390.
- [64] G. Drews, *Mikrobiologie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2010**.
- [65] P. Braun, A.-C. Gingras, *Proteomics* **2012**, *12*, 1478.
- [66] S. G. Hedin, *The Biochemical journal* **1906**, *1*, 474.
- [67] a) Q. C. Zhang, D. Petrey, L. Deng, L. Qiang, Y. Shi, C. A. Thu, B. Bisikirska, C. Lefebvre, D. Accili, T. Hunter et al., *Nature* **2012**, *490*, 556; b) M. P. H. Stumpf, T. Thorne, E. de Silva, R. Stewart, H. J. An, M. Lappe, C. Wiuf, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 6959.
- [68] a) E. A. Ponomarenko, E. V. Poverennaya, E. V. Ilgisonis, M. A. Pyatnitskiy, A. T. Kopylov, V. G. Zgoda, A. V. Lisitsa, A. I. Archakov, *International journal of analytical chemistry* **2016**, *2016*, 7436849; b) L. M. Smith, N. L. Kelleher, *Nature methods* **2013**, *10*, 186.
- [69] a) E. L. Huttlin, R. J. Bruckner, J. A. Paulo, J. R. Cannon, L. Ting, K. Baltier, G. Colby, F. Gebreab, M. P. Gygi, H. Parzen et al., *Nature* **2017**, *545*, 505; b) E. L. Huttlin, L. Ting, R. J. Bruckner, F. Gebreab, M. P. Gygi, J. Szpyt, S. Tam, G. Zarraga, G. Colby, K. Baltier et al., *Cell* **2015**, *162*, 425; c) K. Luck, G. M. Sheynkman, I. Zhang, M. Vidal, *Trends in biochemical sciences* **2017**, *42*, 342; d) E. Pournoor, N. Elmi, Y. Masoudi-Sobhanzadeh, A. Masoudi-Nejad, *Informatics in Medicine Unlocked* **2019**, *17*, 100249; e) T. Rolland, M. Taşan, B. Charletoaux, S. J. Pevzner, Q. Zhong, N. Sahni, S. Yi, I. Lemmens, C. Fontanillo, R. Mosca et al., *Cell* **2014**, *159*, 1212; f) M. P. Washburn, *Genome biology* **2016**, *17*, 48; g) L. Bonetta, *Nature* **2010**, *468*, 851.
- [70] M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nature reviews. Drug discovery* **2004**, *3*, 301.
- [71] a) J. M. Davis, L. K. Tsou, A. D. Hamilton, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 326; b) J. P. Plante, T. Burnley, B. Malkova, M. E. Webb, S. L. Warriner, T. A. Edwards, A. J. Wilson, *Chem. Commun.* **2009**, 5091.

- [72] a) J. M. Clark, W. M. Abraham, C. E. Fishman, R. Forteza, A. Ahmed, A. Cortes, R. L. Warne, W. R. Moore, R. D. Tanaka, *American journal of respiratory and critical care medicine* **1995**, *152*, 2076; b) J. F. Molinari, M. Scuri, W. R. Moore, J. Clark, R. Tanaka, W. M. Abraham, *American journal of respiratory and critical care medicine* **1996**, *154*, 649.
- [73] a) P. J. Pereira, A. Bergner, S. Macedo-Ribeiro, R. Huber, G. Matschiner, H. Fritz, C. P. Sommerhoff, W. Bode, *Nature* **1998**, *392*, 306; b) C. P. Sommerhoff, W. Bode, P. J. Pereira, M. T. Stubbs, J. Stürzebecher, G. P. Piechottka, G. Matschiner, A. Bergner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 10984.
- [74] Q.-Q. Jiang, L. Bartsch, W. Sicking, P. R. Wich, D. Heider, D. Hoffmann, C. Schmuck, *Organic & biomolecular chemistry* **2013**, *11*, 1631.
- [75] Q.-Q. Jiang, W. Sicking, M. Ehlers, C. Schmuck, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1792.
- [76] R. Huang, I. K. H. Leung, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2016**, *21*.
- [77] a) H. Hermeking, *Nature reviews. Cancer* **2003**, *3*, 931; b) D. Berg, C. Holzmann, O. Riess, *Nature reviews. Neuroscience* **2003**, *4*, 752; c) C. Anders, Y. Higuchi, K. Koschinsky, M. Bartel, B. Schumacher, P. Thiel, H. Nitta, R. Preisig-Müller, G. Schlichthörl, V. Renigunta et al., *Chemistry & biology* **2013**, *20*, 583; d) P. Steinacker, A. Aitken, M. Otto, *Seminars in cell & developmental biology* **2011**, *22*, 696.
- [78] a) M. B. Yaffe, *FEBS Letters* **2002**, *513*, 53; b) M. K. Dougherty, D. K. Morrison, *Journal of cell science* **2004**, *117*, 1875.
- [79] H. Wu, J. Ge, S. Q. Yao, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2010**, *49*, 6528.
- [80] J. Zhao, Y. Du, J. R. Horton, A. K. Upadhyay, B. Lou, Y. Bai, X. Zhang, L. Du, M. Li, B. Wang et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 16212.
- [81] M. Mori, G. Vignaroli, Y. Cau, J. Dinić, R. Hill, M. Rossi, D. Colecchia, M. Pešić, W. Link, M. Chiariello et al., *ChemMedChem* **2014**, *9*, 973.
- [82] M. Ehlers, J.-N. Grad, S. Mittal, D. Bier, M. Mertel, L. Ohl, M. Bartel, J. Briels, M. Heimann, C. Ottmann et al., *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2018**, *19*, 591.
- [83] M. Molzan, S. Kasper, L. Röglin, M. Skwarczynska, T. Sassa, T. Inoue, F. Breitenbuecher, J. Ohkanda, N. Kato, M. Schuler et al., *ACS chemical biology* **2013**, *8*, 1869.
- [84] P. Thiel, M. Kaiser, C. Ottmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 2012.
- [85] D. J. Hamilton, T. Dekker, H. F. Klein, G. V. Janssen, M. Wijtmans, P. O'Brien, I. J. P. de Esch, *Drug discovery today. Technologies* **2020**, *38*, 77.
- [86] S. A. Andrei, V. Thijssen, L. Brunsveld, C. Ottmann, L.-G. Milroy, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 14809.
- [87] V. Singh, K. Singh, A. Nand, H. Dai, J. Wang, L. Zhang, A. Merino, J. Zhu, *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, *12*, 2111.
- [88] G. Ambrosini, C. Adida, D. C. Altieri, *Nature medicine* **1997**, *3*, 917.

- [89] N. K. Sah, C. Seniya, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **2015**, *36*, 6623.
- [90] L. Chantalat, D. A. Skoufias, J.-P. Kleman, B. Jung, O. Dideberg, R. L. Margolis, *Molecular Cell* **2000**, *6*, 183.
- [91] Y. L. Yang, X. M. Li, *Cell research* **2000**, *10*, 169.
- [92] a) A. A. Jeyaprakash, C. Basquin, U. Jayachandran, E. Conti, *Structure (London, England : 1993)* **2011**, *19*, 1625; b) F. Wang, J. Dai, J. R. Daum, E. Niedzialkowska, B. Banerjee, P. T. Stukenberg, G. J. Gorbosky, J. M. G. Higgins, *Science (New York, N.Y.)* **2010**, *330*, 231.
- [93] A. E. Kelly, C. Ghenoiu, J. Z. Xue, C. Zierhut, H. Kimura, H. Funabiki, *Science (New York, N.Y.)* **2010**, *330*, 235.
- [94] A. A. Jeyaprakash, U. R. Klein, D. Lindner, J. Ebert, E. A. Nigg, E. Conti, *Cell* **2007**, *131*, 271.
- [95] S. K. Knauer, C. Bier, N. Habtemichael, R. H. Stauber, *EMBO reports* **2006**, *7*, 1259.
- [96] a) S. K. Knauer, O. H. Krämer, T. Knösel, K. Engels, F. Rödel, A. F. Kovács, W. Dietmaier, L. Klein-Hitpass, N. Habtemichael, A. Schweitzer et al., *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2007**, *21*, 207; b) S. K. Knauer, W. Mann, R. H. Stauber, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **2007**, *6*, 518.
- [97] D. Engelsma, J. A. Rodriguez, A. Fish, G. Giaccone, M. Fornerod, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **2007**, *8*, 1495.
- [98] S. WHEATLEY, I. MCNEISH, *International Review of Cytology* **2005**, *247*, 35.
- [99] S. J. Riedl, Y. Shi, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2004**, *5*, 897.
- [100] M. S. Mohamed, M. K. Bishr, F. M. Almutairi, A. G. Ali, *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* **2017**, *22*, 1487.
- [101] D. C. Altieri, *The Biochemical journal* **2010**, *430*, 199.
- [102] B. P. Eckelman, G. S. Salvesen, F. L. Scott, *EMBO reports* **2006**, *7*, 988.
- [103] S. M. Srinivasula, J. D. Ashwell, *Molecular Cell* **2008**, *30*, 123.
- [104] T. Dohi, E. Beltrami, N. R. Wall, J. Plescia, D. C. Altieri, *The Journal of clinical investigation* **2004**, *114*, 1117.
- [105] Z. Song, X. Yao, M. Wu, *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 23130.
- [106] H. Marusawa, S.-I. Matsuzawa, K. Welsh, H. Zou, R. Armstrong, I. Tamm, J. C. Reed, *The EMBO journal* **2003**, *22*, 2729.
- [107] L. Bai, S. Wang, *Annual review of medicine* **2014**, *65*, 139.
- [108] F. Li, G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio, D. C. Altieri, *Nature* **1998**, *396*, 580.

- [109] F. Shojaei, F. Yazdani-Nafchi, M. Banitalebi-Dehkordi, M. Chehelgerdi, M. Khorramian-Ghahfarokhi, *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* **2019**, *28*, 365.
- [110] a) W. H. Hoffman, S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen, M. Murphy, *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 3247; b) Y. Xu, F. Fang, G. Ludewig, G. Jones, D. Jones, *DNA and cell biology* **2004**, *23*, 527; c) Y. Jiang, H. I. Saavedra, M. P. Holloway, G. Leone, R. A. Altura, *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 40511; d) L. Tracey, A. Pérez-Rosado, M. J. Artiga, F. I. Camacho, A. Rodríguez, N. Martínez, E. Ruiz-Ballesteros, M. Mollejo, B. Martinez, M. Cuadros et al., *The Journal of pathology* **2005**, *206*, 123; e) V. Vaira, C. W. Lee, H. L. Goel, S. Bosari, L. R. Languino, D. C. Altieri, *Oncogene* **2007**, *26*, 2678.
- [111] C. Vallet, D. Aschmann, C. Beuck, M. Killa, A. Meiners, M. Mertel, M. Ehlers, P. Bayer, C. Schmuck, M. Giese et al., *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2020**, *59*, 5567.
- [112] a) C. Adida, D. Berrebi, M. Peuchmaur, M. Reyes-Mugica, D. C. Altieri, *The Lancet* **1998**, *351*, 882; b) G. Capalbo, C. Rödel, R. H. Stauber, S. K. Knauer, M. Bache, M. Kappler, F. Rödel, *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* **2007**, *183*, 593; c) K. Engels, S. K. Knauer, D. Metzler, C. Simf, O. Struschka, C. Bier, W. Mann, A. F. Kovács, R. H. Stauber, *The Journal of pathology* **2007**, *211*, 532; d) C. Xu, M. Yamamoto-Ibusuki, Y. Yamamoto, S. Yamamoto, S. Fujiwara, K. Murakami, Y. Okumura, L. Yamaguchi, Y. Fujiki, H. Iwase, *Breast cancer (Tokyo, Japan)* **2014**, *21*, 482.
- [113] M. Mobahat, A. Narendran, K. Riabowol, *International journal of molecular sciences* **2014**, *15*, 2494.
- [114] a) J.-S. Chen, J.-C. Liu, L. Shen, K.-M. Rau, H.-P. Kuo, Y. M. Li, D. Shi, Y.-C. Lee, K.-J. Chang, M.-C. Hung, *Cancer gene therapy* **2004**, *11*, 740; b) X. Chen, N. Duan, C. Zhang, W. Zhang, *Journal of Cancer* **2016**, *7*, 314; c) C. Chen, D. Yue, L. Lei, H. Wang, J. Lu, Y. Zhou, S. Liu, T. Ding, M. Guo, L. Xu, *Molecular therapy. Nucleic acids* **2018**, *11*, 508.
- [115] M. Pennati, M. Folini, N. Zaffaroni, *Expert opinion on therapeutic targets* **2008**, *12*, 463.
- [116] S. M. Schmidt, K. Schag, M. R. Müller, M. M. Weck, S. Appel, L. Kanz, F. Grünebach, P. Brossart, *Blood* **2003**, *102*, 571.
- [117] S. Reker, A. Meier, L. Holten-Andersen, I. M. Svane, J. C. Becker, P. thor Straten, M. H. Andersen, *Cancer biology & therapy* **2004**, *3*, 173.
- [118] a) D. C. Talbot, J. Davies, S. Callies, V. Andre, M. Lahn, J. Ang, J. S. de Bono, M. Ranson, *JCO* **2008**, *26*, 3518; b) P. Wiechno, B. G. Somer, B. Mellado, P. L. Chłosta, J. M. Cervera Grau, D. Castellano, C. Reuter, M. Stöckle, J. Kamradt, J. Pikiel et al., *European urology* **2014**, *65*, 516.
- [119] a) M. Pennati, G. Colella, M. Folini, L. Citti, M. G. Daidone, N. Zaffaroni, *The Journal of clinical investigation* **2002**, *109*, 285; b) M. Pennati, M. Binda, M. de Cesare, G. Pratesi, M. Folini, L. Citti, M. G. Daidone, F. Zunino, N. Zaffaroni, *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 1129.
- [120] a) H. Dong, L. Yao, W. Bi, F. Wang, W. Song, Y. Lv, *Journal of cancer research and therapeutics* **2015**, *11*, 717; b) Z. Liu, T. Wang, Z. Zhang, S. Tang, S. Feng, M. Yue, M. Hu, L. Xuan, Y. Chen, *Oncology letters* **2017**, *13*, 2723.

- [121] a) R. A. Fenstermaker, M. J. Ciesielski, J. Qiu, N. Yang, C. L. Frank, K. P. Lee, L. R. Mechtler, A. Belal, M. S. Ahluwalia, A. D. Hutson, *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2016**, *65*, 1339; b) J. Plescia, W. Salz, F. Xia, M. Pennati, N. Zaffaroni, M. G. Daidone, M. Meli, T. Dohi, P. Fortugno, Y. Nefedova et al., *Cancer Cell* **2005**, *7*, 457; c) D. S. O'Connor, N. R. Wall, A. C.G. Porter, D. C. Altieri, *Cancer Cell* **2002**, *2*, 43.
- [122] a) K. D. Lewis, W. Samlowski, J. Ward, J. Catlett, L. Cranmer, J. Kirkwood, D. Lawson, E. Whitman, R. Gonzalez, *Investigational new drugs* **2011**, *29*, 161; b) H. Garg, P. Suri, J. C. Gupta, G. P. Talwar, S. Dubey, *Cancer cell international* **2016**, *16*, 49.
- [123] M. R. Clemens, O. A. Gladkov, E. Gartner, V. Vladimirov, J. Crown, J. Steinberg, F. Jie, A. Keating, *Breast cancer research and treatment* **2015**, *149*, 171.
- [124] A. W. Tolcher, A. Mita, L. D. Lewis, C. R. Garrett, E. Till, A. I. Daud, A. Patnaik, K. Papadopoulos, C. Takimoto, P. Bartels et al., *JCO* **2008**, *26*, 5198.
- [125] R. Dong, Y. Pang, Y. Su, X. Zhu, *Biomaterials science* **2015**, *3*, 937.
- [126] A. H. Karoyo, L. D. Wilson, *Gels (Basel, Switzerland)* **2017**, *3*.
- [127] N. Peppas, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50*, 27.
- [128] S. Bale, V. Banks, S. Haglestein, K. G. Harding, *Journal of wound care* **1998**, *7*, 65.
- [129] B. Kurt, U. Gulyuz, D. D. Demir, O. Okay, *European Polymer Journal* **2016**, *81*, 12.
- [130] X. LI, W. WU, W. LIU, *Carbohydrate Polymers* **2008**, *71*, 394.
- [131] X.-Z. Zhang, P. Jo Lewis, C.-C. Chu, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3299.
- [132] a) G. Mocanu, D. Mihai, V. Dulong, L. Picton, D. Le Cerf, *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 1440; b) P. Saunders, *Anthurium A Caribbean Studies Journal* **2018**, *6*, 1.
- [133] B. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee, S. W. Kim, *Nature* **1997**, *388*, 860.
- [134] V. Percec, T. K. Bera, R. J. Butera, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 272.
- [135] J. P. Baker, H. W. Blanch, J. M. Prausnitz, *Polymer* **1995**, *36*, 1061.
- [136] J.-O. You, D. T. Auguste, *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **2010**, *26*, 4607.
- [137] L. Feng, Y. Jia, X. Chen, X. Li, L. An, *The Journal of chemical physics* **2010**, *133*, 114904.
- [138] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S. K. Bannerjee, *International journal of pharmaceutical investigation* **2012**, *2*, 2.
- [139] T. F. A. de Greef, M. M. J. Smulders, M. Wolffs, A. P. H. J. Schenning, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer, *Chemical reviews* **2009**, *109*, 5687.
- [140] A. Ciferri, *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 511.
- [141] J. Dudowicz, K. F. Freed, J. F. Douglas, *The Journal of chemical physics* **2003**, *119*, 12645.
- [142] a) R. B. Martin, *Chemical reviews* **1996**, *96*, 3043; b) J. R. Henderson, *Phys. Rev. E* **1997**, *55*, 5731; c) J. F. Douglas, J. Dudowicz, K. F. Freed, *The Journal of chemical physics* **2008**, *128*, 224901; d) D. Zhao, J. S. Moore, *Organic & biomolecular chemistry* **2003**, *1*, 3471.

- [143] H. Jacobson, W. H. Stockmayer, *The Journal of chemical physics* **1950**, *18*, 1600.
- [144] G. Ercolani, L. Mandolini, P. Mencarelli, S. Roelens, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3901.
- [145] a) L. Mandolini in *Advances in Physical Organic Chemistry*, Elsevier, **1986**, pp. 1–111; b) M. I. Page, W. P. Jencks, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, *68*, 1678; c) C. Galli, L. Mandolini, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000*, 3117.
- [146] F. Ferrone in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **1999**, pp. 256–274.
- [147] a) C. Cabaleiro-Lago, F. Quinlan-Pluck, I. Lynch, S. Lindman, A. M. Minogue, E. Thulin, D. M. Walsh, K. A. Dawson, S. Linse, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15437; b) S. Linse, C. Cabaleiro-Lago, W.-F. Xue, I. Lynch, S. Lindman, E. Thulin, S. E. Radford, K. A. Dawson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 8691.
- [148] S. S. Rogers, M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley, E. van der Linden, A. M. Donald, *Biophysical journal* **2006**, *90*, 1043.
- [149] a) Z. Cao, F. A. Ferrone, *Journal of Molecular Biology* **1996**, *256*, 219; b) F. A. Ferrone, J. Hofrichter, H. R. Sunshine, W. A. Eaton, *Biophysical journal* **1980**, *32*, 361; c) F. A. Ferrone, J. Hofrichter, W. A. Eaton, *Journal of Molecular Biology* **1985**, *183*, 611; d) F. A. Ferrone, J. Hofrichter, W. A. Eaton, *Journal of Molecular Biology* **1985**, *183*, 591.
- [150] S. B. Padrick, A. D. Miranker, *Biochemistry* **2002**, *41*, 4694.
- [151] W.-F. Xue, S. W. Homans, S. E. Radford, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 8926.
- [152] a) K. P. Nair, V. Breedveld, M. Weck, *Macromolecules* **2008**, *41*, 3429; b) E. Kolomiets, J.-M. Lehn, *Chem. Commun.* **2005**, 1519; c) J.-M. Lehn, *Progress in Polymer Science* **2005**, *30*, 814; d) A. Ciesielski, A. R. Stefankiewicz, F. Hanke, M. Persson, J.-M. Lehn, P. Samorì, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2011**, *7*, 342; e) T. Park, S. C. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11582; f) E. M. Todd, S. C. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14534.
- [153] a) A. Ustinov, H. Weissman, E. Shirman, I. Pinkas, X. Zuo, B. Rybtchinski, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16201; b) E. Obert, M. Bellot, L. Bouteiller, F. Andrioletti, C. Lehen-Ferrenbach, F. Boué, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15601.
- [154] a) S. Fujii, J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 7635; b) I. Danila, F. Riobé, F. Piron, J. Puigmartí-Luis, J. D. Wallis, M. Linares, H. Ågren, D. Beljonne, D. B. Amabilino, N. Avarvari, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8344; c) H. Fenniri, B.-L. Deng, A. E. Ribbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11064; d) V. Dehm, Z. Chen, U. Baumeister, P. Prins, L. D. A. Siebbeles, F. Würthner, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1085.
- [155] a) G. R. Whittell, M. D. Hager, U. S. Schubert, I. Manners, *Nature materials* **2011**, *10*, 176; b) C.-F. Chow, S. Fujii, J.-M. Lehn, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2007**, *46*, 5007; c) W. C. Yount, D. M. Loveless, S. L. Craig, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14488; d) D. Xu, J. L. Hawk, D. M. Loveless, S. L. Jeon, S. L. Craig, *Macromolecules* **2010**, *43*, 3556; e) D. Xu, S. L. Craig, *Macromolecules* **2011**, *44*, 5465; f) F. S. Han, M. Higuchi, D. G. Kurth, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3928; g) R. R. Pal, M. Higuchi, D. G. Kurth, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3562; h) F. S. Han, M. Higuchi, D. G.

- Kurth, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2073; i) G. Schwarz, Y. Bodenthin, Z. Tomkowicz, W. Haase, T. Geue, J. Kohlbrecher, U. Pietsch, D. G. Kurth, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 547.
- [156] a) A. V. Ambade, S. K. Yang, M. Weck, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 2894; b) S.-L. Li, T. Xiao, B. Hu, Y. Zhang, F. Zhao, Y. Ji, Y. Yu, C. Lin, L. Wang, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10755; c) S. K. Yang, A. V. Ambade, M. Weck, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1637; d) S.-L. Li, T. Xiao, Y. Wu, J. Jiang, L. Wang, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6903; e) G. Gröger, W. Meyer-Zaika, C. Böttcher, F. Gröhn, C. Ruthard, C. Schmuck, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8961; f) S.-G. Chen, Y. Yu, X. Zhao, Y. Ma, X.-K. Jiang, Z.-T. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11124; g) Z. Niu, F. Huang, H. W. Gibson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2836.
- [157] X. Yan, F. Wang, B. Zheng, F. Huang, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 6042.
- [158] Y. Liu, Y. Yu, J. Gao, Z. Wang, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 6576.
- [159] C. Fouquey, J.-M. Lehn, A.-M. Levelut, *Adv. Mater.* **1990**, *2*, 254.
- [160] R. P. Sijbesma, F. H. Beijer, L. Brunsveld, B. J. Folmer, J. H. Hirschberg, R. F. Lange, J. K. Lowe, E. W. Meijer, *Science (New York, N.Y.)* **1997**, *278*, 1601.
- [161] J. H. Hirschberg, L. Brunsveld, A. Ramzi, J. A. Vekemans, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer, *Nature* **2000**, *407*, 167.
- [162] a) R. Knapp, A. Schott, M. Rehahn, *Macromolecules* **1996**, *29*, 478; b) M. Burnworth, D. Knapton, S. J. Rowan, C. Weder, *J Inorg Organomet Polym* **2007**, *17*, 91; c) J. P. Sauvage, J. P. Collin, J. C. Chambron, S. Guillerez, C. Coudret, V. Balzani, F. Barigelletti, L. de Cola, L. Flamigni, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 993; d) U. S. Schubert, C. Eschbaumer, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3016.
- [163] a) W. S. Jeon, E. Kim, Y. H. Ko, I. Hwang, J. W. Lee, S.-Y. Kim, H.-J. Kim, K. Kim, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2004**, *44*, 87; b) R. Nally, L. Isaacs, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7249; c) H.-J. Kim, J. Heo, W. S. Jeon, E. Lee, J. Kim, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1574; d) Y. H. Ko, K. Kim, J.-K. Kang, H. Chun, J. W. Lee, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, J. C. Fettinger, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1932; e) U. Rauwald, O. A. Scherman, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 3950.
- [164] K. Basu, A. Baral, S. Basak, A. Dehsorkhi, J. Nanda, D. Bhunia, S. Ghosh, V. Castelletto, I. W. Hamley, A. Banerjee, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5045.
- [165] R. Lin, H. Cui, *Current Opinion in Chemical Engineering* **2015**, *7*, 75.
- [166] J. Naskar, G. Palui, A. Banerjee, *The journal of physical chemistry. B* **2009**, *113*, 11787.
- [167] J. Nanda, A. Banerjee, *Soft matter* **2012**, *8*, 3380.
- [168] L. Qin, P. Duan, F. Xie, L. Zhang, M. Liu, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10823.
- [169] Q. Xu, T. Kuang, Y. Liu, L. Cai, X. Peng, T. Sreenivasan Sreepasad, P. Zhao, Z. Yu, N. Li, *Journal of materials chemistry. B* **2016**, *4*, 7204.
- [170] J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11718.
- [171] M. Hayduk, S. Riebe, J. Voskuhl, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 12221.



- [172] a) Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2009**, 4332; b) A. Qin, J. W. Y. Lam, L. Tang, C. K. W. Jim, H. Zhao, J. Sun, B. Z. Tang, *Macromolecules* **2009**, *42*, 1421; c) S. K. Samanta, S. Bhattacharya, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 25277; d) F. Hu, S. Xu, B. Liu, *Adv. Mater.* **2018**, *30*, e1801350; e) J. Liu, Y.-Q. Fan, S.-S. Song, G.-F. Gong, J. Wang, X.-W. Guan, H. Yao, Y.-M. Zhang, T.-B. Wei, Q. Lin, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**; f) X. Wang, Z. Ding, Y. Ma, Y. Zhang, H. Shang, S. Jiang, *Soft matter* **2019**, *15*, 1658.
- [173] B. Li, Y. Zhang, B. Yan, D. Xiao, X. Zhou, J. Dong, Q. Zhou, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 7118.
- [174] M.-Y. Yeh, C.-W. Huang, J.-W. Chang, Y.-T. Huang, J.-H. Lin, S.-M. Hsu, S.-C. Hung, H.-C. Lin, *Soft matter* **2016**, *12*, 6347.
- [175] Z. Wang, J. Nie, W. Qin, Q. Hu, B. Z. Tang, *Nature communications* **2016**, *7*, 12033.
- [176] C. Zhang, C. Liu, X. Xue, X. Zhang, S. Huo, Y. Jiang, W.-Q. Chen, G. Zou, X.-J. Liang, *ACS applied materials & interfaces* **2014**, *6*, 757.
- [177] M. Biancalana, S. Koide, *Biochimica et biophysica acta* **2010**, *1804*, 1405.
- [178] C. Zhang, Y. Li, X. Xue, P. Chu, C. Liu, K. Yang, Y. Jiang, W.-Q. Chen, G. Zou, X.-J. Liang, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4168.
- [179] J. P. Schneider, D. J. Pochan, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Pakstis, J. Kretsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15030.
- [180] C. M. Rufo, Y. S. Moroz, O. V. Moroz, J. Stöhr, T. A. Smith, X. Hu, W. F. DeGrado, I. V. Korendovych, *Nature chemistry* **2014**, *6*, 303.
- [181] N.-T. Chu, R. D. Chakravarthy, N.-C. Shih, Y.-H. Lin, Y.-C. Liu, J.-H. Lin, H.-C. Lin, *RSC Adv.* **2018**, *8*, 20922.
- [182] A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani, R. V. Ulijn, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 37.
- [183] D. Aschmann, C. Vallet, S. K. Tripathi, Y. B. Ruiz-Blanco, M. Brabender, C. Schmuck, E. Sanchez-Garcia, S. K. Knauer, M. Giese, *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2022**, *23*, e202100618.
- [184] C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 324.
- [185] E. Niedzialkowska, F. Wang, P. J. Porebski, W. Minor, J. M. G. Higgins, P. T. Stukenberg, *Molecular biology of the cell* **2012**, *23*, 1457.
- [186] J. Pampalona, E. Roscioli, W. T. Silkworth, B. Bowden, A. Genescà, L. Tusell, D. Cimini, *PLoS one* **2016**, *11*, e0147420.
- [187] N. C. Baudoin, D. Cimini, *Chromosoma* **2018**, *127*, 215.
- [188] a) D. Cimini, B. Howell, P. Maddox, A. Khodjakov, F. Degrassi, E. D. Salmon, *The Journal of cell biology* **2001**, *153*, 517; b) D. Cimini, B. Moree, J. C. Canman, E. D. Salmon, *Journal of cell science* **2003**, *116*, 4213.

- [189] a) Y. Li, D. Liu, Y. Zhou, Y. Li, J. Xie, R. J. Lee, Y. Cai, L. Teng, *Journal of Cancer* **2015**, *6*, 1187; b) X.-Q. Chen, S. Yang, Z.-Y. Li, H.-S. Lu, M.-Q. Kang, T.-Y. Lin, *Molecular medicine reports* **2012**, *5*, 917.
- [190] a) Y. Miao, V. A. Feher, J. A. McCammon, *Journal of chemical theory and computation* **2015**, *11*, 3584; b) Y. T. Pang, Y. Miao, Y. Wang, J. A. McCammon, *Journal of chemical theory and computation* **2017**, *13*, 9.
- [191] J. Hatai, C. Schmuck, *Accounts of chemical research* **2019**, *52*, 1709.
- [192] R. H. Stauber, W. Mann, S. K. Knauer, *Cancer research* **2007**, *67*, 5999.
- [193] Y. B. Ruiz-Blanco, E. Sanchez-Garcia, *Journal of chemical theory and computation* **2020**, *16*, 1396.
- [194] J. A. Rodríguez, S. W. Span, C. G. M. Ferreira, F. A. E. Kruyt, G. Giaccone, *Experimental cell research* **2002**, *275*, 44.
- [195] I. García-Santisteban, I. Arregi, M. Alonso-Mariño, M. A. Urbaneja, J. J. Garcia-Vallejo, S. Bañuelos, J. A. Rodríguez, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2016**, *73*, 4685.
- [196] S. Riebe, C. Vallet, F. van der Vight, D. Gonzalez-Abradelo, C. Wölper, C. A. Strassert, G. Jansen, S. Knauer, J. Voskuhl, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 13660.
- [197] J. Stelzer, C. Vallet, A. Sowa, D. Gonzalez-Abradelo, S. Riebe, C. G. Daniliuc, M. Ehlers, C. A. Strassert, S. K. Knauer, J. Voskuhl, *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 985.
- [198] L. Rojas-Sánchez, V. Sokolova, S. Riebe, J. Voskuhl, M. Epple, *ChemNanoMat* **2019**, *5*, 436.
- [199] S. Riebe, M. Saccone, J. Stelzer, A. Sowa, C. Wölper, K. Soloviova, C. A. Strassert, M. Giese, J. Voskuhl, *Chem. Asian J.* **2019**, *14*, 814.
- [200] M. Li, S. Schlesiger, S. K. Knauer, C. Schmuck, *Organic & biomolecular chemistry* **2016**, *14*, 8800.
- [201] S. Dong, B. Zheng, D. Xu, X. Yan, M. Zhang, F. Huang, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3191.
- [202] D. Y. Alene, R. Arumugaperumal, M. Shellaiiah, K. W. Sun, W.-S. Chung, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 2772.
- [203] M. Martínez-Abadía, S. Varghese, J. Gierschner, R. Giménez, M. B. Ros, *J. Mater. Chem. C* **2022**, *10*, 12012.
- [204] Y. Hu, H. Wang, J. Wang, S. Wang, W. Liao, Y. Yang, Y. Zhang, D. Kong, Z. Yang, *Organic & biomolecular chemistry* **2010**, *8*, 3267.
- [205] A. R. Patel, M. Babaahmadi, A. Lesaffer, K. Dewettinck, *Journal of agricultural and food chemistry* **2015**, *63*, 4862.
- [206] M. Externbrink, S. Riebe, C. Schmuck, J. Voskuhl, *Soft matter* **2018**, *14*, 6166.
- [207] J. Harathi, K. Thenmozhi, *Mater. Chem. Front.* **2020**, *4*, 1471.
- [208] N. B. Shustova, B. D. McCarthy, M. Dincă, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20126.

- [209] a) B. Alberts, *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New York, **2008**; b) B. Fultz, J. M. Howe, *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*, Springer, Berlin, New York, **2008**.
- [210] a) P. Jana, M. Ehlers, E. Zellermann, K. Samanta, C. Schmuck, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 15287; b) M. Simonyi, Z. Bikádi, F. Zsila, J. Deli, *Chirality* **2003**, *15*, 680; c) N. Zhao, N. Kumar, K. Neuenschwander, K. Nakanishi, N. Berova, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7844; d) S. Matile, N. Berova, K. Nakanishi, S. Novkova, I. Philipova, B. Blagoev, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7021; e) S. Matile, N. Berova, K. Nakanishi, J. Fleischhauer, R. W. Woody, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5198; f) R. V. Person, K. Monde, H. U. Humpf, N. Berova, K. Nakanishi, *Chirality* **1995**, *7*, 128.
- [211] E. Valkov, T. Sharpe, M. Marsh, S. Greive, M. Hyvönen, *Topics in current chemistry* **2012**, *317*, 145.
- [212] R. J. Kelly, A. Thomas, A. Rajan, G. Chun, A. Lopez-Chavez, E. Szabo, S. Spencer, C. A. Carter, U. Guha, S. Khozin et al., *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2013**, *24*, 2601.
- [213] R. Wirth, J. D. White, A. D. Moghaddam, A. L. Ginzburg, L. N. Zakharov, M. M. Haley, V. J. DeRose, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15169.

## 9 Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.





# 10 Anhang

## 10.1 Abkürzungsverzeichnis

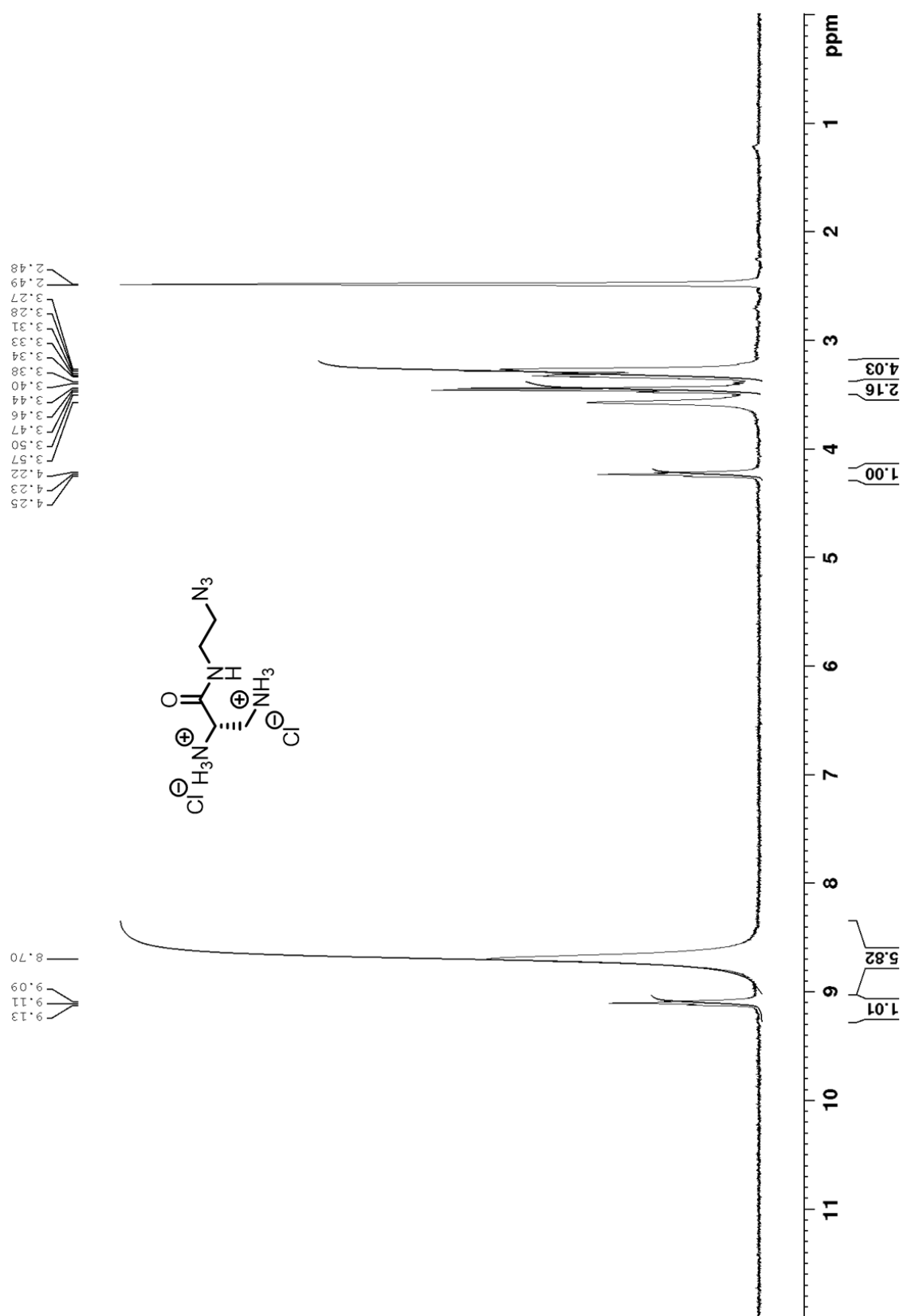
°	Grad	BIR	<i>Baculovirus IAP-Repeat</i>
$\alpha$	Alpha	BIRC5	<i>baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 5</i>
$\beta$	Beta	Bn	Benzyl
$\gamma$	Gamma	Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
$\delta$	Chemische Verschiebung	Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
$\Delta G$	Gibbsche freie Energie	br.	breit
$\Delta H$	freie Enthalpie	c	Konzentration
$\Delta S$	freie Entropie	C	Kohlenstoff/Celsius
$\varepsilon$	Epsilon	c-IAP1	zelluläres IAP1
$\eta$	Eta	CARD	<i>caspase-associated recruitment domain</i>
$\tau$	Tau	Cbz	Benzyloxycarbonyl
$\mu$	Mikro	CD	Circulardichroismus
$\lambda$	Wellenlänge	CGC	<i>critical gelation concentration</i>
$\zeta$	Zeta	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
<sup>1</sup> H	Wasserstoffisotop 1	CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
<sup>13</sup> C	Kohlenstoffisotop 13	CL-FEP	<i>Central Limit Free Energy Perturbation</i>
Å	Ångström	CPC	<i>chromosomal passenger complex</i>
abs.	absolut	CT-WW	Ladungstransferwechselwirkungen
Ac	Acetyl	CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
ACN	Acetonitril	Cy	Cyclohexan
ACQ	<i>aggregation caused quenching</i>	d	Dublett
AFM	<i>atomic force microscope</i>	D	Asparaginsäure
AIE	<i>aggregation induced emission</i>	DAP	Diaminopropyl
Ala	Alanin	DCM	Dichlormethan
Am	Amid	DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
Äq.	Äquivalent	DLS	<i>dynamic light scattering</i>
Arg	Arginin	DMF	Dimethylformamid
AS	Aminosäure		
ATR	<i>attenuated total reflection</i>		

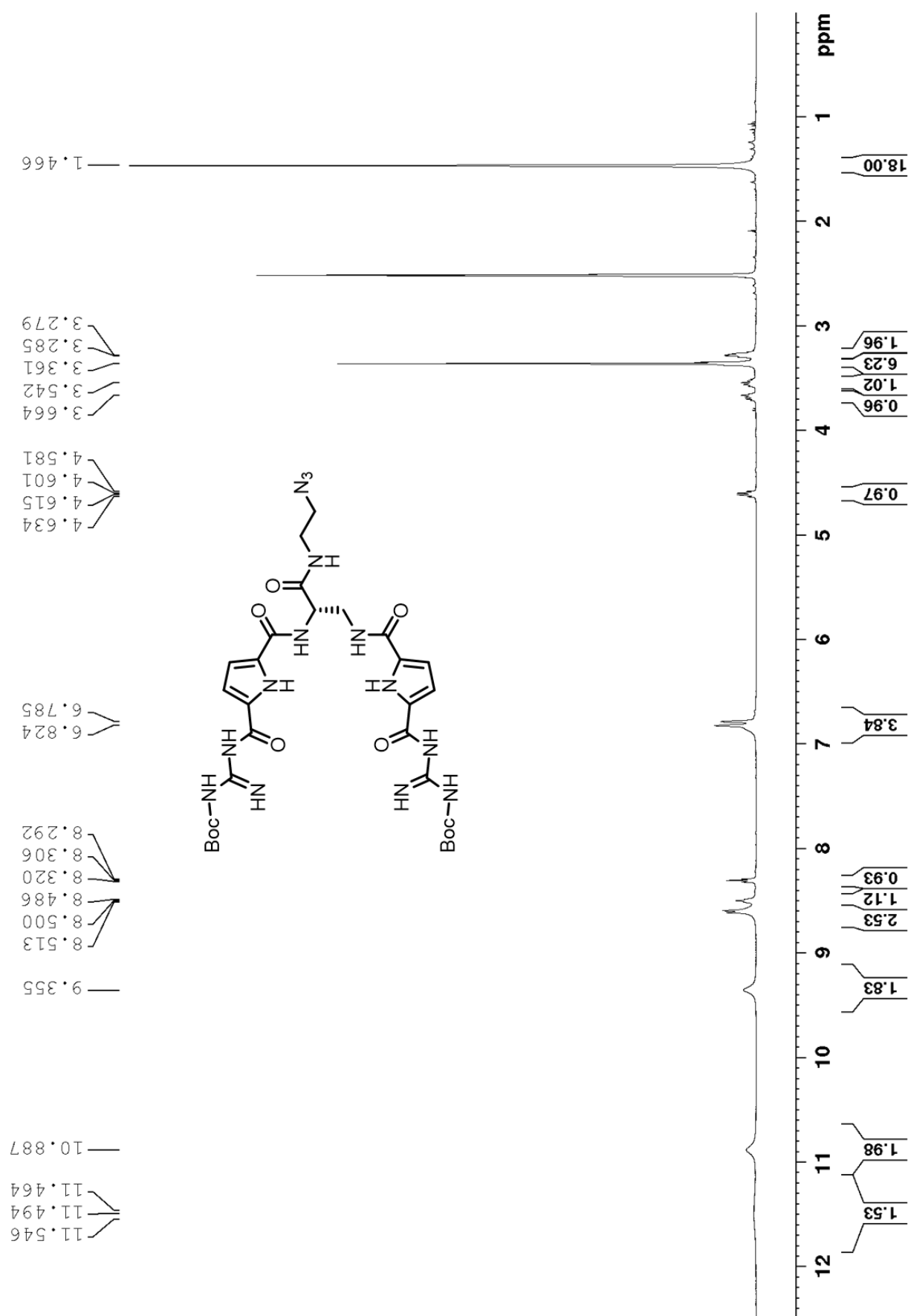
DMSO	Dimethylsulfoxid	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
DTT	Dithiothreitol	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
E	Glutaminsäure	HR-MS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
EA	Ethylacetat	HSCT	wirtsstabilisierte Ladungstransferwechselwirkungen
EC <sub>50</sub>	mittlere Hemmkonzentration	Hz	Hertz
EDC*HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid	IAP	<i>inhibitors of apoptosis protein</i>
ESI	Elektronensprayionisation	INCENP	innere Zentromerprotein
Et	Ethyl	IR	Infrarot
Et <sub>2</sub> O	Diethylether	ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
et al.	et alii	K	Lysin
F	Phenylalanin	K <sub>ass</sub>	Assoziationskonstante
FP	Fluoreszenzpolarisation	K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
g	Gramm	K <sub>inter</sub>	intermolekulare Assoziationskonstante
G	Glycin	K <sub>intra</sub>	intramolekulare Assoziationskonstante
GCP	Guanidiniocarbonylpyrrol	kat.	Katalysator
Glu	Glutaminsäure	kcal	Kilokalorie
Gly	Glycin	KMnO <sub>4</sub>	Kaliumpermanganat
G'	Speichermodul	L	Leucin
G''	Verlustmodul	Lys	Lysin
h	Stunde	m	Milli/Multiplett
H	Proton	MA	Malonsäure
H <sub>2</sub>	Wasserstoff	MD	Molekulardynamik
H <sub>2</sub> O	Wasser	Me	Methyl
HA	Hämagglutinin	MeOH	Methanol
HCl	Salzsäure	MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
HCTU	2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiumhexafluorophosphat	min	Minute
HeLa	Henrietta Lacks	MPLC	<i>medium pressure liquid chromatography</i>



mRNA	<i>messenger RNA</i>	quant.	quantitativ
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium	R	Arginin
m/z	Masse pro Ladung	RIM	<i>restriction of intramolecular motion</i>
n	Nano	RING	<i>really interesting new gene</i>
N	Stickstoff	RIV	<i>restriction of intramolecular vibration</i>
NaHSO <sub>4</sub>	Natriumhydrogensulfat	RNS	Ribonukleinsäure
NAIP	neuronales Apoptose-Inhibitor-Protein	RP	Reversphase
NaOH	Natriumhydroxid	RT	Raumtemperatur
NES	<i>nuclear export signal</i>	s	Singulett/Sekunde
Net <sub>3</sub>	Triethylamin	S	Serin
NH <sub>3</sub>	Ammoniak	SiO <sub>2</sub>	Silikagel
NLS	<i>nuclear localizing signal</i>	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
NMM	4-Methylmorpholin	SOCl <sub>2</sub>	Thionylchlorid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>	sog.	Sogenannte
NOE	<i>nuclear overhauser effect</i>	t	Triplett
O	Sauerstoff	T	Threonin
P	Prolin	TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle	TEA	Triethylamin
pH	<i>pondus hydrogenii</i>	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Phe	Phenylalanin	TFA	Trifluoressigsäure
PIDA	(Diacetoxyiodo)benzol	THF	Tetrahydrofuran
pK <sub>s</sub>	Säurekonstante	TPE	Tetraphenylethylen
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>	Trp	Tryptophan
pos.	positiv	UV	Ultraviolett
PPI	Protein-Protein-Interaktionen	V	Valin
ppm	parts per million	Vis	<i>visible</i>
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat	Val	Valin
q	Quadruplet	W	Tryptophan
Q	Glutamin	WT	Wildtyp
		X-Ray	Röntgenstrahlung
		XIAP	gebundener Inhibitor des Apoptose-Proteins

z.B. zum Beispiel

10.2  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren**Abb. 87:**  $^1\text{H-NMR}$  von Verbindung **85** in  $\text{DMSO-d}_6$ .



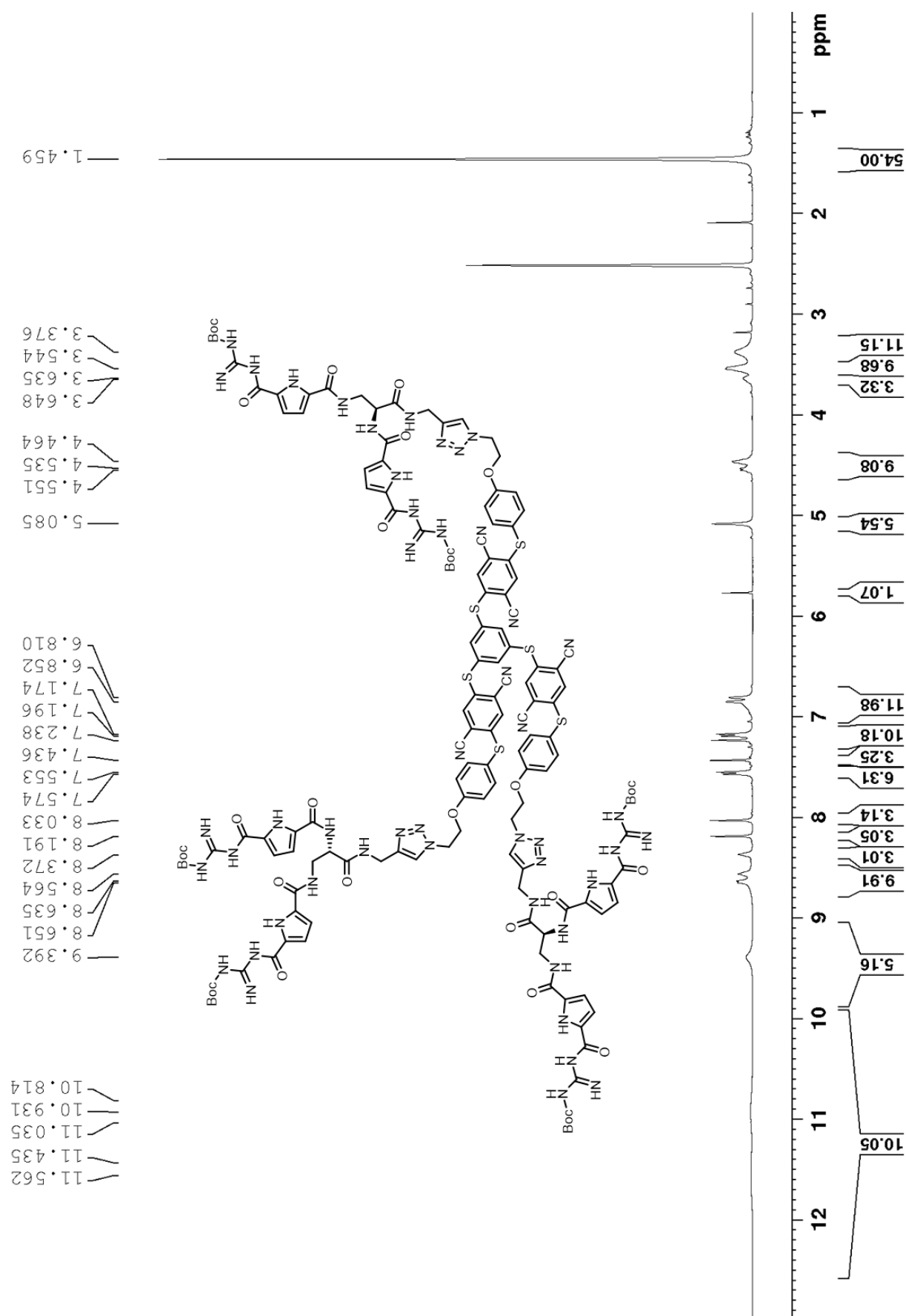


Abb. 89:  $^1\text{H-NMR}$  des geschützten Gelators **84** in  $\text{DMSO-d}_6$ .

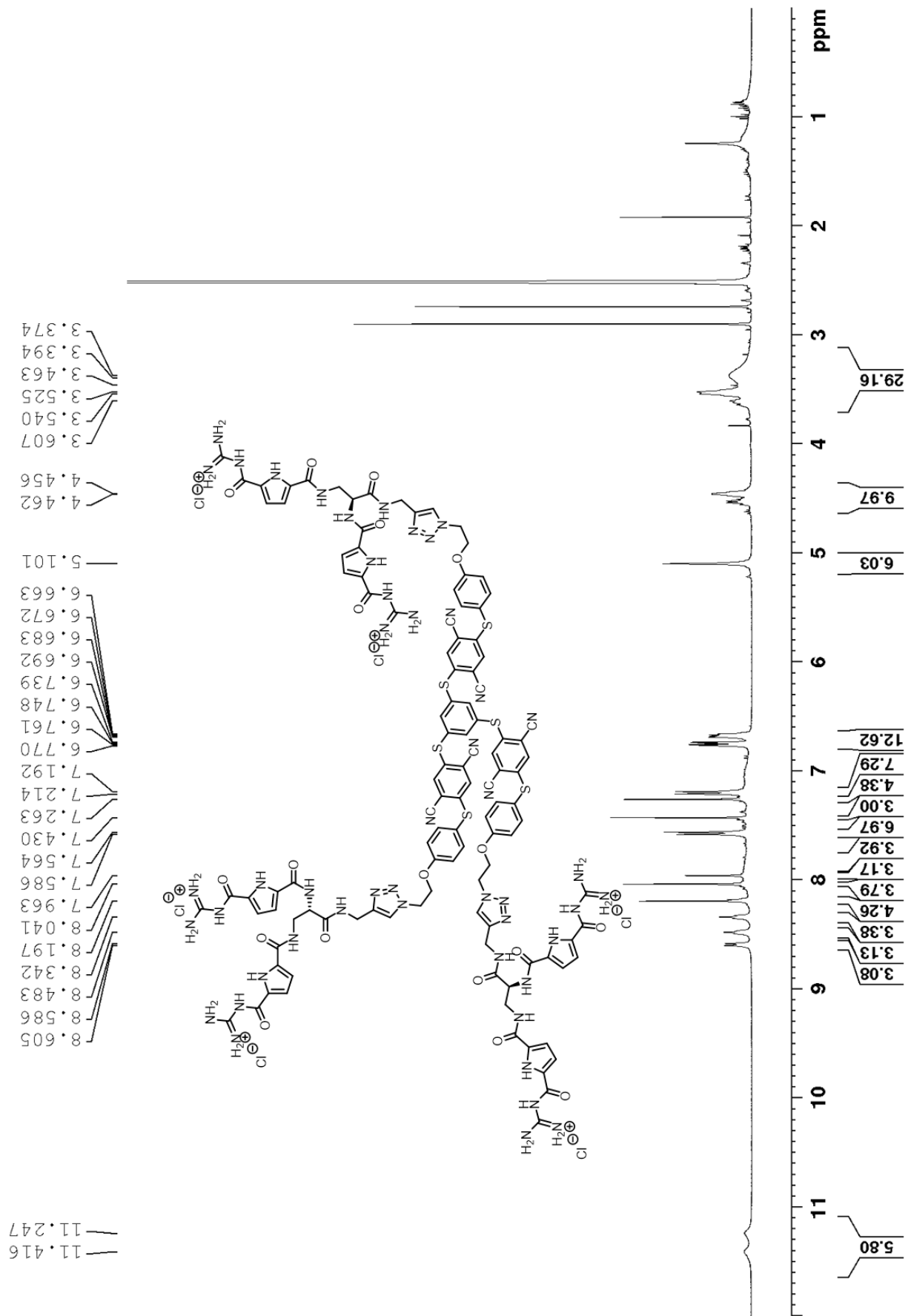


Abb. 90:  $^1\text{H-NMR}$  des Gelators **53** in  $\text{DMSO-d}_6$ .



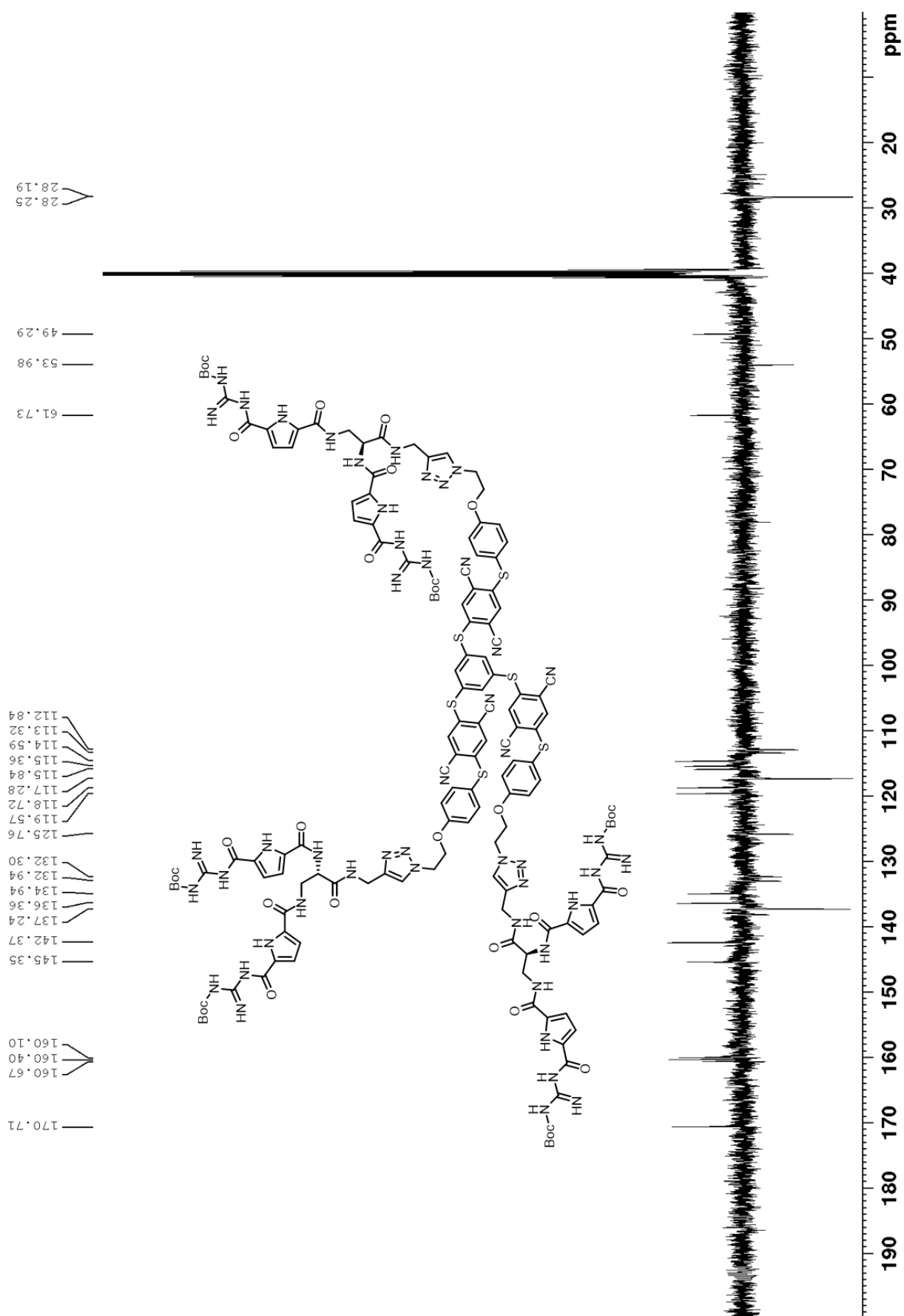
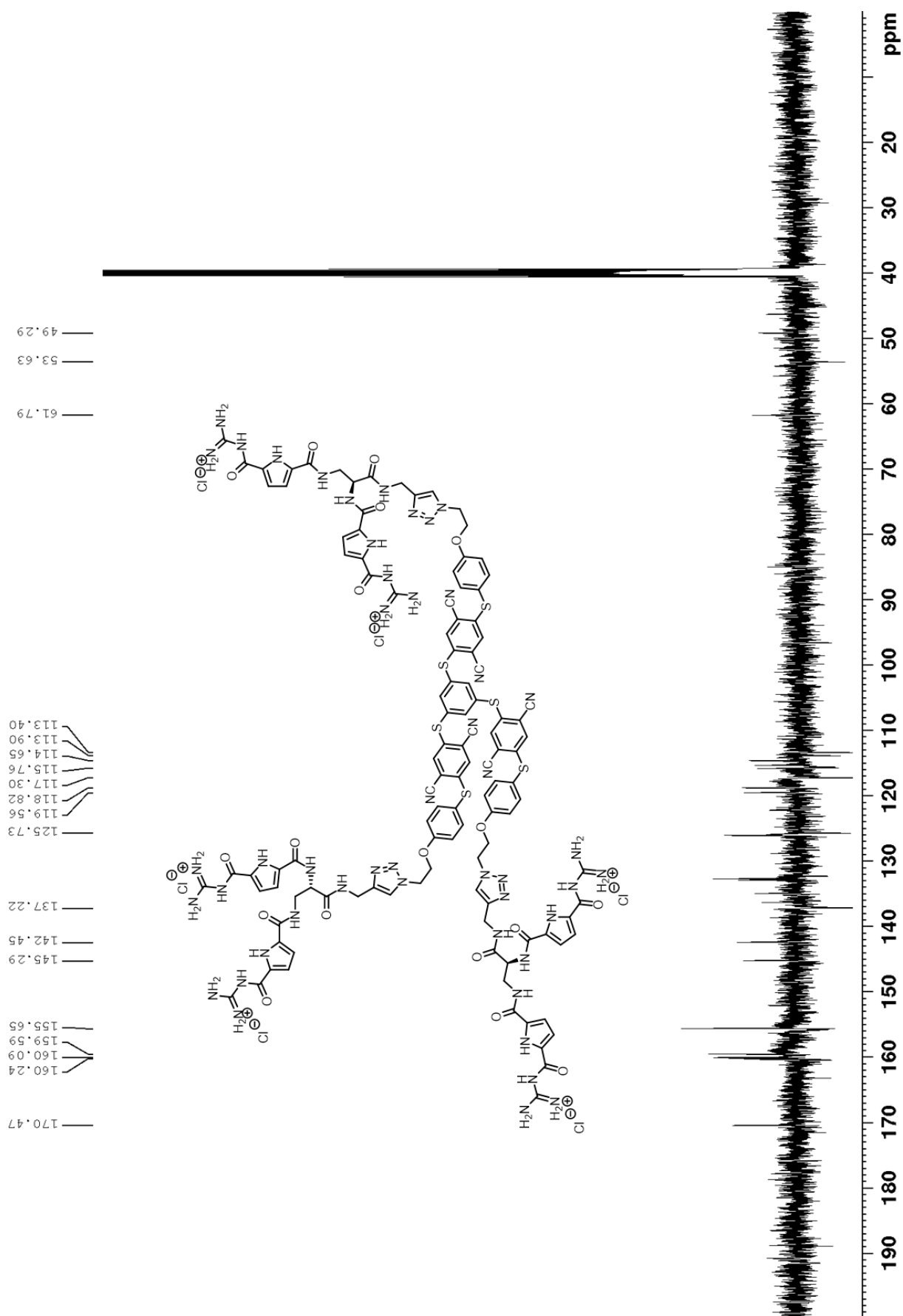


Abb. 92:  $^{13}\text{C}$ -NMR der Verbindung **89** in  $\text{DMSO-d}_6$ .





**Abb. 93:** <sup>13</sup>C-NMR der Verbindung **53** in DMSO-d<sub>6</sub>.