

**Photochemische Funktionalisierung
exosomaler Membranen mithilfe von
Photoaffinitäts-Labeln**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

im Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Oliver Dabrowski

aus

Hamburg

Hamburg 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2015 bis Oktober 2018 im Fraunhofer Zentrum für Angewandte Nanotechnologie (bis Dezember 2017 Centrum für Angewandte Nanotechnologie GmbH) in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Horst Weller vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg erstellt.

1. Gutachter: Dr. Theo Schotten
2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Weller

Tag der Disputation: 30.11.2018

Tag der Druckfreigabe: 30.11.2018

Sperrvermerk

Die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Photochemische Funktionalisierung exosomaler Membranen mithilfe von Photoaffinitäts-Labeln“

enthält vertrauliche Daten und Informationen des Fraunhofer Zentrums für Angewandte Nanotechnologie IAP-CAN.

Die Dissertation darf nur dem Erst- und Zweitgutachter sowie befugten Mitgliedern des Prüfungsausschusses zugänglich gemacht werden. Eine Veröffentlichung und Vervielfältigung der Dissertation ist – auch in Auszügen – nicht gestattet.

Eine Einsichtnahme der Arbeit durch Unbefugte bedarf einer ausdrücklichen Genehmigung des Verfassers und des Fraunhofer Zentrums für Angewandte Nanotechnologie IAP-CAN.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Schemaverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
2 Theorie	3
2.1 Exosomen.....	3
2.1.1 Bildung.....	3
2.1.2 Biologische Funktion	5
2.2 Die Blut-Hirn-Schranke.....	5
2.2.1 Aufbau	6
2.2.2 Transportmechanismen zur Überquerung der Blut-Hirn-Schranke.....	7
2.3 Glioblastoma Multiforme.....	8
2.3.1 Therapie.....	10
2.4 Photoaffinitäts-Label.....	11
2.4.1 Photophysikalisches Verhalten von Benzophenon.....	12
2.4.2 Chemisches Verhalten von Benzophenon im Triplet-Zustand	13
2.5 Kationische-Ringöffnungs-Polymerisation von 2-Oxazolinen	13
2.5.1 Mechanismus	14
2.6 Stand der Wissenschaft.....	15
3 Zielsetzung.....	19
4 Ergebnisse und Diskussion	20
4.1 Erläuterung zum Synthesepan	20
4.2 Retrosynthesepan.....	24

4.3	Synthese.....	25
4.4	Dynamische NMR-Studie.....	29
4.5	Photochemische Funktionalisierung von Exosomen	31
4.5.1	Versuche mit nicht bestrahlten Exosomen.....	33
4.5.2	Versuche zur Bestrahlung mit UV-A Strahlung	35
4.5.3	Optimierung des Färbeprotokolls	37
4.5.4	Versuche zur Bestrahlung mit UV-C Strahlung.....	41
4.5.5	Reduktion der Farbstoffmenge.....	43
4.6	Photochemische Funktionalisierung synthetischer Vesikel	43
4.7	Versuche zur Darstellung eines di-end funktionalisierten Oligomers mittels Kationischer-Ringöffnungs-Polymerisation	44
4.7.1	Synthese der Bausteine.....	45
4.7.2	Polymerisation mit Ethyloxazolin	46
4.7.3	Polymerisation mit benzophenon-funktionalisiertem Oxazolin	48
5	Zusammenfassung.....	53
6	Summary	56
7	Experimenteller Teil	59
7.1	Material und Methoden.....	59
7.1.1	Chemikalien und Lösemittel	59
7.1.2	Präparative Verfahren	60
7.1.3	Chromatographische Methoden.....	60
7.1.4	Photochemische Bestrahlung.....	60
7.1.5	Isolation der Exosomen.....	61
7.1.6	SDS-Page mit anschließendem Western Blot.....	61
7.1.7	Immunfluoreszenzfärbung der murinen Neuroblastoma-Zellen.....	61
7.1.8	Instrumentelle Analytik.....	62
7.2	Synthesevorschriften und analytische Daten.....	64
7.2.1	Darstellung von 12-Phenyldodecansäure (3).....	64
7.2.2	Darstellung von 12-Phenyldodecansäuremethylester	65
7.2.3	Darstellung von (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl) dodecansäuremethylester	65
7.2.4	Darstellung von (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäure (4)	67

7.2.5 Darstellung von mono Boc-Piperazin (9).....	68
7.2.6 Darstellung von Rhodamin-Boc-Piperazid.....	68
7.2.7 Darstellung von Rhodamin-Piperazid (10)	70
7.2.8 Darstellung von Ethyl 2-(hexadecylamino)essigsäureethylester (6).....	70
7.2.9 Darstellung von Ethyl 2-(N-hexadecyl-3-(4-(4-methylbenzoyl) phenyl)dodecanamido)essigsäureethylester.....	71
7.2.10 Darstellung von Ethyl 2-(N-hexadecyl-12-(4-(4-methylbenzoyl) phenyl)dodecanamido)essigsäure (7)	72
7.2.11 Darstellung von R87 (1) - N-(6-(diethylamino)-9-(2-(4-(2-(N-ethyl-3-(4-(4- methylbenzoyl)phenyl)propanamido)acetyl)piperazine-1-carbonyl)phenyl)- 3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chlorid	73
7.2.12 Darstellung von <i>tert</i> -Butyl 4-(2-bromacetyl)piperazin-1-carbamat (13)	74
7.2.13 Darstellung von N-(2-Hydroxyethyl)-12-(4-(4-methylbenzoyl) phenyl)dodecanamid	75
7.2.14 Darstellung von (4-(11-(4,5-dihydrooxazol-2-yl)undecyl)phenyl) (p-tolyl)methanone	76
7.2.15 Darstellung von 1-N-Boc-4-[(methylamino)methyl]piperidin.....	77
8 Anhang	X
8.1 Gefahrstoffliste mit GHS mit H- und P-Sätzen	X
8.2 Wortlaut der H- und P-Sätze	XIV
8.2.1 Gefahrenhinweise (H-Sätze)	XIV
8.2.2 Ergänzende Gefahrenhinweise (EUH-Sätze).....	XVIII
8.2.3 Sicherheitshinweise (P-Sätze).....	XIX
8.3 Gefahrenpiktogramme.....	XXVII
9 Literatur.....	XXVIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bildung von Exosomen	3
Abbildung 2: Darstellung eines Exosoms mit einem Durchmesser von 60 nm.....	4
Abbildung 3: Querschnitt einer cerebralen Kapillare.....	6
Abbildung 4: Statistische Verteilung aller auftretenden Hirntumorarten.....	9
Abbildung 5: Carmustin und Temozolomid mit seinem Metaboliten.....	10
Abbildung 6: Gängige funktionelle Gruppen für Photoaffinitäts-Label.....	11
Abbildung 7: Jablonski Diagramm von Benzophenon	12
Abbildung 8: Mechanismus der Kationischen-Ringöffnungs-Polymerisation	14
Abbildung 9: Lipidartiges PAL nach A. Lala und E. Kumar	16
Abbildung 10: Lipidartiges PAL nach nach Hilbold <i>et al.</i>	16
Abbildung 11: Einfaches di-end-funktionalisiertes PAL.....	17
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zielstruktur	20
Abbildung 13: Dipalmitoylphosphatidylcholin.....	21
Abbildung 14: Benzophenon	21
Abbildung 15: Rhodamin B	22
Abbildung 16: Gleichgewichtsreaktion zum Lacton.....	22
Abbildung 17: Molekülrückgrat.....	23
Abbildung 18: Zielverbindung.....	23
Abbildung 19: DNMR von R87.....	29
Abbildung 20: DNMR von R87 vergrößert, mit Molekülausschnitt.	30
Abbildung 21: Struktur von R51.....	31
Abbildung 22: 40 μ M, wässrige Lösungen von R87 und R51.....	32
Abbildung 23: PKH26.....	32
Abbildung 24: Dichtegradient nach erfolgter Ultrazentrifugation	33
Abbildung 25: Western Blot mit Nachweis auf Flotillin-1	34
Abbildung 26: N2a Zellen mit PKH26 gefärbten, nicht bestrahlten Exosomen	34
Abbildung 27: N2a Zellen mit R87 gefärbten, nicht bestrahlten Exosomen	35
Abbildung 28: Verwendeter Photoreaktor.....	36
Abbildung 29: Exosomen nach 5 Min. Bestrahlung im Reaktor.....	36
Abbildung 30: Zusammensetzung Diluent C	37
Abbildung 31: Iodixanol.....	38

Abbildung 32: MALDI von Iodixanol.....	38
Abbildung 33: MALDI mit Iodixanolderivaten	39
Abbildung 34: N2a Zellen mit angefärbten Exosomen (R87) ohne Bestrahlung.....	40
Abbildung 35: Größe und Größenverteilung vor Anfärbung mit R87 und nach Re-Isolation.....	41
Abbildung 36: N2A Zellen inkubiert mit Exosomen, die unterschiedlich lange bestrahlt wurden..	42
Abbildung 37: Proben mit variiertes Farbstoffmenge	43
Abbildung 38: Abbruchreagenz	46
Abbildung 39: ESI des Ethyloxazolins	47
Abbildung 40: Typisches MALDI einer Reaktion mit BeOX.	48
Abbildung 41: Untersuchte CROP-Initiatoren.....	49
Abbildung 42: MALDI von EtOX nach Synthese mit 4,4'-Dimethylbenzophenon Zusatz.....	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Methoden unter Verwendung von R87	39
Tabelle 2: Liste aller Polymerisationsversuche.....	52
Tabelle 3: Eigenständig getrocknete Lösemittel und verwendetes Trockenmittel.....	60
Tabelle 4: Liste verwendeter Gefahrstoffe	X

Schemaverzeichnis

Schema 1: Retrosyntheseplan.....	24
Schema 2: Kupferkatalysierte C-C Verknüpfung	25
Schema 3: Darstellung von (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäure.....	26
Schema 4: <i>N</i> -Alkylierung von Hexadecylamin	26
Schema 5: Abschluss der Synthese des hydrophoben Bausteins	27
Schema 6: Darstellung von mono-Boc-Piperazin	27
Schema 7: Darstellung der Rhodamin-Piperazids	28
Schema 8: Darstellung der Zielsubstanz R87.....	28
Schema 9: Darstellung des Oxazolins	45
Schema 10: Darstellung des Initiators	46
Schema 11: Abbruch durch hydrolysierten Initiator.....	47

Abkürzungsverzeichnis

ABC - ATP binding cassett

ATP - Adenosintriphosphat

BAPC - 1-*tert*-Butyl-4-(2-bromoacetyl)piperazincarbat

BBB - Blut-Hirn-Schranke (blood brain barrier)

BeOX - Benzophenon funktionalisiertes Oxazolin

ber. - berechnet

Boc - *tert*-Butyloxycarbonyl Schutzgruppe

BP - Benzophenon

BrBBr - 4-Brombenzylbromid

BSA - Bovines Serumalbumin

CCV - clathrin beschichtete Vesikel (clathrin-coated vesicles)

CDI - 1,1'-Carbonyldiimidazol

CROP - Kationische-Ringöffnungs-Polymerisation (*cationic-ringopening-polymerization*)

DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol

DCM - Dichlormethan

DIPEA - Diisopropylethylamin

DNMR - dynamische Kernspinresonanz (dynamic nuclear magnetic resonance)

DTT - Dithiothreitol

EDTA - Ethylendiamintetraacetat

ESCRT - endosomal sorting complexes required for transport

ESI - Elektrospray Ionisation

EtOAc - Essigsäureethylester

EtOH - Ethanol

EtOX - Ethyloxazolin

FCS - fetalem Kälberserum (fetal calf serum)

FTIR - Fourier Transform Infrarot

GBM - *glioblastoma multiforme*

gef. - gefunden

HEPES - 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

IC - interne Umwandlung (internal conversion)

ISC - Interkombination (intersystem crossing)

MADLI-TOF - Matrix Assistierte Laser Desorption Ionisierung mit der Flugzeitanalyse

MeOH - Methanol

MVE - Multivesikuläres Endosom (multivesicular endosome)

N2a - murine Neuroblastoma-Zelllinie 2a

NaOH - Natriumhydroxid

NMR - nuclear magnetic resonance

NO₂Ph - Nitrophenol

NTA - Nanoparticle Tracking Analysis

ODCB - *ortho*-Dichlorbenzol

PAL Photoaffinitäts-Label

PBCA - Polyisobutylcyanacrylat

PBS - Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)

RT - Raumtemperatur

SAR - Struktur-Wirkungsbeziehung (structure activity relationship)

SLC - solute carrier

TEA - Triethylamin

THF - Tetrahydrofuran

Tris-HCl - (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid

Triton X-100 - ((*p*-tert-Octylphenoxy)polyethoxyethanol

ZNS - Zentrales Nervensystems

1 Einleitung

Exosomen sind körpereigene Vesikel, die von nahezu allen eukaryotischen Zelltypen produziert werden. Eine ihrer Funktionen ist nach heutigem Wissenstand die interzelluläre Kommunikation. Exosomen können dabei auch die Blut-Hirn-Schranke (blood brain barrier, BBB) passieren. Diese Eigenschaft macht Exosomen als Transporter für Wirkstoffe zur Behandlung neurologischer Erkrankungen interessant.^{[1], [2]}

Die Blut-Hirn-Schranke ist bei allen Landwirbeltieren eine physiologische Barriere, die zur Wahrung der Homöostase den Blutkreislauf (intravasal) von den extravasalen Flüssigkeitssystemen des zentralen Nervensystems (ZNS) trennt. Sie fungiert dabei als hochselektiver Filter, der das Eindringen von Toxinen, Krankheitserregern und Wirksubstanzen in das ZNS verhindert. Diese Schutzfunktion steht allerdings einer effektiven medikamentösen Behandlung neurologischer Erkrankungen entgegen, da lediglich ca. 2% aller experimentell erprobten Neuropharmaka die BBB überwinden können.^[3] Um Wirkstoffe dennoch in das ZNS einschleusen zu können, wurden verschiedene Trägersysteme für den gezielten Stofftransport und die Freisetzung im ZNS intensiv beforscht. Dazu zählen artifizielle Systeme, wie Liposomen oder Polymersomen, oder als körpereigene Vesikel Exosomen. Trotz ihrer sehr viel höheren Komplexität gegenüber den reduzierten Systemen, haben körpereigene Exosomen den Vorteil fehlender Immunogenität.

Hirntumore zählen zu den zehn häufigsten neurologischen Erkrankungen.^[4] Unter den malignen Gehirntumoren ist das *glioblastoma multiforme* (GBM) die mit Abstand häufigste und bösartigste Variante. Mit ca. 54% der registrierten Fälle ist jeder zweite Tumor dieser Klasse zuzuordnen.^[5] Die mittlere Lebenserwartung nach der Diagnostizierung eines GBM beträgt im Durchschnitt 14 Monate.^[6] Derzeit besteht die Behandlungsprozedur aus einer operativen Resektion des Tumorgewebes mit anschließender Bestrahlung und Chemotherapie. Letztere zeigt jedoch wenig Erfolg, weil potentielle Pharmaka die BBB nicht durchdringen und somit das Tumorgewebe nicht erreichen können. Daher wurde im Jahr 2013 das internationale Forschungsprojekt „GlioEx“ von der europäischen Förderplattform EuroNanoMed bewilligt, das die Einschleusung von Wirkstoffen mittels modifizierter Exosomen zum Ziel hatte. Da der Einschluss von Wirkstoffen in das innere Volumen meist mit einer Denaturierung des Exosoms einhergeht,^[7] war stattdessen eine Anbindung an die äußere Membran geplant.

Allerdings war es bis dahin nicht gelungen, Exosomen nachhaltig zu funktionalisieren. Es konnte zwar gezeigt werden, dass lipophile Stoffe in die exosomale Membran interkalieren können,^[8] jedoch ist dieser Vorgang diffusionskontrolliert und daher reversibel.

Eine longitudinale Stabilisierung sollte durch kovalente Anbindung von Molekülen an die Exosomenmembran erfolgen. Gängige chemische Kopplungschemie kam wegen der zu befürchtenden irreversiblen, funktionalen Schädigung des Exosoms nicht in Betracht. Stattdessen sollte eine longitudinal stabile Membranfunktionalisierung mithilfe von Photoaffinitäts-Labeln untersucht werden.

Die Entwicklung und Optimierung geeigneter Phototags, die prinzipielle Machbarkeit einer longitudinal stabilen Verankerung von Molekülen an Exosomen und der Nachweis der Funktionalität des Konstrukts *in vitro* ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2 Theorie

2.1 Exosomen

Neben einer Reihe von Botenstoffen sondern Zellen auch verschiedene Arten von Vesikel ab.^{[9], [10]} Dazu gehören auch Exosomen. Sie haben einen Durchmesser von 50 - 150 nm^[11] und sind von einer Lipid-Doppelschicht umhüllt. Aufgrund ihrer Größe können sie zu den Nanopartikeln gezählt werden.

2.1.1 Bildung

Exosomen werden -anders als Mikropartikel- nicht direkt aus der Plasmamembran gebildet, sondern entstehen durch einen kombinierten Prozess aus Endozytose und Exozytose (Abb. 1).^{[12], [13]}

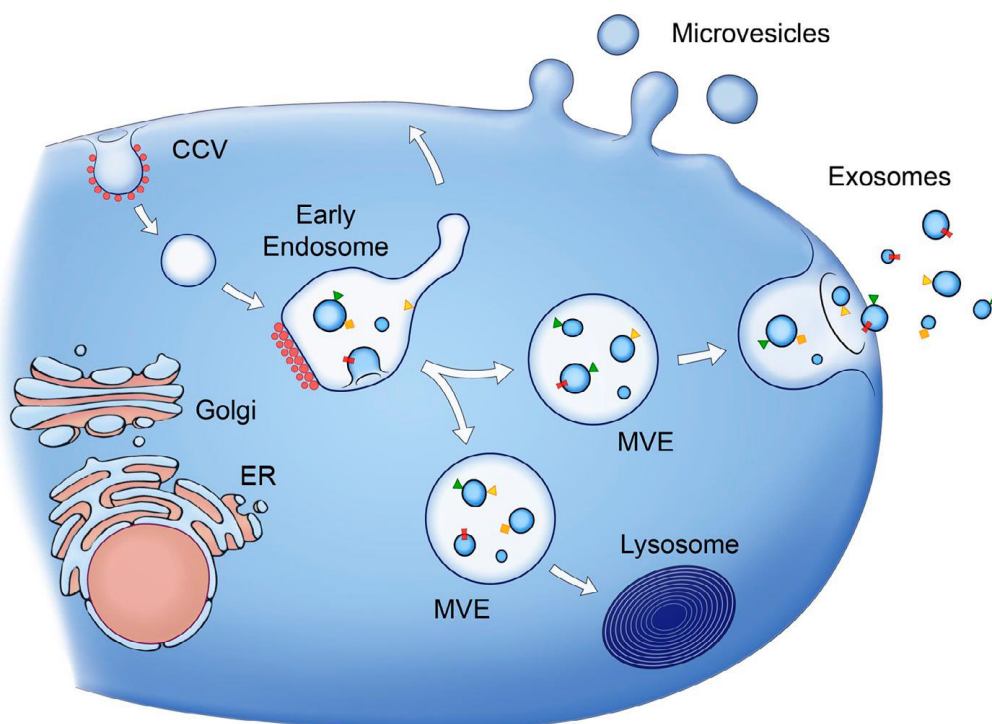


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bildung von Exosomen durch clathrin-vermittelte Endozytose.^[14]

Die Endozytose ist ein Vorgang bei der die Zellmembran in das Innere der Zelle eingestülpt wird. Durch Abschnüren entsteht ein intrazelluläres Vesikel. Eukaryotische Zellen besitzen vier bekannte Mechanismen zur Endozytose: die Phagozytose, die Makropinozytose, mithilfe von Caveolae und die clathrin-vermittelte Endozytose. Letztere wird am häufigsten beobachtet.

Dabei handelt es sich um einen rezeptorvermittelten Prozess, bei dem die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor als Schlüsselreiz dient. Das Membranprotein Clathrin (Abb. 1, S. 3, rote Punkte) vermittelt daraufhin an der Innenseite der Zellmembran die Einstülpung. Anschließend wird die Zellmembran abgeschnürt und clathrin-beschichtete Vesikel erhalten (clathrin-coated vesicles, CCV). Nach Abspaltung des Clathrins durch uncoating-ATPase entsteht daraus das frühe Endosom. Durch Einstülpungen in das frühe Endosom wiederum werden Exosomen gebildet. Sie verbleiben zunächst im Inneren des Endosoms, das in dieser Form als multivesikuläres Endosom bezeichnet wird (multivesicular endosome, MVE). In diesem entscheidenden Stadium können die MVE entweder dem Lysosom zugeführt werden oder die Exosomen durch Exozytose in den extrazellulären Raum abgeben. Welcher Prozess hierbei entscheidend beteiligt ist, ist bislang nicht bekannt. In Abbildung 2 ist ein maßstabsgetreues Exosom gezeigt. Die Zusammensetzung der Membran entspricht einem Exosom einer Mast-Zelle, wie sie durch Laulagnier *et al.* [15] beschrieben wurde.

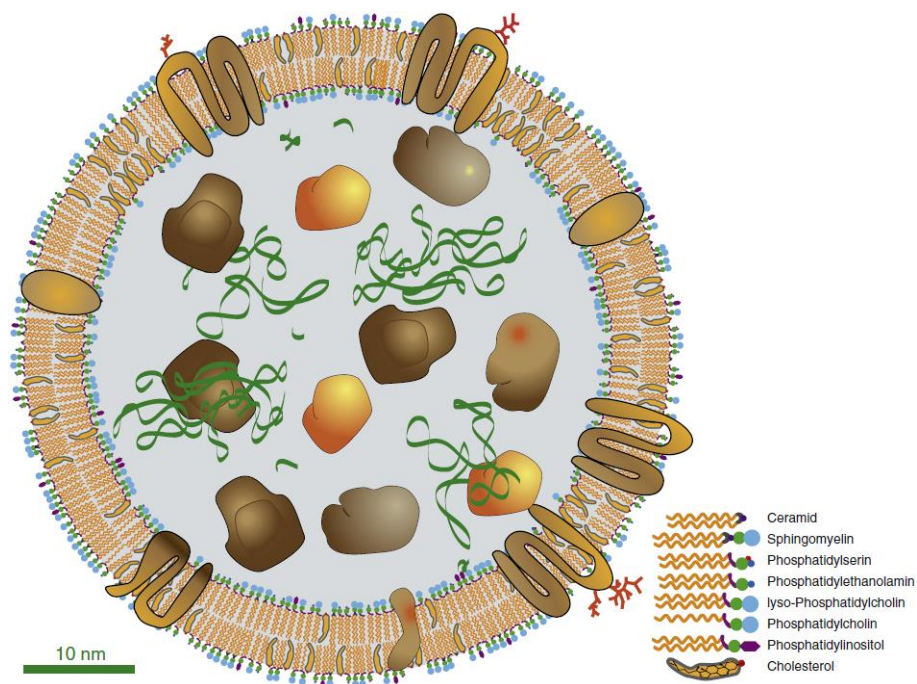


Abbildung 2: Darstellung eines Exosoms mit einem Durchmesser von 60 nm. Die Größen entsprechen den tatsächlichen Proportionen (grüne Fäden = RNA, Klümpchen = Proteine, rote Äste = Saccharide (Position und Anzahl willkürlich)). Abbildung modifiziert nach [16].

Aufgrund ihres endosomalen Ursprungs besitzen die Exosomen alle in der Membran der Mutterzelle enthaltenen Proteine. Zudem wurden bereits mehr als 4400 weitere Proteine mit Exosomen in Verbindung gebracht, welche spezifisch über den ESCRT-Komplex (endosomal sorting complexes required for transport) in die Exosomen inkorporiert werden können. [17], [18] Vermutlich sind sie in den meisten Fällen die Fracht dieser Vesikel. [19], [20]

Exosomen können Saccharide auf der Oberfläche tragen und enthalten signifikante Mengen verschiedener, nicht kodierender, tendenziell kleiner RNA Fragmente.^{[21], [22]} Diese RNA Fragmente unterscheiden sich strukturell und quantitativ teilweise deutlich von denen der Mutterzelle.^{[23], [24], [25]}

2.1.2 Biologische Funktion

Zahlreiche Zelltypen setzen Exosomen frei u.a. Reticulozyten, B-Zellen, T-Zellen, dendritische Zellen, Mast-Zellen, Schwann-Zellen, neuronale Zellen, Fibroblasten und eine Reihe von Tumorzellen.^{[12], [13], [15], [16], [26], [27]} Exosomen konnten in vielen körpereigenen Flüssigkeiten, wie Blut, Urin, Speichel, Liquor, Fruchtwasser und Muttermilch, aber auch in diversen pathologischen Flüssigkeitsansammlungen, wie bei Aszites nachgewiesen werden.^[16] Unabhängig von ihrem Vorkommen wird ihnen zugeschrieben, der interzellulären Kommunikation zu dienen und an verschiedenen physiologischen Prozessen regulierend beteiligt zu sein.^{[28], [29], [30]}

Auch Glioblastoma-Zellen geben Exosomen ab. Diese enthalten insbesondere angiogene Proteine, die nach Aufnahme in Endothelzellen die Neoangiogenese stimulieren und so die Bildung der tumoralen Blutversorgung induzieren.^[24] Ebenso wurde die Verbreitung von Oncogenen durch Exosomen von Tumorzellen beschrieben.^{[31], [32], [33], [34]} Diese Befunde belegen, dass die zelluläre Signaltransduktion neben den bekannten, kontaktabhängigen Kommunikationswegen wie z.B. Synapsen auch durch Exosomen erfolgt, die anhand spezifischer Oberflächenstrukturen oder adhäsiver Moleküle erkannt werden.^{[30], [35]}

2.2 Die Blut-Hirn-Schranke

Um das zentrale Nervensystem (ZNS) von Landwirbeltieren vor unerwünschten Einflüssen zu schützen, hat sich im Laufe der Evolution ein überaus komplexer, hochselektiver Schutzmechanismus entwickelt. Die Blut-Hirn-Schranke (BBB, blood-brain-barrier) trennt den Blutkreislauf von den extravasalen Flüssigkeitsräumen des ZNS, gewährleistet deren Homöostase und blockiert gleichzeitig die Aufnahme von Pathogenen und Toxinen. Diese Funktionen ergeben sich aus einem besonderen anatomischen Aufbau.

2.2.1 Aufbau

Histologisch besteht die BBB aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten. Die Blutkapillaren sind aus Endothelzellen gebildet, denen extravasal Perizyten aufgelagert sind. Diese Bindegewebszellen regulieren den Blutdruck und stabilisieren die Kapillare durch kontraktile Elemente. Umhüllt ist das Gebilde von einer Proteinschicht, der Basallamina, die unmittelbar an die Plasmamembran der Astrozyten grenzt (Abb. 3).

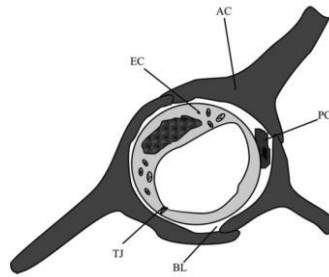


Abbildung 3: Querschnitt einer cerebralen Kapillare. Endothelzelle (EC), Perizyt (PC), Astrozyt (AC), Basallamina (BL), Tight Junction (TJ).^[36]

Auch subzellulär unterscheiden sich zerebrale von peripheren Kapillaren durch sog. Tight Junctions, fehlende Fenestrierung, eine geringere pinozytotische Aktivität und eine höhere Anzahl an Mitochondrien.^{[37], [38], [39], [40]} Tight Junctions sind besonders dichte Verbindungen zwischen benachbarten Zellen. Sie werden durch spezielle Proteine gebildet und verhindern den parazellulären Transport. Fenestrierungen sind ca. 50 nm große Öffnungen, die einen Austausch von Wasser und im Wasser gelösten bzw. suspendierten Stoffen mit dem umliegenden Gewebe ermöglichen. Aufgrund dieser beiden Besonderheiten spricht man auch von einem kontinuierlichen Endothel. Die geringere pinozytotische Aktivität führt zu einer geringeren Endozytoserate.

Tight Junctions, fehlende Fenestrierung und verringerte pinozytotische Aktivität verhindert die Aufnahme unerwünschter Substanzen. Parazellulärer Transport und der Austausch durch Fenestrierungen sind passive, diffusionskontrollierte Transporte und daher verhältnismäßig wenig selektiv. Bei der Endozytose werden Teile des Mediums mit übertragen, dadurch können unerwünschte Substanzen mit aufgenommen werden. Dementsprechend werden diese Möglichkeiten im Bereich der BBB unterdrückt. Stattdessen werden die selektiveren, aktiven Transportwege bevorzugt.^[41] Dadurch entsteht ein erhöhter Energiebedarf, auf den die höhere Anzahl an Mitochondrien an dieser Stelle zurück zu führen ist. Etwa jede dritte Endothelzelle ist fest mit einem Perizyt verbunden. Perizyten wird die Fähigkeit zugesprochen, den Blutdruck lokal regulieren zu können.^[42]

Je geringer die Fenestrierung, desto mehr Perizyten sind vorhanden. Außerdem scheinen sie in zerebralen Kapillaren auch als Makrophagen zu fungieren.^{[43], [44]} Über die konkrete Rolle der Perizyten in der BBB ist jedoch bisher wenig bekannt. Für eine Reihe von Beobachtung konnte bisher keine Erklärung gefunden werden. So wurde z.B. beobachtet, dass Perizyten als Reaktion auf eine Unterversorgung mit Sauerstoff oder einem Hirntrauma aus den Hirngefäßen verschwinden.^{[45], [46]} Ihr Mitwirken in der BBB wird allerdings durch die Beobachtung gestützt, dass sie in der Lage sind unter bestimmten Bedingungen die Bildung der Tight Junction zu induzieren.^[47]

Die Verbindung zwischen Blutgefäß und Neuron wird durch die Astrozyten gebildet. Eine ihrer Hauptaufgaben besteht darin die Nervenzellen mit Nährstoffen zu versorgen. Ihre Funktion in der BBB wurde in Zahlreichen Experimenten untersucht. Trotz teilweise widersprüchlicher Ergebnisse gilt als allgemeiner Konsens, dass sie für die Ausbildung und die Aufrechterhaltung der BBB verantwortlich sind.^{[48], [49]} Dies konnte in Transplantations-versuchen gezeigt werden bei denen embryonale Hirnzellen von Wachteln in Hühnerembryos transplantiert wurden.^[50]

2.2.2 Transportmechanismen zur Überquerung der Blut-Hirn-Schranke

Der erste Möglichkeit die BBB zu überqueren, ist die Diffusion.^[51] Dafür muss das Molekül zunächst eine bestimmte Lipophilie beim physiologischen pH-Wert von 7.4 besitzen.^[52] Dies wird gewöhnlich durch den logP-Wert des Verteilungskoeffizienten in einem Octanol/Wasser-Gemisch bestimmt.

Weiterhin sollte die Oberfläche des Moleküls keine hohe Polarität aufweisen, nicht mehr als sechs Wasserstoffbrücken ausbilden können, keine frei drehbaren Bindungen besitzen und die Molekülmasse sollte nicht über 450 Da liegen.^{[52], [53], [54]}

Alle genannten Voraussetzungen sind nur Faustregeln, die zuerst von Lipinski *et al.* für die Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Medikamenten formuliert wurden und unter dem Begriff *Lipinski's Rule of Five* bekannt sind.^[55] Ein Molekül, das alle Voraussetzungen erfüllt, kann trotzdem von der BBB zurückgehalten werden. Allerdings kann auch der umgekehrte Fall eintreten, dass ein Molekül, das nicht allen Kriterien entspricht, die BBB trotzdem passieren kann.^[56] Der Transport von Gasen wie Sauerstoff oder Kohlendioxid ist ebenfalls diffusionskontrolliert und nur vom Konzentrationsgradienten und dem Blutdruck abhängig. Die Diffusion ist ein passiver Transportvorgang und benötigt von Organismus keine Energiezufuhr.

Einige essentielle Stoffe wie Glucose oder Aminosäuren können die BBB nicht durch Diffusion überwinden. Hierfür stehen Carrier- oder auch Membran-Proteine zur Verfügung. Das Endothel stellt eine Vielzahl dieser sogenannten SLC-Transporter (Solute Carrier) bereit. SLC-Transporter können sowohl zum hinein als auch heraus zu schleusen dienen.^{[57], [58], [59]} Auch dieser Prozess ist Diffusionskontrolliert.

Muss ein Stoff gegen einen Konzentrationsgradienten bewegt werden, wird Energie benötigt. ABC-Transporter (ATP binding casset) generieren Energie durch die Hydrolyse von gebundenem ATP (Adenosintriphosphat). Wie die SLC-Transporter können sie in beide Richtungen wirken. Allerdings besteht ihre Hauptaufgabe im Ausschleusen von unerwünschten Substanzen unter ATP-Verbrauch. Darunter sind überwiegend neurotoxische oder xenobiotische Stoffe mit ausgeprägt lipophilem Charakter. Damit besitzen die ABC-Transporter eine wichtige Rolle beim Entgiften und dem Schutz von Nervenzellen.^{[60], [61], [62]}

Aufgrund ihrer Größe sind die Möglichkeiten für Makromoleküle, die BBB zu überschreiten, stärker begrenzt. Für einige besondere hat sich jedoch im Verlauf der Evolution eine Möglichkeit etabliert. Das Makromolekül muss sich dafür an eine spezielle Bindungsstelle oder einen Rezeptor am Endothel anlagern. Daraufhin wird eine transzytotische Reaktion ausgelöst, die sowohl das Makromolekül als auch die Bindungsstelle an der Oberfläche abschnürt, in Form eines Vesikels durch die Membran transportiert, und auf der anderen Seite in den extrazellulären Raum freisetzt.^{[63], [64]} Ein Beispiel für diesen Transportprozess ist die Einschleusung von Insulin.^[65]

2.3 Glioblastoma Multiforme

Bei GBM handelt es sich um die am häufigsten auftretende Form von bösartigen Gehirntumoren. 54% aller diagnostizierter Hirntumore ist ein GBM (Abb. 4, S. 9).^[5] Es erhielt seinen Namen 1926 von den beiden Neurologen und Chirurgen P. Bailey und H. Cushing aufgrund seiner variablen Erscheinungsform (multiforma) und der anfangs vorherrschenden Vorstellung, dass sich diese Form von Tumoren aus Glioblasten entwickelt. Pro Jahr erkranken im Durchschnitt 3 von 100.000 Menschen an dieser Krankheit. Aufgrund der schlechten Prognose wird diese Art nach der WHO-Klassifikation der Tumore des zentralen Nervensystems als Grad IV eingestuft. Dies ist die höchste Klasse mit der schlechtesten Prognose. Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt 14 Monate.

Besonders die vaskuläre Hyperproliferation (erhöhte Bildung von Blutgefäßen) und die Nekrose (unkontrollierter Zelltod) unterscheiden GBM von Tumoren mit einer niedrigeren Klasse. Wie fast alle Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) bildet auch GBM keine Metastasen außerhalb des ZNS aus. Es ist äußerst invasiv, wächst also in gesundes Gewebe hinein und besitzt pro-angiogenetische Eigenschaften, was bedeutet, dass es eine eigene Blutversorgung ausbildet.

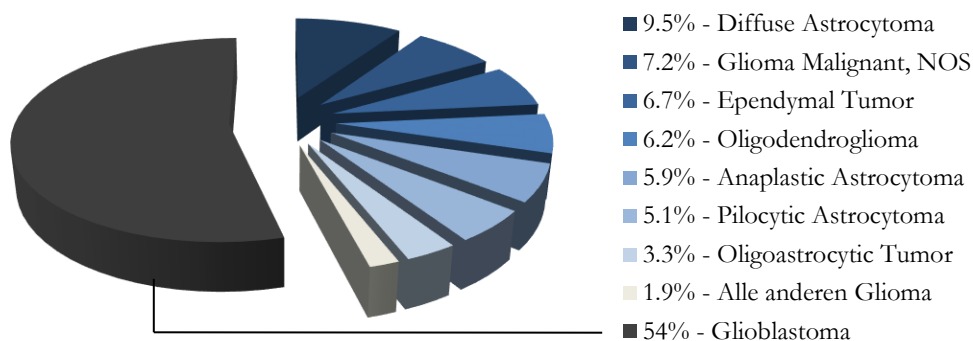


Abbildung 4: Statistische Verteilung aller auftretenden Hirntumorarten.^[5]

Bei GBM wird zwischen zwei Subtypen unterschieden. Primäre GBM entstehen ohne eine bislang bekannte Vorerkrankung, wobei sekundäre sich aus Tumoren einer niedrigeren WHO-Klassifikation entwickeln. Das Durchschnittsalter bei der Erstdiagnose beträgt beim primären Typ 62 Jahre und beim sekundären Typ 45 Jahre. Außerdem treten beide Typen bei den beiden Geschlechtern unterschiedlich häufig auf. Während der primäre Typus bei Männern drei Mal häufiger auftritt, als bei Frauen, verhält es sich beim sekundären genau umgekehrt.^{[66], [67]} GBM kann in allen Hirnregionen auftreten, bevorzugt im Großhirn in den Regionen Frontal- und Temporallappen. Die ersten Symptome sind fast immer Kopfschmerzen, anwachsende neuronale Defizite und Krämpfe. Je nach betroffener Hirnregion kann eine Vielzahl an weiteren Symptomen auftreten.

Die Ätiologie ist bislang weitestgehend unbekannt. Im Verdacht stehen diverse karzinogene Chemikalien, die bei der Produktion oder Verarbeitung von Kunststoffen, Erdöl und landwirtschaftlichen Erzeugnissen verwendet oder erzeugt werden, ebenso wie Rauchen, Passivrauchen und die regelmäßige Exposition gegenüber Reinigungsmitteln. Bislang konnte allerdings kein schlüssiger Zusammenhang hergestellt werden.^[68] Lediglich der schädigende Einfluss von ionisierender Strahlung wurde bisher nachgewiesen.^[69] Außerdem scheint ein höherer sozioökonomischer Status eine Erkrankung zu begünstigen.^[70] Eine Prognose ist bislang nur eingeschränkt möglich, die beiden einzigen bislang verlässlichen Indikatoren sind das Alter und der Karnofsky Performance Status.^[71]

2.3.1 Therapie

Glioblastome sind bislang unheilbar. Daher sind alle zurzeit angewendeten Methoden lediglich lebensverlängernd bzw. palliativ. Die Therapie besteht aus drei Teilen: Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie. Aufgrund des ausgeprägt invasiven Charakters migrieren Tumorzellen in umliegendes, gesundes Gewebe und verhindern so die vollständige Entfernung des Tumors. Um eine nachhaltige Wirkung zu erzielen müssen mehr als 98% des Tumorgewebes entfernt werden, was allen Umständen zum Trotz in fast allen Fällen möglich ist. Obwohl die Resektion das bislang wirkungsvollste Instrument im Kampf gegen GBM ist, führt sie, in Kombination mit einer anschließenden Strahlentherapie, lediglich zu einer Verlängerung der Lebenserwartung um durchschnittlich 6 Monate.^{[72], [73], [74], [75]} Auf beiden Gebieten konnten in der Vergangenheit nennenswerte Fortschritte erzielt werden. Allerdings konnte die Wirksamkeit der Behandlung kaum gesteigert werden. Die Fortschritte beschränken sich im Wesentlichen auf der technischen Weiterentwicklung der angewandten Methoden und führten überwiegend zu einer Reduzierung unangenehmer Begleitumstände und Nebenwirkungen.

Die Chemotherapie stellt die dritte Säule der Therapie dar. Trotz zahlreicher Studien an einer Vielzahl, zunächst vielversprechender Wirkstoffe, wurden bislang nur zwei Kandidaten zugelassen. Dabei handelt es sich um die beiden Zytostatika Temozolomid und Carmustin (Gliadel). Während Carmustin bereits in seiner Wirkform vorliegt, handelt es sich bei Temozolomid um ein Prodrug, das erst in Körper zum Wirkstoff Monomethyl-triazonimidazol-carboxamid metabolisiert wird (Abb. 5).

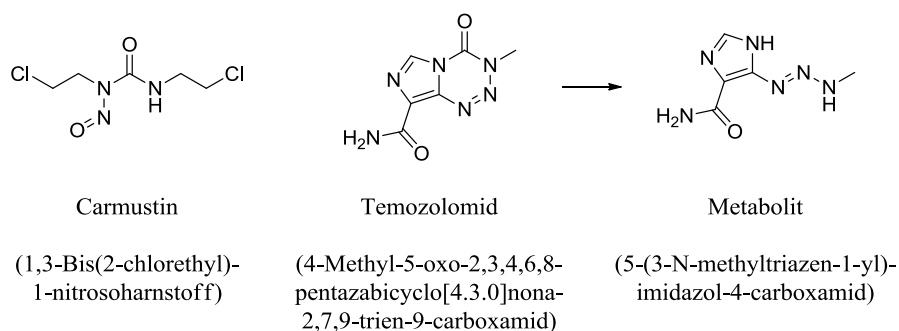


Abbildung 5: Carmustin und Temozolomid mit seinem Metaboliten.

Beide Substanzen sind starke Alkylanzien und entfalten ihre Wirkung besonders in schnell wachsenden Gewebetypen, zu denen auch Tumorzellen zählen. Sie erhöhen die Lebenserwartung, unabhängig voneinander zusätzlich um bis zu zwei Monate.^{[76], [77], [78]}

2.4 Photoaffinitäts-Label

Für die nachhaltige Inkorporation in die exosomale Membran bedarf es der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem theranostischen Motiv und der Membran. Eine milde Methode hierfür stellt die Herbeiführung einer photochemischen Reaktion dar. Als photochemische Reaktionen werden Prozesse bezeichnet, die durch Licht initiiert werden. Durch die Einwirkung von Strahlung wird das Molekül in einen angeregten Zustand versetzt, aus dem es eine Reaktion eingehen kann.

Für photochemische Experimente in biologischen Systemen haben sich einige, sogenannte Photoaffinitäts-Label (PAL) etabliert. Unter Einwirkung von UV-Strahlung bilden sie reaktive Zwischenstufen, die ohne die Bildung unerwünschter Nebenprodukte in umliegende C-H oder Heteroatom-H Bindungen insertieren können. In Abbildung 6 sind drei gängige photoaktivierbare Gruppen, zusammen mit ihren radikalischen Intermediaten dargestellt.

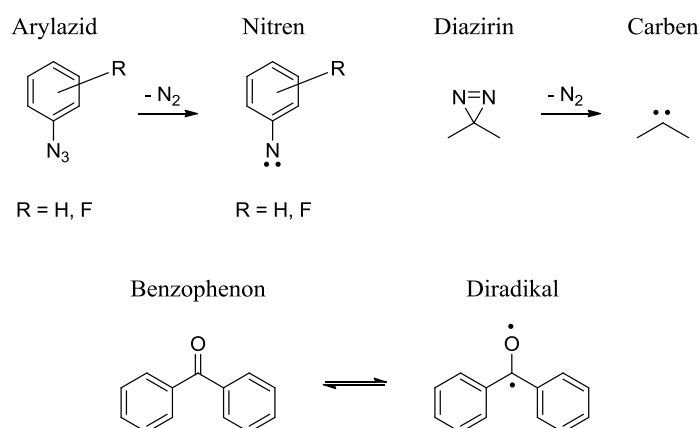


Abbildung 6: Gängige funktionelle Gruppen für Photoaffinitäts-Label.

Die Diazirine und die azidischen PAL eliminieren nach Anregung ein Äquivalent Stickstoff. Phenylazide bilden dabei ein Nitren. Perfluorierte Derivate stellen eine Weiterentwicklung dar, sie können vorteilhaft mit energieärmeren UV-A Licht angeregt werden und zeigen eine geringere Neigung zu intramolekularer Formation eines Azepins. Diazirine verhalten sich ähnlich wie Phenylazide, jedoch zerfallen sie nach Anregung bei ca. 350 nm in Carbene. Durch ihre höhere thermische und chemische Stabilität verbessert sich ihre Handhabung. Benzophenon ist das am häufigsten verwendete PAL. Im Gegensatz zu den stickstoffhaltigen Phenylaziden und Diazirinen gehen Benzophenone nach der Anregung in einen reversiblen, diradikalischen Zustand über und können bei nicht erfolgter Reaktion zur Ausgangssubstanz zurückreagieren und dann erneut angeregt werden.

Dies führt dazu, dass Benzophenone bei anhaltender Bestrahlung eine deutlich höhere Reaktionsausbeute aufweisen. Sie können ebenfalls mit einer Wellenlänge von ca. 350 nm angeregt werden, inserieren jedoch selektiv in C-H Bindungen. Vorteilhaft sind auch die höhere chemische Stabilität, die leichte Synthetisierbarkeit und die geringere Sensibilität gegenüber Umgebungslicht.

2.4.1 Photophysikalisches Verhalten von Benzophenon

Durch die Absorption eines Lichtquants wird Benzophenon aus dem Grundzustand (S_0) in einen angeregten Singulett-Zustand (S_n , $n \geq 1$) angehoben. Entsprechend der Kasha-Regel relaxiert das Molekül sofort in den niedrigsten, angeregten Zustand S_1 durch interne Umwandlung (IC, internal conversion). Carbonylverbindungen mit einem oder zwei Phenylresten haben die Besonderheit, dass der Triplett-Zustand T_2 energetisch sehr stark dem S_1 -Zustand ähnelt. Durch die Konjugation ist das π^* -Orbital in der Carbonylbindung energetisch herabgesetzt. Die Folge ist, dass die Energiedifferenz zwischen den π^* -Orbital und dem n_p -Orbital gering ist. Daher kommt es sehr häufig zu einer Interkombination (ISC, intersystem crossing), bei dem das Molekül unter Spinumkehr eines Elektrons vom Singulett-Zustand S_1 in den Triplett-Zustand T_2 wechselt. Beim Benzophenon ist die Quantenausbeute für diesen Prozess nahezu 1. Anschließend relaxiert das Molekül durch IC in den T_1 -Zustand. Im Triplett-Zustand besitzt das Benzophenon zwei ungepaarte Elektronen. Aufgrund der hohen Quantenausbeute für das ISC kommt es beim Benzophenon ausschließlich zu Reaktionen aus dem Triplett-Zustand.^[79] Findet keine Reaktion statt, kehrt das Molekül überwiegend strahlungsfrei in den Grundzustand zurück und kann erneut angeregt werden. Da Phosphoreszenz verboten ist erfolgt sie extrem langsam. Das Jablonski Diagramm von Benzophenon ist in Abbildung 7 zu sehen.

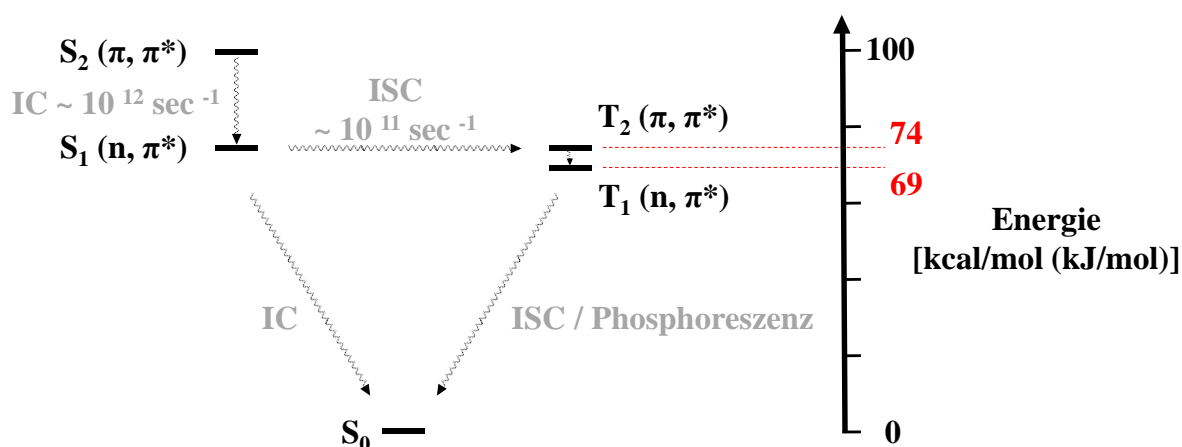


Abbildung 7: Jablonski Diagramm von Benzophenon.

2.4.2 Chemisches Verhalten von Benzophenon im Triplett-Zustand

Nach der Anregung liegt Benzophenon als Diradikal vor. Im Wesentlichen gehen Benzophenonderivate im Triplett-Zustand zwei Reaktionen ein: Die Insertion in C-H Bindungen und die Addition an C-C Doppelbindungen (Paterno-Büchi Reaktion). Die Insertion ist das Ergebnis eines zweistufigen Prozesses, der formal aus der Abstraktion eines Wasserstoffatoms und anschließender Rekombination zweier Radikale besteht. Beide Reaktionen sind nach der Interkalation in die Membran zielführend für eine photochemische Verankerung. Die Norrish-Typ I und Typ II Reaktionen, die mit einer Spaltung der Carbonylverbindung einhergehen, können in der Regel nicht beobachtet werden.

Im T_1 -Zustand besitzt das Benzophenon durch die Anregung eine Energie von $E_T = 288$ kJ/mol. Diese Energie reicht aus, um ein aliphatisches Proton zu abstrahieren. Die Bindungsdissoziationsenergie E_{Diss} der zur Verfügung stehenden C-H Bindungen ist entscheidend, ob ein Proton abstrahiert werden kann. E_{Diss} muss dafür geringer sein als E_T . Je niedriger E_{Diss} , desto wahrscheinlicher wird das dazugehörige Proton abstrahiert. Auch die mittlere freie Weglänge, die ein Radikal vor der Desaktivierung bewältigen kann und die statistische Verteilung spaltbarer Bindungen spielen eine Rolle. Die Abstraktion eines weiteren Protons durch das monoradikalische Zwischenprodukt kann nicht beobachtet werden. Aufgrund der räumlichen Nähe findet in der Regel eine Rekombination statt. Eine Möglichkeit diesen Mechanismus präparativ auszunutzen ist die photoreduktive Kupplung von Ketonen. Wird eine Lösung aus Benzophenon in Isopropanol angeregt, abstrahiert das angeregte Keton ein Wasserstoffatom von einem Lösemittelmolekül. Das radikalische Isopropanol rekombiniert in diesem Fall nicht, sondern reagiert mit einem zweiten Benzophenon unter Abgabe eines weiteren Wasserstoffatoms zu Aceton. Die verbleibenden radikalischen Benzophenone dimerisieren im Anschluss zum Benzpinakol.

2.5 Kationische-Ringöffnungs-Polymerisation von 2-Oxazolinen

Die Verknüpfung von Benzophenon mit Membranbestandteilen ist unspezifisch. Die Bindungsbildung erfolgt statistisch anhand der zur Verfügung stehenden Bindungen und ist somit stark von der Zusammensetzung der Membran abhängig. In erster Näherung ist davon auszugehen, dass ein entsprechendes PAL mit allen Membranbestandteilen gleichermaßen reagieren und sich somit sowohl an kleinere Bestandteile wie Lipide binden wird, als auch an größere wie Proteine.

Die Bindung an kleinere Membranbestandteile könnte weiterhin eine signifikante Diffusion erlauben. Um dies vollständig zu unterbinden, könnte es notwendig sein, durch mehrere photoaktivierbare Gruppen eine Vernetzung zu erreichen. Zur Darstellung entsprechender Strukturen stellt die Kationische-Ringöffnungs-Polymerisation von 2-Oxazolinen (CROP, *cationic-ringopening-polymerization*) einen eleganten Ansatz dar. Durch die Integration der photoaktivierbaren Gruppe in das Monomer könnte die Anzahl der Funktionalisierungen vom Polymerisationsgrad abhängig gemacht werden. Zudem bietet die CROP die Möglichkeit diend-funktionalisierten Polymere darzustellen. Somit könnten in einem Schritt Substrate dargestellt werden, die je Monomereinheit eine photoaktivierbare Gruppe besitzen und an den Kettenenden jeweils eine Funktionalität aufweisen.

2.5.1 Mechanismus

Die CROP gehört zur Gruppe der lebenden Polyreaktionen. Sie kann formal in die drei Schritte Initiierung, Propagation und Abbruch unterteilt werden. Als Monomere werden 2-Oxazoline eingesetzt, die im Verlauf der Polymerisation ein Polyethylenimid bilden. Der Mechanismus ist in Abbildung 8 beispielhaft an 2-Methyloxazolin gezeigt.

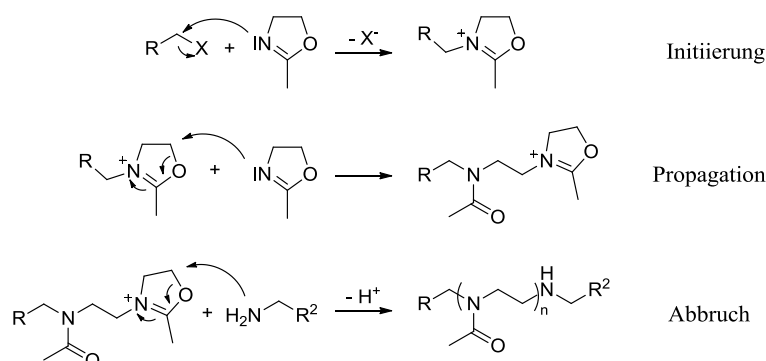


Abbildung 8: Mechanismus der Kationischen-Ringöffnungs-Polymerisation.

Die Initiierung erfolgt durch den nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaares am Stickstoff des Oxazolins an ein Elektrophil. Durch die Abspaltung eines Anions wird das Oxazolonium-Kation erhalten, das die lebende Spezies darstellt. In der Literatur ist eine Vielzahl an möglichen Initiatoren beschrieben, am häufigsten verwendet werden Alkylhalogenide, Arylhalogenide, Tosylate sowie Mesylate. Das entstehende Anion muss in der Folge gut abgeschirmt werden, um die Hemmung der folgenden Propagation durch die Bildung eines Kontaktenpaars zu verhindern. Dazu werden bevorzugt aprotische, polare Lösemittel verwendet wie z.B. Acetonitril, um eine gute Ladungstrennung zu erreichen.

Die Propagation erfolgt durch den nucleophilen Angriff eines Monomers auf die kationische Spezies, der zu einer irreversiblen Öffnung des Ringes führt. Die treibende Kraft ist die Energiefreisetzung von ca. 110 kJ/mol, die durch den Abbau der Ringspannung frei wird. Aufgrund des lebenden Charakters erfolgen keine Kettenabbrüche, bis die Reaktion durch die Zugabe eines Abbruchreagenzes beendet wird. Zur Terminierung können eine Vielzahl an Nucleophilen eingesetzt werden. Häufig verwendete Abbruchreagenzien sind Wasser, Alkohole, Amine, und Natriumazid.

Der Initiator und das Abbruchreagenz werden, entsprechend dem Mechanismus, Teil der Polymerkette. Daher kann durch die Verwendung maßgeschneiderter Bausteine ein hochfunktionalisiertes Endprodukt erhalten werden. Die Funktionalisierung kann aufgrund des lebenden Charakters quantitativ erfolgen. Unter konventionellen Bedingungen können CROP Reaktionen bis zu 24 Stunden benötigen.^[80] In den letzten Jahren hat sich die mikrowellengestützte Synthese als überlegenes Verfahren etabliert, da dadurch die Reaktionszeit auf wenige Minuten reduziert werden kann.^[81]

2.6 Stand der Wissenschaft

Bei der Entwicklung von Molekülen zu biochemischen Zwecken gibt es zwei Konzepte, die angewendet werden können. Das erste ist der naturstoff-chemische Ansatz. Bei dieser Herangehensweise steht im Vordergrund, an einem Naturstoff nur punktuelle Veränderungen durchzuführen, um das System möglichst wenig zu stören. Somit verfolgt das Konzept das Ziel, natürliche Prozesse aufzuklären. Ein Beispiel ist die Verwendung photochemischer Linker zur Identifikation von Bindungsstellen zwischen Liganden und Rezeptoren bei biologischen Prozessen wie z.B. der Bildung von Enzym-Substrat Komplexen.^[82]

Das zweite Konzept ist der medizinal-chemische Ansatz. Hierbei wird die Naturstoffstruktur auf ihre wesentlichen Funktionalitäten reduziert und nur ergänzt, wenn es zur Erzeugung oder Verbesserung der gewünschten Wirkung erforderlich ist. Dieses Konzept verfolgt das Ziel, den einmal gefundenen Wirkzusammenhang durch Erarbeitung einer Struktur-Wirkungsbeziehung (structure activity relationship, SAR) gezielt zu steuern bzw. zu optimieren. In diesem Zusammenhang werden Stereozentren besonders kritisch gesehen. Die Zweischneidigkeit von Stereozentren zeigte sich auf besonders tragische Weise, als Mitte des 20. Jahrhunderts durch Thalidomid der Contergan-Skandal ausgelöst wurde.^[83] Sofern sie nicht zur SAR beitragen, werden sie -nicht zuletzt um eine Synthese zu vereinfachen- eliminiert. Daher wird dieser Ansatz häufig vor allem in der angewandten Forschung gewählt.

Zur Etablierung einer SAR werden divergente Synthesestrategien bevorzugt. Diese ermöglichen im Gegensatz zu konvergenten, linearen Synthesestrategien, durch Kombination der verwendeten Edukte, die Darstellung von strukturell diversen Substanz-Bibliotheken. Da das Fernziel dieser Arbeit die Darstellung klinisch anwendbarer Konstrukte ist, bietet der medizinal-chemische Ansatz dafür die bessere Grundlage.

Das Benzophenon ist für die vorgesehene Anwendung von zentraler Bedeutung. Neben der photochemischen Funktion werden noch weitere Anforderungen an eine Zielstruktur gestellt. In Anbetracht der Tatsache, dass die Substanz in die exosomale Membran interkalieren soll, ist es naheliegend, sich an ihren Hauptbestandteilen zu orientieren und den Grundkörper von einem Lipid abzuleiten. Zur Synthese lipidartiger PAL sind eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht worden. Mit wenigen Ausnahmen basieren die dargestellten Verbindungen auf Phosphatidylcholin. Diese unterscheiden sich lediglich in den Lipid-Resten und der Position der photoaktivierbaren Gruppe. In Abbildung 9 ist stellvertretend eine Variante nach A. Lala und E. Kumar gezeigt.^[84]

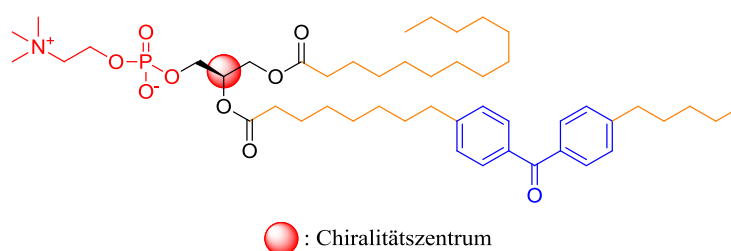


Abbildung 9: Lipidartiges PAL nach A. Lala und E. Kumar.^[84]

Erste grundlegende Abweichungen vom Phosphatidylcholin-Grundgerüst wurden von Hilbold *et al.*^[85] publiziert (Abb. 10). Die Esterbindungen wurden durch metabolisch stabilere Amide ersetzt und anstelle des Phosphatidylrests ein Rhodaminderivat verwendet.

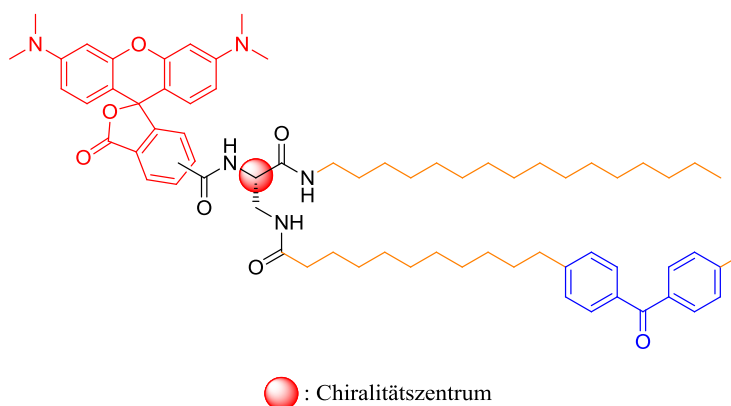


Abbildung 10: Lipidartiges PAL nach Hilbold *et al.*^[85]

Medizinal-chemisch betrachtet ist die Struktur kritisch zu beurteilen. Neben der ungünstigen linearen Syntheseroute weist sie ein artifizielles Chiralitätszentrum auf, dessen Funktion ungeklärt ist. Zudem besteht aufgrund des verwendeten Rhodamin-Derivats eine undefinierte Konnektivität zum Rest des Moleküls. Rhodamin-Derivate sind dafür bekannt, dass sie zu Spirolactonen cyclisieren können, wie durch Hilbold *et al.* dargestellt. Sie verlieren allerdings bis zu 97% ihrer Fluoreszenzquantenausbeute, wenn sie in dieser Form vorliegen, was ihre Verwendbarkeit als Fluoreszenzlabel einschränkt.^[86]

Neben den diskutierten Lipidanaloga wurden auch aus Cholesterin PAL dargestellt. Beide Substanzklassen finden eine breite Anwendung bei der Analyse von Membranprozessen und der Identifikation von aktiven Zentren bei Enzym-Substrat Komplexen. Unter verschiedenen Gesichtspunkten wurden zu diesem Themenkomplex in den letzten Jahren mehrere Review-Artikel veröffentlicht,^{[87], [88], [89], [90], [91]} allerdings wurden PAL bislang ausschließlich zu den beschriebenen, analytischen Zwecken verwendet. Die Inkorporation in Lipid-Membranen, um mithilfe der Photochemie theranostische Motive auf der Oberfläche zur Verankern, konnte in der verwendeten Literatur nicht gefunden werden.

Wird die Struktur von membranbildenden Lipiden als Grundlage betrachtet, so erscheint es wenig aussichtsreich mehr als eine photoaktivierbare Gruppe je Lipidrest in das Molekül einzuführen. Damit ist die Anzahl auf maximal zwei Gruppen pro Molekül beschränkt. Es könnte jedoch vorteilhaft sein, einen höheren Vernetzungsgrad zu erreichen, um die Diffusion wirkungsvoller zu unterbinden. Sollen große Motive an der Oberfläche verankert werden, könnte es zudem notwendig werden den lipophilen Teil zu erweitern, um zu gewährleisten, dass eine hinreichende Interkalation für die Verankerung gegeben ist. Um diesem Problem zu begegnen, sollte mithilfe der CROP ein Verfahren entwickelt werden, mit dem Oligomere synthetisiert werden können, die je Monomereinheit ein Benzophenon tragen (Abb. 11).

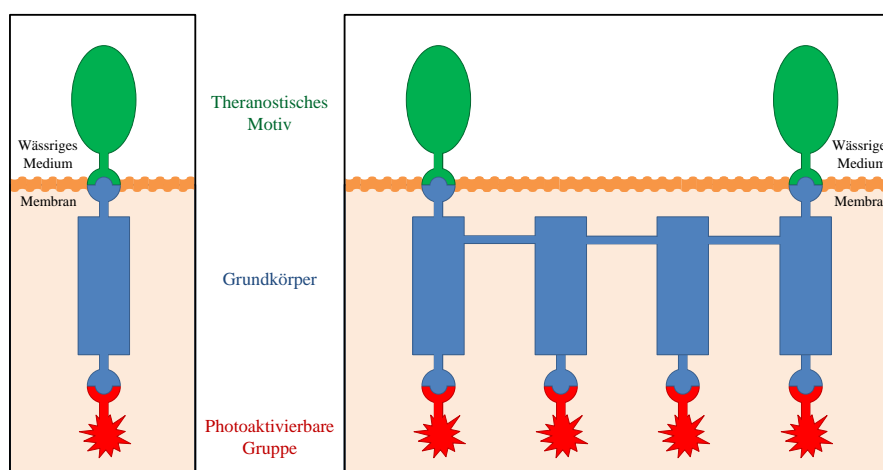


Abbildung 11: Einfaches PAL (li.) und di-end-funktionalisiertes PAL (re).

Dadurch könnte über den Polymerisationsgrad die Anzahl der photoaktiven Gruppen gesteuert werden. Zudem bietet die CROP die Möglichkeit di-end-funktionalisierte Polymere darzustellen. Polyoxazoline sind seit längerer Zeit im Fokus, da ihnen eine höhere Bioverträglichkeit im Vergleich zu Polyethylenglycolen zugesprochen wird.^{[92], [93]} In diesem Kontext ist es interessant zu untersuchen, ob mithilfe der CROP Oligomere dargestellt werden, die zur photochemischen Markierung von biologischen Membranen verwendet werden können. Aus der verwendeten Literatur ist kein Beispiel bekannt, dass sich mit dieser Fragestellung auseinandergesetzt hat.

3 Zielsetzung

Diese Arbeit beinhaltet zwei Ziele. Das erste war die Etablierung divergenter Synthesewege, die die Darstellung optimierter Photoaffinitäts-Label erlauben, mit denen eine longitudinal stabile Markierung bzw. Funktionalisierung von Exosomen möglich ist, ohne deren biologische Eigenschaften zu schädigen. Das Konzept sah zunächst eine lipidanaloge Struktur vor, bei der das Konzept von Hilbold *et al.* aufgegriffen und für die eigene Anwendung optimiert wurde. Im Anschluss sollten die vorteilhaften Eigenschaften der Kationischen-Ringöffnungs-Polymerisation dazu genutzt werden, das Konzept weiterzuentwickeln um di-end-funktionalisierte, poly-photofunktionale Oligomere darzustellen. Die chemische Struktur sollte eine photoaktivierbare Gruppe enthalten, die unter milden Bedingungen zur Reaktion gebracht werden kann, um eine kovalente Bindung einzugehen. Die Strahlenbelastung darf dabei nicht zu hoch sein, um Schäden zu vermeiden die die biologische Funktionalität der Exosomen beeinträchtigen könnte. Zudem sollte sie eine Bindungsstelle besitzen mit der eine Vielzahl an theranostischen Motiven mit der Grundstruktur verknüpft werden können wie z.B. DNA- oder RNA-Fragmente, Peptidsequenzen, Medikamente oder Farbstoffe. Da Exosomen nur in wässrigen Medien stabil sind, musste die Zielstruktur einen amphiphilen Charakter aufweisen, der zum einen die Löslichkeit in Wasser gewährleistet, zum anderen aber die Zielstruktur ein lipophiles Medium bevorzugen lässt, damit es aus dem wässrigen Medium in die exosomale Membran diffundiert.

Das zweite Ziel war die Entwicklung eines Verfahrens, mit dem die dargestellten Photoaffinitäts-Label an der exosomalen Membran photochemisch verankert werden können. Nach der Etablierung eines entsprechenden Protokolls sollten die optimalen Reaktionsbedingungen bestimmt werden und zum Abschluss die Viabilität der funktionalisierten Exosomen anhand von Zellaufnahme-Studien geprüft werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel gliedert sich in drei Teile. Im ersten Abschnitt wird die Synthese der Zielsubstanz vorgestellt. Es werden zunächst die Überlegungen diskutiert, die zur Entwicklung der gewählten Struktur geführt haben und im Anschluss die einzelnen Syntheseschritte sowie deren Ergebnisse präsentiert. Im zweiten Abschnitt wird die Zielsubstanz verwendet, um photochemische Experimente zur Verankerung auf einer exosomalen Membran durchzuführen. Es beinhaltet die Entwicklung und Optimierung eines Färbeprotokolls sowie die Interpretation der erhaltenen, konfokalmikroskopischen Aufnahmen. Im dritten Abschnitt werden die Ergebnisse zur Darstellung eines di-end-funktionalisierten Oligomers mittels der Kationischen-Ringöffnungs-Polymerisation (CROP) behandelt.

4.1 Erläuterung zum Syntheseplan

Da es sich bei Exosomen um eine biologische Entität handelt und das spätere Anwendungsgebiet der menschliche Organismus darstellen soll, musste dies bereits bei der Ausarbeitung einer Struktur und den verwendeten Methoden berücksichtigt werden. Nach Möglichkeit sollten übergangsmetallkatalysierte Reaktion vermieden oder in einem frühen Stadium der mehrstufigen Synthese eingeplant werden. Besonders giftige Metalle wie Nickel oder Kobalt können selbst in Spuren eine fatale Wirkung auf Organismen haben. Dies gilt analog für organische Verbindungen mit vergleichbarem Gefährdungspotential.

Die Zielverbindung lässt sich schematisch aus drei Teilen zusammensetzen (Abb. 12):

- Dem Grundkörper (blau), der im Wesentlichen die Lipophilie sicherstellt,
- Der photoaktivierbaren Gruppe (rot), die zur Verankerung dient und
- Dem theranostischen Motiv (grün), das auf der Oberfläche verankert werden soll.

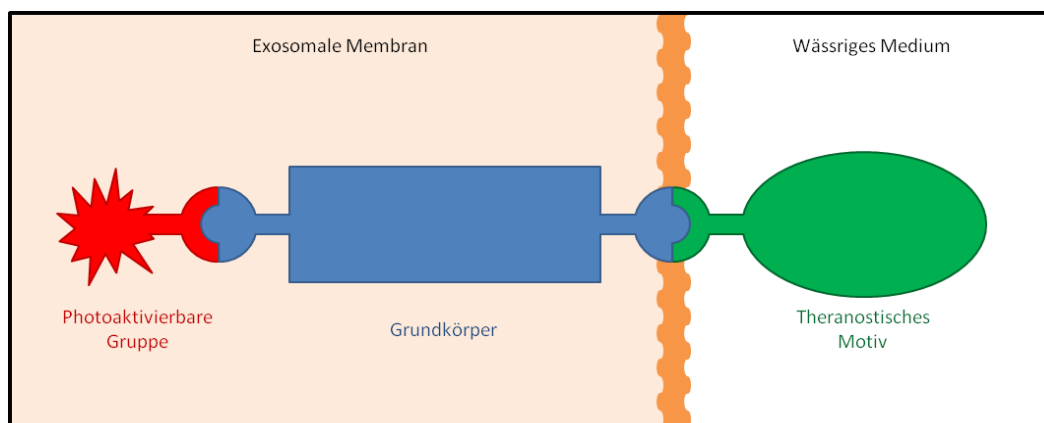


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zielstruktur.

Da die exosomale Membran aus einer Lipiddoppelschicht besteht, erschien es aussichtsreich, ein Analogon zu konzipieren, das in wesentlichen Strukturmerkmalen einem Lipid entspricht, gleichzeitig aber die Funktion eines photochemischen Markers erfüllt und resistent gegenüber biologischen Abbauprozessen ist. Membranbildende Lipide sind hauptsächlich Phospholipide, bestehend aus zwei Fettsäuren, die über Glycerol an eine Kopfgruppe gebunden sind. Die Kopfgruppe bestimmt die Lipid-Klasse und ist hydrophil, die Fettsäuren bilden den hydrophoben Rest. Ein typischer Vertreter eines Membranlipids ist Phosphatidylcholin, ein zwitterionisches Phospholipid (Abb. 13).^[94]

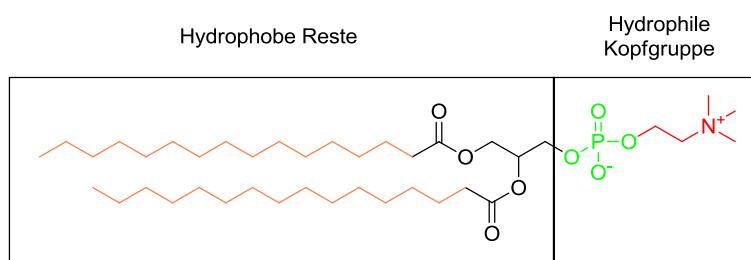


Abbildung 13: Dipalmitoylphosphatidylcholin. Orange: Palmitoylreste; schwarz: Glycerol-Rückgrat; grün: Phosphat; rot: Cholinrest.

An dieser Grundstruktur sollten drei Modifikationen durchgeführt werden um ein Molekül mit den gewünschten Eigenschaften zu erhalten. Die erste Modifikation war die Einführung der photoaktivierbaren Gruppe. Als aussichtsreicher Kandidat erschien dafür Benzophenon (Abb. 14), als idealtypisches Lehrbeispiel in der Fachliteratur zum Thema Photochemie.^[79]

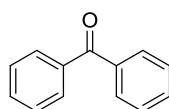


Abbildung 14: Benzophenon.

Die Photochemie von Benzophenon und seinen Derivaten wurde in der Vergangenheit überaus gründlich erforscht und eine Vielzahl an wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Thema veröffentlicht. Benzophenone absorbieren abhängig vom Substitutionsmuster bei ca. 254 und 333 nm. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Bestrahlung ggf. auch bei längerer Wellenlänge im schonenderen UV-A Bereich durchzuführen, falls die harscheren Bestrahlungsbedingungen die biologischen Strukturen schädigen sollten. Aufgrund seiner Lipophilie eignet es sich zur Integration in den hydrophoben Rest. Eine terminale Position ist dabei wünschenswert denn sie bietet die Möglichkeit, die Photoreaktion tiefer in der Membran ablaufen zu lassen und so an tendenziell lipophilere Bestandteile zu binden, oder gar transmembrane Strukturen zu bilden.^[84]

Als zweite Modifikation sollte die Kopfgruppe durch Rhodamin B ersetzt werden (Abb. 15).

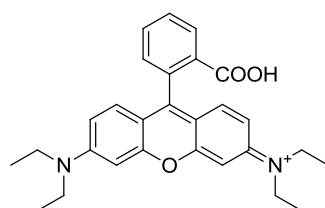


Abbildung 15: Rhodamin B.

Rhodamin B ist ein Fluoreszenzfarbstoff und gehört zur Gruppe der Rhodaminfarbstoffe. Die Einführung eines Fluoreszenzfarbstoffs geschieht stellvertretend für theranostische Motive, dazu zählen wie zuvor erwähnt u.a. DNA- oder RNA-Fragmente, Peptidsequenzen bzw. Wirkstoffe, lässt sich aber - im Gegensatz zu letzteren - nach Inkorporation in die exosomale Membran leicht nachweisen. Rhodaminfarbstoffe zeichnen sich durch hohe Photostabilität und eine hohe Quantenausbeute aus. Die hohe Photostabilität ist notwendig, um Photobleaching unter UV-Bestrahlung zu minimieren. Eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute verbessert die Nachweisempfindlichkeit im Fluoreszenzmikroskop. Da im späteren Verlauf Diffusionsprozesse betrachtet werden sollten, war es erforderlich, ein besonders sensitives Nachweisverfahren anwenden zu können. Rhodaminfarbstoffe werden standardmäßig in der Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt.

Primäre und sekundäre Amide von Rhodamin-Derivaten können analog zur freien Säure, bei entsprechenden pH-Werten zu Spiroverbindung zyklisieren (Abb. 16). Diese Lactame verlieren ebenso wie das Lacton dabei ihre Fluoreszenzeigenschaften. Dieser Effekt lässt sich z.B. für fluoreszente Chemosensoren, respektive Chemodosimeter ausnutzen. [95], [96]

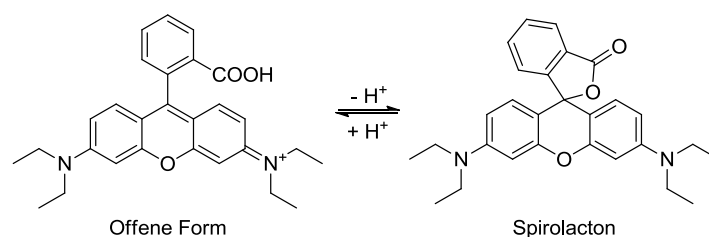


Abbildung 16: Gleichgewichtsreaktion zum Lacton

Dieser Reaktionsweg musste für den geplanten Einsatz als Fluoreszenz-Label jedoch unterbunden werden, indem das Rhodamin-Derivat über ein tertiäres Amid mit dem hydrophoben Rest verknüpft werden sollte, dass keinen Ringschluss zum Spirolactam eingehen kann.

Die dritte Modifikation sollte die Substitution von Glycerol durch Glycin als zentralen Bestandteil des Molekülrückgrats sein (Abb.17).

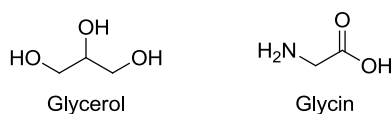


Abbildung 17: Molekülrückgrat.

Im Gegensatz zu den Hydroxygruppen des Glycerols, die in Lipiden jeweils nur eine metabolisch labile Esterbindung eingehen, bietet die Aminofunktion des Glycins eine zweifache Funktionalisierungsmöglichkeit. Zusammen mit der Säurefunktion können somit drei Reste über metabolisch stabile Amidbindungen in das Molekül eingeführt werden. Esterbindungen, wie sie z.B. in Phospholipiden vorkommen sind anfällig für spontane Transacylierungsreaktionen und unterliegen einer enzymatischen Hydrolyse durch Lipasen.^[97] Diese Überlegungen ergaben folgende hypothetische Struktur (Abb. 18):

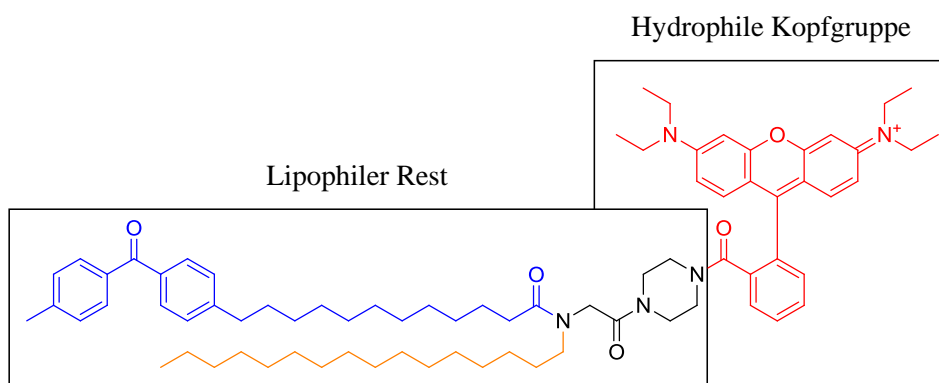
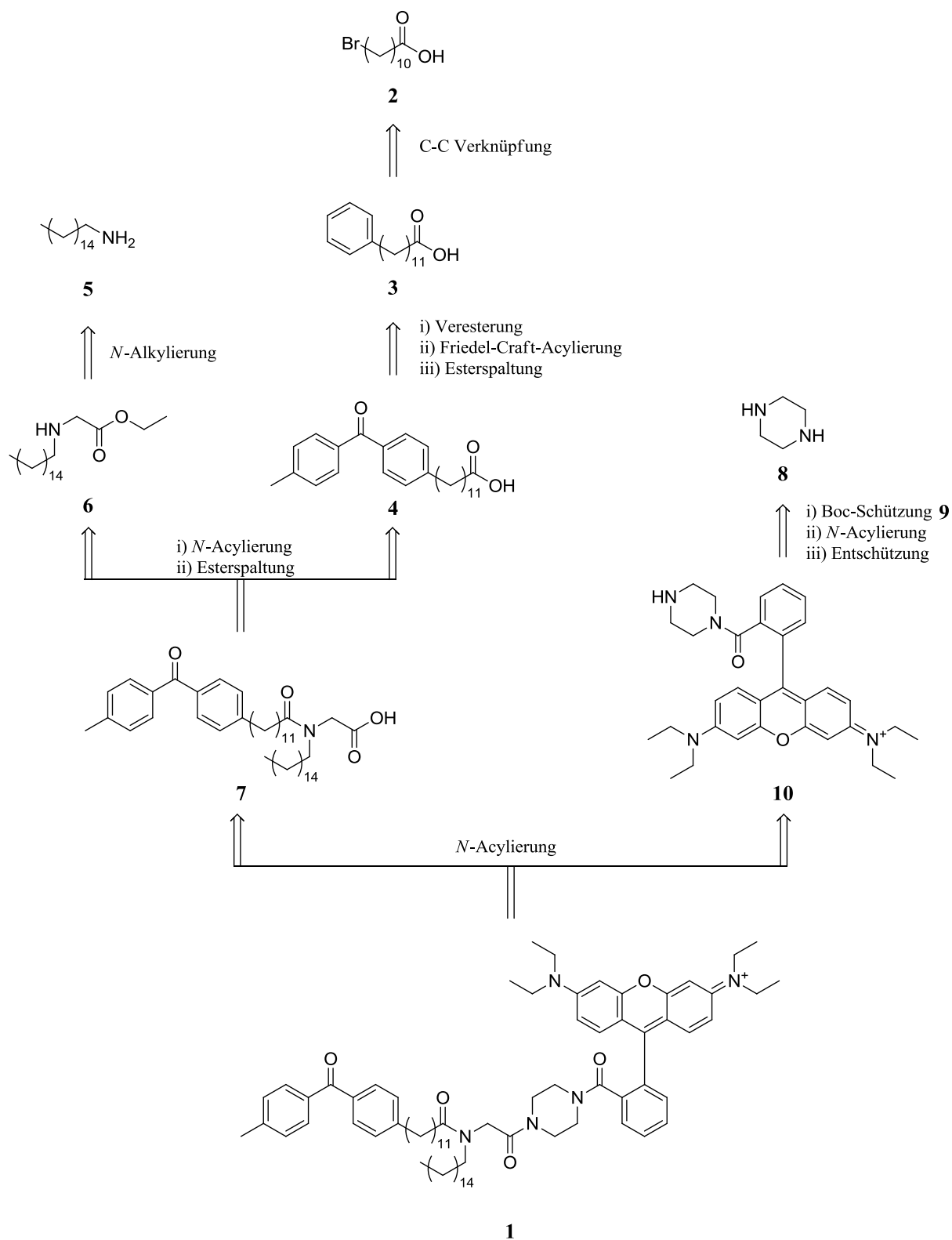


Abbildung 18: Zielverbindung, Orange: Palmitoylrest; blau: Fettsäurerest mit photoaktivierbarer Gruppe; schwarz: Glycin-Rückgrat mit Piperazin; rot: Rhodamin B.

Die Retrosynthese umfasste elf Synthesestufen mit 11-Bromundecansäure, Hexadecylamin, Glycin und Piperazin als günstige Ausgangsmaterialien. Die Edukte erlauben eine einfache Homologisierung, was zu einer hohen Divergenz führt.

4.2 Retrosyntheseplan



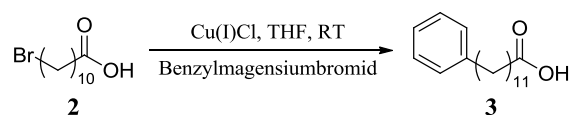
Schema 1: Retrosyntheseplan.

4.3 Synthese

Für die Darstellung der (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäure (4) konnte auf eigene Vorarbeiten im Rahmen einer anderen Arbeit zurückgegriffen werden.^[98] Zu Beginn der vorliegenden Arbeit standen von dieser Zwischenstufe ausreichende Mengen zur Verfügung, um die synthetischen Arbeiten ohne Nachsynthese abschließen zu können. Die Ergebnisse werden hier kurz vorgestellt, um einen Überblick über den gesamten Syntheseweg zu geben.

Die Verschleppung von metallischen Katalysatorresten in einen pharmazeutischen Wirkstoff, kann zu einer adjuvanten, nicht strukturbedingten Toxizität führen. Sofern metallkatalysierte Reaktionen nicht vermieden werden können, sollten sie in der Synthesesequenz möglichst frühzeitig durchgeführt werden, damit eine sukzessive Abreicherung erfolgen kann. Somit wurde die kupferkatalysierte C-C Verknüpfung in der ersten Stufe durchgeführt. Eine bemerkenswerte, von Ren *et al.* veröffentlichte, kupferkatalysierte Grignard-Reaktion ermöglichte die direkte Verknüpfung eines Phenylrings, respektive Benzylrests mit der ω -Position der 11-Bromundecansäure (2) unter Tolerierung der freien Carboxy-Funktionalität.^[99]

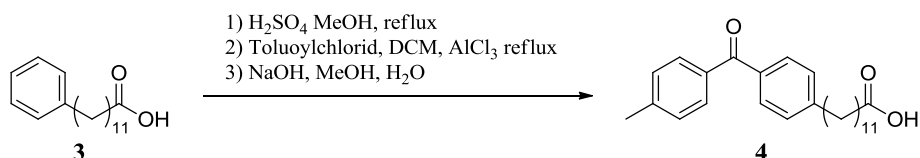
Die zu erwartende, unerwünschte Reaktion zum tertiären Alkohol unterbleibt, es muss lediglich ein weiteres Äquivalent Grignard-Reagenz zugesetzt werden, um die Säure *in situ* in das Magnesium-Salz überzuführen. Unter Verwendung von Benzylmagnesiumbromid als Grignard-Reagenz wurde 12-Phenylundecansäure (3) erhalten (Abb. 18).



Schema 2: Kupferkatalysierte C-C Verknüpfung.

Eine denkbare Alternative Reaktion mit Phenylmagnesiumbromid zu 11-Phenylundecansäure wurde verworfen, um die Bildung von Benzol unter Hydrolysebedingungen zu vermeiden. Die Ausbeute betrug 74%.

Für die anschließenden Friedel-Crafts-Acylierung wurde die Säuregruppe als Methylester geschützt, der mittels Fischer-Veresterung quantitativ erhalten wurde. Umsetzung mit *p*-Toluoylchlorid lieferte den (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäuremethylester.

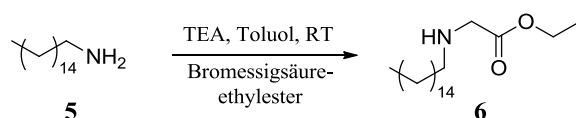


Schema 3: Darstellung von (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäure.

Die Ausbeute betrug 39% und lag damit im Erwartungsbereich für Friedel-Crafts-Acylierungen. Als Nebenprodukt wurden 3% des *ortho*-Isomeren isoliert. Anschließend wurde der Methylester in wässrig-methanolischer Natronlauge quantitativ hydrolysiert und die (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäure (4) erhalten. Zur Steigerung der moderaten Ausbeute wurden zwei mikrowellengestützte, lösemittelfreie Varianten getestet mit Zink bzw. Kupfer-Eisen-Ferrit als Lewis-Säure, jedoch wurde kein Produkt erhalten.^{[100], [101]}

Eine optimierte Atom-Ökonomie ließe sich durch eine Umstellung der Synthesesequenz erzielen, indem die Veresterung bereits vor der C-C-Verknüpfung erfolgte, da dies das zusätzliche Äquivalent an Grignard-Reagenz obsolet macht. Da die Reaktion allerdings nicht mit Benzylderivaten beschrieben worden war und die bestehende Syntheseroute zufriedenstellende Ausbeuten lieferte, wurde auf die Optimierung verzichtet und die Aufskalierung mit der etablierten Sequenz durchgeführt.

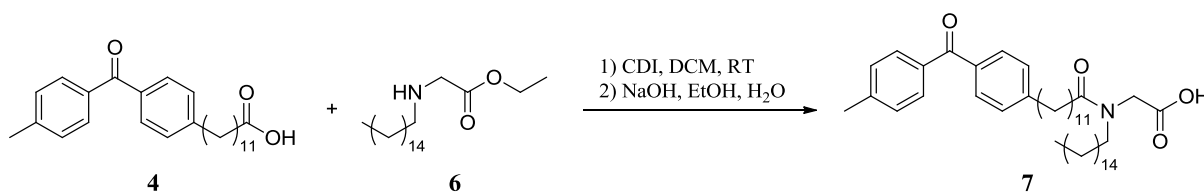
Der zweite Baustein (6), um den hydrophoben Teil der Zielsubstanz zusammensetzen, wurde durch die *N*-Alkylierung von Hexadecylamin (5) mit Bromessigsäureethylester erhalten. Infolge der höheren Nucleophilie des sekundären Amins (6) gegenüber dem Edukt (5) entstand auch das tertiäre Amin, dessen Bildung sich auch nicht durch überschüssigen Bromessigester vollständig unterdrücken ließ. Aufgrund der Ansatzgröße wurde von einer chromatographischen Trennung abgesehen und das Rohprodukt stattdessen destillativ gereinigt.



Schema 4: *N*-Alkylierung von Hexadecylamin.

Bei der Destillation musste der Destillationskolben auf 200 °C erhitzt werden, um das Produkt bei einem Druck von $3 \cdot 10^{-2}$ mbar in die Vorlage zu überführen.

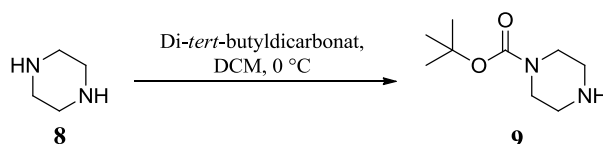
Die Übergangstemperatur betrug ca. 140 °C. Die hohe thermische Belastung führte mutmaßlich zur Bildung von Polyamiden durch Aminolyse der Estergruppe, so dass das gewünschte Produkt nur in 15% Ausbeute erhalten werden konnte. Das Reaktionsprodukt aus dem vorangegangenen Schritt (6), konnte in einer Acylierungsreaktion mit der (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäure (4) zum tertiären *N,N*-Dialkylamid (7) umgesetzt werden. Dazu wurde die Carbonsäure mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) in das reaktivere Carboxyimidazolid übergeführt und anschließend, das zu acylierende Amin zur aktivierten Spezies hinzugegeben. Die Acylierung verlief mit einer Ausbeute von 90%, die anschließende Esterspaltung war quantitativ.



Schema 5: Abschluss der Synthese des hydrophoben Bausteins.

Nach der Spaltung des Ethylesters war die Synthese des hydrophoben Bestandteils abgeschlossen und es konnte die hydrophile Kopfgruppe synthetisiert werden.

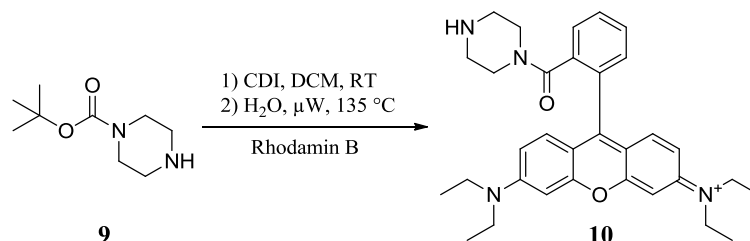
Als Brücke zwischen Rhodamin B und dem hydrophoben Bestandteil sollte Piperazin (8) dienen. Das Rhodamin-Piperazid (10) ist in der Literatur mehrfach beschrieben. Allerdings konnte es anhand der Literaturvorschriften nicht in akzeptabler Reinheit dargestellt werden. In der Literatur wird das Amid (10), stets als Rohprodukt für die Folgesynthesen eingesetzt. Versuche, das Rohprodukt mittels Kristallisation, Sublimation oder Chromatographie zu reinigen verliefen erfolglos. Um einen eindeutigen Reaktionsverlauf zu erzielen, wurde Piperazin (8) durch Umsetzung mit Di-*tert*-butyldicarbonat in das einfach geschützte Boc-Derivat (9) übergeführt.



Schema 6: Darstellung von mono-Boc-Piperazin.

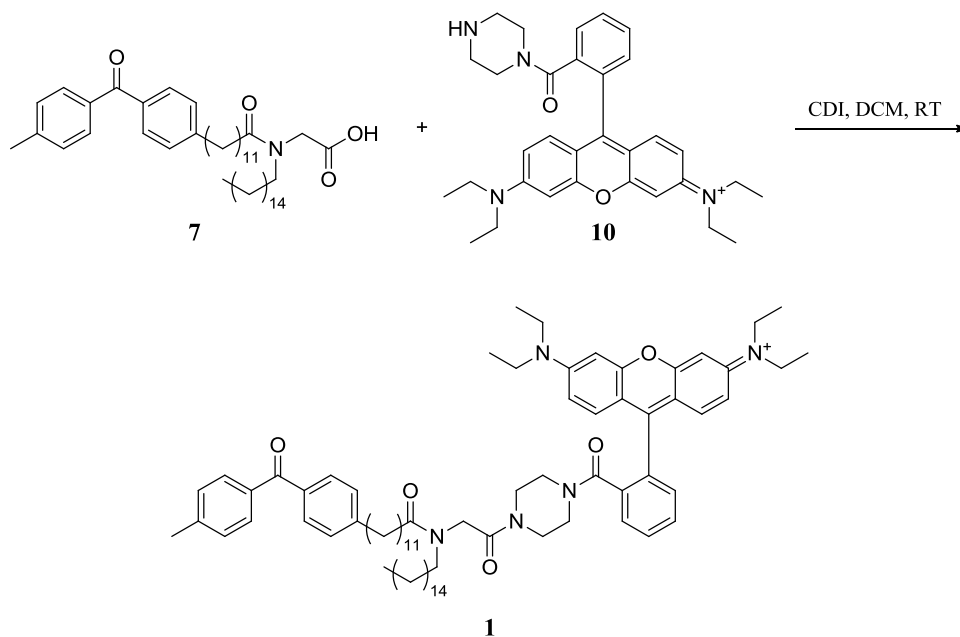
Anschließend wurde Rhodamin B mit CDI in das Carboxyimidazolid übergeführt und das mono-Boc-Piperazin (9) hinzugegeben. Im Gegensatz zum ungeschützten Derivat lässt sich das Boc-geschützte Rhodamin-Piperazid chromatographisch reinigen. Zunächst wurde das freie Rhodamin B durch Elution mit Aceton abgetrennt.

Anschließend wurde die Säule auf Dichlormethan/Methanol (90:10) umequilibriert und das Produkt von der Säule eluiert. Die Schützung verlief mit 70%, die Darstellung des geschützten Rhodamin-Piperazids gelang mit 90% Ausbeute. Das Boc-Carbamat wurde vorteilhaft in überhitztem Wasser bei 135 °C im Mikrowellenreaktor in quantitativer Ausbeute entschützt.



Schema 7: Darstellung der Rhodamin-Piperazids.

Nach Lyophilisierung fiel das gewünschte Produkt (10) analysenrein an. Die Verknüpfung des Rhodamin-Piperazids (10) mit dem hydrophoben Rest (7) erfolgte wiederum in bewährter Weise durch die Darstellung des intermediären Carboxyimidazolidis mit CDI und anschließender Zugabe des Amins. Die Zielsubstanz R87 (1) wurde mit einer Ausbeute von 56% erhalten.



Schema 8: Darstellung der Zielsubstanz R87.

4.4 Dynamische NMR-Studie

Aufgrund der zunehmenden Größe des Moleküls war zu erwarten gewesen, dass die NMR-Spektren an Komplexität gewinnen und die Zuordnung der Signale anspruchsvoller werden würde. Einen wesentlichen Teil trugen dazu die enthaltenen Amidbindungen bei. Ihr partieller Doppelbindungscharakter führte zu einer erhöhten Rigidität am Glycin-Rückgrat und damit zu gehinderter Rotation, die in der Ausbildung von diskriminierbaren Rotationsisomeren mündete. Protonen, die in α -Position zu einem Amid stehen, (siehe Schema 7, S. 28) zeigen gebrochene Integralverhältnisse, da sie infolge der zu geringen Austauschgeschwindigkeit nicht mehr chemisch äquivalent sind.

Um nachzuweisen, dass alle Signale zu dem gewünschten Produkt gehören, wurde ein dynamisches ^1H -NMR-Spektrum (DNMR) aufgenommen. Dazu wurde dieselbe Probe bei verschiedenen Temperaturen gemessen und die Veränderung des Spektrums beobachtet. Die Zufuhr von Wärmeenergie führt dazu, dass die Energiebarriere zwischen den Rotationsisomeren überschritten werden kann und die Diskriminierbarkeit der Isomeren verschwindet. Die chemische Inäquivalenz der Protonen in α -Position zu den Amididen sollte aufgehoben werden, die Signale der einzelnen Protonen zunächst koaleszieren und schließlich das Durchschnittssignal geben.

Abbildung 19 zeigt das DNMR von R87. Aufgetragen ist der relevante Messbereich für das Protonenspektrum bei den Temperaturen 25, 40, 60, 80 und 100 °C.

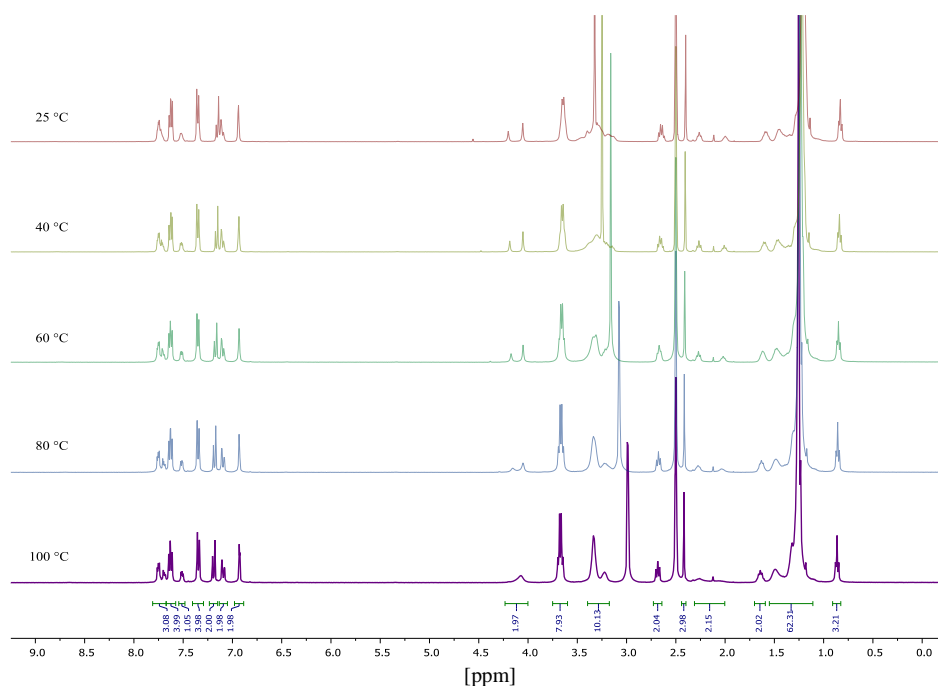


Abbildung 19: DNMR von R87.

Die Erhöhung der Messtemperatur führt zu einer Koaleszenz bei allen Protonen die sich in α -Position zu einer Amidbindung befinden. Exemplarisch ist dafür der Bereich zwischen 2.5 ppm und 4.6 ppm in Abbildung 20 vergrößert dargestellt.

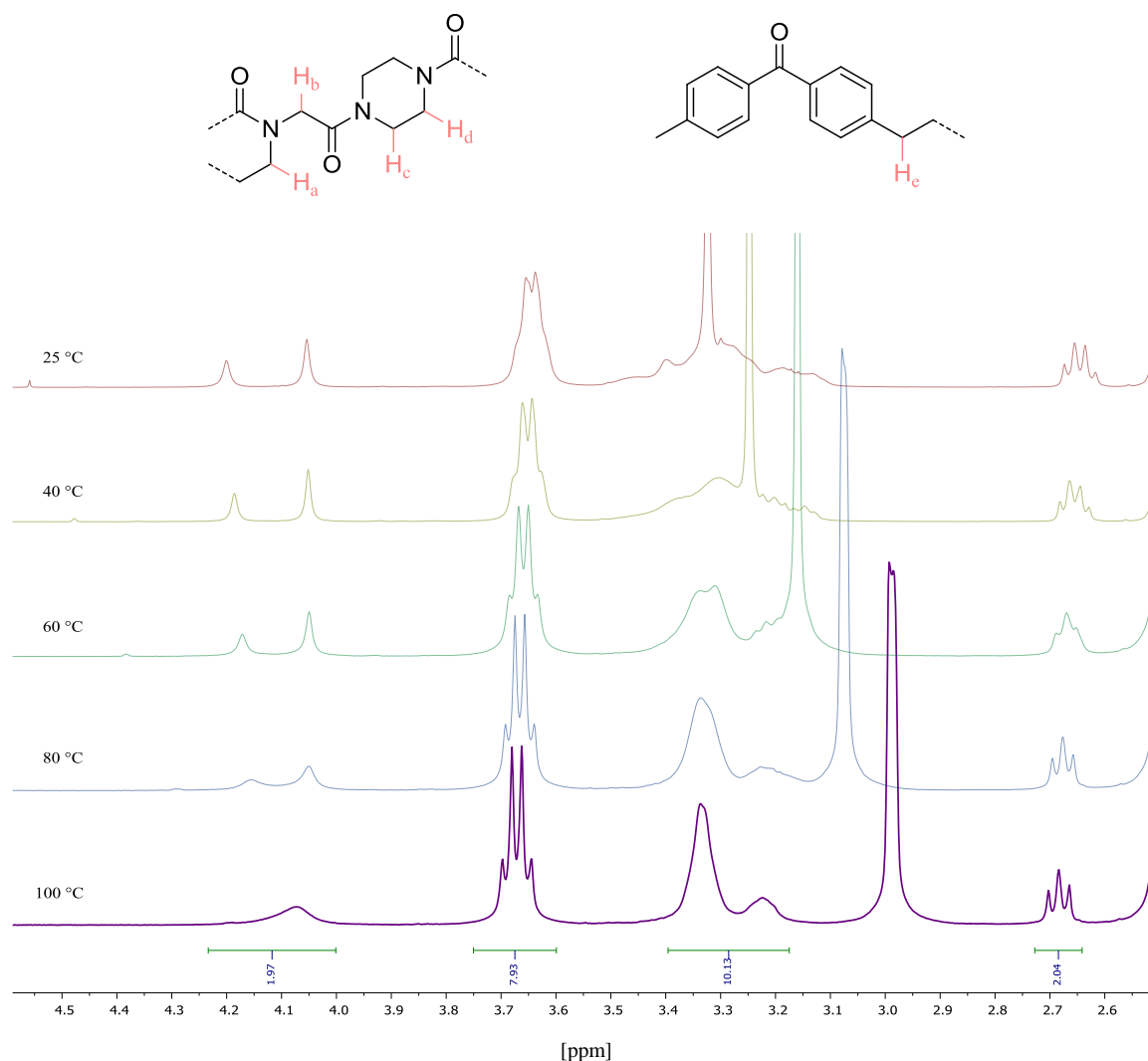


Abbildung 20: DNMR von R87 vergrößert, mit Molekülausschnitt.

Der Einfluss der gehinderten Rotation, auf die chemische Verschiebung, ist bei den Protonen zwischen den beiden Amidinen (H_b) besonders gut zu erkennen. Während es bei 25 °C noch aus drei diskreten Signalen zwischen 4.0 und 4.6 ppm besteht, koalesziert es bei ca. 100 °C zu einem breiten Singulett. Die zwei Protonen in α -Position zum amidischen Stickstoff (H_a) und die acht Protonen aus dem Piperazinrest (H_c und H_d) liegen zunächst, zusammen mit dem Wasser, als komplexes Multiplett vor (3.1 ppm bis 3.5 ppm). Mit zunehmender Temperatur wandert das Wassersignal von ehemals 3.3 ppm auf 3.0 ppm und überlagert anschließend nicht mehr die Signale aus dem Molekül. Dies ermöglicht eine saubere Bestimmung des Integrals. Beide Signale koaleszieren analog zu H_a bei ca. 100 °C. Im Ausschnitt ebenfalls zu sehen ist das benzylicke Signal (H_e, 2.7 ppm).

Bei 25 °C entsteht der irrtümliche Eindruck eines Quartetts, stattdessen sind die Signale der beiden Protonen in etwa um den Wert der 3J -Kopplungskonstante gegeneinander verschoben. Ab ca. 80 °C zeigt sich das erwartete Triplet und befindet sich bei 100 °C bereits nahe am Durchschnittssignal.

Mithilfe des DNMR konnte damit gezeigt werden, dass das vorliegende Spektrum ausschließlich eine Substanz zeigt. Die bei Raumtemperatur unterscheidbaren Signale der Rotamere koaleszieren bei erhöhter Temperatur durch die Überwindung der Rotationsbarriere und die dazugehörigen Protonen werden chemisch äquivalent.

4.5 Photochemische Funktionalisierung von Exosomen

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit M. Sc. Alexander Hartmann aus dem Institut für Neuropathologie unter Leitung von Prof. Dr. Med. Markus Glatzel vom Universitätsklinikum Eppendorf erarbeitet.

Im Zuge einer vorangegangenen Arbeit wurde eine reduzierte Variante, des in dieser Arbeit vorgestellten Photoaffinitäts-Labels R87 dargestellt.^[98] Die Verbindung, mit der Bezeichnung R51, weist keine zweite Alkylkette auf und verzichtet daher auch auf das Glycin-Rückgrat (Abb. 21).

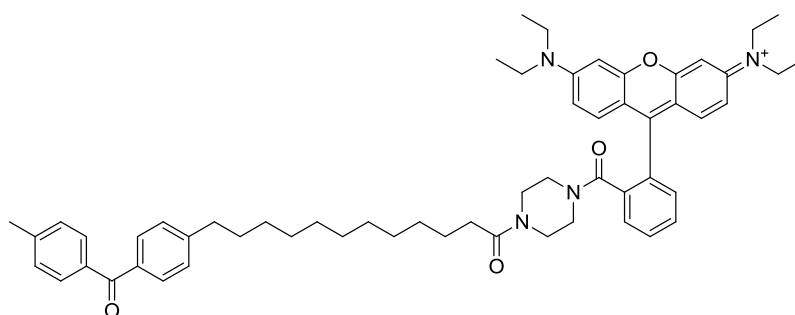


Abbildung 21: Struktur von R51.

Ein Teilaspekt der photochemischen Untersuchungen sollte sein, ob der synthetische Mehraufwand zur Einführung einer zweiten Alkylkette gerechtfertigt ist. Beide Verbindungen zeigten bereits in Vorversuchen unterschiedliche Eigenschaften in wässriger Lösung.

Eine 40 μM Lösung von R87 wies eine erkennbar niedrigere Oberflächenspannung auf, während bei der gleichen Konzentration von R51 der Meniskus weiterhin deutlich sichtbar blieb (Abb. 22). Dies zeigte, dass die angestrebten, tensidischen Eigenschaften bei R87 deutlich ausgeprägter waren als bei R51.



Abbildung 22: 40 μM , wässrige Lösungen von R87 (li.) und R51 (re.).

Mit R51 und R87 wurden Markierungsexperimente an Exosomen durchgeführt, mit dem Ziel, Exosomen longitudinal stabil an der Oberfläche zu funktionalisieren. Die verwendeten Exosomen entstammen von Zellen einer Zelllinie des Typs N2a (Neuro2a Zellen, schnell wachsende murine Neuroblastoma-Zelllinie). Dabei diente die Rhodamin-Kopfgruppe zur Erfolgskontrolle mithilfe der Konfokalmikroskopie. Ferner konnte durch den anvisierten lipophilen Charakter, das Molekül wie ein Membranfarbstoff behandelt und auf etablierte Methoden zur Färbung von exosomalen Membranen zurückgegriffen werden.^[102] Zum Vergleich wurde PKH26, ein Vertreter aus der Klasse der Bisindolylmethin-Farbstoffe herangezogen (Abb. 23).

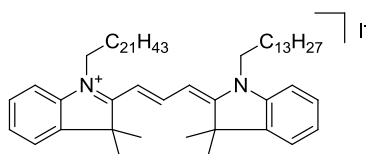


Abbildung 23: PKH26

Derartige Farbstoffe werden sehr häufig zur Markierung von biologischen Membranen verwendet, sind jedoch nicht longitudinal stabil, d.h. sie diffundieren innerhalb einer Membran und auch zwischen benachbarten Membranen. Dieser Effekt wird z.B. bei Studien zur Zellproliferation ausgenutzt.^[103] Es wurde erwartet, dass sich R87 vor Bestrahlung ähnlich verhält, jedoch nach der photochemischen Verankerung keine Diffusion mehr aufweist.

Bei der Etablierung eines eigenen Färbeprotokolls wurde daher auf das Standardprotokoll zur Färbung von Exosomen mit PKH26 zurückgegriffen, es ist relativ aufwändig und umfasst fünf Schritte:

- I. Inkubation der Exosomen mit Diluent C
- II. Inkubation mit dem Farbstoff
- III. Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS)
- IV. Reinigung der gefärbten Exosomen mithilfe eines Dichtegradienten
- V. Isolation mittels Ultrazentrifugation

4.5.1 Versuche mit nicht bestrahlten Exosomen

Zunächst wurde das Protokoll als Standard für drei Farbstoffe, R51, R87 und PKH26, parallel reproduziert. Im Dichtegradienten konnte in allen Fällen eine farbige Bande beobachtet werden, die aus angefärbten Exosomen bestand. Die Kontrolle blieb farblos (siehe Abb.).

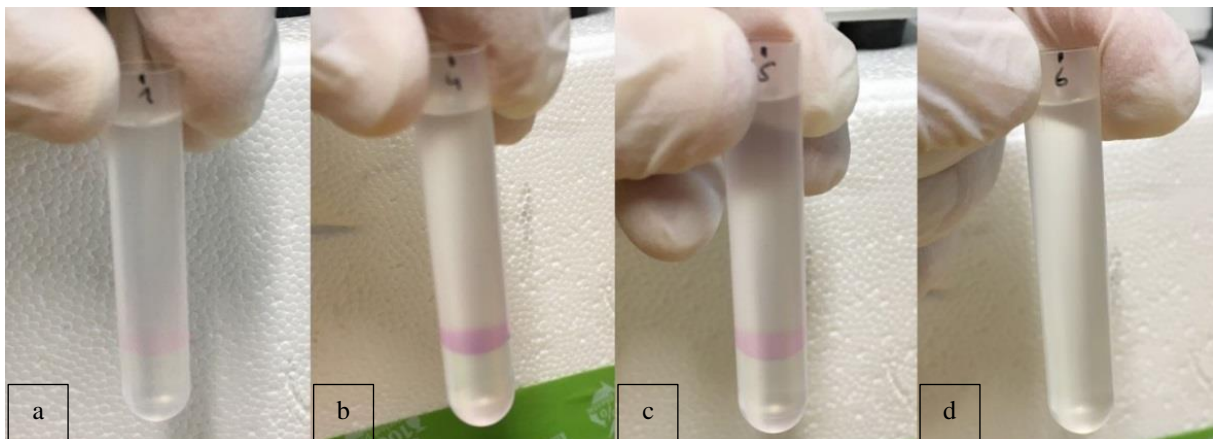


Abbildung 24: Dichtegradient nach erfolgter Ultrazentrifugation, a) R51, b) R87, c) PKH26, d) Kontrolle.

In der Abbildung sind deutliche Unterschiede in der Intensität der Färbung zu erkennen. Der Farbeindruck bei R87 ist deutlich intensiver als bei R51 und PKH26. Da R87 und R51 das identische Chromophor tragen, kann hier ein proportionaler Zusammenhang zur interkalierten Menge an Farbstoff hergestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigte Vorversuche, in denen R87 günstigere Eigenschaften aufwies, als R51. Daher wurde die Anfärbung mit R51 nicht weiterverfolgt und die weiteren Arbeiten auf R87 fokussiert.

Der Nachweis auf Exosomen wurde durch eine SDS-Page mit anschließendem Western Blot geführt (Abb. 25). Dabei wurde gezielt auf Flotillin-1 geprüft. Flotillin-1 ist ein Membranprotein, dass am ESCRT-Komplex beteiligt ist und auf diesem Wege in die exosomale Membran eingebaut wird. Es ist ein gängiges Markerprotein für die Analyse von Exosomen.^[104] Der Gradient wurde schrittweise abgetragen und in 12 Fraktionen geteilt, die farbige Bande entsprach in allen Fällen der Fraktion 9. Die Ergebnisse aus dem Western Blot zeigten, dass es sich bei der farbigen Bande um die exosomenhaltige Fraktion handelt.

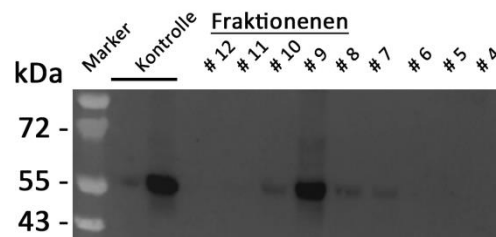


Abbildung 25: Western Blot mit Nachweis auf Flotillin-1.

Nach der Isolierung wurden die angefärbten Exosomen für Inkubationsexperimente an N2a-Zellen eingesetzt, aus denen auch die Exosomen ursprünglich gewonnen wurden. N2a Zellen interagieren mit Exosomen auf natürliche Weise. In Abbildung 26 und 27 sind die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Zellen zu sehen, die mit den jeweiligen, angefärbten Exosomen (rot) behandelt wurden.

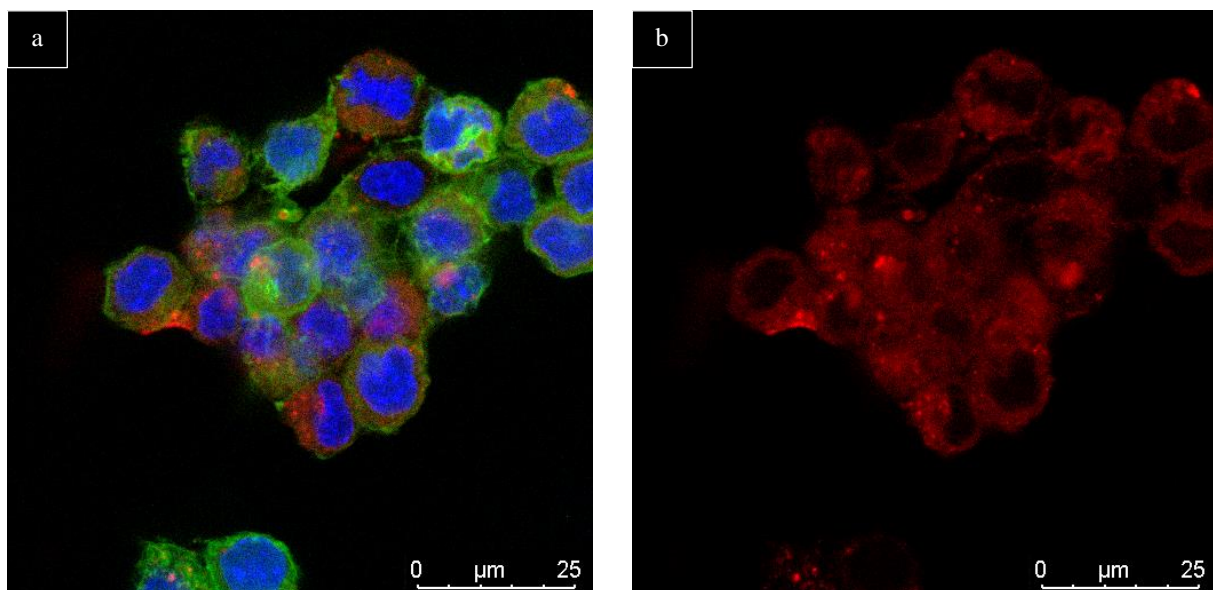


Abbildung 26: N2a Zellen mit PKH26 gefärbten, nicht betrahteten Exosomen.

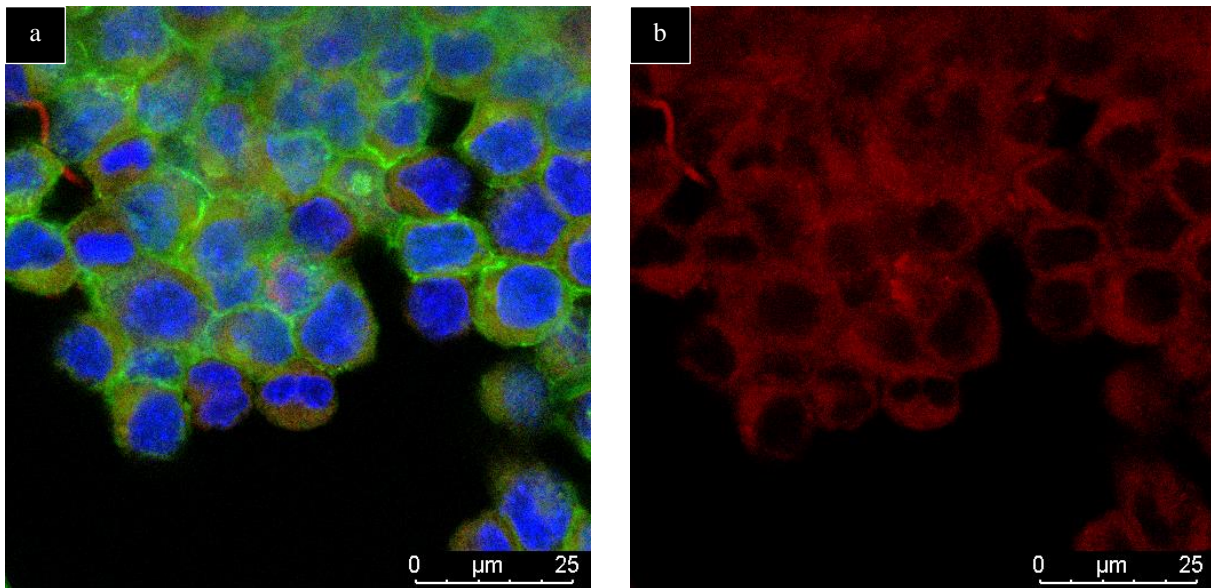


Abbildung 27: N2a Zellen mit R87 gefärbten, nicht bestrahlten Exosomen.

Sowohl PKH26- als auch R87-angefärbte Zellen zeigten eine ungehinderte Diffusion. Während R87 ein sehr homogenes Diffusionsverhalten zeigt (Abb. 27), sind bei PKH26 in verschiedenen Bereichen Akkumulationen zu erkennen (Abb. 26). Ein solches Phänomen wurde in der verwendeten Literatur bisher nicht beschrieben, war jedoch -auch mit verschiedenen Farbstoff-Chargen- stets reproduzierbar und scheint somit nicht artefaktisch. Die Ergebnisse zeigen, dass das Standardprotokoll für PKH26 zur Anfärbung von exosomalen Membranen auf R87 übertragbar ist.

4.5.2 Versuche zur Bestrahlung mit UV-A Strahlung

Für die ersten Bestrahlungsexperimente wurde ein Photoreaktor in Eigenbau konstruiert (siehe Abb.). Die Proben wurden in Quarzglasküvetten gefüllt und der Innenraum mithilfe eines Ventilators konstant auf 37 °C gehalten. Die Thermostatisierung auf physiologische Temperaturen war zielführend. Eine stärkere Absenkung war aufgrund der hohen Wärmeentwicklung durch die Leuchtmittel apparativ ohnehin nicht möglich.

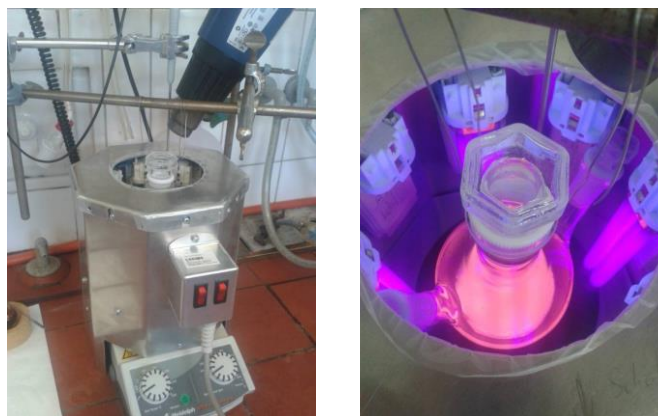


Abbildung 28: Verwendeter Photoreaktor, beispielhaft mit einem 2-Halskolben und einer 1 mM, wässrigen Lösung R87.

Die Bestrahlung erfolgte zwischen Schritt III und IV des Standardprotokolls, entsprechend nach der Zugabe des FCS und vor der Zentrifugation (siehe 4.5). Unter den gewählten Bedingungen konnte allerdings keine Verankerung des Farbstoffs erreicht werden. Stattdessen begannen die Exosomen ab einer Bestrahlungsdauer von 5 Min. erste Aggregate zu bilden, die zunächst nur im Konfokalmikroskop sichtbar waren (Abb. 29). Nach 10 Min. war eine Trübung mit bloßem Auge erkennbar.

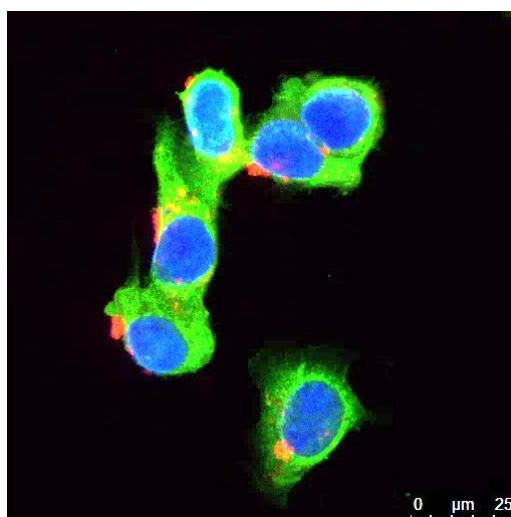


Abbildung 29: Exosomen nach 5 Min. Bestrahlung im Reaktor.

Unerwartet zeigte R87 eine zu geringe Absorption im UV-A Bereich, vielmehr erforderte die geringe Effizienz der photochemischen Verankerung verlängerte Bestrahlungszeiten, die mit einer massiven Schädigung der Exosomen einherging. Daher wurde, zur Anregung der kürzerwelligen Absorptionsbande des Benzophenons, die Bestrahlung im UV-C Bereich untersucht.

4.5.3 Optimierung des Färbeprotokolls

Für die weiterführenden Bestrahlungsversuche wurde jedoch zunächst eine Optimierung des Färbeprotokolls durchgeführt. Die Verwendung von PKH26 oder vergleichbaren Farbstoffen erfordert im ersten Schritt die Inkubation mit Diluent C. Dabei handelt es sich um einen Puffer, der unter anderem Detergenzien enthält (Abb. 30). Er dient dazu die Membran temporär zu desintegrieren, um dadurch ein Eindringen des Farbstoffes zu ermöglichen.

250 mM NaCl
10 mM Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid)
0.1 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat)
1 mM DTT (Dithiothreitol)
0.15% Triton X-100 ((p-tert-Octylphenoxy)polyethoxyethanol)
200 µg/ml BSA (Bovines Serumalbumin)
50% Glycerol

Abbildung 30: Zusammensetzung Diluent C.

Die Desintegration der Membran kann allerdings nachhaltige Schäden bewirken, die zur Zerstörung des Vesikels führen können. Dieser lytische Prozess wird nach der Inkubation mit dem Farbstoff durch die Zugabe von FCS abgebrochen.

Die Verwendung von FCS ist in mehrfacher Hinsicht problematisch. Neben der ethisch fragwürdigen Gewinnung aus den Föten geschlachteter, trächtiger Weidekühe, ist die genaue Zusammensetzung und die Funktion ihrer Bestandteile in der Zellkultur weitestgehend unerforscht und bekannten Bestandteilen kann häufig keine Funktion zugeordnet werden.^{[105], [106]}

Da es sich um ein Naturprodukt handelt, ist es natürlichen Schwankungen unterlegen, die dazu führen, dass sich die Chargen stark unterscheiden. Dennoch ist FCS in der Zellkultur derzeit unverzichtbar. An einer Substitution wird intensiv geforscht und erste Lösungsansätze wurden publiziert.^[107]

Die Zugabe von Diluent C und FCS erfordert eine aufwändige Reinigung der angefärbten Exosomen. Diese erfolgt durch einen Dichtegradienten, für den häufig OptiPrep™ verwendet wird. Dabei handelt es sich um eine 60%ige, wässrige Lösung von Iodixanol (Abb. 31).

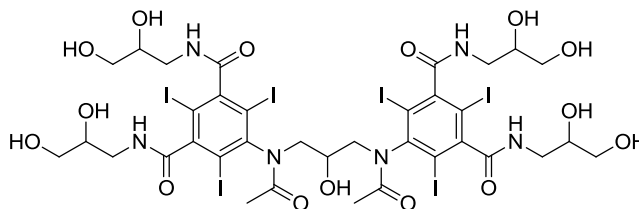


Abbildung 31: Iodixanol.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Proben, die mithilfe dieses Dichtegradienten gereinigt wurden, Iodixanol mittels MADLI als prozessbedingte Verunreinigung nachgewiesen werden (Abb. 32). Das entsprechende Signal für $[M+H]^+$ konnte bei 1550.735 $[M/z]$ gefunden werden.

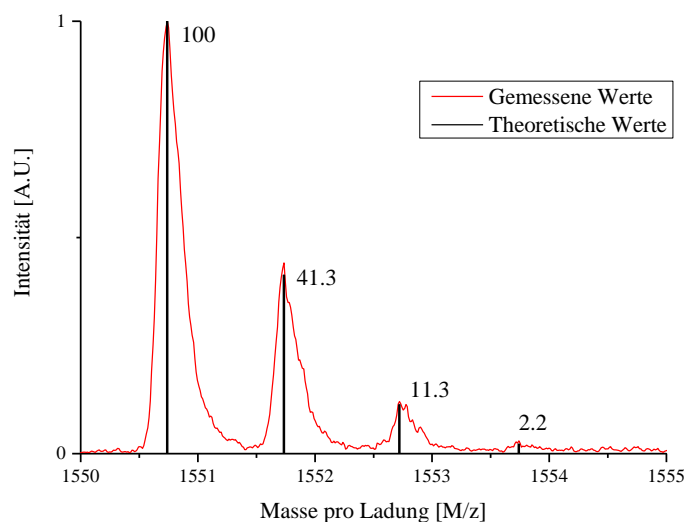


Abbildung 32: MALDI von Iodixanol.

Das Isotopenmuster entspricht exakt der Verteilung, die für ein Molekül mit der Summenformel $C_{35}H_{44}I_6N_6O_{15} + H^+$ zu erwarten ist. Neben dem Molekülpeak und den entsprechenden Natrium- (+23) und Kaliumaddukten (+39) wurden noch weitere Signale gefunden, die auf einen Austausch von Iod hinweisen (Abb. 33, S. 39). Da diese Signale bei einer parallelen ESI Messung nicht nachgewiesen werden konnten, sind sie methodenbedingt.

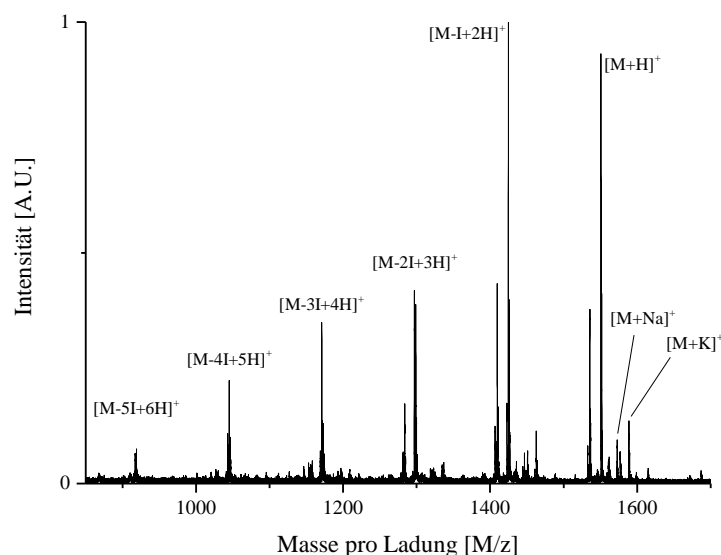


Abbildung 33: MALDI mit Iodixanolderivaten.

Iodixanol ist gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 zwar nicht als gefährlicher Stoff eingestuft, jedoch ist der Eintrag von Artefakten bei einem Reinigungsverfahren äußerst kontraproduktiv. Aufgrund dieser zahlreichen Nachteile wurde untersucht, ob das Färbeprotokoll auch ohne Diluent C, FCS und den Dichtegradienten erfolgreich durchgeführt werden kann und welchen Einfluss diese Modifikationen auf die Eigenschaften der Exosomen hat. Die wurde Prozedur auf die Inkubation mit dem Farbstoff und die Re-Isolierung mittels Ultrazentrifugation reduziert und die Ergebnisse mit der ursprünglichen fünfstufigen Methode verglichen. Als Vergleichsparameter wurden für PKH26 und R87 jeweils die Ausbeute nach der Re-Isolation, die Größe und die Größenverteilung der Exosomen mittels NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) bestimmt. Anschließend erfolgten Inkubations-experimente an Zellen. Die Ausbeute an R87-markierten Exosomen konnte mit der vereinfachten Methode von durchschnittlich 50% auf 70% gesteigert werden, wogegen eine Anfärbung mit PKH26 misslang. Zu Beginn hatte die verwendete Exosomen-Isolation eine durchschnittliche Größe von 120 nm mit einer durchschnittlichen Abweichung von ± 61 nm (Tab.1).

Tabelle 1: Vergleich der Methoden unter Verwendung von R87.

	Ausgangswert	Ursprüngliche Methode (5 Schritte, R87)	Vereinfachte Methode (2 Schritte, R87)
Größe [nm]	120 ± 2.3	140 ± 1.0	136 ± 2.5
Mittlere Abweichung von der Größe [nm]	61 ± 2.3	108 ± 9.7	72 ± 3.5
Ausbeute [%]	-	50	70

Bei beiden Methoden ist nach der Behandlung die mittlere Größe angewachsen. Dieser Effekt war auch bei den Vergleichsproben ohne Farbstoff zu beobachten und ist somit prozessbedingt. Die Zentrifugation führt zu einer Anreicherung größerer Vesikel im Sediment, da kleinere Partikel aufgrund ihrer geringeren Sedimentationsgeschwindigkeit im Überstand verbleiben können. Dieser Effekt war jedoch bei dem optimierten Verfahren signifikant geringer. Darüber hinaus zeigten die so markierten Exosomen eine einheitliche monomodale Verteilung. Während die mittlere Größenabweichung bei der ursprünglichen Methode um 47 nm auf 108 nm anstieg, gab es bei der vereinfachten Methode lediglich einen moderaten Anstieg um 11 nm auf 72 nm.

Nach Inkubation von N2a-Zellen mit R87-markierten Exosomen, die jeweils nach dem Standardprotokoll und dem optimierten Verfahren gewonnen wurden, konnte in beiden Fällen Fluoreszenz in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 34). Diese war eindeutig auf R87 zurückzuführen, wie durch Lambda-Scans belegt werden konnte. Die unter Zugabe von Diluent C präparierten Exosomen bewirkten eine sehr ausgeprägte Diffusion von R87 (a). Im Gegensatz dazu zeigte die Inkubation mit markierten Exosomen aus der vereinfachten Prozedur ein granulares Erscheinungsbild (b). Worauf dieses unterschiedliche Verhalten zurückzuführen ist, konnte nicht abschließend geklärt werden.

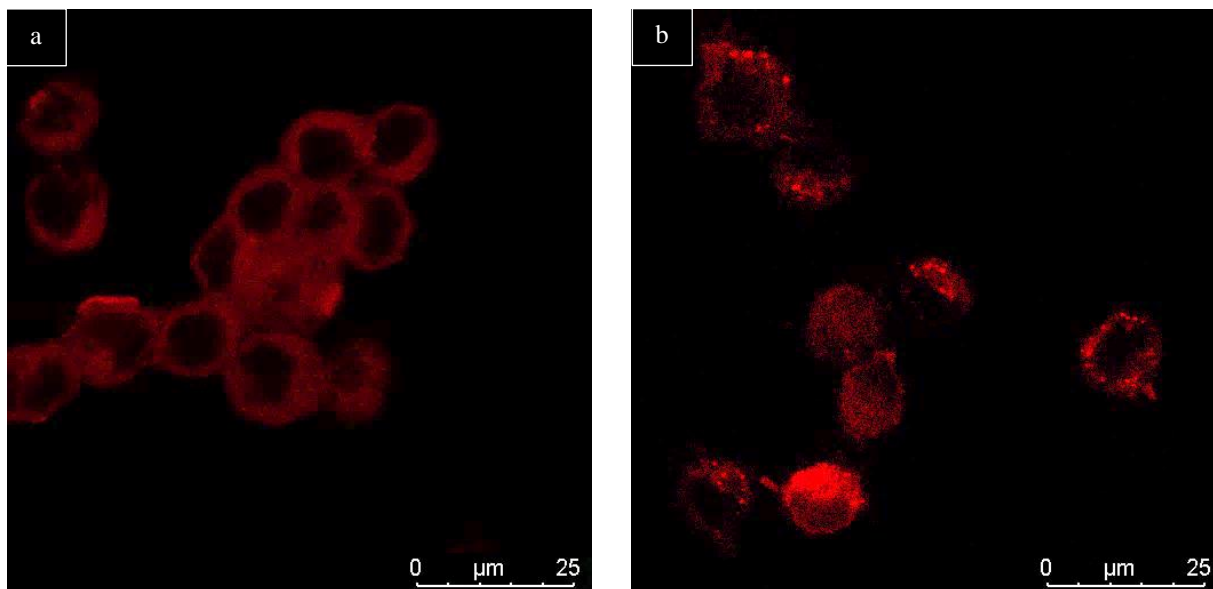


Abbildung 34: N2a Zellen mit angefärbten Exosomen (R87) ohne Bestrahlung.
a) Standardprotokoll; b) Optimiertes Verfahren.

Eine mögliche Erklärung ist, dass die in Diluent C enthaltene Detergenzien über die exosomale Membran in die Zellen verschleppt wurden und dort die Diffusion des Farbstoffs in andere Membrankompartimente begünstigten.

Dieser Befund weist auf eine signifikante Denaturierung der nativen Exosomenmembran hin, was eine Interpretation biologischer Daten erschwert. Da die Anfärbung mit PKH26 nach der vereinfachten Methode misslang, konnten hier keine Vergleichswerte erhoben werden. Als nächster Schritt wurde die photochemische Verankerung von R87 unter UV-C Strahlung untersucht.

4.5.4 Versuche zur Bestrahlung mit UV-C Strahlung

Für die Sterilisation von Werkbänken werden in der Zellbiologie handelsübliche Leuchtstoffröhren mit einem erhöhten UV-C Anteil verwendet, die in vielen Fällen bereits herstellerseitig in die Werkbänke integriert werden. Eine Nutzung dieser Strahlungsquelle zur photochemischen Verankerung von R87 erschien daher besonders anwenderfreundlich. Aufgrund der energiereicheren Strahlung einerseits und des höheren Absorptionskoeffizienten des Benzophenons im UV-C Bereich andererseits, war zu erwarten, dass die photochemische Reaktion schneller als unter UV-A-Bestrahlung abliefe. Außerdem könnte die energiereichere Strahlung zu einer schnelleren photobiologischen Schädigung führen. Daher wurde ein Zeitfenster zwischen 0 und 3 Minuten untersucht. Für die Anfärbung wurde das optimierte Protokoll verwendet. Nach der Inkubation mit R87 und wurde für 0, 1, 2, und 3 Minuten bestrahlt. Die funktionale Integrität der Exosomen wurde mittels NTA und Zellaufnahme-Experimenten kontrolliert. Größe und Größenverteilung der Exosomen blieben bei Durchführung des Inkubations- und Bestrahlungsprozesses praktisch konstant, wie in der NTA gezeigt werden konnte (Abb. 35).

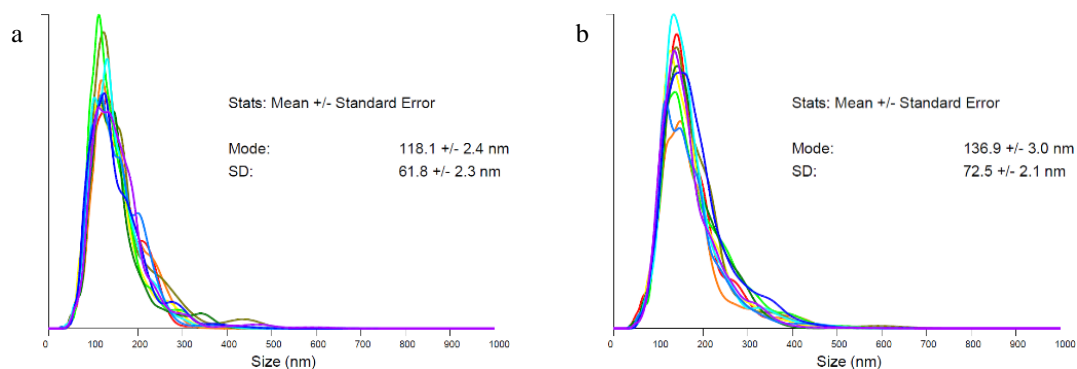


Abbildung 35: Größe und Größenverteilung vor der Anfärbung mit R87 (a) und nach der Re-Isolation (b).

Frisch isolierte native Exosomen (a) unterschieden sich von re-isolierten Exosomen nach Inkubation mit R87 und 2 min Bestrahlung (b) nur durch einen geringfügig gestiegenen Durchmesser.

Dies wurde ebenso bei unbehandelten Vergleichsproben beobachtet, und ist, wie bereits in Abschnitt 4.5.3 diskutiert, durch den erforderlichen Zentrifugationsschritt prozessbedingt.

Nach Aufarbeitung ließen sich routinemäßig ca. 70% der eingesetzten Exosomen markiert zurückgewinnen. Anschließend wurde die funktionale Integrität anhand der Aufnahme in N2a-Zellen konfokalmikroskopisch überprüft, insbesondere der Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungszeiten auf die Aggregation und das Diffusionsverhalten von R87 (Abb. 36).

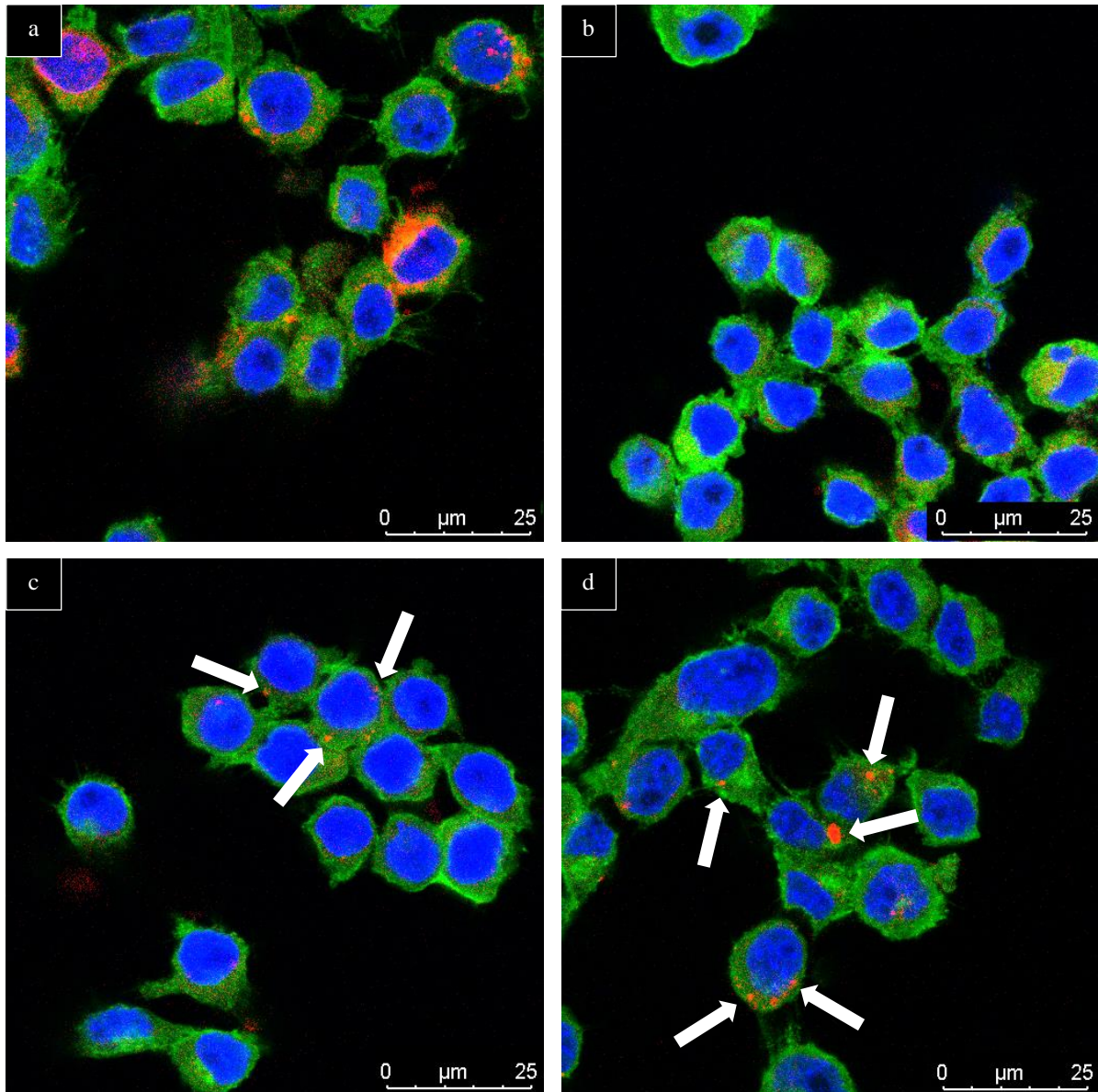


Abbildung 36: N2A Zellen inkubiert mit Exosomen, die unterschiedlich lange bestrahlt wurden.

a) 0 Min., b) 1 Min., c) 2 Min., d) 3 Min.

Ohne Bestrahlung ist die Diffusion des Farbstoffes zu erkennen, aufgrund dessen Exosomen nicht von freiem R87 unterscheidbar sind (a).

Dies entspricht den Befunden in Abschnitt 4.5.3 (Abb. 34). Nach 1 Min. Bestrahlungsdauer findet keine Diffusion mehr statt, stattdessen sind die Exosomen in Form von einzelnen, diskreten Punkten in den Zellen zu erkennen (b). Nach 2 Min. ist keine weitere Änderung in Bezug auf die Diffusion zu beobachten, allerdings setzt Aggregation ein (c). Nach 3 Min. ist die Zahl der Aggregate gestiegen, verbunden mit einem Zuwachs der Durchmesser von 1-2 μm auf bis zu 5 μm . Die Aggregation deutet auf photochemische Schädigung, jedoch zeigen hohe, lokal scharf abgegrenzte Konzentrationen von R87 die Effizienz der photochemischen Verankerung (d).

4.5.5 Reduktion der Farbstoffmenge

Zu Beginn der Studie wurde eine zu PKH26 direkt vergleichbare Menge an R87 eingesetzt. Nach Optimierung der Bestrahlungsdauer wurde die Empfindlichkeit der Methode untersucht. Dazu wurde die Ursprungskonzentration von R87 um 50% bzw. 75% reduziert und jeweils 1 Min. bestrahlt. Nach der vereinfachten Aufreinigung konnten markierte Exosomen wiederum in ca. 70% Ausbeute isoliert werden. Auch bei diesen Verdünnungen sind diese Exosomen ausreichend markiert, um sie konfokalmikroskopisch auf Zellen sicher nachweisen zu können (Abb. 37 a-c).

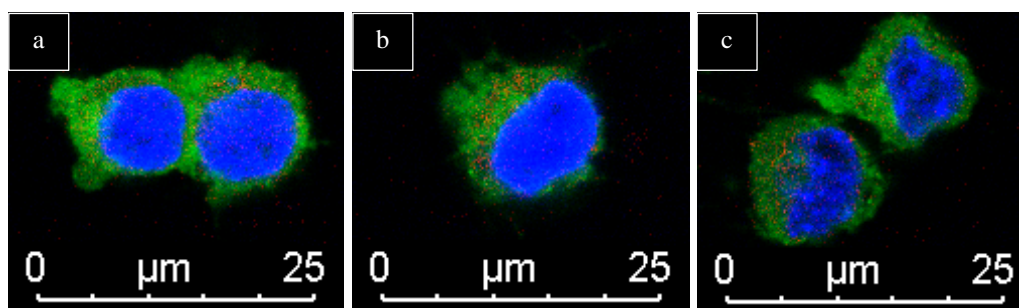


Abbildung 37: Proben mit variiertes Farbstoffmenge.
a) 100% (Originalmenge), b) 50% reduziert, c) 75% reduziert.

4.6 Photochemische Funktionalisierung synthetischer Vesikel

Nachdem die Funktionalisierung biologischer Membranen mit R87 gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob R51 für artifizielle Vesikel aus Polyisobutylcyanacrylat (PBCA) eingesetzt werden kann.

PBCA-Kapseln, die mit Rhodamin B beladen wurden, zeigten signifikantes Auslaufen, so dass nach einer Woche ca. 25% des Farbstoffs an das Medium abgegeben wurde. Deshalb wurde untersucht, ob eine photochemische Verankerung zu farbstabilen Polymernanopartikeln führt.

Dazu wurden PBCA-Kapseln nach einer modifizierten Variante von L. Haberkorn hergestellt.^[108] Bei der Synthese der PBCA-Kapseln wurde das R87 der ethanolischen Lösemittelkomponente beigefügt und die Synthese wie beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die erhaltenen PBCA-Kapseln, zur Abtrennung von freiem R51, vier Wasch- und Zentrifugationszyklen unterzogen. Die Mutterlauge bildete das erste Eluat E1, E2-E4 wurden in direkt darauffolgenden Reinigungszyklen erhalten. Die Waschlösungen wurden mittels Absorptionsmessung ($\lambda_{\max} = 567.8 \text{ nm}$) und einer Verdünnungsreihe auf ihren Gehalt an R51 untersucht. E1 und E2 enthielten kumuliert 5% des eingesetzten R51.

In den Eluaten 3 und 4 konnte kein R51 nachgewiesen werden, daraus ergibt sich eine Inkorporationsrate von 95%. Die Probe wurde auf ein Auslaufen überprüft und dazu 2 Wochen in demin. Wasser aufbewahrt. Es wurde nach 1 und 2 Wochen ein erneuter Waschzyklus durchgeführt und E5 bzw. E6 erhalten, in beiden Fällen konnte ebenfalls kein R51 mehr nachgewiesen werden.

In analogen Versuchen mit UV-A Bestrahlung im Photoreaktor (Abb. siehe 4.5.2) wurde das gleiche Ergebnis erhalten. R51 zeigte demnach auch ohne photochemische Verankerung eine außergewöhnlich hohe Affinität zu den PBCA-Kapseln, sodass eine Bestrahlung ohne messbaren Effekt blieb. Die Lipophilie von R51 reichte aus, um das Auslaufen des Rhodamins zu unterbinden. Die photoaktivierbare Gruppe könnte jedoch in anderen Fällen zu einer zusätzlichen Stabilisierung beitragen.

4.7 Versuche zur Darstellung eines di-end funktionalisierten Oligomers mittels Kationischer-Ringöffnungs-Polymerisation

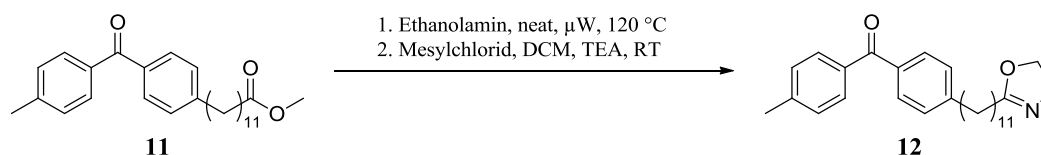
Nach der erfolgreichen Markierung von Exosomen mittels R87, wurde eine weitere Fragestellung untersucht. Wünschenswert erschien ein bi-funktionalisiertes System, das neben einem Fluoreszenzlabel zusätzlich eine biologische Entität, z.B. eine Peptidsequenz, einen Wirkstoff oder Antikörper präsentieren könnte. Dabei sollte bedacht werden, dass bei Anbindung von supramolekularen Strukturen wie z.B. Antikörpern, die photochemische Verankerung in der Membran über lediglich eine kovalente Bindung für ein longitudinal stabiles Signal unzureichend sein könnte.

Daher sollte die hypothetische Struktur der zweiten Generation neben der Bifunktionalität auch multiple Phototags enthalten. Dafür bot sich die Synthese von Oligooxazolinen über die Kationische-Ringöffnungs-Polymerisation (CROP) an.

4.7.1 Synthese der Bausteine

Polyoxazoline sind chemisch betrachtet acylierte Ethylenimine und weisen damit eine strukturelle Analogie zu R87 auf. Amidbindungen sind, wie bereits in 4.1 diskutiert, metabolisch weitgehend stabil.

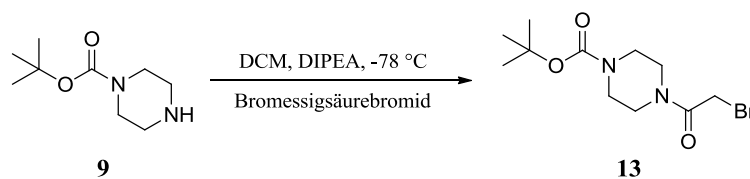
Zur Darstellung der drei benötigten Ausgangsmaterialien - Initiator, Monomer und Abbruchreagenz - wurde, um eine möglichst hohe Ähnlichkeit zu R87 zu erreichen, auf Bausteine zurückgegriffen die bereits bei der Synthese von R87 verwendet wurden. Als Edukt zur Darstellung des Monomers diente das (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäuremethylester (11). Im ersten Schritt wurde der Ester mit Ethanolamin ohne Lösemittel im Mikrowellenreaktor umgesetzt. Dabei erfolgte als Nebenreaktion die Bildung der Schiff'schen Base aus Benzophenon und Ethanolamin. Saure Hydrolyse des Imins lieferte das gewünschte Produkt in 90% Ausbeute. Anschließend wurde das erhaltene Ethanolamid mithilfe von Tosylchlorid zum benzophenon-funktionalisierten Oxazolin (12) („BeOX“), in Anlehnung an eine Arbeit von S. Crosignani und D. Swinnen, cyclisiert.^[109]



Schema 9: Darstellung des Oxazolins.

Entgegen der Originalliteratur war es nicht notwendig, ein polymer-gestütztes Sulfochlorid zu präparieren, die einfache Zugabe von Mesylchlorid reichte aus, um die Reaktion bei Raumtemperatur ablaufen zu lassen. Die entstehende Methansulfonsäure konnte durch Chromatographie problemlos vollständig entfernt werden. Die Ausbeute betrug 89%.

Zur Darstellung des Initiators wurde das mono Boc-Piperazin (9) mit Bromessigsäurebromid in 74% Ausbeute zu 1-*tert*-Butyl-4-(2-bromoacetyl)piperazincarbamat (13, BAPC) umgesetzt.



Schema 10: Darstellung des Initiators.

Die Boc-geschützte Aminofunktion ist während der CROP stabil und kann nach milder Entschützung mit einer Vielzahl von carboxyfunktionalisierten Biomolekülen verknüpft werden, z.B. mit Biotin. Letzteres bindet mit außerordentlich hohen Bindungskonstanten von $K_d = 10^{-14}$ mol/l bis 10^{-15} mol/l quasi-kovalent und hochselektiv an Lectine wie Avidin, Streptavidin oder Neutravidin.^[110]

Dieser Bindungsmechanismus wird für biochemische Konjugationen universell genutzt und böte einem neuartigen photochemischen Markierungssystem breiteste Einsatzmöglichkeiten.

Das Rhodaminpiperazid als Abbruchreagenz konnte direkt als Zwischenprodukt aus der R87-Synthese übernommen werden.

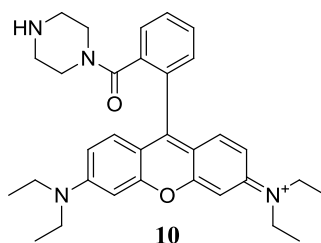


Abbildung 38: Abbruchreagenz.

4.7.2 Polymerisation mit Ethyloxazolin

Als erstes Modell-System wurden Ethyloxazolin (EtOX) und BAPC im Verhältnis 3:1 in Acetonitril gelöst und für 40 Minuten im Mikrowellenreaktor auf 120 °C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgefäß auf 40 °C temperiert und 10 Äquivalente Piperazin hinzugegeben. Das ESI-Massenspektrum zeigt eine erfolgreiche Umsetzung, sowie dass der Polymerisationsgrad dem eingestellten Ausgangsverhältnis von 3:1 sehr gut entspricht (Abb. 39).

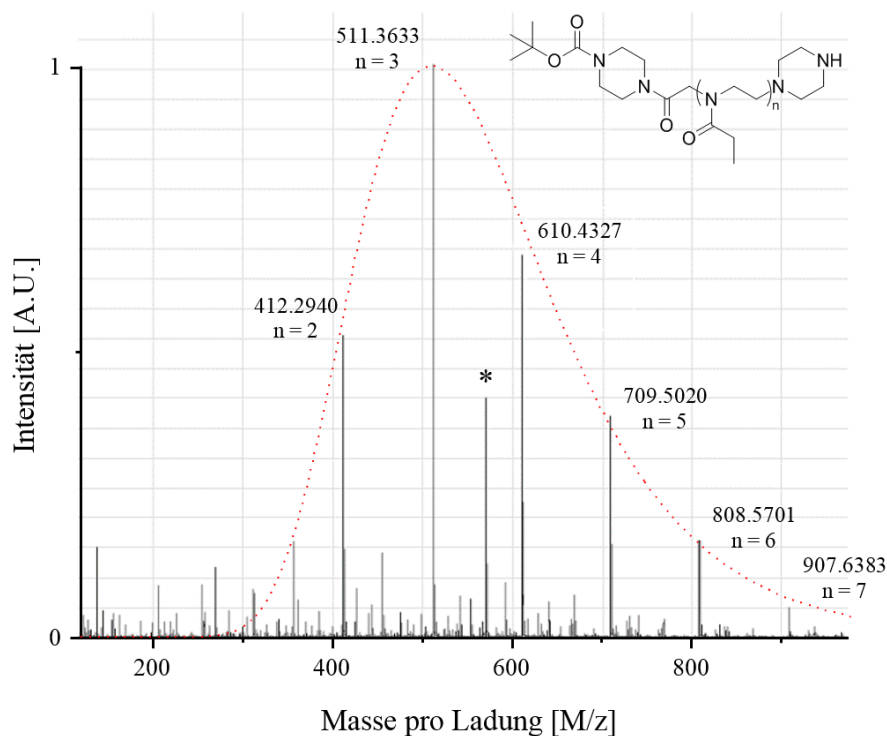
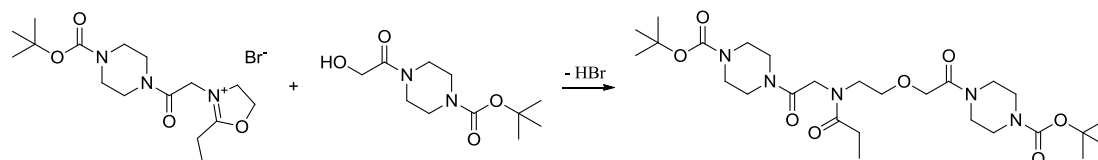


Abbildung 39: ESI des Ethyloxazolins.

Als einziges Nebenprodukt wurde dabei ein Peak mit $[M/z] = 570.35$ identifiziert (*). Mechanistisch lässt sich dieser Befund durch Abbruch der Polymerisation nach $n = 1$, durch einen hydrolysierten Initiator erklären (Schema 11).



Schema 11: Abbruch durch hydrolysierten Initiator.

Dieses Nebenprodukt konnte in allen folgenden Reaktionen wiedergefunden werden, unabhängig vom verwendeten Monomer, Lösemittel und Abbruchreagenz. Die Hydrolyse des Initiators zeigte an, dass eines der Edukte Spuren von Wasser enthalten haben musste. Zur Kontrolle wurde der Initiator in Acetonitril gelöst und unter den gleichen Bedingungen im Mikrowellenreaktor erhitzt. Die Bildung des Nebenprodukts konnte nicht beobachtet werden und der Initiator wurde unverändert zurück erhalten. Das gleiche Ergebnis wurde bei analogen Versuchen mit dem Monomer erhalten. Obwohl das Monomer sehr hydrolyseempfindlich ist, konnte eine Ringöffnung nicht beobachtet werden.

Die verwendeten Abbruchreagenzien konnten somit ausgeschlossen werden, denn die Terminierung durch den Alkohol fand frühzeitig und ausschließlich bei $n = 1$ statt. Abbruchreaktionen mit Wasser, die zu einer Hydroxylgruppe am Polymerende führten, konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Da die Bildung der Oligomere erwartungsgemäß verlief, wurde die Nebenreaktion toleriert.

Piperazin wurde zunächst nur verwendet, um zu überprüfen, ob die Reaktion mit einem sekundären Amin terminiert werden kann. Die verwendete Literatur beschreibt mit wenigen Ausnahmen ausschließlich primäre Amine bzw. Alkohole als Abbruchreagenzien. In weiteren Experimenten wurde auch Allylamin zur Terminierung verwendet. Überschüssiges Allylamin konnte vorteilhaft nach Beendigung der Reaktion destillativ entfernt werden, was die Aufarbeitung deutlich vereinfachte. Zudem bot die Doppelbindung eine sichere Identifizierung im NMR, sowie potentiell weitere Funktionalisierungsmöglichkeiten.

4.7.3 Polymerisation mit benzophenon-funktionalisiertem Oxazolin

Trotz der erfolgreichen Reaktionsoptimierung mit EtOX, verliefen alle folgenden Experimente mit dem synthetisierten BeOX (12) unbefriedigend. Aufgrund der zu erwartenden höheren Molmassen infolge des veränderten Ausgangsmonomers, wurde MALDI-TOF eingesetzt. Ein typisches Spektrum zeigte durchaus das gewünschte Produkt (Abb. 40).

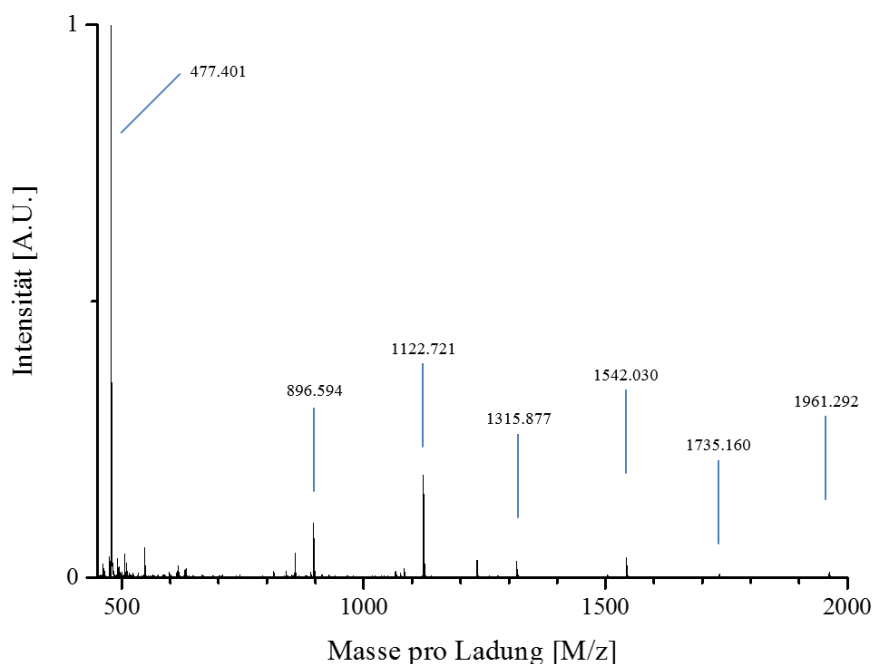


Abbildung 40: Typisches MALDI einer Reaktion mit BeOX.

Die Peaks $M/z = 1122$, 1542 und 1961 stehen für die Polymerisationsgrade $n = 2$, 3 und 4 . Allerdings ist ebenfalls zu erkennen, dass eine erhebliche Menge an Monomer keine Reaktion eingegangen ist und lediglich mit dem zugegebenen Abbruchreagenz Allylamin reagiert hat ($M/z = 477$). Neben den gewünschten Oligomeren ist mit $M/z = 896$, 1315 und 1735 eine weitere Serie zu erkennen. Diese lässt sich einer protoneninitiierten Spezies mit den Polymerisationsgraden $n = 2$, 3 und 4 zuordnen. Die Reaktionen wurden darüber hinaus auch NMR-spektroskopisch untersucht. Dies bestätigte zwar die massenspektroskopischen Befunde, zeigte jedoch auch, dass die Umsätze nur im unteren einstelligen Prozentbereich lagen. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 120 min erbrachte keinen Erfolg. Bei einer weiteren Verlängerung auf bis zu 20 Stunden nahm die Signalintensität des Monomers sowie aller Produkte stetig ab.

Der offensichtlichen Reaktionsträgheit sollte durch Erhöhung der Initiatormenge begegnet werden, jedoch konnte selbst bei einem umgekehrten Verhältnis von 1:3 (Monomer : Initiator) keine signifikante Verbesserung erreicht werden. Neben dem selbst synthetisierten Initiator BAPC wurden weitere literaturbekannte CROP-Initiatoren untersucht (Abb. 41).

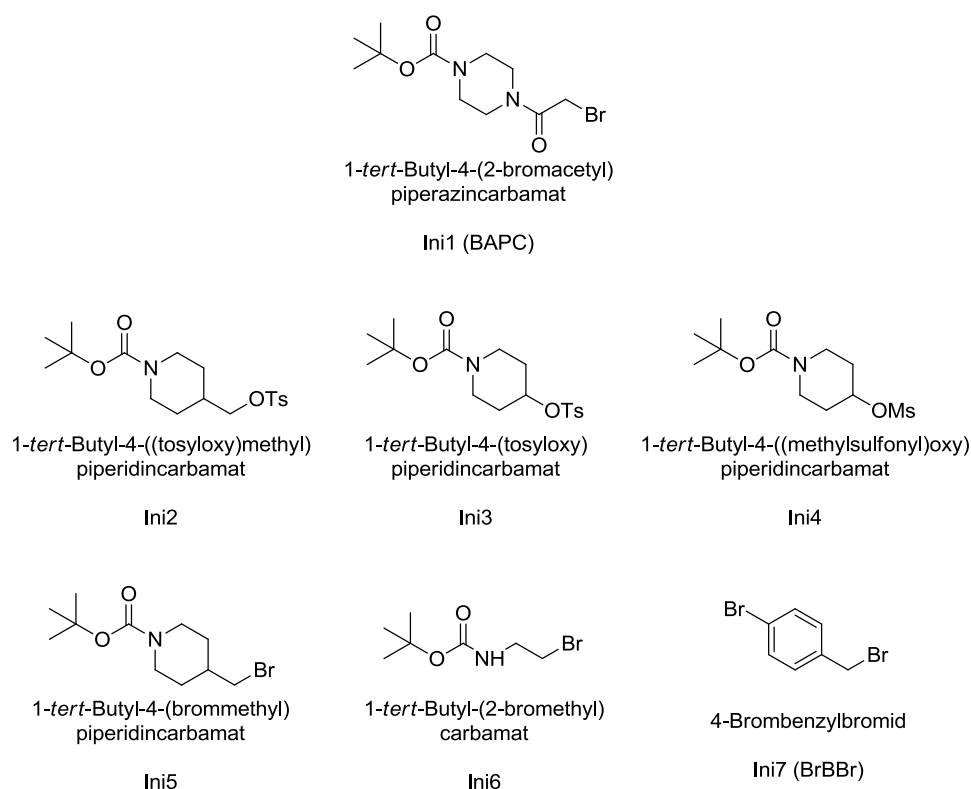


Abbildung 41: Untersuchte CROP-Initiatoren.

Die Elektrophilie der Alkylbromide reichte zur Initiierung der CROP nicht aus. Die Tosylate, das Mesylat und das 4-Brombenzylbromid lieferten jeweils dieselben unbefriedigenden Ergebnisse wie BAPC.

Um auszuschließen, dass die Benzophenonfunktion die Polymerisation möglicherweise hemmt, wurden der Modellreaktion mit Ethyloxazolin äquimolare Mengen an 4,4'-Dimethylbenzophenon hinzugefügt. Weiterhin wurde das Monomer/Initiator Verhältnis auf 6:1 erhöht, damit die für BeOX ausgearbeitete MALDI-Methode angewendet werden konnte. Das MALDI zeigt eine idealtypische Verteilung der Molmassen (Abb. 42). Die Anwesenheit von 4,4'-Dimethylbenzophenon hatte somit keine negativen Auswirkungen auf die Polymerisation.

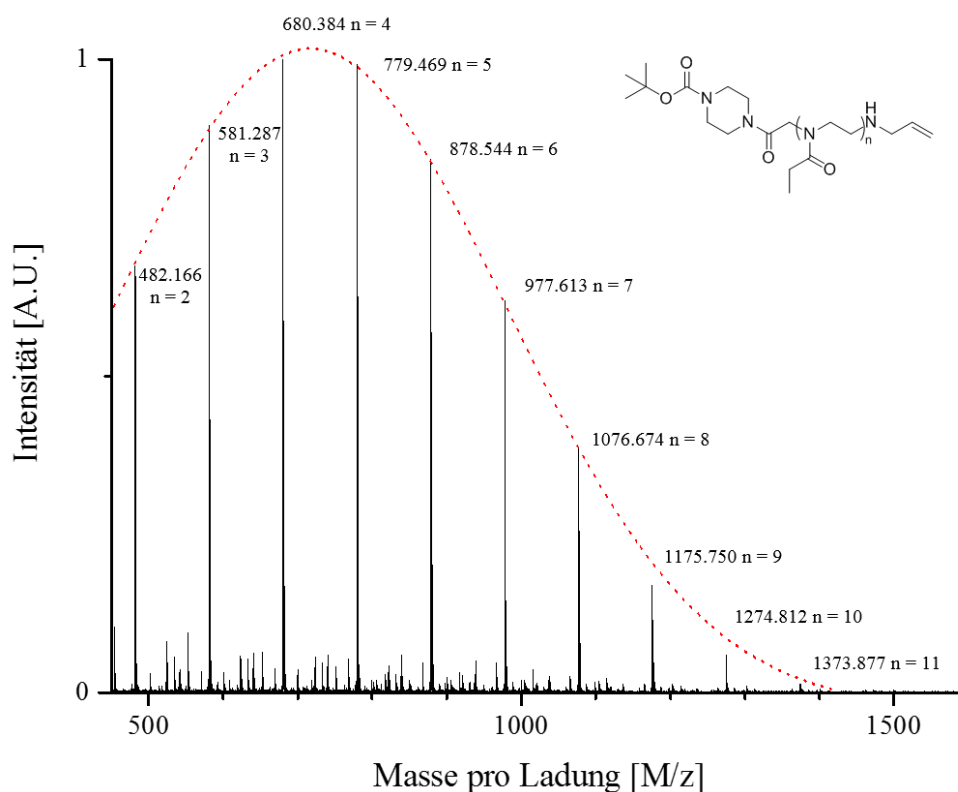


Abbildung 42: MALDI von EtOX nach Synthese mit 4,4'-Dimethylbenzophenon Zusatz.

Die Thermosensitivität der in BAPC enthaltenen Boc-Gruppe limitierte die Reaktionstemperatur auf 130 °C. Eine Temperatursteigerung auf bis zu 160 °C konnte durch Verwendung von 4-Brombenzylbromid (BrBBr) ermöglicht werden, ohne jedoch bessere Ergebnisse zu erzielen. Noch höhere Temperaturen waren aufgrund der Druckentwicklung nicht möglich.

In der zu Rate gezogenen Fachliteratur wurde überwiegend Acetonitril als Solvens für die CROP verwendet. Aufgrund der hohen Permittivität erfolgt eine gute Trennung der entstehenden Ionen. Acetonitril ist darüber hinaus ein gängiges Lösemittel von relativ geringer Toxizität und leicht zu entfernen. Ein weiterer Vorteil ist der moderate Dampfdruck, der ein Arbeiten mit überhitztem Acetonitril in druckstabilen Behältern erlaubt. Während in jüngeren Publikationen teilweise auch mit Chloroform gearbeitet wird, gibt es Arbeiten aus den 1980er und 1990er Jahren in denen Nitrobenzol (NO₂Ph) bzw. *o*-Dichlorbenzol (ODCB) verwendet wurde.

Chloroform (Kanzerogen, Kat. 1b) und NO₂Ph (Reproduktionstoxisch, Kat. 1B) sind als KMR-Stoff klassifiziert, zudem ist Nitrobenzol in der REACH-Kandidatenliste der besonders besorgniserregenden Stoffe aufgeführt. ODCB besitzt keine KMR-Klassifizierung, allerdings gilt für das *para*-Derivat: „Aus geeigneten Mutagenitätsversuchen liegen einige Anhaltspunkte vor, die wegen möglicher erbgutverändernder Wirkung auf den Menschen zu Besorgnis Anlass geben“. Daher wird mit einer Klassifizierung in absehbarer Zeit gerechnet. Die bisherigen Arbeiten zeigten, dass das Substitutionsgebot nicht zum gewünschten Erfolg führte, obwohl die Verwendung weniger gefährlicher Stoffe umfassend geprüft wurde. Daher war es legitim, in der Folge die Polymerisationsversuche in den oben diskutierten Lösemitteln durchzuführen. Die Lösemittel wurden sowohl einzeln als auch als 1:1 Gemische mit Acetonitril eingesetzt. Die Reaktion in reinem Chloroform konnte nur bis 80 °C erhitzt werden, da sonst die Druckentwicklung die gerätebedingte Maximalgrenze überschritten hätte.

Die Reaktion in reinem Chloroform zeigte keinen Umsatz. Nach Zugabe von Allylamin wurde lediglich das aminolysierte Edukt erhalten. Die Reaktion im 1:1 Gemisch mit Chloroform/Acetonitril ergab das gleiche Ergebnis, das zuvor bereits diskutiert und in Abb. 40 gezeigt wurde. Alle Reaktionen unter Verwendung von ODCB oder NO₂Ph verliefen ebenfalls erfolglos. In keinem Fall konnte eine Teilpolymerisation beobachtet werden, allerdings wurde auch kein unverändertes Ausgangsmonomer mehr gefunden. Somit konnte das Konzept trotz umfangreicher Versuche nicht realisiert werden. Tabelle 2 fasst die Versuche zur Darstellung von Polyoxazolinen mit EtOX und BeOX (12) zusammen.

Tabelle 2: Liste aller Polymerisationsversuche.

Nr.	Solvens	Monomer	Initiator	Molares Verhältnis	Temperatur [°C]	Zeit [Min.]	Ergebnis
1	MeCN	EtOX	BAPC	3:1	100	40	A
2	MeCN	EtOX	BAPC	3:1	120	40	B
3	MeCN	EtOX	BAPC	3:1	140	40	C
4	MeCN	BeOX	BAPC	3:1	120	40	D
5	MeCN	BeOX	BAPC	3:1	120	120	D
6	MeCN	BeOX	BAPC	3:1	120	240	D
7	MeCN	BeOX	BAPC	3:1	120	360	D
8	MeCN	BeOX	BAPC	3:1	120	1200	E
9	MeCN	BeOX	BAPC	1:1	120	40	D
10	MeCN	BeOX	BAPC	1:3	120	40	D
11	MeCN	BeOX	Ini2	3:1	120	40	D
12	MeCN	BeOX	Ini3	3:1	120	40	D
13	MeCN	BeOX	Ini4	3:1	120	40	D
14	MeCN	BeOX	Ini5	3:1	120	40	D
15	MeCN	BeOX	Ini6	3:1	120	40	D
16	MeCN	BeOX	BrBBr	3:1	120	40	D
17	MeCN	BeOX	BrBBr	3:1	140	40	D
18	MeCN	BeOX	BrBBr	3:1	160	40	D
19	CHCl ₃	BeOX	BAPC	3:1	80	40	A
20	CHCl ₃ /MeCN	BeOX	BAPC	3:1	120	40	D
21	ODCB	EtOX	BAPC	3:1	120	40	E
22	ODCB/MeCN	EtOX	BAPC	3:1	120	40	E
23	NO ₂ Ph	EtOX	BAPC	3:1	120	40	E
24	NO ₂ Ph/MeCN	EtOX	BAPC	3:1	120	40	E
25	MeCN	EtOX	BAPC	6:1	120	40	B ¹

¹ 1 Äquiv. 4,4'-Dimethylbenzophenon je Monomer

A: Kein Umsatz, Erhalt der Edukte

B: Vollständiger Umsatz

C: Verlust der Schutzgruppe

D: Sehr geringer Umsatz

E: Kein Umsatz, Verlust aller Edukte

5 Zusammenfassung

Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ist eine der zentralen Herausforderungen für die Behandlung von Erkrankungen des ZNS. Eine effiziente und breit anwendbare Methode, um Therapeutika in das Gehirn zu transportieren würde den Weg für zahlreiche neue Therapieformen ebnen. Ein vielversprechender Ansatz ist die Verwendung von körpereigenen Vesikeln. Exosomen können die Blut-Hirn-Schranke überwinden und sind somit potentiell in der Lage Wirkstoffe in das Gehirn zu transportieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob natürliche Vesikel, wie Exosomen bzw. artifizielle Polymerkapseln mithilfe von Photoaffinitäts-Labeln auf der Oberfläche funktionalisiert werden können. Bei den Exosomen war darauf zu achten, dass die Bestrahlung keinen negativen Einfluss auf die biologische Funktion hat. Der Erfolg sollte durch konfokalmikroskopische Aufnahmen dokumentiert werden.

Es sollten zwei Synthesewege entwickelt werden, mit denen entsprechende Phototags hergestellt werden können. In Voraussicht auf zukünftige Studien sollte sichergestellt werden, dass die Syntheserouten eine hohe Divergenz aufweisen und auf die Verwendung von potentiell zelltoxischen Verbindungen verzichtet wird.

Der erste Syntheseweg umfasst elf Stufen und weist eine hohe Divergenz auf. Alle Bausteine lassen sich einfach homologisieren, erlauben die Anpassung der Lipophilie, eine Veränderung der Position des Photolabels und Manipulationen an der Rigidität des Moleküls. Das Rhodaminlabel der Grundstruktur kann mit einfachen Methoden gegen andere Amine bzw. Carbonsäuren ausgetauscht werden, was den Pool an möglichen Motiven aus der Biochemie außerordentlich groß werden lässt. Auf diesem Weg konnte das Photoaffinitäts-Label R87 erfolgreich und in hoher Reinheit erhalten werden. Die Zielstruktur trägt als photoaktivierbare Gruppe das Benzophenon und stellvertretend für das theranostische Motiv den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B.

Der zweite Syntheseweg basierte auf der Kationischen-Ringöffnungs-Polymerisation. Die benötigten Bausteine wurden erfolgreich und in hoher Ausbeute dargestellt. In mehreren Modellversuchen konnte die Reaktion erfolgreich durchgeführt werden. Mit dem synthetisierten Initiator konnte Polyethyloxazolin hergestellt werden, das ein geschütztes Amin enthält und eine idealtypische Verteilung aufweist.

Dieser Erfolg ließ sich allerdings nicht auf das terminal, benzophenon-funktionalisierte Fettsäure-Oxazolin (BeOX) übertragen. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Polymerisation von Ethyloxazolin in Anwesenheit von 4,4'-Dimethylbenzophenon erfolgreich verläuft, ein ähnliches Ergebnis konnte aber bei der Verwendung von BeOX nicht erreicht werden. In zahlreichen Experimenten wurde lediglich ein geringer Umsatz beobachtet, der überwiegende Teil des eingesetzten Monomers verblieb unverändert bis zur Zugabe des Abbruchreagenzes. Trotz zahlreicher Optimierungsversuche konnte kein verbessertes Ergebnis erzielt werden.

In einer früheren Arbeit konnte das Photoaffinitäts-Labeln R51 dargestellt werden. Zusammen mit R87 wurden Markierungsexperimente an natürlichen und synthetischen Vesikeln durchgeführt. Mit R51 konnte die erfolgreiche Funktionalisierung von artifiziellen PBCA-Kapseln demonstriert werden. Die Inkorporationsrate betrug 95%. Die dargestellten Kapseln zeigten über mehrere Wochen kein Auslaufen des Farbstoffs, auch ohne eine photochemische Verankerung. Bei der Funktionalisierung von Exosomen zeigte R87 überlegen.

Mit R87 konnten bei der longitudinalen Markierung von Exosomen ausordentlich gute Resultate erzielt werden. Zur Färbung wurde ein Verfahren entwickelt, das sich vom derzeitigen Stand der Technik abhebt und eine deutliche Verbesserung darstellt. Die optimierte Methode stellt eine deutliche Vereinfachung des gängigen Protokolls zur Färbung von biologischen Membranen dar und benötigt einen erheblich geringeren materiellen und zeitlichen Aufwand, was Qualität und Menge der erhalten Exosomen zugutekommt. R87 erfüllt das erforderliche Profil und interkaliert selbstständig und ohne die sonst übliche Zugabe von Detergenzien in die exosomale Membran.

Bei Inkubationsexperimenten mit fixierten Zellen konnte gezeigt werden, dass R87 nach der Bestrahlung im Vergleich zu konventionellen Membranfarbstoffen ein deutlich verändertes Diffusionsverhalten zeigte und keine laterale Diffusion mehr aufwies. Die neuartige Methode erlaubte die Darstellung diskreter Exosomen. Die Markierung kann mit einer handelsüblichen UV-Lampe durchgeführt werden und ist innerhalb von 60 Sekunden abgeschlossen.

Nach dieser Zeit konnte weder eine laterale Diffusion, noch eine Aggregatbildung durch photobiologisch geschädigte Exosomen beobachtet werden. Die Exosomen interagierten nach der Bestrahlung weiterhin auf natürliche Weise mit Zellen.

Biologische Entitäten wie Exosomen können durch die nachhaltige Fluoreszenzmarkierung besser verfolgt werden, da die Diffusion und die damit einhergehende Verdünnung des Farbstoffs unterbunden werden.

Die milden Bedingungen zur photochemischen Markierung erlauben es, das Anwendungsfeld zu erweitern und weitere biologische, aber auch synthetische, lipophile Domänen mit R51, R87 sowie weiteren Derivaten longitudinal stabil zu markieren. Der divergente Syntheseweg ermöglicht es, hierzu weitere Motive an die Struktur zu binden und eröffnet damit vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der biomedizinischen Forschung.

6 Summary

The blood-brain-barrier (BBB) protects the central nervous system (CNS) of terrestrial vertebrates against pathogens and toxins. This poses a central challenge in the pharmaceutical management of diseases of the CNS, because drugs have to cross the BBB in order to be effective. A broadly applicable methodology to overcome the BBB would lead to a breakthrough in CNS therapies. A promising approach is the use of endogenous vesicles, i.e. exosomes, which are capable of crossing the BBB. Therefore, exosomes were studied as potential carriers for targeted drug delivery into the brain. However, exosomes are utmost delicate structures and engineering, e.g. drug loading inevitably affects functionality, because to this means their lipid bilayer has to be transiently disrupted. Likewise, surface functionalization by “wet chemistry” is not a viable option for similar reasons.

This thesis investigated the scope of mild photochemical functionalization of the outer exosomal membrane, aiming for the longitudinal stable labeling with putative actives, recognition motifs etc. The biological performance of the resulting constructs was monitored by confocal microscopy, in order to prove their integrity.

Two synthetic strategies were pursued. A common goal of both was a divergent route for facile structural modifications and low toxicity of the final target.

The first synthetic route consisted of eleven steps and was highly divergent. All building blocks can be exchanged by homologs, which allow adjusting the lipophilicity, the position of the phototag and tuning of the rigidity of the backbone. Rhodamine B was chosen as a fluorescent model probe in order to track successful labeling, but could easily be exchanged by any kind of biological entity bearing an amine or carboxy moiety. This leads to a plethora of potential biochemical targets for exosome labeling. Benzophenone (BP) was chosen continuously as the photoactive functionality. As a result, a highly pure photoaffinity label R87, was created and compared with a related structure, R51, formerly synthesized in my Diploma Thesis. *Prima vista*, both compounds differed in lipophilicity. Whereas, R87 showed superior performance in exosome labeling, R51 was very effective in labeling artificial polymersomes comprised of biocompatible poly butylcyanoacrylate (PBCA).

The second synthesis was based on the cationic-ringopening-polymerization (CROP) of functionalized oxazolines. CROP tolerates numerous, optionally highly complex functionalities and offers a convenient access to bi-end functionalized polymers. This was compelling in pursue of hybrid phototags, which putatively bear two functionalities, e.g. a fluorescence label

and a recognition motif. Furthermore, multiple terminal BP moieties in the polymer side chains would reinforce longitudinal stability of the tagging.

All building blocks were obtained in high yield. Several model reactions were carried out as a proof of concept. The specially synthesized initiator bearing a boc-protected piperazine successfully provided the desired end-functionalized polyethyloxazoline with an ideal mass distribution.

Unfortunately, these encouraging results could not be transferred to the synthesized monomer with a terminal BP moiety. Reaction inhibition caused by the presence of the BP moiety was excluded by successful polymerization of ethyloxazoline in presence of 4,4'-dimethylbenzophenone.

All optimization efforts finally provided only very low yields of a terminated monomer, not useful for further applications.

The photoaffinity labels R51 and R87 were successfully used for labeling experiments. PBCA-particles were labeled by R51 with an efficiency of about 95%, even without irradiation. No leaching of Rhodamine was observed over several weeks.

R87 was benchmarked against a common transient membrane dyestuff PKH26, used for exosome labeling. Without irradiation R87 showed comparable performance in confocal microscopy of cell incubation experiments, but superior sensitivity. Even more importantly, the staining protocol could be substantially improved, providing a significant higher yield of viable, labeled exosomes of higher purity. No addition of demonstrably adverse detergents (Diluent C) was needed, which resulted in a strongly simplified workup with considerable savings in time and costs.

After irradiation, R87-labeled exosomes showed a completely different behavior after incubation in *in vitro* cell culture experiments. Discrete labeled exosomes were observable, showing natural interactions with cells. The irradiation can be conveniently carried out with a common UV sterilization lamp and is completed within 60 sec. Under these optimized conditions, longitudinal labeling is completed, without formation of aggregates indicating photo-damaged exosomes.

In conclusion, a new structure and method for longitudinal photoaffinity functionalization of exosomes was established, without impairing their biological viability. The flexible synthetic design will provide tailor-made, highly functionalized phototags. The successful permanent

labeling of lipid bilayers with these compounds under very mild conditions may be extended to cellular entities and will stimulate new ways in biomedical research.

7 Experimenteller Teil

7.1 Material und Methoden

7.1.1 Chemikalien und Lösemittel

Alle verwendeten Lösungsmittel, einschließlich der absolutierten Lösungsmittel und Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, kommerziell erworben und ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

Aceton ($\geq 99.9\%$), Dichlormethan ($\geq 99.9\%$), Aluminiumtrichlorid (99%), Ammoniumchlorid ($\geq 99.9\%$), Benzylmagnesiumchlorid, 2M in THF, 1,2-Dichlorbenzen (99%), N-Boc-2-bromethylamin (95%), Bromessigsäurebromid ($\geq 98\%$), Bromessigsäureethylester ($\geq 98\%$), 11-Bromundecansäure (95%), Calciumhydrid ($\geq 90\%$), 1,1-Carbonyldiimidazol ($\geq 97\%$), Diethylether (wasserfrei, 99.7%), Diisopropylethylamin ($\geq 99.5\%$), Di-tert-butylidicarbonat ($\geq 98\%$), Essigsäure (100%), Ethyloxazolin ($\geq 99.9\%$), Hexadecylamin (90%), *n*-Hexan ($\geq 95\%$), Kaliumcarbonat ($\geq 99\%$), Kupfer(I)Chlorid ($\geq 97\%$), Mesylchlorid ($\geq 99.7\%$), Natriumchlorid ($\geq 99\%$), Natriumhydrogencarbonat ($\geq 99.7\%$), Natriumhydroxid ($>98\%$), Natriumsulfat ($>99\%$), Phosphorpentoxid ($>98\%$), Piperazin ($>99\%$), Rhodamin B ($\geq 95\%$), Salzsäure 37%, Schwefelsäure 96%, Tetrahydrofuran ($\geq 99.9\%$), Toluol (wasserfrei $\geq 99.8\%$), *p*-Toluoylchlorid ($>98\%$) und Triethylamin ($\geq 99.5\%$) wurden von Sigma-Aldrich, Acetonitril (≥ 99.8) und Ethylacetat (>99.8) wurden bei Carl Roth, Dichlormethan (wasserfrei, $>99.9\%$) wurde bei Acros Organics, Allylamin ($>98\%$) und Ethanolamin ($>98\%$) wurden bei Alfa Aesar, Methanol ($>95\%$) wurde bei Chemsolute, Nitrobenzen ($>95\%$) wurde Merck, 1-Boc-4-(methanesulfonyloxy)piperidin ($>98\%$), 1-Boc-4-(tosyloxymethyl)piperidin ($>98\%$), 1-Boc-4-tosyloxypiperidin ($>98\%$), und 4,4'-Dimethylbenzophenon ($>99\%$) wurden von TCI bezogen.

Für die Kationische-Ringöffnungs-Polymerisation wurden die Lösemittel 3 Tage unter Stickstoffatmosphäre über einem geeigneten Trockenmittel refluxiert, mit einer Edelstahlkanüle in einen Schlenkkolben überführt und unter Stickstoff und über Molsieb (3Å) aufbewahrt.

Tabelle 3: Eigenständig getrocknete Lösemittel und verwendetes Trockenmittel.

Lösemittel	Trockenmittel
Acetonitril	Calciumhydrid
1,2-Dichlorbenzol	Phosphorpentoxid
Nitrobenzol	Phosphorpentoxid

7.1.2 Präparative Verfahren

Reaktionen mit luftempfindlichen Substanzen wurden unter Stickstoffatmosphäre mittels Schlenktechnik durchgeführt und sind mit dem Vermerk: ‚Die Reaktion fand unter Schutzgasatmosphäre statt‘ versehen. Entgaste Lösungsmittel wurden durch die freeze-pump-thaw Methode unter Verwendung von Stickstoffgas erhalten.

7.1.3 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel-beschichteten Aluminium-Fertigfolien der Firma Macherey-Nagel, Alugram[®] SIL G/UV₂₅₄ mit Fluoreszenzindikator. Die Detektion der Substanzen erfolgte über ihre UV-Absorption oder durch verkohlen mit ethanolischer Schwefelsäure (10 vol.-% H₂SO₄).

Zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Firma Sigma-Aldrich mit einer Partikelgröße von 40-63 µm und einer Porengröße von 60 Å verwendet.

7.1.4 Photochemische Bestrahlung

Die Standardmenge für eine Probe waren $23.7 \cdot 10^8$ Exosomen. Die Exosomen wurden mit 1 mM HEPES Puffer (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) auf 50 µL verdünnt und in Form eines Tropfens in einer Quarzküvette (10x10 mm) vorgelegt. Zur Probe wurde eine Lösung aus 7.1 µM Farbstoff in 50 µL 1 mM HEPES hinzu pipettiert und durch Aufziehen und Ablassen rasch miteinander vermischt. Dies entspricht einer Menge von 0.3 µM Farbstoff je $1 \cdot 10^8$ Partikel oder 0.003 µL der 0.1 mM Stammlösung. Nach dem Vermischen ruhten die Proben für 5 Minuten unter Lichtausschluss, anschließend wurde die Probe gleichmäßig auf dem Küvettenboden verteilt und für die gewünschte Zeit bestrahlt. Die Probe wurde in Zentrifugengefäß übergeführt, die Küvette 4 Mal mit 100 µL 1 mM HEPES gewaschen und die Waschlösungen dem Zentrifugengefäß hinzugefügt.

Die Re-Isolierung erfolgte durch Ultrazentrifugation in Anlehnung an die Vorschrift zur Isolation von Exosomen aus Zellen nach Falker *et al.*^[11]

Zur Bestrahlung im UV-A Bereich wurden vier Leuchtmittel der Firma Philips (PL-S 9W BLB/2P) mit je 1.65 W UV-A Leistung (18%) verwendet.

Zur Bestrahlung im UV-C Bereich wurde ein Leuchtmittel der Firma Osram (HNS 15W OFR) mit einer UV-C Leistung von 4 W (27%) verwendet.

7.1.5 Isolation der Exosomen

Die Isolation wurden in Anlehnung an die Vorschrift von Falker *et al.* durchgeführt.^[11] Anstelle des PBS-Puffers wurde im gesamten Protokoll ein 1mM HEPES-Puffer verwendet.

7.1.6 SDS-Page mit anschließendem Western Blot

Die Proteinexpressionsanalyse wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Falker *et al.* durchgeführt.^[11]

Als Primärantikörper wurde Maus-anti-flotillin-1 (BD Biosciences) eingesetzt und als Sekundärantikörper Esel-anti-Maus gekoppelt mit IRDye®680RD (LI-COR).

7.1.7 Immunfluoreszenzfärbung der murinen Neuroblastoma-Zellen

In einem „µ-Slide VI^{0,4} ibiTreat“ (ibidi, München) wurden zunächst $4.5 \cdot 10^3$ Zellen pro Kanal ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit 1 x PBS (phosphate buffered saline) gewaschen und für 20 Min. mit 4% Paraformaldehyd-Lösung bei 37°C fixiert. Die Zellmembran wurde mithilfe von 0.2% Triton-X-100 für 10 Min. permeabilisiert, dreimal mit 1 x TBST (Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween20) gewaschen und 1 Std. auf dem Schüttler mit Blocking-Puffer (Protein-Free Blocking-Buffer-TBST, GBioscience, Thermo Fisher Scientific, USA) behandelt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-Maus POMII, 1:100) erfolgte bei 4 °C über Nacht. Es wurde erneut dreimal mit 1 x TBST gewaschen und für 90 Min. mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus Alexa Fluor® 647, 1:50) inkubiert. Das Eindeckeln der Proben erfolgte mit DAPI Fluoromount-G® (Southern Biotech, USA), welches bereits den Farbstoff DAPI zur Färbung der Zellkerne enthielt. Die fixierten und gefärbten Proben wurden anschließend mit dem konfokalen Mikroskop TCS SP8 (Leica, Wetzlar) dokumentiert.

7.1.8 Instrumentelle Analytik

UV/VIS Spektren wurden am Varian Cary 500 aufgenommen.

Fluoreszenzquantenausbeute wurden am PTI der Firma m. u. t. Aviation Technology GmbH mit Felix32 Software gemessen. Die Bestimmung der Quantenausbeute erfolgt mittels Ulbricht Kugel am Fluoreszenz-Spektrophotometer. Zur Bestimmung der Quantenausbeute wurden die entsprechende Probe und das jeweilige Lösungsmittel bei der Wellenlänge angeregt, bei der die Probe eine optische Dichte von 0.1 aufweist. Das Signal der vermessenen Probe wurde vom Signal des Lösungsmittels subtrahiert und aus den berechneten Fluoreszenzintensitäten wurde das Flächenintegral bestimmt. Die Quantenausbeute ergibt sich aus dem Verhältnis der Fläche des Fluoreszenzsignals zu dem des Lampensignals.

IR-Spektren wurden am FTIR-Gerät ALPHA-P der Firma Bruker aufgenommen.

Mikrowellensynthesen wurden in einer CEM Discover S-Class durchgeführt.

Schmelzpunkte wurden mit dem Barnstead Electrothermal 9100 bestimmt und sind nicht korrigiert.

NMR-Spektren wurden mit Geräten der Firma Bruker aufgenommen:

Bruker Fourier 300 MHz:	(¹ H-Resonanz: 300 MHz, ¹³ C-Resonanz: 75 MHz)
Bruker Avance 400 MHz:	(¹ H-Resonanz: 400 MHz, ¹³ C-Resonanz: 100 MHz)
Bruker Avance I 400 MHz:	(¹ H-Resonanz: 400 MHz, ¹³ C-Resonanz: 100 MHz)
Bruker DRX 500 MHz:	(¹ H-Resonanz: 500 MHz, ¹³ C-Resonanz: 125 MHz)
Bruker Avance III HD 600 MHz:	(¹ H-Resonanz: 600 MHz, ¹³ C-Resonanz: 150 MHz).

Als interner Standard für die chemische Verschiebung diente das Lösemittelsignal. Als Software wurde MestreNova 10.0 verwendet.

Konfokalmikroskopische Bilder wurden mit einem Leica TCS SP8 X aufgenommen.

Laser: WLL 470-670 nm; Diode 405 nm; Multi-Ar 458 nm/476 nm/488 nm/496 nm/514 nm; DPSS 561 nm; HeNe 594nm, HeNe 633 nm

Software: Leica LAS X

Die **Nanoparticle Tracking Analyse** wurde mit einem NanoSight LM14 NTA 3.0 Build 0033 der Firma Malvern Instruments Ltd. durchgeführt. Zur Quantifizierung der Exosomen wurden die Proben auf eine Konzentration zwischen $8 \cdot 10^8$ und $2 \cdot 10^9$ Partikel/mL eingestellt und mit einem Laser der Wellenlänge 638 nm (Marlin F-033) bestrahlt.

Die Partikelbewegung wurde 5 Mal für 30 Sec. durch eine IRF Kamera (Allied Vision Technologies, Stadroda, Deutschland) aufgezeichnet. Die Kameraintensität betrug 16. Die Partikelgröße wurde mithilfe der Batch-Prozess Funktion ermittelt.

7.2 Synthesevorschriften und analytische Daten

7.2.1 Darstellung von 12-Phenyldodecansäure (3)

Die Synthese wurde in Anlehnung an die Vorschrift von *Ren et al.* durchgeführt.^[99]

Die Reaktion fand unter Schutzgasatmosphäre statt.

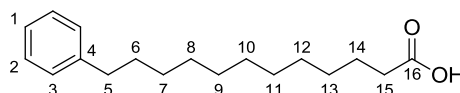
Es wurden 10.0 g (37.7 mmol, 1 Äquiv.) 11-Bromoundecansäure und 112 mg (1.13 mmol, 0.03 Äquiv.) Kupfer(I)Chlorid in 110 mL wasserfreiem THF gelöst. Die Lösung wurde mittels eines Eisbades auf 0 °C gekühlt und 45 mL (90 mmol, 2.4 Äquiv.) einer 2 M Lösung Benzylmagnesiumchlorid in THF hinzu getropft. Die Lösung wurde 90 Minuten gerührt und mit 20 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der gelbliche Rückstand wurde in 20 mL n-Hexan aufgenommen und mit verdünnter Salzsäure (pH 2-3) gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Eisessig (99:1) als Laufmittel gereinigt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurden 7.6 g eines farblosen, kristallinen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 74%

Aussehen: Farblose Kristalle

Summenformel: C₁₈H₂₈O₂

Molekulare Masse: 276.414 g/mol



¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 7.33 - 7.12 (m, 5H, H-1 + H-2 + H-3), 2.60 (t, ³J (H,H) = 7.8 Hz, 2H, H-5), 2.35 (t, ³J (H,H) = 7.4 Hz, 2H, H-15), 1.70 - 1.54 (m, 4H, H-6 + H-14), 1.40 - 1.20 (m, 14H, H-7 bis H-13).

Schmelzpunkt: 61 °C (Lit.: 57-58 °C)

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[111]

7.2.2 Darstellung von 12-Phenyldodecansäuremethylester

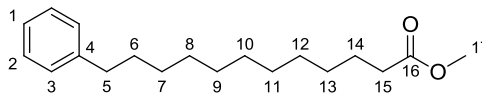
In 200 mL Methanol wurden 4.59 g (16.6 mmol) 12-Phenyldodecansäure gelöst und 7.5 mL konzentrierte Schwefelsäure hinzugegeben. Die Lösung wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 100 mL DCM verdünnt, zwei Mal mit 50 mL demin. Wasser, zwei Mal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und zwei Mal mit 50 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und als farbloses Öl erhalten (4.3 g).

Ausbeute: 89%

Aussehen: Farbloses Öl

Summenformel: C₁₉H₃₀O₂

Molekulare Masse: 290.440 g/mol



¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 7.33 - 7.12 (m, 5H, H-1 + H-2 + H-3), 3.76 (s, 3H, H-17) 2.60 (t, ³J (H,H) = 7.7 Hz, 2H, H-5), 2.30 (t, ³J (H,H) = 7.4 Hz, 2H, H-15), 1.68 - 1.53 (m, 4H, H-6 + H-14), 1.40 - 1.20 (m, 14H, H-7 bis H-13).

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[111]

7.2.3 Darstellung von (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäuremethylester

Die Synthese wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Y. Gan *et al.* durchgeführt.^[112]

Die Reaktion fand unter Schutzgasatmosphäre statt.

Es wurden 2.91 g (10 mmol, 1 Äquiv.) 12-Phenyldodecansäuremethylester und 2.7 mL (20 mmol, 1.5 Äquiv.) *p*-Toluoylchlorid in 100 mL wasserfreiem DCM gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Es wurden 2.94 g (22 mmol, 2.2 Äquiv.) Aluminiumtrichlorid hinzugegeben. Die Kühlung wurde entfernt und die entstandene Lösung über Nacht unter Rückfluss gerührt. Die Lösung wurde mit 300 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und die wässrige Phase zwei Mal mit 100 mL DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (95:5) als Laufmittel gereinigt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet.

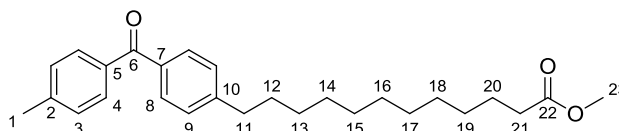
Es wurde ein farbloses Öl erhalten, das nach einem Tag auskristallisierte (1.6 g Hauptprodukt, 120 mg Nebenprodukt als Öl).

Ausbeute: 39%

Aussehen: Farblose Kristalle

Summenformel: C₂₇H₃₆O₃

Molekulare Masse: 408.573 g/mol



¹H-NMR (MeOD, 300 MHz): δ [ppm] = 7.72 - 7.65 (m, 4H, H-4 + H-8), 7.37 - 7.31 (m, 4H, H-3 + H-9) 3.64 (s, 3H, H-23) 2.71 (t, ³J (H,H) = 7.7 Hz, 2H, H-11), 2.44 (s, 3H, H-1) 2.30 (t, ³J (H,H) = 7.4 Hz, 2H, H-21), 1.73 - 1.53 (m, 4H, H-12 + H-20), 1.40 - 1.25 (m, 14H, H-13 bis H-19).

¹³C-NMR (MeOD, 100 MHz): δ [ppm] = 198.2 (C-6), 176.0 (C-22), 149.6 (C-10), 144.8 (C-2), 136.58 (C-7), 136.37 (C-5), 131.22, 131.20, 130.07, 129.51, 51.9 (C-23), 36.9 (C-11), 34.8 (C-21), 32.3, 30.61*, 30.52*, 30.35, 30.30, 30.17, 26.0, 21.6 (C-1).

*Signal stark verbreitert

HRMS (ESI): m/z ber. für [C₂₇H₃₇O₃⁺]: 409.2742, gef. 409.2736.

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2925 (s, C-H₃), 2855 (s, C-H.), 1735 (s, C=O), 1645 (s, C=O), 1605 (s, C=O), 1410 (m, CH₂), 1275 (m, C-O-C), 1175 (m, C-O-C).

Schmelzpunkt: 44 °C

UV/VIS: λ_{abs} 257 nm (MeOH)

Nebenprodukt:

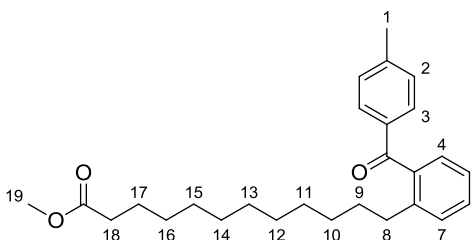
(2-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäuremethylester

Ausbeute: 3%

Aussehen: Farbloses Öl

Summenformel: C₂₇H₃₆O₃

Molekulare Masse: 408.573 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (MeOD, 300 MHz): δ [ppm] = 7.66 (d, 2H, H-3), 7.47 - 7.16 (m, 6H, H-3 bis H-7), 3.64 (s, 3H, H-19), 2.59 (t, 2H, H-8), 2.42 (s, 3H, H-1), 2.30 (t, 2H, H-18), 1.65 - 1.41 (m, 4H, H-9 + H-17), 1.35 - 1.21 (m, 14H, H-10 bis H-16).

7.2.4 Darstellung von (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäure (4)

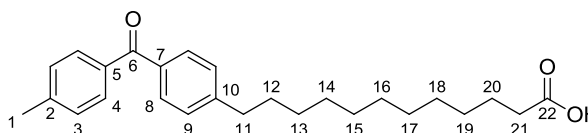
Es wurden 500 mg (1.23 mmol) (4-(4-Methylbenzoyl)phenyl)dodecansäuremethylester in 25 mL Methanol gelöst und 50 mL einer 3 M Lösung NaOH in Wasser hinzugegeben und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 25 mL 1 M HCl aufgenommen drei Mal mit 50 mL n-Hexan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurde 480 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 99%

Aussehen: Farbloses Pulver

Summenformel: $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_3$

Molekulare Masse: 394.546 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (MeOD, 300 MHz): δ [ppm] = 7.72 - 7.65 (m, 4H, H-4 + H-8), 7.37 - 7.31 (m, 4H, H-3 + H-9), 2.72 (t, 3J (H,H) = 7.7 Hz, 2H, H-11), 2.44 (s, 3H, H-1), 2.27 (t, 3J (H,H) = 7.4 Hz, 2H, H-21), 1.73 - 1.53 (m, 4H, H-12 + H-20), 1.40 - 1.25 (m, 14H, H-13 bis H-19).

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOD, 100 MHz): δ [ppm] = 198.3 (C-6), 177.7 (C-22), 149.6 (C-10), 144.8 (C-2), 136.58 (C-7), 136.37 (C-5), 131.21, 131.19, 130.07, 129.51, 36.9 (C-11), 35.0 (C-21), 32.3, 30.63, 30.62, 30.55, 30.52, 30.40, 30.31, 30.23, 26.1, 21.6 (C-1).

HRMS (ESI): m/z ber. für $[\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_3]^+$: 395.2586, gef. 395.2578.

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2915 (s, C-H₃), 2845 (s, C-H), 1645 (s, C=O), 1605 (s, C=O), 1410 (m, CH₂).

Schmelzpunkt: 76 °C

7.2.5 Darstellung von mono Boc-Piperazin (9)

Die Synthese wurde nach der Vorschrift von D. Hayes *et al.* durchgeführt.^[113]

In 250 mL DCM wurden 10 g (116 mmol, 1 Äquiv.) Piperazin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 12.7 g (58.2 mmol, 0.5 Äquiv.) Di-*tert*-butyldicarbonat in 100 mL DCM gelöst über einen Zeitraum von 20 min. in die stark rührende Piperazinlösung hinzugegeben. Die Kühlung wurde entfernt und die entstandene Suspension eine Stunde gerührt. Die Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Der Rückstand wurde in 175 mL demin. Wasser aufgenommen, erneut filtriert, mit Kaliumcarbonat gesättigt und drei Mal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurde ein farbloser, kristalliner Feststoff erhalten (7.7 g).

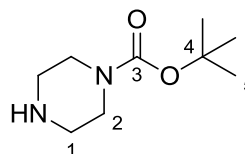
Das Produkt ist hygroskopisch und muss unter Schutzgas aufbewahrt werden!

Ausbeute: 70%

Aussehen: farblose Kristalle

Summenformel: C₉H₁₈N₂O₂

Molekulare Masse: 186.251 g/mol



¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 3.39 (m, 4H, H-1) 2.81 (m, 4H, H-2), 2.21 (bs, 1H, NH), 1.45 (s, 9H, H-5).

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[113]

7.2.6 Darstellung von Rhodamin-Boc-Piperazid

Die Reaktion wurde unter Schutzgas durchgeführt.

In 15 mL wasserfreiem DCM wurden 500 mg (1.04 mmol, 1 Äquiv.) Rhodamin B gelöst und 230 mg (1.36 mmol, 1.2 Äquiv.) Carbonyldiimidazol hinzugegeben. Die Lösung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde eine Lösung aus 233 mg (1.25 mmol, 1.2 Äquiv.) Boc-Piperazin in 10 mL DCM hinzu getropft und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde zwei Mal mit 20 mL demin. Wasser extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch gereinigt.

Zunächst wurde mit Aceton eluiert bis das Eluat farblos war, anschließend wurde das Laufmittel schrittweise auf DCM/MeOH (9:1) geändert.

Aceton : DCM/MeOH (9:1) 10:0

Aceton : DCM/MeOH (9:1) 8:2

Aceton : DCM/MeOH (9:1) 6:4

Aceton : DCM/MeOH (9:1) 4:6

Aceton : DCM/MeOH (9:1) 2:8

Aceton : DCM/MeOH (9:1) 0:10

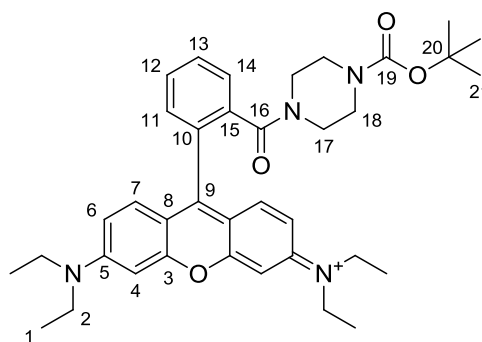
Das Produkt wurde von der Säule eluiert, am Rotationverdampfer vom Lösungsmittel befreit und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurden 610 mg eines violetten Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 90%

Aussehen: violetter Feststoff

Summenformel: C₃₇H₄₇N₄O₄·Cl

Molekulare Masse: 647.2576 g/mol



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 7.72 - 7.65 (m, 2H, H-12 + H-14), 7.56 - 7.50 (m, 1H, H-13), 7.39 - 7.34 (m, 1H, H-11), 7.22 (d, ³J (H,H) = 9.2 Hz, 2H, H-7), 6.98 (bs, 2H, H-6), 6.81 (bs, 2H, H-4), 3.65 (q, 8H, H-2), 3.43 - 3.20 (m, 8H, H-17 + H-18), 1.41 (s, 9H, H-21), 1.32 (t, 12H, H-1).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 167.7 (C-16), 157.9 (C-3), 155.8 (C-15), 154.5 (C-5), 135.3 (C-10), 132.2 (C-7), 130.85, 130.59, 130.30*, 127.9 (C-11), 114.52 (C-6), 113.75 (C-9), 96.4*, 80.74 (C-20), 46.41 (C-2), 43.8* (C17 + C-18), 28.45 (C-21), 12.8 (C-1).

*Signal stark verbreitert

HRMS (ESI): m/z ber. für [C₃₇H₄₇N₄O₄⁺]: 611.3597, gef. 611.3609.

Schmelzpunkt: 125-130 °C (Zersetzung)

7.2.7 Darstellung von Rhodamin-Piperazid (10)

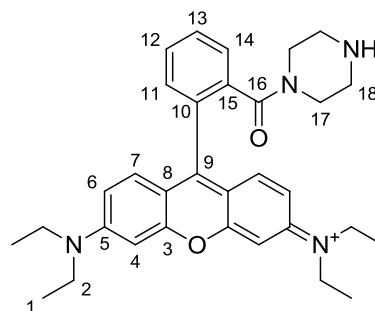
In einem Mikrowellengefäß wurden 550 mg (0.85 mmol) Rhodamin-Boc-Piperazid in 10 mL Reinstwasser gelöst und mit der Mikrowelle für 90 Min. auf 135 °C erhitzt. Die Lösung wurde lyophilisiert und das Produkt als violetter Feststoff erhalten (510 mg).

Ausbeute: 99%

Aussehen: violetteres Pulver

Summenformel: C₃₂H₃₉N₄O₂·Cl

Molekulare Masse: 547.127 g/mol



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 7.71 - 7.61 (m, 2H, H-12 + H-14), 7.58 - 7.50 (m, 1H, H-13), 7.37 - 7.30 (m, 1H, H-11), 7.22 (d, ³J (H,H) = 9.2 Hz, 2H, H-7), 6.98 (dd, ³J (H,H) = 9.2 Hz, ⁴J (H,H) = 2.0 Hz, 2H, H-6), 6.76 (d, ⁴J (H,H) = 2.0 Hz, 2H, H-4), 3.80 - 3.51 (m, 12H, H-2 + H-17), 2.85 (s, 4H, H-18), 1.32 (t, 12H, H-1).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 167.2 (C-16), 157.8 (C-3), 155.96 (C-15), 155.86 (C-5), 135.1 (C-10), 131.78 (C-7), 131.06 (C-8), 130.50 (C-12), 130.31 (C-13), 130.17 (C-14), 127.9 (C-11), 114.52 (C-6), 113.75 (C-9), 96.5 (C-4), 46.41 (C-2), 45.13, 44.61, 44.00, 43.56, 12.8 (C-1).

HRMS (ESI): m/z ber. für [C₃₂H₃₉N₄O₂⁺]: 511.3073, gef. 511.3073.

Schmelzpunkt: 212 °C

UV/VIS: λ_{abs} 560 nm (MeOH), ϵ : 76000 mol⁻¹cm⁻¹ (MeOH).

Fluoreszenz: λ_{em} 583 nm (MeOH); Φ 0.28 (MeOH)

7.2.8 Darstellung von Ethyl 2-(hexadecylamino)essigsäureethylester (6)

Die Synthese wurde nach der Vorschrift von M. Koppitz *et al.* durchgeführt.^[114]

Es wurden 7.2 g (30 mmol, 1.03 Äquiv.) Hexadecylamin und 4.1 mL (30 mmol, 1.03 Äquiv.) TEA in 30 mL Toluol suspendiert und eine Lösung aus 3.2 mL (29 mmol, 1.0 Äquiv.) Bromessigsäureethylester in 20 mL Toluol hinzu getropft. Die erhaltene Suspension wurde 28 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wurde im Vakuum fraktioniert destilliert und erstarrte in der Vorlage. Es wurden 1.38 g erhalten.

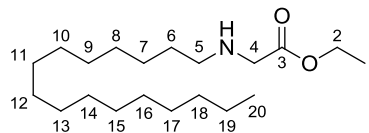
Ausbeute: 15%

Aussehen: Farbloser, kristalliner Feststoff

Summenformel: C₂₀H₄₁NO₂

Molekulare Masse: 327.545 g/mol

Siedepunkt: 130-140 °C (bei 3x10⁻² mbar)



¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 4.19 (q, ³J (H,H) = 7.1 Hz, 2H, H-2), 3.42 (s, 2H, H-4), 2.62 (t, ³J (H,H) = 7.8 Hz, 2H, H-5), 2.29 (s, 1H, NH), 1.60 - 1.40 (m, 2H, H-6), 1.38 - 1.15 (m, 29H, H-1, H-7 bis H-19), 0.88 (t, ³J (H,H) = 6.7 Hz, 3H, H-20).

Schmelzpunkt: 35 °C.

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

7.2.9 Darstellung von Ethyl 2-(N-hexadecyl-3-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecanamido)essigsäureethylester

Die Reaktion wurde unter Schutzgas durchgeführt.

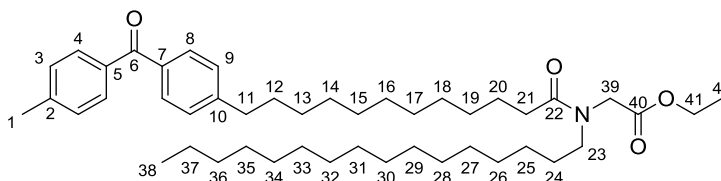
In 4 mL wasserfreiem DCM wurden 300 mg (760 μ mol, 1 Äquiv.) 12-(4-(4-methylbenzoyl)-phenyl)dodecansäure gelöst und 148 mg (912 μ mol, 1.2 Äquiv.) Carbonyldiimidazol hinzugegeben. Die Lösung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde eine Lösung aus 374 mg (1141 μ mol, 1.5 Äquiv.) Ethyl 2-(hexadecylamino)-essigsäureethylester in 3.5 mL wasserfreiem DCM hinzu getropft und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde zwei Mal mit 2 mL demin. Wasser extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt mit Hex/EtOAc (85:15) als Laufmittel. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (481 mg).

Ausbeute: 90%

Aussehen: farbloses Öl

Summenformel: C₄₆H₇₃NO₄

Molekulare Masse: 704.076 g/mol



¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ [ppm] = 7.73 - 7.68 (m, 4H, H-4 + H8), 7.29 - 7.25 (m, 4H, H-3 + H-9), 4.21 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, H-41, Isomer B), 4.17 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, H-41, Isomer A), 4.03 (s, 1H, H-39, Isomer A), 4.00 (s, 1H, H-39, Isomer B), 3.36 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H-23, Isomer B), 3.31 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H-23, Isomer A), 2.67 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H-11), 2.43 (s, 3H, H-1), 2.36 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-21, Isomer A), 2.20 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-21, Isomer B), 1.69 - 1.58 (m, 4H, H-12 + H-20), 1.58 - 1.43 (m, 2H, H-24) 1.38 - 1.19 (m, 43H, H-13 bis H-19 + H-25 bis H-37 + H-42), 0.87 (t, ³J = 6.6 Hz, 3H, H-38).

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ [ppm] = 196.39 (C-6), 173.78 (C-22), 169.66 (C-40), 148.03 (C-10), 143.00 (C-2), 135.50 (C-7), 135.36 (C-5), 130.32 (C-8 + C-4)*, 129.01 (C-9), 128.38 (C-3), 61.68 (C-41, Isomer B), 61.16 (C-41, Isomer A), 49.98 (C-39, Isomer B), 49.33 (C-23, Isomer A), 47.81 (C-39, Isomer A), 47.61 (C-23, Isomer B), 36.16 (C-11), 33.25 (C-21, Isomer B), 32.83 (C-21, Isomer A), 32.06, 31.34, 29.83*, 29.79, 29.76, 29.76, 29.69, 29.67, 29.61*, 29.56, 29.49, 29.47, 29.46, 28.93 (C-24, Isomer A), 27.66 (C-24, Isomer B), 27.05 (Isomer A zu 26.92), 26.92 (Isomer B zu 27.05), 25.39 (Isomer A zu 25.22), 25.22 (Isomer B zu 25.39), 22.82, 21.76 (C-1), 14.29 (C-42), 14.26 (C-38).

*Signal stark verbreitert.

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2924 (s, C-H₃), 2853 (s, C-H), 1730 (m, C=O), 1655 (m, C=O), 1607 (m, Aromat), 1464 (m, CH₂), 1311 (s, C-N) 1178 (s, C-O-C).

HRMS (ESI): m/z ber. für [C₄₆H₇₄NO₄⁺]: 704.5617, gef. 704.5626.

7.2.10 Darstellung von Ethyl 2-(*N*-hexadecyl-12-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecanamido)essigsäure (7)

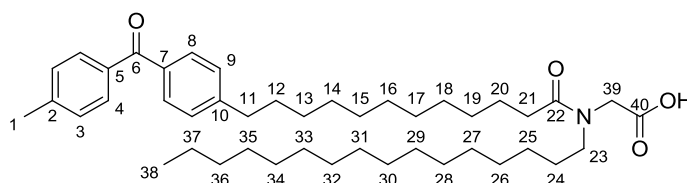
In einem Rundkolben wurden 60 mg (245 μ mol) Ethyl 2-(*N*-Hexadecyl-12-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecanamido)essigsäure in 5 mL Ethanol gelöst und 10 mL einer 3 M Lösung NaOH in Wasser hinzugegeben und über Nacht unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (70:30) gereinigt und ein farbloses Öl erhalten (quantitativ).

Ausbeute: quantitativ

Aussehen: farbloses Öl

Summenformel: C₄₄H₆₉NO₄

Molekulare Masse: 676,023 g/mol



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 7.71 (m, 4H, H-4 + H8), 7.27 (m, 4H, H-3 + H-9), 4.05 (s, 1H, H-39, Isomer A), 4.04 (s, 1H, H-39, Isomer B), 3.37 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H-23, Isomer B), 3.33 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H-23, Isomer A), 2.68 (t, ³J = 7.7 Hz, 2H, H-11), 2.44 (s, 3H, H-1), 2.37 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-21, Isomer A), 2.21 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-21, Isomer B), 1.75 - 1.41 (m, 6H, H-12 + H-20 + H-24), 1.41 - 1.05 (m, 40H, H-13 bis H-19 + H-25 bis H-37), 0.87 (t, ³J = 6.6 Hz, 3H, H-38).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 196.50 (C-6), 175.38 (C-22), 172.03 (C-40), 148.03 (C-10), 143.07 (C-2), 135.52 (C-7), 135.35 (C-5), 130.36 (C-8 + C-4)*, 129.04 (C-9), 128.40 (C-3), 49.95 (C-23, Isomer A), 49.26 (C-39, Isomer A), 47.35 (C-23, Isomer B), 47.07 (C-39, Isomer B), 36.17 (C-11), 33.22 (C-21, Isomer B), 32.79 (C-21, Isomer A), 32.07, 31.34, 29.84*, 29.81, 29.77, 29.74, 29.70*, 29.66, 29.62*, 29.57, 29.51*, 29.45, 29.42, 28.86 (C-24), 26.84, 25.28, 22.84, 21.76 8 (C-1), 14.27 (C-38).

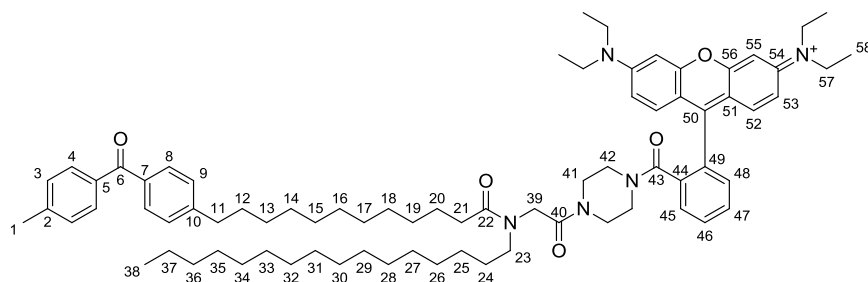
*Signal stark verbreitert.

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2924 (s, C-H₃), 2854 (s, C-H), 1726 (m, C=O), 1652 (m, C=O), 1609 (m, Aromat), 1466 (m, CH₂), 1311 (s, C-N).

HRMS (ESI): m/z ber. für [C₄₄H₇₀NO₄⁺]: 676.5305, gef. 676.4027.

7.2.11 Darstellung von R87 (1) - N-(6-(diethylamino)-9-(2-(4-(2-(N-ethyl-3-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)propanamido)acetyl)piperazine-1-carbonyl)phenyl)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chlorid

In 2 mL wasserfreiem DCM wurden 170 mg (251 μ mol, 1 Äquiv.) Ethyl 2-(N-hexadecyl-12-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecanamido)essigsäure gelöst und 50 mg (308 μ mol, 1.2 Äquiv.) Carbonyldiimidazol hinzugegeben. Die Lösung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde eine Lösung aus 165 mg (302 μ mol, 1.2 Äquiv.) Rhodamin-Piperazin in 10 mL DCM hinzu getropft und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde zwei Mal mit 20 mL demin. Wasser extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch an Kieselgel mit DCM/MeOH (90:10) als Laufmittel gereinigt. Es wurde ein violetter Feststoff erhalten (144 mg).



Ausbeute: 48%

Summenformel: C₇₆H₁₀₆N₅O₅·Cl

Aussehen: Violetter Feststoff

Molekulare Masse: 1205.135 g/mol

¹H-NMR (MeOD, 600 MHz): δ [ppm] = 7.80 - 7.75 (m, 2H), 7.72 - 7.69 (m, 1H), 7.68 - 7.64 (m, 4H, H-4 + H-8), 7.53 - 7.49 (m, 1H), 7.35 - 7.31 (m, 4H, H3 + H9), 7.30 - 7.25 (m, 2H), 7.10 - 7.04 (m, 2H), 6.97 - 6.94 (m, 2H), 4.28 (s, 2H, H-39 Isomer A), 4.13 (s, 2H, H-39 Isomer B), 3.73 - 3.64 (m, 8H, H-57), 3.56 - 3.23 (10H, H-23, H-41 + H-42), 2.73 - 2.67 (m, 2H, H-11), 2.44 (s, 3H, H-1), 2.42 - 2.37 (m, 2H, H-21 Isomer B), 2.16 - 2.10 (m, 2H, H-21 Isomer A), 1.71 - 1.63 (m, 2H, H-24), 1.63 - 1.12 (m, 56H, H-12 - H-20 & H-25 - H-37 + H-58), 0.92 - 0.84 (m, 3H, H-38).

¹³C-NMR (MeOD, 150 MHz): δ [ppm] = 198.21 (C-6), 176.01 (C-22), 168.98 (C-40), 159.28, 157.23, 149.59, 144.76, 136.57, 136.51, 136.34, 133.19, 131.77, 131.35, 131.29, 131.24, 131.20, 130.09, 129.52, 128.93, 115.42, 101.39, 97.36, 48.26 (C-39), 46.90 (C-57), 36.90 (C-11), 33.54 (C-21), 33.08, 32.35, 30.81*, 30.80*, 30.79*, 30.77, 30.69, 30.65, 30.62, 30.61, 30.53, 30.51, 30.48, 30.45, 30.42, 30.32, 30.30, 27.76, 26.42, 23.74, 21.64 (C-1), 14.46 (C-38), 12.85 (C-58).

*Signal stark verbreitert.

HRMS (ESI): m/z ber. für [C₇₆H₁₀₆N₅O₅⁺]: 1168.8194, gef. 1168.8258.

7.2.12 Darstellung von *tert*-Butyl 4-(2-bromacetyl)piperazin-1-carbamat (13)

Die Reaktion wurde in Anlehnung an die Vorschrift von M. Griffin *et al.* durchgeführt.^[115]

Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt.

In 7.5 mL wasserfreiem DCM wurden 1.03 g (5.5 mmol, 1 Äquiv.) Boc-Piperazin und 1.06 mL (785 mg, 6.1 mmol, 1.1 Äquiv.) DIPEA hinzugegeben. Die Lösung wurde mit einem Ethanolkältebad auf -78 °C gekühlt und unter starkem Rühren eine Lösung aus 478 μ L (1.11 g, 5.5 mmol, 1 Äquiv.) Bromessigsäurebromid gelöst in 7.5 mL wasserfreiem DCM hinzu getropft und die Lösung für weitere 3 Stunden gerührt.

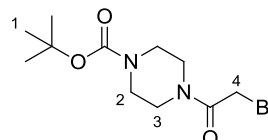
Die Kühlung wurde entfernt, die Lösung mit 30 mL DCM verdünnt und mit jeweils 50 mL demin. Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (70:30) als Laufmittel gereinigt. Es wurden 1.26 g eines hellgelben Feststoffs erhalten.

Ausbeute: 74%

Aussehen: Hellgelber Feststoff

Summenformel: C₁₁H₁₉BrN₂O₃

Molekulare Masse: 307.184 g/mol



¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 3.86 (s, 2H, H-4), 3.65 - 3.39 (m, 8H, H-2 + H-3), 1.47 (s, 9H, H-1).

Schmelzpunkt: 92 °C.

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.

7.2.13 Darstellung von *N*-(2-Hydroxyethyl)-12-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecanamid

In einem Mikrowellengefäß wurde 1 g (2.45 mmol, 1 Äquiv.) 12-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecansäuremethylester vorgelegt und 2 mL (33 mmol, 13.5 Äquiv.) Aminoethanol hinzugegeben. Die Suspension wurde unter Rühren 1 Stunde in der Mikrowelle auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die entstandene Lösung in 100 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 100 mL 1M Salzsäure versetzt. Die erhaltene Emulsion wurde über Nacht sehr stark gerührt und der Endpunkt dünnschichtchromatographisch bestimmt.

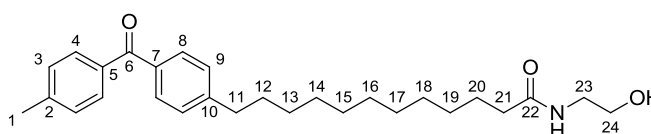
Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt Säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (50:50) als Laufmittel gereinigt. Es wurden 964 mg eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 90%

Aussehen: Farbloses Öl

Summenformel: C₂₈H₃₉NO₃

Molekulare Masse: 437.614 g/mol



¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 7.74 - 7.68 (m, 4H, H-4 + H-8), 7.30 - 7.24 (m, 4H, H-3 + H-9), 6.09 (bs, 1H, NH), 3.72 (t, ³J (H,H) = 4.9 Hz, 2H, H-24), 3.42 (q, ³J (H,H) = 5.1 Hz, 2H, H-23), 2.68 (t, ³J (H,H) = 7.7 Hz, 2H, H-11), 2.44 (s, 3H, H-1), 2.20 (t, ³J (H,H) = 7.6 Hz, 2H, H-21), 1.70 - 1.56 (m, 4H, H-12 + H-20), 1.38 - 1.14 (m, 14H, H-13 - H-19).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 196.43 (C-6), 174.61 (C-22), 147.95 (C-10), 142.97 (C-2), 135.36 (C-7), 135.19 (C-5), 130.20 (C-4 + C-8), 128.91, 128.28, 62.60 (C-24), 42.52 (C-23), 36.65 (C-21), 35.98 (C-11), 31.11, 29.49, 29.45, 29.40, 29.38, 29.31, 29.25, 29.18, 25.71, 21.64 (C-1).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für [C₂₈H₄₀NO₃⁺]: 437.2930, gef. 438.3035.

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3297 (OH), 2916 (s, C-H₃), 2848 (s, C-H), 1647 (m, C=O), 1607 (m, Aromat), 1468 (m, CH₂), 1288 (s, C-N) 1179 (s, C-O-C).

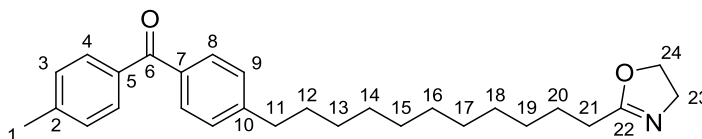
7.2.14 Darstellung von (4-(11-(4,5-dihydrooxazol-2-yl)undecyl)phenyl)(p-tolyl)methanone

Ausbeute: 89%

Aussehen: Farbloser Feststoff

Summenformel: C₂₈H₃₇NO₂

Molekulare Masse: 419.599 g/mol



In 30 mL wasserfreiem DCM wurden 562 mg (1.28 mmol, 1 Äquiv.) *N*-(2-Hydroxyethyl)-12-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecanamid gelöst und 537 μ L TEA (390 mg, 3.85 mmol, 3 Äquiv.) hinzugegeben sowie 149 μ L Mesylchlorid (221 mg, 1.93 mmol, 1.5 Äquiv) hinzugegeben. Die Lösung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hex/EtOAc (80:20) gereinigt. Es wurden 479 mg eines farblosen Feststoffs erhalten.

Das Produkt ist feuchtigkeitsempfindlich und muss unter Schutzgas gelagert werden!

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ [ppm] = 7.73 - 7.68 (m, 4H, H-4 + H-8), 7.29 - 7.25 (m, H-3 + H-9), 4.22 (t, ³J (H,H) = 9.5 Hz, 2H, H-24), 3.82 (t, ³J (H,H) = 9.5 Hz, 2H, H-23), 2.67 (t, ³J (H,H) = 7.7 Hz, 2H, H-11), 2.43 (s, 3H, H-1), 2.27 (t, ³J (H,H) = 7.7 Hz, 2H, H-21) 1.68 - 1.58 (m, 4H, H-12 + H-20), 1.38 - 1.13 (m, 14H, H-13 - H-19).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): δ [ppm] = 196.4 (C-6), 169.0 (C-22), 148.1 (C-10), 143.0 (C-2), 135.5 (C-7), 135.4 (C-5), 130.3 (C-4 + C-8), 129.0 (C-9), 128.3 (C-3), 67.3 (C-24), 54.4 (C-23), 36.2 (C-11), 31.3, 29.71, 29.67, 29.60, 29.57, 29.44, 29.39, 29.38, 28.1 (C-21), 26.1, 21.8 (C-1).

HRMS (ESI): m/z ber. für $[\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{NO}_3^+]$: 420.2902, gef. 420.2912.

7.2.15 Darstellung von 1-*N*-Boc-4-[(methylamino)methyl]piperidin

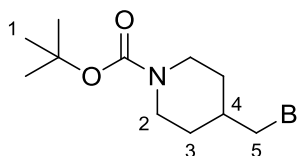
In einem Rundkolben wurden 500 mg (1.35 mmol, 1 Äquiv.) *N*-Boc-4-methyltosylpiperidine in 5 mL wasserfreiem Aceton gelöst und 235 mg (2.71 mmol, 2 Äquiv.) Lithiumbromid hinzugegeben. Die Suspension wurde 1 Stunde unter Rückfluss gerührt, filtriert und säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Essigester (90:10) gereinigt. Das Produkt wurde am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurden 330 mg eines farblosen Öls erhalten.

Ausbeute: 88%

Aussehen: Farbloses Öl

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{BrNO}_2$

Molekulare Masse: 278.186 g/mol



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ [ppm] = 4.30 - 4.01 (m, 2H, H-2a) 3.29 (d, 3J (H,H) = 6.1 Hz, 2H, H-5) 2.78 - 2.58 (m, 2H, H-2b), 1.88 - 1.71 (m, 4H, H-3), 1.45 (s, 9H, H-1), 1.30 - 1.09 (m, 1H, H-4).

Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[116]

8 Anhang

8.1 Gefahrstoffliste mit GHS-Symbolen sowie H- und P-Sätzen

Tabelle 4: Liste verwendeter Gefahrstoffe.

Substanz	GHS-Piktogramm	Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	02, 07	Gefahr	225, 319, 336, EUH066	210, 280, 304+340+312, 305+351+338, 337+313, 403+235
Acetonitril	02, 07	Gefahr	225, 302+312+332, 319	210, 261, 280, 305+351+338, 370+378, 403+235
Aluminiumtrichlorid	05	Gefahr	314, EUH014	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Allylamin	02, 06, 09	Gefahr	225, 301, 311, 331, 411	210, 261, 303+361+353, 361, 405, 501
Ammoniumchlorid	07	Achtung	302, 319	301+312+330, 305+351+338
Benzylmagnesiumchlorid, 2M in THF	02, 05, 07, 08	Gefahr	225, 314, 335, 351, EUH019	210, 260, 280, 305+351+338, 370+378, 403+235
<i>N</i> -Boc-2-bromethylamin	07	Achtung	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
1-Boc-4-bromomethyl piperidin	07	Achtung	302, 319	305, 351, 338
1-Boc-4-(methanesulfonyloxy) piperidin	07	Achtung	315, 319	264 280, 302+352+332+313+362+364, 305+351+338+337+313
1-Boc-piperazin	07	Achtung	315, 319	264 280, 302+352+332+313+362+364, 305+351+338+337+313

Tabelle 4: Liste verwendeter Gefahrstoffe (Fortsetzung).

1-Boc-4-(tosyloxymethyl) piperidin	07	Achtung	315, 319	264 280, 302+352+332 +313+362+364, 305+351+338+ 337+313
1-Boc-4-tosyloxy piperidin	07	Achtung	315, 319	264 280, 302+352+332+ 313+362+364, 305+351+338+ 337+313
Bromessigsäure bromid	05	Gefahr	314	280, 305+351+338, 310
Bromessigsäure ethylester	02, 06	Gefahr	226, 300+310+330	210, 280, 301+330+331+310, 302+352+310, 304+340+310, 370+378
11-Bromundecansäure	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.			
Calciumhydrid	02	Gefahr	260	223, 231+232, 370+378
1,1-Carbonyldiimidazol	05, 07	Gefahr	302, 314	280, 305+351+338, 310
1,2-Dichlorbenzen	07, 09	Achtung	302+332, 315, 317, 319, 335, 410	261, 280, 301+312+330, 305+351+338
Dichlormethan	07,08	Achtung	315, 319, 336, 351	201, 261, 264, 280, 304+340+312, 308+313
Diethylether	02, 07	Gefahr	224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 261
Diisopropylethylamin	02, 05, 06	Gefahr	225, 302, 318, 331 ,335	210, 261, 280, 305+351+338, 311
4,4'-Dimethylbenzophenon	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.			
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	02, 05, 06	Gefahr	226, 315, 317, 318, 330, 335	210, 260, 280, 304+340+310, 305+351+338+310, 370+378

Tabelle 4: Liste verwendeter Gefahrstoffe (Fortsetzung).

Essigsäure, 100%	02, 05	Gefahr	226, 290, 314	210, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338+310, 370+378
Ethanolamin	05, 07	Gefahr	302+312+332, 314, 335, 412	261, 273, 301+312+330, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Ethylacetat	02, 07	Gefahr	225, 319, 336	210, 233, 261, 280, 303+361+353, 370+378
Ethyloxazolin	02, 07	Achtung	226, 302+312+332	280
Hexadecylamin	05, 09	Gefahr	314, 400	273, 280, 305+351+338, 310
<i>n</i> -Hexan	02, 07, 08, 09	Gefahr	225, 304, 315, 336, 361f, 373, 411	201, 210, 273, 301+P310, 308+313, 331
Kaliumcarbonat	07	Achtung	315, 319, 335	305+351+338
Kupfer(I)Chlorid	05,07,09	Gefahr	302, 318, 410	264, 273, 280, 305+351+338+310, 391, 501
Mesylchlorid	05, 06	Gefahr	301+311, 314, 317, 330, 335	260, 280, 301+330+331+310, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Methanol	02, 06, 08	Gefahr	225, 301+311+331, 370	210, 280, 302+352+312, 304+340+312, 370+378, 403+235
Natriumchlorid	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.			
Natriumhydrogencarbonat	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.			
Natriumhydroxid	05	Gefahr	290, 314	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338

Tabelle 4: Liste verwendeter Gefahrstoffe (Fortsetzung).

Natriumsulfat	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.			
Nitrobenzen	06, 08	Gefahr	301+311+331, 351, 360F, 372, 412	201, 280, 301+330+331+310, 302+352+312, 304+340+311, 308+313
Phosphorpentoxid	05	Gefahr	314, EUH014	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Piperazin	05, 08	Gefahr	314, 317, 334, 361fd	261, 280, 305+351+338, 310
Rhodamin B	05, 07	Gefahr	302, 318, 412	273, 280, 305+351+338
Salzsäure, 37%	05, 07	Gefahr	290-314-335	261, 280, 305+351+338, 310
Schwefelsäure, 96%	05	Gefahr	290, 314	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Tetrahydrofuran	02,07,08	Gefahr	225, 302, 319, 335, 351, EUH019	201, 210, 233, 261, 280, 370+378
Toluol	02, 07, 08	Gefahr	225, 304, 315, 336, 361d, 373	210, 260, 280, 301+310, 370+378, 403+235
<i>p</i> -Toluoylchlorid	05	Gefahr	314	280, 305+351+338, 310
Triethylamin	02, 05, 06	Gefahr	225, 302, 311+331, 314, 335	210, 261, 280, 303+361+353, 305+351+338, 370+378
12-Phenyldodecansäure	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.			
12-Phenyldodecansäure methylester	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.			
(4-(4-Methylbenzoyl)phenyl) dodecansäuremethylester	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.			
(4-(4-Methylbenzoyl)phenyl) dodecansäure	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.			

Tabelle 4: Liste verwendeter Gefahrstoffe (Fortsetzung).

mono Boc-Piperazin	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
Rhodamin-Boc-Piperazid	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
Rhodamin-Piperazid	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
Ethyl 2-(N-hexadecyl-3-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecanamido)essigsäureethylester	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
Ethyl 2-(N-hexadecyl-12-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecanamido)essigsäure	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
<i>tert</i> -Butyl 4-(2-bromacetyl)piperazin-1-carbammat	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-12-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)dodecanamid	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
(4-(11-(4,5-dihydrooxazol-2-yl)undecyl)phenyl) (p-tolyl)methanone	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
1- <i>N</i> -Boc-4-[(methylamino)methyl]piperidin	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.
<i>N</i> -(6-(diethylamino)-9-(2-(4-(2-(<i>N</i> -ethyl-3-(4-(4-methylbenzoyl)phenyl)propanamido)acetyl)piperazine-1-carbonyl)phenyl)-3H-xanthen-3-ylidene)- <i>N</i> -ethylethanaminium chlorid	Achtung – noch nicht vollständig geprüfter Stoff.

8.2 Wortlaut der H- und P-Sätze

8.2.1 Gefahrenhinweise (H-Sätze)

H 200-Reihe: Physikalische Gefahren

- H200 Instabil, explosiv.
- H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
- H202 Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H203 Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.

H204	Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H205	Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
H220	Extrem entzündbares Gas.
H221	Entzündbares Gas.
H222	Extrem entzündbares Aerosol.
H223	Entzündbares Aerosol.
H224	Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H240	Erwärmung kann Explosion verursachen.
H241	Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
H242	Erwärmung kann Brand verursachen.
H250	Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
H251	Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H252	In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H260	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
H261	In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
H270	Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
H271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
H281	Enthält tiefkaltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -Verletzungen verursachen.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H 300-Reihe: Gesundheitsgefahren

- H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H340 Kann genetische Defekte verursachen.
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
- H350 Kann Krebs erzeugen.
- H350i Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen.
- H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

H360F	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H360FD	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H360Fd	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H360Df	Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
H362	Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
H370	Schädigt die Organe.
H371	Kann die Organe schädigen.
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
H 400-Reihe:	Umweltgefahren
H400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H413	Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.

8.2.2 Ergänzende Gefahrenhinweise (EUH-Sätze)

EUH001	In trockenem Zustand explosionsgefährlich.
EUH006	Mit und ohne Luft explosionsfähig.
EUH014	Reagiert heftig mit Wasser.
EUH018	Kann bei Verwendung explosionsfähige/entzündbare Dampf/Luft-Gemische bilden.
EUH019	Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
EUH044	Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
EUH029	Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
EUH031	Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
EUH032	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
EUH066	Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
EUH070	Giftig bei Berührung mit den Augen.
EUH071	Wirkt ätzend auf die Atemwege.
EUH059	Die Ozonschicht schädigend.
EUH201	Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten.
EUH201A	Achtung! Enthält Blei.
EUH202	Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
EUH203	Enthält Chrom (VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH204	Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH205	Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH206	Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da Gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.

EUH207	Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.
EUH208	Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH209	Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
EUH209A	Kann bei Verwendung entzündbar werden.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
EUH401	Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchsanleitung einhalten.

8.2.3 Sicherheitshinweise (P-Sätze)

P 100-Reihe: Allgemeines

P101	Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
P102	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
P103	Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.

P 200-Reihe: Prävention

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210	Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P211	Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
P220	Von Kleidung/. . ./brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
P221	Mischen mit brennbaren Stoffen/. . . unbedingt verhindern.

-
- P222 Kontakt mit Luft nicht zulassen.
- P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem
Aufflammen unbedingt verhindern.
- P230 Feucht halten mit . . .
- P231 Unter inertem Gas handhaben.
- P232 Vor Feuchtigkeit schützen.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
- P241 Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen /
Beleuchtung / . . . verwenden.
- P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
- P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
- P244 Druckminderer frei von Fett und Öl halten.
- P250 Nicht schleifen/stoßen/. . ./reiben.
- P251 Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch
nicht nach der Verwendung.
- P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
- P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
- P263 Kontakt während der Schwangerschaft/und der Stillzeit vermeiden.
- P264 Nach Gebrauch . . . gründlich waschen.
- P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
- P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes
tragen.

P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
P282	Schutzhandschuhe/Gesichtsschild/Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
P283	Schwer entflammbare/flammhemmende Kleidung tragen.
P284	Atemschutz tragen.
P285	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P231 + P232	Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
P235 + P410	Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.
P 300-Reihe:	Reaktion
P301	Bei Verschlucken:
P302	Bei Berührung mit der Haut:
P303	Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
P304	Bei Einatmen:
P305	Bei Kontakt mit den Augen:
P306	Bei Kontaminierter Kleidung:
P307	Bei Exposition:
P308	Bei Exposition oder falls betroffen
P309	Bei Exposition oder Unwohlsein:
P310	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P311	Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P312	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P313	Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

-
- P315 Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe . . . auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P321 Besondere Behandlung (siehe . . . auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P322 Gezielte Maßnahmen (siehe . . . auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P330 Mund ausspülen.
- P331 Kein Erbrechen herbeiführen.
- P332 Bei Hautreizung:
- P333 Bei Hautreizung oder -Ausschlag:
- P334 In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.
- P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.
- P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
- P337 Bei anhaltender Augenreizung:
- P338 Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen.
Weiter ausspülen.
- P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P341 Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P342 Bei Symptomen der Atemwege:
- P350 Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P352 Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P353 Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.

P361	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
P362	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P363	Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
P370	Bei Brand:
P371	Bei Großbrand und großen Mengen:
P372	Explosionsgefahr bei Brand.
P373	Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische /Erzeugnisse erreicht.
P374	Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
P375	Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P376	Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P377	Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
P378	. . . zum Löschen verwenden.
P380	Umgebung räumen.
P381	Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.
P390	Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
P391	Verschüttete Mengen aufnehmen.
P301 + P310	Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301 + P312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301 +	
P330 + P331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
P302 + P334	Bei Kontakt mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.

- P302 + P350 Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P302 + P352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P303 +
- P361 + P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P304 + P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P304 + P341 Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und In einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P305 +
- P351 + P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P306 + P360 Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P307 + P311 Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P308 + P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P309 + P311 Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P333 + P313 Bei Hautreizung oder -Ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P335 + P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.

- P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P370 + P378 Bei Brand: . . . zum Löschen verwenden.
- P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen.
- P370 +
- P380 + P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P371 +
- P380 + P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P 400-Reihe: Aufbewahrung**
- P401 . . . aufbewahren.
- P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P406 In korrosionsbeständigem/. . . Behälter mit korrosionsbeständiger Auskleidung aufbewahren.
- P407 Luftspalt zwischen Stapeln/Paletten lassen.
- P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P411 Bei Temperaturen von nicht mehr als . . . °C/. . . aufbewahren.
- P412 Nicht Temperaturen von mehr als 50°C aussetzen.

-
- P413 Schüttgut in Mengen von mehr als . . . kg bei Temperaturen von nicht mehr als . . . °C aufbewahren.
- P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.
- P422 Inhalt in/unter . . . aufbewahren
- P402 + P404 In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403 + P233 Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P403 + P235 Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P410 + P403 Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P410 + P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen von mehr als 50°C aussetzen.
- P411 + P235 Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr als . . . °C aufbewahren.
- P 500-Reihe: Entsorgung**
- P501 Inhalt/Behälter . . . zuführen.

8.3 Gefahrenpiktogramme



GHS 01: Explosivstoffe



GHS 02: Entzündlich



GHS 03: Brandfördernde
Stoffe und org. Peroxide



GHS 04: Gase unter Druck



GHS 05: Korrosive Stoffe



GHS 06: Giftige Stoffe



GHS 07: Reizende oder
sensibilisierende Stoffe
(Haut, Augen)



GHS 08: Reizende oder
sensibilisierende Stoffe
(Einatmung),
krebserregende,
mutagene,
teratogene Stoffe



GHS 09: Umwelt-
gefährdende Stoffe

9 Literatur

- [1] A. Aryani, B. Denecke, *Mol. Neurobiol.*, **2016**, 53, 818.
- [2] D Ha, N. Yang, V. Nadithe, *Acta Pharm. Sin. B*, **2016**, 6, 4, 287.
- [3] W. Pardridge, *Mol. Interv.* **2003**, 3, 90.
- [4] Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik), Fachserie 12, Reihe 6.4, (Artikelnummer: 2120640137004), **Erschienen am 2014, korrigiert 2015**.
- [5] C. Kruchko *et al.*, *Neuro-Oncology*, **2012**, 14, 5, 1.
- [6] L. Steward, *Lancet*, **2002**, 359, 9311, 1011.
- [7] X. Luan, *Acta Pharmacol. Sin.*, **2017**, 38, 6, 754.
- [8] H. Zhang *et al.*, *Molecular Therapy*, **2010**, 18, 9, 1606.
- [9] R. Simpson, S. Jensen, J. Lim, *Proteomics*, **2008**, 8, 4083.
- [10] E. Cocucci, G. Racchetti, J. Meldolesi, *Trends Cell. Biol.*, **2009**, 19, 43.
- [11] C. Falker *et al.*, *J. Neurochem.*, **2016**, 137, 88.
- [12] R. Johnstone *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262, 9412.
- [13] G. Raposo *et al.*, *J. Exp. Med.*, **1996**, 183, 1161.
- [14] G. Raposo, W. Stoorvogel, *J. Cell Biol.* **2013**, 200, 4, 373.
- [15] K. Laulagnier *et al.*, *Biochem. J.*, **2004**, 380, 161.
- [16] A. Vlassov *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, 1820, 940.
- [17] C. Raiborg, H. Stenmark, *Nature*, **2009**, 458, 445.
- [18] J. Hurley, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, 45, 463.
- [19] J. Conde-Vancells *et al.*, *J. Proteome Res.*, **2008**, 7, 5157.
- [20] C. Subra *et al.*, *J. Lipid Res.*, **2010**, 51, 2105.
- [21] B. Batista *et al.*, *J. Proteome Res.*, **2011**, 10, 4624.
- [22] H. Valadi *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **2007**, 9, 654.
- [23] M. Mittelbrunn *et al.*, *Nat. Commun.*, **2011**, 2, 282.
- [24] J. Skog *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **2008**, 10, 1470.
- [25] A. Zomer *et al.*, *Commun. Integr. Biol.*, **2010**, 3, 447.
- [26] L. Zitvogel *et al.*, *Nature Med.*, **1998**, 4, 594.
- [27] G. Raposo *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, **1997**, 8, 2631.
- [28] G. Van Niel *et al.*, *J. Biochem. (Tokyo)*, **2006**, 140, 13.
- [29] A. Lakkaraju, E. Rodriguez-Boulan, *Trends Cell Biol.*, **2008**, 18, 199.
- [30] J. Schorey, S. Bhatnagar, *Traffic*, **2008**, 9, 871.

- [31] D. Pegtel, M. van de Garde, J. Middeldorp, *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1809, 715.
- [32] P. Leblanc *et al.*, *EMBO J.*, **2006**, 25, 2674.
- [33] D. Pegtel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107, 6328.
- [34] E. Chertova *et al.*, *J. Virol.*, **2006**, 80, 9039.
- [35] J. Mallegol *et al.*, *Gastroenterology*, **2007**, 132, 1866.
- [36] B. Hawkins, T. Davis, *Pharmacol. Rev.*, **2005**, 57, 2, 173.
- [37] J. Fenstermacher *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1988**, 529, 21.
- [38] R. Sedlakova *et al.*, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **1999**, 31, 149.
- [39] U. Kniesel, H. Wolburg, *Cell. Mol. Neurobiol.* **2000**, 20, 1, 57.
- [40] W. Oldendorf *et al.*, *Ann. Neurol.*, **1977**, 1, 409.
- [41] J. Kreuter, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2014**, 71, 2.
- [42] R. Bandopadhyay *et al.*, *J. Neurocytol.*, **2001**, 30, 35.
- [43] M. Mato *et al.*, *Experientia*, **1984**, 40, 399.
- [44] R. Balabanov *et al.*, *Microvasc. Res.*, **1996**, 52, 127.
- [45] P. Dore-Duffy *et al.*, *Microvasc. Res.*, **2000**, 60, 55.
- [46] E. Gonul *et al.*, *Microvasc. Res.*, **2002**, 64, 116.
- [47] S. Hori *et al.*, *J. Neurochem.*, **2004**, 89, 503.
- [48] J. Krum *et al.*, *Exp. Neurol.*, **1997**, 146, 33.
- [49] C. Willis *et al.*, *Glia*, **2004**, 45, 325.
- [50] P. Stewart, M. Wiley, *Dev. Biol.*, **1981**, 84, 183.
- [51] X. Liu *et al.*, *Drug Metab. Dispos.* **2004**, 32, 132.
- [52] D. Clark, *Drug Discov. Today*, **2003**, 8, 927.
- [53] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 20, 3714.
- [54] M. Gleeson, *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 817.
- [55] C. Lipinski *et al.*, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2001**, 46, 3.
- [56] N. Bodor, P. Buchwald, *Am. J. Drug Targ.*, **2003**, 1, 13.
- [57] E. Zhang *et al.*, *Drug Metab. Rev.*, **2003**, 34, 709.
- [58] A. Betz *et al.*, *Brain Res.*, **1980**, 192, 17.
- [59] J. Bernacki *et al.*, *Pharmacol. Rep.*, **2008**, 60, 600.
- [60] D. Begley, *Curr. Pharm. Des.*, **2004**, 10, 1295.
- [61] S. Dallas *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, **2006**, 58, 140.
- [62] D. Begley, *Pharmacol. Ther.*, **2004**, 104, 29.
- [63] I. Sauer *et al.*, *Biochemistry*, **2005**, 44, 2021.
- [64] B. Zlokovic *et al.*, *Exp. Neurol.*, **1990**, 107, 263.

- [65] W. Banks, *Eur. J. Pharmacol.*, **2004**, 490, 5.
- [66] B. Jourde *et al.*, *Cancer. Res.*, **2004**, 64, 19, 6892.
- [67] H. Ohgaki, *Neuropathology*, **2005**, 25, 1, 1.
- [68] T. Chew *et al.*, *Neuro. Oncol.*, **2002**, 4, 4, 278.
- [69] J. Fisher *et al.*, *Neurol. Clin.*, **2007**, 25, 4, 867.
- [70] P. Demers, T. Vaughan, R. Schommer, *J. Occup. Med.*, **1991**, 33, 9, 1001.
- [71] D. Karnofsky, *Cancer*, **1948**, 1, 634.
- [72] C. Chang, *et al.*, *Cancer*, **1983**, 52, 6, 997.
- [73] J. Simpson, *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1993**, 26, 2, 239.
- [74] J. Wood, S. Green, W. Shapiro, *J. Clin. Oncol.*, **1988**, 6, 2, 338.
- [75] M. Lacroix, *et al.*, *J. Neurosurg.*, **2001**, 95, 2, 190.
- [76] M. Westphal, *et al.*, *Neurooncol.*, **2003**, 5, 2, 79.
- [77] H. Brem, *et al.*, *Lancet*, **1995**, 345, 8956, 1008.
- [78] R. Stupp, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **2005**, 352, 10, 987.
- [79] P. Klán, J. Wirz, *Photochemistry of Organic Compounds*, **2009**, 1. Auflage, Wiley & Sons Ltd, West Sussex, pp. 293.
- [80] R. Hoogenboom, *Macromol. Rapid Commun.*, **2003**, 24, 1, 15.
- [81] R. Hoogenboom, *Macromol. Chem. And Phys.*, **2007**, 208, 18.
- [82] R. Galardy, L. Craig LC, M. Printz, *Nat. New Biol.*, **1973**, 242, 127.
- [83] W. Silverman, *Pediatrics*, **2002**, 110, 2, 22, 404.
- [84] A. Lala, E. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 3982.
- [85] B. Hilbold *et al.*, *Med. Chem.*, **2011**, 19, 7464.
- [86] U. Klein, F. Hafner, *Chem. Phys. Lett.*, **1976**, 43, 141.
- [87] D. Murale *et al.*, *Proteome Science*, **2017**, 15:14.
- [88] Y. Yang, H. Song, P. Chen, *IUBMB life*, **2016**, 68, 11, 879.
- [89] K. Sakurai, *Asian J. Org. Chem.*, **2015**, 4, 116.
- [90] E. Smith, *Future Med. Chem.*, **2015**, 7, 2, 159.
- [91] T. Tomohiro, Y. Hatanaka, *Heterocycles*, **2014**, 89, 12, 2697.
- [92] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, M. Vicent, *Polym. Chem.*, **2011**, 2, 1900.
- [93] N. Adams, U. Schubert, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2007**, 59, 1504.
- [94] G. van Meer, D. Voelker, G. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2008**, 9, 2, 112.
- [95] V. Dujols, F. Ford, A. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 7386.
- [96] M. Lee *et al.*, *Org. Lett.*, **2007**, 9, 13, 2501.
- [97] C. Vines *et al.*, *Phospholipases in eLS*, **2015**, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

- [98] O. Dabrowski, Diplomarbeit, „*Synthese bifunktionaler Lipid-Mimetika zur photochemischen Markierung von biologischen Membranen und Nachweis der photochemischen Reaktivität*“, **2015**, unveröffentlicht.
- [99] P. Ren *et al.*, *Angew. Chem.*, **2012**, 124, 9244; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 9110.
- [100] S. Paul *et al.*, *Synthesis*, **2003**, 18, 2877.
- [101] R. Parella *et al.*, *Tetrahedron Letters*, **2013**, 54, 1738.
- [102] P. Dominkuš *et al.*, *BBA - Biomembranes*, **2018**, 1860, 1350.
- [103] P. Wallace *et al.*, *Cytometry Part A*, **2008**, 73, 1019.
- [104] Y. Lee *et al.*, *Human Molecular Genetics*, **2012**, 21, 1, R125.
- [105] A. Schrödel, *Biol. Unserer Zeit*, **2007**, 37, 289.
- [106] Y. Pan *et al.*, *J. Nutr.*, **1998**, 128, 4, 744.
- [107] C. Fang *et al.*, *PLoS ONE*, **2017**, 12, 6.
- [108] L. Haberkorn, *Masterarbeit: „Verkapselung superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel in Poly-n-butylcyanoacrylat-Kapseln für medizinische Anwendungen“*, **2014**, unveröffentlicht.
- [109] S. Crosignani, D. Swinnen, *J. Comb. Chem.*, **2005**, 7, 688.
- [110] X. Wang *et al.*, *Langmuir*, **2009**, 20, 25, 2, 744.
- [111] M. Goodman, G. Kirsch, F. Knapp Jr., *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 390.
- [112] Y. Gan, P. Wang, T. Spencer, *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 9487.
- [113] D. Hayes *et al.*, *Science*, **2013**, 340, 1431
- [114] M. Koppitz *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, 80, 1280.
- [115] M. Griffin *et al.* Patentschrift WO 2014/057266.
- [116] N. Vila, *RSC Adv.*, **2016**, 6, 46170.

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den