

Untersuchung der Kinetik und Dynamik der Selbstassemblierung supramolekularer Peptidamphiphile

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaft“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Marius Thomas

Geboren in Nastätten

Mainz, 2024

Dekanin:

Univ.-Prof. Dr. Eva Rentschler

1. Gutachter:

████████████████████

2. Gutachter:

████████████████████

Datum der Disputation:

Für meine Familie

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2020 bis März 2024 in der Forschungsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Pol Besenius im Department Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Ein Kapitel dieser Arbeit ist in einer internationalen, wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht. Andere Teile befinden sich in der Vorbereitung der Manuskripte. Der Hauptteil der Arbeit ist in Deutsch verfasst. Die experimentelle Vorgehensweise ist in englischer Sprache beschrieben.

D77 – Dissertation der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Zusammenfassung

Strukturell verwandte Peptidamphiphile sind in der Lage im wässrigen Medium spontan in supramolekulare Copolymere zu assemblieren. Funktionalisierte Varianten dieser Copolymere sind durch die hohe Vielfalt unterschiedlicher Anwendungsmöglichkeiten von besonderem Interesse. Für deren Entwicklung und Verständnis gehören die Morphologie, die Kinetik und die Dynamik zu den entscheidendsten Eigenschaften dieser Verbindungen.

Zur Einleitung wird in Kapitel 1 die Definition supramolekularer Copolymere und deren Zusammensetzungsmöglichkeiten eingeführt. Sie werden in das Fachgebiet eingeordnet und Beispiele aus neuesten Veröffentlichungen wissenschaftlicher Literatur dargelegt. Danach wird der theoretische Hintergrund der Kinetik und Dynamik supramolekularer Polymere und deren Messmethoden beschrieben. Anhand der Verwendung dieser Methoden in aktueller Fachliteratur werden Beispiele der Erkenntnisse dieser Methoden aufgezeigt. Abschließend wird die Theorie der Lumineszenzeigenschaften organischer Chromophore beschrieben sowie der Fluoreszenz- und supraaufgelösten Mikroskopie.

Kapitel 3 beschreibt zunächst die Synthese verschiedener selbstassemblierender, copolymerbildender Peptidamphiphile und präsentiert verschiedene Synthesestrategien, deren Problematik und Optimierung. Zur Evaluierung der zuvor genannten Eigenschaften sind spektroskopische Sonden, die an die Peptidamphiphile angebracht werden, geeignet. So wird zusätzlich die Darstellung von funktionalisierbaren Varianten beschrieben, die die Konjugation mit den Sonden ermöglicht. Daran schließt sich die systematische Evaluierung der Morphologie und der Dynamik des Monomeraustauschs im Gleichgewicht der supramolekularen Homo- als auch Copolymere an. Die Peptidamphiphile bilden durch Selbstassemblierung in Wasser eindimensionale Nanostäbchen mit vergleichbaren Eigenschaften bekannter supramolekularer Polymere und können durch Zugabe mehrerer Komponenten Copolymere mit variabel einstellbarer Zusammensetzung bilden.

Zusätzlich beleuchtet Kapitel 4 die Kinetik der supramolekularen Polymerisation eines Peptidamphiphils. Hierfür wird die Synthese eines linearen Konjugats beschrieben, das mit einem metallorganischen Komplex funktionalisiert werden kann, der als Assemblierungsmotiv und als Sonde dient. Der besondere Fokus der Evaluierung liegt hierbei auf dem Einfluss der Probenvorbereitung der Verbindung und der Anteile organischer Lösungsmittel im wässrigen Medium der Polymerisation. Die systematische Untersuchung der konzentrationsabhängigen Assemblierung zeigt einen elongations-nukleations dominierten Mechanismus der supramolekularen Polymerisation. Darüber hinaus wurde der besondere Einfluss organischer Lösungsmittelzusätze im wässrigen Medium herausgearbeitet.

Summary

Structurally related peptide amphiphiles are able to spontaneously assemble into supramolecular copolymers in aqueous solution. Functionalized variants of these copolymers are of particular interest due to the high diversity of possible applications. For their development and understanding, morphology, kinetics and dynamics are among the most important properties of these compounds.

Chapter 1 introduces the definition of supramolecular copolymers and their compositional possibilities. They are categorized in the field of research and examples of the latest publications in the scientific literature are presented. The theoretical background of kinetics and dynamics of supramolecular polymers and their measurement techniques are then described. Based on the use of these methods in current scientific literature, examples of the findings of these methods are shown. Finally, the theory of luminescence properties of organic chromophores is described as well as fluorescence and super-resolution microscopy.

In Chapter 3 the synthesis of various self-assembling and copolymer-forming peptide amphiphiles is described and different synthesis strategies, their problem and their optimization are presented. Spectroscopic probes attached to the compounds are suitable for evaluating the aforementioned properties. The synthesis of functionalizable derivatives that enable the conjugation with the probes is also described. This is followed by the systematic evaluation of the morphology and the dynamics of the monomer exchange in the equilibrium of the supramolecular homo- and copolymers. The peptide amphiphiles form one-dimensional nanofibers with comparable properties of known supramolecular polymers in water and can form copolymers with adjustable composition by addition of several components of different ratios.

In addition, Chapter 4 examines the kinetics of the supramolecular polymerization of a peptide amphiphile. The synthesis of a linear conjugate that can be functionalized with an organometallic complex, which serves as a probe and an assembly motif, is described. The particular focus of the evaluation is on the influence of the sample preparation of the compound and the content of organic solvent in aqueous medium of the polymerization. The systematic investigation of the concentration-dependent self-assembly shows a nucleation-elongation dominated mechanism of the supramolecular polymerization process. In addition, the particular influence of organic solvent additives in the aqueous solution was worked out.

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Supramolekulare Copolymerisation im wässrigen Medium.....	1
1.2	Fluoreszente Farbstoffe	8
1.3	Kinetik supramolekularer Polymerisationen.....	12
1.4	Dynamik supramolekularer Polymere.....	17
1.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	24
2	Motivation und Zielsetzung	31
3	Dynamik BTA-basierter supramolekularer Peptidamphiphile	33
3.1	Synthese des Dendrons	36
3.2	Synthese eines mannosefunktionalisierten Dendrons	41
3.3	Synthese eines „click“-baren Dendrons.....	49
3.4	Synthese der Peptidamphiphile.....	54
3.5	Synthese eines Peptidkonjugats zur Nonafunktionalisierung	69
3.6	Synthese der funktionalisierbaren Peptidamphiphile	78
3.7	Evaluierung der Peptidamphiphile.....	83
3.8	Fazit.....	139
4	Kinetik der Assemblierung von Au(I)-Metallopeptidamphiphilen.....	143
4.1	Synthese des Au(I)-Peptidamphiphils	145
4.2	Evaluierung der Assemblierungskinetik.....	148
4.3	Fazit.....	158
5	Zusammenfassung und Ausblick	159
6	Experimental Section.....	163
6.1	Methods.....	163
6.2	Synthesis.....	176
6.3	Solid phase peptide synthesis	229
7	Literaturverzeichnis	235
8	Danksagung.....	249
9	Analytikdaten/Anhang.....	251

Abkürzungsverzeichnis

A	Akzeptor	BOP	Benzotriazolyloxytris (dimethylamino)- phosphoniumhexafluoro- phosphat
Abs	Absorption		
abs.	absolut		
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid	BTA	Benzoltricarboxamid
AccPbFRET	Akzeptor- Photobleichung-Förster- Resonanzenergietransfer	BTC	1,3,5- Benzoltricarbonsäure, Trimesinsäure
AcO	Acetyl	BzIm	Benzimidazol
ADP	Adenosindiphosphat	calc.	berechnet
AF488	Alexa Fluor 488	CD	Circulardichroismus
AF647	Alexa Fluor 647	CH	Cyclohexan
Ahx	6-Aminohexansäure	CHCA	α -Cyano-4- hydroxyzimtsäure
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose	CLEM	<i>correlative light and electron microscopy</i> , korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie
APC	Allophycocyanin		
AR	<i>aspect ratio</i> , Seitenverhältnis	COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
Ar	Aromat	Cryo-EM	Kryo- elektronenmikroskopie
ATP	Adenosintriphosphat		
A β 40	Amyloid-beta 40	CuAAC	<i>copper-catalyzed azide- alkyne cycloaddition</i> , kupferkatalysierte Azid- Alkin-Cycloaddition
A β 42	Amyloid-beta 42		
BMDM	<i>bone marrow derived macrophages</i> , Knochenmark- Makrophagen	D	Donor
BME	β -Mercaptoethanol	DAD	Diodenarray-Detektor
Bn	Benzyl	DCC	<i>N,N'</i> - Dicyclohexylcarbodiimid
BnBr	Benzylbromid	DCM	Dichlormethan
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	DiPEA	Diisopropylethylamin
		DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid	FWHM	<i>full width at half maximum,</i> Halbwertsbreite
DMTST	Dimethyl(methylthio) sulfonium-triflat	GA	Glycolsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	GDP	Guanosindiphosphat
Dnd	Dendron	GIOx	Glucoseoxidase
dSTORM	<i>direct stochastic optical reconstruction microscopy</i>	Glu, E	L-Glutaminsäure
Dye	Farbstoff	GTP	Guanosintriphosphat
E	Energie	H	Wasserstoff
EA	Ethylacetat	HATU	2-(7-Azabenzotriazol-1- yl)-1,1,3,3- tetramethyluronium- hexafluorophosphat
EEDQ	2-Ethoxy-1- ethoxycarbonyl-1,2- dihydrochinoline	H-Brücke	Wasserstoffbrücken- bindung
EG	Ethylenglycol	HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)- 1,1,3,3- tetramethyluronium- hexafluorophosphat
Em	Emission	HDX	Wasserstoff/Deuterium- Austausch
ESI	Elektrospray-Ionisation	HFIP	1,1,1,3,3,3- Hexafluorisopropanol
EtOH	Ethanol	HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting,</i> Durchflusszytometrie	HMPTA	Hexamethyl- phosphorsäuretriamid
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy,</i> Fluoreszenzkorrelation- Spektroskopie	HOAt	1-Hydroxy-7- azabenzotriazol
Fl	Fluoreszenz	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
FLIM	<i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxy- carbonyl	HR	<i>high resolution,</i> hochauflösend
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>		
FRET	Förster- Resonanzenergietransfer		

HSQC	<i>heteronuclear quantum coherence</i>	<i>single</i>	NMM	N-Methylmorpholin
IC	innere Konversion		NMR	<i>nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz</i>
IR	Infrarot		OAc	Acetyl
ISC	<i>intersystem crossing</i>		OSu	Oxysuccinimid
LCST	<i>lower critical solution temperature</i>		P	Phosphoreszenz
LSCM	<i>laser scanning confocal microscopy</i>		PAINT	<i>point accumulation for imaging in nanoscale topography</i>
M	Multiplizität		PALM	<i>photoactivatable localisation microscopy</i>
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>		PB	Phosphatpuffer
Man	D-Mannose		PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
MD	<i>molecular dynamics</i>		pd	partiell deuterierte Spezies
MEA	Mercaptoethylamin, Cysteamin		PGA	O-Propargylglykolsäure
MeOH	Methanol		Phe, F	L-Phenylalanin
MF	Molekülformel		PI(3)K-SH3	Phosphoinositid-3-Kinase α -Substruktur
MHC	<i>major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex</i>		pos.	positiv
MPLC	<i>medium pressure liquid chromatography</i>		ppm	<i>parts per million</i>
MR	Mannoserezeptor		Pr	Propyl
MS	Massenspektrometrie		PSF	<i>point spread function, Punktspreizfunktion</i>
MW	Molekulargewicht		Py	Pyridin
Na-Asc	Natriumascorbat		PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
NDI	Napthalindiimid			
NHC	N-heterozyklisches Carben		quant.	Quantitativ
NHS	N-Hydroxysuccinimid		RESI	<i>resolution enhancement by sequential imaging</i>
NIS	N-Iodsuccinimid			

RNA	Ribonukleinsäure	TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies	TIS	Triisopropylsilan
RT, r.t.	Raumtemperatur	TMS	Trimethylsilyl
S	Singulett	TMU	1,1,3,3-Tetramethylharnstoff
sCy3	sulfo-Cyanin 3	TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
sCy5	sulfo-Cyanin 5	TOF	<i>time of flight</i>
SIM	<i>structured illumination microscopy</i>	Tos, Ts	Tosyl
SMLM	<i>single molecule localisation microscopy, Einzelmolekül-lokalisationsmikroskopie</i>	TPPA	Tripyrrolidino-phosphorsäuretriamid
SPPS	<i>solid phase peptid synthesis, Festphasen-Peptidsynthese</i>	TRIS, Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
SR	Schwingungsrelaxation	Trt	Trityl
STED	<i>stimulated emission depletion</i>	Trz	1,2,3-Triazol
STORM	<i>stochastic optical reconstruction microscopy</i>	TsCl	<i>para</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
T	Triplett	UPy	Ureidopyrimidinon
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)	US	Ultraschall
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie	UV	Ultraviolett
TFA	Trifluoressigsäure	vd	vollständig deuterierte Spezies
TFE	Trifluorethanol	Vis	visible, sichtbar
THF	Tetrahydrofuran	vol%, Vol.%	Volumenprozent
ThT	Thioflavin T	VraR	<i>vancomycin-resistance-associated regulator</i>
tht	Tetrahydrothiophen	wt%, Gew%	Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 Supramolekulare Copolymerisation im wässrigen Medium

Supramolekulare Polymere sind eindimensionale Aggregate, deren Monomere durch direktionale und reversible Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Ungleich der klassischen kovalenten Polymere werden die Monomere durch eine Vielzahl schwacher bis moderater, nichtkovalenter Wechselwirkungen gebildet.^[1,2] Zu diesen gehören der hydrophobe Effekt, Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken), Metallkoordination sowie elektrostatische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen.^[3,4]

Supramolekulare Polymerisationen spielen im menschlichen Organismus eine entscheidende Rolle. Filamente, die das Cytoskelett der Zelle darstellen, sind aus Proteinen gebildete supramolekulare Polymere. Sie erfüllen viele wichtige Zellfunktionen wie Motilität der Zellen, Erhalt und Stabilität der Zellform, intrazellulären Transport, Mitose und viele weitere.^[5-9] Actin ist dabei das am häufigsten auftretende Protein in eukaryotischen Zellen.^[7] Actinfilamente polymerisieren aus dem globulären Monomer G-Actin in die Mikrofilamente des F-Actins und bilden eine doppelkettige, helikale Bandstruktur. Alle F-Actin-Monomere sind entlang der Filamentachse gleich orientiert, wodurch die Filamentstruktur polarisiert ist.^[2] Das Polymer besitzt deshalb ein Plusende und ein Minusende.^[10] G-Actin kann je ein Adeninnukleotid in seine Struktur aufnehmen. Dabei polymerisiert Adenosintriphosphat (ATP)-tragendes G-Actin schneller an das Plusende der Filamente als Adenosindiphosphat (ADP)-tragendes Actin. Die Assoziation an das Minusende ist für beide Proteine langsamer. Die Elongation der Actinfilamente findet deshalb dominant am Plusende durch ATP-Actin statt. Das ATP des F-Actins wird langsam zu ADP hydrolysiert, wodurch die thermodynamischen Eigenschaften verändert werden und ADP-Actin am Minusende depolymerisiert. Dieses Phänomen ist als Treitmühleneffekt bekannt und ist für die Motilität und Plasmaströmung der Zelle verantwortlich.^[8,11] Der dynamische Charakter dieser supramolekularen Biopolymere sowie die angepassten kinetischen Eigenschaften der Polymerisation in Aktinfilamenten sind entscheidend für die Funktion dieser filamentösen Struktur. In der Zelle werden die kinetischen und thermodynamischen Parameter der supramolekularen Polymerisation durch regulatorische Proteine verändert und kontrolliert, wodurch Aktinfilamente eine weite Bandbreite biologischer Funktionen erfüllen.^[7-9]

Ein weiteres Filament des Cytoskeletts der Zelle sind die Mikrotubuli. Sie werden aus Heterodimeren des Proteins α - und β -Tubulin gebildet. Sie lagern sich ebenfalls gerichtet in einer *head-to-tail* Anordnung alternierend zu oligomeren Protofilamenten zusammen, die zu äußerst rigiden polymeren Hohlzylindern aggregieren. Durch diese Anordnung besitzen die Mikrotubuli ebenfalls eine polarisierte Struktur mit einem Plus- und einem Minusende. Tubulin trägt im Gegensatz zu Actin entweder das Guaninnukleotid Guanosintriphosphat (GTP) oder Guanosindiphosphat (GDP).^[2] Mikrotubuli sind extrem

Einleitung

dynamische Polymere die ebenso bevorzugt über das Plusende polymerisieren. Die Depolymerisation wird dabei auch über die Hydrolyse von GTP zu GDP gesteuert. Die Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung der Dimere von einer geraden zu einer geneigten Konformation. Die Struktur wird durch die GTP-Dimere am Plusende jedoch in einer geraden Konformation gehalten. Wird die Konzentration der GTP-Dimere in dieser GTP-Kappe jedoch zu gering, depolymerisiert der Mikrotubulus rapide (engl. *catastrophic breakdown*).^[12] Dieses interessante Verhalten wird als „dynamische Instabilität“ bezeichnet und stellt eine eingebaute Fragilität der Struktur dar. Sie ist vermutlich essenziell für die biologischen Aufgaben der robusten und langen Polymere.^[13]

Neben diesen essenziellen Filamenten des Cytoskeletts spielt die supramolekulare Polymerisation aber auch in der Bildung pathogener Aggregate wie den Amyloidfibrillen eine entscheidende Rolle. Sie sind fibrillare Polypeptide in einer *cross-β*-Konformation, in der sich die Polypeptide senkrecht zur Richtung der Fibrillen anlagern.^[14] Amyloide Strukturen werden durch fehlgefaltete Proteine verursacht und sind mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert wie Alzheimer, Parkinson, aber auch Typ II Diabetes.^[14,15] Die supramolekulare Polymerisation dieser Strukturen führt zur Bildung unlöslicher Polypeptide, die im Gewebe abgelagert werden. Alzheimer ist dabei die Hauptursache für Demenz und entwickelt sich zur teuersten, tödlichsten und belastendsten Krankheit dieses Jahrhunderts.^[16] Sie zeigt die besondere Relevanz des Verständnisses supramolekularer Polymerisationen zur Prävention und Entwicklung potenzieller Therapien.

In der Chemie spielen supramolekulare Polymere circa seit der Jahrtausendwende eine zunehmend große Bedeutung. Einen Meilenstein hierin konnten MEIJER *et al.* mit der Entwicklung von Ureidopyrimidinon (UPy)-basierten supramolekularen Polymeren erzielen.^[17] Sie besitzen durch die Bildung selbstkomplementärer vierfacher Wasserstoffbrückenbindungen eine außerordentlich hohe Assoziationskonstante von $K_{\text{Dim}} = 6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ in CHCl_3 .^[18] In Form von bifunktionellen Derivaten polymerisieren die selbstkomplementären Einheiten zu langen Ketten. Bereits 1990 zeigten LEHN *et al.* die Selbstassemblierung zweier komplementärer bifunktioneller Komponenten durch dreifache Wasserstoffbrückenbindung in strikt alternierende lineare Ketten in einer flüssigkristallinen Phase.^[19] Aber auch die direkte Stapelung diskotisch geformter Verbindungen führt zur Bildung von eindimensionalen supramolekularen Polymeren, wie AIDA *et al.* zeigten.^[20] Die hohe Relevanz der supramolekularen Polymere ist auf ihren dynamischen Charakter zurückzuführen, der sie potenziell mit responsiven, selbstheilenden und adaptiven Eigenschaften ausstattet.^[21]

Supramolekulare Polymerisationen in Wasser bringen einzigartige Vor- und Nachteile gegenüber organischen Lösungsmitteln mit sich. Wasser ist sowohl ein guter H-Brückendonator als auch -akzeptor. H-Brücken zwischen den Monomeren in supramolekularen Polymeren stehen in Konkurrenz mit dem Lösungsmittel. Hierfür wird die Abschirmung der H-Brückenstrukturmotive in einer hydrophoben Tasche benötigt.^[22,23] Auf der anderen Seite stellt der hydrophobe Effekt eine bedeutend starke Wechselwirkung dar und liefert für einige Strukturen die Haupttriebkraft der

Assemblierung.^[22,24] Die Wasserkompatibilität der supramolekularen Polymere ist die Voraussetzung für die Biokompatibilität der Materialien im Allgemeinen. Es macht sie zu erfolgsversprechenden Kandidaten für biomedizinische Anwendungen.

Auf Grundlage der nichtkovalenten Wechselwirkungen bilden strukturell ähnliche Monomere häufig Copolymere aus mindestens zwei unterschiedlichen Monomerbestandteilen. Liegen mehrere Bestandteile vor, ergeben sich unterschiedliche Möglichkeiten der supramolekularen Polymerisation dieser Monomere. Eine schematische Darstellung der möglichen Copolymere ist in Abbildung 1.1 gezeigt. Polymerisieren die Monomere ausschließlich oder deutlich bevorzugt mit sich selbst, werden Homopolymere in einem System erhalten, in dem sich die Monomere selbst sortieren und nur mit der eigenen Spezies polymerisieren (engl. *self-sorted*)^[25,26]. Tritt keine Wechselwirkung bevorzugt auf, bildet sich eine statistische Anordnung aus. Geschicktes Design der assemblierenden Bausteine der supramolekularen Copolymerisation kann zu alternierenden^[27,28] und periodischen^[29,30] Copolymeren führen. In lebenden supramolekularen Polymerisationen können durch sequenzielle Zugabe oder durch Impfen geblockte supramolekulare Polymere entstehen^[31,32].

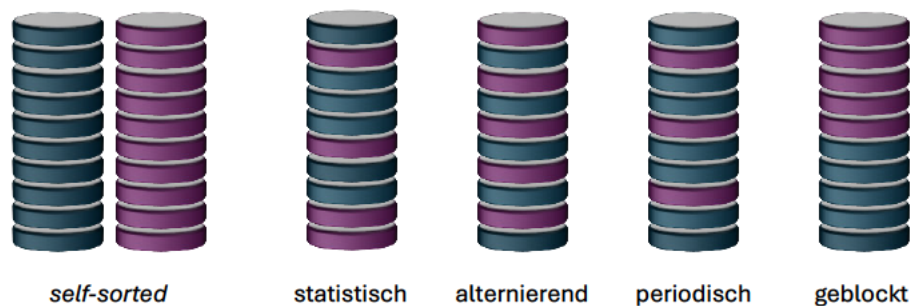


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Arten eindimensionaler supramolekularer Copolymere.

Welche Art der Polymerisation auftritt ist meist vom Design der Struktur der Monomere abhängig. Viele Veröffentlichungen zeigen hierfür die Bemühungen zur Aufklärung von Design-Prinzipien auf, um die Art der Copolymerisation voraussagen und ausnutzen zu können.^[33–38] Abhängig von der Durchführung der supramolekularen Polymerisation können aber auch verschiedene Fälle mit dem selben multikomponenten Monomersystem entstehen. Im Jahr 2020 stellten GEORGE *et al.* ein System aus zwei Naphthalindiimid (NDI)-Derivaten vor, das abhängig von der Durchführung der supramolekularen Polymerisation statistische, geblockte oder *self-sorted* Copolymere erzeugen kann.^[39] Es stellt ein Beispiel der Sequenzkontrolle in supramolekularen Copolymerisationen dar.

Copolymerisation mehrerer Komponenten in supramolekularen Systemen ist zudem eine geeignete Methode zur Einstellung der Eigenschaften der resultierenden Copolymere. Zum einen bietet sich die Möglichkeit der Inkorporation mehrere Monomere mit unterschiedlichen Aufgaben. Zum anderen können so aber auch supramolekulare Copolymere erhalten werden, die bessere Eigenschaften haben als ein

Einleitung

Homopolymersystem der gleichen Bestandteile. In 2018 veröffentlichten PALMANS, MEIJER *et al.* ein Copolymersystem auf Basis von Benzoltricarboxamid (BTA) mit synergistischem Effekt.^[40] Sie beschreiben die Copolymerisation von nBTA mit linearen ethylenglykolbasierten Seitenketten und dBTA mit dendronisierten Seitenketten. Die Strukturformeln der Monomere sind in Abbildung 1.2 dargestellt. Das lineare nBTA homopolymerisiert in lange Nanostäbchen in Wasser, während das dendronisierte dBTA allein lediglich kleine sphärische Aggregate bildet. Werden beide Moleküle zu gleichen Anteilen in einer Copolymerisation verwendet, kann für die Mischung nBTA:dBTA von 2:1 ebenfalls lange Nanostäbchen gefunden werden. Wird die Dynamik der resultierenden Strukturen mittels Wasserstoff/Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS) untersucht, zeigten MEIJER *et al.*, dass in der Copolymermischung die Amidprotonen weniger stark gegenüber dem Lösungsmittel D₂O exponiert sind als im Homopolymer von nBTA, was auf eine stabilere Inkorporation der Monomere im Copolymer hinweist.^[40]

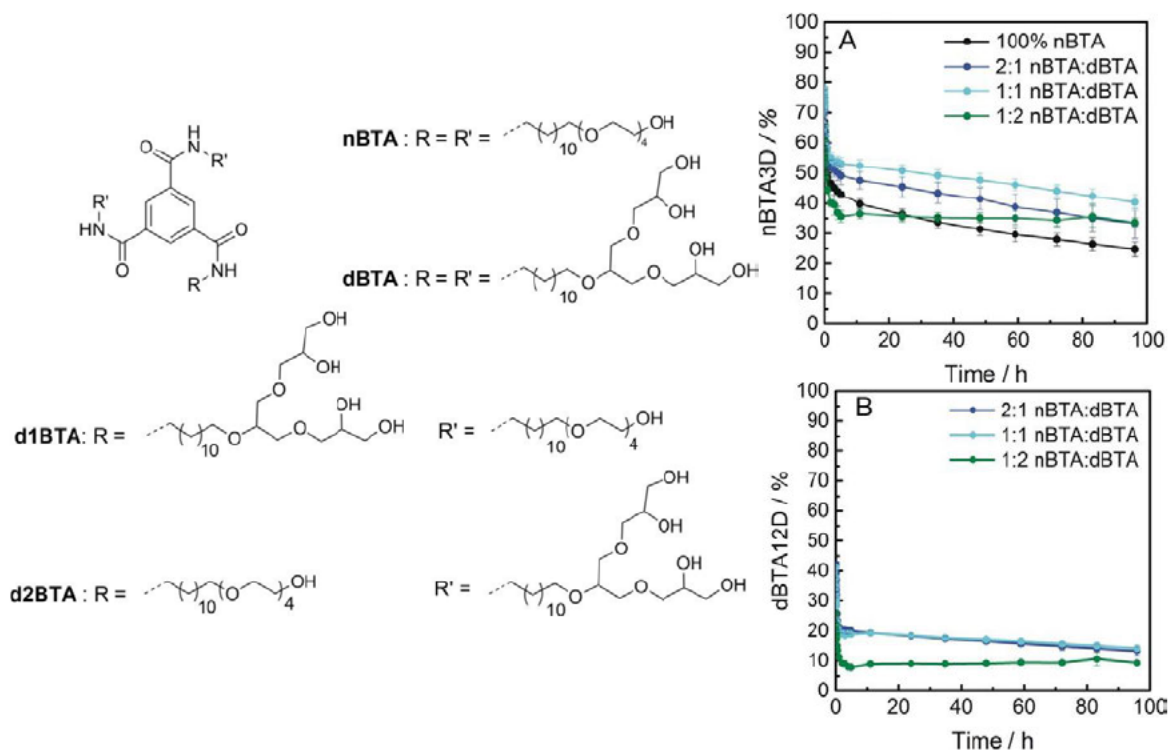


Abbildung 1.2: Strukturformeln der BTA-basierten supramolekularen Amphiphile. A: Anteil der dreifach deuterierten Spezies des Moleküls nBTA mit der Zeit des HDX-MS-Experiments. B: Anteil der zwölfmal deuterierten Spezies des Moleküls dBTA mit der Zeit des HDX-MS-Experiments. Abbildung adaptiert nach Referenz^[40] mit der Genehmigung von *John Wiley and Sons*.

Wird die Dynamik des Copolymersystems nBTA:dBTA der Zusammensetzung 2:1 mit einem Homopolymer des Moleküls d1BTA (Abbildung 1.2) verglichen, welches aus den gleichen Anteilen linearer und dendronisierter Seitenketten besteht, zeigten die Autorinnen und Autoren die langsamere Dynamik und die erhöhte Abschirmung der inneren Amide in der stabileren Copolymerarchitektur gegenüber dem Homopolymer. Molekulardynamik (MD)-Simulationen wiesen auf eine Verbesserung der Regularität der

Packung der Monomere innerhalb der Copolymerstäbchen gegenüber der Homopolymere hin.^[40] Das Experiment zeigte so eindrucksvoll, dass durch die Einbettung der unterschiedlichen Monomere Copolymere gebildet werden konnten, die stabiler sind als beide Homopolymere allein.

In ähnlicher Art und Weise sorgt das *Sergeant and Soldier*-Prinzip dafür, dass durch Zugabe einer kleinen Menge einer chiralen Komponente eine achirale Komponente die chirale Information in Copolymeren amplifiziert.^[41] Dies wurde beispielsweise in diskotischen Bipyridinderivaten gezeigt.^[42] Die Zugabe von nur 2,5 % des chiralen Bipyridinderivats zu einem achiralen Analogon führt zu einem starken Cottoneneffekt gemessen in Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie. Im Gegensatz zu nicht-assemblierten kleinen Molekülen, in denen der spezifische Drehwert linear vom Verhältnis der beiden Enantiomere abhängt, wird hier für die Mischung aus 10 % der chiralen Komponente und 90 % der achiralen sogar ein Cottoneneffekt erhalten, der den der reinen chiralen Komponente übersteigt.^[42] Diese Beobachtung zeigt erneut die Verbesserung der Stapelung der Copolymere gegenüber den Homopolymeren. Die Literatur führt zahlreiche Beispiele dieser Amplifikation in Copolymerensystemen supramolekularer Architekturen wie in Oligophenylenvinylenen^[43], Triphenylaminen^[44], Porphyrinaggregaten^[45] und einigen weiteren an.

Neben der Verbesserung der Eigenschaften der resultierenden Copolymere können durch die multikomponente Copolymerisation mehrerer Monomere unterschiedlicher Responsivitäten eingeführt werden. Dies kann in supramolekularen Peptidamphiphilen durch die Einbettung verschiedener Aminosäuren realisiert werden. BESENIUS *et al.* zeigten, dass in Copolymerensystemen C₃-symmetrischer Peptidamphiphile mit Glutaminsäure- und Lysinaminosäuren lineare Nanostäbchen erhalten werden können, die sich durch Regulation des pH-Werts zwischen Homopolymeren und Copolymeren schalten lassen.^[46] Durch das zusätzliche Einbringen von Methionin kann darüber hinaus die Depolymerisation durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) induziert werden.^[47] Durch thermoresponsive Seitenketten in diesen Strukturen kann sogar die Temperatur als Stimulus eingeführt werden.^[48]

Ein weiterer eleganter Weg zur Verwendung supramolekularer multikomponenten Copolymere ist die Copolymerisation von strukturell gleichen Monomereinheiten unterschiedlicher Funktionalisierung. PERRIER *et al.* verwendeten wasserlösliche Cyclopeptid-Polymerkonjugate, die mit unterschiedlichen hydrophoben Farbstoffen funktionalisiert sind, und copolymerisierten diese in stabile eindimensionale Nanostäbchen.^[49] Diese Modifikation der Monomere erlaubt die molekular separierte Ausrichtung der Farbstoffe entlang des supramolekularen Polymers (Abbildung 1.3). Durch einen effizienten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen den Farbstoffen zeigt sich das Polymer als effizienter künstlicher Lichtsammelkomplex mit einer Quantenausbeute von 30 % im wässrigen Medium.^[49]

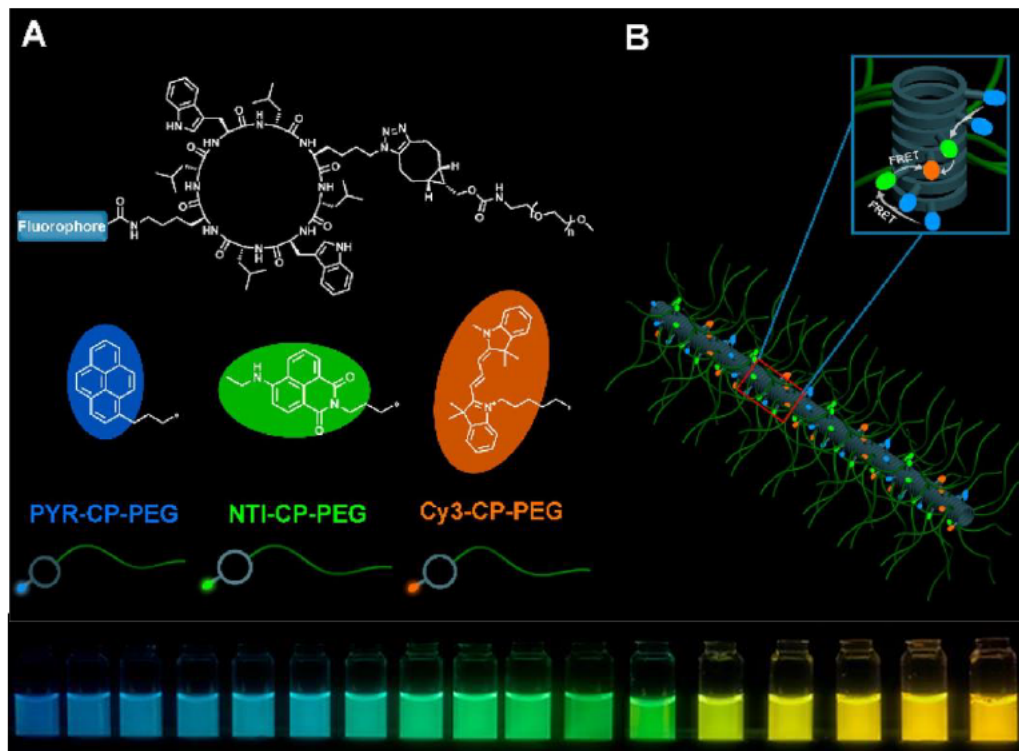


Abbildung 1.3: A: Struktur der funktionalisierten Cyclopeptid-Polymerkonjugate mit verschiedenen Fluorophoren. B: Schematische Darstellung der gebildeten Nanoröhren und Emissionsfarben der Lösungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen. Abbildung adaptiert nach Referenz^[49] mit der Genehmigung von *American Chemical Society*.

Besonders relevant wird diese Strategie für die Bildung von multikomponenten supramolekularen Polymeren mit bioaktiver Beladung.^[50,51] Durch einfache synthetische Strategien können so bioaktive Copolymere erzeugt werden, die nicht im großen Maße im Einbau der Monomere und der gebildeten Morphologie beeinflusst werden.^[51] BESENIUS *et al.* verwenden diese Methode zur Gestaltung einer modularen, multikomponenten Plattform für die Entwicklung potenter Antitumorvakzine^[52,53] und der Immunisierung gegenüber bakteriellen Pathogenen. Durch die Coassemblierung der Komponenten gelingt die multivalente Adressierung und die Präsentation multipler immunogener Epitope, die essenziell für eine starke Immunantwort und langfristige Immunisierung sind.^[54] Diese vollsynthetischen, virusartigen^[55] Nanostäbchen bilden eine flexible Plattform für die Copräsentation der Vakzinkomponenten auf der Oberfläche (Abbildung 1.4). Durch einfaches Mischen der Monomere können so hoch definierte multifunktionale Copolymere erzeugt werden, die zum Screening und zur Optimierung der Vakzinkomposition verwendet werden können.^[56]

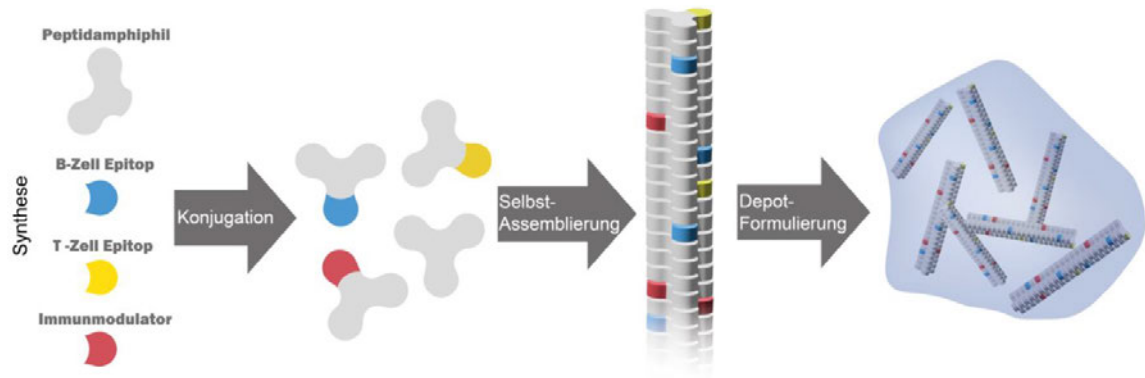


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Konjugation und Formulierung der modularen multikomponenten Plattform supramolekularer Copolymere für die biomedizinische Anwendung. Abbildung adaptiert nach Referenz^[53] mit der Genehmigung von MORITZ URSCHBACH.

1.2 Fluoreszente Farbstoffe

Einige etablierte Untersuchungsmethoden dynamischer supramolekularer Systeme benötigen die Einführung einer Sonde, um ein messbares Signal zu generieren, das zur Auswertung der gesuchten Größe verwendet werden kann. Häufig kommen hierfür fluoreszente Farbstoffe zum Einsatz.^[57-64] In den biologischen Wissenschaften zählen Fluoreszenzmethoden zu den primär genutzten Werkzeugen in Untersuchungen. Die Detektion der Fluoreszenz ist einfach und hochempfindlich, weshalb es sie zu einer attraktiven Anwendung macht.

Elektronische Übergänge von fluoreszenten Farbstoffen durch elektromagnetische Strahlung werden gewöhnlich in einem Jablonski-Diagramm dargestellt, wie es in Abbildung 1.5 illustriert ist. Es zeigt die energetischen Zustände der beteiligten Partner auf einer Energieachse und veranschaulicht die möglichen Prozesse der Übergänge. Fluoreszente organische Farbstoffe sind in der Regel konjugierte aromatische Verbindungen, deren Elektronenübergänge mit elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Bereich angeregt werden können. Die Absorption (**Abs**) ist durch den senkrechten Pfeil aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in den ersten S_1 oder zweiten elektronisch angeregten Singulettzustand S_2 dargestellt. Die Absorption wird fundamental durch das LAMBERT-BEER'sche Gesetz (Gleichung (1.1)) beschrieben.^[65] Hier kann die wellenlängenabhängige Absorption $Abs(\lambda)$ durch den Extinktionskoeffizienten einer Substanz κ , der Konzentration der Substanz c und der Pfadlänge des Lichts durch das Medium d beschrieben werden. Der Intensitätsverlust durch Absorption einer solchen Probe wird durch den negativen dekadischen Logarithmus des Verhältnisses aus der Intensität nach (I) und vor (I_0) dem Durchgang durch die Probe beschrieben.

$$Abs(\lambda) = \kappa \cdot c \cdot d = -\log \frac{I}{I_0} \quad (1.1)$$

Nach dem Franck-Condon-Prinzip findet die Änderung der elektronischen Zustände durch die geringe Elektronenmasse deutlich schneller statt als die Bewegung der Atomkerne.^[66] Durch die Veränderung des Dipolmoments während der Absorption liegt der elektronisch angeregte Zustand nicht im vibratorischen Grundzustand des elektronisch angeregten Zustands vor. Mittels Schwingungsrelaxation (**SR**) gibt der vibratorisch angeregte Zustand strahlungslos Energie an seine Umgebung ab und erreicht schnell den vibratorischen Grundzustand des elektronisch angeregten Zustands. Der Übergang des elektronisch angeregten Zustands in den Grundzustand findet spontan statt und wird als Fluoreszenz (**Fl**) bezeichnet.^[67] Da die Schwingungsrelaxation im Picosekundenbereich stattfindet und die Fluoreszenz in der Regel im Bereich von Nanosekunden, findet die Fluoreszenz aus dem vibratorischen Grundzustand des elektronisch angeregten Zustands statt.^[68] Dies wird als KASHA-Regel bezeichnet. Typische Fluoreszenzlebensdauern für organische Farbstoffe liegen zwischen 1 und 10 ns.^[69] Da die Relaxation durch Fluoreszenz erneut mit einer Änderung des

Dipolmoments einhergeht und dieser elektronische Prozess nach dem Franck-Condon-Prinzip ohne Änderung der Atomposition einhergeht, findet die Fluoreszenz ebenfalls in einen vibratorisch angeregten Zustand des elektronischen Grundzustands statt. Die Energie des freiwerdenden Photons ist somit immer geringer als die des absorbierten Photons für die Absorption und wird als STOKES-Verschiebung bezeichnet.^[67]

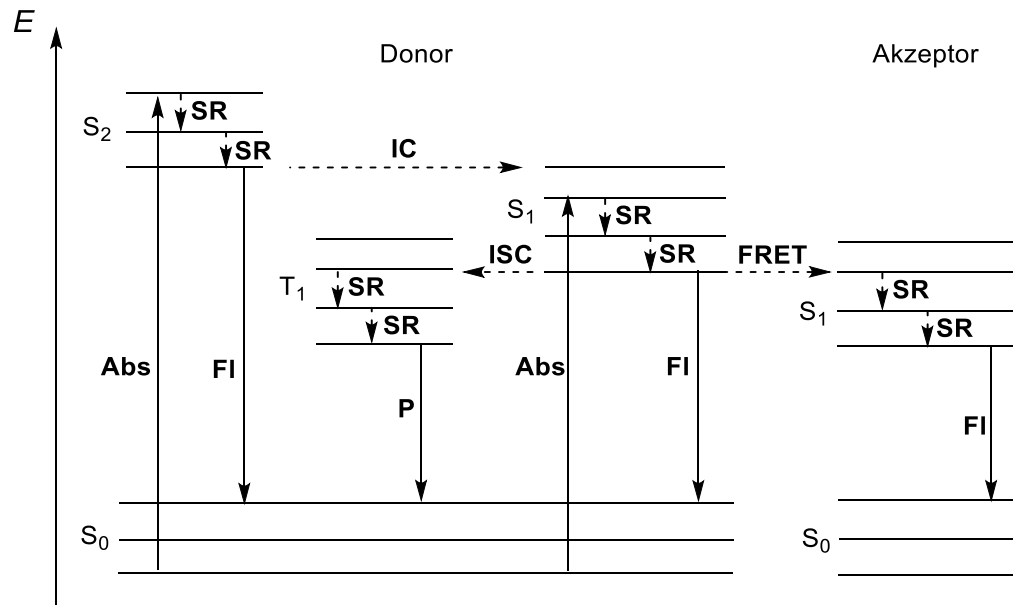


Abbildung 1.5: Jablonski-Diagramm der Energiezustände in fluoreszenten Farbstoffen. Die Prozesse die zum Übergang der energetischen Niveaus der Singulett- (S) und Triplettzustände (T) führen sind fett dargestellt. Diese beinhalten die Absorption (**Abs**), die Fluoreszenz (**FI**), die Phosphoreszenz (**P**), die Schwingungsrelaxation (**SR**) und die isoenergetischen Prozesse der inneren Konversion (**IC**), dem *intersystem crossing* (**ISC**) und dem Förster-Resonanzenergietransfer (**FRET**).

Existieren andere isoenergetische Zustände zum angeregten Zustand, können strahlungslose Übergänge stattfinden, die im Jablonski-Diagramm (Abbildung 1.5) als waagerechte, gestrichelte Pfeile dargestellt sind. Findet der Übergang im selben Spinsystem statt, spricht man von innerer Konversion (**IC**). Bei Wechsel des Spinsystems tritt ein *intersystem crossing* (**ISC**) auf.^[67] Hierbei kann der Triplettzustand T₁ besetzt werden, aus dem spontan Phosphoreszenz (**P**) in den Grundzustand stattfindet. Phosphoreszenz zählt wie die Fluoreszenz zu den strahlenden Relaxationen unter Abgabe eines Photons, ist aber ein spinverbotener Übergang und erfolgt deshalb deutlich langsamer.^[67] Alle diese Prozesse verlaufen mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit und werden durch eine spezifische Zerfallsratenkonstante k charakterisiert.^[69]

Ein weiterer strahlungsloser Übergang kann in Gegenwart eines geeigneten Akzeptors stattfinden. Bei genügend geringer Entfernung des Donors und Akzeptors kann durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung die Energie des Donors auf den Akzeptor übertragen werden. Der Übergang ist strahlungslos und wird als Förster-Resonanzenergietransfer (**FRET**) bezeichnet. Dabei kehrt der Donor in den Grundzustand zurück und der Akzeptor

Einleitung

wird elektronisch angeregt. Diese Wechselwirkung setzt den Überlapp des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors voraus. Zudem hängt sie durch den Charakter der Dipol-Dipol-Wechselwirkung stark vom Abstand und von der Orientierung der Übergangsdipolmomente des Donors und Akzeptors zueinander ab. Die Rate des FRET k_{FRET} kann durch Gleichung (1.2) beschrieben werden.^[67]

$$k_{\text{FRET}} = \frac{9000 \cdot \ln(10)}{128 \cdot \pi^5 \cdot N_A} \cdot \frac{1}{\tau_D} \cdot \frac{1}{r^6} \cdot \kappa^2 \cdot \frac{Q_D}{n^4} \cdot J \quad (1.2)$$

Dabei stellt τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donors dar, r den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, κ den Orientierungsfaktor, der die Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander beschreibt, Q_D die Quantenausbeute des Donors, n den Brechungsindex des Mediums und J das Überlappungsintegral des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Aus Gleichung (1.2) geht hervor, dass sich die Rate des Energietransfers mit der sechsten Potenz des Abstands zwischen Donor und Akzeptor ändert. Die Effizienz des Energietransfers kann damit durch Gleichung (1.3) beschrieben werden.^[67]

$$E_{\text{FRET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1.3)$$

Dabei ist R_0 der Förster-Radius, der den Abstand zwischen Donor und Akzeptor darstellt, bei dem 50 % der Energie des Donors an den Akzeptor durch FRET übertragen wird. Typische Förster-Radien liegen im Bereich zwischen 3 und 6 nm, weshalb der FRET für die Messung des Abstands zwischen Molekülen oder speziellen Positionen von Proteinen und anderen Biomakromolekülen verwendet werden kann.^[67] Durch die Fähigkeit der Abstandsmessung im Nanometerbereich wird die Technik auch als „spektroskopisches Lineal“ bezeichnet.^[70] Durch die Abnahme mit der sechsten Potenz des Abstands r wird FRET auch häufig für Anwendungen verwendet, für die der genaue molekulare Abstand unerheblich ist und nur die räumliche Nähe berücksichtigt wird.^[71-74]

Eine weitere fundamentale Eigenschaft von Fluorophoren entsteht durch die spontane Fluoreszenz aus dem angeregten Zustand. Dabei beschreibt die Fluoreszenzlebensdauer τ_{Fl} die mittlere Zeit, die das Fluorophor im angeregten Zustand verbleibt, bevor es durch einen der zuvor beschriebenen Prozesse in den Grundzustand übergeht. Die Lebensdauer des angeregten Zustands ist reziprok proportional zur Zerfallsratenkonstante $\tau = \frac{1}{k}$.^[69] Hierbei sind in k alle strahlenden k_r und strahlungslosen k_{nr} Prozesse zusammengefasst, die den elektronisch angeregten Zustand entvölkern. So kann der Nenner als Summe aller Zerfallsratenkonstanten in Gleichung (1.4) beschrieben werden.^[67]

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{\text{nr}}} = \frac{1}{k_{\text{Fl}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{FRET}} + \dots} \quad (1.4)$$

So nimmt die Fluoreszenzlebensdauer mit der Rate der Fluoreszenz k_{Fl} , der inneren Konversion k_{IC} , des *intersystem crossing* k_{ISC} und weiteren Prozessen ab. In Anwesenheit eines Akzeptors spielt zusätzlich die Rate des Energietransfers k_{FRET} eine Rolle und kann die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors entscheidend verringern.

1.3 Kinetik supramolekularer Polymerisationen

Das Wachstum supramolekularer Polymere kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. Neben dem kooperativen Mechanismus wird der isodesmische und der Ring-Ketten-Mechanismus diskutiert.^[1] Auf die Letzteren soll in dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Der interessierte Leser sei auf eine Reihe Übersichtsartikel und Publikationen verwiesen.^[1,38,75,76] Kooperative supramolekulare Polymerisationen verlaufen über zwei Stufen. In einem ersten Schritt bildet sich aus n_c Monomeren ein Nukleus aus mit der Assoziationskonstante K_n . Es schließt sich der zweite Schritt der Elongation an. Hierbei werden weitere Monomere an den Nukleus angelagert mit der Assoziationskonstante der Elongation K_e .^[1] Dieser Mechanismus ist schematisch in Abbildung 1.6 A dargestellt. Hierbei ist die Nukleation in der Regel energetisch ungünstig, während die Elongation mit einem Energiegewinn einhergeht (Abbildung 1.6 B).

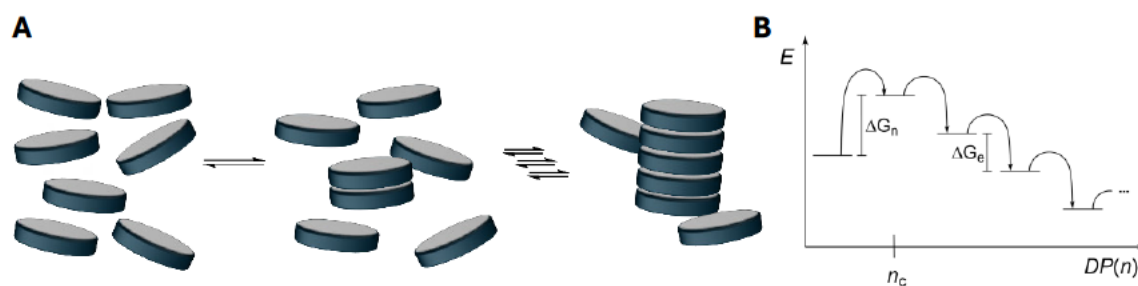


Abbildung 1.6: A: Schematische Darstellung des kooperativen Mechanismus supramolekularer Polymerisationen. B: Energiediagramm der Änderung der freien Enthalpie ΔG für die zwei Stufen des kooperativen Mechanismus. Frei adaptiert nach Referenz^[38] mit der Genehmigung von *Royal Society of Chemistry*.

Da die Assoziation der Monomere in supramolekularen Polymeren ausschließlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen stattfindet, ist jeder der Polymerisationsschritte eine Gleichgewichtsreaktion. Die Polymerisation findet häufig über eine Vielzahl an Mechanismen statt. Diese können in primäre und sekundäre Mechanismen eingeteilt werden. Zu den primären Mechanismen gehört die Nukleation mit einer Ratenkonstante k_n , in der aus einer Anzahl von n_c Monomeren ein Keim der kritischen Nukleationsgröße n_c entsteht. Außerdem die Elongation mit der Ratenkonstante k_+ , die die Anlagerung eines Monomers an das supramolekulare Polymer beschreibt und der umgekehrte Prozess der Dissoziation, in der ein im Polymer assoziiertes Monomer mit einer Rate k_- aus dem Polymer dissoziiert.^[77]

Zu den sekundären Prozessen gehören unter anderem die Fragmentierung und die sekundäre Nukleation. Bei der Fragmentierung löst sich die Bindung zwischen zwei Monomeren innerhalb der Polymerkette mit der Ratenkonstante k_{frag} und zwei neue kürzere Ketten entstehen. In einem Ereignis der sekundären Nukleation bildet sich ein polymerisationsfähiger Keim durch Assoziation von n_2 Monomeren auf der Oberfläche bereits gebildeter Polymere mit einer Rate k_{n2} .^[78] Weitere Mechanismen sind diskutiert und deren kinetische Evaluierung ist Gegenstand gegenwärtiger Forschung.^[79-82]

In den primären Prozessen der Elongation und Dissoziation bleibt die Anzahl polymerisationsfähiger Kettenenden gleich. Bei der Fragmentierung hingegen entstehen aus zwei wachstumsfähigen Enden vier neue. Im Gegensatz zu der primären Nukleation hängen sekundäre Prozesse nicht nur von der Monomerkonzentration ab, sondern auch von der Konzentration der bereits gebildeten Polymere. So führen sekundäre Prozesse zum exponentiellen Anstieg der aggregierten Masse in einem autokatalytischen Prozess.^[78] Eine ausführliche kinetische Beschreibung aller Mechanismen ist komplex. Sie beinhaltet nicht-linear gekoppelte Differentialgleichungen für jede Kette der Länge i , um die Änderung der Konzentration dieser Spezies mit der Zeit zu verfolgen. Einfacher ist es jedoch nur die zentralen Momente der Aggregatgrößenverteilung zu betrachten. Das nullte und erste zentrale Moment der Aggregatgrößenverteilung ist die Aggregat-Anzahlkonzentration $P(t)$ bzw. die Aggregat-Massenkonzentration $M(t)$.^[78] Beide Größen sind Observablen die über die mittlere Aggregatkettenlänge $\mu(t) = \frac{M(t)}{P(t)}$ verknüpft sind.

Für die Untersuchung fibrillarer Proteinaggregate kann $M(t)$ beispielsweise direkt durch Lichtstreuung^[83,84], durch photospektrometrische Messung der Thioflavin T-Interaktion^[85] oder sogar sondenfrei unter Ausnutzung der intrinsischen Autofluoreszenz von Tryptophan innerhalb der Proteine^[86] gemessen werden. Die Polymerisationskinetik folgt im Allgemeinen einem sigmoidalen Kurvenverlauf. Charakteristisch in diesem Verlauf ist die Halbwertszeit der Aggregation $t_{1/2}$, die die Zeit beschreibt, bei der die Hälfte der Konzentration der Polymere erreicht ist. Das Skalierungsverhalten der Halbwertszeit $t_{1/2}$ mit der Monomerkonzentration m_0 der Polymerisation liefert Rückschlüsse auf die dominanten Mechanismen der Polymerbildung, durch Analyse des Potenzgesetzes $t_{1/2} \propto m_0^\gamma$. Der Exponent γ beschreibt hierbei, wie die Halbwertszeit $t_{1/2}$ mit der Monomerkonzentration m_0 skaliert. Da alle Mechanismen der Polymerisation nebeneinander stattfinden und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ beeinflussen, fließen alle Faktoren in das Skalierungsverhalten ein. In einer doppellogarithmischen Auftragung von $t_{1/2}$ gegen m_0 wird der Exponent γ als Steigung der Geraden erhalten. Wird jedoch eine Krümmung in der Auftragung gefunden, tritt ein Skalierungsexponent γ auf, der von der Monomerkonzentration abhängig ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Auswahl, welcher Mechanismus der Prozesse dominiert, ebenfalls konzentrationsabhängig ist. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

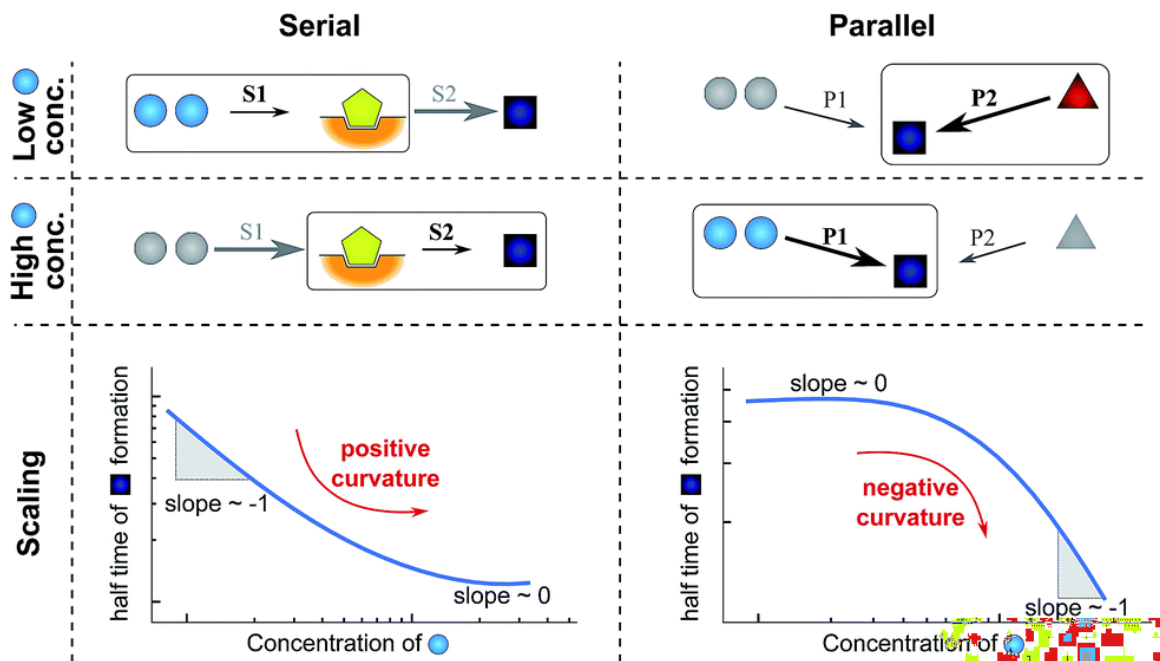


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der konkurrierenden Prozesse in der Polymerisation fibrillärer supramolekularer Polymere in einer seriellen Reaktionsfolge (*Serial*) und einer parallelen Reaktion (*Parallel*) bei niedrigen (*Low conc.*) und hohen Monomerkonzentrationen (*High conc.*). Die Krümmung (*curvature*) des Skalierungsexponenten ist durch die Steigung (*slope*) in den doppellogarithmischen Graphen dargestellt. Abbildung adaptiert nach Referenz^[78] mit der Genehmigung von *Royal Society of Chemistry*.

MEISL *et al.* haben in diesem Kontext die Polymerisation von monomerem Insulin untersucht.^[78] Die konzentrationsabhängige Polymerisationskinetik wurde mittels ThT-Test zeitaufgelöst gemessen und mit *Amylofit*^[87] durch die globale Anpassung der Daten analysiert. Die Änderung des Skalierungsexponenten γ deutet auf einen Sättigungsprozess mit steigender Monomerkonzentration hin (Abbildung 1.8 A). Durch die Wahl der Modellgleichungen für die Anpassung der Daten führen die Autorinnen und Autoren diesen Effekt auf die Sättigung des Elongationsprozesses zurück. Solch ein serieller Prozess kann Folge einer Adsorption des Monomers an das Polymerende sein, an die sich nachfolgend eine konformationelle Umorientierung des Monomers zur Inkorporation in das Polymer anschließt.^[88–90] Bei geringen Konzentrationen ist die Adsorption des Monomers an das Polymerende langsam und wird beschleunigt mit steigender Monomerkonzentration. Ist die Geschwindigkeit der initialen Adsorption größer als die darauffolgende konzentrationsunabhängige Inkorporation, sättigt sich die Geschwindigkeit der Elongation.

In einer weiteren Studie konnten MEISL *et al.* einen solchen Sättigungseffekt auf die sekundäre Nukleation in der Polymerisation des Peptids Amyloid-beta 40 (A β 40) zurückführen.^[91] Hier wird der serielle Prozess in der anfänglichen konzentrationsabhängigen Anlagerung des Monomers an die Polymeroberfläche, gefolgt von einer konzentrationsunabhängigen Umorientierung und Abtrennung des neu

gebildeten Keims, postuliert. Die Krümmung der doppellogarithmischen Auftragung für diesen Fall ist in Abbildung 1.8 B gezeigt.

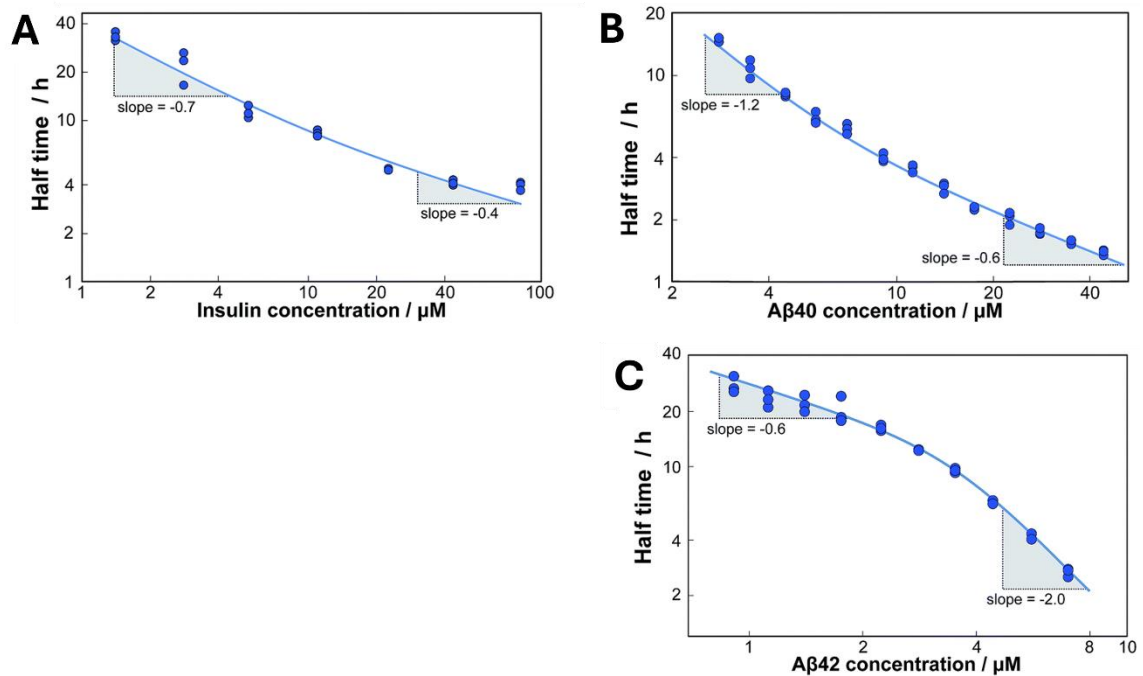


Abbildung 1.8: Experimentelle Beispiele für die Auftragung der Halbwertszeit der Aggregation $t_{1/2}$ (half time) gegen die Monomerkonzentration m_0 (concentration). A: Serieller Prozess in der Polymerisation von monomerem Insulin. B: Serieller Prozess in der Polymerisation des Peptids Amyloid-beta 40 ($\text{A}\beta_{40}$). C: Paralleler Prozess in der Polymerisation des Peptids Amyloid-beta 42 ($\text{A}\beta_{42}$). Abbildung adaptiert nach Referenz^[78] mit der Genehmigung von *Royal Society of Chemistry*.

Die Konkurrenz zweier parallel verlaufender Prozesse konnte die gleiche Gruppe in der Polymerisation des Peptids Amyloid-beta 42 ($\text{A}\beta_{42}$) bei geringer Ionenstärke der Lösung zeigen.^[92] Aufgrund der Konkurrenz aller Prozesse während der Polymerisation können parallele Prozesse direkt gefunden werden, wenn im Verlauf der Konzentrationserhöhung ein zuvor langsamerer Prozess über einen anderen dominiert. Im Fall von $\text{A}\beta_{42}$ übertrifft die sekundäre Nukleation, die von der Monomerkonzentration abhängt, bei hohen Konzentrationen die Fragmentierung, die nur von der Polymerkonzentration abhängig ist. Dies führt zur entgegengesetzten Beobachtung wie im Fall der Sättigung. Wie in Abbildung 1.8 C dargestellt ist, nimmt die Monomerabhängigkeit mit steigender Monomerkonzentration zu.^[78]

In der Polymerisation synthetischer supramolekularer Polymere zeigten GALANGAU *et al.* die kinetische Kontrolle der supramolekularen Polymerisation von Toluol-Bisamiden in eindimensionale Polymere. Durch das Design des aromatischen Systems dieser Verbindungen konnte ein metastabiler Zustand gefunden werden, durch den sich die kooperative Polymerisationskinetik einstellen ließ.^[93] GAZIT *et al.* untersuchten die Polymerisationskinetik von Mono-, Di- und Triphenylalanin als kleinstes Modell

assemblierender Strukturen.^[94] Durch Turbidimetrie kann die Polymerisation verfolgt und das dominante Auftreten sekundärer Prozesse durch die starke Konzentrationsabhängigkeit der Strukturen gezeigt werden. Durch die systematische Untersuchung zeigten sie, dass die kritische Nukleusgröße für die längeren Peptide abnimmt. ^[94] YAGAI *et al.* erforschten die Kinetik geimpfter Polymerisationen von π -konjugierten Barbituraten in organischen Lösungsmitteln. Sie zeigten, dass sie durch das Impfen mit Keimen einer helikalen Morphologie die Elongation an den Kettenenden induzierten, während sie durch das Impfen mit Keimen ringförmiger Aggregate die sekundäre Nukleation an der Ringoberfläche auslösten.^[95] In einer umfassenden Studie der Polymerisationskinetik von Binaphthyl-Naphthalindiimid (NDI)-Derivaten zeigten GEORGE *et al.* in ähnlicher Weise die Kinetik kreuzgeimpfter Polymerisationen.^[96] Dabei wurde die Polymerisation spektroskopisch *in situ* durch die Fluoreszenz von NDI verfolgt. Das Impfen mit chiralen Keimen bietet in den Systemen eine Stereoselektivität, die im Fall homochiraler Paare zur primären Nukleation-Elongation in Blockcopolymeren führt. Impfen bei heterochiralen Paaren hingegen führt zur sekundären Nukleation und einem *self-sorting* der Homopolymere.^[96]

Die Untersuchung der Kinetik liefert fundamentale Einsichten in die Mechanismen und Pfade der beteiligten Spezies in supramolekularen Polymerisationen. Sie ermöglicht uns das Verständnis des Wechselspiels der dominierenden Prozesse und wie wir dieses nutzen können. Der dynamische Charakter supramolekularer Polymere hört bei der Beendigung der supramolekularen Polymerisation nicht auf. Vielmehr liegt im Gleichgewicht supramolekularer Polymere ein ständiger Ein- und Ausbau der Monomere vor. Auf diese Eigenschaft im dynamischen Gleichgewicht soll nun im folgenden Kapitel eingegangen werden.

1.4 Dynamik supramolekularer Polymere

Supramolekulare Architekturen haben aufgrund der nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen diesen Verbindungen einen dynamischen Charakter. Die Dynamik beinhaltet zum einen die Bildung und Dissoziation der supramolekularen Bestandteile und zum anderen intramolekulare Konformationsänderungen oder Mobilität gebundener Gäste eines Komplexes. Ersteres kann in der simpelsten Form durch einen supramolekularen Komplex von Kronenethern mit Alkalimetallionen gezeigt werden. Die Komplexbildung von Alkalimetallionen durch Kronenether kann als bimolekulare Reaktion der Form $M^+ + K \rightarrow KM^+$ mit der Ratenkonstante k_{on} beschrieben werden, wobei M^+ das Alkalimetallion beschreibt, K den Kronenether und KM^+ das gebildete Assoziat. Die Rückreaktion zu den Komponenten ist monomolekular und wird durch die Ratenkonstante k_{off} charakterisiert. Dies ist in Abbildung 1.9 für das Kaliumkation und [18]Krone-6 dargestellt.^[97]

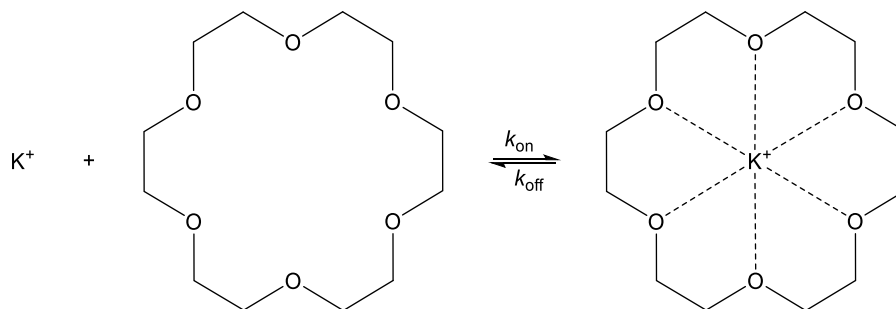


Abbildung 1.9: Gleichgewichtsgleichung der Komplexbildung von [18]Krone-6 mit einem Kaliumkation.

Im thermodynamischen Gleichgewicht der Reaktion gilt dann für die Raten nach dem Massenwirkungsgesetz der Zusammenhang in Gleichung (1.5) mit der Assoziationskonstante K_A .^[98]

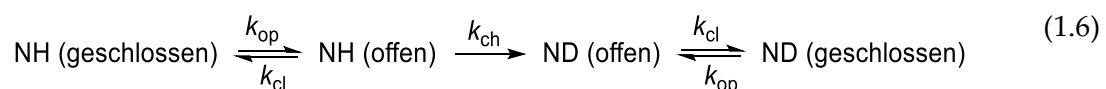
$$\frac{[KM^+]}{[K] \cdot [M^+]} = K_A = \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad (1.5)$$

Ist die Assoziationsrate k_{on} sehr hoch, handelt es sich oft um eine diffusionskontrollierte Assoziation mit einer Rate k_{diff} ($k_{diff} = 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in Wasser). In diesem Fall hängt die Dissoziationsrate $k_{off} = k_{diff}/K_A$ nur von der Assoziationskonstante K_A ab.^[99] So kann die Rate k_{off} allein durch Bestimmung der Assoziationskonstante erhalten werden. Bei geringeren Assoziationsraten werden die Ratenkonstanten häufig durch NMR oder photospektrometrisch bestimmt.^[97] Wird die strukturelle Dynamik von Kronenethern berücksichtigt, wird die Assoziationsrate darüber hinaus von der konformationellen Mobilität beeinflusst.^[100] In komplexeren supramolekularen Systemen sind häufig eine Vielzahl dynamischer Prozesse involviert, die die genaue Bestimmung der Prozesse erschweren. Für die Bestimmung der Dynamik, z. B. von Proteinfaltungsprozessen, haben

Einleitung

sich eine Reihe an fortgeschrittenen Methoden zur Untersuchung dieser Prozesse etabliert. Diese beinhalten zum einen die Zugänglichkeit zu multidimensionalen, heteronuklearen NMR-Experimenten mit isotopengelabelten Proteinen^[101,102] oder langen Simulationszeiten der Proteinfaltung^[103,104]. Zum anderen werden ortsspezifische Methoden wie in Wasserstoffaustausch-Experimenten und *Phi-value* sowie *Psi-value analysis*,^[105–108] aber auch spektroskopische Methoden auf Einzelmolekülebene^[109,110] verwendet.

Eine Methode der Wasserstoffaustausch-Experimente ist der Wasserstoff/Deuterium-Austausch. In Wasserstoff/Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS)-Experimenten wird der Austausch von Wasserstoffatomen der Strukturen durch Deuterium in Deuteriumoxid analysiert. Dies wird beispielsweise in der Untersuchung von Proteinen genutzt, da die Exposition des Proteins zu Deuteriumoxid die Amidprotonen in ungeordneten Regionen des Proteins schnell durch Deuterium ersetzt.^[105] Durch Massenspektrometrie kann die Massenzunahme, die mit dem Austausch des schwereren Isotops einhergeht, gemessen werden. Aufgrund schlechter Zugänglichkeit für das Lösungsmittel und der Bildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen findet der Austausch deutlich langsamer statt, da diese Positionen stärker geschützt vorliegen. Der Austausch eines vollständig lösungsmittlexponierten Amids, welches nicht in Wasserstoffbrückenbindung involviert ist, tauscht sein Proton mit der Rate k_{ch} aus. Geschützte Amide tauschen langsamer mit einer Rate k_{HDX} aus. Für die Faltung von Proteinen wird so der *protection factor* $P = \frac{k_{ch}}{k_{HDX}}$ berechnet, der das Maß geordneter Regionen im Protein angibt.^[105] Der Isotopenaustausch vieler Amidprotonen im nativen Protein kann nur nach dem Übergang in eine offene Konformation stattfinden. Die dynamische strukturelle Fluktuation dieser Proteine ist durch die Ratenkonstanten k_{op} für den Übergang in den geöffneten Zustand und k_{cl} für den Übergang in den geschlossenen Zustand gekennzeichnet. Für den Mechanismus des Austauschs gilt dann folgende Reaktionsgleichung:



Für den HDX können zwei Fälle unterschieden werden. Findet der Austausch der Amidprotonen des ungeschützten Amids deutlich schneller statt als das Schließen des geöffneten Proteins, was durch den Unterschied der Raten $k_{ch} \gg k_{cl}$ charakterisiert ist, findet der Austausch aller Amidprotonen direkt beim ersten Öffnungsereignis statt. Dieses Regime des Austauschs wird in HDX-MS-Experimenten als **EX1** bezeichnet und beschreibt einen monomolekularen Austausch.^[111] Die Ratenkonstante der Öffnung des Proteins kann dann direkt durch die Austauschkinetik beschrieben werden. Es gilt $k_{op} = k_{HDX}$.

Findet das Schließen des geöffneten Proteins schneller statt als der Deuteriumaustausch für die exponierten Amide ($k_{cl} \gg k_{ch}$), werden bei einem Öffnungsereignis des Proteins nicht alle Amide deuteriert. Dieses Austauschzenario wird als **EX2** beschrieben.^[111] Als Konsequenz wird eine Vielzahl an Öffnungs-/Schließungsereignissen benötigt, damit ein

Isotopenaustausch stattfindet. Die gemessene Austauschrategleichung k_{HDX} ist in diesem Fall durch $k_{\text{HDX}} = K_{\text{op}} \cdot k_{\text{ch}}$ gegeben. K_{op} beschreibt hierbei die Gleichgewichtskonstante der Proteinöffnung, die durch $K_{\text{op}} = \frac{k_{\text{op}}}{k_{\text{cl}}}$ ausgedrückt werden kann.

In einem Beispiel der Messung der Dynamik in Proteinen zeigten GOLEMI-KOTRA, KONERMANN *et al.* die Austauschkinetik für das Protein VraR (engl. *vancomycin-resistance-associated regulator*) das als Bestandteil für die Antibiotikaresistenz von *Staphylococcus aureus* gilt.^[112] Die Autorinnen und Autoren fanden einen hohen dynamischen Charakter des nativen VraR, während die phosphorylierte Variante VraR-P einen deutlich langsameren Austausch aufwies. Die Verringerung der Dynamik kann durch den geringeren Anteil ungeordneter Regionen gegenüber VraR, die mit einer deutlichen Konformationsänderung assoziiert ist, begründet werden.^[112]

DOBSON *et al.* zeigten durch die Verwendung von HDX-MS den Proteinausbau und -einbau in amyloiden Fibrillen der α -Substruktur der bovinen Phosphoinositid-3-Kinase (PI(3)K-SH3).^[113] Amyloide Fibrillen sind ein pathologisches Charakteristikum vieler Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Amyotrophe Lateralsklerose (ALS).^[114] Nach dem Lösen gebildeter amyloider Fibrillen des Proteins PI(3)K-SH3 in Deuteriumoxid-Puffer können nur zwei Populationen im Massenspektrum gefunden werden, die dem partiell deuterierten Protein (P_{pd}) und dem vollständig deuterierten Protein (P_{fd}) zugeordnet werden kann (Abbildung 1.10 A). Im zeitlichen Verlauf der kontinuierlichen Deuterierung der Fibrillen konnte die Abnahme der Spezies P_{pd} unter der Zunahme der Spezies P_{fd} sowie dem Erhalt einer äußerst homogenen Verteilung dieser Spezies gefunden werden.^[113] Die Autorinnen und Autoren konnten durch Simulation des Protonenaustauschs durch geeignete Modellgleichungen für die HDX-Daten Hypothesen zum Mechanismus des dynamischen Proteinaustauschs in den Fibrillen aufstellen. Sie schlussfolgerten, dass die Moleküle in den eindimensional aggregierten Fibrillen in einem dynamischen Gleichgewicht mit einer Population gelöster Proteinmoleküle vorlagen. Der Ein- und Ausbau der Proteine in und aus den Fibrillen musste dominant nur an den Enden der eindimensionalen Aggregate stattfinden. Die starke Verlangsamung der Nettorate des Isotopenaustauschs in diesem Experiment konnte so durch den steigenden Anteil bereits vollständig deuterierter Proteinmoleküle erklärt werden, die wieder in die amyloiden Fibrillen polymerisierten.^[113] Der Mechanismus ist in Abbildung 1.10 B schematisch dargestellt.

Abseits großer Biomakromoleküle wird HDX-MS auch für die Untersuchung der Dynamik synthetischer supramolekularer Systeme verwendet. SCHALLEY *et al.* zeigten in 2013 die Messung des dynamischen Charakters in multivalenten Dendrimer-Dendrimer-Komplexen durch HDX-MS.^[115] Durch die Deuterierung mittels MeOD in der Gasphase konnten sie feststellen, dass sich die individuellen Bindungsstellen hochdynamisch lösten und neu gebildet wurden. In den multivalenten Komplexen wurde durch die anderen intakten Bindungen jedoch eine hohe lokale Konzentration erzeugt, die die Neubildung

Einleitung

der Bindungsstelle bevorzugte. Durch diesen Mechanismus können die Komplexe auf der Oberfläche der Dendrimere in einem „rock'n'roll“-Mechanismus migrieren.

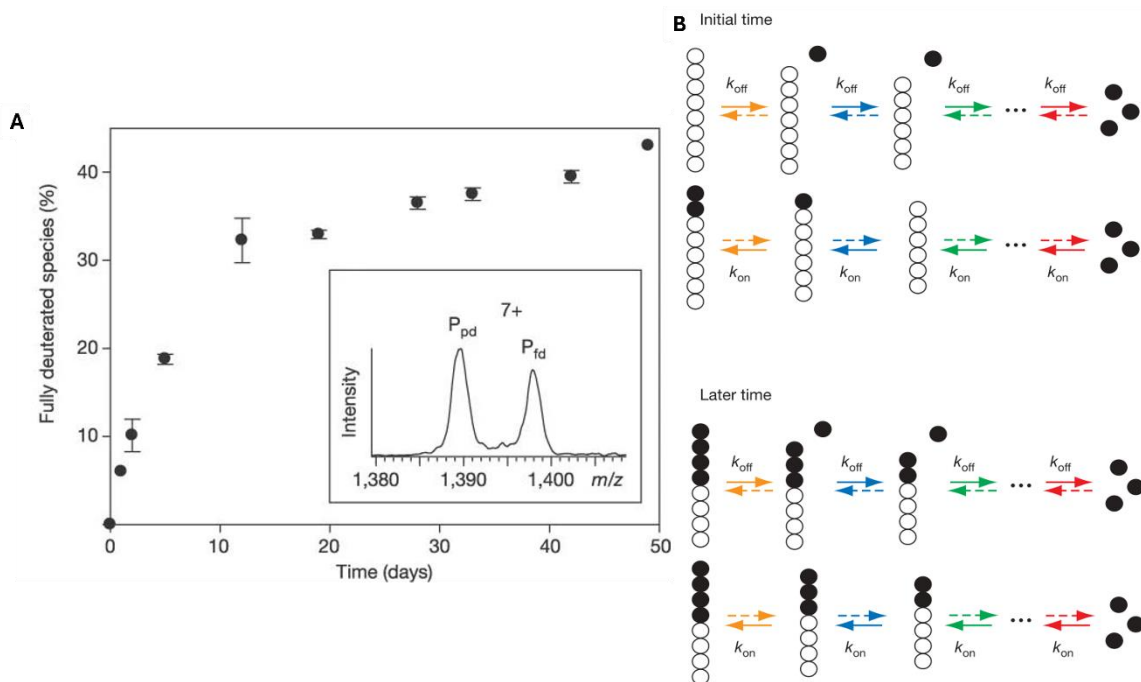


Abbildung 1.10: A: Verlauf des Anteils der vollständig deuterierten Spezies (*fully deuterated species*) mit der Zeit (*time*). Der eingefügte Graph zeigt die detektierten Massenverteilungen der siebenfach geladenen Addukte durch die Massenspektrometrie. B: Schematische Darstellung des Mechanismus des Proteinausbaus und -einbaus in die Fibrillen. Abbildung adaptiert nach Referenz^[113] mit der Genehmigung von *Springer Nature*.

MEIJER *et al.* untersuchten BTA-basierte supramolekularer Polymere mittels HDX-MS zur Illustration des dynamischen Monomeraustauschs dieser Strukturen in wässrigen Lösungen.^[116] Für die Struktur **C₁₂BTA** (Abbildung 1.11) zeigten sie den schnellen Austausch der peripheren Hydroxygruppen (OH) der Ethylenglykoleinheit aufgrund ihrer Lösungsmittelzugänglichkeit. Die Amidprotonen im Inneren der Polymere hingegen wiesen eine deutlich langsamere Austauschrate auf, die auf die Bildung einer hydrophoben Tasche und der intermolekularen H-Brücken zwischen den Monomeren zurückzuführen ist. Der HDX findet durch die hohe Aggregationstendenz in einem EX2-Regime statt.

Durch den Vergleich der Austauschkinetik in einem *exchange-in* Szenario, bei dem die protonierte Verbindung in Deuteriumoxid labile Wasserstoffe durch Deuterium ersetzt, mit einem *exchange-out* Szenario, in dem die deuterierte Spezies in Wasser protoniert wird, konnte kein Unterschied festgestellt werden. Dies zeigt, dass die Deuteriumsonde keinen Einfluss auf die Stärke der H- bzw. D-Brücke hat und die Wechselwirkung innerhalb der Polymere nicht verändert.^[116]

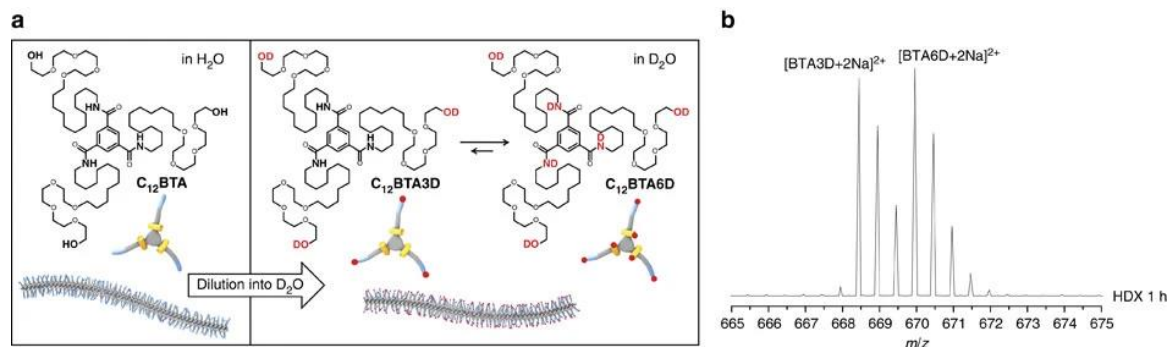


Abbildung 1.11: a) Strukturformel des BTA-basierten Amphiphils $C_{12}BTA$ und die schematische Darstellung der supramolekularen Polymere in Wasser sowie die Repräsentation des Deuteriumaustauschs der Struktur nach Verdünnung in Deuteriumoxid. b) ESI-MS-Spektrum der Verbindung $C_{12}BTA$, das die Isotopenverteilung der Spezies $BTA3D$ und $BTA6D$ zeigt. Abbildung adaptiert nach Referenz^[116] mit der Genehmigung von *Springer Nature*.

Bei der weiteren Analyse des zeitlichen Verlaufs der Austauschkinetik wurden drei unterschiedliche Austauschraten gefunden. Obwohl die Ursache für die verschiedenen Austauschraten nicht direkt gefunden werden konnte, deutet dies auf die strukturelle Diversität der gebildeten supramolekularen Polymere hin. Während keine Konzentrationsabhängigkeit der Austauschkinetik gefunden wurde, zeigten MEIJER *et. al* eine deutliche Temperaturabhängigkeit des Austauschs. So reagierte der Austausch hochsensibel auf die Raumtemperatur zu unterschiedlichen Jahreszeiten und der Temperatur der Equilibrierung vor der Verdünnung und der Lagerung danach.^[116] Der Monomeraustausch in eindimensionalen supramolekularen Polymeren fand durch den dynamischen Charakter über dieselben Mechanismen statt, die im Kapitel 1.3 für die supramolekulare Polymerisation besprochen wurden.

Eine weitere häufig verwendete Methode zur Messung dynamischen Verhaltens ist der Förster-Resonanzenergietransfer. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben findet FRET mit einer sehr starken Abstandsabhängigkeit in geeigneten Donor-Akzeptor-Paaren statt. Dies kann dann abhängig von der Wahl der Paare durch die Fluoreszenzlöschung des Donors in Gegenwart eines *Quenchers* oder die Emissionszunahme eines fluoreszenten Akzeptors gemessen werden.

MEIJER *et al.* zeigten diese Methode ebenfalls für das BTA-basierte supramolekulare Polymer $C_{12}BTA$ durch Funktionalisierung dieser Struktur mit den Farbstoffen des FRET-Paars Cyanin 3 bzw. Cyanin 5. Werden zwei Probelösungen der Polymere mit unterschiedlichen FRET-Farbstoffen separat polymerisiert und anschließend gemischt, kann das FRET-Verhältnis (FRET *ratio*) mit der Zeit aufgenommen werden. Durch den dynamischen Austausch der Monomere zwischen den Polymerstäbchen im Gleichgewicht des Systems, nähern sich die Farbstoffpaare durch Einbau in dasselbe Polymerstäbchen an und ein höheres FRET-Verhältnis kann gemessen werden. Die Zeit, die für das Mischen benötigt wird, um vollständig statistisch verteilte Copolymere zu erhalten, kann durch die Sättigung des FRET-Verhältnisses verfolgt werden. In einem

Einleitung

anderen Versuchsaufbau zeigten MEIJER *et al.* die Änderung der Monomersequenz innerhalb der Polymerstäbchen durch den dynamischen Ein- und Ausbau der Monomere.^[117] In dieser Versuchsanordnung kann ein supramolekulares Copolymer, das bereits beide Farbstoffe des FRET-Paars beinhaltet, durch die Zugabe einer Einzelstrang-DNA aus der statistischen Anordnung in eine geblockte Struktur überführt werden. Diese Kontrolle der Monomerverteilung wird durch den kationischen Charakter der farbstofffunktionalisierten Monomere und der Bindung mit der hoch negativ geladenen Einzelstrang-DNA durch elektrostatische Wechselwirkung realisiert (Abbildung 1.12 B). Durch die Zugabe einer RNase kann das Enzym die Einzelstrang-DNA degradieren, sodass die multivalente Rekrutierung der kationischen Farbstoffmonomere nicht mehr gewährleistet ist. Nach der Zugabe der RNase kehrt das Copolymer durch den zufälligen Ein- und Ausbau von Monomeren wieder in die statistische Anordnung zurück. Da sich der Abstand der Farbstoffe gegenüber der geblockten Struktur erhöht, kann dieser Vorgang mit der Zeit durch eine Verringerung des FRET-Verhältnisses verfolgt werden.^[117]

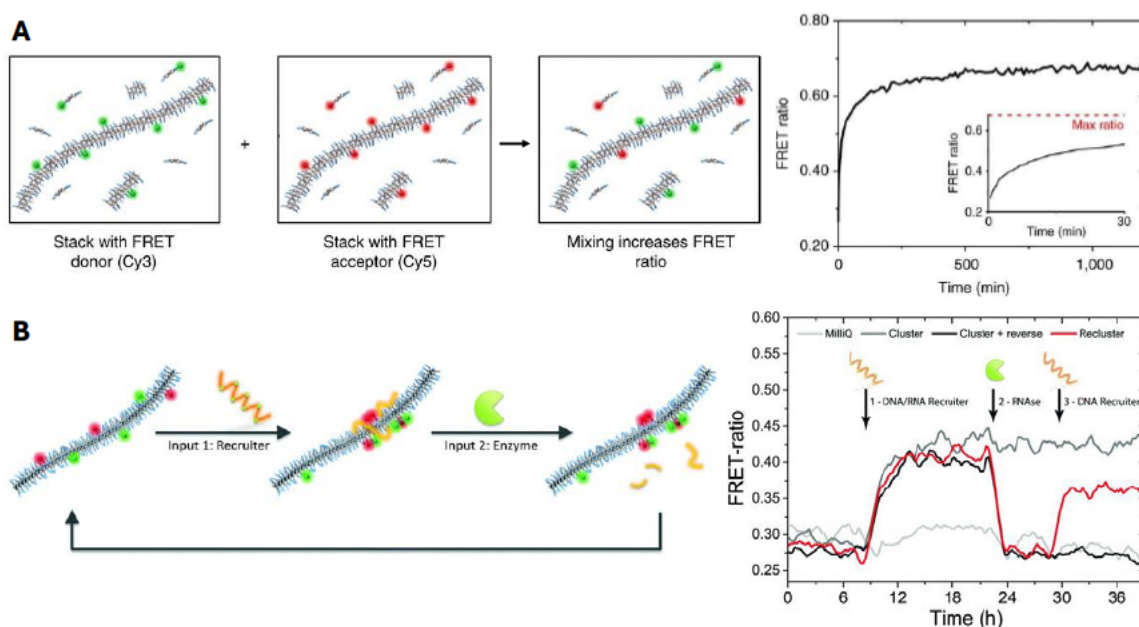


Abbildung 1.12: FRET-basierte Tests der Dynamik eines BTA-basierten supramolekularen Polymers. A: Schematische Darstellung des Monomeraustauschs innerhalb des FRET-Mischungsexperiment und der Graph des FRET-Verhältnisses (*FRET ratio*) mit der Zeit (*Time*). B: Schematische Darstellung der reversiblen Rekrutierung der farbstofffunktionalisierten Monomere des Copolymers durch eine Einzelstrang-DNA (*Recruiter*) und der Degradierung der Einzelstrang-DNA durch das Enzym RNase zur Wiederherstellung der Startanordnung. Abbildung adaptiert nach Referenz^[74] und Referenz^[117] mit der Genehmigung von *Springer Nature* und *Royal Society of Chemistry*.

Die Verwendung von FRET zur Untersuchung von dynamischen Prozessen in supramolekularen Polymeren ist ein hoch sensibles Werkzeug, das selektiv bis auf molekularer Ebene verwendet werden kann. Es besitzt wenig Limitationen, ist nicht invasiv, ist anwendbar in verdünnten Proben, besitzt eine hohe Zeitauflösung und wird kaum durch Lösungsmittel oder andere Moleküle beeinflusst.^[118] Durch seine simple

Durchführung kommt es neben der breiten Anwendung in biologischen Systemen in vielen supramolekularen Polymeren zur Charakterisierung der Dynamik zum Einsatz. Neben den BTA-basierten, eindimensionalen Polymeren^[22] wurde eine Vielzahl weiterer Architekturen wie Zylopeptid-Polymer-Nanoröhren^[64], selbstkomplementäre Wasserstoffbrückenbildner^[119], selbstassemblierende Fluoren-Oligomere^[120], koordinationsgetriebene Assemblierungen^[121], Naphthalindiimiden (NDI)^[122] oder Bolaamphiphilen^[123] untersucht.

1.5 Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskope brechen durch eine Anordnung von Linsen gesammeltes Licht zu einem vergrößerten Bild. Durch die vergrößerte Darstellung können Objekte und Strukturelemente wahrgenommen werden, die durch die Auflösungsgrenze des menschlichen Auges nicht unterscheidbar sind. So erlaubt die optische Mikroskopie die Untersuchung biologischer Zellen sowie lebender Organismen für die sie exzessiv verwendet wird.^[124] Es ist darauf hinzuweisen, dass die Vergrößerung nicht mit der Auflösung gleichgesetzt werden kann. Die Unterscheidung von Strukturmerkmalen wird durch den Detailreichtum einer Aufnahme bestimmt. Eine Vergrößerung ist also nur so lange sinnvoll, bis alle Details einer Probe dargestellt werden können. Eine weitere Vergrößerung der Aufnahme erzielt dann keine Verbesserung mehr. Sind Details auf Grundlage der folgenden Annahmen nicht mehr unterscheidbar, ist eine weitere Vergrößerung ebenfalls nicht zielführend.^[125] Die natürliche räumliche Auflösungsgrenze der optischen Mikroskopie wurde von ERNST ABBE 1873 postuliert. „Die physikalische Unterscheidungsgrenze [...] hängt allein vom Öffnungswinkel ab und ist dem Sinus seines halben Betrages proportional.“^[126]

$$d_{x,y} = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\alpha)} \quad (1.7)$$

Demnach kann trotz höherer Vergrößerung in der optischen Mikroskopie, abhängig von der verwendeten Wellenlänge λ , dem Brechungsindex des Immersionsmediums n und dem Öffnungswinkel des Objektivs α , die Auflösung nicht unter die Grenze, die durch Gleichung (1.7) ausgedrückt wird, verbessert werden.^[124] Der halbe Öffnungswinkel α und der Brechungsindex des Immersionsmediums n werden häufig als Charakteristikum eines Objektivs zur numerischen Apertur NA durch die Gleichung $NA = n \cdot \sin(\alpha)$ zusammengefasst. Darüber hinaus kann ein einzelnes Lichtquant wegen seiner Wellencharakteristik nicht unendlich fokussiert werden. Stattdessen wird durch Beugung bei der Fokussierung eines infinitesimal kleinen Leuchtpunkts durch eine Linse eine Intensitätsverteilung detektiert, die als Punktspreizfunktion (PSF) bezeichnet wird. Für ein punktförmiges, selbstleuchtendes Objekt kann in einem Mikroskop mit einem Objektiv der numerischen Apertur NA und der verwendeten Wellenlänge λ eine Auflösung nach RAYLEIGH durch Gleichung (1.8) erhalten werden.^[127]

$$d_{\text{Rayleigh}} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \quad (1.8)$$

Darüber hinaus beschreibt das RAYLEIGH-Kriterium, dass zwei selbstleuchtende, punktförmige Objekte gerade dann noch aufgelöst dargestellt werden können, wenn das Maximum der PSF eines Objekts in das Minimum des benachbarten fällt.^[127]

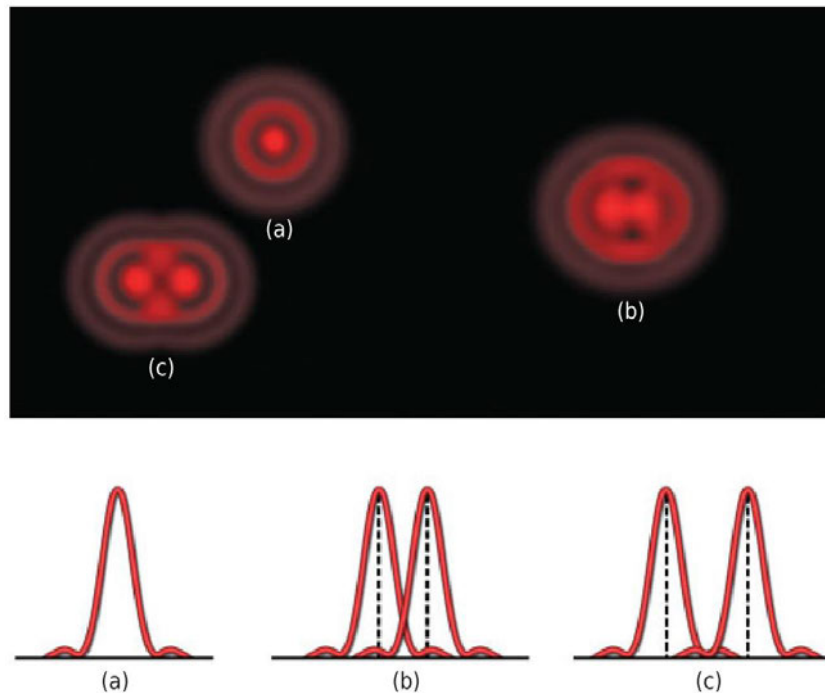


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der Aufnahme benachbarter selbstleuchtender, punktförmiger Objekte im Mikroskop zur Veranschaulichung des RAYLEIGH-Kriteriums. a) Profil eines einzelnen selbstleuchtenden Objekts. b) Profil zweier selbstleuchtender Objekte, die nach dem Rayleigh-Kriterium gerade noch aufgelöst werden. c) Profil zweier separierter Objekte, die deutlich aufgelöst werden können. Abbildung adaptiert nach Referenz^[127] mit der Genehmigung von *John Wiley and Sons*.

Moderne Mikroskope sind standardmäßig hochoptimiert für die Verwendung bis zur natürlichen Auflösungsgrenze. In der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen konfokale Mikroskope darüber hinaus einen hohen Kontrast durch die Detektion von der Fluoreszenz ausschließlich aus der Fokusebene. Durch den Ausschluss der Fluoreszenz außerhalb des Fokus, bietet die Aufnahme in mehreren Ebenen die Möglichkeit, aus den Stapeln dreidimensionale Aufnahmen zu erzeugen.^[128,129] Spezielle Anregungstechniken erlauben die Mikroskopie mit hoher Penetrationstiefe in Gewebe durch Zwei-Photon-Absorption^[130] oder gegenteilig durch TIRF (engl. *total internal reflection fluorescence*) die Anregung ausschließlich in der Nähe des Deckglasbodens zur Minimierung der Hintergrundfluoreszenz^[131–133]. Neben der einfachen Vergrößerung zur Darstellung von Größe, Form und Ort von Proben gestattet die Fluoreszenzmikroskopie eine Reihe von Spezialanwendungen zur orts aufgelösten Analyse vieler Eigenschaften. Zu diesen gehören unter anderem FRAP^[134,135] (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*), FCS^[136,137] (engl. *fluorescence correlation spectroscopy*), FLIM^[138] (engl. *fluorescence lifetime imaging microscopy*) oder FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-Mikroskopie^[139].

FRET-Mikroskopie kann verwendet werden, um die räumliche Nähe in der Interaktion oder der Aggregation aufnehmen zu können. Für eine ausführliche Betrachtung der Theorie und Anwendungen des abstandsabhängigen FRET sei auf Kapitel 1.2 und 1.4 verwiesen. In der Mikroskopie kann FRET auf verschiedene Art und Weisen gemessen

werden. Eine Methode ist die ratiometrische Messung der Energietransfereffizienz E_{FRET} durch Akzeptor-Photobleichung. Die quantitative Bestimmung von E_{FRET} wird durch den Vergleich der Donorintensität einer Probe vor und nach der Bleichung des Akzeptors durchgeführt.^[140] In der räumlichen Anwesenheit des Akzeptors vor dem Bleichen ist die Intensität der Donors I_{DA} geringer, da durch den Energietransfer auf den Akzeptor weniger Fluoreszenz des Donors stattfindet. Wird der Akzeptor vollständig gebleicht, erhöht sich die Donorintensität auf die Intensität in Abwesenheit des Akzeptors I_{D} . Die Energietransfereffizienz kann dann durch Gleichung (1.9) berechnet werden.

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{I_{\text{DA}}}{I_{\text{D}}} \quad (1.9)$$

Die Methode konnte von IRVINE *et al.* im Jahr 2023 zur Untersuchung der Antigenstabilität von Vakzinen in den Lymphknoten von Mäusen angewendet werden.^[141] Die Ergebnisse der FRET-Analyse wurden verwendet, um die Degradation der Antigene auf die Proteaseaktivität in den Lymphknoten zurückzuführen. Aus den Erkenntnissen ging hervor, dass durch die Anpassung der Vakzinierungsstrategie die Antikörperproduktion deutlich erhöht werden konnte.^[141]

1.5.1 Superaufgelöste Mikroskopie

Mikroskopische Methoden, die eine höhere Auflösung erzielen, indem sie die natürliche Auflösungsgrenze umgehen, werden supraauflösende Mikroskopiemethoden genannt. Zu ihnen zählt die STED (engl. *stimulated emission depletion*)-Methode, die von HELL etabliert wurde^[142,143], die SIM (engl. *structured illumination microscopy*)-Methode^[144] und die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie (SMLM, engl. *single molecule localisation microscopy*). SMLM umfasst mehrere Methoden, die allgemein Weitfeldmikroskopie verwenden und durch Lokalisation einzelner Moleküle hoher Präzision Aufnahmen mit erhöhter Auflösung erzeugen können.^[145–148] Zu diesen gehört unter anderem dSTORM (engl. *direct stochastic optical reconstruction microscopy*), PALM (engl. *photoactivatable localisation microscopy*) und DNA-PAINT (engl. *DNA-point accumulation for imaging in nanoscale topography*). Diese Methoden basieren auf dem Konzept, dass einzelne fluoreszente Moleküle mit hoher Präzision durch die Bestimmung des Maximums der Intensität der Punktspreizfunktion bestimmt werden können, wenn diese nicht überlappen.^[149] Um die Überlappung der Punktspreizfunktionen zu umgehen, wird die Emission der Fluorophore mit der Zeit separiert. Abhängig von der Methode wird dies durch Fotoschaltung, Fotoaktivierung oder transiente Bindung an der Zielstruktur realisiert. So befinden sich die Fluorophore in einem fluoreszierenden *on*-Zustand oder einem nichtfluoreszierenden *off*-Zustand. Dieses Schalten zwischen *on*- und *off*-Zustand wird als „Blinken“ bezeichnet.^[149] Durch die Aufnahme einer großen Anzahl an Aufnahmen mit Untergruppen von einigen wenigen Fluorophoren, die sich im *on*-Zustand befinden, kann eine Aufnahme mit hoher Auflösung rekonstruiert werden.

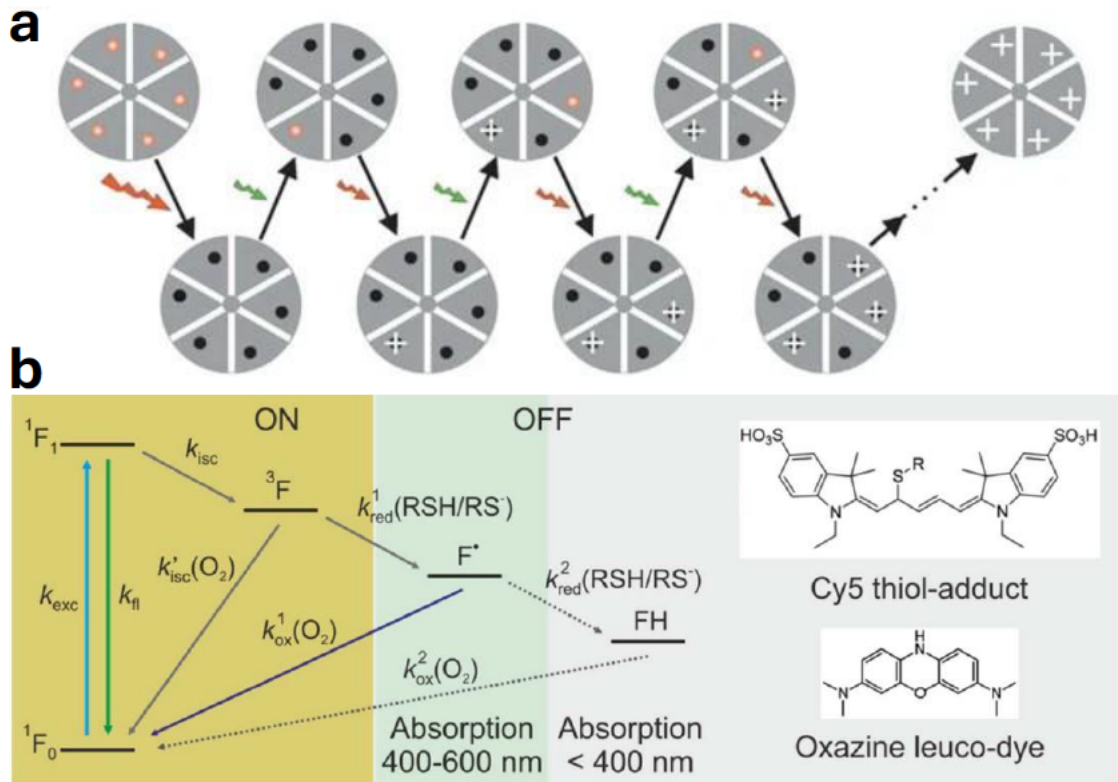


Abbildung 1.14: a: Schematische Darstellung der sequenziellen Aufnahme von sechs Fluorophoren in einer runden Anordnung zur Rekonstruktion einer supraaufgelösten Darstellung. b: Jablonski-Diagramm der Energiezustände des Fluorophors in dSTORM, die durch das Thiol aus dem *on*-Zustand in den *off*-Zustand transferiert und abhängig von Sauerstoff zurück in den Grundzustand gebracht werden können. Abbildung adaptiert nach Referenz^[147] und Referenz^[150] mit der Genehmigung von *Springer Nature* und *American Chemical Society*.

In dSTORM kann die Schaltung der Fluorophore in den *off*-Zustand durch primäre Thiole wie Mercaptoethylamin (MEA, Cysteamin) und β -Mercaptoethanol (BME) in sogenannten STORM-Puffern durchgeführt werden. In der Anwesenheit einer hohen Konzentration an Thiolat-anionen kann der Triplettzustand 3F effizient in das Radikalanion F^* im *off*-Zustand überführt werden.^[150] Die Blinkkinetik des verwendeten Fluorophors hängt dann maßgeblich von der Sauerstoffkonzentration ab, die den Triplettzustand 3F und die reduzierten *off*-Zustände F^* und FH in den Singulettgrundzustand oxidiert.^[150] In offenen Systemen kann die Konzentration von Sauerstoff enzymatisch, beispielsweise mit Glukoseoxidase und Katalase, eingestellt werden. Durch STORM-Puffer angepasste Thiol- und Enzymkonzentration wird die Blinkkinetik optimiert, die eine der entscheidendsten Kriterien der SMLM ist.^[151]

Die Lokalisationspräzision σ_{SMLM} in supraauflösender Weitfeldmikroskopie ist abhängig von der Anzahl der detektierten Photonen N pro *on*-Zustand der blinkenden Fluorophore.^[152] Die gewonnene Präzision kann in der simpelsten Form als Standardfehler des arithmetischen Mittelwerts durch Gleichung (1.10) angegeben werden.^[149]

$$\sigma_{SMLM} = \frac{\sigma_0}{\sqrt{N}} \quad (1.10)$$

Einleitung

Wobei σ_0 die Standardabweichung der Punktspreizfunktion darstellt. Die erreichte Auflösung R kann nicht besser sein als die 2,3-fache Lokalisationspräzision σ_{SMLM} ($R \geq 2,3 \sigma_{\text{SMLM}}$).^[149] So können typischerweise Auflösungen von circa 20 nm erzielt werden.^[147,153,154]

Die relativ junge Methode erlangt durch die enorme Auflösungssteigerung hohe Aufmerksamkeit und wird in der laufenden Forschung ständig optimiert. Im Jahr 2023 zuletzt zeigten JUNGSMANN *et al.* elegant die Erhöhung des Auflösungsvermögens durch sequenzielle Aufnahme in SMLM bis auf die Ångström-Größenordnung.^[152] Zwei oder mehr nahe beieinander liegende Fluorophore, die nicht durch die Lokalisationspräzision aufgelöst werden können, verhindern die Zuweisung der Lokalisationen zu den verursachenden Positionen. Durch die sequenzielle Bildaufnahme der unterschiedlichen Ziele mit Fluorophoren unterschiedlicher Emissionswellenlänge, kann diese Zuweisung vorgenommen werden. Die Aufteilung der Fluoreszenzmarkierung einer einzelnen zu beobachtenden Spezies in mehrere räumlich getrennte Untergruppen erhöht die Auflösung der supraaufgelösten Methode weiter in den Ångström-Bereich. Diese auf DNA-PAINT basierende Methode wurde von den Autorinnen und Autoren als RESI (engl. *resolution enhancement by sequential imaging*) implementiert.^[152]

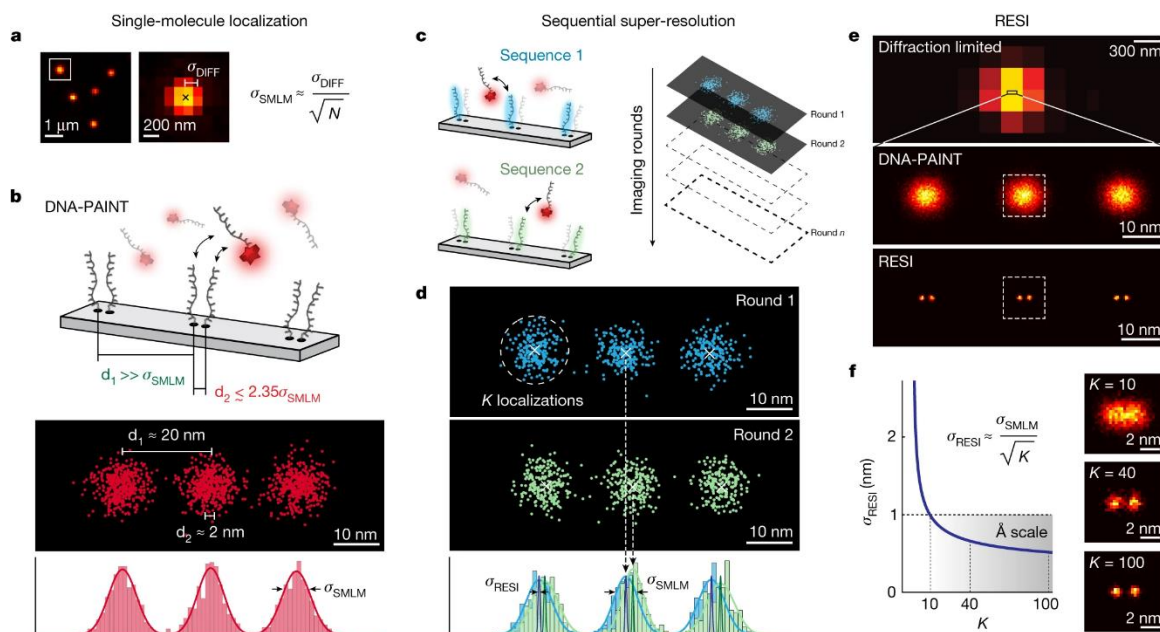


Abbildung 1.15: Konzept der Auflösungserhöhung durch RESI in SMLM. Abbildung adaptiert nach Referenz^[152] mit der Genehmigung von *Springer Nature*.

Die Anwendung korrelativer Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM, engl. *correlative light and electron microscopy*) verbindet die Vorteile der Fluoreszenzmikroskopie sondenmarkierter Proben mit der überlegenen Auflösung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zur Aufnahme zellulärer Substrukturen.^[155-157] Im Jahr 2023 zeigten PUJALS, ALBERTAZZI *et al.*^[157] die Kombination von TEM mit

dSTORM, wodurch beide Techniken die Auflösung auf molekularer Ebene erlauben. TEM besitzt abhängig von der Beschleunigungsspannung ein ABBE-Limit im ÅNGSTRÖM-Bereich durch die geringe Wellenlänge der beschleunigten Elektronen. dSTORM erreicht durch die oben beschriebene Methodik Auflösungsgrenzen im geringen Nanometerbereich und eignet sich gegenüber TEM zur intrazellulären Verfolgung von Nanomaterialien.

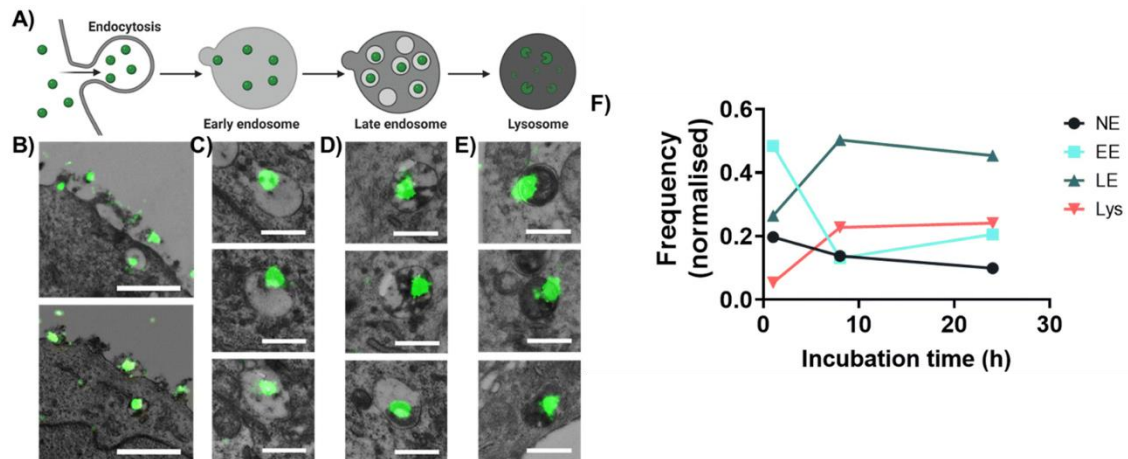


Abbildung 1.16: Aufnahmen der CLEM für die intrazelluläre Verfolgung von Nanopartikeln. A) zeigt die schematische Darstellung der endosomalen Zellaufnahme. CLEM-Aufnahme der Nanopartikel in unterschiedlichen Kompartimenten der HeLa-Zellen B) während des Endozytose, C) im frühen Endosom (EE), D) im späten Endosom (LE) und E) im Lysosom (Lys) lokalisiert. F) zeigt den zeitlichen Verlauf der Verteilung ermittelt durch quantitative dSTORM-Analyse in den endosomalen und nicht-endosomalen Kompartimenten (NE). Abbildung adaptiert nach Referenz^[157] mit der Genehmigung von *Royal Society of Chemistry*.

Diese beeindruckende Methode der Kombination beider Techniken für dieselbe Probe ermöglicht die Auflösung der zellulären Kompartimente der Zelle durch TEM, während die Lokalisation und Verfolgung der aufgenommenen Nanopartikel auf Nanometer-Skala durch dSTORM realisiert werden kann. Beugungsbegrenzte Fluoreszenzmikroskopie erreicht nicht die Auflösung zur Untersuchung zellulärer Kompartimente, wodurch falsch-positive Ergebnisse erzielt werden können.^[158] Der zeitliche Verlauf der Aufnahme lässt die Verteilung in den Kompartimenten analysieren und zeigt den endolysosomalen Pfad der Nanopartikel.^[157]

Der beeindruckende Fortschritt in supraauflösender Mikroskopie zeigt, dass für Strukturen auf der Nanometerskala nicht mehr nur AFM und TEM zur Verfügung stehen.^[159] Für biologische Proben kann in einigen Varianten sogar eine Kompatibilität mit lebenden Zellen erreicht werden. Künstliche Intelligenz und maschinelles Lernen beschleunigen oder automatisieren sogar die Aufnahme, Prozessierung und Interpretation der Bilder. Die Errungenschaften deuten auf die hohe Relevanz dieser Methoden für die zukünftige mikroskopische Analyse hin, die Einsicht in Struktur, Dynamik und Funktion komplexer synthetischer und biologischer Systeme haben kann.^[159,160]

2 Motivation und Zielsetzung

Supramolekulare Polymere sind interessante Verbindungen mit enormem Potential in verschiedenen Disziplinen. In den Polymerwissenschaften rücken supramolekulare Polymere durch ihren dynamischen Charakter, der ihnen selbstheilende Eigenschaften verleiht, in den Vordergrund. In der Biomedizin besitzen einige supramolekulare Polymere mit biologisch abgeleiteten Strukturen durch ihre Biokompatibilität und responsiven sowie variablen Eigenschaften besondere Relevanz. Die Anpassbarkeit auf der molekularen Ebene macht supramolekulare Polymere in der Nanotechnologie und vielen weiteren Disziplinen außerordentlich wertvoll. Auf Grundlage von Design-Prinzipien werden viele Bausteine für die supramolekulare Polymerisation synthetisiert, phänomenologisch untersucht und so für eine Bandbreite an Anwendungen vorgeschlagen. Einige der fundamentalen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse sind jedoch nur unzureichend verstanden und selten systematisch untersucht.

Die Natur stellt häufig eine Quelle für die Inspiration komplexer Strukturen dar. Eindimensionale supramolekulare Polymere besitzen eine hohe Ähnlichkeit zu den Filamenten des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen. Evolutionsbiologisch haben diese Zellen das Design, die Kinetik, die Thermodynamik und die Regulation dieser Eigenschaften längst gemeistert, um komplexe Funktionen in einer beeindruckenden Vielzahl zu erfüllen. Die Bildung supramolekularer Aggregate ist hierbei häufig mehrstufig und beinhaltet mehrere Komponenten. Die molekulare Dynamik supramolekularer Aggregate, die für diese so charakteristisch ist, spielt neben der Thermodynamik und der Kinetik der Assemblierung eine entscheidende Rolle. Der Umfang und die Rate des Monomeraustauschs in linearen supramolekularen Polymeren bestimmt die Fähigkeit und die Geschwindigkeit der Anpassung der supramolekularen Polymere auf eine Änderungen der molekularen Umgebung.^[161]

Peptidamphiphile besitzen eine hohe Triebkraft zur Bildung rigider, eindimensionaler supramolekularer Polymere in Wasser. Bei Mischung mehrerer verschiedener Peptidamphiphile coassemblieren diese häufig in statistische Copolymere der Bestandteile. Die flexible und modulare Gestaltung der Copolymere ist besonders nützlich in biomedizinischen Anwendungen multipler bioaktiver Komponenten. In dieser Arbeit werden daher solche Strukturen in ihren fundamentalen Eigenschaften untersucht. Ein Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Morphologie der untersuchten supramolekularen Copolymere, der molekularen Dynamik der Bausteine im Gleichgewicht und der Kinetik der Assemblierung. Unter anderem soll dabei der Einfluss der Isolationsbedingungen und der Probenvorbereitung beleuchtet werden. Die Probenhistorie, also die Reihe aller Bedingungen, denen die Probe ausgesetzt war, ist hier ebenfalls von Bedeutung. Das tiefere Verständnis der Dynamik des Monomeraustauschs im Gleichgewicht ist zudem eine wertvolle Eigenschaft und soll in dieser Arbeit für die verwendeten Peptidamphiphile genauer untersucht und quantifiziert werden. Dabei werden verschiedene Methoden geprüft und genutzt. Allem voran soll die Synthese von

Motivation und Zielsetzung

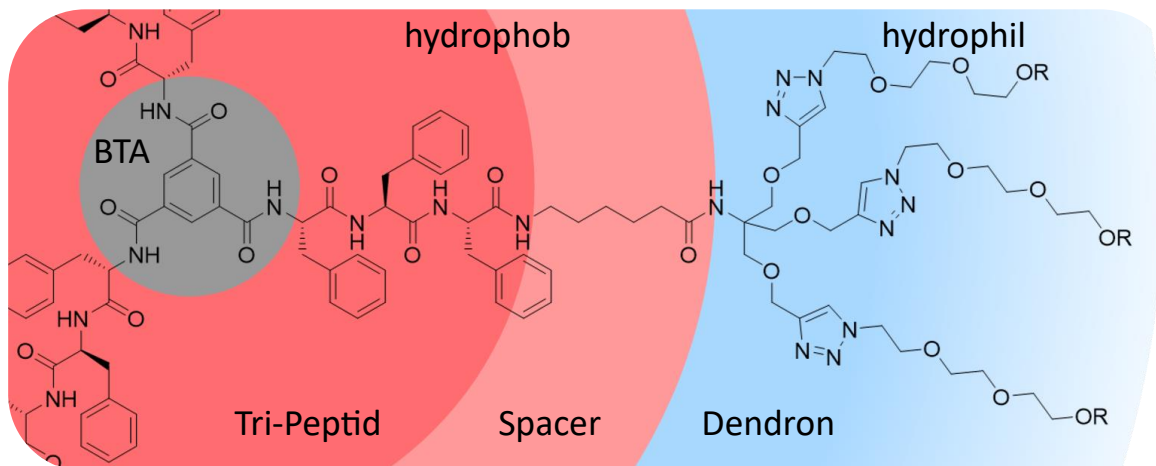
Peptidamphiphilen, die sich für die supramolekulare Polymerisation eignen, durchgeführt und die Synthese funktionalisierbarer Varianten mit hoher struktureller Ähnlichkeit erreicht werden. Letztere sollen die Einführung passender Farbstoffsonden, die sich für die Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie sowie der Fluoreszenzmikroskopie und deren Spezialanwendungen eignen, gewährleisten. Die Coassemblierung in supramolekulare Copolymere soll dabei die Einstellbarkeit der Funktionalisierungsdichte ermöglichen, um die farbstofftragenden Copolymere in den Untersuchungsmethoden verwenden zu können. Da es ein Ziel ist, die supramolekularen Polymere und deren strukturell verwandten Verbindungen in biomedizinischen Anwendungen zu verwenden, sollen sie letztlich auf ihre Biokompatibilität und ihre Interaktion mit Zellen überprüft werden.

3 Dynamik BTA-basierter supramolekularer Peptidamphiphile

In diesem Kapitel soll das Design und die dafür verwendete Synthesestrategie C₃-symmetrischer Peptidamphiphile auf Basis einer Benzoltricarboxamid (BTA)-Struktureinheit betrachtet und anschließend systematisch untersucht werden. Hierbei wird zunächst in Kapitel 3.1 bis 3.3 die Entwicklung der Synthese eines Methoxyethylglykol- und eines Triethylglykolmannosid-Dendrons beschrieben. Anschließend zeigt Kapitel 3.4 die Synthese der Peptidamphiphile dieser Dendrone. Kapitel 3.5 geht dann auf eine weitere divergente Synthesestrategie von Peptidamphiphilen ein, die die flexible Einführung von solubilisierenden Einheiten im Dendron ermöglichen soll. Durch eine Reihe so synthetisierter Peptidamphiphile sollen die Grenzen der Sterik und Hydrophilie der Bausteine in der supramolekularen Polymerisation zu eindimensionalen Nanostäbchen gezeigt werden. In dem abschließenden synthetischen Kapitel 3.6 wird zuletzt die Darstellung von funktionalisierbaren Peptidamphiphilen zur Einführung von Farbstoffen als fluoreszente Sonden präsentiert.

Anschließend erfolgt die Evaluierung der Strukturen in Kapitel 3.7 mittels systematischer Untersuchung der Eigenschaften der supramolekularen Polymere der Peptidamphiphile im wässrigen Medium. Hierbei werden zuerst die Homopolymere in Kapitel 3.7.1 in ihrer Assemblierung und der resultierenden Morphologie sowie dem thermoresponsiven Verhalten der Peptidamphiphile untersucht. Danach wird in Kapitel 3.7.2 durch Fluoreszenzmikroskopie und supraaufgelöste Methoden die Morphologie der farbstoffmarkierten Copolymere genauer untersucht. Hier soll zudem durch Kollisionsstudien der Nachweis der supramolekularen Copolymerisation der Peptidamphiphile erbracht werden. Nachfolgend wird in Kapitel 3.7.3 die Dynamik der supramolekularen Polymere untersucht, indem die Monomeraustauschkinetik zwischen den Polymeren durch ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Mischungsexperiment und Wasserstoff/Deuterium-Austausch bestimmt wird. Diese Experimente sollen den Vergleich der Geschwindigkeit des Monomeraustauschs für die verschiedenen Peptidamphiphile ermöglichen. Darüber hinaus soll über die Dynamik ein Maß für die Stabilität der supramolekularen Polymerstruktur sowie der Geschwindigkeit der Anpassung dieser auf eine Änderung der molekularen Umgebung beschrieben werden. Außerdem soll in diesem Kapitel FRET fluoreszenzmikroskopisch durch Akzeptor-Photobleichung und Fluoreszenzlebenszeitmessung bestimmt werden, um zusätzlich orts aufgelöste Informationen zu erhalten. Abschließend wird in Kapitel 3.7.4 in Zellexperimenten die Zellaufnahme der Peptidamphiphile untersucht und die Zelltoxizität getestet, um die Eignung der supramolekularen Polymere in biomedizinischen Anwendungen zu zeigen.

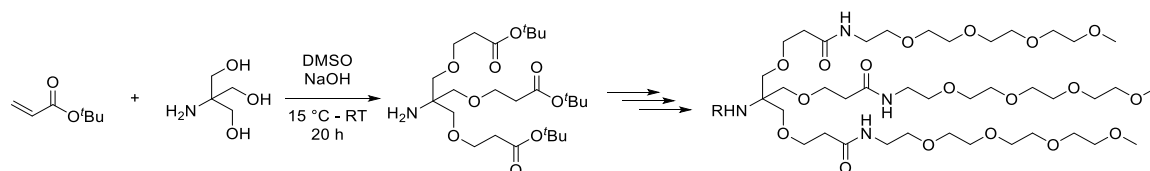
Entwickelt von MEIJER *et al.* in zunächst unpolaren Lösungsmitteln wie Methylcyclohexan^[162,163] stellt BTA ein häufig untersuchtes Strukturmotiv für supramolekulare Polymere in wässrigen Medien dar.^[2,164-166] BTA als zentrales Strukturmerkmal ist für die Ausbildung kolumnar gestapelter Aggregate verantwortlich. Diese beruht zum einen auf der dreifachen Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) zwischen den Amidgruppen des BTA und zum anderen auf der hydrophoben Interaktion des Zentrums der Struktur.^[163] Somit gibt das Benzoltricarboxamidzentrum die Direktionalität in eindimensional gestapelte Bausteine vor. An diesen trifunktionellen Kern wird dreimal Tri-L-Phenylalanin angeknüpft, was für die C₃-Symmetrie der Verbindung sorgt. Durch diese Einheiten wird die Anzahl möglicher H-Brücken zwischen den Bausteinen innerhalb des kolumnaren Stapels um neun H-Brücken erhöht. Zudem nimmt durch die Einführung von Phenylalanineinheiten die Hydrophobizität der BTA-Seitenkette zu. Beide Phänomene verstärken die Aggregationstendenz und erhöhen die Stabilität der gebildeten Stapel. Phenylalanin besitzt aufgrund des hydrophoben Charakters und der Verzweigung in β -Position eine der höchsten Neigungen zur Bildung von β -Faltblattstrukturen unter den proteinogenen Aminosäuren.^[167,168] Eine β -faltblattähnliche Aggregation bewirkt die Linearität der Seitenkette selbst und die parallele Anordnung untereinander. An das Tripeptid angeschlossen, sorgt ein Aminohexansäure-Spacer für die Anbindung eines hydrophilen Dendrons und räumliche Separation dieses vom hydrophoben Zentrum des Moleküls. Die aliphatische Kette der Aminohexansäure schirmt die β -Faltblattstruktur der Peptide vom Lösungsmittel ab. Wasser agiert als hervorragender Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor und konkurriert mit den intermolekularen H-Brücken des Stapels, sofern diese für Wasser erreichbar sind. Durch Ausbildung einer hydrophoben Tasche wird diese Zugänglichkeit verhindert. Der Alkylspacer gilt als Designprinzip für die Wasserkompatibilität der Selbstassemblierung von BTA-Motiven.^[169] Das daran angeschlossene Dendron sorgt mit seinen hydrophilen Gruppen für die Wasserlöslichkeit der Moleküle und der daraus gebildeten supramolekularen Polymere. Die Wahl der Länge und Anzahl der wasserlöslichen Gruppen ist hier ausschlaggebend. Die resultierende Wasserlöslichkeit beeinflusst direkt die Balance der Hydrophobie/Hydrophilie und damit verbunden die Morphologie, Kinetik und Dynamik. Zudem kann der sterische Anspruch der dendritischen Einheit eine Limitation der Aggregation verursachen und ein frustriertes Wachstum der Polymere bewirken.^[80,170-173] Die Struktur der Peptidamphiphile, die nach diesen Designprinzipien konzipiert wurden, sind anhand der schematischen Darstellung in Schema 3.1 dargestellt.



Schema 3.1: Schematische Darstellung der Strukturformel eines C_3 -symmetrischen Peptidamphiphiles auf Basis des BTA-Strukturmotivs. In Rot sind die hydrophoben Bereiche der Struktur dargestellt, während der blaue Bereich das hydrophile Dendron darstellt. Die einzelnen hydrophoben Strukturmerkmale wie der zentrale Benzoltricarboxamidkern, die Tri-L-Phenylalanineinheit und der Alkylspacer sind in Grau und Rot dargestellt.

3.1 Synthese des Dendrons

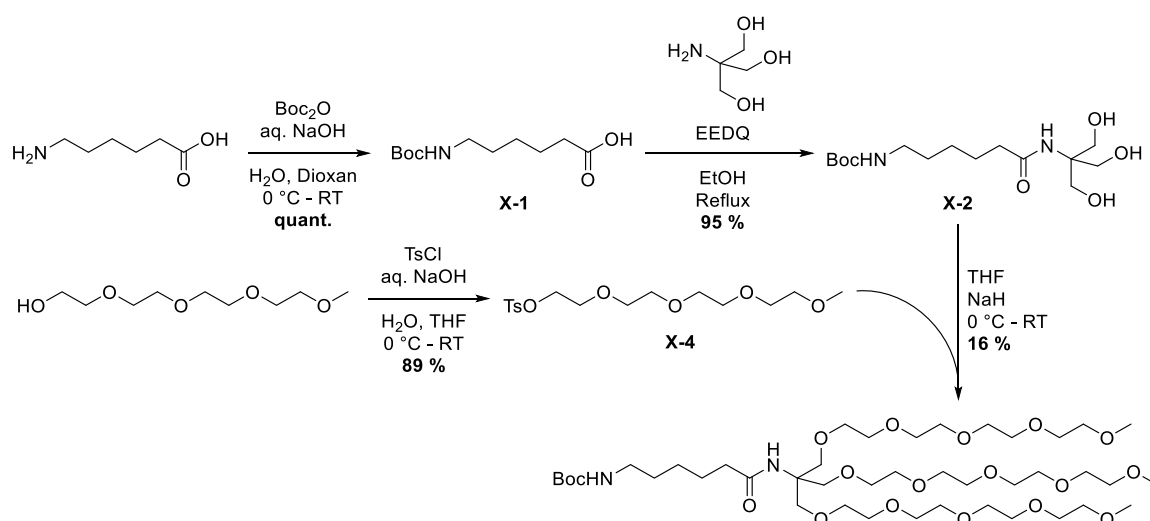
Für eine hohe Aggregationstendenz und Robustheit der gewählten Peptidamphiphile ist eine hohe Hydrophobizität des inneren Bereichs der Struktur von großer Bedeutung. Um dennoch eine Löslichkeit in Wasser zu erreichen, wird ein Motiv mit einer hohen solubilisierenden Wirkung benötigt. Dieses muss einen nicht ionischen Charakter haben, da sich die supramolekularen Bausteine durch Coulomb-Wechselwirkung abstoßen und eine Assemblierung verhindern würden.^[174] Kurze Oligoethylenglykol-Einheiten reichen wegen des hohen hydrophoben Charakters der Struktur nicht aus, um eine Wasserlöslichkeit der Moleküle zu erreichen. Zu diesem Zweck haben sich neben langen Oligoethylenglykolketten dendritische Motive bewährt. STRAßBURGER beschrieb bereits die Synthese NEWKOME-ähnlicher Dendrone zur Solubilisierung C₃-symmetrischer Peptidamphiphile in Wasser.^[52] Die Syntheseroute ist in Schema 3.2 dargestellt. Ausgangspunkt der Verzweigung und der praktischen Funktionalisierung ist Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris). Es kann durch die unterschiedliche Reaktivität der Hydroxy- und Amingruppen stufenweise funktionalisiert werden. Drei Hydroxygruppen ermöglichen die Funktionalisierung mit drei Tetraethylenglykolmonomethylether-Ketten und die Aminfunktionalität die Anbringung an die Peptidstruktur. Die Problematik in der Synthese dieser NEWKOME-ähnlichen Dendrone liegt in der dreifachen MICHAEL-Addition von Acrylsäure-*tert*-butylester an Tris. Unter basischen Bedingungen und erhöhten Temperaturen kann hier eine Retro-MICHAEL-Reaktion auftreten.^[52] Diese β -Eliminierung kann ebenfalls dreimal auftreten, wobei bereits die erste Reaktion die Ausbeute verringert und das Trennproblem der Aufreinigung enorm erschwert.



Schema 3.2: Syntheseroute zur Darstellung eines NEWKOME-ähnlichen Tetraethylenglykoldendrons.^[52] Der Rest R stellt den Alkylspacer für die Anbringung an die Peptidsequenz dar.

Eine Verbesserung ist die direkte Alkylierung der Hydroxygruppen von Tris mit einem geeigneten Tetraethylenglykol-Derivat. Die Übersicht der Syntheseroute soll in Schema 3.3 veranschaulicht werden. Hierfür konnte in nur einem Syntheseschritt der kommerziell erhältliche Tetraethylenglykolmonomethylether durch Tosylchlorid in einer Ausbeute von 89 % mit einer Abgangsgruppe versehen und das Tosylat **X-4** erhalten werden. Bei dieser Herangehensweise wurde zunächst der Aminohexansäure-Spacer an Tris angebracht, um die höhere Nucleophilie der Aminogruppe gegenüber den Hydroxygruppen an Tris auszunutzen. Hierfür musste die Aminfunktion der Aminohexansäure zuvor mit einer Schutzgruppe versehen werden. Da eine Alkylierung

von Tris unter basischen Bedingungen abläuft, wurde die *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe als orthogonale Schutzgruppe gewählt. Diese ließ sich unter quantitativer Ausbeute und geringem synthetischen Aufwand in Verbindung **X-1** einführen. Die Amidierung der Boc-geschützten Aminoheptansäure **X-1** mit Tris zum Derivat **X-2** konnte chemoselektiv mit dem Kupplungsreagenz *N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) durchgeführt werden.^[175] Dieser Ansatz nutzt die langsame Produktion eines Aktivesters in Form eines gemischten Anhydrids der zu kuppelnden Carbonsäure mit dem Ethylcarbonat von EEDQ. Die geringe Konzentration des Aktivesters bewirkt, dass dieses bevorzugt mit dem stärker nukleophilen Amin reagiert und die statistisch wahrscheinlichere Reaktion mit einer der drei Hydroxygruppen verhindert. Der Nachteil dieser Syntheseroute liegt jedoch in der folgenden dreifachen Funktionalisierung des Tris-Derivats begründet. Wie bereits von URSCHBACH beschrieben, ist ein hoher Umsatz und eine exakt Reaktionsführung für den Erfolg dieser Reaktion notwendig.^[53] Durch die Verwendung starker Basen in der Reaktionsführung einer Williamson-Ethersynthese ist auch eine Substitution an der Amidfunktion und im höheren Maß an der Carbamatfunktion der Schutzgruppe möglich. Eine zu geringe Substitution der Hydroxygruppen führt zu einem Gemisch einer Vielzahl ethylenglykolfunktionalisierter Nebenprodukte und einem komplizierten Trennproblem in der Aufarbeitung der Reaktionsmischung. Der stöchiometrische Einsatz von Natriumhydrid als Base gestaltet sich schwierig, da der Gehalt und die Qualität des NaH in einer 60 %-igen Dispersion variiert und vollkommen wasserfrei gearbeitet werden muss. Dies verringert die Reproduzierbarkeit der Reaktion enorm. Versuche mildere Basen, wie K_2CO_3 ^[53] oder $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ mit BaO für die Substitution zu verwenden, schlugen ohne Erhalt des Produkts fehl.

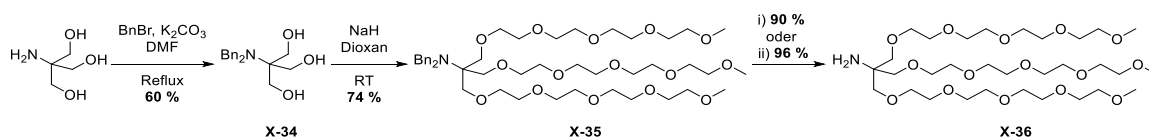


Schema 3.3: Syntheseroute zur Darstellung eines Tetraethylglykol-Dendrons durch WILLIAMSON-Ethersynthese an Tris.

Eine weitere Methode zur Synthese des Tetraethylglykol-Dendrons unter Verwendung einer WILLIAMSON-Ethersynthese ist die Einführung einer Schutzgruppe, die die

Substitution der Hydroxygruppen erlaubt und eine Überalkylierung der Struktur verhindert. Dies kann die Reaktionsführung vereinfachen und die Reproduzierbarkeit sowie die Skalierbarkeit der Reaktion verbessern. Hierfür sollte die Einführung zweier Benzylschutzgruppen am Amin getestet werden. Die Alkylierung der Aminfunktion mit zwei Äquivalenten Benzylbromid führte selektiv zum dibenzylgeschützten Tris-Derivat in nur einer Stufe.^[176] Die Überalkylierung zum Ammoniumderivat findet aus sterischen Gründen nicht statt und eine Alkylierung der Hydroxyfunktion spielt eine untergeordnete Rolle. Ein erster Versuch dieser Reaktion führte zu einer 30 % isolierten Ausbeute. Aus der Mutterlauge der umkristallisierten Reaktionsmischung kristallisierten langsam große farblose Kristalle. Durch Optimierung von [REDACTED] konnte *N,N*-Dibenzyl-(tris(hydroxymethyl))-aminomethan **X-34** in einer Ausbeute von 60 % nach Umkristallisation erhalten werden. Weiteres Produkt konnte durch säulenchromatographische Aufreinigung der Mutterlauge erhalten werden. Bedingt durch den sterischen Anspruch der Benzylgruppen und der quaternären Alkylgruppe wird die Nukleophilie des tertiärenamins so weit herabgesetzt, dass eine Alkylierung desamins nicht erfolgen kann. So kann die WILLIAMSON-Ethersynthese im folgenden Syntheseschritt mit einem großen Überschuss Base durchgeführt werden. Dies vereinfacht die Reaktionsführung enorm, da nicht auf die genaue Stöchiometrie der eingesetzten Base geachtet werden muss. Durch einen Überschuss einer starken Base kann das Triol **X-34** vollständig in das Alkoxid umgesetzt werden. Bei Verwendung von nicht vollständig trockenem Lösungsmittel führt hier die Anwesenheit von Wasser zur Bildung von Hydroxidionen die das Tetraethylglykoltosylat **X-4** hydrolysieren. Die vollständige Substitution zum Produkt **X-35** kann durch die Zugabe eines Überschusses an Tosylat **X-4** oder der weiteren Zugabe während der Reaktion bewerkstelligt werden.

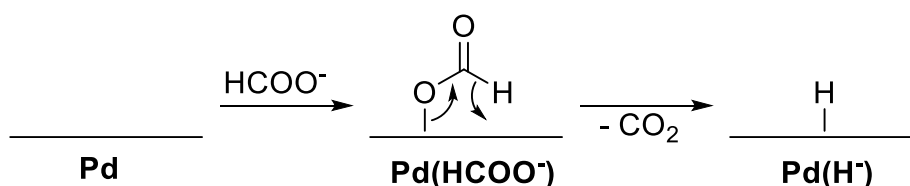
So konnte mit der Unterstützung von [REDACTED] die Ausbeute nach chromatographischer Aufreinigung an Kieselgel auf 74 % optimiert werden. Das Trennproblem dieser Reinigung gestaltete sich ebenfalls einfach, da das Produkt nur von einer geringen Menge des zweifach substituierten Produkts getrennt werden musste. Hierfür wurden 20 Äquivalente NaH und vier Äquivalente des Tosylats **X-4** verwendet.



Schema 3.4: Syntheseroute zur Darstellung eines Tetraethylglykol-Dendrons ausgehend von *N,N*-Dibenzyl-(tris(hydroxymethyl))-aminomethan **X-34**. Die Deblockierung der Aminfunktion kann mit folgenden Methoden bewerkstelligt werden: i) Na, NH₃, MeOH, 1 h, -78 °C, 90 %. ii) HCOONH₄, Pd/C, MeOH, 80 °C, 7 d, 96 %.

Die Abspaltung der Benzylschutzgruppen findet reduktiv beziehungsweise speziell hydrogenolytisch statt. Eine der meistgenutzten Methoden ist die hydrogenolytische

Abspaltung unter Zuhilfenahme eines Palladiumkatalysators auf Aktivkohle in einer heterogenen Katalyse. Hierbei wird das Edukt **X-35** in Methanol gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle (10 Gew% Pd auf C) versetzt und die Atmosphäre mit Wasserstoff gesättigt. Dazu wurde ein Hydrierballon mit Wasserstoffgas gefüllt und durch die Lösung geleitet. Danach wurde unter intensivem Rühren die H₂-Atmosphäre durch den Anschluss des Hydrierballons mit der Gasphase des Reaktionsgefäßes aufrecht gehalten. Beim Einsatz von 33 Gew% Palladium auf Aktivkohle bezüglich des Edukts und einer Reaktionszeit von neun Tagen konnte kein Umsatz detektiert werden, da Dibenzylamin als resistent gegenüber Hydrogenolyse beschrieben wird.^[177] Eine deutlich harschere Methode zur Reduktion der Benzylamingruppen stellt die Birch-Reduktion dar. Als Reduktionsmittel dienen hier solvatisierte Elektronen in flüssigem Ammoniak.^[178] Ein vollständiger Umsatz des Edukts **X-35** zum entschützten Amin **X-36** konnte bereits nach einer Stunde erzielt werden. Nach Abdampfen des flüssigen Ammoniaks und säulenchromatographischer Aufreinigung konnte **X-36** in einer isolierten Ausbeute von 90 % erhalten werden. Durch die Notwendigkeit des Einkondensierens von Ammoniak und der Reaktionsführung unter Inertbedingungen erhöht sich der apparative Aufwand dieser Reaktion. Eine weitere Möglichkeit zur Abspaltung der Benzylschutzgruppen stellt die Transferhydrogenolyse dar. Als Wasserstoffdonor wurde Ammoniumformiat verwendet und der heterogene Katalysator Pd auf Aktivkohle kam erneut zum Einsatz. Das Dibenzylamin **X-35** wurde in Methanol gelöst und mit fünf Äquivalenten Ammoniumformiat sowie 10 Gew% Palladium auf Aktivkohle für sieben Tage refluxiert. Nach Filtration des heterogenen Katalysators und wässriger Aufarbeitung konnte das Produkt **X-36** in einer Ausbeute von 96 % isoliert werden. Bei der Transferhydrogenolyse adsorbiert zunächst das Formiatanion als Wasserstoffdonor an der Palladiumoberfläche [**Pd(HCOO⁻)**]. Danach unterliegt es einer dissoziativen Chemisorption an Palladium. Da die Adsorptionseigenschaften von CO₂ sehr schlecht sind, entweicht gasförmiges CO₂ und es entsteht formal **Pd(H⁻)**. Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt produziert die für die Reduktion reaktive Spezies. Die nachfolgende Koordination des zu reduzierenden Substrats und die Insertion des Hydrids finden schnell statt. ^[179,180]



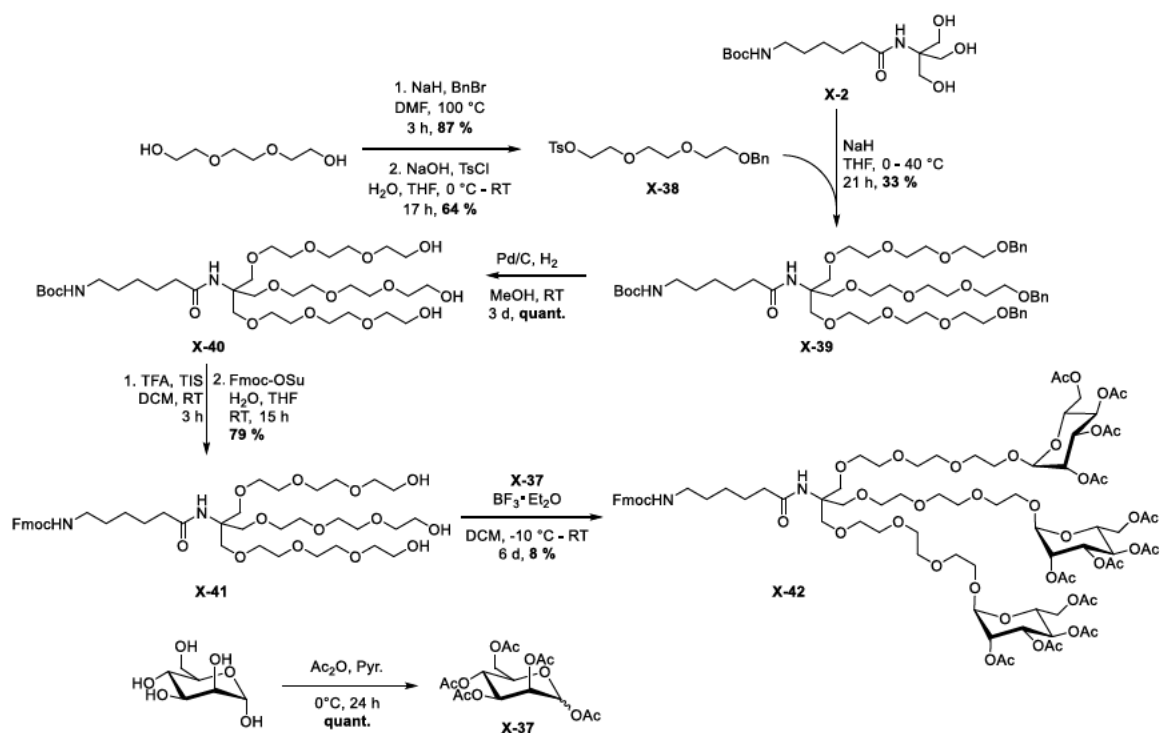
Schema 3.5: Reaktionsgleichung der Bildung der aktiven Hydrid-Spezies auf der Oberfläche des Palladiumkatalysators durch das Formiatanion.^[179]

Obwohl die Reaktionszeit dieser Methode deutlich länger ist als in einer Birch-Reduktion, zeichnet sich die Reaktion durch ihre simple Durchführbarkeit, milden Reaktanden und einfache Aufarbeitung aus. Somit lässt sich die Reaktion einfach reproduzieren und die Ansatzgröße skalieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Dreifachfunktionalisierung eines dendritischen Bausteins für die Synthese von

Peptidamphiphilen über die Einführung zweier Benzylamin-Schutzgruppen durchführen lässt. Der Ansatz kann die Synthese hinsichtlich der Ausbeute, des synthetischen und apparativen Aufwands sowie der Aufarbeitung verbessern. Die Methode wurde weiterhin von SYBILLE BOTSCHNER zur Synthese von Peptidamphiphilen im Multi-Gramm-Maßstab verwendet. Für die Synthese der Peptidamphiphile in der vorliegenden Arbeit wurde dennoch eine alternative Syntheseroute verwendet, die in Kapitel 3.2 und Kapitel 3.3 erläutert wird.

3.2 Synthese eines mannosefunktionalisierten Dendrons

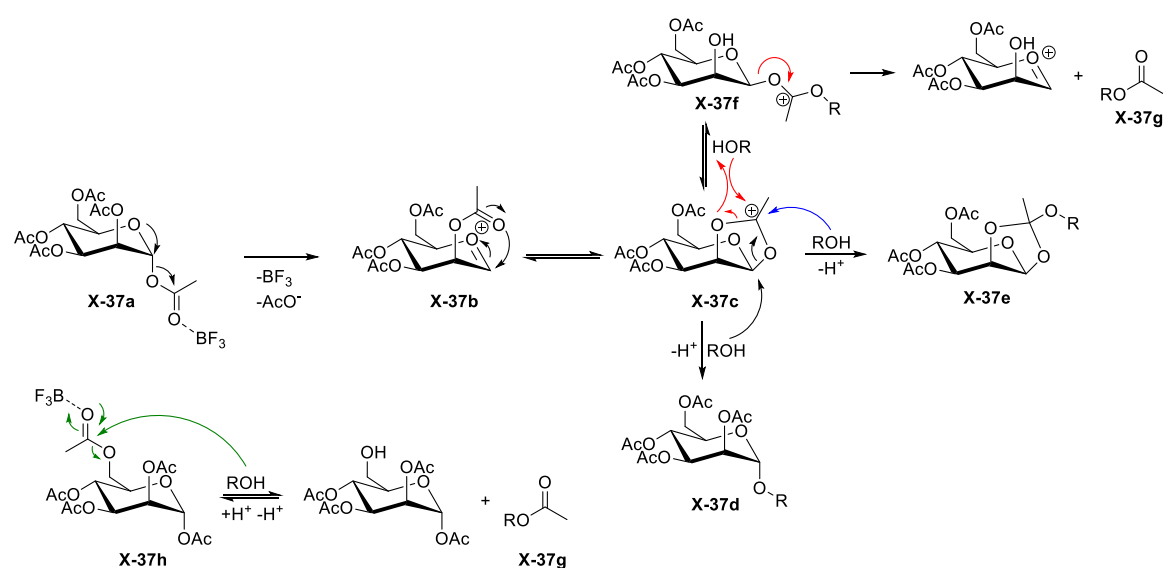
Zusätzlich zu den bisher verwendeten Tetraethylenglykolmonomethylether-basierten Dendronen sollte ein mannosefunktionalisiertes Dendron synthetisiert werden. Glycoside stellen ebenfalls eine in Wasser solubilisierende Einheit dar und erfüllen darüber hinaus spezifische Aufgaben. So ermöglicht die Präsentation der Mannoseeinheiten an der Oberfläche die Bildung supramolekularer Polymere, die von spezifischen Immunzellen mittels Oberflächenrezeptoren erkannt werden können. STRAßBURGER *et al.* haben bereits gezeigt, dass durch die Funktionalisierung supramolekularer Strukturen mit Mannose eine effektive Zellaufnahme in antigenpräsentierenden Zellen ausgelöst werden kann. Dies verläuft durch Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Phagozytose nach Addressierung des Mannoserezeptors (MR).^[56] Darüber hinaus kann die Funktionalisierung mit Mannose die Wirksamkeit von Vakzinen erhöhen, indem die Prozessierung der Antigene für die Präsentation am Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) verbessert wird.^[181,182] Die zuerst vorgesehene Syntheseroute ist in Schema 3.6 abgebildet und wurde bereits von Straßburger durchgeführt^[52], sowie in vorherigen Arbeiten diskutiert.^[183] Analog zur Synthesestrategie in Kapitel 3.1 (Schema 3.3) wurde Tris als verzweigendes Motiv verwendet und mit dem Aminohexansäurespacer verknüpft. Dieser wurde mit einer Boc-Schutzgruppe versehen, um stabil gegenüber den basischen Bedingungen einer WILLIAMSON-Ethersynthese zu sein. Da Mannose selbst eine hervorragende Wasserlöslichkeit besitzt, wurde für das zu synthetisierende Dendron eine Triethylenglykol- anstelle der Tetraethylenglykol-Einheit verwendet. Es wurde von Triethylenglykol ausgegangen und in zwei Schritten zunächst eine Benzyl-Schutzgruppe und anschließend eine Tosyl-Fluchtgruppe eingeführt. Das so modifizierte Triethylenglykol-Derivat **X-38** konnte in einer WILLIAMSON-Ethersynthese mit einer geringen Ausbeute von 33 % mit **X-2** umgesetzt werden. Damit diese Verbindung als Glykosylakzeptor für die Glykosylierung mit Mannose eingesetzt werden konnte, mussten die Benzylschutzgruppen der Ethylenglykol-Ketten entfernt werden. Außerdem musste die Boc-Schutzgruppe der Aminofunktion der Aminohexansäure-Teilstruktur durch die säurestabile Fmoc-Schutzgruppe ersetzt werden. Der Austausch der Schutzgruppen konnte in einer Einstufen-Synthese mit einer Ausbeute von 79 % durchgeführt werden. Als Glykosyldonor diente Mannose, die in einem Syntheseschritt mit quantitativer Ausbeute peracetyliert werden konnte, um **X-37** zu erhalten. Der Glykosyldonor **X-37** wurde dreimal mit dem Glykosylakzeptor **X-41** umgesetzt. Als Lewis-Säure zur Aktivierung des Glykosyldonors wurde Bortrifluorid-Diethyletherat verwendet. Das Produkt **X-42** konnte nur in einer Ausbeute von 8 %, nach aufwendiger Reinigung des Produktgemischs, erhalten werden.



Schema 3.6: Syntheseroute zur Darstellung eines mannosefunktionalisierten Dendrons durch dreifache Glykosylierung von peracetylierter Mannose an ein trifunktionelles dendritisches Motiv.

Die Problematik dieser Reaktion liegt in der Vielzahl möglicher Nebenreaktionen in Glykosylierungsreaktionen und der dreifachen Durchführung an ein Substrat begründet. Damit Verbindung **X-42** erhalten wird, muss dreimal das α -Glykosid in der Reaktion erhalten werden. Durch den Nachbargruppeneffekt der Acetylgruppe verläuft die Reaktion sehr selektiv zum α -Mannosid.^[184] Dennoch bedingt das intermediär gebildete Acetoxoniumion, das für die hohe α -Selektivität verantwortlich ist, auch die Möglichkeit der Bildung von Orthoestern oder die Umesterung der Acetylgruppe an den Glykosylakzeptor **X-41**.^[184,185] Der Mechanismus der Reaktion ist in Schema 3.7 (schwarz) veranschaulicht. Zunächst führt die Aktivierung der Acetylgruppe in 1-Position zur Abspaltung der Acetylgruppe und Bildung des Oxocarbeniumions **X-37b**. Durch den Nachbargruppen-Effekt der Acetylgruppe in 2-Position bildet sich dann das Acetoxoniumion **X-37c**. Wird dieses durch einen Rückseitenangriff von einem Alkohol nukleophil angegriffen, entsteht selektiv das gewünschte α -Mannosid **X-37d**. Wird **X-37c** jedoch am Acetoxoniumion direkt angegriffen, kann sich der Orthoester **X-37e** bilden (Schema 3.7, blau). Eine weitere von WULFF und SCHMIDT diskutierte Nebenreaktion ist der nukleophile Angriff des Alkohols an das Acetoxoniumions **X-37c** unter Bildung des Ions **X-37f**, welches den acetylierten Glykosylakzeptor **X-37g** unter Bildung eines Oxocarbeniumions abspaltet (Schema 3.7, rot). Das Oxocarbenium stellt einen aktivierten Glykosyldonor dar, der unselektiv zur Glykosylierung befähigt ist, allerdings eine Acetylschutzgruppe verloren hat. Das Auftreten dieser Nebenreaktion erhöht somit die Produktpalette der Reaktion immens. Außerdem entsteht der acetylierte Alkohol, der den Glykosylakzeptor unreaktiv macht und diese Komponente verbraucht. In einer

Glykosylierung mit einem Glykosylakzeptor, der nur eine Funktionalität trägt, lässt sich diese Nebenreaktion durch die Stöchiometrie der eingesetzten Komponenten regeln. In dieser Reaktion führt die Acetylierung einer Alkoholposition des trifunktionellen Glykosylakzeptors jedoch zum Verbrauch des Reaktanden und verhindert eine vollständige Glykosylierung des Dendrons. Abseits der Nebenreaktion des intermediären Acetoxoniumions ist auch die direkte säurekatalysierte Transesterifizierung der Acetylgruppe durch einen Alkohol denkbar. Dieser Mechanismus ist ebenfalls in Schema 3.7 (grün) abgebildet und beginnt mit der Positivierung des Carbonylkohlenstoffs einer Acetylgruppe durch die Lewis-Säure. Der nukleophile Angriff des Alkohols und die Abspaltung des Saccharids führt ebenfalls zum acetylierten Alkohol **X-37g** durch Umesterung.

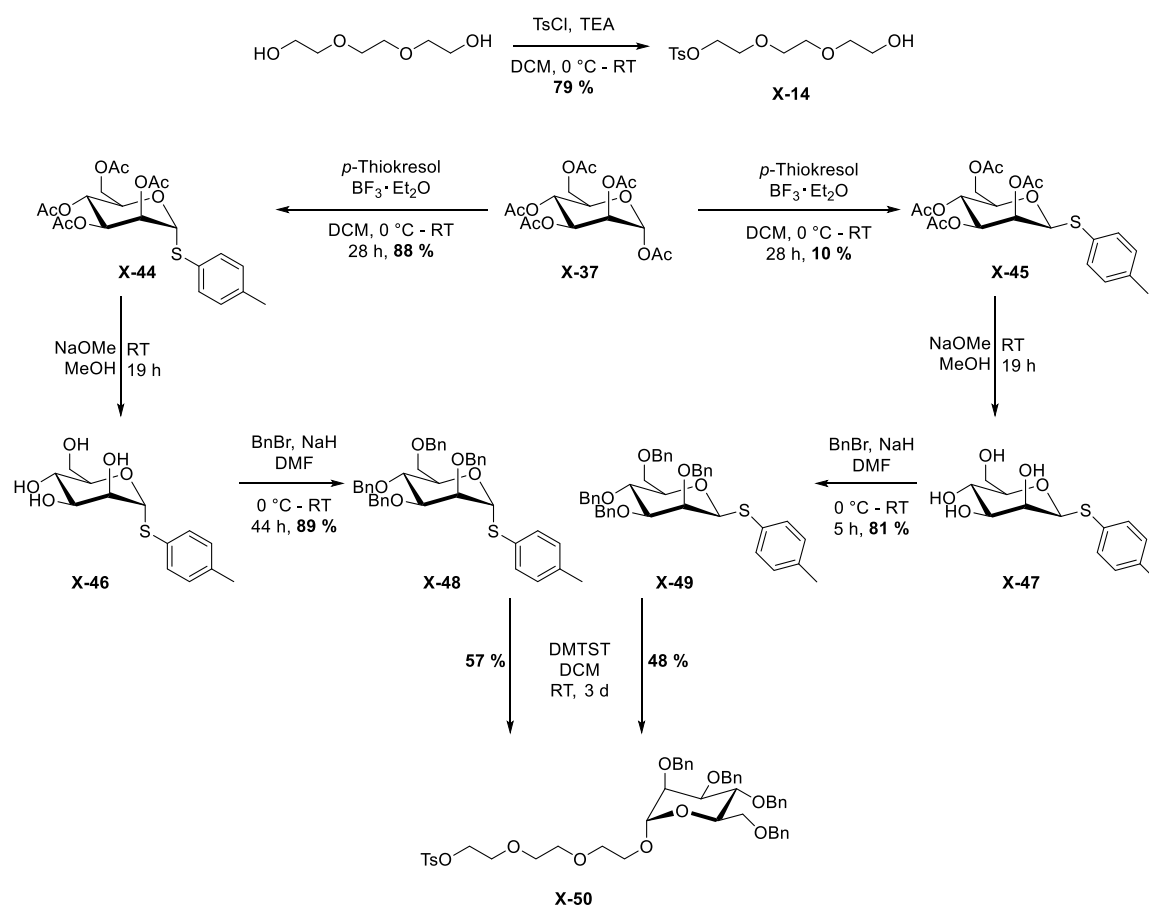


Schema 3.7: Reaktionsschema der Glykosylierung mit peracetylierter Mannose **X-37**. Die Reaktion führt über die Aktivierung des Glykosyldonors mit der Lewis-Säure BF_3 zum Acetoxoniumion **X-37b**, das durch einen Alkohol als Glykosylakzeptor zum gewünschten Produkt **X-37d** umgesetzt werden kann (schwarz). Außerdem zeigt das Schema die Nebenreaktion des Acetoxoniumions **X-37b** zum Orthoester **X-37e** (blau) und die Umesterung zum acetylierten Alkohol **X-37g** (rot). Zudem ist der Mechanismus der säurekatalysierten Umesterung einer aktivierten Acetylgruppe **X-37h** dargestellt (grün).^[184,185]

Da eine Deblockierung einer Hydroxyfunktion des Glykosyldonors **X-37** diesen ebenfalls zu einem Glykosylakzeptor macht, kann dieses Nebenprodukt mit einem weiteren Glykosyldonor reagieren und Oligomere bilden. Die theoretisch möglichen Nebenprodukte wie der einfach, zweifach und dreifach acetylierte Glykosylakzeptor sowie Mannoseoligomere konnten mittels semi-präparativer HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) isoliert und durch NMR und Massenspektrometrie analysiert und bestätigt werden.^[185]

Da sich die dreifache Glykosylierung als deutlich ungeeignete Reaktion herausgestellt hat, wurde eine alternative Syntheseroute getestet, die ein Mannosid in nur einer einzelnen

Glykosylierung darstellt und die Trifunktionalität später einführt. Hierfür wurde auf die Alkylierung des Tris-Derivats in einer WILLIAMSON-Ethersynthese wie in Kapitel 3.1 zurückgegriffen. Die ausgewählte Syntheseroute ist in Schema 3.8 abgebildet.

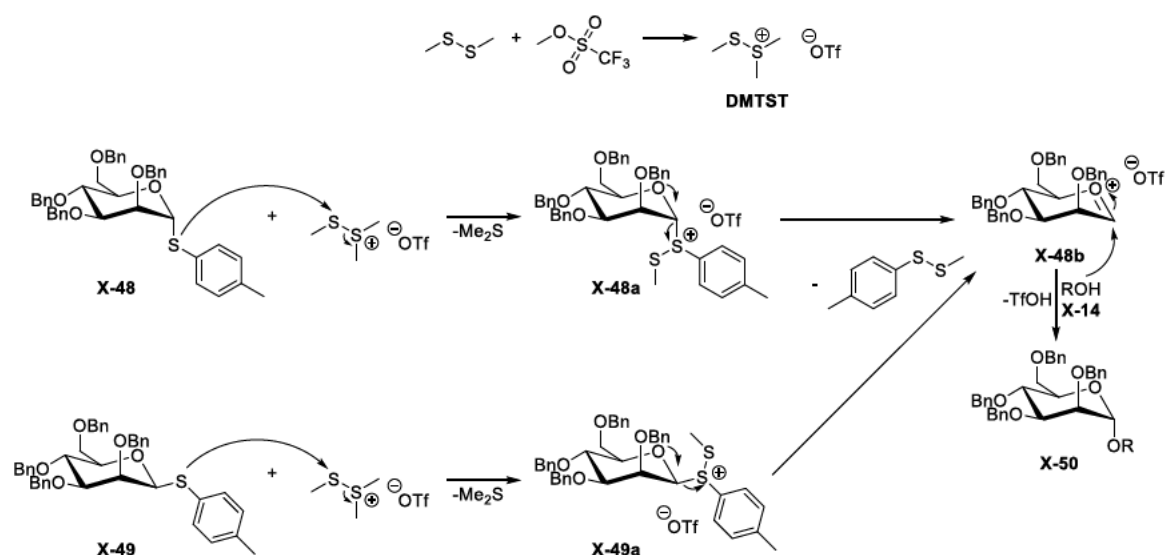


Schema 3.8: Syntheseroute eines mannosylierten Bausteins für die Funktionalisierung eines Dendrons durch WILLIAMSON-Ethersynthese.

Als Glykosylakzeptor wurde Triethylglykolmonotosylat **X-14** gewählt. Dieses kann ausgehend von Triethylglykol mit einer Ausbeute von 79 % monofunktionalisiert werden. Durch die Monofunktionalisierung wird eine Hydroxyfunktion des Glykosylakzeptors in der Glykosylierungsreaktion blockiert und gleichzeitig die Fluchtgruppe für die WILLIAMSON-Ethersynthese eingeführt. Als Glykosyldonor muss ein Mannosederivat eingesetzt werden, das Schutzgruppen enthält, welche dem Einwirken starker Basen in einer WILLIAMSON-Ethersynthese standhalten. Hierfür wurde die peracetylierte Mannose **X-37** zunächst mit *p*-Thiokresol in einer Glykosylierungsreaktion mit Bortrifluorid-Diethyletherat umgesetzt. Die Reaktion verläuft mit einer Ausbeute von 98 % zum Thioglykosid. Durch säulenchromatographische Aufreinigung konnte das α - und β -Thioglykosid voneinander getrennt werden. Das α -Thioglykosid **X-44** entstand in einer isolierten Ausbeute von 88 %, während das β -Thioglykosid mit zehnpromzentiger Ausbeute isoliert werden konnte. Die Acetylschutzgruppen beider Thioglykoside wurden in einer Umesterung nach ZEMPLÉN mit Natriummethanolat in Methanol in quantitativer

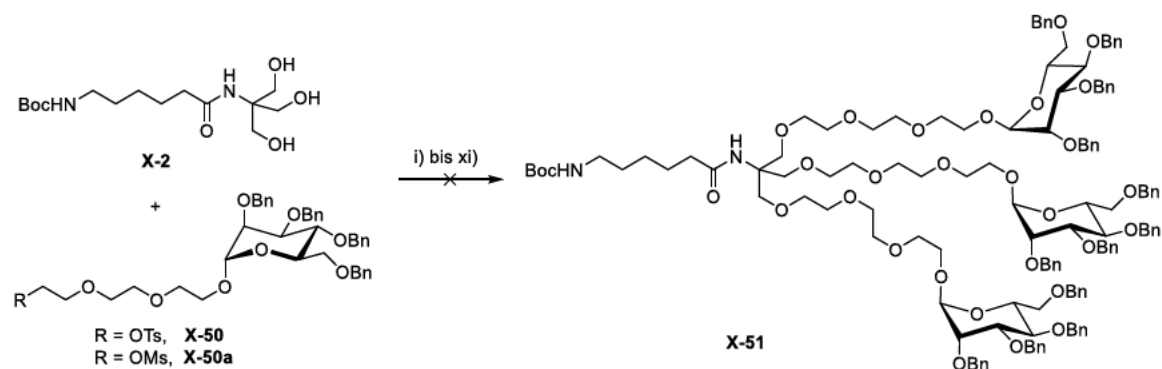
Ausbeute deblockiert.^[186] Als basenstabile Schutzgruppe der Hydroxyfunktionen wurde die Benzylschutzgruppe gewählt. Diese konnte durch Benzylbromid und Natriumhydrid in DMF eingeführt werden. Hierbei wird die Hydroxygruppe zum Alkoholat deprotoniert. Das Alkoholat greift den benzyllischen Kohlenstoff nukleophil an und substituiert in einer S_N2-Reaktion das Bromid des Benzylbromids. So entsteht 1-Toluyll-2,3,4,6-Tetrabenzyl- α ,D-thiomannopyranosid **X-48** in einer Ausbeute von 89 % und 1-Toluyll-2,3,4,6-Tetrabenzyl- β ,D-thiomannopyranosid **X-49** in einer Ausbeute von 81 %. Anzumerken ist, dass das α -Thiomannopyranosid **X-48** als leicht gelbes Öl vorliegt, während das β -Thiomannopyranosid **X-49** als amorpher, wachsartiger, farbloser Feststoff anfällt. So konnten beide Glykosyldonoren mit ähnlicher Ausbeute synthetisiert werden.

Die nachfolgende Glykosylierung wurde separat mit beiden Anomeren durchgeführt, um den Effekt auf die Reaktivität in der Reaktion untersuchen zu können. Die Glykosylierung mit Thioglykosiden benötigt einen thiophilen Promotor zur Aktivierung des Glykosyldonors. Hierfür wurde Dimethyl(methylthio)sulfonium-triflat (DMTST) verwendet.^[187] Dieses lässt sich aus Dimethyldisulfid und Methyltriflat als kristalliner Feststoff herstellen und ist unter Inertbedingungen über mehrere Wochen stabil. Dennoch wurde DMTST für diese Reaktionen direkt vor der Zugabe in trockenem DCM frisch hergestellt und in Lösung direkt zugegeben. Der Vorteil von DMTST gegenüber der Aktivierung durch Halogene ist die direkte Aktivierung des Glykosyldonor, während in der Aktivierung durch Halogene zunächst das Glykosylhalogenid gebildet und danach mit einem weiteren aktivierenden Reagenz wie Silber- oder Quecksilbersalze umgesetzt wird. Außerdem besteht der Vorteil, dass DMTST in besonderem Maße thiophil ist und selektiv den Glykosyldonor aktiviert. Nebenreaktionen wie die O-Alkylierung, die bei Aktivierung durch Methyltriflat auftritt, bleiben bei diesem Promotor aus.^[187,188] Der Mechanismus der Bildung von DMTST ist in Schema 3.9 dargestellt. Ein Schwefelatom des Dimethyldisulfids greift die Methylgruppe des Methyltriflats nukleophil in einer S_N2-Reaktion an und alkyliert das Disulfid zu DMTST. Nach einer Stunde wurde die DMTST-Lösung zu dem Glykosyldonor-Akzeptor-Gemisch gegeben und bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Hierbei greift der Schwefel der Thioglykoside **X-48** und **X-49** das DMTST an, wobei Dimethylsulfid abgespalten wird. In einem Folgeschritt wird das Methyl-*p*-toluyldisulfid unter Bildung eines Oxocarbeniumions **X-38b** abgespalten. Obwohl eine schlechte Stereoselektivität in dieser Glykosylierungsmethode ohne Nachbargruppeneffekt der 2-Position beschrieben wird,^[189] kann in dieser Reaktion für **X-48** und **X-49** ausschließlich das α -Glykosid **X-50** gefunden werden. Wie in Schema 3.8 gezeigt, konnte eine isolierte Ausbeute von 57 % für die Reaktion mit dem Glykosyldonor **X-48** und eine isolierte Ausbeute von 47 % für die Reaktion mit dem Glykosyldonor **X-49** erhalten werden. Es wird vermutet, dass die Stereoinformation des Glykosyldonors für die Glykosylierungseffizienz und Stereoinformation des Produkts keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Eine Trennung der Anomere des Thioglykosids **X-48** und **X-49** ist für die Glykosylierung mit dem Akzeptor **X-14** unerheblich.



Schema 3.9: Mechanismus der Bildung von Dimethyl(methylthio)sulfonium-triflat (DMTST) ausgehend von Dimethyldisulfid und Methyltriflat. Sowie der Mechanismus der Glykosylierung der Toluythioglykoside **X-48** und **X-49** durch den thiophilen Promotor DMTST mit dem Glykosylakzeptor **X-14**.

Das so erhaltene tosylierte Triethylenglykolmannosid **X-50** soll als Alkylierungsmittel für das Trisderivat **X-2** dienen. Die allgemeine Reaktionsführung, wie sie in Kapitel 3.1 durchgeführt wurde, konnte in diesem Beispiel nicht reproduziert werden. So führte die Reaktion von **X-2** und **X-50** in trockenem THF unter der Verwendung von NaH als Base bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C auch nach 31 Stunden Reaktionszeit nicht zum Produkt **X-51**.



Schema 3.10: Nucleophile Substitutionsreaktion der Triethylenglykolmannoside **X-50** und **X-50a** mit dem Tris-Derivat **X-2** zur Darstellung eines mannosylierten Dendrons **X-51**. i) THF, NaH, 40 °C, 31 h. ii) THF, NaH, 50 °C, 9 d. iii) MeCN, NaH, 60 °C, 10 min, Mikrowelle. iv) THF, NaH, 120 °C, 10 min, Mikrowelle. v) DMF, Ba(OH)₂·8H₂O, BaO, r.t., 14 d. vi) Dioxan/Toluol, NaH, KI, 60 °C, 3 d. vii) Dioxan/Toluol, NaH, KI, 150 °C, 30 min, Mikrowelle. viii) Dioxan, NaH, KI, 80 °C, 6 d. ix) Pyridin, 80 °C, 5 d. x) DMF, DiPEA, 80 °C, 5 d. xi) DMF, DBU, 80 °C, 5 d.

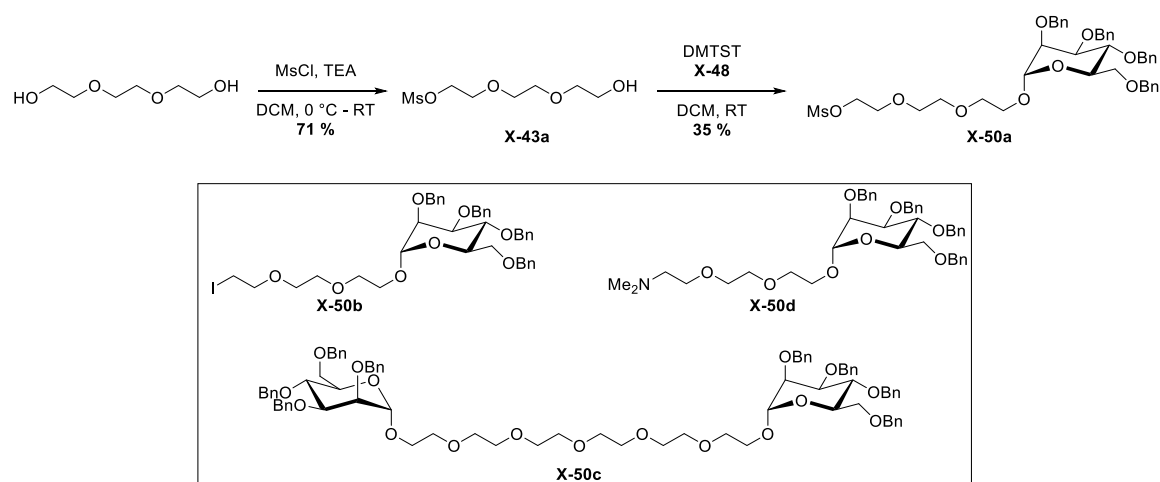
Es konnte weder das Entstehen des Produkts noch der Konsum der Edukte nachgewiesen werden. Daraufhin wurden verschiedene Reaktionsansätze getestet, die in Tabelle 3.1 zusammengefasst sind.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung aller Reaktionsbedingungen der Testreaktionen zur Herstellung von **X-51** ausgehend vom Tris-Derivat **X-2** und dem Tosylat **X-50** bzw. dem Mesylat **X-50a**.

Ansatz	Substrat	Lösemittel	Base	Temp.	Reaktionszeit	Zusatz
i)	R-OTs	THF	NaH	40 °C	31 h	-
ii)	R-OTs	THF	NaH	50 °C	9 d	-
iii)	R-OTs	MeCN	NaH	60 °C	10 min	Mikrowelle
iv)	R-OTs	THF	NaH	120 °C	10 min	Mikrowelle
v)	R-OTs	DMF	Ba(OH) ₂ ·8H ₂ O	r.t.	14 d	BaO
vi)	R-OTs	Dioxan, Toluol	NaH	60 °C	3 d	KI
vii)	R-OTs	Dioxan, Toluol	NaH	150 °C	30 min	Mikrowelle und KI
viii)	R-OMs	Dioxan	NaH	80 °C	6 d	KI
ix)	R-OTs	Pyridin	Pyridin	80 °C	5 d	-
x)	R-OTs	DMF	DiPEA	80 °C	5 d	-
xi)	R-OTs	DMF	DBU	80 °C	5 d	-

Zunächst wurde die Reaktionszeit der Reaktion auf neun Tage erhöht und eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C vorgenommen (ii). Die Reaktionstemperatur wurde nur geringfügig erhöht, da keine Informationen über die Temperaturstabilität des Glykosids **X-50** vorlagen. Auch nach dieser verlängerten Reaktionszeit konnte kein Produkt gefunden werden und die Edukte wurden reisoliert. Da sich die Substitution als herausfordernd herausstellte, wurde die Synthese Mikrowellen-unterstützt durchgeführt. Hierfür wurde die Reaktion in Acetonitril mit NaH bei 60 °C bei einer maximalen Leistung von 200 W für zehn Minuten durchgeführt (iii). Nachdem kein Umsatz festgestellt werden konnte, wurde die Reaktion in THF mit NaH bei 120 °C für zehn Minuten bei maximal 200 W ohne Erfolg durchgeführt (iv). Die Verwendung von Bariumhydroxid als Base unter Zusatz von BaO, um entstehendes Wasser vollständig zu Ba(OH)₂ umzusetzen, blieb auch nach 14 Tagen ohne Umsatz erfolglos (v). Der Wechsel des Lösemittels zu einem Dioxan/Toluol-Gemisch (1/3, V/V) zeigte nach drei Tagen bei 60 °C unter Verwendung von NaH und dem Zusatz von Kaliumjodid keinen Umsatz (vi). Da Iodid ein exzellentes Nukleofug darstellt, sollte durch Zugabe von Kaliumjodid das Tosylat in ein Alkyljodid überführt werden. Nach der Trennung des Reaktionsgemischs konnte neben dem Tosylat **X-50** ebenfalls das Alkyljodid **X-50b** (Schema 3.11) isoliert werden. Dies zeigt, dass auch das Alkyljodid unter den Reaktionsbedingungen nicht in der Lage ist, **X-2** zu alkylieren. Die Mikrowellen-unterstützte Reaktion dieser Reaktionsmischung für 30 Minuten bei 150 °C unter einer maximalen Leistung von 300 W konnte die Edukte

ebenfalls nicht miteinander umsetzen (vii)). Um die Abgangstendenz der Fluchtgruppe in dieser Substitutionsreaktion zu erhöhen, wurde zudem das Mesylat-Derivat **X-50a** des Triethylglykolmannosids hergestellt (Schema 3.11). In einer Reaktion des besseren Nucleofugs **X-50a** in Dioxan mit der Base NaH für sechs Tage bei 80 °C mit der Zugabe von KI konnte erneut kein Umsatz detektiert werden (viii)). Nach der Trennung dieser Reaktionsmischung konnte neben der Reisolation des Mesylats **X-50a**, ebenfalls das Alkylidiod **X-50b**, aber auch eine dimere Spezies **X-50c** (Schema 3.11) isoliert werden. Diese kann nach Hydrolyse des Triethylglykolmannosids mit einem weiteren Molekül des Mesylats **X-50a** oder des Alkylidiods **X-50b** durch Substitution entstehen. Drei weitere Versuche das Tosylat **X-50** für fünf Tage bei 80°C in Pyridin (ix)), in DMF mit DiPEA (x)) und in DMF mit DBU (xi)) umzusetzen, schlugen auch fehl. Die massenspektrometrische Untersuchung des Reaktionsgemischs der Reaktionen in DMF zeigten die Substitution mit Dimethylamin, einem Zerfallsprodukt des Lösemittels DMF, zu einem tertiären Amin **X-50d**.



Schema 3.11: Syntheschema der Darstellung des Mesylats **X-50a** als alternatives Nucleofug für die Syntheseveruche des mannosylierten Dendrons **X-51** sowie die Strukturformeln der gefundenen Nebenprodukte der Substitutionsreaktion.

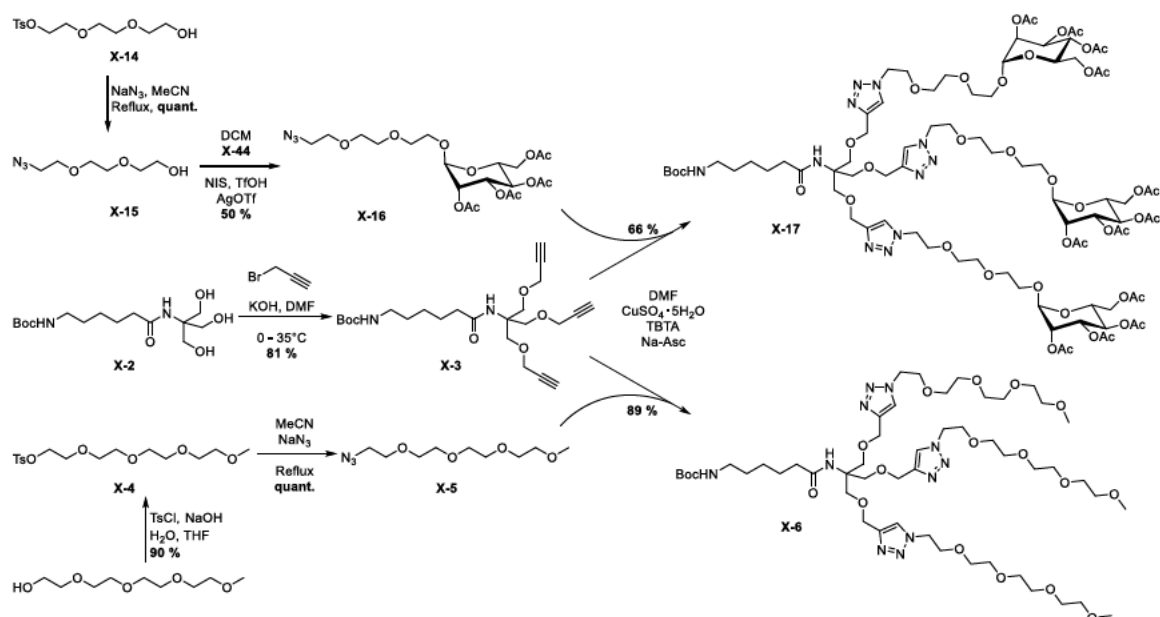
Somit konnte unter keinen der verwendeten Reaktionsbedingungen eine Substitution zum mannosylierten Dendron **X-51** erreicht werden. Obwohl die Glykosylierungsreaktion in einfacher Ausführung effizient und stereoselektiv durchgeführt werden konnte, scheint eine multivalente Präsentation des Triethylglykolmannosids **X-50** durch eine dreifache Substitutionsreaktion an das verzweigende Motiv Tris nicht möglich.

So kann das mannosylierte Dendron nur mit einer sehr geringen Ausbeute und einem hohen chromatographischen Reinigungsaufwand in einer dreifachen Glykosylierungsreaktion hergestellt werden. Leider zeichnet sich die Reaktion durch eine große Anzahl möglicher Nebenreaktionen aus. Eine alternative Syntheseroute, die die Glykosylierung in einzelner Ausführung vorsieht und die glykosylierte Struktur im Nachhinein durch Substitution einführt, schlug fehl. Eine weitere Methode zur Bindungsknüpfung soll im nachfolgenden Kapitel gezeigt werden.

3.3 Synthese eines „click“-baren Dendrons

Eine weitere elegante und robuste Methode zur Bindungsknüpfung stellt die Verwendung einer sogenannten Click-Reaktion dar. Der Begriff Click-Reaktion wurde 2001 von SHARPLESS eingeführt und geprägt und fasst eine Kategorie von chemischen Reaktionen zusammen, die bestimmte Anforderungen erfüllen müssen.^[190] Reaktionen dieses Typs müssen modular sein und eine breite Anwendbarkeit finden. Sie müssen stereospezifisch ein Produkt in sehr hohen Ausbeuten und müssen nichtreaktive Koppelprodukte liefern, die sich leicht abtrennen lassen. Die Edukte und Reaktanden müssen leicht zugänglich sein und unter einfachen Reaktionsbedingungen zu einem Produkt umgesetzt werden, das einfach isoliert werden kann.^[190] Diese außerordentlich strikten Bedingungen lassen sich nur durch Reaktionen erfüllen, in denen Reaktionspartner sehr selektiv miteinander exergon reagieren und eine Reaktivität gegenüber anderen Reaktionspartnern sehr gering ist. Hierfür wird eine hohe thermodynamische Triebkraft benötigt.^[190] Die Entwicklung solcher hochselektiven und verlässlichen Reaktionen zur Bindungsknüpfung wurde 2022 mit dem Nobelpreis in Chemie gewürdigt. BERTOZZI, MELDAL und SHARPLESS erhielten die Auszeichnung für die „Entwicklung der Click-Chemie und der bioorthogonalen Chemie“.^[191] Eine häufig verwendete Reaktion dieses Typs, meist selbst als Click-Reaktion bezeichnet, ist die Kupfer(I)-katalysierte-Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC). Diese findet in der Synthese von Glycoclustern oder Glycodendronen mit Tris als verzweigendem Motiv bereits Verwendung.^[192,193] Für diesen Ansatz muss eine Azid- bzw. eine Alkinfunktionalität in die Bausteine eingebaut werden. Die Azidfunktion lässt sich einfach durch eine nukleophile Substitution mit Natriumazid einführen. Da hierfür bereits die tosylierten Ethylenglykolderivate **X-4** und **X-14** zur Verfügung stehen, wurden diese verwendet und die Alkinfunktionalität an das Tris-Derivat **X-2** angebracht. Die vollständige Syntheseübersicht der Dendrone, die durch CuAAC erhalten werden konnten, sind in Schema 3.12 dargestellt.

Das Tris-Derivat **X-2** kann in der Boc-geschützten Variante wie in Kapitel 3.1 verwendet werden. Die Alkingruppen wurden in einer nukleophilen Substitution mit Propargylbromid eingeführt. So kann das Trialkin **X-3** in einer Ausbeute von 81 % nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten werden. An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass die Reinheit dieser Synthesestufe in der Synthese der Peptidamphiphile von besonderer Bedeutung ist. Bei unvollständigem Umsatz der Reaktion kann das Dialkin als nicht vollständig umgesetztes Zwischenprodukt anfallen. Das Retentionsverhalten des Dialkins unterscheidet sich gegenüber des Trialkins **X-3** noch deutlich und kann einfach chromatographisch getrennt werden. Wird das Dialkin jedoch nicht vollständig abgetrennt und in den nachfolgenden Syntheseschritten weiter modifiziert, schwindet der Retentionsunterschied des unvollständig modifizierten Zwischenprodukts und der Zielstruktur. Eine Trennung ist dann nicht mehr einfach zu bewerkstelligen.



Schema 3.12: Syntheschema der Darstellung des mannosylierten Dendrons **X-17** und des Tetraethylglykol-Dendrons **X-6** durch dreifache Kupfer(I)-katalysierte-Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) Click-Reaktion.

Um die dreifache Click-Reaktion zu testen, sollte zunächst das Tetraethylglykolazid **X-5** synthetisiert werden. Wie in Kapitel 3.1 gezeigt, lässt sich ein Tetraethylglykol-basiertes Dendron bereits optimiert herstellen. Dennoch sollte ein Tetraethylglykol-Dendron über CuAAC dargestellt werden, um ein Peptidamphiphil zu synthetisieren, das direkt mit den Vorgängern verglichen werden kann. Hierfür wurde das Tosylat **X-4** mit Natriumazid in Acetonitril unter Refluxieren des Lösungsmittels erhitzt. So kann das Azid **X-5** in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Nun kann das Trialkin **X-3** in einer Kupfer(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition mit dem Azidderivat **X-4** umgesetzt werden. Als Kupfer(I)-Quelle kam Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat zum Einsatz, das *in situ* durch Natriumascorbat zu Cu(I) reduziert wurde.^[194] Zusätzlich wurde Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA) als Liganden verwendet, welches das Kupfer(I)-ion koordiniert. Der vierzählige Ligand sorgt so für die Stabilisation der Oxidationsstufe, erhöht die Elektronendichte am Metallzentrum und somit die Reaktivität des Katalysators in dieser Reaktion.^[195] Die entgaste Reaktionsmischung wurde zwei Tage bei 60 °C zur Reaktion gebracht und das Produkt **X-6** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel in einer Ausbeute von 89 % isoliert werden. Die vollständige Substitution kann anhand des ¹H-NMR-Spektrums der Substanz gezeigt werden (Abbildung 3.1, oben). Für die Integration der Signale kann das Triplet, verursacht durch die CH₂-Gruppe in α -Position der Aminohexansäure-Teilstruktur, verwendet werden. Das Triplet bei 2,03 ppm tritt in dieser Verbindung und allen nachfolgenden Stufen als isoliertes Signal auf und eignet sich deshalb zur Normierung der Integrale (Abbildung 3.1, orange). Das Singulett, das durch das in der Reaktion gebildete Triazol-H-5-Proton bei 8,00 ppm verursacht wird, weist ein Integral von 3,0 auf und zeigt so die vollständige Bildung dreier Triazol-Gruppen (Abbildung 3.1, blau). Eine massenspektrometrische

Untersuchung mittels HR-TOF-MS durch Electrospray-Ionisation in Methanol zeigt ebenfalls die Bildung des Produkts. Es können die einfach geladenen Addukte $[X-6+H]^+ = 1148,6773$ Da und $[X-6+Na]^+ = 1170,6592$ Da sowie die zweifach geladenen Addukte $[X-6+2H]^{2+} = 574,8423$ Da, $[X-6+H+Na]^{2+} = 593,8202$ Da und $[X-6+2Na]^{2+} = 596,8242$ Da detektiert werden (Abbildung 3.1, unten). Eine geringe Menge eines zweifach funktionalisierten Nebenprodukts **X-6a**, das aus einem Edukt entstanden sein muss, welches nur zwei Alkin-Funktionalitäten besessen hat, konnte ebenfalls detektiert werden. Das Signal kann dem Natriumaddukt der gezeigten Spezies in Abbildung 3.1 $[X-6a+Na]^+ = 899,5060$ Da zugeordnet werden. Das detektierte Signal befindet sich gerade so oberhalb der Nachweisgrenze. Da sich die Ionisationseigenschaften dieses Moleküls nicht grundsätzlich von denen des Produkts **X-6** unterscheiden und das Molekulargewicht dieser Nebenverbindung geringer ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Verunreinigung durch dieses Nebenprodukt sehr gering ausfällt. An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, dass eine Trennung der unvollständig funktionalisierten Dendrone schwierig ist. Die geringfügige Menge des gezeigten Nebenprodukts eluiert bei chromatographischer Reinigung an Kieselgel mit dem Produkt **X-6**.

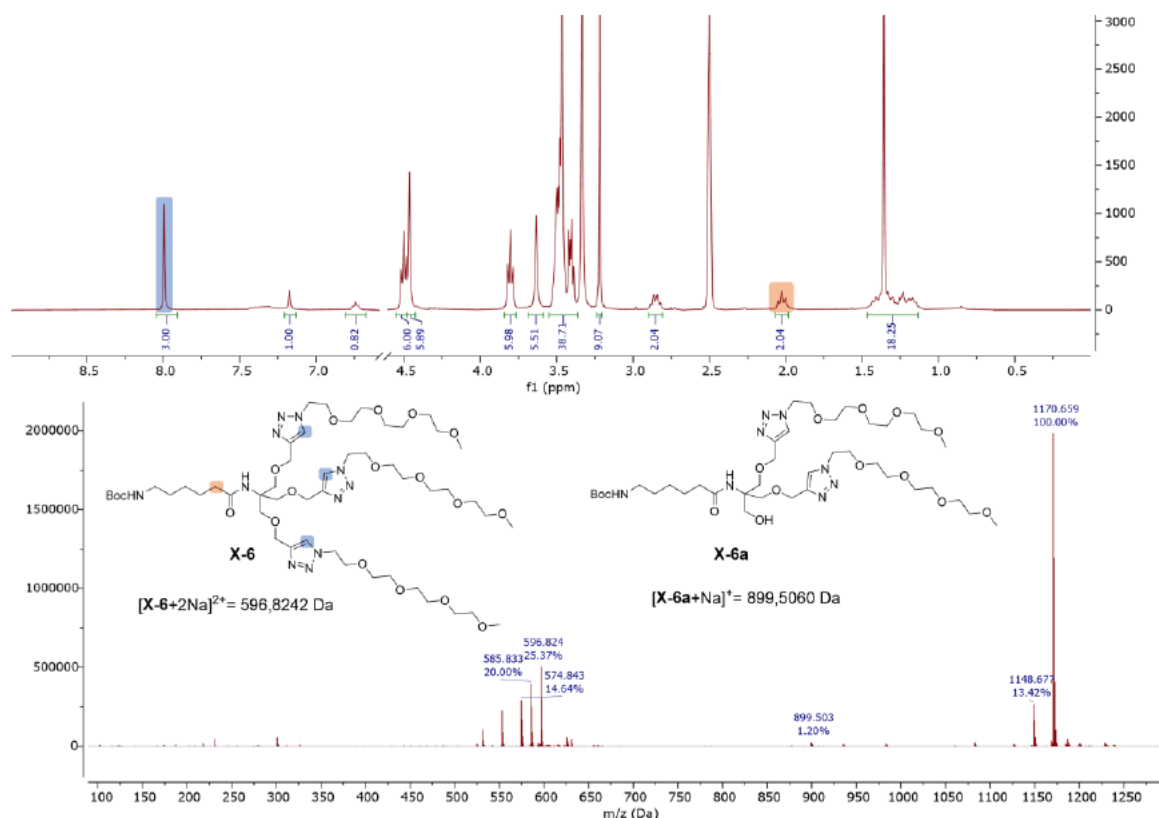


Abbildung 3.1: Oben: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Tetraethylglykol-Dendrons **X-6** in $\text{DMSO-}d_6$. Die vollständige Funktionalisierung kann an der Entstehung der drei Triazol-H-5-Protonen (blau) gezeigt werden. Unten: HR-TOF-MS durch Electrospray-Ionisierung (ESI) des isolierten Produkts **X-6** in Methanol. Das Produkt kann als einfach und zweifach geladenes Addukt detektiert werden. Ein zweifach funktionalisiertes Nebenprodukt **X-6a** kann gerade noch oberhalb der Detektionsgrenze gefunden werden ($m/z = 899,503$ Da).

Da sich die Verwendung der CuAAC zur Darstellung des Dendrons **X-6** als praktikabel herausgestellt hat, soll diese ebenfalls für ein mannosyliertes Dendron verwendet werden. Hierfür wird vom selben Trialkin **X-3** als verzweigende Einheit ausgegangen. Für die Einführung des Azids wird das Triethylenglykolmonotosylat **X-14** aus Kapitel 3.2 verwendet. Dieses ließ sich ebenfalls mit Natriumazid in Acetonitril in quantitativer Ausbeute in das Monoazid **X-15** überführen. Da die CuAAC eine chemoselektive Reaktion ist, besteht kein besonderer Anspruch an die Schutzgruppenchemie des verwendeten Mannosederivats. Deshalb wird auf den peracetylierten Thiomannopyranosid-Baustein **X-44** zurückgegriffen. In einer Glykosylierungsreaktion mit *N*-Iodsuccinimid (NIS), Silbertriflat und Trifluormethansulfosäure in DCM konnte das α -Anomer des Triethylenglykolmannopyranosid-Derivats **X-16** in einer Ausbeute von 50 % erhalten werden. Das Azid **X-16** wurde nun unter denselben Reaktionsbedingungen wie in der Darstellung des Tetraethylenglykol-Dendrons **X-6** in einer CuAAC mit dem Trialkin **X-3** umgesetzt. Überraschenderweise ist die Polarität der erhaltenen Verbindung **X-17** ($R_F = 0,00$ (SiO₂, CH:EA, 1:2)) deutlich höher als die der Ausgangsverbindungen **X-16** ($R_F = 0,44$ (SiO₂, CH:EA, 1:2)) und **X-3** ($R_F = 0,69$ (SiO₂, CH:EA, 1:2)) und liegt nicht zwischen diesen.

So wurde das Produkt in der Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie zunächst übersehen. Die Reinigung der Reaktionsmischung musste aufgrund der Polarität zusätzlich mittels MPLC (engl. *medium pressure liquid chromatography*) an einer C-18-Umkehrphase (A: H₂O, B: MeCN, grad. 30 %B zu 100 %B) durchgeführt werden. So konnte das Produkt **X-17** in einer Ausbeute von 66 % isoliert werden. Die vollständige Umsetzung kann ebenfalls durch Integration des ¹H-NMR-Spektrums (Abbildung 3.2, oben) gezeigt werden.

Für das Produkt **X-17** liegt die Methylengruppe in ϵ -Position der Aminohexansäure-Teilstruktur bei 3,06 ppm (Abbildung 3.2, orange) isoliert vor und eignet sich zur Normierung der Integrale. Das Signal der α -Position wird hier durch die Methylgruppen der Acetylschutzgruppen überlagert. Erneut bestätigt ein Integral von 2,98 eine dreifache Funktionalisierung des Trialkins **X-3**. HR-TOF-Massenspektrometrie der in Methanol gelösten Probe zeigt Addukte der zweifach und einfach geladenen Produktspezies. Es konnten die Addukte $[\mathbf{X-17+2H}]^{2+} = 982,9221$ Da, $[\mathbf{X-17+H+Na}]^{2+} = 993,9131$ Da, $[\mathbf{X-17+2Na}]^{2+} = 1004,9041$ Da, $[\mathbf{X-17+H}]^+ = 1964,8370$ Da und $[\mathbf{X-17+Na}]^+ = 1986,8189$ Da detektiert werden. Unvollständig funktionalisierte Spezies und andere Nebenprodukte konnten nicht nachgewiesen werden.

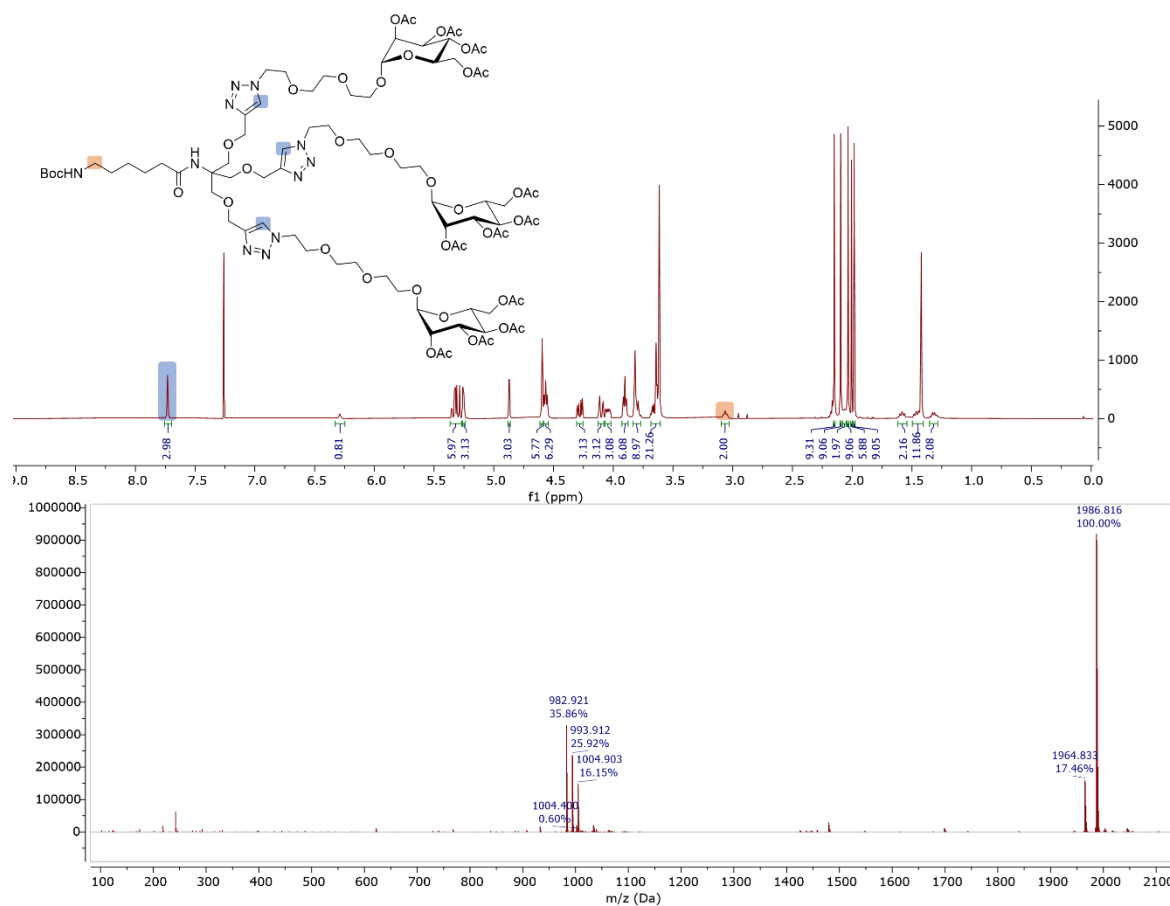


Abbildung 3.2: Oben: ^1H -NMR-Spektrum des Triethylglykollmannosid-Dendrons **X-17** in CDCl_3 . Die vollständige Funktionalisierung kann an der Entstehung der drei Triazol-H-5-Protonen (blau) gezeigt werden. Unten: HR-TOF-MS durch Electrospray-Ionisierung (ESI) des isolierten Produkts **X-17** in Methanol. Das Produkt kann als einfach und zweifach geladenes Addukt detektiert werden. In diesem Fall konnte kein Nebenprodukt in der isolierten Substanz nachgewiesen werden.

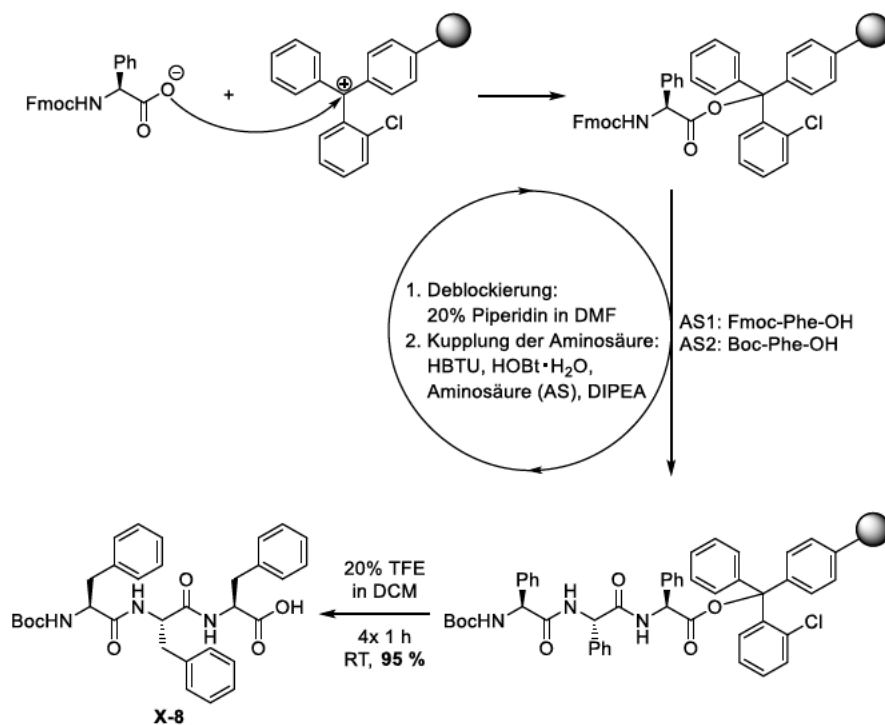
Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Click-Chemie die Synthese von löslichkeitsvermittelnden Dendronen vereinfacht werden konnte. Das verzweigende Motiv konnte durch die Einführung dreier Alkylgruppen in hohen Ausbeuten vollständig substituiert werden. Das so modifizierte Tris-Derivat eignet sich für eine Kupfer(I)-katalysierte-Azid-Alkin-Cycloaddition mit Azidkomponenten. Auf den analogen Ansatz ein Triazid-Derivat darzustellen, das mit alkinfunktionalisierten Bausteinen versehen werden kann, wurde bewusst verzichtet. Aufgrund der hohen Anzahl an Stickstoffatomen in der resultierenden Verbindung wurde sie als potenziell explosiv eingeschätzt. Die benötigten Azidderivate konnten einfach durch Substitution der Tosylate hergestellt werden. Die Funktionalisierung durch CuAAC erfolgte vollständig und in hohen Ausbeuten ohne das Auftreten aufwendiger Trennprobleme. Die hervorragende Chemospezifität der Konjugationsmethode erlaubt die Einführung einer großen Bandbreite an Funktionalitäten und minimiert die nötige Schutzgruppenchemie für die Einführung.

3.4 Synthese der Peptidamphiphile

Nachdem die hydrophile dendritische Einheit der Amphiphile erfolgreich synthetisiert werden konnte, soll nun auf die hydrophobe Einheit eingegangen werden. Diese bildet neben dem Spacer, der bereits mit dem Dendron verknüpft wurde, die Tri-L-Phenylalanin-Sequenz. Die Peptide sorgen durch eine Vielzahl nichtkovalenter Wechselwirkungen für die Assemblierung der resultierenden Peptidamphiphile. L-Phenylalanin stellt dabei eine der hydrophobsten natürlichen Aminosäuren dar.^[196] Sie ist maßgeblich für den hydrophoben Effekt der inneren Teilstruktur der Peptidamphiphile verantwortlich. Der hydrophobe Effekt führt zu einem Zusammenlagern der hydrophoben Bereiche, was mit einem Energiegewinn einhergeht, der meist sowohl entropischer als auch enthalpischer Natur ist.^[197,198] Er trägt einen großen Anteil an der Stabilität und damit auch an der Kinetik und Dynamik der erhaltenen supramolekularen Polymere im wässrigen Medium bei. Dies ist vergleichbar mit der Stabilität der DNA-Doppelhelix, deren wasserstoffbrückenbindende Basenpaare im Inneren des Doppelstrangs in einer hydrophoben Teilstruktur abgeschirmt sind. Diese beiden Interaktionen sind hauptverantwortlich für die Stabilität der Konstrukte. Entgegen der verbreiteten Meinung, der Hauptanteil der DNA-Stabilität wird durch die Wasserstoffbrückenbindungen der WATSON-CRICK-Basenpaare verursacht, wurde gezeigt, dass hydrophobe Wechselwirkungen den größten Einfluss haben.^[24,199,200] L-Phenylalanin besitzt neben des hydrophoben Charakters eine hohe Tendenz zur Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen.^[167,168] Innerhalb der hydrophoben Domäne des Peptidamphiphils kann das Tripeptid so intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zum Tripeptid des nächsten Amphiphils im kolumnaren Stapel ausbilden. Da drei dieser Tri-L-phenylalanineinheiten mit dem zentralen Benzoltricarboxamids verknüpft werden, enthält die resultierende Struktur zwölf Wasserstoffbrücken im hydrophoben Bereich der Peptidamphiphile.

Zur Synthese des Tripeptids wurde auf die Festphasenpeptidsynthese zurückgegriffen. Diese wurde nach dem Fmoc-Protokoll von ATHERTON und SHEPPARD durchgeführt.^[201] Als feste Phase wurde ein 2-Chlortritylchlorid-Polystyrolharz verwendet. Das Harz konnte durch eine Substitutionsreaktion mit der ersten Aminosäure beladen werden. Hierbei wurde der C-Terminus der amingeschützten Aminosäure zur Reaktion gebracht. Unter basischen Bedingungen greift das Carboxylat das Tritylkation nukleophil in einer S_N1 -Reaktion an, nachdem das Chloridion als Fluchtgruppe abgespalten wurde (Schema 3.13). Zur Blockierung nicht substituierter Tritylchlorid-Gruppen am Harz wurde danach mit Methanol substituiert. Methanol ist deutlich nukleophiler sowie sterisch weniger gehindert als die zu kuppelnde Aminosäure und blockiert so verlässlich nicht substituierte Reaktionsstellen des Harzes. Nach dieser Beladung wurde das Harz in der automatisierten Festphasensynthese eingesetzt. In einem Kupplungszyklus wird hier zunächst die Fmoc-Schutzgruppe durch eine 20 Vol.-% Piperidinlösung in DMF deblockiert. Die Abspaltungsreaktion verläuft über einen E1cb-Mechanismus, bei dem Piperidin die 9-Position der Fluorenylgruppe deprotoniert. Daraufhin eliminiert

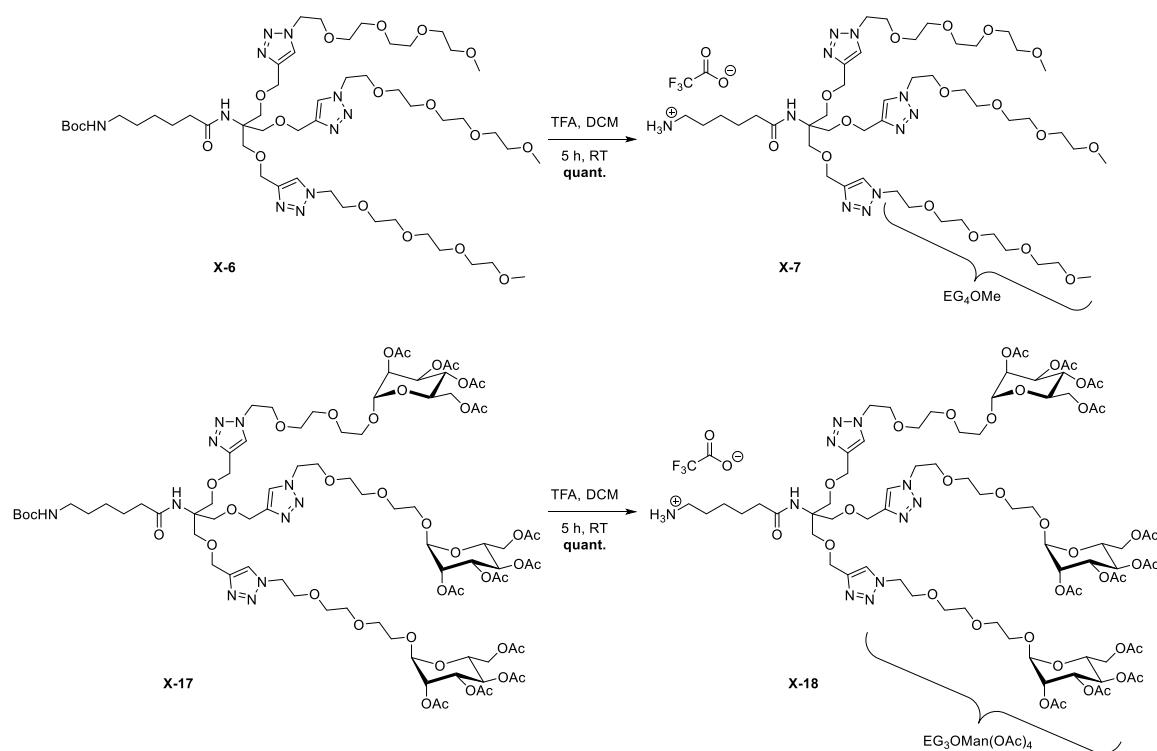
Dibenzofulven und die Carbaminsäure decarboxyliert, um das Amin freizusetzen. Das freie Amin kann nun mit der nächsten Aminosäure der Sequenz gekuppelt werden. Dies erfolgt über eine HBTU-vermittelte Amidierung. Auf den Mechanismus dieser Kupplungsreaktion wird nachfolgend in Schema 3.15 eingegangen. Auf einen Capping-Schritt wurde in dieser Festphasensynthese verzichtet, da die Kupplungseffizienz der Aminosäurebausteine sehr hoch ist und nur zwei Aminosäuren gekuppelt werden müssen.



Schema 3.13: Schema der Syntheseführung der Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll. Gezeigt ist die Beladung des Harzes mit der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure sowie der Zyklus der Kupplung der Aminosäuren an der festen Phase. Außerdem ist die Abspaltung des Peptids durch Trifluorethanol zum Erhalt des Tripeptids Boc-FFF-OH (X-8) dargestellt.

Der Kupplungszyklus, bestehend aus Deblockierung und Kupplung der Aminosäure, wurde zuerst mit Fmoc-Phe-OH und danach mit Boc-Phe-OH durchgeführt. Die Fmoc-geschützte Aminosäure dient als Standard-Aminosäurebaustein, der nach Fmoc-Protokoll basenlabil entschützt werden kann. Die Boc-geschützte Aminosäure kann nicht weiter verlängert werden, da sie eine säurelabile Schutzgruppe trägt. Die Boc-Schutzgruppe ist aber die favorisierte Schutzgruppe in der nachfolgenden Amidierungsreaktion. So kann die Boc-geschützte Aminosäure als letzte N-terminale Aminosäure eingeführt werden. Eine Abspaltung des Tripeptids von der festen Phase ist dank der 2-Chlortrityl-Modifizierung des Harzes möglich. 2-Chlortrityl-Derivate sind deutlich säurestabiler als die unsubstituierte Trityl-Modifikation eines Harzes.^[202] So konnte die Abspaltung einer Carboxygruppe von der 2-Chlortritylgruppe bereits durch die Verwendung von 20 % der schwachen Säure Trifluorethanol (TFE) erfolgen. Die zuletzt eingeführt Boc-Schutzgruppe bleibt unter den schwach sauren Bedingungen unversehrt.

Zur Darstellung der Peptidamphiphile wurde nun erneut auf die wiederholte Peptidknüpfung durch Deblockierung und darauffolgende Kupplung der Aminosäure zurückgegriffen. Diese wiederholten Amidierungen wurden hier aber mit Boc-geschützten Aminen und vollständig in Lösung durchgeführt. Um die Kupplung der Dendrone an die hydrophobe Peptidsequenz **X-8** zu ermöglichen, muss die Boc-Schutzgruppe entfernt werden. Diese wurde ebenfalls unter sauren Bedingungen abgespalten, wobei auf Trifluoressigsäure (TFA) als weitaus stärkere Säure zurückgegriffen wurde. Die Reaktionsgleichung dieser Reaktionen ist in Schema 3.14 dargestellt. Eine vollständige Deblockierung der Aminfunktion konnte bei Raumtemperatur nach fünf Stunden erreicht werden. Durch die Verwendung von TFA wurde das Trifluoressigsäure-Ammoniumsalz der Amine **X-7** und **X-18** erhalten.

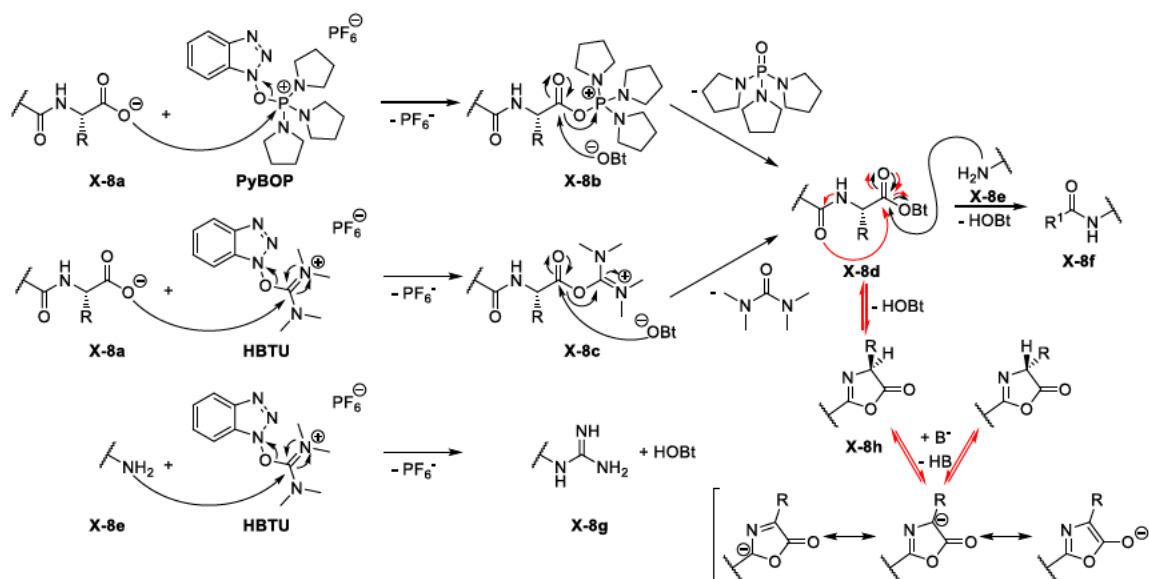


Schema 3.14: Reaktionsgleichung der Boc-Entschützung der „click“-baren Dendrone **X-6** und **X-17** aus Kapitel 3.3 durch Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan.

Die Ammoniumsalze können direkt in der nächsten Amidierungsreaktion mit dem Tripeptid **X-8** verwendet werden. Hierbei ist notwendig, ein weiteres Äquivalent der Base hinzuzusetzen, um das Ammoniumion ebenfalls zu deprotonieren. Gegenüber der Amidierungsreaktionen an der festen Phase wurde hier eine Amidierung durch Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) gewählt. Der Mechanismus der PyBOP-vermittelten Amidierung als auch der Amidierung mittels HBTU ist in Schema 3.15 demonstriert.

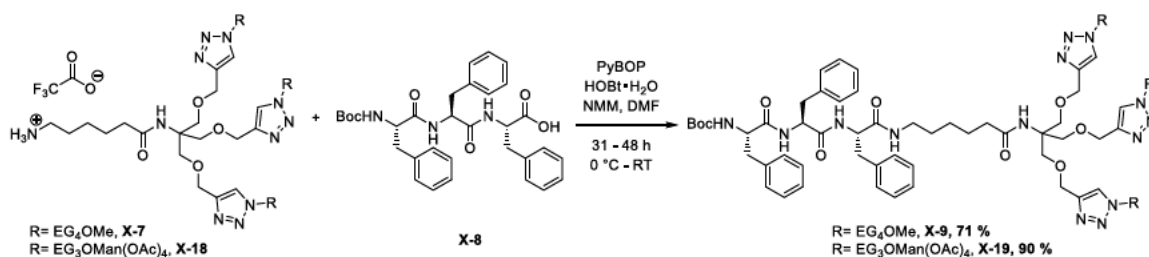
PyBOP ist eine Variante des zuvor von CASTRO *et al.* etablierten Kupplungsreagenz Benzotriazolyl-oxytris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat (BOP).^[203]

Obwohl BOP ein besonders effizientes Kupplungsreagenz ist, bildet es als Koppelprodukt Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPTA), welches als stark krebserregend eingestuft ist. PyBOP hingegen produziert das weniger toxische Tripyrrolidinophosphorsäuretriamid (TPPA).^[203,204] Die Aktivierung der Carbonsäure verläuft durch den nukleophilen Angriff des Carboxylats **X-8a** an das Phosphoniumion des PyBOPs. Dabei entsteht das Acylphosphoniumion **X-8b** und das 1-Oxybenzotriazolyl (-OBt) -Anion. Das Acylphosphoniumion **X-8b** stellt bereits einen aktivierten Ester dar, der schnell mit dem OBt-Anion reagiert und den OBt-Ester **X-8d** generiert. Die Darstellung des dabei abgespaltene TPPAs stellt die Triebkraft dieser Reaktion dar.^[205] Das aktivierte Intermediat **X-8d** kann dann nukleophil vom Amin **X-8e** angegriffen werden, um das Amid **X-8f** zu erzeugen, während HOBt abgespalten wird. Diese Reaktion verläuft mit primären Aminen in der Regel schnell. Um dennoch eine Epimerisierung zu verhindern, wird der Reaktion HOBt zugesetzt.^[206,207] Dies verschiebt das Gleichgewicht der Oxazolombildung, die zur Epimerisierung führt (Schema 3.15, rot), auf die Seite des OBt-Aktivesters, der zum gewünschten Amid reagieren kann.^[205] Eine Epimerisierung durch die direkte Abstraktion des Protons in α -Position der Aktivester **X-8b**, **X-8c** und **X-8d** ist aber auch denkbar. Die Azidität des α -Protons wird durch die Überführung in den Aktivester gegenüber des Carboxylats erhöht. Außerdem wurde die moderate und nicht-nukleophile Base *N*-Methylmorpholin (NMM) verwendet. Die geringe Basizität gegenüber DiPEA soll die Deprotonierung der potenziell gebildeten Oxazolonspezies verringern. Die HBTU-vermittelte Amidierung verläuft über einen ähnlichen Mechanismus bei der das Carboxylat **X-8a** den Uroniumkohlenstoff nukleophil angreift und eine Acyluroniumion **X-8c** unter Abspaltung des OBt-Anions bildet. Dieser Aktivester wird ebenfalls schnell in den OBt-Ester **X-8d** überführt, der mit dem Amin **X-8e** zum Amid **X-8f** reagiert. Triebkraft der Reaktion stellt die Bildung des Tetramethylharnstoffs (TMU) dar. Gegenüber der Phosphonium-Variante PyBOP besitzt das Kupplungsreagenz HBTU keine erhöhte Oxophilie, weshalb das Uroniumion auch durch das nukleophilere Amin **X-8e** angegriffen werden kann. Dabei bildet sich das Guanidin **X-8g** als Nebenprodukt.^[205] Deshalb ist in einer Eintopf-Synthese die Voraktivierung der Carboxylkomponente mit dem Kupplungsreagenz und den Additiven zum Aktivester notwendig, bevor die Aminkomponente hinzugegeben wird. Bei Amidierungen in Lösung führt das dazu, dass bei unvollständiger Umsetzung der Edukte kein zusätzliches Kupplungsreagenz mehr hinzugegeben werden kann. Dieser Nachteil spielt bei der Peptidknüpfung an der festen Phase eine untergeordnete Rolle, da die Abtrennung der Reagenzien durch Filtrations- und Waschschrte möglich ist. So kann derselbe Kupplungsschritt wiederholt werden, um den Umsatz der Kupplung zu erhöhen. Da HBTU deutlich preiswerter ist als PyBOP und in der SPPS ein hoher Überschuss der Kupplungsreagenzien und Aminosäuren verwendet wird, wird in Amidierungen an der festen Phase auf HBTU zurückgegriffen.



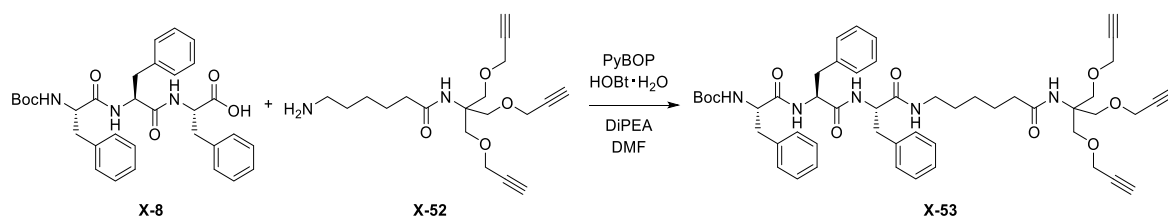
Schema 3.15: Reaktionsmechanismus der Amidierungsreaktion mittels der Kupplungsreagenzien 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) sowie der Nebenreaktion unter Verwendung von HBTU mit dem Amin X-8e zum Guanidin X-8g. Außerdem ist die Epimerisierung über das Oxazolone X-8h gezeigt (rot).

In einer Eintopf-Reaktion der PyBOP-vermittelten Amidierung kann das Amin neben der Carbonsäure zu Beginn der Reaktion vorliegen. Weitere Zugabe von PyBOP ist möglich, um den Umsatz der Edukte zu erhöhen. Deshalb wurde für Amidierungen in Lösung PyBOP verwendet. Die linearen Peptidamphiphile X-9 und X-19 konnten durch die Amidierung der Dendrone X-7 und X-18 mit dem Tripeptid X-8 in guten Ausbeuten erhalten werden.



Schema 3.16: Reaktionsgleichung der PyBOP-vermittelten Amidierung der Dendrone X-7 und X-18 mit dem hydrophoben Tripeptid X-8 zu den linearen Peptidamphiphilen X-9 und X-19.

Die PyBOP-vermittelte Amidierung mit Boc-geschützten, chiralen Aminosäuren ist die in dieser Arbeit am häufigsten durchgeführte Reaktion. Sie weist einige Anforderungen und Besonderheiten auf, die im Folgenden kurz dargelegt werden sollen. In Schema 3.17 ist die PyBOP-vermittelte Amidierung des Trialkin-Peptidkonjugats X-53 mit dem Boc-geschützten Triphenylalanin X-8 dargestellt.



Schema 3.17: Reaktionsgleichung der PyBOP-vermittelten Amidierung von **X-53** aus dem Tripeptid **X-8** und dem Trialkin **X-52**.

Die Amidierung an Phenylalanin des Tripeptids **X-8** mit primären Aminen wie **X-52**, aber auch die Amidierung mit dem Dendronen **X-7** und **X-18** (vgl. Schema 3.16), hat sich als epimerisierungsfähig herausgestellt. Hierbei können die Aktivester des dritten Phenylalanins (Phe3), wie in Schema 3.15 gezeigt, durch eine Base epimerisieren. Bei achtsamer Reaktionsführung kann das Peptidkonjugat mit der Stereoinformation SSS erhalten werden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **X-54** mit der korrekten Stereoinformation SSS ist in Abbildung 3.3 A) gezeigt. Hier ist darauf hinzuweisen, dass durch den sterischen Anspruch der *tert*-Butylgruppe der Boc-Schutzgruppe eine Rotationsbarriere in der *cis-trans*-Isomerie des Carbamats bei 296 K vorliegt. Dies führt zur Detektion von zwei Signalsätzen im ^1H -Spektrum in $\text{DMSO-}d_6$ bei 296 K, die anhand der Amid- und Carbamatprotonen deutlich werden. Die Signale des *trans*-Carbamats sind in Blau hinterlegt und die Signale des *cis*-Carbamats in Orange. Das Signal des Carbamatprotons des *trans*-Carbamats (*trans*- NH^{Phe1}) liegt bei 6,89 ppm, während das Signal des *cis*-Carbamatprotons (*cis*- NH^{Phe1}) bei 6,44 ppm liegt. Der Unterschied der chemischen Verschiebung der Isomere liegt bei 0,45 ppm. Der Unterschied der chemischen Verschiebung der Amidprotonen des zweiten und dritten Phenylalanins sind ebenfalls zu erkennen, jedoch weniger stark ausgeprägt, je weiter entfernt die Aminosäure in der Peptidsequenz auftritt. So weisen die Signale der Amidprotonen des zweiten Phenylalanins (Phe2) bei 7,89 ppm bzw. 7,96 ppm nur noch einen Unterschied der chemischen Verschiebung von 0,07 ppm auf. Die Signale der Amidprotonen des dritten Phenylalanins (Phe3) bei 8,21 ppm bzw. 8,25 ppm haben nur noch einen Unterschied von 0,04 ppm. Das Triplett bei 7,81 ppm, das durch das Amidproton der Aminohexansäure (NH^{Ahx}) hervorgerufen wird, weist keinen auflösbaren Unterschied der chemischen Verschiebung auf. Diese Beobachtung wurde ebenfalls von STRAßBURGER und URSCHBACH protokolliert.^[52,53] STRAßBURGER konnte in temperaturabhängigen NMR-Experimenten zeigen, dass die Signale der Rotamere bei höheren Temperaturen in einen Signalsatz koaleszieren, wenn die thermische Energie die Rotationsbarriere und die Geschwindigkeit der Umwandlung der Rotamere die Zeitskala der NMR-Messmethode übersteigt.^[52] Der doppelte Signalsatz der Rotamere sollte nicht als Indikator für das Auftreten von Epimerisierung während der Peptidkupplung fehlinterpretiert werden.

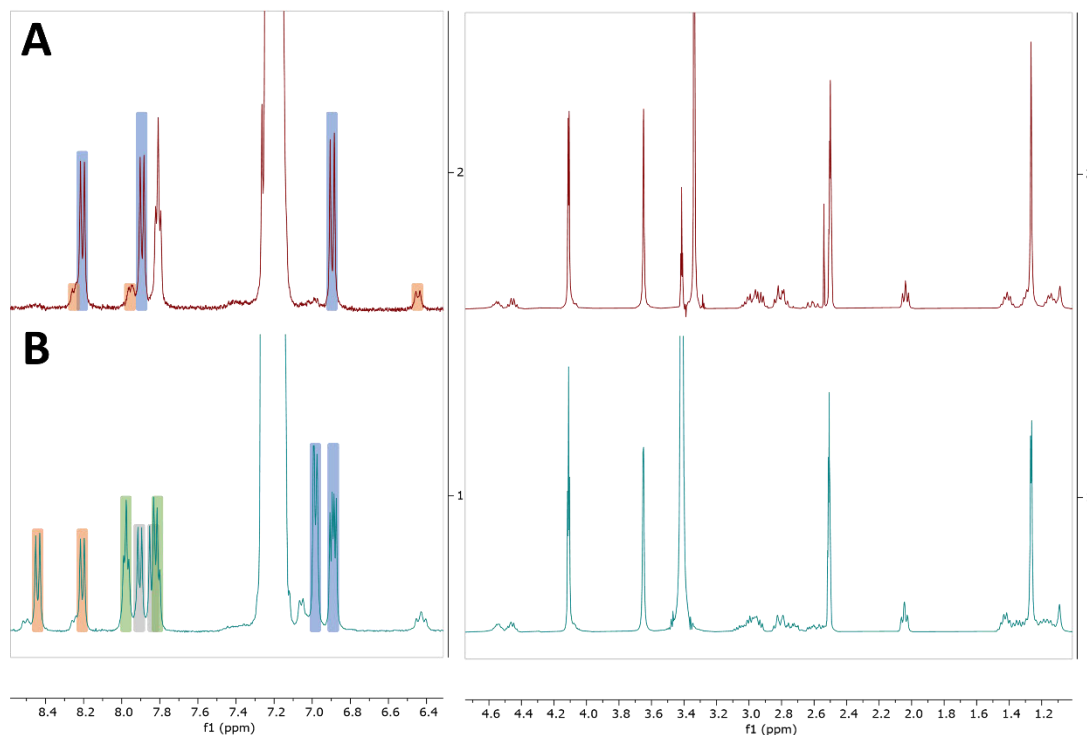
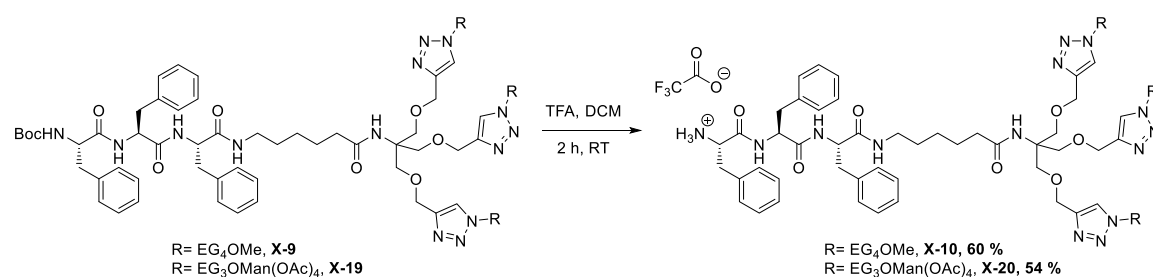


Abbildung 3.3: A) ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **X-53** in $\text{DMSO-}d_6$. Signale der Amidprotonen des *trans*-Carbamats sind blau und die Signale des *cis*-Carbamats sind in Orange dargestellt. B) ^1H -NMR-Spektrum eines Racemats der Epimere mit der Stereoinformation *SSS* und *SSR* der Verbindung **X-53** in $\text{DMSO-}d_6$. Die gleichen Signale der Amidprotonen der Epimere sind in der gleichen Farbe dargestellt.

Bei einer Reaktionsführung der Amidierung zu Verbindung **X-53** (Schema 3.17), in der sowohl die Zugabe des Additivs HOBt- H_2O vergessen wurde, als auch ein Überschuss der Base DiPEA verwendet wurde, wurde ein Racemat der möglichen Epimere *SSS* und *SSR* des Peptidkonjugats **X-53** erhalten. Das ^1H -NMR-Spektrum des Gemischs in $\text{DMSO-}d_6$ bei 296 K ist in Abbildung 3.3 B) dargestellt. In diesem Spektrum ist neben der zusätzlichen Signale für das *cis*-Rotamer zusätzlich ein weiterer Signalsatz der Amid- und Carbamatprotonen zu sehen. Hier sind die Signale der Epimere, die durch das gleiche Proton in der Struktur hervorgerufen werden, in der gleichen Farbe dargestellt. Auffällig ist hier, dass die Signale in der direkten Umgebung der racemisierten Stelle in der Struktur der Verbindung den größten Unterschied der chemischen Verschiebung aufweisen. Das Amidproton der Aminohexansäure (NH^{Ahx} , grün) und des dritten Phenylalanins (NH^{Phe3} , orange) zeigen den größten Unterschied, während die Differenz mit dem zweiten Phenylalanin (NH^{Phe2} , grau) und dem ersten Phenylalanin (NH^{Phe1} , blau) abnimmt. Da die Rotamere durch die Boc-Gruppe am *N*-Terminus hervorgerufen wird und eine Epimerisierung am aktivierten *C*-Terminus der zu kuppelnden Aminosäure auftreten würde, lassen sich diese beiden Phänomene durch eine genaue NMR-analytische Betrachtung voneinander unterscheiden.

Um eine Epimerisierung zu vermeiden, ist die Zugabe des Additivs HOBt·H₂O unabdingbar. Zudem sollte eine Base nur in äquimolaren Mengen zur Deprotonierung der Carbonsäure zugegeben werden, um die Deprotonierung des gebildeten Aktivesters in α -Position zu vermeiden. Wird das TFA-Ammoniumsalz der Aminkomponente der Kupplung verwendet, muss ein weiteres Äquivalent Base verwendet werden, um das nukleophile Amin zu generieren. Da die TFA-Ammoniumsalze der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen nur schlecht kristallisieren, ist der Restgehalt der Trifluoressigsäure im öligen Produkt nur schwierig einzuschätzen. Dadurch wird die genaue Zugabe der Base in der Kupplungsreaktion erschwert. Es empfiehlt sich das TFA-Salz in das Hydrochlorid zu überführen, indem das Öl mehrfach mit 0.1 M Salzsäure gelöst oder suspendiert wird und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt wird. Die getrockneten Hydrochloride ergeben häufig amorphe Feststoffe, die keinen Überschuss Salzsäure enthalten. Eine weitere Möglichkeit ist die Überführung der Ammoniumspezies in das freie Amin durch mehrfache wässrige Aufarbeitung mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung. In diesem Fall wird kein weiteres Äquivalent Base für die Amidierung benötigt. Die Zugabe der Base in der Amidierungsreaktion sollte schrittweise und unter Eiskühlung stattfinden. Das reduziert die Epimerisierung sowie Nebenreaktionen wie die Bildung des Oxazolons **X-8h**.^[205] DiPEA ist eine farblos, klare Flüssigkeit, die sich bei längerer Lagerung gelblich verfärbt. Es sollte nur DiPEA hoher Reinheit verwendet werden, da dies die Ausbeute komplizierter Kupplungen ansonsten massiv beeinträchtigt. Hierfür kann DiPEA über Kaliumhydroxid destilliert werden.

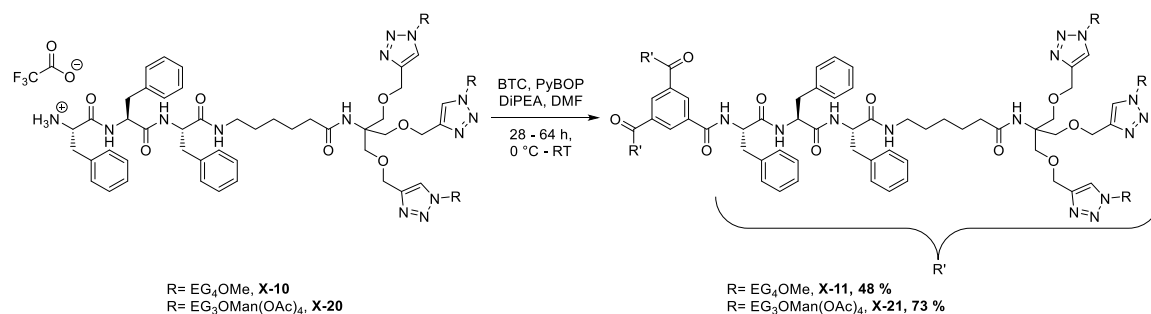
Zur Fertigstellung der C₃-symmetrischen Peptidamphiphile müssen die linearen Peptidamphiphile **X-9** und **X-19** mit der Trimesinsäure (BTC) als dreiwertige Carbonsäure gekuppelt werden. So wird das BTA-Motiv für diese supramolekularen Monomere eingeführt. Hierfür müssen die N-Termini der linearen Peptidamphiphile **X-9** und **X-19** wiederum deblockiert werden.



Schema 3.18: Reaktionsgleichung der Boc-Entschützung der linearen Peptidamphiphile **X-9** und **X-19** zu den TFA-Salzen **X-10** und **X-20**.

Hierzu wurde erneut TFA in Dichlormethan verwendet. Die vollständige Entschützung konnte bei Raumtemperatur auch bereits nach zwei Stunden erreicht werden. Eine Verlängerung der Reaktionszeit wurde vermieden, um Nebenreaktionen zu vermindern. Da es sich im nächsten Kupplungsschritt um eine Mehrfachfunktionalisierung handelt, ist

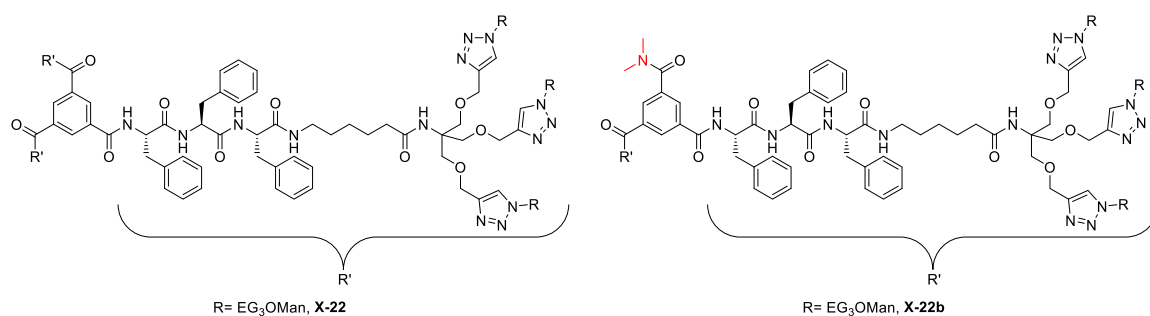
die chemische Reinheit der Produkte **X-10** und **X-20** von hoher Bedeutung. Deshalb wurden nach der Entfernung der Lösemittel die Rohprodukte mittels semipräparativer HPLC an einer C18-Umkehrphase gereinigt. Nach Vereinigung vollständig separierter Fraktionen konnte eine Ausbeute von 60 % bzw. 54 % erreicht werden (Schema 3.18).



Schema 3.19: Reaktionsgleichung der PyBOP-vermittelten Amidierung der deblockierten linearen Peptidamphiphile **X-10** und **X-20** an die Trimesinsäure (BTC) zur Synthese der C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile **X-11** und **X-21**.

In der nachfolgenden PyBOP-vermittelten Peptidkupplung wird ein Äquivalent der trifunktionellen Trimesinsäure mit drei Äquivalenten der linearen Peptidamphiphile **X-10** und **X-20** zur Reaktion gebracht. Da die Carbonsäurekomponente dieser Kupplung nicht chiral ist, kann auf eine Zugabe des Additivs HOBt·H₂O verzichtet werden. Die Reaktion verläuft dreifach nacheinander über den in Schema 3.15 beschriebenen Mechanismus. So konnten die C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile **X-11** mit 48 %iger und **X-21** mit 73 %iger Ausbeute synthetisiert werden.

Die besondere Herausforderung dieser Reaktion ist die Vermeidung von Nebenreaktionen. Ähnlich der Dreifachfunktionalisierung der dendritischen Motive in Kapitel 3.1, 3.2 und 3.3 führt eine Nebenreaktion einer Carbonsäurefunktion zur Blockierung dieser Stelle und eine vollständige Funktionalisierung ist nicht mehr möglich. Die Kupplung mit den linearen Peptidamphiphilen **X-10** und **X-20** verläuft aufgrund deren sterischer Hinderung langsam, während die sterische Abschirmung der Trimesinsäure mit jeder weiteren Kupplungsreaktion mit den linearen Peptidamphiphilen zunimmt. Die prominenteste Nebenreaktion, die in diesem Kontext beobachtet werden konnte, ist die Bildung von Dimethylamiden. Die Nebenverbindung konnte gut in der isolierten Produktmischung für Verbindung **X-22** nachgewiesen werden (Schema 3.20). Abbildung 3.4 A) zeigt das MALDI-TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*)-Massenspektrum aus einer α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure (CHCA)-Matrix. Neben den Addukten des Produkts **X-22** [**X-22**+Na]⁺ = 5584,17 Da (calc. 5583,55) und [**X-22**+K]⁺ = 5599,58 Da (calc. 5599,52) konnten die Addukte des Dimethylamid **X-22b** [**X-22b**+Na]⁺ = 3827,63 Da (calc. 3827,75) und [**X-22b**+K]⁺ = 3843,68 Da (calc. 3843,72) gefunden werden. Die Strukturformeln der Verbindungen sind in Schema 3.20 dargestellt.



Schema 3.20: Strukturformeln des C₃-symmetrischen Peptidamphiphils nach der Entschützung der Acetylgruppen der Mannoseeinheiten **X-22** sowie des Dimethylamidnebenprodukts **X-22b** aus der PyBOP-vermittelten Amidierungsreaktion.

Zudem sind die Methylgruppen durch NMR-Spektroskopie aus der Produktmischung nachweisbar. Abbildung 3.4 B) zeigt das ¹H-NMR-Spektrum des Gemischs in DMSO-*d*₆. Durch die Vielzahl der Wasserstoffatome in den Verbindungen kann das Vorliegen zweier Substanzen nur durch die Verbreiterung der Signale wahrgenommen werden. Der vergrößerte Spektrenausschnitt zwischen 3,00 ppm und 2,75 ppm zeigt jedoch die zusätzlich detektierten Singulets, die durch die Methylgruppen des Dimethylamids verursacht werden. Deutlicher können diese Signale durch 2D-NMR-Spektroskopie dargestellt werden. Im ¹H-¹³C-HSQC (engl. *hetero single quantum coherence*)-Spektrum der Produktmischung (Abbildung 3.4 C)) können die Signale der Methylgruppen (rot) leicht von überlagernden Signalen der Methylengruppen (blau) der β-Position von Phenylalanin (Phe^β) und der ε-Position der Aminohexansäure (Ahx^ε) unterschieden werden. Dies liegt am Vorzeichen der Signale in diesem NMR-Experiment. CH₃- und CH-Gruppen erzeugen ein Signal mit positivem Vorzeichen (rot), während CH₂-Gruppen ein negatives Vorzeichen hervorrufen (blau).^[65]

Die Quelle für Dimethylamin für diese Nebenreaktion ist das Lösemittel DMF. In der Literatur sind zwei mögliche Wege der Bildung von Dimethylamiden diskutiert.^[208–212] Zum einen kann Dimethylamin als Zerfallsprodukt des DMFs unter Generation von Kohlenstoffmonoxid entstehen. Das Dimethylamin kann unter den günstigen Reaktionsbedingungen der Kupplungsreaktion an die aktivierte Carbonsäure gekuppelt werden. Da *in situ* generiertes Dimethylamin sehr nukleophil und wenig sterisch gehindert ist, reagiert das kleine Amin schnell gegenüber dem linearen Peptidamphiphil. Zum anderen besteht die Möglichkeit der direkten Reaktion des Aktivesters **X-11a** mit dem Lösemittel DMF. Der Reaktionsmechanismus ist in Schema 3.21 dargestellt. Das hypothetische Intermediat **X-11b** bildet dann durch Decarboxylierung das Dimethylamid **X-11c**.

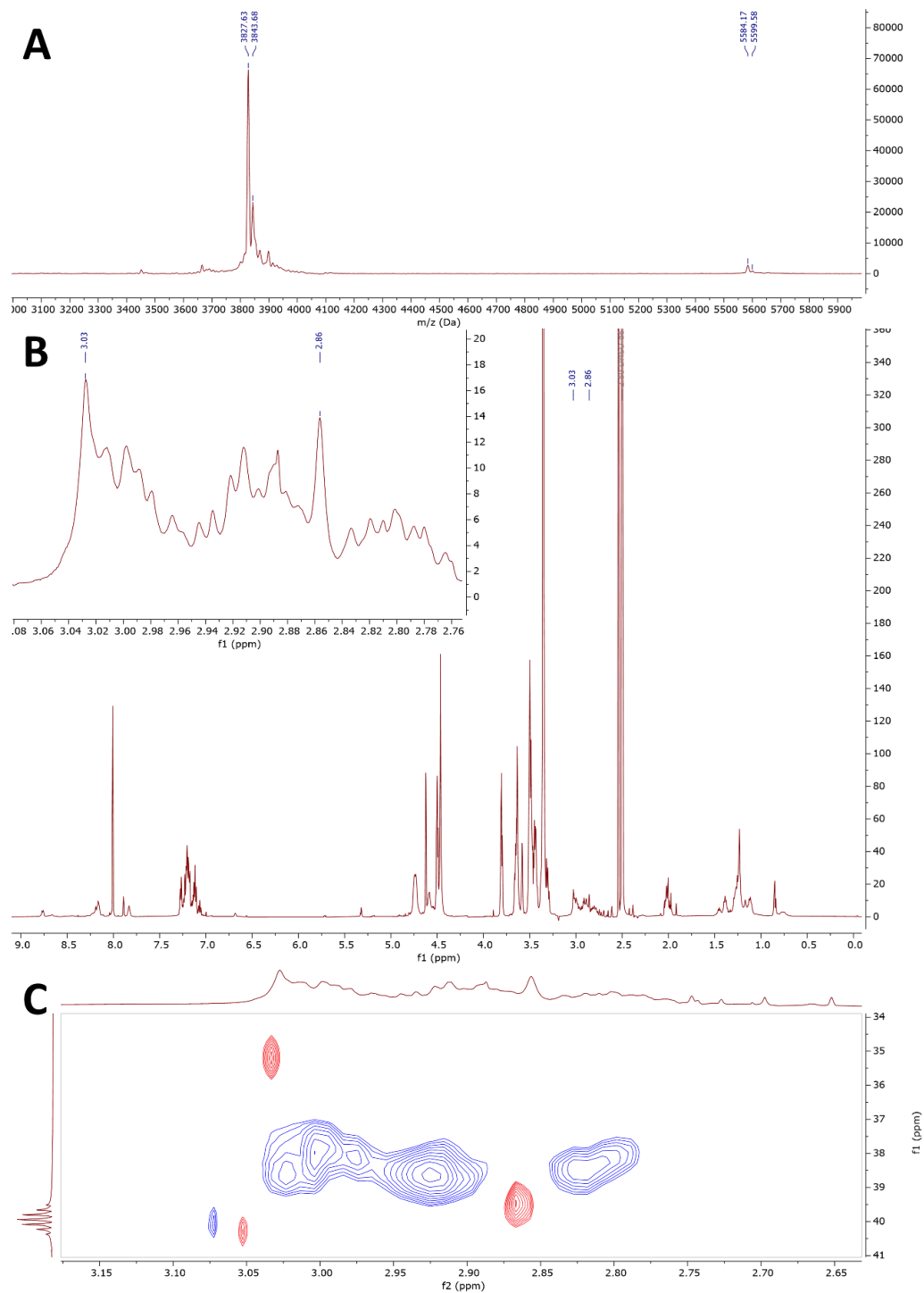
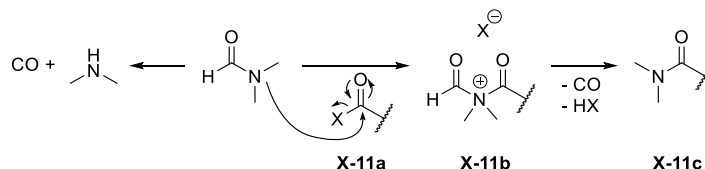


Abbildung 3.4: A) MALDI-TOF Massenspektrum (CHCA) der isolierten Produktmischung der Verbindung **X-22**. Detektiert wurden die Addukte der Dimethylamid-Nebenverbindung **X-22b** $[\text{M}'+\text{Na}]^+= 3827,63 \text{ Da}$ (calc. 3827,75) und $[\text{M}'+\text{K}]^+= 3843,68 \text{ Da}$ (calc. 3843,72) sowie die Addukte des Produkts **X-22** $[\text{M}+\text{Na}]^+= 5584,17 \text{ Da}$ (calc. 5583,55) und $[\text{M}+\text{K}]^+= 5599,58 \text{ Da}$ (calc. 5599,52). B) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der isolierten Produktmischung der Verbindung **X-22** in $\text{DMSO-}d_6$. Der eingerückte Spektrenausschnitt zeigt die zwei Singulets der Methylgruppen des Dimethylamids in der Produktmischung. C) $^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC-NMR}$ -Spektrum der isolierten Produktmischung der Verbindung **X-22** in $\text{DMSO-}d_6$ zeigt die Signale der Methylgruppen (CH_3 , rot) des Dimethylamids in entgegengesetztem Vorzeichen zu den Signalen der Methylengruppen (CH_2 , blau), die die Signale überlagern.

Um das Auftreten dieser Nebenreaktion zu verhindern, hat es sich bewährt, das Lösemittel DMF vor der Reaktion durch Eintrag eines Stroms von Argon durch die Flüssigkeit zu entgasen. Dadurch werden flüchtige Bestandteile wie das Dimethylamin aus dem Lösungsmittel ausgetrieben. Die Reaktionen selbst wurden dann unter Ausschluss von Luft und Lichteinstrahlung zur Reaktion gebracht, um die Degradation von DMF zu vermeiden. Selbige Beobachtungen wurden ebenfalls von URSCHBACH diskutiert.^[53]



Schema 3.21: Hypothetische Mechanismen der Bildung von Dimethylamin aus DMF, welches zum Dimethylamid weiterreagieren kann, und der direkten Reaktion von DMF mit dem Aktivester **X-11a** zum Dimethylamid **X-11c**.^[210]

Zusätzlich konnte, wegen der langsamen Reaktion, eine Nebenreaktion mit dem Trifluoressigsäureamid, das als Gegenion des Ammoniumsalzes auftritt, beobachtet werden. Dieses konnte durch HR-Massenspektrometrie (ESI, pos., MeOH) in einer Produktmischung der Verbindung **X-11** nach der Reaktion nachgewiesen werden. Das Massenspektrum und die Strukturformel des Trifluoressigsäureamids **X-11b** ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Neben den Addukten $[\mathbf{X-11}+3\text{H}+\text{Na}]^{4+} = 1162,6189 \text{ Da}$ (calc. 1162,6178 Da), $[\mathbf{X-11}+2\text{H}+\text{Na}]^{3+} = 1549,8227 \text{ Da}$ (calc. 1549,8213 Da) und $[\mathbf{X-11}+2\text{Na}]^{2+} = 2335,2183 \text{ Da}$ (calc. 2335,2192 Da) des erwarteten Produkts **X-11**, kann das Natriumaddukt $[\mathbf{X-11d}+\text{Na}]^+ = 1607,7958 \text{ Da}$ (calc. 1607,7943 Da) des TFA-Amids **X-11d** aufgelöst werden.

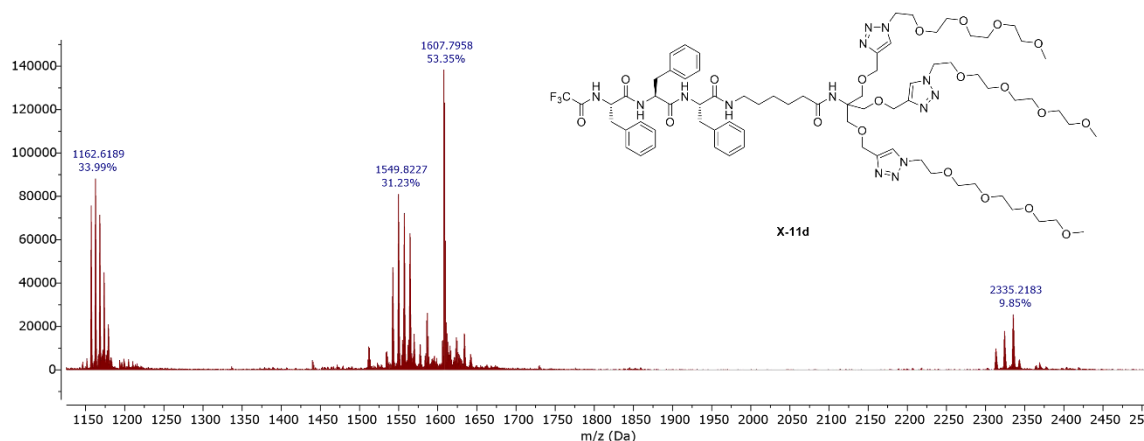
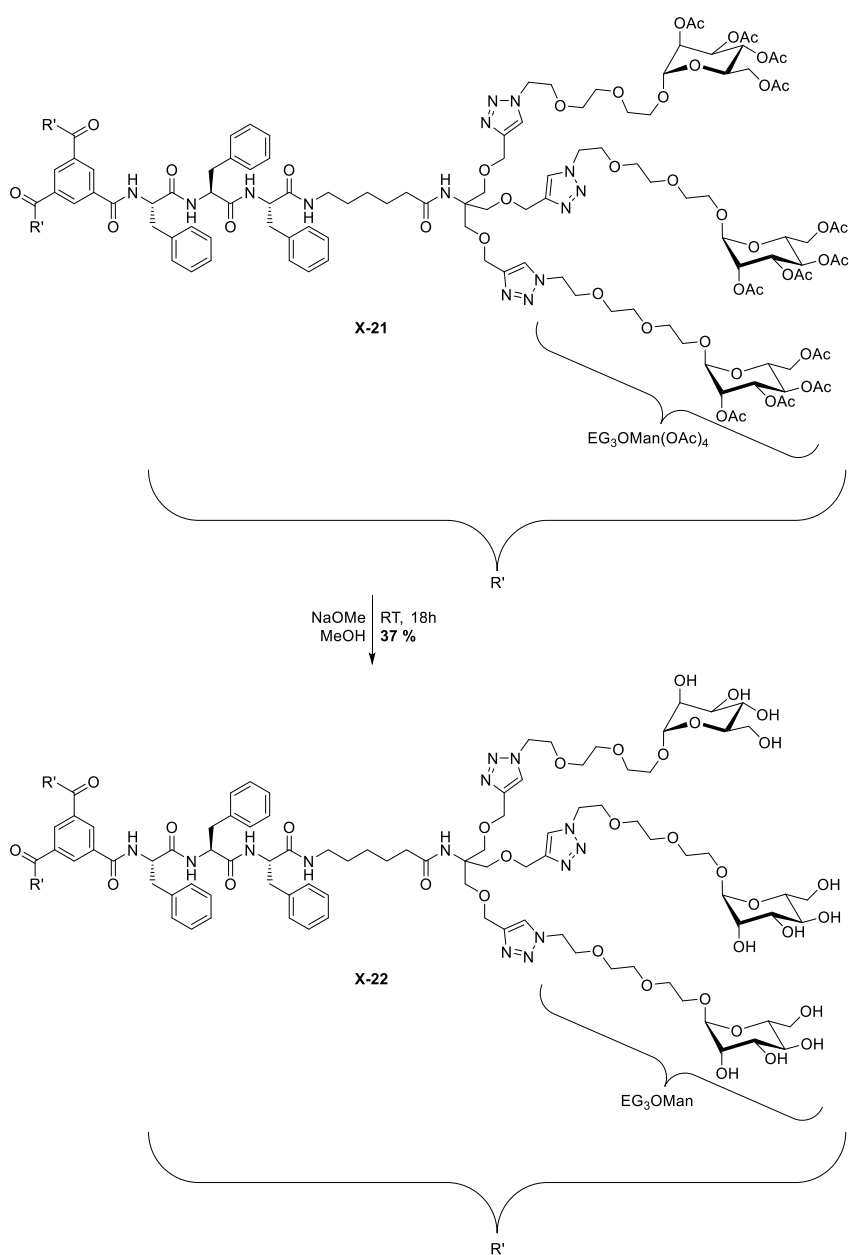


Abbildung 3.5: HR-Massenspektrum (ESI, pos., MeOH) einer Produktmischung von **X-11**. Hier kann neben der Addukte des Produkts **X-11** in unterschiedlicher Ladung $[\mathbf{X-11}+3\text{H}+\text{Na}]^{4+} = 1162,6189 \text{ Da}$ (calc. 1162,6178 Da), $[\mathbf{X-11}+2\text{H}+\text{Na}]^{3+} = 1549,8227 \text{ Da}$ (calc. 1549,8213 Da) und $[\mathbf{X-11}+2\text{Na}]^{2+} = 2335,2183 \text{ Da}$ (calc. 2335,2192 Da) das Addukt des Trifluoressigsäureamids **X-11d** $[\mathbf{X-11d}+\text{Na}]^+ = 1607,7958 \text{ Da}$ (calc. 1607,7943 Da) detektiert werden.

Diese Nebenreaktionen konnten im Besonderen bei schwierigen Kupplungen beobachtet werden. Verläuft eine Amidierungsreaktion schnell mit wenig sterisch gehinderten Substraten, spielen diese Nebenreaktionen eine untergeordnete oder keine Rolle. Zur Erhöhung des amphiphilen Charakters des Peptidamphiphils **X-21** müssen die Acetylgruppen der Mannoseeinheiten in der Peripherie der Verbindung entfernt werden. Hierfür wurden die Reaktionsbedingungen einer Umesterung nach ZEMPLÉN verwendet, wie sie bereits in Kapitel 3.2 vorgestellt wurden.^[186] Die Reaktion ist in Schema 3.22 dargestellt und konnte nach chromatographischer Trennung *via* HPLC mit einer Ausbeute von 37 % isoliert werden.



Schema 3.22: Reaktionsgleichung der Acetyl-Deblockierung aller Acetylgruppen der Verbindung **X-21** nach ZEMPLÉN zur Darstellung des mannosefunktionalisierten C₃-symmetrischen Peptidamphiphils **X-22**.

So konnten die BTA-basierten C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile **X-11** und **X-22** dargestellt werden. Die vollständigen Strukturformeln dieser Verbindungen sind umseitig in Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7 dargestellt. Um diese Verbindungen mit einer fluoreszenten Farbstoffsonde zu versehen, gilt es strukturell ähnliche Peptidamphiphile zu den Verbindungen **X-11** und **X-22** herzustellen, die eine Konjugation mit der Farbstoffsonde erlaubt. Auf die Synthese der funktionalisierbaren Varianten der Peptidamphiphile soll in Kapitel 3.6 eingegangen werden. Eine weitere Methode zur Synthese der Peptidamphiphile und der simplen Abwandlung der peripheren Dendrone ist in Kapitel 3.5 beschrieben.

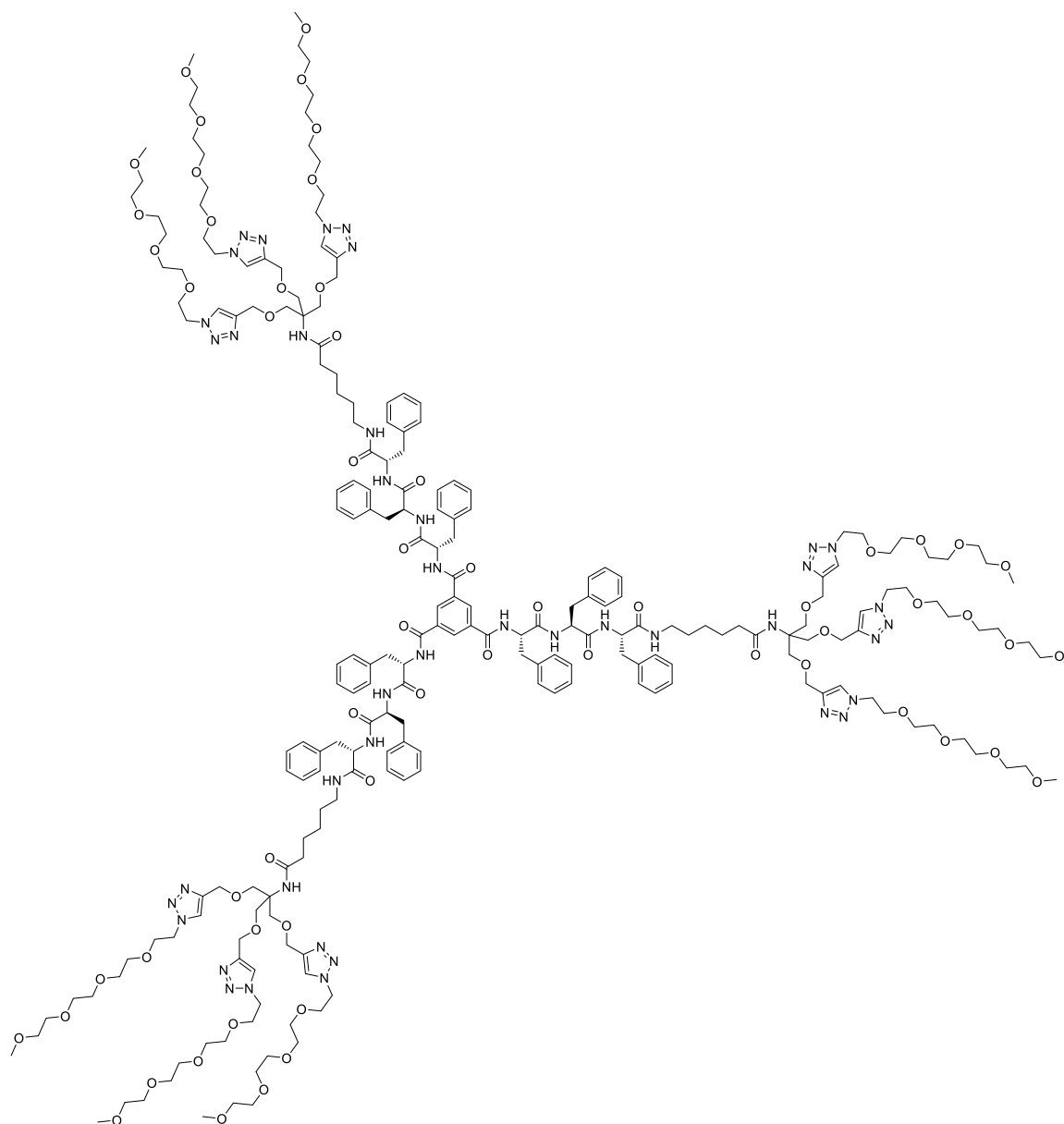


Abbildung 3.6: vollständige Strukturformel des BTA-basierten C_3 -symmetrischen Peptidamphiphils mit Tetraethylglykolmonomethylether-Dendronen **X-11**.

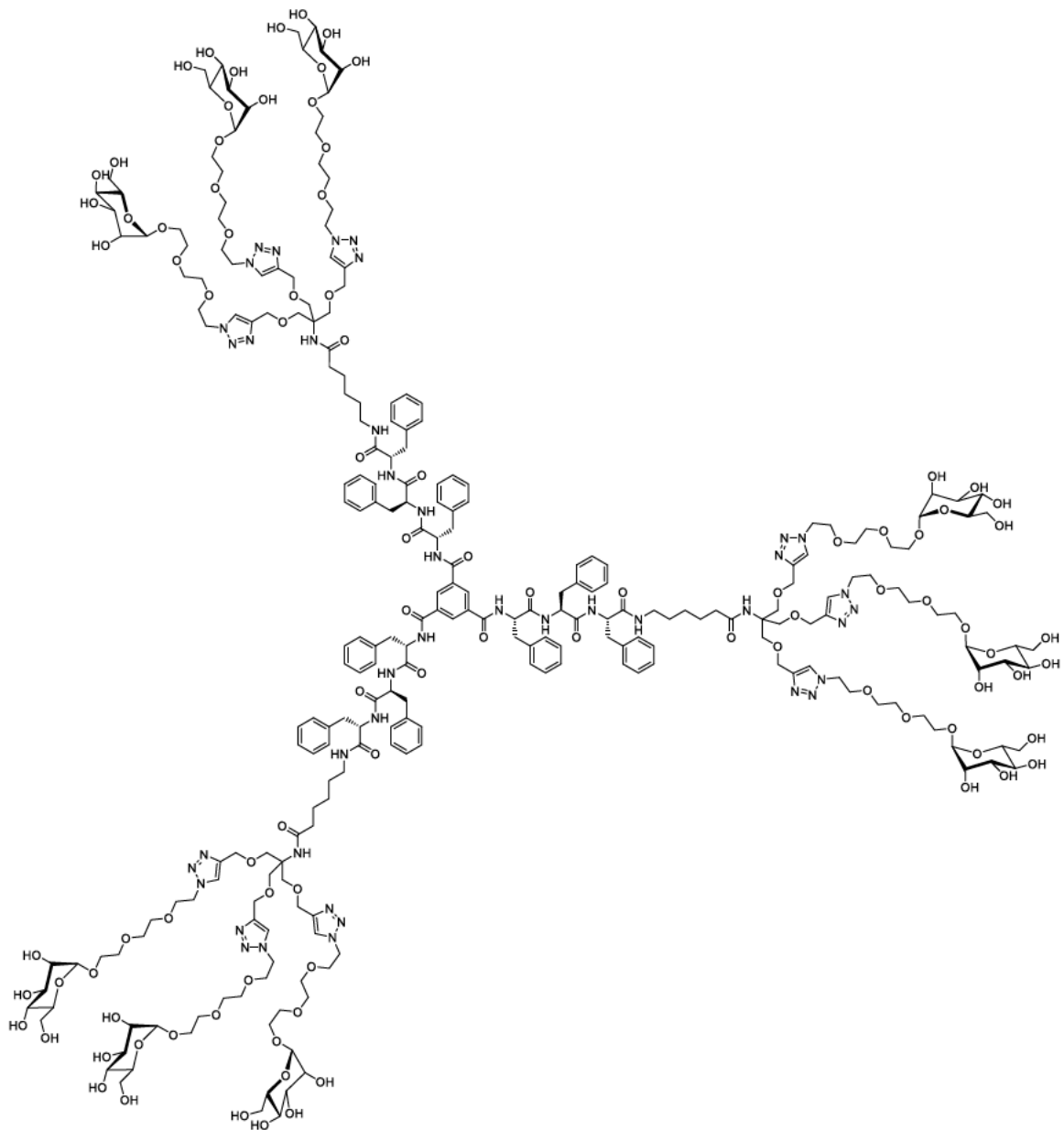
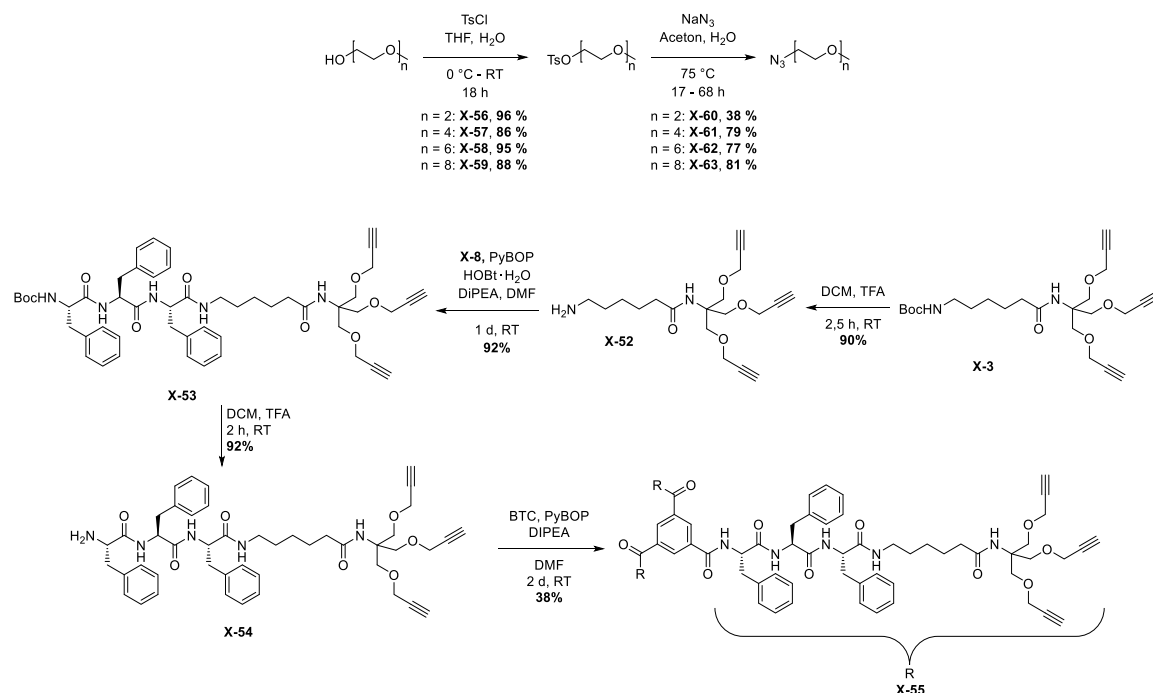


Abbildung 3.7: vollständige Strukturformel des BTA-basierten C₃-symmetrischen Peptidamphiphils mit Triethylenglykolmannosid-Dendronen X-22.

3.5 Synthese eines Peptidkonjugats zur Nonafunktionalisierung

Im Folgenden soll eine weitere divergente Synthesestrategie C₃-symmetrischer Peptidamphiphile gezeigt werden, die durch die Click-Chemie zur Darstellung der Dendrone ermöglicht wird. Es wird die Synthese eines Peptidkonjugats beschrieben, das die Funktionalisierung der Dendrone im letzten Syntheseschritt vorsieht. Ausgehend von dieser Vorstufe wurde eine kleine Bibliothek von Peptidamphiphilen mit steigender Ethylenglykol-Kettenlänge hergestellt. Der Einfluss der Struktur dieser Verbindungen auf die supramolekulare Polymerisation in Wasser soll anschließend durch CD-Spektroskopie und TEM untersucht werden.

Hierfür kann die Funktionalisierung des dendritischen Motivs, wie in Kapitel 3.3 besprochen, ausgenutzt werden. Das Syntheschema dieser Strategie ist in Schema 3.23 abgebildet. Wenn das dendritisch verzweigte Trialkin **X-3** nicht direkt mit der solubilisierenden Komponente konjugiert wird, sondern unfunktionalisiert in der weiteren Syntheseroute verwendet wird, kann ein Peptidkonjugat **X-55** hergestellt werden, das in einem finalen Syntheseschritt mit einer beliebigen azidfunktionalisierten Gruppe gekuppelt werden kann. Um diese Variante zu testen, wurden die Ethylenglykolmonomethylether-Azide mit zwei (**X-60**), vier (**X-61**), sechs (**X-62**) und acht Wiederholungseinheiten (**X-63**) hergestellt. Die Azide wurden von [REDACTED] aus den kommerziell erhältlichen Oligoethylenglykolmonomethylethern der entsprechenden Kettenlänge dargestellt. Dazu wurde die Hydroxyfunktion zunächst durch Tosylierung in eine bessere Abgangsgruppe überführt.



Schema 3.23: Syntheseroute zur Darstellung des multifunktionalisierbaren Nonaalkins **X-55** sowie der Ethylenglykolazide **X-60** bis **X-63** zur Funktionalisierung.

Die resultierenden Tosylate **X-56** bis **X-59** konnten anschließend durch Substitution mit Natriumazid in die Azide der analogen Kettenlänge **X-60** bis **X-63** in guten Ausbeuten umgesetzt werden. Zur Synthese des Nonaalkins **X-55** wurde auf das Trialkin **X-3** zurückgegriffen. Der *N*-Terminus dieser Verbindung musste vor dem nächsten Reaktionsschritt deblockiert werden. Die säurekatalysierte Entfernung der Boc-Schutzgruppe wurde mit TFA in DCM innerhalb zweieinhalb Stunden erreicht. Zunächst wurde das TFA-Ammoniumsalz dieser Verbindung in der Amidierungsreaktion mit dem Tripeptid **X-8** verwendet. Da eine Epimerisierung, wie in Schema 3.17 beschrieben, schwer zu unterdrücken war, wurde das Ammoniumsalz in einer wässrigen Aufarbeitung mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung in die freie Base **X-52** überführt. Die PyBOP-vermittelte Amidierung des Amins **X-52** mit dem Tripeptid **X-8** konnte unter Verwendung von $\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$, entgastem DMF und äquimolaren Mengen DiPEA epimerisierungsfrei in einer isolierten Ausbeute von 92 % durchgeführt werden. Das erhaltene Boc-geschützte lineare Peptidkonjugat **X-53** wurde erneut säurekatalysiert unter Verwendung von TFA in DCM deblockiert und in das freie Amin **X-54** durch wässrige Aufarbeitung mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung überführt. Mit diesem Baustein konnte wiederum die dreifache Amidierung an die Trimesinsäure (BTC) in DMF zur Darstellung eines C_3 -symmetrischen Peptidkonjugats **X-55** durchgeführt werden. Die Aufarbeitung und Trennung der Reaktionsmischung stellte sich jedoch als herausfordernd heraus. Das Produkt **X-55** weist eine sehr geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln neben DMF oder DMSO auf. Dies erschwerte die Trennung der Produktmischung enorm. Eine Trennung mittels Größenausschlusschromatographie (Bio-Beads, DMF) führte zu einem nicht zufriedenstellenden Ergebnis. Im Chromatogramm der semi-präparativen HPLC kann ein massives Tailing des Produktpeaks mit einer Retentionszeit von $R_t = 27$ min aufgezeichnet werden (Abbildung 3.8), das mit der äußerst geringen Löslichkeit der Substanz zu begründen ist. Da eine hohe Reinheit dieser Ausgangssubstanz erforderlich ist, die nur eine äußerst geringe Löslichkeit besitzt, eignet sich die Methode der Nonafunktionalisierung nur für einen geringen Milligramm-Maßstab.

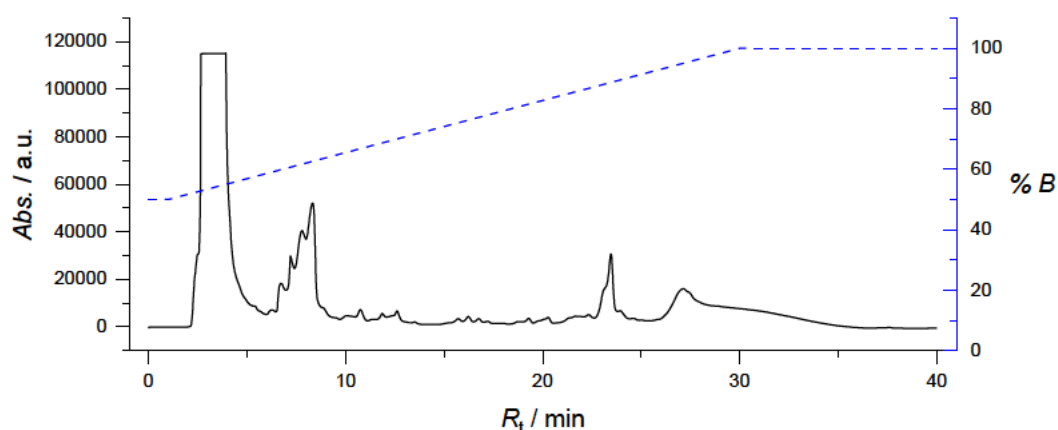
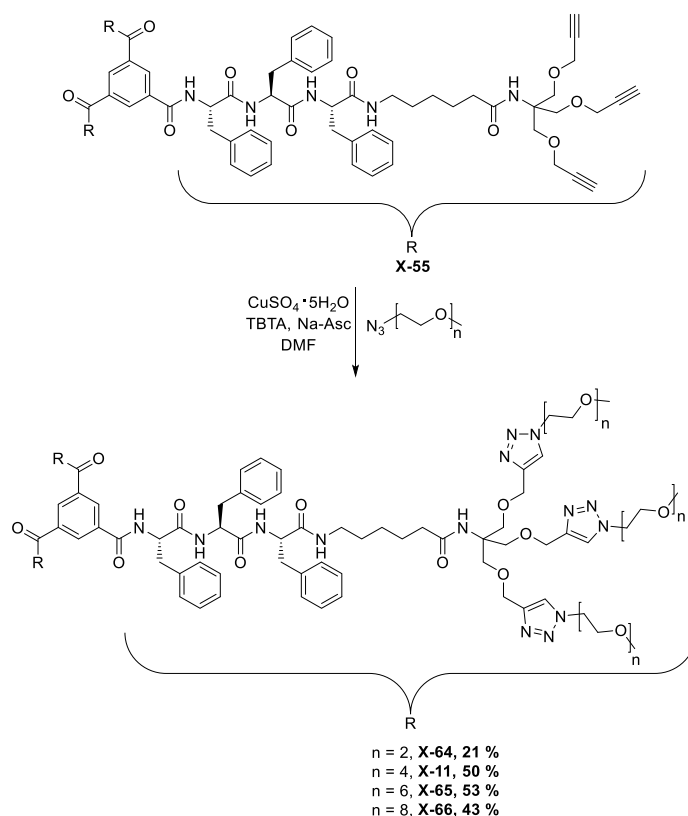


Abbildung 3.8: Chromatogramm der semi-präparativen HPLC der Reinigung der Reaktionslösung von **X-55**. Für die Detektion wurde ein DAD-Detektor verwendet und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 215$ nm detektiert.

Dynamik BTA-basierter supramolekularer Peptidamphiphile



Schema 3.24: Syntheschema der C₃-symmetrischen Peptidamphiphile **X-64**, **X-11**, **X-65** und **X-66** unterschiedlicher Ethylenglykolkettenlänge der terminalen Dendrone.

Nach erfolgreicher Synthese und Aufreinigung des Nonaalkins **X-55**, das als Ausgangspunkt der divergenten Synthese einer Bibliothek von dendronisierten Oligoethylenglykol-Peptidamphiphilen unterschiedlicher Kettenlänge dienen soll, konnte dieses in der CuAAC umgesetzt werden. Diese Neunfachfunktionalisierungen wurden erneut von [REDACTED] durchgeführt. Hierfür wurde das Nonaalkin **X-55** jeweils mit den azidfunktionalisierten Oligoethylenglykolmonomethyletherderivaten **X-60** bis **X-63** in DMF umgesetzt. Der Umsatz der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie (CHCA) kontrolliert. Die HPLC-Chromatogramme ließen bis zur Beendigung der Reaktion keinen einzelnen isolierten Produktpeak erkennen. Vielmehr wurde eine Mischung unterschiedlicher Funktionalisierungsgrade beobachtet.

Dieses Produktgemisch wurde mittels Größenausschlusschromatographie (Bio-Beads, DMF) und anschließender semi-präparativer HPLC (C18, H₂O:MeCN) getrennt und analysiert. Eine Isolation der neunfach addierten Spezies von den unvollständig reagierten Spezies war nicht möglich. Dies verlief für die vier untersuchten Verbindungen analog und soll exemplarisch anhand des Hexaethylenglykolmonomethylether-Peptidamphiphils **X-65** gezeigt werden. Im MALDI-TOF-Massenspektrum (CHCA), das in Abbildung 3.9 dargestellt ist, wird deutlich, dass neben der Addukte des Produkts **X-65** $[\text{X-65}+\text{Na}]^+ = 5439,27 \text{ Da}$ (calc. 5439,92 Da) und $[\text{X-65}+\text{K}]^+ = 5455,75 \text{ Da}$ (calc.

5455,89 Da) auch eine achtfach modifizierte Spezies detektiert werden kann. Diese Spezies kann aber wider erwarten nicht der achtfach funktionalisierten Verbindung mit einer verbleibenden Alkingruppe **X-65a** zugeordnet werden. Vielmehr wurde eine Spezies **X-65b** gefunden, die aus einem Octaalkin hervorgegangen sein muss. Hierbei konnten die Addukte $[\text{X-65b}+\text{Na}]^+= 5081,61 \text{ Da}$ (calc. 5081,72 Da) und $[\text{X-65b}+\text{K}]^+= 5098,35 \text{ Da}$ (calc. 5097,69 Da) zugewiesen werden.

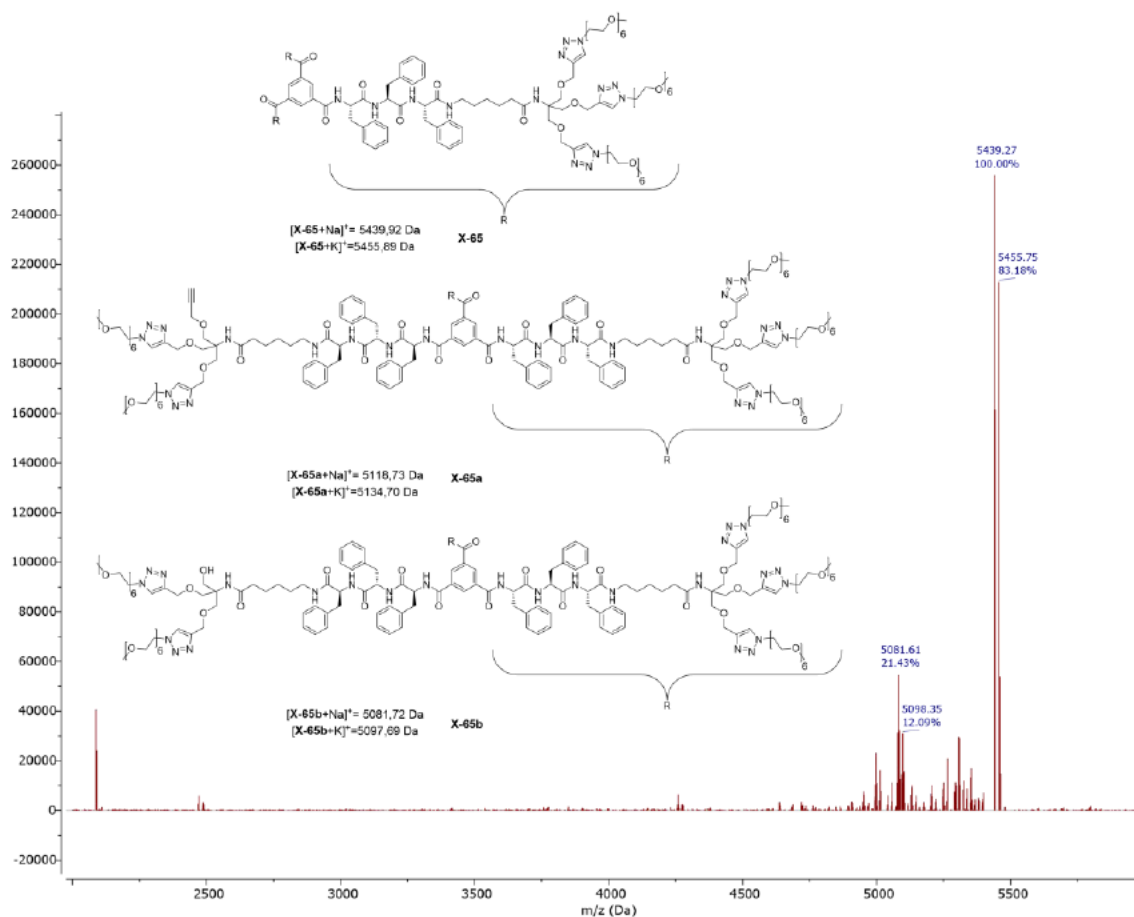


Abbildung 3.9: MALDI-TOF-Massenspektrum der isolierten Produktmischung des C₃-symmetrischen Peptidamphiphils **X-65**, die durch die Nonafunktionalisierung des Nonaalkins **X-55** mit dem Azid **X-62** erhalten wurde.

Das Octaalkin kann als Verunreinigung des Edukts **X-55** vorliegen, bei der die Alkylierung zum Alkin unvollständig abgelaufen ist. Das lässt vermuten, dass die CuAAC, die als Ausgangspunkt der divergenten Synthese dient, vollständig abläuft, jedoch eine hohe Reinheit des verwendeten Edukts vorauszusetzen ist. In der Synthese ist anzumerken, dass die Vollständigkeit der Alkylierung mit Propargylbromid zum Trialkin **X-3** von großer Bedeutung ist. Wird die Verunreinigung durch das Dialkin übersehen und für die Amidierung der Trimesinsäure verwendet, kann nicht ausschließlich das Nonaalkin **X-55** erhalten werden. Aufgrund der geringen strukturellen Unterschiede lassen sich die Nebenprodukte, die durch ein Dialkin verursacht werden, nicht vom Produkt trennen. Statistisch gesehen kann die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens

einmal das Dialkin in das C₃-symmetrische Peptidkonjugat **X-55** eingebaut wird, als Gegenwahrscheinlichkeit des Einbaus von ausschließlich mit Trialkin konjugierter Verbindung ausgedrückt werden. Bei einer Verunreinigung von nur einem Prozent durch das Dialkin, wird nach Gleichung (3.1) eine Produktmischung erhalten, in der 3 % nicht neunfach funktionalisiert werden können.

$$\begin{aligned} P(\text{mind. einmal mit Dialkin(1\%) konjugiert}) & \quad (3.1) \\ &= 1 - P(\text{nur mit Trialkin konjugiert}) \\ &= 1 - 0,99^3 \\ &= 0,03 \end{aligned}$$

Deutlicher wird dieses Rechenbeispiel unter der Annahme einer Verunreinigung von fünf Prozent des Dialkins. In diesem Fall wird nach Gleichung (3.2) ein Produktgemisch mit 14 % Nebenprodukten erhalten, das nicht neunfach funktionalisiert werden kann.

$$\begin{aligned} P(\text{mind. einmal mit Dialkin(5\%) konjugiert}) & \quad (3.2) \\ &= 1 - 0,95^3 \\ &= 0,14 \end{aligned}$$

Da dennoch hauptsächlich die nonafunktionalisierten Spezies der Peptidamphiphile **X-11** und **X-64** bis **X-66** dargestellt wurden, sollen diese hinsichtlich ihres Assemblierungsverhaltens und ihrer Morphologie untersucht werden.

Hierfür wurden zunächst Circular dichroismus (CD)-Spektren der wässrigen Lösungen der Peptidamphiphile gemessen. Die CD-Messungen wurden von [REDACTED] durchgeführt. Die Peptidamphiphile mit vier bis acht Wiederholungseinheiten der Ethylenglykolketten **X-11**, **X-65** und **X-66** wurden bei einer Konzentration von $c = 25 \mu\text{M}$ gemessen. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Peptidamphiphils, das lediglich Diethylenglykolmonomethylether trägt (**X-64**), wurde bei einer Konzentration von $c = 5 \mu\text{M}$ gemessen, wobei die Lösung bei dieser Konzentration immer noch eine leichte Trübung aufwies. Aus den Spektren in Abbildung 3.10 wird ersichtlich, dass die Peptidamphiphile **X-11** und **X-65** eine kleine negative Bande bei 250 nm und eine größere negative Bande bei 215 nm aufweisen. Diese sind charakteristisch für die Stapelung von kolumnar gestapelten supramolekularen Polymeren auf Basis von BTA und der β -faltblattähnlichen Struktur der assemblierten Tri-L-Phenylalanin-Einheiten der Peptidamphiphile. Die Spektren der Peptidamphiphile mit der kürzesten (**X-64**) und längsten (**X-66**) untersuchten Ethylenglykolkettenlänge zeigen keine oder nur eine sehr schwache Bande bei 210 nm in der CD-Spektroskopie. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Peptidamphiphile keine eindimensionalen kolumnaren Stapel ausbilden beziehungsweise nicht in besonders ausgeprägtem Ausmaß. Dies kann für das Diethylenglykolderivat **X-64** wahrscheinlich durch die unzureichende Löslichkeit in Wasser erklärt werden. Für das Ocatethylenglykolderivat **X-66** liegt der Grund vermutlich an der zu hohen Wasserlöslichkeit, was die hydrophob/hydrophile-Balance beeinträchtigt^[213–216], oder an dem erhöhten sterischen Anspruch der Dendrone, der die Stapelung der Monomere verhindert.^[173] Auch eine Kombination beider Faktoren ist denkbar.

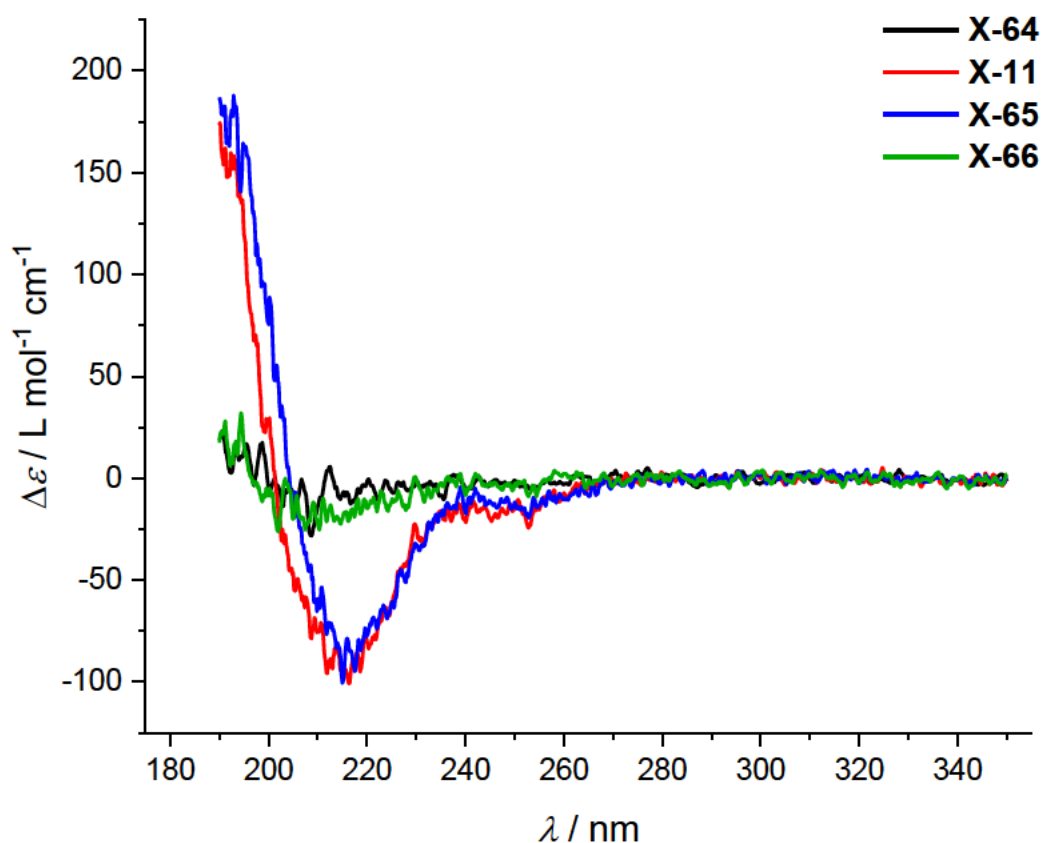


Abbildung 3.10: CD-Spektren der aus dem Nonaalkin X-55 synthetisierten C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile unterschiedlicher Ethylenglykolkettenlänge ($n = 2$, X-64, schwarz), ($n = 4$, X-11, rot), ($n = 6$, X-65, blau) und ($n = 8$, X-65, grün) in Milli-Q Wasser bei 20 °C.

Um die These der Assemblierung in eindimensionale Architekturen zu unterstützen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der eingetrockneten Probelösungen auf dem kohlenstoffbeschichteten Träger angefertigt. Die Proben wurden mit Hilfe von Uranylacetat negativ kontrastiert. Die in Abbildung 3.11 gezeigten TEM-Aufnahmen sind von XXXXXXXXXX aufgenommen worden. Eine Untersuchung des Peptidamphiphils mit Diethylenglykolmonomethylether-Dendron (X-64) konnte nicht durchgeführt werden. Die geringe Löslichkeit der Verbindung ließ eine korrekte Probenvorbereitung aus wässriger Lösung zur elektronenmikroskopischen Auswertung nicht zu.

Die Aufnahmen des Tetraethylenglykol-Derivat X-11 ist in Abbildung 3.11 A dargestellt und zeigt die Ausbildung eindimensionaler Nanostäbchen. Es lassen sich zwei Klassen dieser Nanostäbchen einstufen. Neben langen, lateral aggregierenden Stäbchen sind kürzere Stäbchen mit größerer Breite ohne Tendenz zur lateralen Aggregation zu erkennen. Die Auswertung der Aufnahmen wurde mit *ImageJ*^[217] durchgeführt. Die Länge der langen, dünneren Stäbchen lässt sich nicht statistisch auswerten, da der Großteil der Stäbchen größer als der Bildausschnitt ist. Sie weisen also eine Länge über einem Mikrometer auf. Die Breite w kann mit $w = (6,3 \pm 0,5)$ nm ausgemessen werden. Die

kürzeren, dickeren Stäbchen weisen eine Länge l von $l = (108,5 \pm 57,4)$ nm auf. Die Verteilung der Länge kann durch das Zahlenmittel der Länge l_n , das Gewichtsmittel der Länge l_w und die Dispersität \mathfrak{D} in Gleichung (3.3), (3.4) und (3.5) beschrieben werden.

$$l_n = \frac{\sum_{i=1}^n n_i l_i}{\sum_{i=1}^n n_i} \quad (3.3)$$

$$l_w = \frac{\sum_{i=1}^n n_i l_i^2}{\sum_{i=1}^n n_i l_i} \quad (3.4)$$

$$\mathfrak{D} = \frac{l_w}{l_n} \quad (3.5)$$

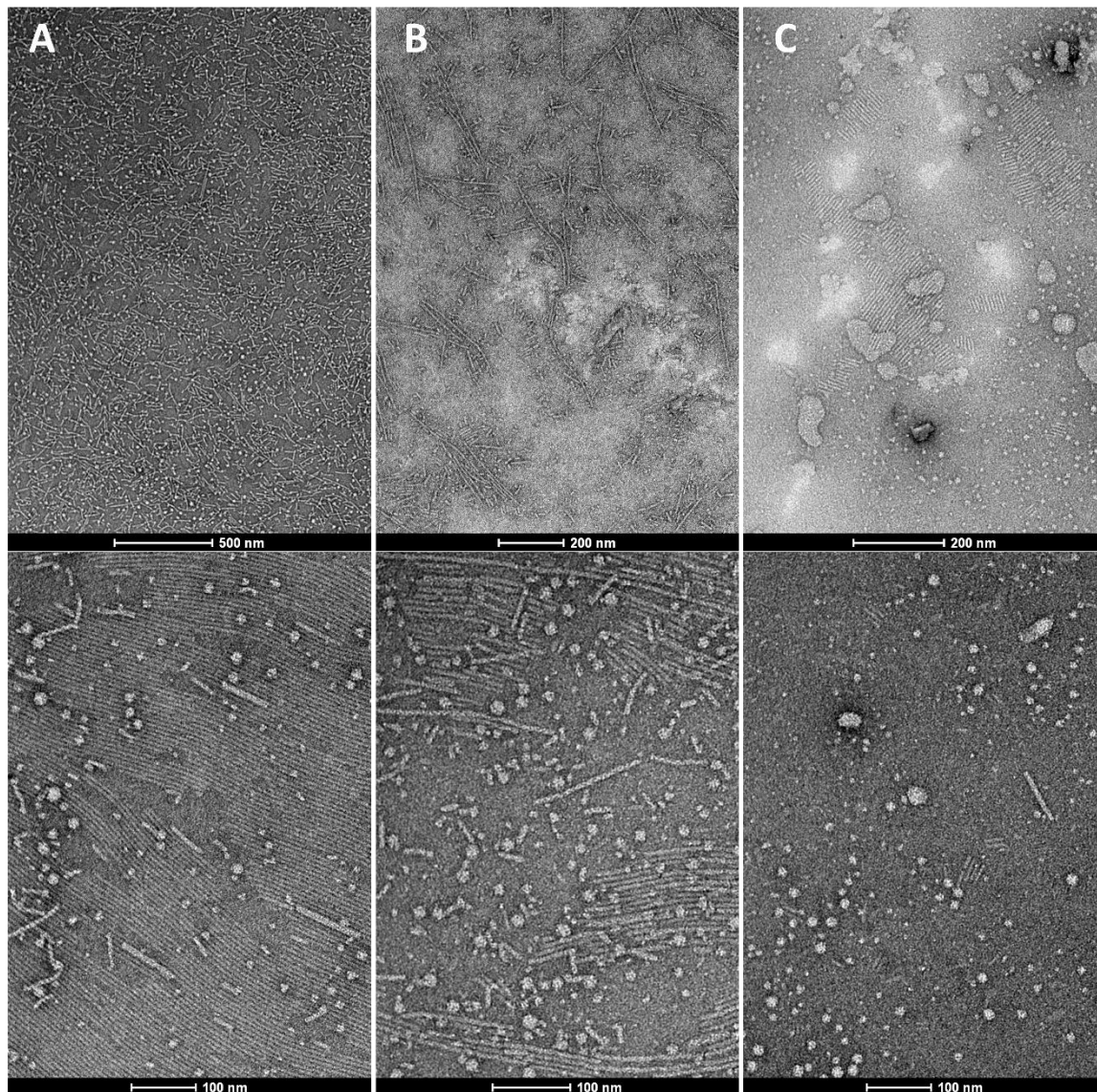


Abbildung 3.11: Transmissionselektronenmikroskopie der Peptidamphiphile unterschiedlicher Ethylenglykollkettenlänge (A, $n = 4$, X-11), (B, $n = 6$, X-65) und (C, $n = 8$, X-65) negativ kontrastiert mit Uranylacetat.

Diese betragen für die kürzeren, dickeren Stäbchen der Peptidamphiphile X-11 mit einer Stichprobenmenge von $n = 100$ $l_n = 108,5$ nm, $l_w = 138,5$ nm und $\mathfrak{D} = 1,28$. Die Breite w

der dickeren Stäbchen beträgt $w = (7,5 \pm 1,6)$ nm. Sie sind damit etwa einen Nanometer breiter, aber deutlich weniger uniform als die längeren, dünne Stäbchen. Es handelt sich hierbei vermutlich um die Zusammenlagerung mehrerer Stäbchen. Da Verbindung **X-11** das Peptidamphiphil mit der kürzesten, getesteten Ethylenglykolkettenlänge, welche noch wasserlöslich ist, sollte die Abschirmung des hydrophoben Inneren der eindimensionalen Polymere am geringsten sein. Ein Zusammenlagern der Stäbchen durch den hydrophoben Kontakt minimiert so die Exposition der hydrophoben Bereiche mit dem Lösungsmittel.^[218] Neben der Nanostäbchen enthalten die Aufnahmen sphärische Partikel. Ob es sich hierbei um mizellare Strukturen der Peptidamphiphile oder Artefakte der Probenvorbereitung der Elektronenmikroskopie handelt, ist unklar. Der Durchmesser d der sphärischen Partikel in den Aufnahmen des Peptidamphiphils **X-11** kann mit $d = (11,4 \pm 3,1)$ nm beziffert werden.

Aufnahmen des Hexaethylenglykol-Derivats **X-65** zeigen ebenfalls Stäbchen und sphärische Partikel (Abbildung 3.11 B). Sofort kann die geringere Tendenz zur lateralen Aggregation beobachtet werden. Die Stäbchen scheinen zudem eine einheitliche Breite zu besitzen. Lateral aggregierte Stäbchen außerhalb eines Clusters besitzen eine Breite w von $w = (7,4 \pm 0,8)$ nm. Die Stäbchen fallen im Mittel etwas kürzer aus als die des Peptidamphiphiles **X-11** mit einer Länge l von $l = (65,6 \pm 47,4)$ nm und einer Verteilung von $l_n = 65,6$ nm, $l_w = 99,5$ nm und $\text{Đ} = 1,52$ bei einer Stichprobenmenge von $n = 122$. Die niedrige, mittlere Länge wird vor allem durch das Auftreten vieler sehr kurzer Stäbchen verursacht. Die geringere Tendenz zur lateralen Aggregation könnte durch das größere Dendron zu begründen sein, das den hydrophoben inneren Bereich eines einzelnen Stäbchens besser abschirmt. Eine Zusammenlagerung der exponierten hydrophoben Bereiche in wässriger Lösung wäre dann in geringerem Umfang notwendig.^[218] Auch hier können sphärische Partikel dargestellt werden, die einen Durchmesser d von $d = (19,8 \pm 4,2)$ nm besitzen.

Für das Octaethylenglykol-Derivat **X-66** konnten in den Aufnahmen nur selten aggregierte Polymere gefunden werden. In Abbildung 3.11 C sind die Aufnahmen weniger kurzer Stäbchen gezeigt. Sie besitzen lediglich eine Länge l von $l = (43,3 \pm 25,1)$ nm in einer Verteilung von $l_n = 43,3$ nm, $l_w = 57,8$ nm, $\text{Đ} = 1,34$ bei einer Stichprobenzahl von $n = 230$ und sind ausschließlich in Clustern lateral aggregierter Stäbchen zu finden. Sphärische Partikel dieser Probe besitzen einen Durchmesser d von $d = (12,9 \pm 3,7)$ nm.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass ein C_3 -symmetrisches Peptidamphiphil mit Diethylenglykolmonomethylether-Dendronen **X-64** in Wasser eine zu geringe Löslichkeit aufweist, um assemblierte supramolekulare Polymere zu bilden. Ab vier Wiederholungseinheiten der Ethylenglykolmonomethylether-Dendrone kann ein Signal der supramolekularen Polymere mittels CD-Spektroskopie detektiert und die Morphologie mittels TEM untersucht werden. Mit fortschreitender Kettenlänge der Ethylenglykolkette der Dendrone steigt der sterische Anspruch der monomeren Einheiten

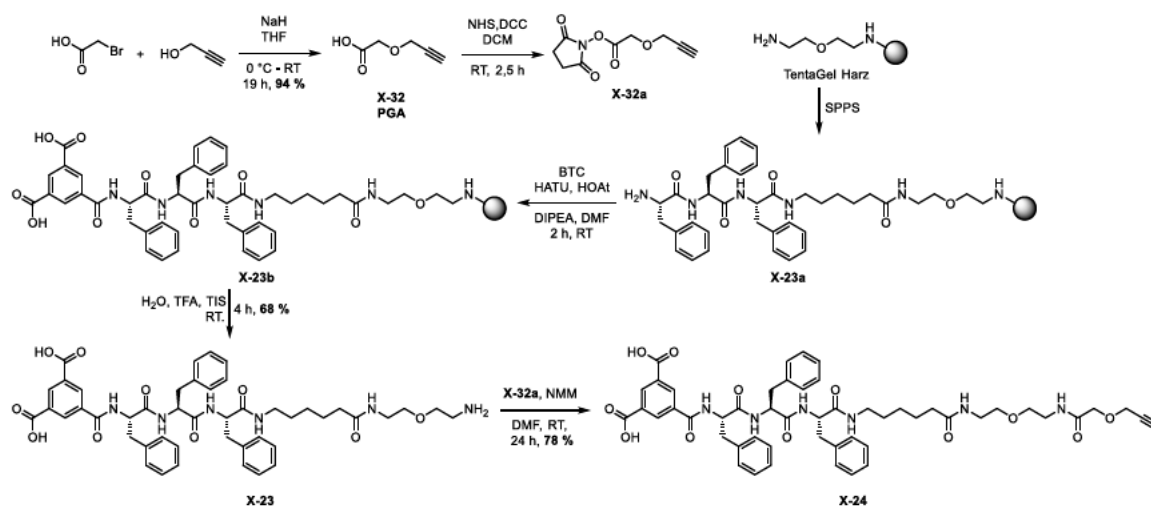
eines Nanostäbchens und die Länge der mittels TEM untersuchten supramolekularen Polymere nimmt ab. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von APPEL *et al.*, die den Einfluss der Sterik eines Dendrons auf die Morphologie supramolekularer Polymere zeigen.^[173] Durch CD-Spektroskopie kann nur für die Peptidamphiphile mit Tetra- (**X-11**) und Hexaethylenglykoleinheiten (**X-65**) ein signifikantes CD-Signal aufgenommen werden. Das äußerst schwache Signal der Octaethylenglykolvariante **X-66** steht hierbei im Einklang mit der Beobachtung mittels Elektronenmikroskopie, mit der nur selten kleinste Strukturen aufgezeichnet werden können. Diese kleine Bibliothek supramolekularer Peptidamphiphile unterschiedlicher Ethylenglykolkettenlänge zeigt die Grenzen der Kombination der Wasserlöslichkeit der Moleküle, der hydrophob/hydrophilen Balance und des sterischen Anspruchs der löslichkeitsvermittelnden Komponente der Strukturen. Für in Wasser polymerisierende eindimensionale Nanostäbchen sollte eine Ethylenglykolkettenlänge des Dendrons mit mehr als zwei, aber weniger als acht Wiederholungseinheiten gewählt werden. Es wird vermutet, dass die Wahl der Wiederholungseinheiten zwischen drei und sieben einen Einfluss auf die Länge und Längenverteilung resultierender Stäbchen sowie auf deren Morphologie, Dynamik und weitere Eigenschaften hat.

3.6 Synthese der funktionalisierbaren Peptidamphiphile

Nachdem die unfunktionalisierten C₃-symmetrischen Peptidamphiphile **X-11** und **X-22** hergestellt werden konnten, wird eine funktionalisierbare Variante dieser Strukturen benötigt. Diese ermöglicht die Konjugation mit verschiedenen fluoreszenten Sonden im hydrophilen Bereich der Struktur. So können die assemblierten Peptidamphiphile fluoreszenzspektroskopisch mittels FRET auf ihren dynamischen Monomeraustausch im Gleichgewicht untersucht werden. Darüber hinaus erlauben sie die Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Morphologie und mikroskopische Spezialanwendungen wie superauflösende Mikroskopie oder FLIM (siehe Kapitel 3.7).

Um eine Stelle für die Funktionalisierbarkeit in die Struktur der Verbindungen einzuführen, soll eines der drei Dendrone ersetzt werden. Hierbei ist es wichtig, das strukturelle Motiv der Peptidamphiphile so wenig wie möglich zu verändern. Durch Ersatz des Dendrons und Erhalt der Aminosäuren dieser linearen Teilstruktur, bleibt der für die Assemblierung verantwortliche Teil der Struktur erhalten. Der sterische Anspruch der fluoreszenten Sonden, die eingeführt werden sollen, wird geringer eingeschätzt als die des Dendrons, weshalb die funktionalisierten Peptidamphiphile favorisiert mit den C₃-symmetrischen unfunktionalisierten Peptidamphiphilen copolymerisieren sollten. Würde die Struktur zu stark abgewandelt und es entstehen größere strukturelle oder elektronische Unterschiede, besteht die Tendenz zum *self-sorting*, bei der die Bestandteile einer Monomermischung homopolymerisieren.^[219,220] Als funktionelle Gruppe, die die Konjugation mit einer Sonde ermöglicht, wird erneut ein terminales Alkin verwendet. Wie in Kapitel 3.3 erprobt, eignet sich die CuAAC als Konjugationmethode als letzter Syntheseschritt der funktionalisierbaren Peptidamphiphile. Die hohe Toleranz funktioneller Gruppen und das geringe Auftreten von Nebenreaktionen macht die CuAAC so besonders wertvoll.

Um eine Funktionalisierbarkeit auf die oben beschriebene Weise zu realisieren, wurde auf den Syntheseansatz von STRAßBURGER zurückgegriffen.^[52,221] Dieser nutzte die Darstellung der Peptidsequenz an der festen Phase mittels SPPS und realisierte die Kupplung mit der Trimesinsäure, während das Peptid noch am Harz gebunden ist. So wird eine Monoamidierung gegenüber der Reaktion in Lösung deutlich erhöht. Durch die Anbindung am Harz sind die Peptidgruppen räumlich weiter voneinander entfernt und die Diffusion zu einem benachbarten Peptid ist gehindert. Gleichzeitig dient die Bindung zum Harz als Schutzgruppe des C-Terminus des Peptids. Das Syntheschema dieser Reaktionsfolge ist in Schema 3.25 abgebildet.

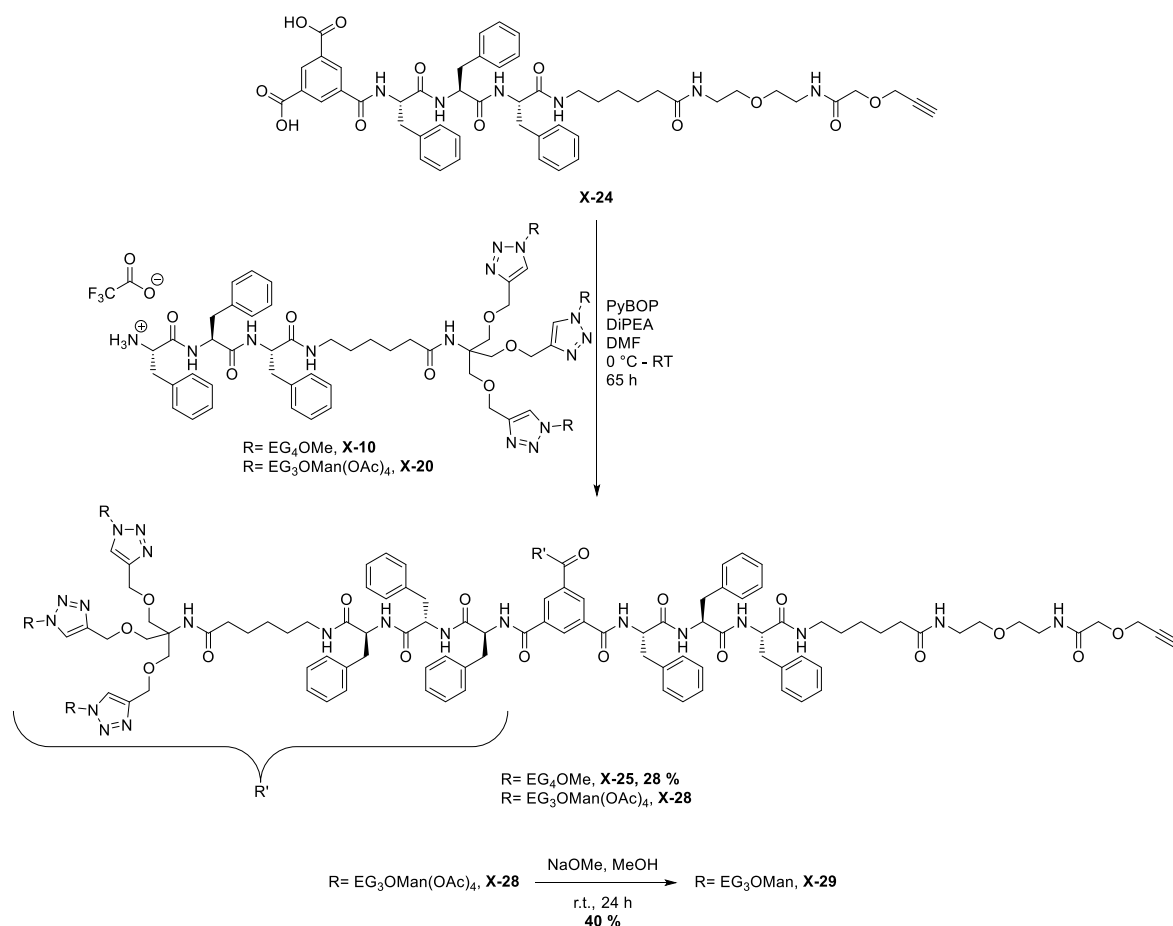


Schema 3.25: Reaktionsschema der Synthese der Peptidamphiphil-Vorstufe **X-24** für die Darstellung eines funktionalisierbaren Peptidamphiphils.

In diesem Synthesansatz wurde von einem kommerziell erhältlichen TentaGel-Harz ausgegangen, welches mit einer 2,2'-Bisamino-diethylether-Gruppe beladen ist. An dieser Gruppe wurde durch Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Protokoll die Peptidsequenz PhePhePheAhx **X-23a** erzeugt. Die Peptidsequenz entspricht der, die in den Peptidamphiphilen in Kapitel 3.4 zu finden ist. Die Trimesinsäure (BTC) wurde nach der automatisierten SPPS manuell gekuppelt. Hierfür wurde BTC mit HATU, HOAt und DiPEA für 30 min bei Raumtemperatur voraktiviert, anschließend zum Peptid an der festen Phase **X-23a** gegeben und 90 min reagiert. Da sich das Peptid noch an einem gering beladenen Harz befindet, findet unter den Reaktionsbedingungen bevorzugt die Monoamidierung der Trimesinsäure zu Verbindung **X-23b** statt. Für eine optimierte Variante dieser Methode sei auf die Arbeit von URSCHBACH verwiesen.^[53] Da die Beladung des Harzes über eine Tritylchloridgruppe realisiert wurde, konnte das so hergestellte Peptid unter sauren Bedingungen abgespalten werden. Die Abspaltungslösung, bestehend aus H₂O : TFA : TIS (1 : 38 : 1), spaltete das Peptid in vier Stunden vollständig ab und verhinderte die Alkylierung von Verbindung **X-23**. Da eine doppelte Amidierung durch diese Synthesestrategie nur zurückgedrängt, jedoch nicht verhindert werden kann, wurde die so erhaltene Produktmischung der Verbindung **X-23** noch von der zweifach amidierten Verbindung mittels HPLC getrennt. Nach der Isolation des Produkts wurde eine Ausbeute von 68 % erhalten. Um die Alkinfunktion einzuführen, wurde Propargylglykolsäure (PGA, **X-32**) durch Substitution von 2-Bromessigsäure durch Propargylalkohol dargestellt. Um die Carbonsäure **X-32** selektiv an die Aminfunktion am C-Terminus des Peptids **X-23** anzubringen, wurde auf die Bildung eines Aktivesters zurückgegriffen. PGA wurde hierfür in einem ersten Schritt *in situ* durch *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in den NHS-Ester überführt und in einem zweiten Schritt dem Peptid **X-23** zugesetzt. So reagierte das nukleophile Amin selektiv mit der aktivierten Carbonsäure des PGA zum Peptid-Alkin-Konjugat **X-24** und die Carbonsäuren der Trimesinsäure blieben unversehrt.

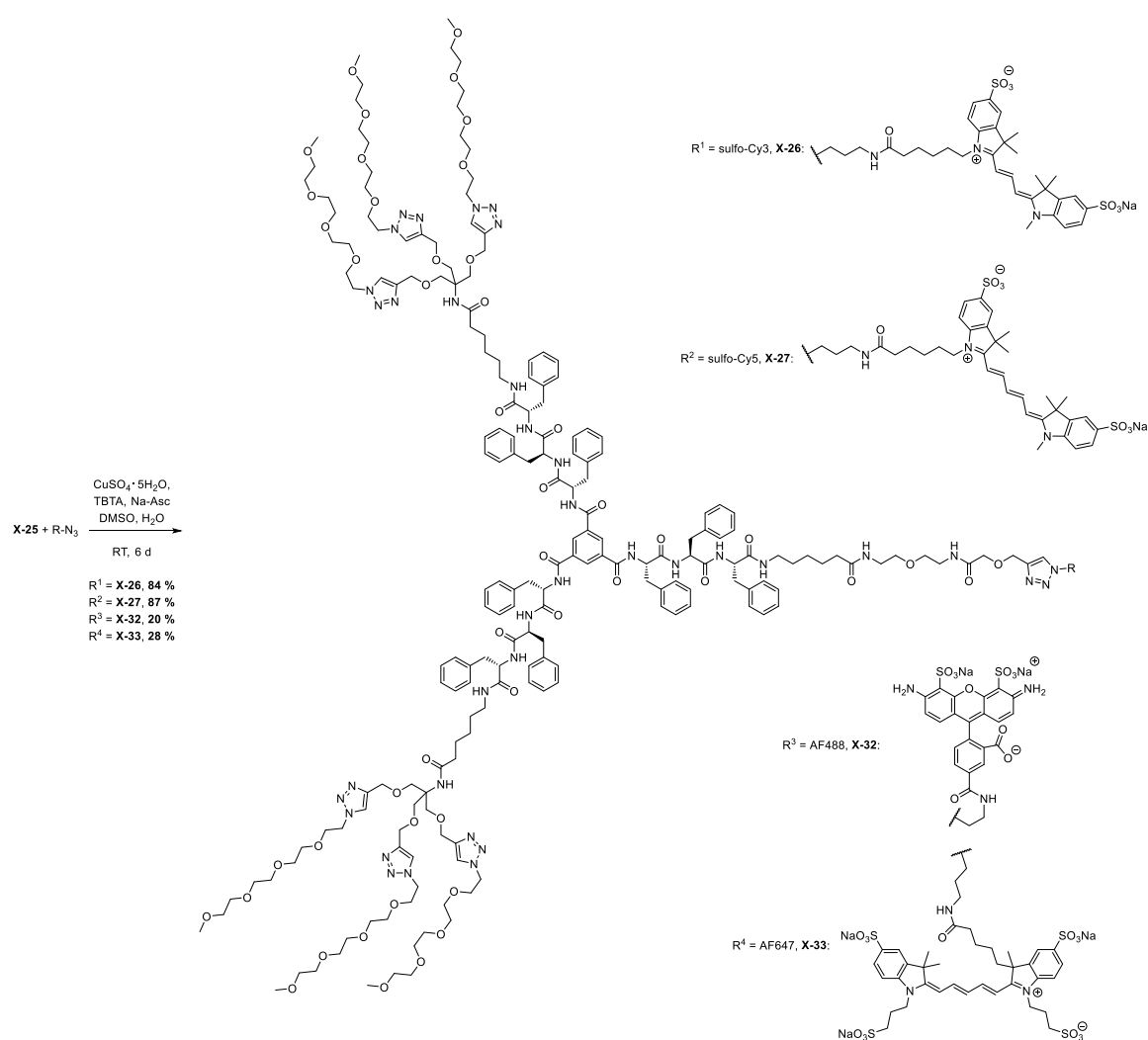
Nun konnte das einfach substituierte Derivat der Trimesinsäure **X-24** analog zu Kapitel 3.4 mit den linearen Peptidamphiphilen **X-10** und **X-20** zu den funktionalisierbaren Peptidamphiphilen **X-25** und **X-28** umgesetzt werden. Die Reaktion ist in Schema 3.26 dargestellt.

Die PyBOP-vermittelte Amidierung des Tetraethylglykolmonomethylether-Derivats **X-10** konnte nach chromatographischer Reinigung mittels HPLC in einer Ausbeute von 28 % durchgeführt werden. Die Reaktion musste innerhalb dieser Arbeit nur einmal durchgeführt werden und wurde nicht unter den ermittelten optimierten Bedingungen durchgeführt. Die Kupplung des peracetylierten Triethylglykolmannosids **X-20** konnte erfolgreich durchgeführt werden und wurde ohne weitere Aufarbeitung der Umesterung nach ZEMPLÉN zur Deblockierung der Hydroxygruppen aller Mannoseeinheiten unterzogen.^[186] Das Mannosederivat des funktionalisierbaren Peptidamphiphils mit freien Hydroxygruppen **X-29** konnte nach dieser Reaktion in 40 %iger Ausbeute nach chromatographischer Reinigung *via* HPLC isoliert werden.

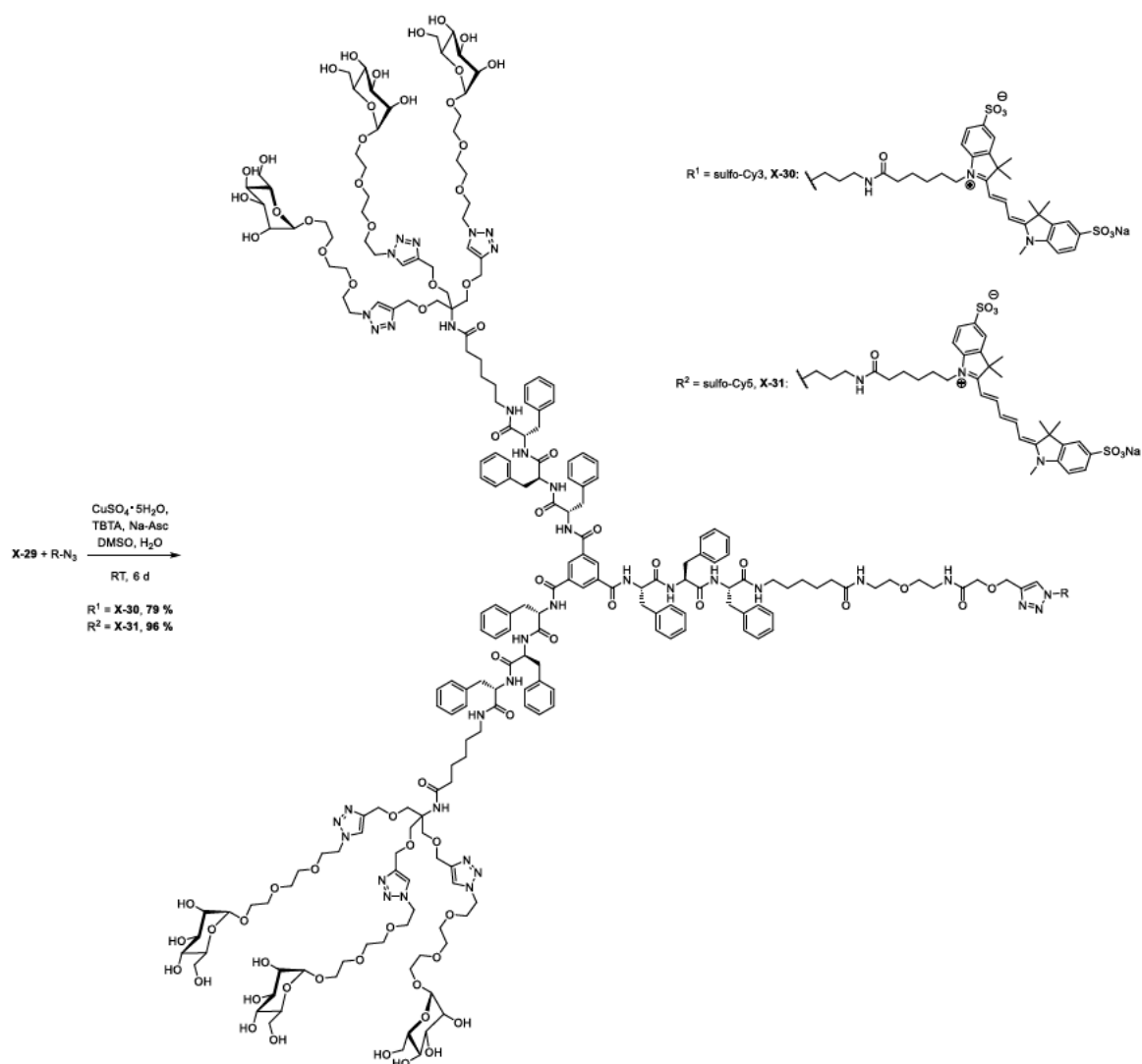


Schema 3.26: Syntheschema der PyBOP-vermittelten Kupplung der linearen Peptidamphiphile **X-10** und **X-20** zu den funktionalisierbaren Peptidamphiphilen **X-25** und **X-28** sowie der Entschützung des acetylierten Mannosederivats **X-28** zum Mannosederivat **X-29** mit freien Hydroxygruppen.

Die so synthetisierten alkinfunktionalisierten Peptidamphiphile **X-25** und **X-28** können nun durch CuAAC mit den fluoreszenten Sonden konjugiert werden. Im Fall des mannosylierten Peptidamphiphils **X-28** kann diese Reaktion ohne Verwendung von Schutzgruppen durchgeführt werden. Die hohe Chemoselektivität der Click-Reaktion ermöglicht die Konjugation der azidfunktionalisierten fluoreszenten Sonden in der Anwesenheit der 24 freien Hydroxygruppen der peripheren Mannoseeinheiten. So konnten die farbstofffunktionalisierten Peptidamphiphile in nur einer Stufe hergestellt werden und die empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe mussten nicht den Reaktionsbedingungen einer Deblockierungsreaktion unterzogen werden. Die vollständigen Strukturformeln der dargestellten funktionalisierten Peptidamphiphile durch die CuAAC-Click-Reaktion sind in Schema 3.27 und Schema 3.28 dargestellt.



Schema 3.27: Syntheschema der funktionalisierten Peptidamphiphile basierend auf Tetraethylglykoldendron **X-26**, **X-27**, **X-32** und **X-33** durch CuAAC. Die Fluoreszenzfarbstoffe sulfo-Cyanin 3 (sulfo-Cy3), sulfo-Cyanin 5 (sulfo-Cy5), Alexa Fluor 488 (AF488) und Alexa Fluor 647 (AF647) sind rechts gezeigt.



Schema 3.28: Syntheschema der funktionalisierten Peptidamphiphile basierend auf Triethylenglykolmannosiddendron **X-30** und **X-31** durch CuAAC. Die Fluoreszenzfarbstoffe sulfo-Cyanin 3 (sulfo-Cy3) und sulfo-Cyanin 5 (sulfo-Cy5) sind rechts gezeigt.

Es konnte eine Funktionalisierung von Peptidamphiphilen erreicht werden, ohne die Struktur der in Kapitel 3.4 dargestellten C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile maßgeblich zu verändern. Die Assemblierungsmotive der Struktur aller Peptidamphiphile **X-11**, **X-22**, **X-26**, **X-27**, **X-30**, **X-31**, **X-32** und **X-33** bleiben unverändert und die Anzahl möglicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Molekülen bleiben erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung einer Alkinfunktionalität an eine geringfügig veränderte Struktur der Peptidamphiphile **X-11** und **X-22** eine Einführung unterschiedlicher fluoreszenter Sonden möglich ist.

3.7 Evaluierung der Peptidamphiphile

Nach erfolgreicher Synthese der Peptidamphiphile und ihrer funktionalisierten Variante sollen nachfolgend die Eigenschaften der supramolekularen Polymere dieser Moleküle untersucht werden. Dabei wird zunächst das Homopolymersystem nur einer Komponente und darauffolgend die Copolymersysteme verschiedener Komponenten betrachtet. Diese werden in ihrer Morphologie sowie ihrem dynamischen Charakter mithilfe unterschiedlicher Techniken und Methoden erforscht.

Die in Kapitel 3.4 synthetisierten C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile sind in der Lage, in Wasser spontan eindimensionale, kolumnare Stapel auszubilden. Die supramolekulare Polymerisation führt zur Bildung nanometer- bis mikrometerlanger Nanostäbchen. Diese Assemblierung soll zunächst gezeigt werden. Die Aggregation der monomeren Bestandteile führt zur Ausbildung von Überstrukturen, die spektroskopisch nachgewiesen werden können. Neben der Methoden der UV-Vis- und IR-Spektroskopie, eignet sich besonders die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie für die Untersuchung peptidbasierter supramolekularer Polymere.^[65] Die chiroptische Methode der CD-Spektroskopie zeichnet sich als nützliche Methode zur Auswertung der Strukturinformationen chiraler, aggregierter Verbindungen aus. Sie nutzt die unterschiedliche Anregungsenergie elektronischer Zustände der chromophoren Struktureinheiten von Peptiden. Somit lassen sich Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur ziehen.^[222] Zudem können mikroskopische Methoden wie Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und lichtmikroskopische Methoden wie die Konfokalmikroskopie sowie supraauflösende Techniken verwendet werden. Diese Methoden sind in der Lage, die gebildeten Strukturen direkt abzubilden und die Morphologie zu untersuchen.

3.7.1 Evaluierung der Homopolymer-Systeme

Zunächst wurden die Peptidamphiphile **X-11** und **X-22** mittels CD-Spektroskopie auf ihre Assemblierungsfähigkeit untersucht. Das Peptidamphiphil **X-11** ist das direkte Analogon des Peptidamphiphils SM^{EG4} , das in der BESENIUS-Gruppe verwendet wird und umfänglich charakterisiert und untersucht wurde.^[52,53,221] Dieses unterscheidet sich nur durch die zusätzlichen Triazolgruppen im Dendron, die durch die CuAAC eingeführt wurden. Die Strukturformeln der Verbindungen sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Das Peptidamphiphil SM^{EG4} wurde von [REDACTED] zur Verfügung gestellt. Es soll gezeigt werden, dass das neue Peptidamphiphil **X-11** auch zur supramolekularen Polymerisation befähigt ist und gleiche oder ähnliche Eigenschaften besitzt wie SM^{EG4} . CD-Spektren der Peptidamphiphile in Wasser bei einer Konzentration von 25 μM zeigen eine stark positive Bande bei $\lambda = 190$ nm und zwei negative Signale bei $\lambda = 205$ nm und $\lambda = 215$ nm (Abbildung 3.13 A). Diese Banden unterscheiden sich lediglich leicht in ihrer Intensität zwischen den Aggregaten der Verbindungen **X-11** und SM^{EG4} bei 20 °C. Die

erhaltenen charakteristischen Signale im CD-Spektrum werden auf das Vorliegen von β -faltblattähnlichen Strukturmerkmalen in den kolumnar gestapelten Peptidamphiphilen zurückgeführt, die durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Tri-L-phenylalanineinheiten der Monomere hervorgerufen werden.^[47,48,56,221,223,224]

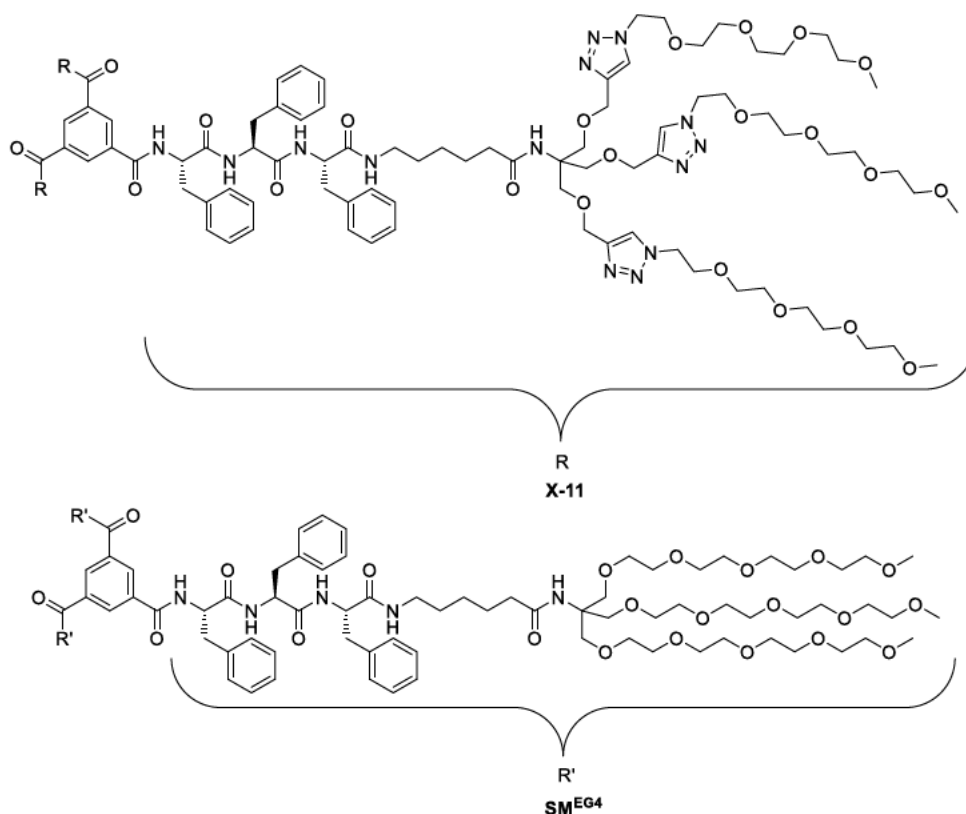


Abbildung 3.12: Strukturformeln der C₃-symmetrischen Peptidamphiphile mit Tetraethylglykolmonomethylether-Dendron X-11 und SM^{EG4}.

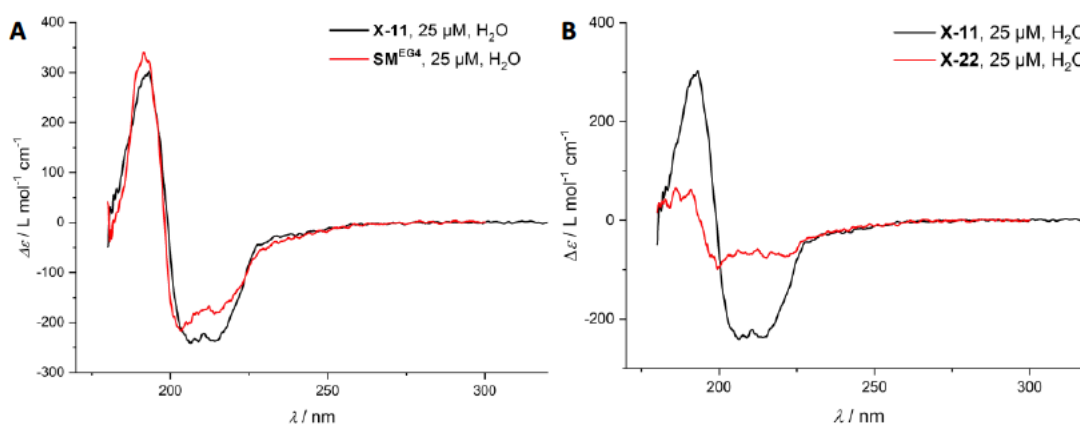


Abbildung 3.13: A: Vergleich der CD-Spektren der C₃-symmetrischen Peptidamphiphile X-11 und SM^{EG4} mit Tetraethylglykolmonomethylether-Dendronen (25 μM in Milli-Q Wasser, 20 °C). B: Vergleich der CD-Spektren der Peptidamphiphile mit „click“-baren Dendronen X-11 und X-22 (25 μM in Milli-Q Wasser, 20 °C).

Ein Vergleich der CD-Spektren der in dieser Arbeit synthetisierten C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile **X-11** und **X-22** in Abbildung 3.13 B zeigt deutlich, dass für beide supramolekulare Polymere in Wasser die gleichen CD-Signale erhalten werden, jedoch für das mannosylierte Derivat **X-22** deutlich geringer ausgeprägt. Das niedrigere CD-Signals kann auf eine geringere Assemblierungstendenz oder eine geringere Ordnung innerhalb der Aggregate hindeuten. Die CD-Spektroskopie allein vermag diesen Sachverhalt aber nicht eindeutig zu erklären. In Abbildung 3.14 sind zusätzlich die CD-Spektren der Lösungen der funktionalisierten Peptidamphiphile **X-26**, **X-27**, **X-30** und **X-31** einer Konzentration von 25 μM in Wasser gezeigt. Abbildung 3.14 A stellt hierbei den Vergleich des C_3 -symmetrischen Peptidamphiphils mit Tetraethylenglykol-Dendron **X-11** mit den funktionalisierten Varianten **X-26** und **X-27** dar. Es wird deutlich, dass die gebildeten Nanostäbchen der funktionalisierten Derivate die gleichen CD-Signale aufweisen, wobei die negative Bande bei $\lambda = 205$ nm nicht auftritt. Durch die eingeführten Farbstoffe weisen **X-26** und **X-27** eine höhere Hydrophilie auf. Zudem wird die C_3 -Symmetrie aufgehoben, was vermutlich zu einer veränderten Ordnung in der Stapelung der Monomere führt. Der Vergleich der mannosylierten Peptidamphiphile **X-22** mit **X-30** und **X-31** zeigt den gleichen Sachverhalt. Auf welches Strukturmerkmal die Bande bei $\lambda = 205$ nm zurückzuführen ist, konnte nicht ausreichend geklärt werden. Außerdem ist die Signalintensität der negativen Bande bei $\lambda = 215$ nm vergleichsweise schwach ausgeprägt, während das positive Signal bei $\lambda = 190$ nm für die funktionalisierten Peptidamphiphile intensiver aufgenommen wird.

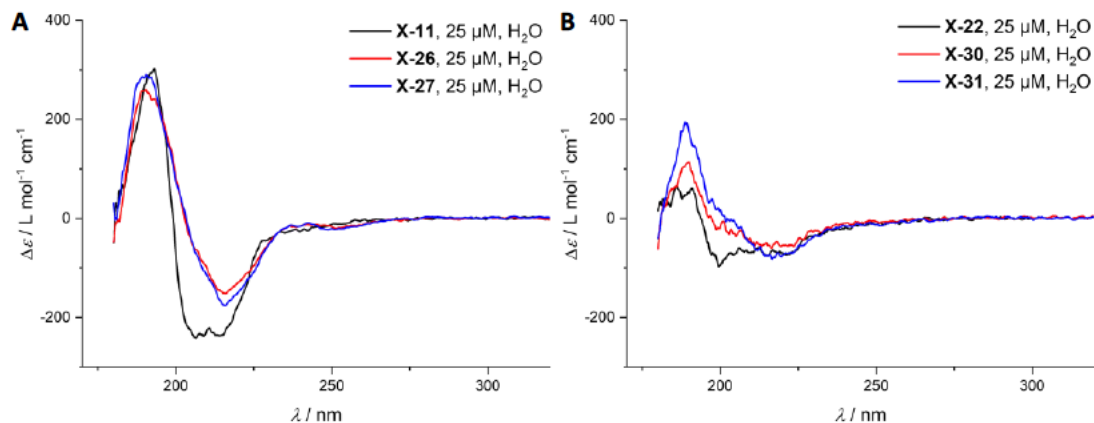


Abbildung 3.14: A: CD-Spektren des C_3 -symmetrischen Peptidamphiphils **X-11** und der funktionalisierten Peptidamphiphile **X-26** und **X-27** mit Tetraethylenglykolmonomethylether-Dendron (25 μM in Milli-Q Wasser, 20 $^{\circ}\text{C}$). B: CD-Spektren des C_3 -symmetrischen Peptidamphiphils **X-22** und der funktionalisierten Peptidamphiphile **X-30** und **X-31** mit Triethylenglykolmannosid-Dendron (25 μM in Milli-Q Wasser, 20 $^{\circ}\text{C}$).

Polyethylenglykol-Lösungen in Wasser besitzen eine untere kritische Lösungstemperatur (LCST, engl. *lower critical solution temperature*). Abhängig vom Molekulargewicht des Polymers variiert die LCST wässriger Lösungen zwischen 100 und 180 $^{\circ}\text{C}$.^[225] Durch den dendritischen Effekt erhöht sich die Hydrophobizität dendritischer Architekturen und die

LCST wässriger Lösungen dendritisch verzweigter Oligoethylenglykol-Derivate sinkt gegenüber linearem Polyethylenglykol ab.^[226,227] Dieses thermoresponsive Verhalten konnte bereits für supramolekulare Polymere mit Oligoethylenglykoldendronen beobachtet werden. Es beruht auf der entropiegetriebenen Dehydratisierung der Dendrone, was auf das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wasser und den Ethylenglykoleinheiten zurückzuführen ist.^[228,229]

Um das LCST-Verhalten der in dieser Arbeit synthetisierten Peptidamphiphile zu untersuchen, wurden temperaturabhängige CD-Messungen durchgeführt. Die Lösungen wurden in Wasser zwischen 10 °C und 90 °C untersucht, wobei beim Aufheizen und Abkühlen eine Rate von 5 °C/min verwendet wurde. Die Messungen wurden zunächst für das von [REDACTED] [REDACTED] bereitgestellte Referenzpeptidamphiphil **SM^{EG4}** vorgenommen. Die Spektren der Aufheizphase (A) und der Abkühlphase (B) sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

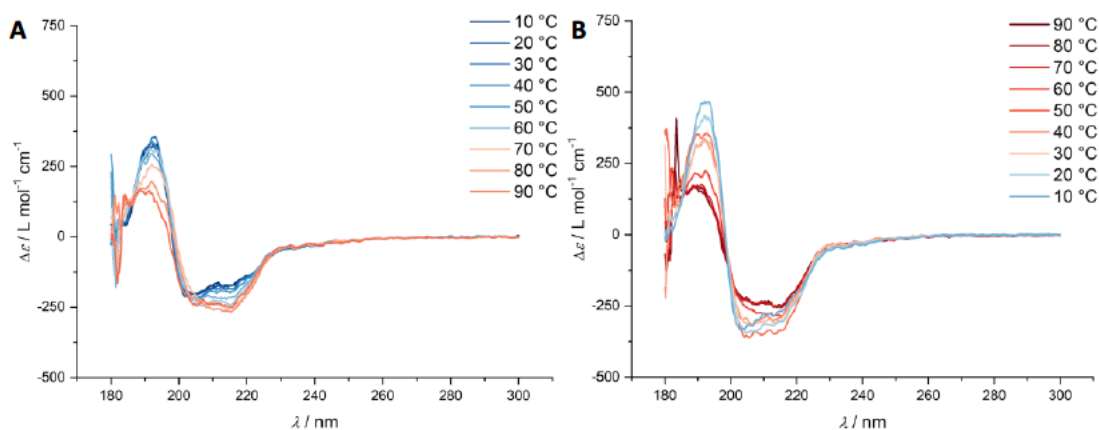


Abbildung 3.15: Temperaturabhängige CD-spektroskopische Messung des Peptidamphiphils **SM^{EG4}** in Milli-Q Wasser bei einer Konzentration von 25 µM. A zeigt die Spektren der Messung bei den angegebenen Temperaturen beim Aufheizen der Probe. B zeigt die Spektren der Messung bei den angegebenen Temperaturen beim Abkühlen, direkt nach der Aufheizphase.

Das Peptidamphiphil **SM^{EG4}** zeigt nur ein schwaches LCST-Verhalten. Beim Aufheizen der Probe bildet sich die Bande bei $\lambda = 215$ nm stärker aus, während die Bande bei $\lambda = 190$ nm bei Temperaturen oberhalb von 60 °C reversibel an Intensität verliert. Beim Abkühlen bildet sich das Signal bei $\lambda = 190$ nm wieder aus, wobei die Banden bei $\lambda = 205$ nm und $\lambda = 215$ nm noch weiter an Intensität gewinnen. Für die vollständige Analyse des LCST-Verhaltens dieser Verbindung sei auf die Arbeit von URSCHBACH verwiesen.^[53]

Das vergleichbare C₃-symmetrische Peptidamphiphil **X-11**, das verknüpfende Triazoleinheiten im Dendron enthält, weist ein deutlicheres LCST-Verhalten als **SM^{EG4}** auf. In den Spektren der Aufheizphase in Abbildung 3.16 A ist die Abnahme des Ausschlags aller detektierten CD-Banden mit steigender Temperatur zu beobachten. Da die Abnahme der Banden mit einer bathochromen Verschiebung begleitet wird, ist von einer strukturellen Veränderung der assemblierten Aggregate und einem anschließenden

Ausfallen der Verbindung auszugehen. Das ist durch die Dehydratisierung der Dendrone zu begründen. Die Hydrophobizität der Dendrone bei hohen Temperaturen ändert den amphiphilen Charakter des Peptidkonjugats zu einer vollständig hydrophoben Verbindung, die sie unlöslich in Wasser macht. Dieser Effekt ist reversibel, wie die Spektren der Abkühlphase in Abbildung 3.16 B zeigen. Bei niedrigen Temperaturen bilden sich die Wasserstoffbrücken des Lösungsmittels mit den dendritischen Oligoethylglykoleinheiten wieder aus und der amphiphile Charakter der Verbindung **X-11** wird wiederhergestellt.

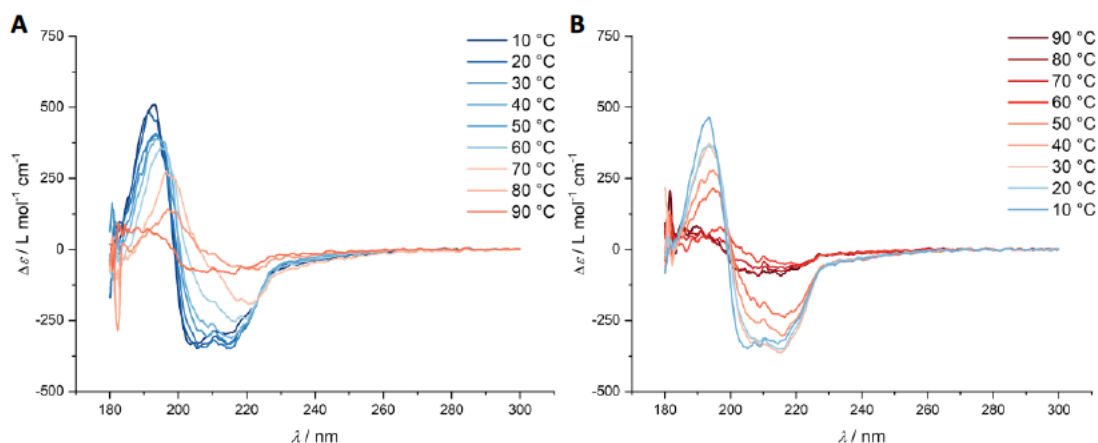


Abbildung 3.16: Temperaturabhängige CD-spektroskopische Messung des Peptidamphiphils **X-11** in Milli-Q Wasser bei einer Konzentration von 25 μM . A zeigt die Spektren der Messung bei den angegebenen Temperaturen beim Aufheizen der Probe. B zeigt die Spektren der Messung bei den angegebenen Temperaturen beim Abkühlen, direkt nach der Aufheizphase.

Zur besseren Darstellung dieses Effekts wurde das detektierte Signal der CD-Spektren bei einer Wellenlänge von $\lambda = 215 \text{ nm}$ auf den Minimalwert normiert und in Abbildung 3.17 gegen die Temperatur aufgetragen dargestellt. Dadurch kann verdeutlicht werden, dass der Wendepunkt bei der Aufheizphase (A) bei etwa 60 $^{\circ}\text{C}$ liegt. Der Wendepunkt der Abkühlphase (B) ist bei etwa 50 $^{\circ}\text{C}$ zu lokalisieren. Das zeigt, dass eine leichte Hysterese für die gewählten Messbedingungen auftritt.

Die deutlichere Temperaturabhängigkeit von **X-11** gegenüber **SM^{EG4}** kann durch die zusätzlichen Triazolgruppen innerhalb der Dendrone begründet werden. Die zusätzlichen hydrophoben Aromaten in der peripheren hydrophilen Domäne des Peptidamphiphils reduzieren die Wasserlöslichkeit der Verbindung und der assemblierten supramolekularen Polymere. Die höhere Hydrophobizität senkt die LCST von **X-11** gegenüber **SM^{EG4}** leicht ab. Generell ermöglicht die Synthesestrategie der „click“-baren Dendrone jedoch die Darstellung vergleichbarer Peptidamphiphile mit ähnlicher Morphologie und Eigenschaften.

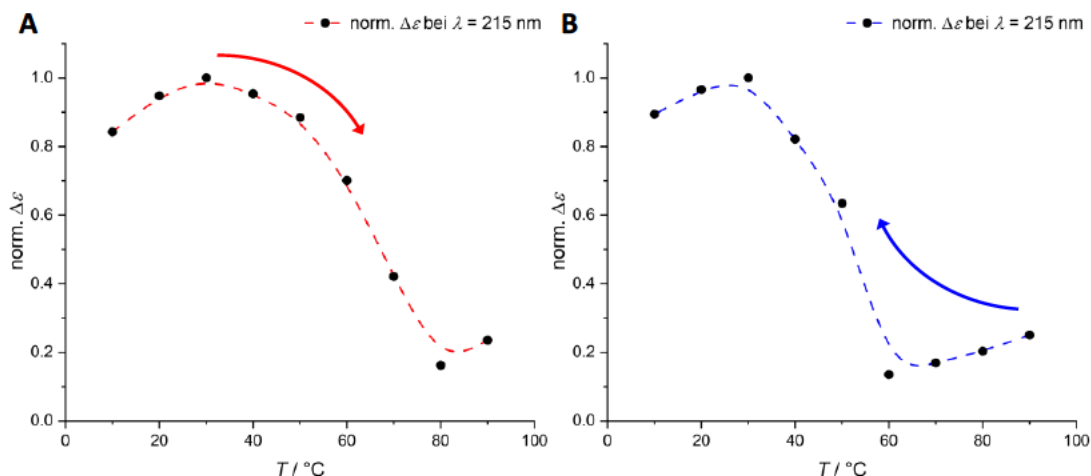


Abbildung 3.17: Auftragung des normierten CD-Signals von **X-11**, detektiert bei einer Wellenlänge von $\lambda = 215$ nm gegen die Temperatur. Die Aufheizphase ist in A und die Abkühlphase in B dargestellt. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 5 °C/min.

Um die resultierende Morphologie der supramolekularen Polymere genauer zu betrachten, wurden TEM-Aufnahmen der wässrigen Peptidamphiphillösungen auf einem dünnen Kohlenstoffträgerfilm angefertigt, der mit Uranylacetat negativ kontrastiert wurde. Die Aufnahmen wurden von [REDACTED] aufgenommen. Die Evaluation der Dimension der dargestellten Aggregate wurde mithilfe der Software *ImageJ* durchgeführt.^[217] In Abbildung 3.18 A sind für das Peptidamphiphil **X-11** deutlich kurze Nanostäbchen der Länge $l = (26,3 \pm 14,3)$ nm zu erkennen. Die mittlere Breite w der vermessenen Stäbchen beträgt $w = (6,8 \pm 0,8)$ nm. Die TEM-Aufnahmen bestätigen die durch CD-Spektroskopie aufgestellte Annahme der Assemblierung in supramolekulare Nanostäbchen.

Eine Lösung des funktionalisierten Peptidamphiphils **X-26** zeigt ebenfalls gebildete Nanostäbchen. Hier fällt die mittlere Länge l mit $l = (68,4 \pm 43,6)$ nm mehr als doppelt so lang aus als bei dem unfunktionalisierten Amphiphil **X-11**. Die Breite w wurde mit $w = (8,0 \pm 1,1)$ nm ermittelt und fällt ebenfalls größer aus als für die Aggregate der Verbindung **X-11**. Zusätzlich sind hier sphärische Partikel zu beobachten. Ob es sich bei den Partikeln um gebildete Mizellen der sulfo-Cy3-funktionalisierten Verbindung **X-26** handelt oder um Artefakte der elektronenmikroskopischen Probenvorbereitung, kann nicht geklärt werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des sulfo-Cy5-funktionalisierten Peptidamphiphils **X-27** erscheinen direkt vergleichbar mit den Aufnahmen der Verbindung **X-26**. Es werden ebenfalls Stäbchen der vergleichbaren Länge $l = (66,2 \pm 39,4)$ nm und Breite $w = (8,8 \pm 1,0)$ nm abgebildet. Erneut sind sphärische Partikel zu erkennen, die in den ausgewählten Aufnahmen des Peptidamphiphils **X-27** in größeren Maßen anfallen wie für **X-26**. Da die Ursache der sphärischen Partikel nicht ausreichend geklärt ist, lässt dieser Befund keine Aussagen über Unterschiede der Peptidamphiphile **X-26** und **X-27** zu.

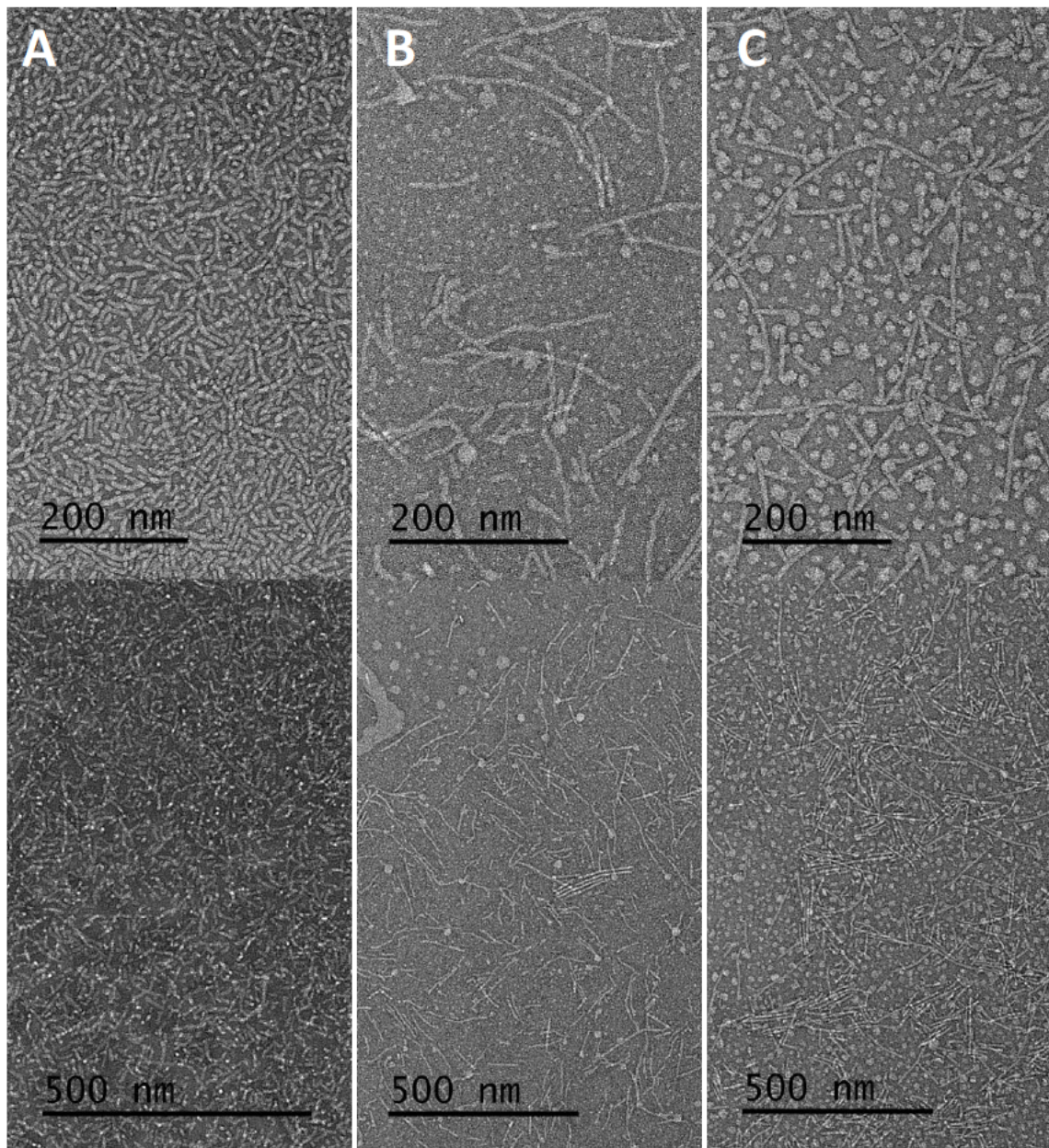


Abbildung 3.18: TEM-Aufnahmen der Peptidamphiphile mit Tetraethylglykolmonomethylether-Dendron X-11 (A), X-26 (B) und X-27 (C) aus einer Lösung der Konzentration von 25 μM in Milli-Q Wasser. Negativ kontrastiert mit Uranylacetat.

Bei der Betrachtung der TEM-Aufnahmen der Peptidamphiphile, die auf einem Triethylglykolmannosid-Dendron basieren (X-22, X-30 und X-31), fallen zunächst für das C_3 -symmetrische Peptidamphiphil X-22 nur sphärische Partikel auf (Abbildung 3.19 A). Bei genauerer Betrachtung können aber lateral aggregierte, in Clustern angeordnete Nanostäbchen mit schwachem Kontrast wahrgenommen werden. Die Nanostäbchen in diesen inselförmig angeordneten Clustern weisen eine durchschnittliche Länge l von $l = (80,0 \pm 30,6)$ nm und eine durchschnittliche Breite w von $w = (6,8 \pm 0,8)$ nm auf. Damit

sind diese Aggregate in ihrer Breite mit dem C₃-symmetrischen Pendant X-11 vergleichbar.

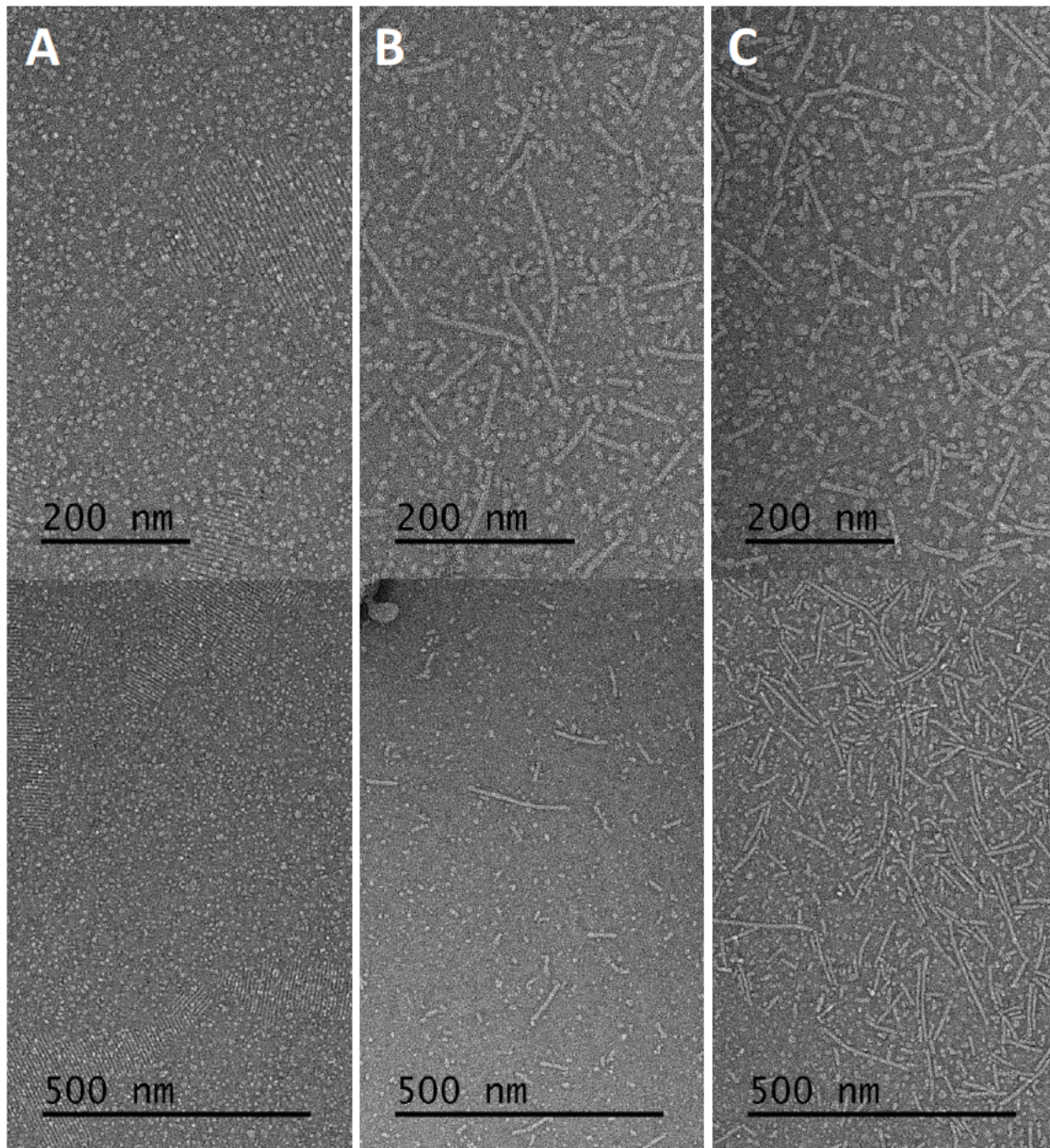


Abbildung 3.19: TEM-Aufnahmen der Peptidamphiphile mit Triethylenglykolmannosid-Dendron X-22 (A), X-30 (B) und X-31 (C) aus einer Lösung der Konzentration von 25 μ M in Milli-Q Wasser. Negativ kontrastiert mit Uranylacetat.

Die Unterschiede in den dendritischen Einheiten von tetraethylenglykol-basiert zu triethylenglykolmannosid-basiert scheinen keinen Einfluss auf die Breite der resultierenden Nanostäbchen zu haben. Die Länge der Nanostäbchen ist im Mittel aber circa dreimal so lang wie für X-11 und wird vermutlich nur durch die Stabilisierung durch laterale Aggregation erreicht. Es können in keiner Aufnahme für X-22 frei vorliegende einzelne Stäbchen beobachtet werden. Das Dendron scheint hier die Morphologie der

supramolekularen Polymere zu beeinflussen, was das Ergebnis der CD-Spektroskopie erklären könnte. Für die funktionalisierten Varianten der Peptidamphiphile **X-30** (Abbildung 3.19 B) und **X-31** (Abbildung 3.19 C) können ebenfalls einheitliche Aufnahmen gefunden werden. **X-30** zeigt Stäbchen der Länge $l = (59,2 \pm 34,9)$ nm und Breite $w = (9,3 \pm 1,1)$ nm, während **X-31** Stäbchen der Länge $l = (58,8 \pm 30,5)$ nm und der Breite $w = (9,0 \pm 1,1)$ nm zeigt. Die Dimensionen der funktionalisierten Peptidamphiphile mit mannosyliertem Dendron **X-30** und **X-31** sind nahezu identisch. Im Vergleich zum unfunktionalisierten Pendant **X-22** können hier aber individuelle Nanostäbchen ohne laterale Aggregation dargestellt werden. Dies könnte durch die eingeführte Ladung der Farbstoffe sulfo-Cy3 und sulfo-Cy5 erklärt werden, die eine Zusammenlagerung durch Coulomb-Abstoßung verhindert. Zum besseren Vergleich sind die gemessenen Dimensionen der Peptidamphiphile in Abbildung 3.20 gegenübergestellt.

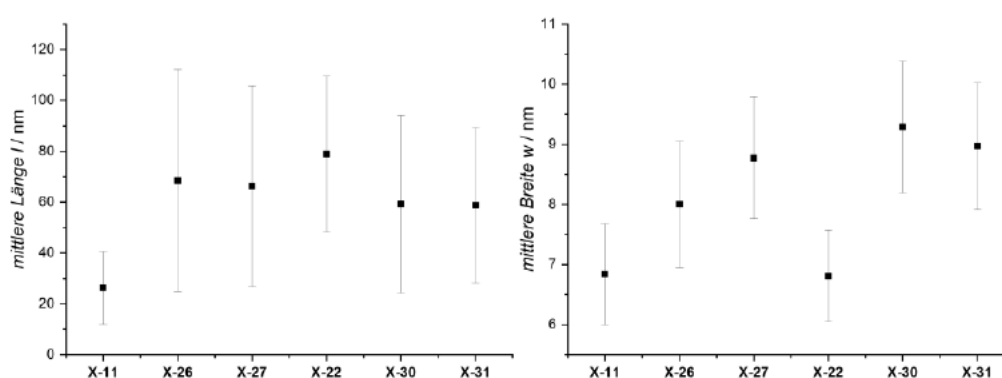


Abbildung 3.20: Zusammenfassung der gemessenen mittleren Längen l und mittleren Breiten w der durch TEM aufgenommenen Nanostäbchen **X-11**, **X-22**, **X-26**, **X-27**, **X-30** und **X-31**.

Die Auswertung der TEM-Aufnahmen der Peptidamphiphile zeigt zusammengefasst, dass während **X-11** kurze, individuelle Stäbchen hervorbringt, bildet **X-22** längere, lateral aggregierende Cluster an Nanostäbchen. Die Funktionalisierung der Peptidamphiphile scheint die Breite der Stäbchen um circa 2 nm zu vergrößern. Im Fall des Peptidamphiphils **X-11** wird die Stäbchenlänge bei Funktionalisierung mehr als verdoppelt. Im Fall des Mannosederivats **X-22** reduziert sich die Länge geringfügig, liegt aber im Intervall der Standardabweichung der gemessenen Stäbchen.

Nachfolgend soll die Fähigkeit der Copolymerisation der synthetisierten Peptidamphiphile untersucht werden. Durch Copolymerisation mit den funktionalisierten Peptidamphiphilen ergibt sich die Möglichkeit weiterer interessanter Untersuchungsmethoden, die ebenfalls Gegenstand des folgenden Kapitels 3.7.2 sind.

3.7.2 Evaluierung der Copolymer-Systeme

Durch Coassemblierung der C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile **X-11** und **X-22** mit den Peptidamphiphilen **X-26**, **X-27** und **X-30** bis **X-33**, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff funktionalisiert sind, können auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungsmethoden herangezogen werden. Um die Verbindungen einer Copolymerisation zu unterziehen, müssen lediglich die Feststoffe der monomeren Bestandteile gemischt und in Wasser gelöst werden. Bei der sofort stattfindenden supramolekularen Polymerisation der Peptidamphiphile in kolumnar gestapelte, eindimensionale Nanostäbchen werden die unterschiedlichen Monomere vermutlich statistisch eingebaut. Zur Herstellung der Copolymerlösungen wurden allerdings Stammlösungen der Peptidamphiphile in Milli-Q Wasser verwendet und in der entsprechenden Zusammensetzung zusammengegeben. In wässrigen Lösungen der Homopolymere liegen jedoch bereits Nanostäbchen vor. Supramolekulare Polymere besitzen aufgrund der nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen den Monomeren einen dynamischen Charakter. Die Monomere innerhalb des Polymers werden in einer Gleichgewichtsreaktion ständig ein- und ausgebaut.^[230] So würden beim Mischen zweier Homopolymere nach einer Wartezeit t Copolymere entstehen, in denen beide Monomerarten eingebaut sind.^[117,231] Da dieser Prozess für die in dieser Arbeit verwendeten Peptidamphiphile jedoch sehr langsam ist und sich der erreichbare Zustand durch Copolymerisation einer Monomermischung vom Zustand einer equilibrierten Mischung zweier Homopolymere unterscheidet (siehe Kapitel 3.7.3), wird eine andere Methode verwendet. Die wässrigen Homopolymermischungen wurden zunächst gefriergetrocknet, um das Lösungsmittel zu entfernen. Die Lyophilisate wurden dann im selben Volumen DMSO aufgenommen, da das aprotisch polare Lösungsmittel ein starker H-Brücken-Akzeptor ist und durch H-Brücken mit den Monomeren die Polymere vollständig aufbricht.^[232] Danach wurde die DMSO-Lösung erneut lyophilisiert, um das Lösungsmittel wiederum durch Wasser zu ersetzen. Durch das Lösen der nun monomeren Mischung der Peptidamphiphile beginnt, wie oben beschrieben, eine spontane supramolekulare Polymerisation mit dem statistischen Einbau von Monomeren in supramolekularen Copolymeren. Um DMSO aus den Proben vollständig zu entfernen, wurden die Lösungen noch zweimal gefriergetrocknet und erneut mit dem gleichen Volumen Milli-Q Wasser gelöst. Auf diese Weise wurden die Probelösungen hergestellt, die in Tabelle 3.2 zusammengefasst sind.

Tabelle 3.2: Tabellarische Übersicht der Zusammensetzung der verwendeten Copolymer-Probeflösungen.

Kürzel	Bestandteile	Konzentration
TEG ^{10%_sCy3}	90 % X-11 , 10 % X-26	25 µM
TEG ^{10%_sCy5}	90 % X-11 , 10 % X-27	25 µM
TEG ^{10%_sAF488}	90 % X-11 , 10 % X-32	25 µM
TEG ^{10%_sAF647}	90 % X-11 , 10 % X-33	25 µM
TEG ^{5%_sCy3}	95 % X-11 , 5 % X-26	25 µM
TEG ^{5%_sCy5}	95 % X-11 , 5 % X-27	25 µM
TEG ^{5%_sCy3+5%_sCy5}	90 % X-11 , 5 % X-26 , 5 % X-27	25 µM
TEG ^{5%_sAF488}	95 % X-11 , 5 % X-32	25 µM
TEG ^{5%_sAF647}	95 % X-11 , 5 % X-33	25 µM
Man ^{10%_sCy3}	90 % X-22 , 10 % X-30	25 µM
Man ^{10%_sCy5}	90 % X-22 , 10 % X-31	25 µM
Man ^{5%_sCy3}	95 % X-22 , 5 % X-30	25 µM
Man ^{5%_sCy5}	95 % X-22 , 5 % X-31	25 µM
TEG ^{10%_sMan^{90%}}	9 % X-11 , 1 % X-26 , 81 % X-22 , 9 % X-31	25 µM
TEG ^{50%_sMan^{50%}}	45 % X-11 , 5 % X-26 , 45 % X-22 , 5 % X-31	25 µM
TEG ^{90%_sMan^{10%}}	81 % X-11 , 9 % X-26 , 9 % X-22 , 1 % X-31	25 µM

Die Copolymer-Nanostäbchen der Probeflösungen haben nun fluoreszente Farbstoffe an der Oberfläche der Stäbchen eingebettet. Diese können als Markierung für Aufnahmen in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden. **TEG**^{10%_sCy3} wurde mittels Weitfeld-Mikroskopie auf einem Elyra 7^[233] von Zeiss untersucht. Hier können Nanostäbchen in wässriger Lösung beobachtet werden. Abbildung 3.21 zeigt eine Zeitserie eines diffundierenden Nanostäbchens durch die Lösung. Das beobachtete Stäbchen besitzt eine Länge von circa 10 µm und ist damit beträchtlich länger als die Nanostäbchen, die bisher in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnten. Da das Stäbchen nicht fixiert ist, befindet sich nicht das gesamte Stäbchen zu jeder Zeit in der Fokusebene des Objektivs und kann daher nicht scharf abgebildet werden. Stäbchen in Wasser diffundieren einzeln in Lösung und adsorbieren nicht auf dem Deckgläschen des Probenträgers. So können keine fixierten Stäbchen abgebildet werden und auch ein Waschen der Probe, um Hintergrundfluoreszenz zu entfernen, ist nicht möglich, da so die gesamte Probe entfernt werden würde.

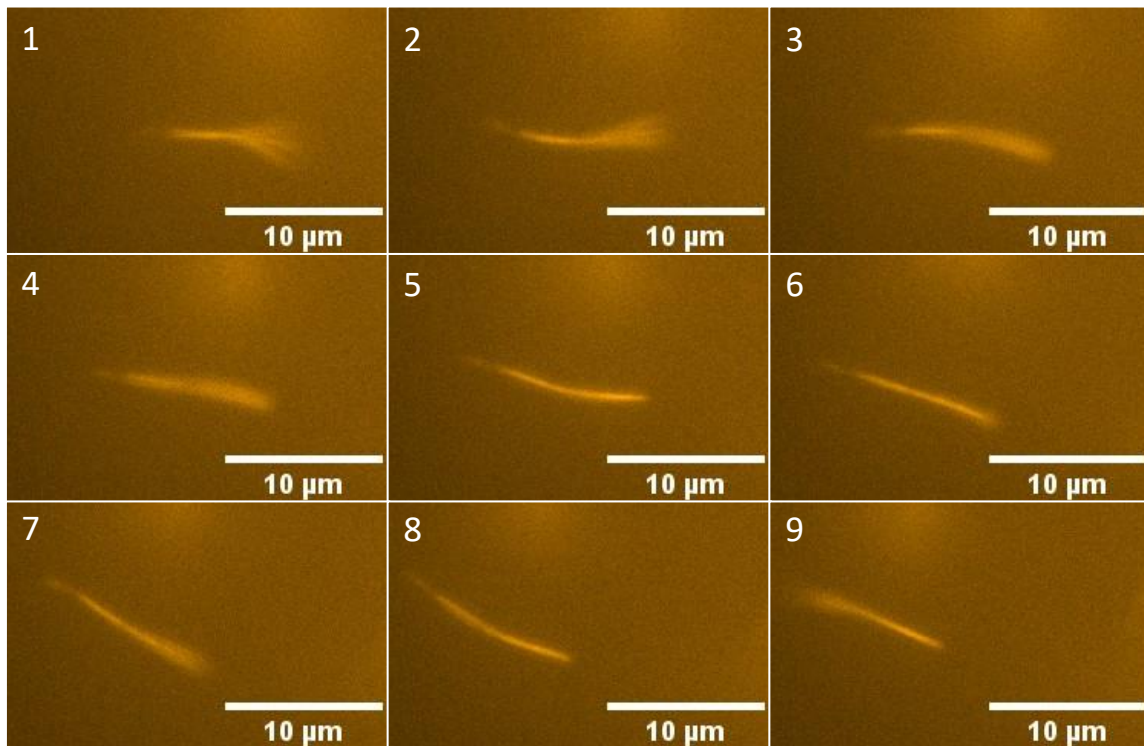


Abbildung 3.21: Weitfeldmikroskopie-Aufnahmen (Elyra 7 von Zeiss) einer Zeitserie der Weitfeldmikroskopie der Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{Cy}^3$ in H_2O . Zu sehen ist ein diffundierendes Nanostäbchen einer Länge von circa $10\ \mu\text{m}$. Die Bildabfolge ist durch die Ziffern in der jeweiligen linken oberen Bildecke gekennzeichnet. Der zeitliche Abstand der Aufnahmen beträgt 56 ms.

Werden die Probelösungen jedoch in phosphatgepufferten Salzlösungen (PBS, 10 mM) verwendet, adsorbieren die supramolekularen Polymere auf der Oberfläche des Deckgläschens. Dies ist besonders effektiv auf hydrophilen Oberflächen wie oberflächenbehandelten Kunststoffdeckgläschen für Zellkulturen und geätzten Borosilikat-Glasdeckgläschen. Weniger effektiv sind unbehandelte Borosilikat-Deckgläschen. Hydrophobe Oberflächen wie unbehandelte Kunststoffträger oder Träger mit hydrophoben Coatings ermöglichen keine Adsorption. In Abbildung 3.22 ist die Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{Cy}^5$ in PBS in einem hydrophil beschichteten Kunststoffobjektträger (ibiTreat 8 well Proben-träger von Ibidi) abgebildet.

Die Aufnahmen wurden durch ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop (LSCM, engl. *laser scanning confocal microscope*) (TCS SP5 von Leica) erzeugt.^[234] In der linken Aufnahme (A) kann gezeigt werden, wie die Nanostäbchen auf dem Deckgläschen adsorbieren. An den schwarzen Stellen adsorbieren keine Aggregate der Probe, was durch die Oberflächenbehandlung des Herstellers bedingt ist. Auf der rechten Seite (Aufnahme B) wird eine Ebene oberhalb der Deckgläschenoberfläche gezeigt. Hier können weitere diffundierende Nanostäbchen aufgenommen werden. Bei Verwendung von Probelösungen dieser Konzentration liegen die Nanostäbchen viel zu dicht vor. Der Durchmesser eines Nanostäbchen wird ausgehend von der TEM-Bildgebung auf circa 8 nm eingeschätzt. Durch das beugungsbegrenzte Auflösungslimit in der

Lichtmikroskopie erscheint das Stäbchen deutlich breiter. Die Punktspreizfunktion bei Verwendung eines Lasers mit der Wellenlänge $\lambda = 633 \text{ nm}$ und einem Objektiv mit numerischer Apertur von $NA = 1,4$ wird eine Halbwertsbreite ($FWHM$) der Punktspreizfunktion von $FWHM = 233 \text{ nm}$ erhalten.^[125] Die Stäbchen erscheinen so etwa 30 mal dicker als in der Elektronenmikroskopie und müssen dementsprechend weiter räumlich separiert fixiert werden, um aufgelöste Nanostäbchen abbilden zu können. Da bei einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ die Oberfläche lückenlos von Stäbchen adsorbiert wird, muss die Konzentration verringert werden.

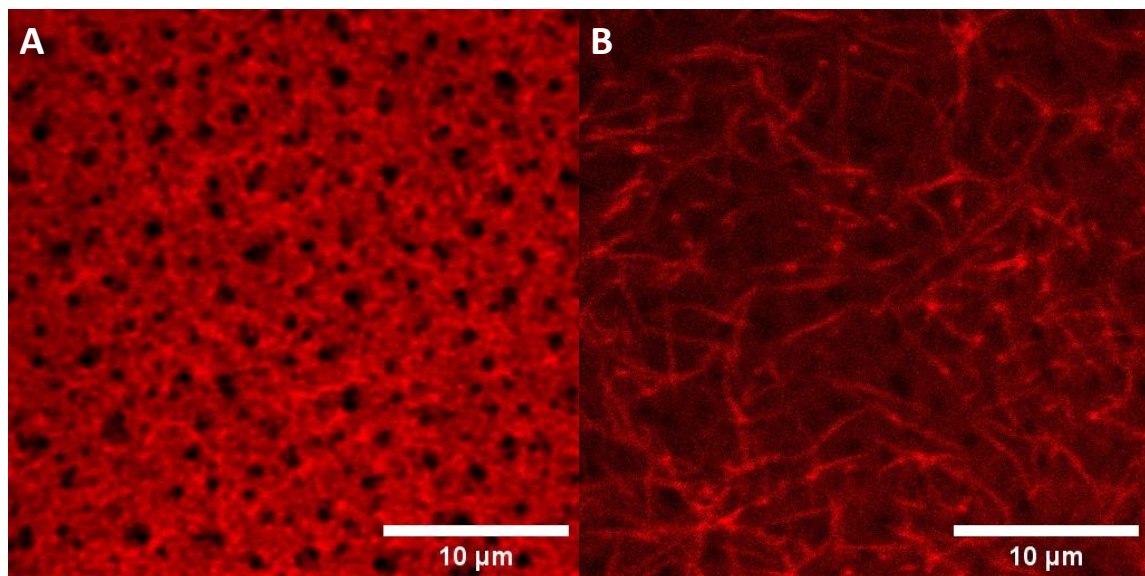


Abbildung 3.22: Aufnahmen der Konfokalmikroskopie (TCS SP5 von *Leica*) der Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{Cy}5$ einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ in PBS. A: Adsorbierte Nanostäbchen auf der Deckglasoberfläche (*ibiTreat 8 well* Probenträger von *Ibidi*). B: Diffundierende Nanostäbchen in Lösung. Aufnahme in einer Ebene oberhalb der Deckglasoberfläche.

Durch Verdünnungsexperimente konnte ermittelt werden, dass eine Verdünnung von 99:1 eine Adsorption gut separierter Stäbchen ermöglicht. Bei der Verdünnung der $25 \mu\text{M}$ Probelösungen in Wasser mit der 99-fachen Menge PBS-Puffer resultierte eine 250 nM Lösung in PBS, die optimale Adsorptionseigenschaften besitzt und eine ausreichende Separation der fixierten Stäbchen aufwies. In ersten Experimenten wurde die verdünnte Probelösung über mehrere Versuchstage verwendet. Abbildung 3.23 zeigt konfokalmikroskopische Aufnahmen der Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{Cy}3$ des ersten (A), zweiten (B) und dritten Versuchstages (C). Am ersten Versuchstag wurde die verdünnte Probelösung frisch vor der Untersuchung verdünnt und direkt eingesetzt. Nach fünf Minuten Adsorptionszeit der Probe wurde die Lösung des Proberaums entnommen und durch PBS-Lösung ersetzt, um ungebundene Nanostäbchen zu entfernen. Der Waschschritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Die Aufnahmen der so angefertigten Proben zeigen ebenfalls Nanostäbchen einer Länge von circa $10 \mu\text{m}$, die ausreichend separiert vorliegen. Dieselbe Probelösung wurde 24 Stunden später verwendet und ebenfalls nach der

Adsorption für fünf Minuten zweimal gewaschen. In den Aufnahmen dieser Probe können ebenfalls Nanostäbchen aufgezeichnet werden. Jedoch liegen diese häufig in zu Clustern verbundenen Aggregaten vor. Bei gleicher Probenvorbereitung konnte am dritten Tag, 48 Stunden nach Verdünnung der Probe, kaum fixierte Nanostäbchen gefunden werden.

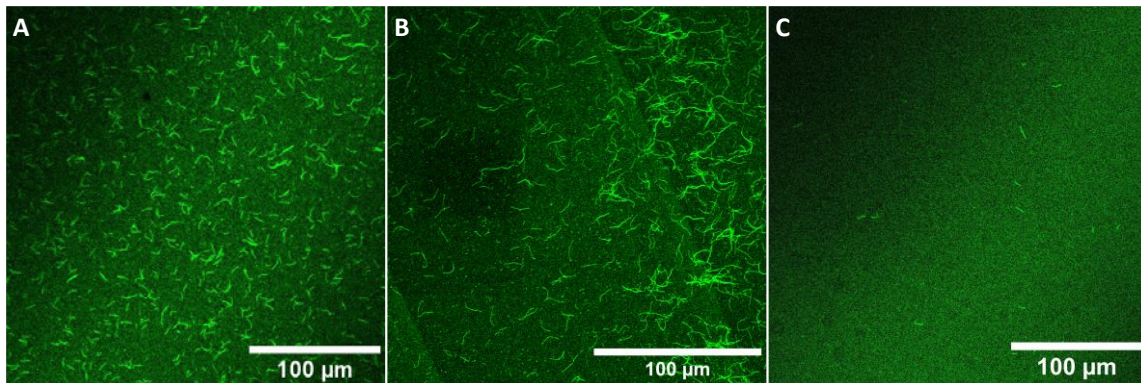


Abbildung 3.23: Konfokalmikroskopische Aufnahmen (TCS SP5 von *Leica*) einer 99:1 verdünnten Probelösung $\text{TEG}^{10\%}\text{Cy3}$ in Wasser mit PBS zu einer finalen Konzentration von 250 nM. Die Proben wurden (A) direkt nach dem Verdünnen, (B) 24 h nach dem Verdünnen und (C) 48 h nach dem Verdünnen für fünf Minuten auf dem Deckgläschen (ibiTreat 8 well Probenträger) adsorbiert und dann zweimal mit PBS gewaschen.

Diese Beobachtung zeigt, dass frisch verdünnte, wässrige Probelösungen in PBS lange, auf dem Deckgläschenboden adsorbierte Stäbchen enthalten, die deutlich weniger dicht vorliegen als bei 25 μM . Die Nanostäbchen reagieren nicht sofort auf die Verdünnung. Eine langsame Dynamik der supramolekularen Polymere sorgt für die langsame Anpassung der Stäbchen auf das neue Gleichgewicht durch die Verdünnung. Eine genaue Untersuchung der Dynamik der supramolekularen Polymere ist in Kapitel 3.7.3 beschrieben. In den ersten 24 Stunden nach Verdünnung konnten lange Stäbchen abgebildet werden, wobei eine Aggregation der Stäbchen zu Clustern beobachtet wurde. Jedoch konnten über 48 Stunden später kaum noch lange Stäbchen gefunden werden. Nanostäbchen adsorbierten hier nur noch vereinzelt. Es wird vermutet, dass nach dieser Zeit der Großteil der Strukturen nicht mehr als mikrometerlange Stäbchen vorliegen und vermutlich beim Waschen aus dem Probenträger entfernt werden. Ob nanometerlange Stäbchen tatsächlich vorhanden sind, kann mit der Auflösung herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie nicht ermittelt werden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer Konzentration von 250 nM konnten Stäbchen im zwei- bis dreistelligen Nanometerbereich gefunden werden (Aufnahmen nicht gezeigt). Die hohe Stabilität der supramolekularen Copolymere ermöglicht eine Probenvorbereitung in der gewünschten Polymerdichte durch Verdünnung und bedingt, dass keine Änderung über den observierten Zeitraum stattfindet.

Die Copolymere konnten ebenfalls mittels Kryoelektronenmikroskopie (Cryo-EM) untersucht werden. Die Aufnahmen wurden von [REDACTED] angefertigt. Cryo-EM ermöglichte eine deutlich höhere Auflösung gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie, leidet aber unter einem schwach ausgeprägten Kontrast für die untersuchten organischen Verbindungen. In Abbildung 3.24 kann durch die hohe Auflösung zwischen einzelnen Stäbchen und gebündelten Stäbchen unterschieden werden. Es können auch Nanostäbchen einer Länge über einem Mikrometer abgebildet werden, jedoch reicht der observierte Probenraum häufig nicht aus, um die Länge vieler Stäbchen messen zu können.

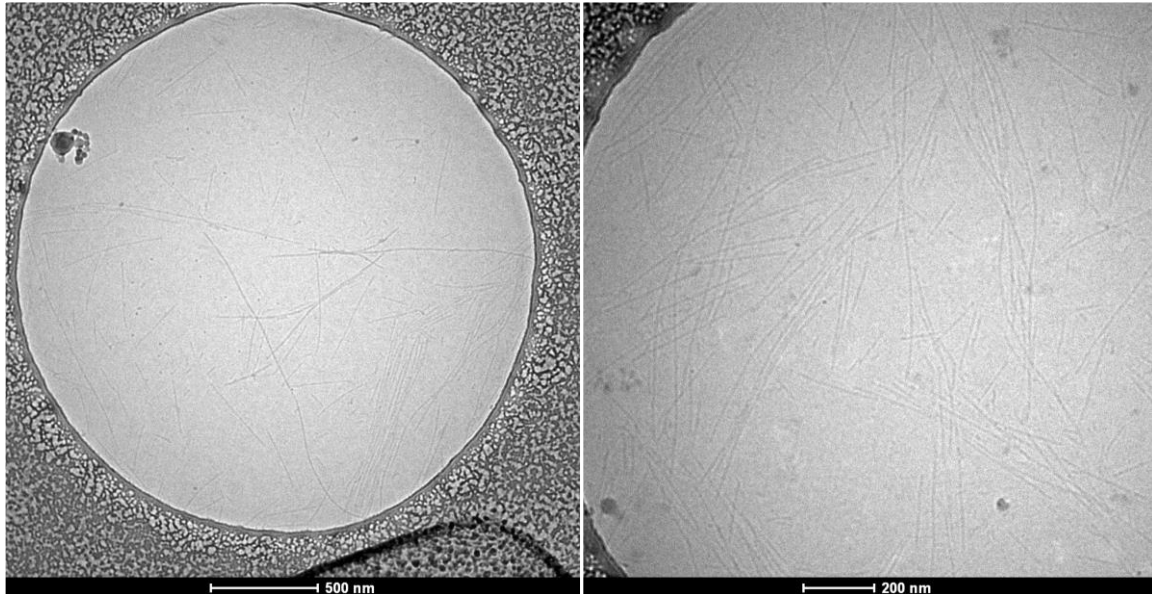


Abbildung 3.24: Cryo-EM-Aufnahmen der Copolymerprobe TEG^{5%}Cy^{3+5%}Cy⁵ in Wasser.

In der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie wurden Stäbchen einer Länge im zweistelligen Mikrometerbereich gefunden. Abbildung 3.25 zeigt neben kürzeren Stäbchen auch ein Stäbchen einer Länge von 26 μm (A) und sogar bis zu 97 μm (B). Die beobachtbare Länge der Stäbchen hängt hier vor allem von der Alterung der 25 μM Probelösung ab (Abbildung 3.28).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen lassen vermuten, dass die Länge der Stäbchen, die über mehrere Mikrometer hinausgeht, nicht durch einzelne Stäbchen verursacht wird, sondern durch die Zusammenlagerung mehrerer Stäbchen zu Bündeln. Eine TEM-Aufnahme solcher Bündel ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Die Nanostäbchen in einem der Bündel sind in Blau hervorgehoben. Die Aufnahme verdeutlicht, dass kein Stäbchen in voller Länge des Bildausschnitts vorliegt. Vielmehr endet ein Stäbchen nach etwa einem Mikrometer Länge und ein neues Nanostäbchen beginnt. Durch die Zusammenlagerung mehrerer Stäbchen zu einem Bündel und der versetzten Anordnung im Bündel wird die Struktur zusammengehalten. Diese Anordnung ist durch die schematische Darstellung in der Bildmitte veranschaulicht.

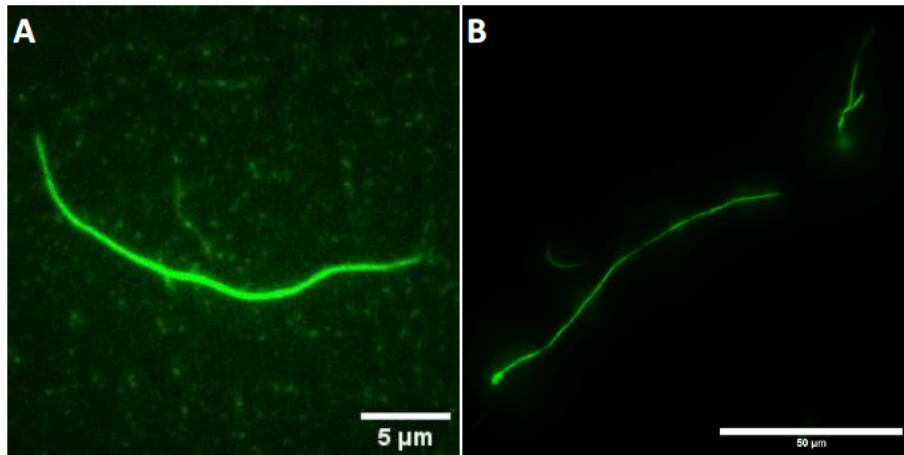


Abbildung 3.25: Weitfeldmikroskopische Aufnahmen (Elyra 7 von Zeiss) der Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{sCy}^3$. Sie zeigen ein 26 µm langes Stäbchen (A) und ein bis zu 97 µm langes Stäbchen (B).

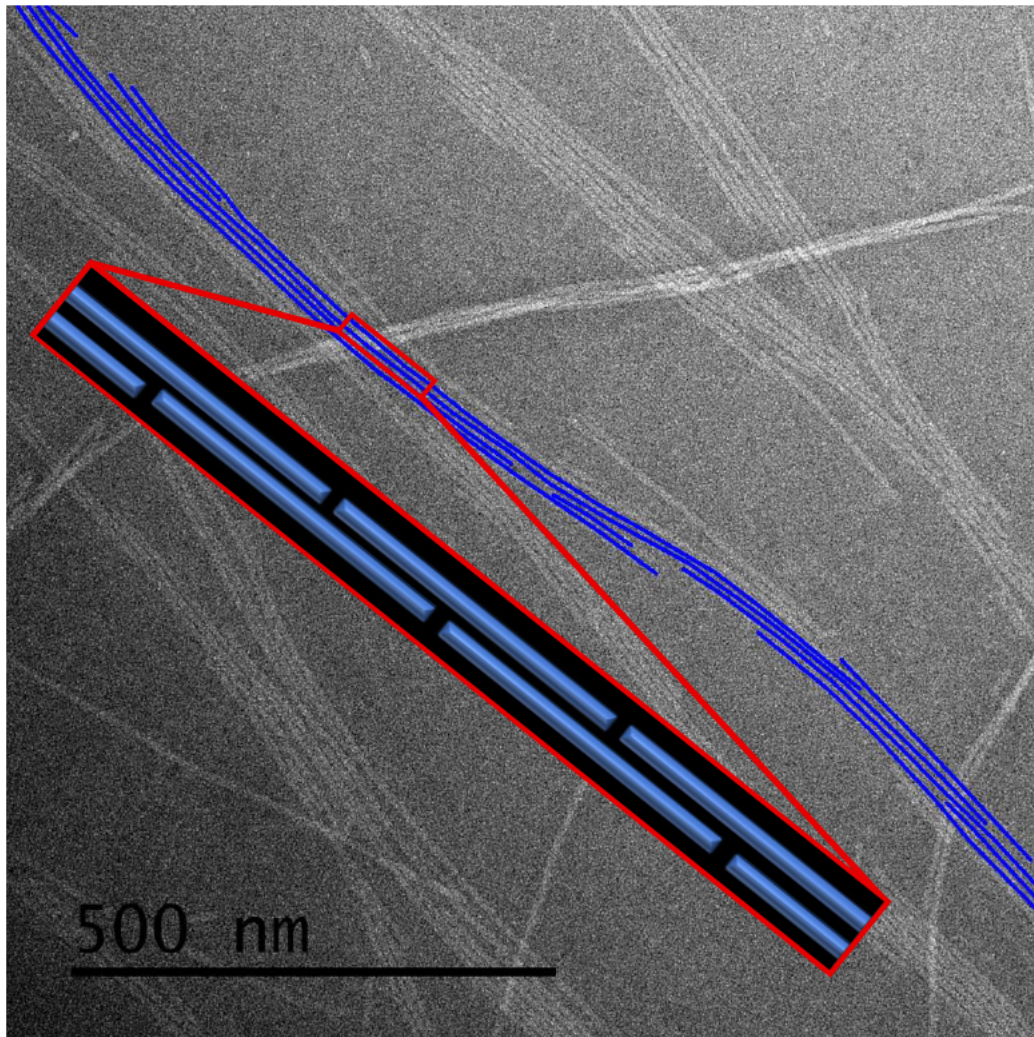


Abbildung 3.26: TEM-Aufnahme der Copolymer-Lösung $\text{TEG}^{10\%}\text{sCy}^3$ einer Konzentration von 25 µM in TBS (10 mM Tris und 150 mM NaCl). Negativ kontrastiert mit Uranylacetat. In Blau sind Nanostäbchen hervorgehoben, die sich durch laterale Aggregation zu Bündeln zusammenlagern. Zusätzlich ist eine schematische Darstellung dieser Zusammenlagerung der Aufnahme überlagert.

Bei einer Untersuchung der Alterung mittels CD-Spektroskopie wurde das CD-Signal der Proben $\text{TEG}^{10\%}\text{Cy3}$ und $\text{Man}^{10\%}\text{Cy3}$ in TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl) einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ direkt nach dem Ansetzen bis zu 14 Tagen nach dem Ansetzen der Probe beobachtet. Eine Änderung des CD-Signals kann für die Probe $\text{Man}^{10\%}\text{Cy3}$ innerhalb des observierten Zeitraums nicht festgestellt werden (Abbildung 3.27 B). Für die Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{Cy3}$ wird jedoch eine Verstärkung der CD-Banden innerhalb der ersten drei Tage beobachtet. Nach dem dritten Tag bis zum vierzehnten Tag ändert sich das Signal nicht mehr. Aus der Untersuchung der Stäbchenlänge mittels mikroskopischer Methoden geht jedoch hervor, dass sich die Länge der Stäbchen besonders bei längeren Zeiträumen, die über drei Tage hinausgehen, erhöht. Die beiden Messmethoden lassen sich nicht direkt miteinander vergleichen. Die Änderung der Intensität des CD-Signals einer Verbindung ist unter anderem zum Aggregationsgrad oder der Aggregat-Massenkonzentration $M(t)$ proportional.^[235,236] Das bedeutet, dass in den ersten drei Tagen noch einige Monomere in die Polymere eingebaut werden oder noch die Konformation der dominierenden thermodynamischen oder metastabilen Aggregate annehmen. Bei dieser Zunahme der Ordnung steigt das CD-Signal ebenfalls. Die Länge der gefundenen Aggregate ist aber nicht direkt proportional zu der Konzentration der aggregierten Masse $M(t)$, sondern zur Aggregat-Anzahlkonzentration $P(t)$.^[237,238] Mikroskopische Methoden sind also nur in der Lage, zu unterscheiden, ob viele kürzere Polymere oder dafür weniger längere Polymere vorliegen (siehe Aggregatkettenlänge $\mu(t)$ in Kapitel 1.3). Bei der Alterung der Probe über einen langen Zeitraum können deutlich längere Stäbchen gefunden werden, während das CD-Signal der Probe gleichbleibt. Das lässt vermuten, dass nach vollständiger Polymerisation der Peptidamphiphile die Aggregat-Anzahlkonzentration $P(t)$ im Zuge der Alterung sinkt. Diese Bildung von Aggregaten höherer Ordnung konnte in der Literatur in späten Phasen des Wachstums supramolekularer Aggregate beobachtet werden.^[239–241]

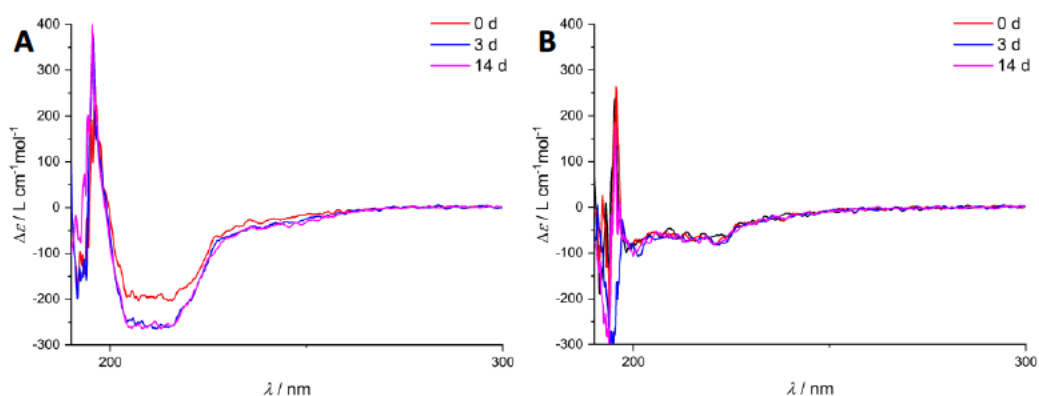


Abbildung 3.27: CD-Spektren direkt nach dem Ansetzen der Probe (0 h), nach drei Tagen (3 d) und nach 14 Tagen (14 d) bei Raumtemperatur. A: $25 \mu\text{M}$ Copolymer-Lösung $\text{TEG}^{10\%}\text{Cy3}$ in TBS (10 mM Tris und 150 mM NaCl). B: $25 \mu\text{M}$ Copolymer-Lösung $\text{Man}^{10\%}\text{Cy3}$ in TBS (10 mM Tris und 150 mM NaCl).

In Abbildung 3.28 sind weitfeldmikroskopische Aufnahmen der Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{sCy}^3$ unterschiedlichen Alters dargestellt. Sie visualisiert eindrücklich den Alterungseffekt der Probe. Abbildung 3.28 A stellt dabei eine frische, drei Tage bei Raumtemperatur equilibrierte Probe dar. Es konnten ausschließliche kurze Stäbchen einer Länge unter zehn Mikrometer aufgenommen werden. Die Verteilung der Länge ist sehr schmal. Dem gegenüber wurden nach mehreren Monaten der Equilibrierung der Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{sCy}^3$ Aufnahmen erhalten, die neben den kurzen Stäbchen auch deutlich längere Strukturen über 25 μm Länge zeigen (Abbildung 3.28 B). Vereinzelt konnten auch toroide Strukturen gefunden werden. Eine reproduzierbare Methode zur Fixierung toroider Strukturen konnte allerdings nicht entwickelt werden.

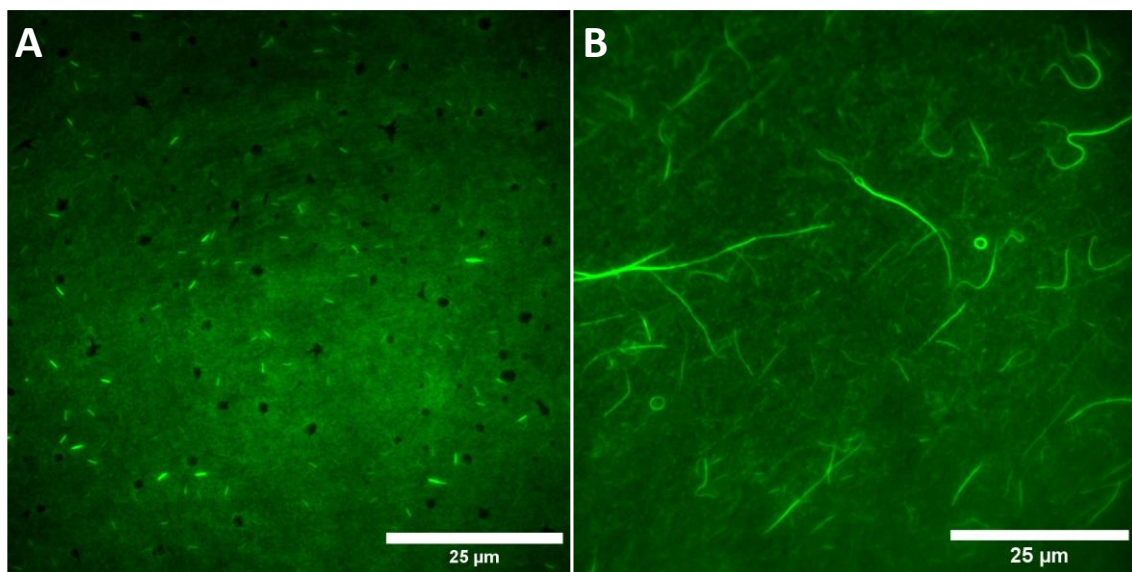


Abbildung 3.28: Weitfeldmikroskopische Aufnahmen (Elyra 7 von Zeiss) einer drei Tagen alten Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{sCy}^3$ (A) und einer gealterten Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{sCy}^3$, die mehrere Monate bei Raumtemperatur gelagert wurde (B).

Um zu beweisen, dass die supramolekularen Aggregate als Copolymere vorliegen und nicht nur geordnete Homopolymere der funktionalisierten und unfunktionalisierten Peptidamphiphile bilden, wurden Colokalisationsversuche durchgeführt. Hierfür wurde eine Drei-Komponenten-Copolymerprobe $\text{TEG}^{5\%}\text{sCy}^3+5\%}\text{sCy}^5$ verwendet. In dieser wird angenommen, dass das unfunktionalisierte Peptidamphiphil **X-11** mit den beiden funktionalisierten Peptidamphiphilen **X-26** und **X-27** in denselben Stäbchen copolymerisiert. Für die Colokalisationsversuche eignet sich insbesondere die Konfokalmikroskopie, da durch das Detektionssystem AOBS® (engl. *acousto-optical beam splitter*) von Leica der aufgenommene Detektionsbereich durch einen akustooptischen Strahlteiler variabel verändert werden kann.^[242] So können die Akquisitionparameter für eine Zweikanal-Aufnahme so gewählt werden, dass keine *Cross-talk* oder *Bleed-through* zwischen den Detektionskanälen auftritt.

In Abbildung 3.29 sind die Kontrollexperimente für die Akquisitionsparameter dargestellt. Dabei entstammen die oberen Aufnahmen einer Kontrollprobe $\text{TEG}^{5\%}\text{sCy}^3$, die nur den grünen Farbstoff Sulfo-Cyanin 3 enthält. Der grüne Farbstoff wurde mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda = 552 \text{ nm}$ angeregt und die Emission im grünen Kanal (Abbildung 3.29 A) in einem Bereich von 561 bis 629 nm und im roten Kanal (Abbildung 3.29 B) in einem Bereich von 647 bis 734 nm detektiert. Hierbei konnte nur im grünen Kanal ein signifikantes Signal detektiert werden. Die Emission des Sulfo-Cyanin 3-Farbstoffs im gewählten roten Kanal ist zu vernachlässigen. Bei den unteren Aufnahmen handelt es sich um die Kontrollprobe $\text{TEG}^{5\%}\text{sCy}^5$, die nur den roten Farbstoff Sulfo-Cyanin 5 enthält. Dieser wurde mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda = 638 \text{ nm}$ angeregt und in den Kanälen derselben Wellenlängenbereiche detektiert wie in der vorherigen Kontrollprobe. Hier konnte kein Signal im grünen Kanal detektiert werden und die Stäbchen werden ausschließlich im roten Kanal detektiert.

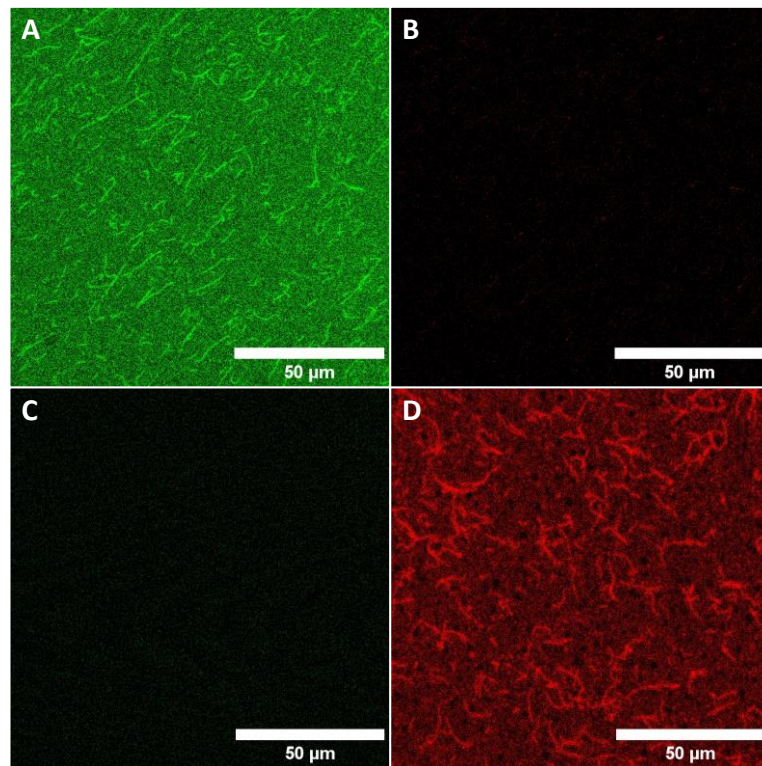


Abbildung 3.29: Kontrollaufnahmen der eingestellten Akquisitionsparameter der konfokalen Mikroskopie.

Mit diesen Parametern wurde die Drei-Komponenten-Copolymerprobe $\text{TEG}^{5\%}\text{sCy}^3+5\%}\text{sCy}^5$ untersucht. Abbildung 3.30 zeigt die Aufnahmen des grünen (A) und roten (B) Kanals. Diese wurden sequenziell aufgenommen und für den grünen Kanal nur mit 552 nm und für den roten Kanal mit 638 nm Wellenlänge angeregt. Die visuelle Inspektion der Aufnahmen zeigt bereits, dass die abgebildeten Nanostäbchen in beiden Kanälen dargestellt sind. In der mathematischen Auswertung der Koloaliation durch den Pearson-Korrelations-Koeffizienten PCC wurde ein mittlere Korrelationskoeffizient der

Stäbchen in den vergrößerten Bildausschnitten (C und D) von $PCC = 0,83$ erhalten. Der hohe Korrelationskoeffizient zeigt eine hohe Colokalisation der beiden Bestandteile im selben Stäbchen. Die Abweichung von der perfekter Colokalisation ($PCC \sim 1,00$) resultiert aus der nicht vollständig homogenen Verteilung der verschiedenen farbstofffunktionalisierten Monomere. Durch den statistischen Einbau in das Polymer treten auch sulfo-Cyanin 3-reichere und sulfo-Cyanin 5-ärmere Bereiche auf und umgekehrt.

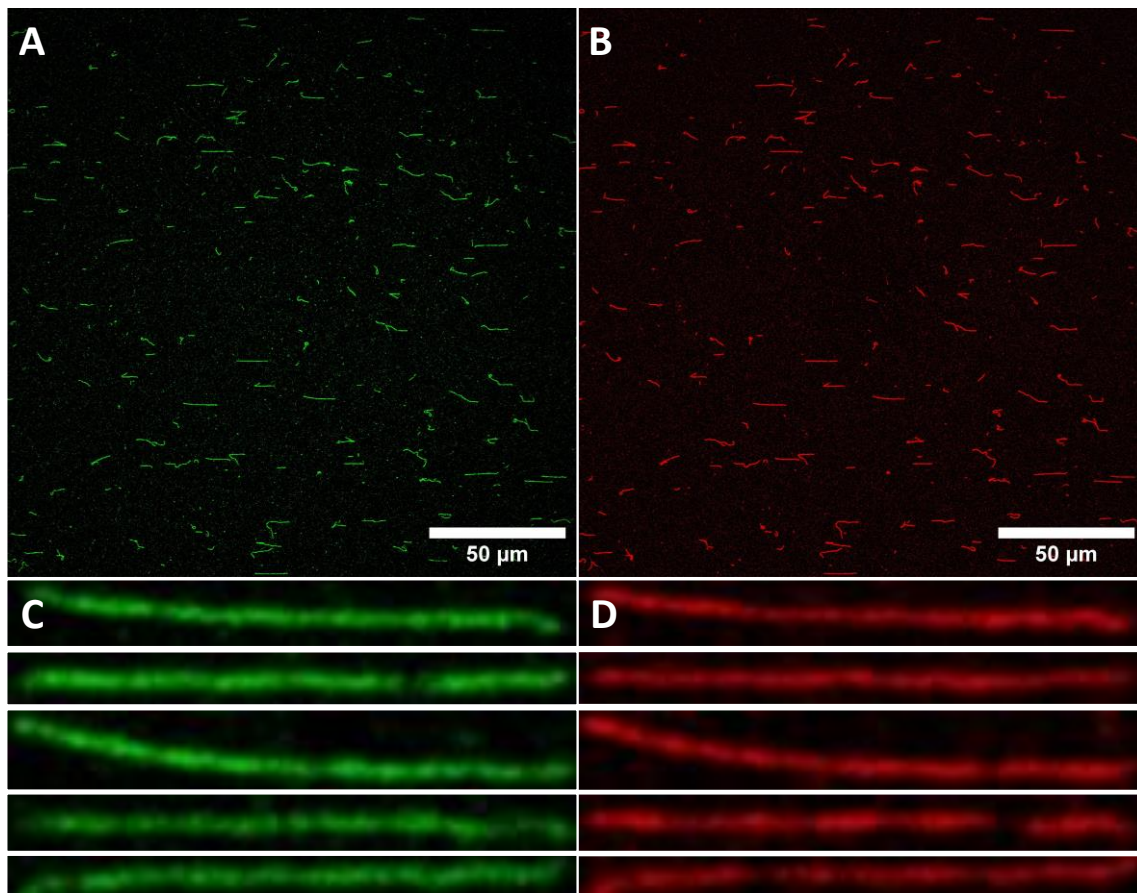


Abbildung 3.30: Sequenzielle konfokalmikroskopische Aufnahme der Drei-Komponenten-Copolymer Probe $TEG^{5\%Cy3+5\%Cy5}$ in PBS. A: Aufnahme des grünen Kanals bei einer Anregungswellenlänge 552 nm und einem Detektionsbereich von 561 bis 629 nm. B: Aufnahme des roten Kanals bei einer Anregungswellenlänge von 638 nm und einem Detektionsbereich von 647 bis 734 nm. Unten sind die vergrößerten Bildausschnitte von fünf zufällig gewählten Nanostäbchen im grünen (C) und roten Kanal (D) abgebildet.

Während die Peptidamphiphile mit einem Tetraethylenglykoldendron und deren Copolymere mikrometerlange Stäbchen oder Bündel bilden, die gut mit der Auflösung herkömmlicher fluoreszenzmikroskopischer Methoden aufgelöst werden können, gestaltet sich dies für die Peptidamphiphile mit mannosidbasierten Dendronen schwieriger. Aufnahmen der Probe $Man^{10\%Cy3}$ zeigen bei gleicher Probenvorbereitung wie zuvor einen nahezu gleichmäßig bedeckten Deckgläschenboden. Ob es sich dabei um fixierte Mono- und Oligomere handelt, oder Polymere, die zu kurz sind, um durch

Fluoreszenzmikroskopie aufgelöst zu werden, ist unklar. Nur vereinzelt können elliptische Signale aufgezeichnet werden.

Ein solches Beispiel ist in Abbildung 3.31 A dargestellt. Diese Aufnahme der Laser-Weitfeldmikroskopie zeigt ein homogenes Hintergrundsignal sowie einige punktförmige Signale höherer Intensität. Der vergrößerte Ausschnitt deutet aber auf ein anisotropes Aggregat hin. Die Halbwertsbreite (FWHM) des Linienprofils durch das Signal ergibt eine Breite von 294 nm. Die Länge des Aggregats wird auf diese Weise mit 450 nm gemessen. Das Seitenverhältnis (AR) erscheint in dieser Aufnahme mit $AR = 1,5$ nicht besonders hoch. Wird dieselbe Stelle mit der modulierten, strukturierten Beleuchtung mittels SIM (engl. *structured illumination microscopy*) aufgenommen und prozessiert, kann die Aufnahme in Abbildung 3.31 B erhalten werden. Die Halbwertsbreite des Linienprofils für diese Aufnahme des Aggregats ergibt eine Breite von 110 nm. Die Auflösung kann mit dieser Methode fast verdreifacht werden. Die Länge des Aggregats wird mit 340 nm gemessen und erscheint durch die höhere Auflösung kleiner als in Abbildung 3.31 A. Das Seitenverhältnis beträgt hier $AR = 3,1$ und ist doppelt so groß wie im Fall der Weitfeldmikroskopie. Durch SIM kann der anisotrope Charakter eindimensionaler Nanostäbchen eindeutiger abgebildet werden. Das Experiment zeigt, dass für Polymere auf Basis der Peptidamphiphile mit Mannosid-Dendron lediglich winzige Nanostäbchen aufgelöst werden können, was nur unter Zuhilfenahme hochauflösender Mikroskopiemethoden möglich ist.

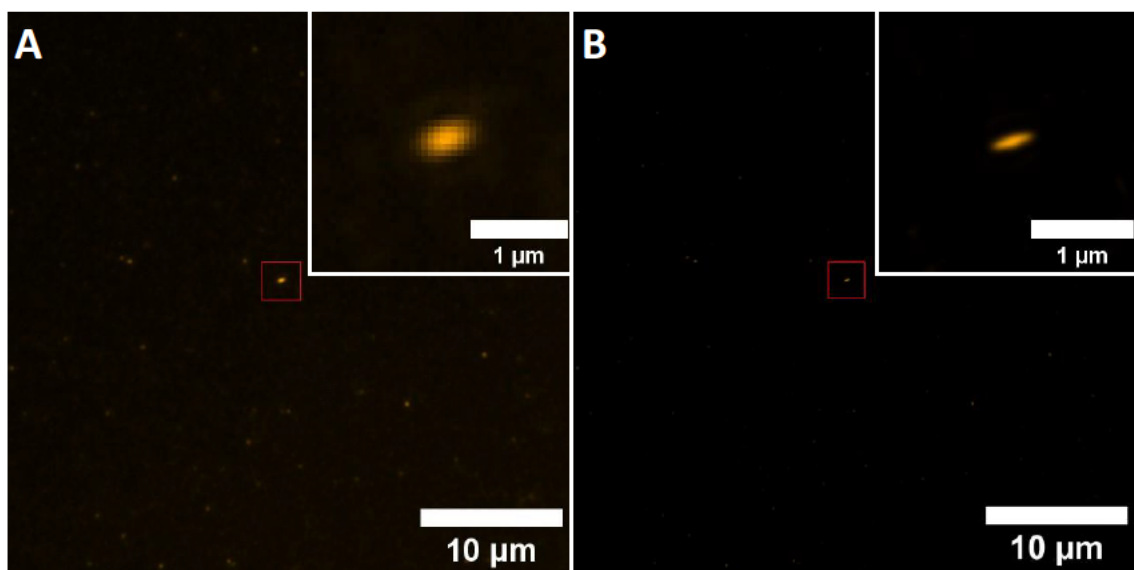


Abbildung 3.31: A: Aufnahme der Probe $\text{Man}^{10\%}\text{Cy}3$ in der Laser-Weitfeldmikroskopie. Die eingeschobene Aufnahme in der rechten oberen Bildecke zeigt die Vergrößerung des rot markierten Bereichs. B: Prozessierte Aufnahme der Probe $\text{Man}^{10\%}\text{Cy}3$ nach der SIM-Mikroskopie. Die eingeschobene Aufnahme in der rechten oberen Bildecke zeigt die Vergrößerung des rot markierten Bereichs.

Zuletzt sollte die Coassemblierung der Peptidamphiphile mit verschiedenartigen Dendronen untersucht werden. Hierzu wurden Copolymere hergestellt, die

Peptidamphiphile mit dem Dendron auf Tetraethylenglykolbasis und Peptidamphiphile mit dem Triethylenglykolmannosiddendron beinhalten. Wie zuvor wurde ein Anteil von 10 % der funktionalisierten Komponenten in den Polymeren angestrebt. In dem Tetraethylenglykol-basierten Anteil wurde das sulfo-Cyanin 3-funktionalisierte Peptidamphiphil **X-26** verwendet und im Mannosid-basierten Anteil das sulfo-Cyanin 5-funktionalisierte Derivat **X-31**. So kann durch sequenzielle Aufnahme in der Laser-Weitfeldmikroskopie zwischen den unterschiedlichen Peptidamphiphilen unterschieden werden. Da das Weitfeldmikroskop mit einem Zweikamerasystem arbeitet und das detektierte Licht durch einen Strahlteilerwürfel aufgeteilt wird, wird die Emission des sulfo-Cyanin 3 in diesem Fall eher in einem orangefarbenen Wellenlängenspektrum detektiert. Es wurden Vier-Komponenten-Copolymere mit einem Anteil von 10 % der Tetraethylenglykolderivate und 90 % der Mannosidderivate (**TEG^{10%}Man^{90%}**), die entgegengesetzte Zusammensetzung (**TEG^{90%}Man^{10%}**) und eine Mischung zu gleichen Anteilen (**TEG^{50%}Man^{50%}**) hergestellt. Die detaillierte Zusammensetzung der Proben ist in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Für die Probe **TEG^{10%}Man^{90%}** (Abbildung 3.32 A und B) konnte in im orangenen Kanal (A) ein Nanostäbchen abgebildet werden. Im roten Kanal (B) wird eine flächige Funktionalisierung der Oberfläche detektiert und zusätzlich sphärische Partikel. Das Nanostäbchen des orangenen Kanals kann aber ebenfalls schwach wahrgenommen werden. Das deutet darauf hin, dass neben den üblich gefundenen Strukturen der Mannosidpeptidamphiphile auch die Copolymerisation in die gebildeten Nanostäbchen der Tetraethylenglykolderivate stattfindet. Dies verdeutlichen die Aufnahmen der Copolymere mit gleichen Anteilen **TEG^{50%}Man^{50%}** in Abbildung 3.32 C und D. Es wird eine Colokalisation der farbstofffunktionalisierten Peptidamphiphile in dasselbe Nanostäbchen beobachtet. Dieses Phänomen wurde auch für die Copolymerprobe **TEG^{90%}Man^{10%}** in Abbildung 3.32 E und F gefunden. Die Aufnahme liefert darüber hinaus keinen Hinweis mehr auf die Struktur der Homopolymere der Mannosidderivate. Es werden ausschließlich Nanostäbchen der Copolymere gefunden. Durch die Colokalisationsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Peptidamphiphile mit unterschiedlichen Dendronen in ein Vier-Komponenten-Copolymer über einen weiten Bereich der Zusammensetzung coassemblieren. Dies geschieht trotz struktureller Unterschiede, die sich unter anderem im sterischen Anspruch bemerkbar machen und andere Morphologien der Polymere zur Folge haben. Durch die Coassemblierung kann die Morphologie langer Stäbchen auch für die Peptidamphiphile erreicht werden, die als Homopolymer nur in sehr kurze oder sphärische Aggregate polymerisieren.

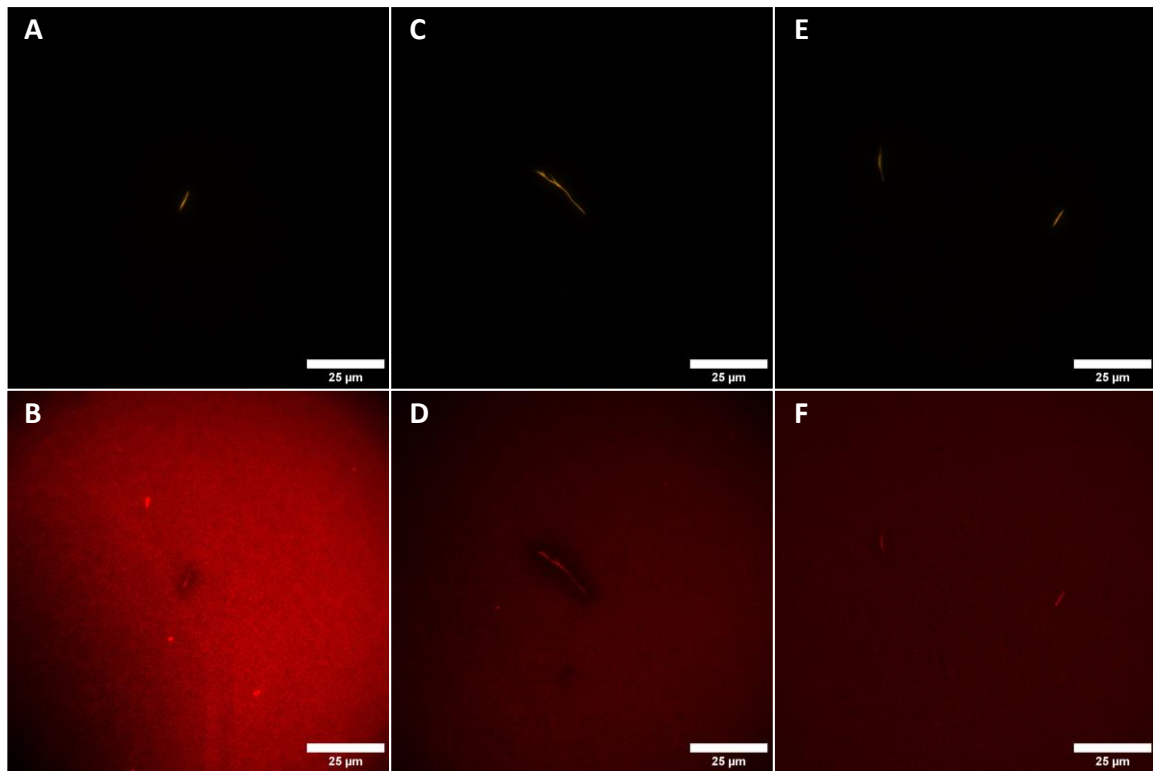


Abbildung 3.32: Laser-weitfeldmikroskopische Aufnahmen der Copolymersysteme mit unterschiedlichen Dendronen **TEG^{10%}Man^{90%}** (A und B), **TEG^{50%}Man^{50%}** (C und D) und **TEG^{90%}Man^{10%}** (E und F). Sequenzielle Aufnahmen des orangenen Kanals sind in A, C und E dargestellt, während die Aufnahmen des roten Kanals in B, D und F abgebildet sind.

Zur weiteren Untersuchung der Morphologie der Polymerstäbchen der Peptidamphiphile in wässriger Lösung wurde ebenfalls supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie durch Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (SMLM, engl. *single molecule localisation microscopy*) durchgeführt. Hierzu wurde die Technik dSTORM (engl. *direct stochastic image reconstruction microscopy*) angewendet. Sie erlaubt die Rekonstruktion supraaufgelöster fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen über die Auflösungsgrenze hinaus.^[243] Am geeignetsten für diese Technik hat sich der Farbstoff AF647 herausgestellt, da dieser unter den verwendeten Bedingungen und unter den verwendeten Farbstoffen die beste Photostabilität aufweist und die meisten Lokalisierungen ermöglicht. Deshalb wurde für die Untersuchung das Copolymer der Probe **TEG^{10%}AF647** in STORM-Puffer verwendet. Ein Vergleich der herkömmlichen Weitfeld-mikroskopischen Aufnahmen (in Graustufe) und der rekonstruierten Aufnahme der Lokalisierungen durch dSTORM (rot) ist in Abbildung 3.33 dargestellt. An der Schnittkante der überlagerten Bilder kann der Auflösungsgewinn direkt erkannt werden.

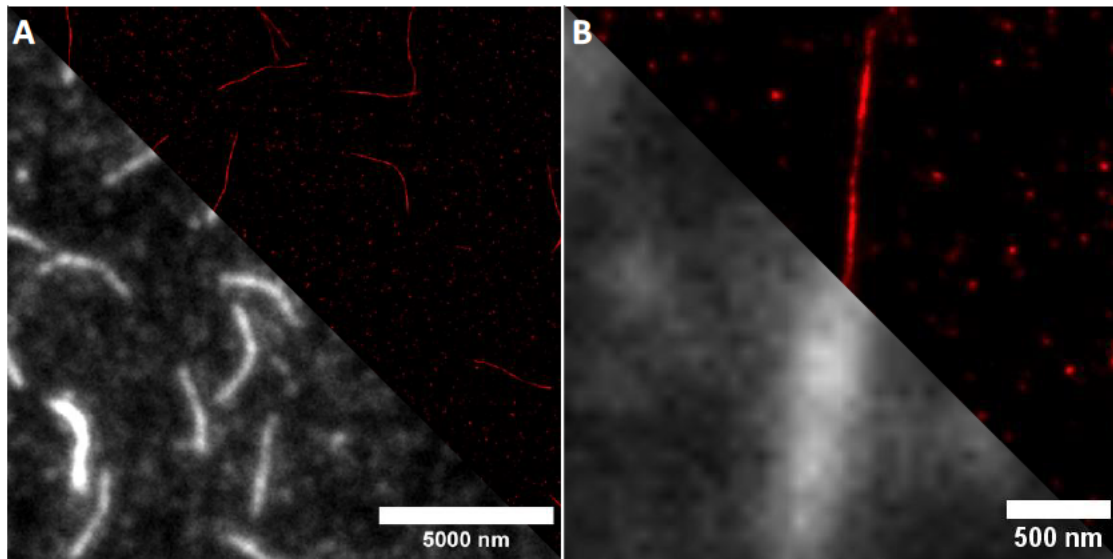


Abbildung 3.33: Vergleich der Weitfeld-mikroskopischen Aufnahmen der Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{AF647}$ in Graustufe mit den rekonstruierten Aufnahmen durch dSTORM in Rot.

Die erzielte Auflösung der Aufnahme der supraaufgelösten Polymerstäbchen kann durch das Messen der Linienprofile orthogonal durch eines der Stäbchen ermittelt werden. Die Linienprofile sind in der Aufnahme in Abbildung 3.34 A in Rot und im Graphen in B dargestellt. Durch die Anpassung der Linienprofile mit einer Gauß-Verteilung kann die Halbwertsbreite FWHM der Intensitätsverteilung ermittelt werden. Der Mittelwert von zehn zufällig durch das Stäbchen gelegter Linienprofile ergibt eine Halbwertsbreite von $\text{FWHM} = (27,1 \pm 0,8) \text{ nm}$. Das entspricht einer Verbesserung der Auflösung gegenüber dem beugungsbegrenzten Auflösungslimit um etwa das Zehnfache und im Vergleich zu den bereits hochaufgelösten Aufnahmen mittels SIM in Abbildung 3.31 um circa das Vierfache.

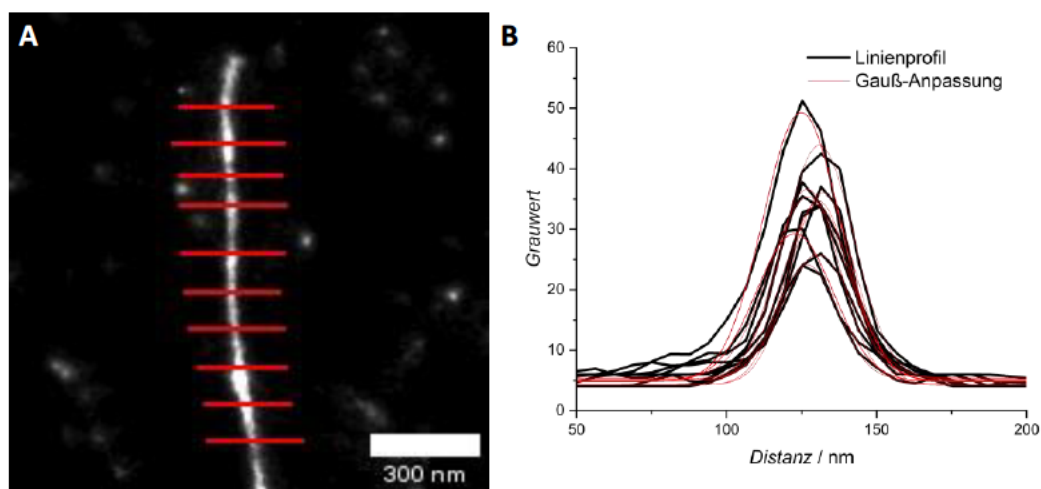


Abbildung 3.34: A: Rekonstruierte Aufnahme eines Stäbchens der Probe $\text{TEG}^{10\%}\text{AF647}$ durch dSTORM. Die vermessenen Linienprofile durch das Stäbchen sind in Rot dargestellt. B: Graph der gemessenen Linienprofile durch das Stäbchen und die Gauß-Anpassung der Intensitätsverteilung zur Ermittlung der Halbwertsbreite FWHM.

Durch die erhöhte Auflösung, die in dieser Methode erzielt werden kann, konnten Merkmale der Strukturen aufgenommen werden, die bei herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie verborgen bleiben. So sind in Abbildung 3.35 A und B Stäbchenbündel zu sehen, die an ihren Enden in einzelne Stäbchen oder dünnere Stäbchenbündel zerfasern. Das Zerfasern der Bündel kann hierbei von dem Überkreuzen zweier eigenständiger Bündel wie in der Aufnahme in Abbildung 3.35 C unterschieden werden. Während das Zerfasern in A und B ohne die erhöhte Auflösung nicht hätte gefunden werden können, hätte das Überkreuzen in der Aufnahme C bei beugungslimitierter Auflösung für separate Enden eines Bündels fehlinterpretiert werden können.

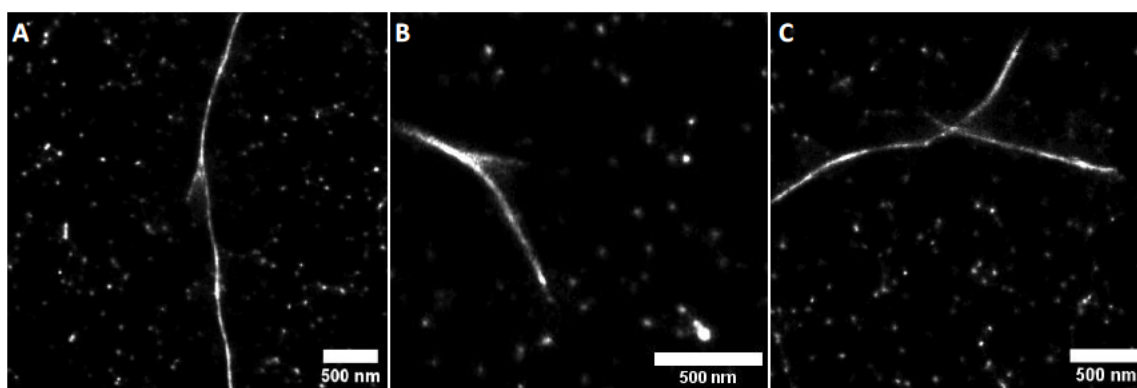


Abbildung 3.35: Rekonstruierte Aufnahmen der Probe TEG^{10%}AF⁶⁴⁷ durch dSTORM. A und B zeigen das Zerfasern der Bündel in Stäbchen oder kleinere Bündel. C zeigt hingegen das Überkreuzen zweier Stäbchenbündel.

Eine genauere Untersuchung eines zerfaserten Endes eines Polymerbündels in Abbildung 3.36 A mithilfe des Linienprofils führte zu dem in Abbildung 3.36 B dargestellten Graph. Bei erneuter Gauß-Anpassung der Intensitätsverteilung konnten drei Maxima gefunden werden. Die Gauß-Anpassung verdeutlicht, dass die Maxima der Verteilung in die Minima der benachbarten Verteilung fallen. So können nach dem Rayleigh-Kriterium drei separate Architekturen aufgelöst werden.^[125] Der Durchmesser der Stäbchen wird anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen auf etwa 8 nm eingeschätzt. Für die vollständige morphologische Auswertung dieser Bündelenden müsste deshalb die Auflösung in den Aufnahmen noch weiter gesteigert werden.

Durch dSTORM wurden Aufnahmen der Polymerstäbchen rekonstruiert, die die Auflösung gegenüber den beugungsbegrenzten Aufnahmen um das Zehnfache verbessern. Der erzielte Auflösungsgewinn ermöglichte die Rekonstruktion von Aufnahmen der Polymerstäbchenenden, die das Zerfasern dieser Enden zeigen. In umgekehrter Logik verdeutlicht dies, dass sich mehrere Nanostäbchen oder bereits kleinere Bündel zu Bündeln der Nanostäbchen zusammenlagern, die als mikrometerlange Stäbchen abgebildet werden können. Die Erkenntnisse der supraaufgelösten Mikroskopie unterstützen somit die Annahme der Bündelformation aus konfokal- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

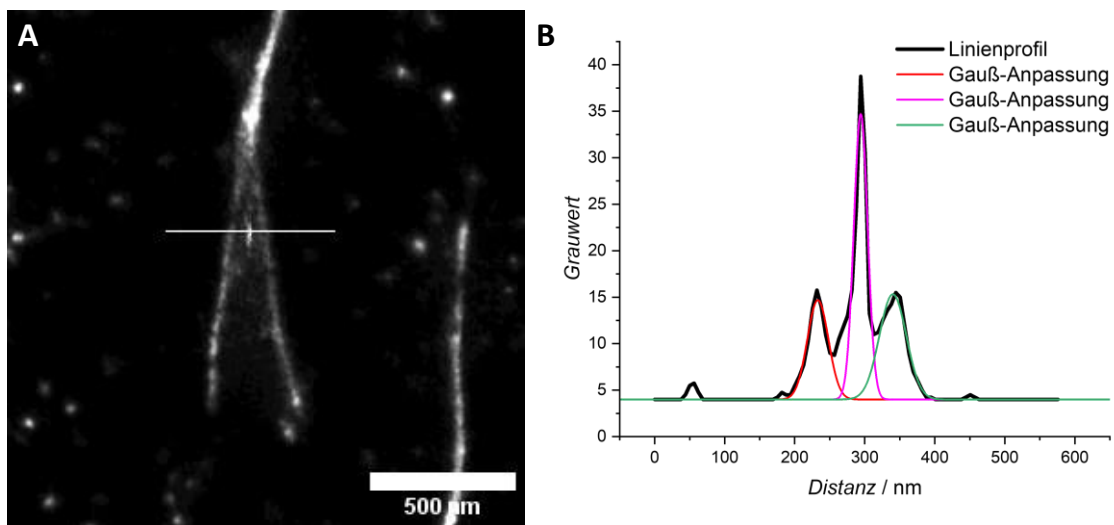


Abbildung 3.36: A: Rekonstruierte Aufnahme der Probe TEG^{10%}AF₆₄₇ durch dSTORM in der das Ende eines Stäbchenbündels, das in mehrere Stäbchen oder kleinere Bündel zerfasert, zu erkennen ist. B: Graph des Linienprofils durch das zerfaserte Ende des Bündels und der Gauß-Anpassungen.

3.7.3 Evaluierung der Dynamik der Polymersysteme

Um die Dynamik der supramolekularen Polymere untersuchen zu können, kann auf die farbstofffunktionalisierten Copolymere zurückgegriffen werden. Hierzu kann der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) in einem FRET-Mischungsexperiment ausgenutzt werden. Dafür wurden zunächst die spektroskopischen Eigenschaften der Polymerlösungen untersucht. Abbildung 3.37 zeigt die UV/Vis-Spektren der tetraethylenglykol- und mannosidbasierten Copolymerproben **TEG**^{10%}AF488, **TEG**^{10%}sCy3, **TEG**^{10%}sCy5, **TEG**^{10%}AF647, **Man**^{10%}sCy3 und **Man**^{10%}sCy5 in Wasser. Durch diese wurden die Absorptionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe in den Copolymeren bestimmt. Die Absorptionsmaxima stimmen gut mit den angegebenen nichtkonjugierten Farbstoffen überein.^[244–247]

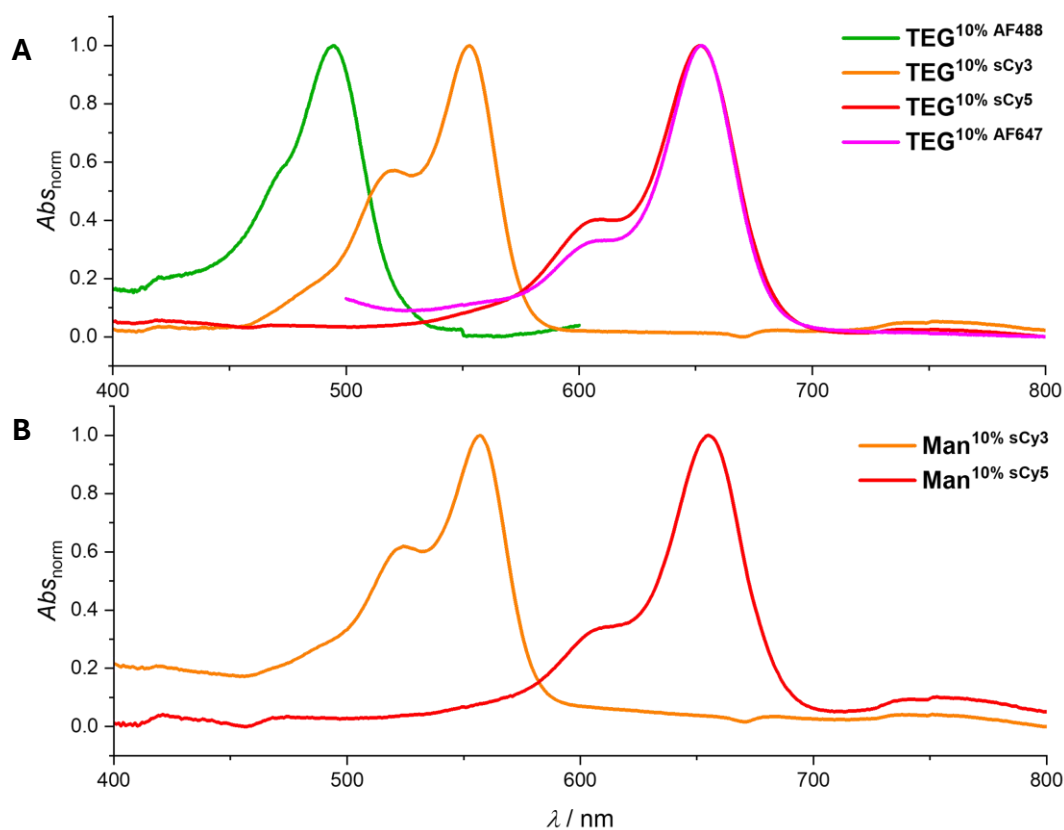


Abbildung 3.37: A: UV-Vis-Spektren der Probelösungen der Peptidamphiphile auf Basis der Tetraethylenglykoldendrone **TEG**^{10%}AF488, **TEG**^{10%}sCy3, **TEG**^{10%}sCy5, **TEG**^{10%}AF647. B: UV-Vis-Spektren der Probelösungen der Peptidamphiphile auf Basis der Triethylenglykolmannosiddendrone **Man**^{10%}sCy3 und **Man**^{10%}sCy5.

Vergleicht man jedoch die Absorptionsmaxima der Proben **TEG**^{10%}sCy3 und **TEG**^{10%}sCy5 mit den Mannosidderivaten dieser Copolymere **Man**^{10%}sCy3 und **Man**^{10%}sCy5, kann eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima der Mannosidderivate beobachtet

werden. Für das Copolymer **TEG**^{10%*s*Cy³} wurde ein Absorptionsmaximum von $\lambda = 553$ nm und für **TEG**^{10%*s*Cy⁵} von $\lambda = 652$ nm ermittelt. Für die Mannosidderivate hingegen wurde $\lambda = 557$ nm im Fall von **Man**^{10%*s*Cy³} und $\lambda = 656$ nm für **Man**^{10%*s*Cy⁵} gefunden. In beiden Fällen sind die Absorptionsmaxima 4 nm rotverschoben. Da bei Cyaninfarbstoffen ein positiver solvatochromer Effekt auftritt, könnte diese leichte bathochrome Verschiebung durch eine polare Umgebung im Fall der Mannosid-Copolymere erklärt werden.^[248] Dies würde mit der höheren Hydrophilie und besseren Löslichkeit der Aggregate übereinstimmen.

Analog wurden Fluoreszenzemissionsspektren der Probelösungen angefertigt. Als Anregungswellenlänge wurde das zuvor ermittelte Absorptionsmaximum verwendet. Die Spektren sind in Abbildung 3.38 dargestellt. Die verwendeten Anregungswellenlängen sind durch die Vertikalen gekennzeichnet. Die Stokes-Verschiebung zwischen Absorption und Emission beträgt für die Cyanin-Farbstoffe Sulfo-Cyanin 3, Sulfo-Cyanin 5 und AF647 19 nm, während die Stokes-Verschiebung für den Rhodaminfarbstoff AF488 26 nm beträgt.

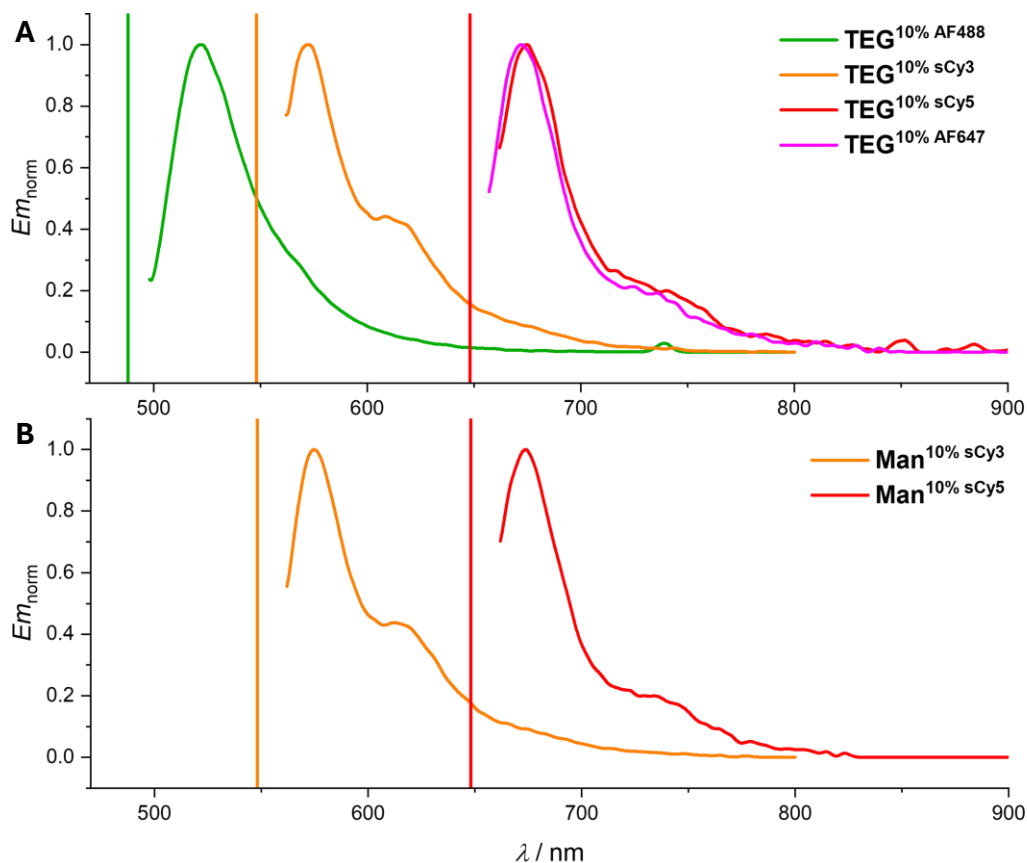


Abbildung 3.38: A: Fluoreszenzemissionsspektren der Probelösungen der Peptidamphiphile auf Basis der Tetraethylglykoldendrone **TEG**^{10%AF488}, **TEG**^{10%*s*Cy³}, **TEG**^{10%*s*Cy⁵}, **TEG**^{10%AF647}. B: Fluoreszenzemissionsspektren der Probelösungen der Peptidamphiphile auf Basis der Triethylglykolmannosiddendrone **Man**^{10%*s*Cy³} und **Man**^{10%*s*Cy⁵}. Die Anregungswellenlängen sind durch die Vertikalen gekennzeichnet.

Für das FRET-Mischungsexperiment wurde das Farbstoffpaar Sulfo-Cyanin 3 und Sulfo-Cyanin 5 gewählt. Bei dieser häufig ausgewählten Kombination stellt das Sulfo-Cyanin 3 den Donor und Sulfo-Cyanin 5 den Akzeptor dar. Der Försterradius R_0 dieses Paares entspricht circa 6,0 nm.^[249] Der spektrale Überlapp für das gewählte Beispiel ist in Abbildung 3.39 gezeigt. Die geteilte Fläche des Fluoreszenzemissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors beschreibt den spektralen Überlapp und ist in der Abbildung blau schraffiert. Der große Überlapp zeigt die hohe Eignung des Farbstoffpaares für den Energietransfer.

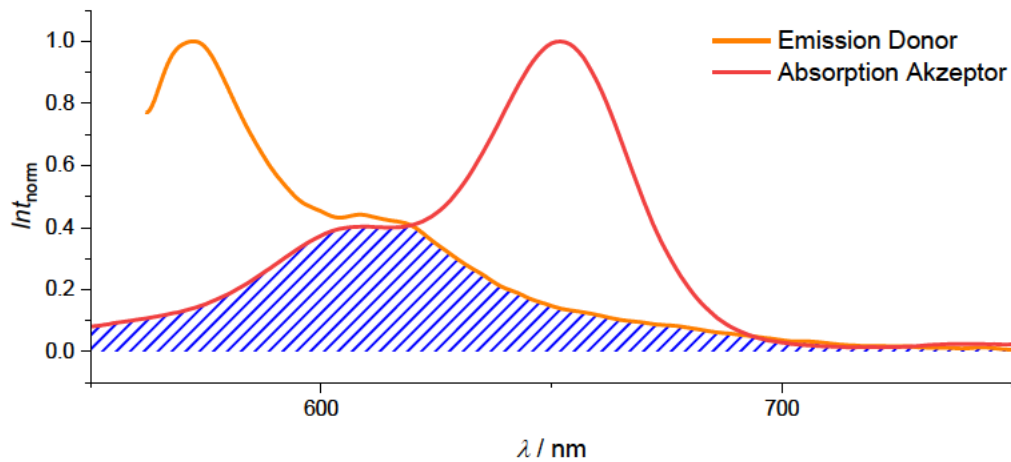


Abbildung 3.39: Fluoreszenzemissionsspektrum der FRET-Donor-Probe $TEG^{10\%Cy3}$ und das Absorptionsspektrum der FRET-Akzeptor-Probe $TEG^{10\%Cy5}$ zur Veranschaulichung des spektralen Überlapps (in Blau schraffiert).

Werden die separat vollständig equilibrierten Probelösungen $TEG^{10\%Cy3}$ und $TEG^{10\%Cy5}$ in gleichen Teilen zusammengegeben, wird die FRET-Probe $FRET^{TEG}$ erhalten. Die Durchführung des FRET-Mischungsexperiments ist schematisch in Abbildung 3.40 gezeigt. Zu Beginn des Experiments liegen die mit dem grünen und roten Farbstoff funktionalisierten Copolymerstäbchen separat in Lösung vor. Der Abstand zwischen den Stäbchen in Lösung ist zu hoch für den Energietransfer des angeregten Donors zum Akzeptor. Dies ist durch die hohe Abstandsabhängigkeit des Energietransfers bedingt. Die Rate des Energietransfers sinkt mit der sechsten Potenz des Abstands zwischen Donor und Akzeptor ($k_{ET} \propto \frac{1}{r^6}$).^[67] Liegen zu einem späteren Zeitpunkt jedoch Nanostäbchen vor, die sowohl die donor- als auch akzeptorfunktionalisierten Peptidamphiphile in das Copolymer eingebaut haben, ist der Abstand innerhalb eines Aggregats in der Größenordnung des Försterradius und ein effizienter Energietransfer kann gemessen werden.

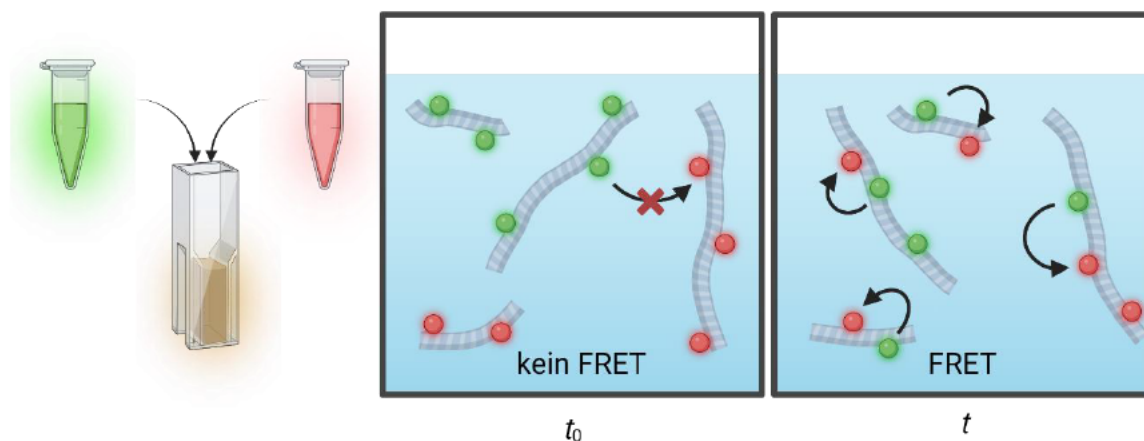


Abbildung 3.40: Schematische Darstellung des FRET-Mischungsexperiments zur spektroskopischen Untersuchung in einer Küvette. Zum Zeitpunkt t_0 liegen Copolymere mit nur je einer Farbstoffmarkierung vor. Zu einem späteren Zeitpunkt t tritt in den gemischtmarkierten Copolymeren FRET auf. Erstellt mit BioRender.com.

Diese Änderung der Zusammensetzung ist durch den dynamischen Charakter supramolekularer Polymere möglich. Über eine Vielzahl an Mechanismen können die nichtkovalent verknüpften Monomere eines supramolekularen Polymers ein- und ausgebaut werden oder direkt zwischen den Aggregaten austauschen. Dieses Phänomen ist in Abbildung 3.41 schematisch dargestellt.

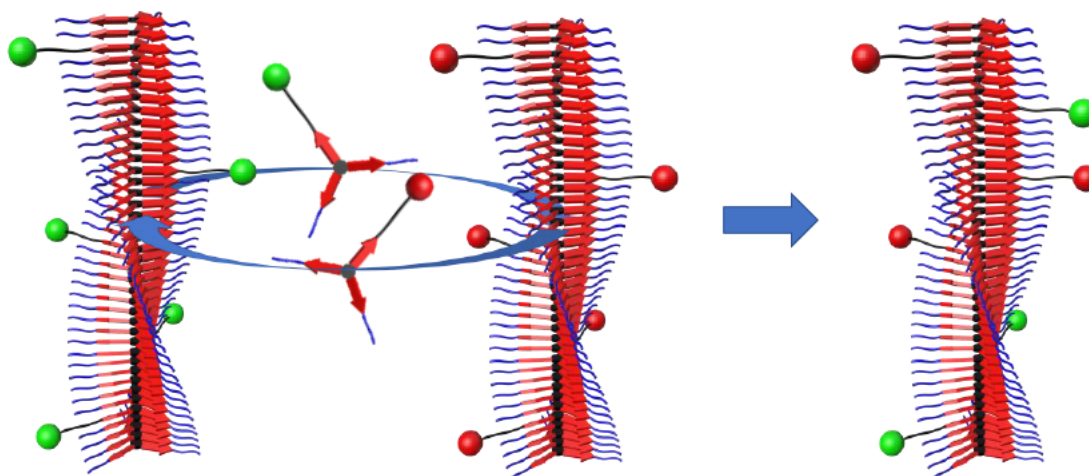


Abbildung 3.41: Schematische Darstellung des Monomeraustauschs der unterschiedlich farbstofffunktionalisierten Copolymere zu statistisch verteilten Copolymeren beider Farbstoffkomponenten.

Die Probe des FRET-Mischungsexperiments wurde unmittelbar nach dem Mischen mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers gemessen. Dazu wurde der Donor bei seinem Absorptionsmaximum angeregt und die Emission bei den Emissionsmaxima des Donors

und des Akzeptors zeitaufgelöst aufgenommen. Dies ist am Beispiel der Probe **FRET^{TEG}** in Abbildung 3.42 A dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass die Intensität des Donors mit der Zeit abnimmt, während die Intensität der Emission des Akzeptors zunimmt. Die Emission des Akzeptors findet durch den Energietransfer des Donors aus dem angeregten Zustand zum Akzeptor statt, da der Akzeptor selbst nicht angeregt wird. Aus diesen Daten kann das FRET-Verhältnis (*FRET-ratio*) nach Gleichung (3.6) berechnet werden. Es wird aus dem Verhältnis der Akzeptorintensität I_A und der Summe der Donor- I_D und Akzeptorintensität I_A ermittelt.

$$FRET - ratio = \frac{I_A}{I_D + I_A} \quad (3.6)$$

Das FRET-Verhältnis stellt eine apparente FRET-Effizienz dar, da die FRET-Effizienz noch mit dem Unterschied der Quantenausbeuten und der Detektionseffizienz des Donors und Akzeptors korrigiert werden müsste.^[72] Das FRET-Verhältnis genügt jedoch der Verfolgung des dynamischen Austauschs der Peptidamphiphile innerhalb der Copolymere.

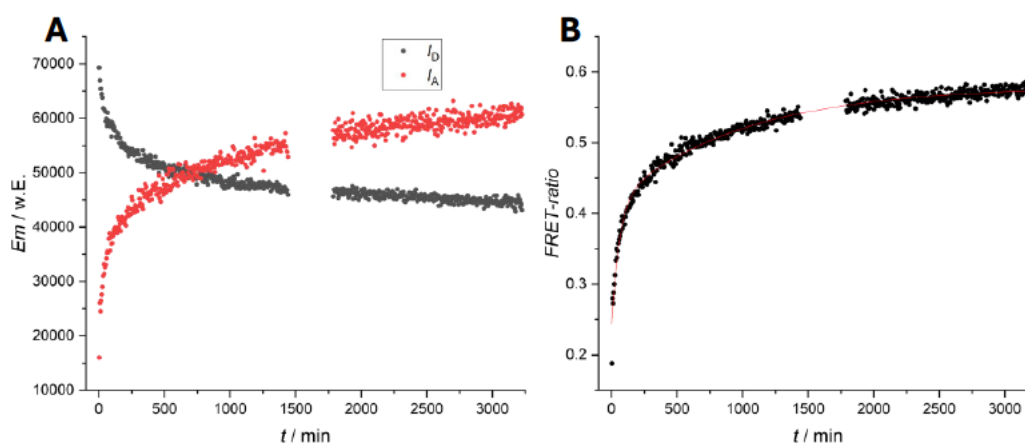


Abbildung 3.42: A: Auftragung der Intensitätsmaxima des Donors (I_D) und des Akzeptors (I_A) der Fluoreszenzemissionsspektren bei der Anregung des Donors bei $\lambda = 548$ nm. B: Auftragung des berechneten FRET-Verhältnisses (*FRET-ratio*) und der biexponentiellen Anpassung (rot).

Das FRET-Verhältnis der Probe **FRET^{TEG}** ist in Abbildung 3.42 B dargestellt. Die erhaltene Kurve wurde zur Bestimmung der Halbwertszeit der Signalsättigung exponentiell angepasst. Eine monoexponentielle Anpassung der Daten reichte nicht aus, um diese ausreichend anzupassen. Ein biexponentieller Fit bildete den Verlauf jedoch sehr gut ab ($R^2 = 0.98$). Die Ursache für das Auftreten eines biexponentiellen Prozesses und die beteiligten Mechanismen der Prozesse auf der kurzen und der langen Zeitskala sind zu diesem Zeitpunkt ungeklärt.^[74]

Auf diese Weise wurde ebenfalls das Mannosidderivat untersucht. Hier bildet das Mischen der Copolymerproben **Man^{100%Cy3}** und **Man^{10%Cy5}** die FRET-Probe **FRET^{Man}**.

Zusätzlich wurde das Ergebnis einer FRET-Probe $\text{FRET}^{\text{EG}_4}$, die aus dem strukturell verwandten Tetraethylglykol-Peptidamphiphil SM^{EG_4} (Abbildung 3.12) hervorgeht, herangezogen. Der Austausch für dieses Peptidamphiphils wurde bereits in den Forschungen im Rahmen meiner Masterarbeit untersucht.^[183] Der Vergleich der FRET-Verhältnisse mit der Zeit ist in Abbildung 3.43 zusammengefasst.

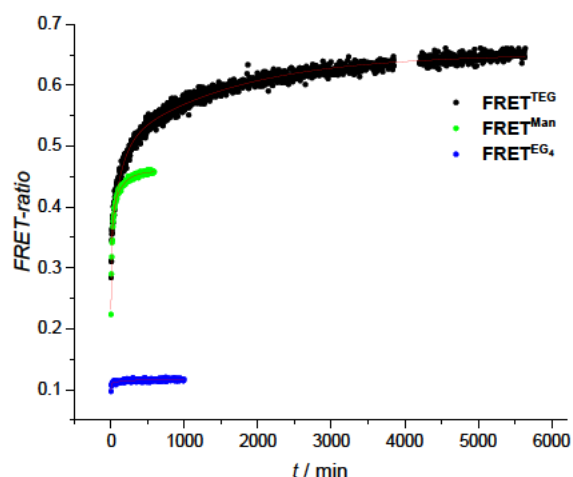


Abbildung 3.43: Vergleich der FRET-Verhältnisse der Probe mit tetraethylglykolbasiertem Dendron FRET^{TEG} , der Probe mit mannosidbasiertem Dendron FRET^{Man} und der Probe mit Tetraethylglykoldendron durch WILLIAMSON-Ethersynthese $\text{FRET}^{\text{EG}_4}$.

Hier wird sofort deutlich, dass die Kinetik des Austauschs der FRET-Probe FRET^{TEG} deutlich langsamer ist als für FRET^{Man} . FRET^{TEG} scheint nach über drei Tagen immer noch nicht vollständig einen Plateauwert erreicht zu haben. FRET^{Man} erreicht hingegen einen Plateauwert nach circa zehn Stunden und die Probe $\text{FRET}^{\text{EG}_4}$ bereits nach circa drei Stunden. Die ermittelten Halbwertszeiten τ sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Auffällig ist hier jedoch, dass $\text{FRET}^{\text{EG}_4}$ lediglich zu einem FRET-Verhältnis von 0,12 konvergiert, während die Proben der vorliegenden Arbeit FRET^{TEG} und FRET^{Man} zu 0,46 bzw. sogar 0,58 konvergieren. Der Vergleich mit einem analogen System von MEIJER *et al.* zeigt, dass hier für das gut untersuchte BTA-Derivat $\text{BTA-C}_{12}\text{-EG}_4$ in einem FRET-Mischungsexperiment Halbwertszeiten von $\tau_1 = (5,6 \pm 0,3)$ min und $\tau_2 = (122 \pm 6)$ min erhalten wurden. Diese liegen innerhalb des Fehlerbereichs der Ergebnisse für die Probe $\text{FRET}^{\text{EG}_4}$ und scheinen damit die gleiche Austauschkinetik aufzuweisen.^[250] Die FRET-Verhältnisse in dieser Studie konvergieren mit Werten von $y_0 = 0,672 \pm 0,001$ bis $y_0 = 0,278 \pm 0,003$ zwischen hohen und niedrigen erreichbaren FRET-Verhältnissen.^[250]

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der ermittelten Halbwertszeiten τ durch die FRET-Mischungsexperimente.

	FRET^{TEG}	FRET^{Man}	$\text{FRET}^{\text{EG}_4}$
τ_1	(92 ± 3) min	$(10,0 \pm 0,5)$ min	(4 ± 1) min
τ_2	(1090 ± 20) min	(92 ± 6) min	(120 ± 30) min
y_0	$0,6511 \pm 0,0008$	$0,4585 \pm 0,0008$	$0,1165 \pm 0,0002$

Wie zuvor in Kapitel 3.7.2 dargelegt, wird vermutet, dass sich die Nanostäbchen zu Bündeln zusammenlagern, die eine Länge im hohen Mikrometerbereich erreichen können. Dabei besteht die Möglichkeit in einem FRET-Mischungsexperiment, dass ein Energietransfer vom Donor- zum Akzeptorfarbstoff ebenfalls auftreten kann, wenn sich donor- und akzeptorfunktionalisierte Nanostäbchen in einem Bündel zusammenlagern. Hierbei wäre ein Austausch der funktionalisierten Monomerbestandteile, der zur Bildung eines Drei-Komponenten-Copolymers führt, nicht zwingend notwendig. Beide Möglichkeiten würde aber zur Erhöhung des ermittelten FRET-Verhältnisses führen. Ebenso können beide Mechanismen parallel stattfinden. Das könnte die Notwendigkeit der biexponentiellen Anpassung der Daten erklären. Da diese Unterscheidung mit der verwendeten Methode allein jedoch nicht möglich ist, müssen weitere Experimente zur Ermittlung der Dynamik herangezogen werden. Ein weiteres Problem, welches bei jeder Methode auftritt, die eine Funktionalisierung mit einer Sonde voraussetzt, ist der Einfluss der Sonde auf das Verhalten der Probe. Zur Synthese der funktionalisierbaren Peptidamphiphile wurde ein Dendron eines Zweigs der C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile durch eine lineare Alkinfunktionalität ersetzt. Dadurch verringert sich die Symmetrie des Moleküls und der sterische Anspruch als auch die Polarität eines Zweigs wird verändert. Dies kann zu einem *Mismatch* (engl. Nichtübereinstimmung) der Strukturmerkmale im kolumnaren Stapel der Copolymere führen. Es folgen weniger stabile Aggregate, mehr Defekte und vermutlich eine schnellere Dynamik. Die Aussagekraft der Messung auf das Homopolymersystem kann dann nicht eingeschätzt werden.

Eine Methode, die diese Probleme umgeht, ist die Messung mittels Wasserstoff/Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS). Hierbei kann das unfunktionalisierte Homopolymer **X-11** direkt verwendet werden. Als detektierbare Sonde in dieser Methode fungiert Deuterium, das mit der Zeit in die Verbindung eingebaut wird, indem es azide Wasserstoffatome austauscht. Dies trifft ausschließlich für die 15 Amid-Protonen der Verbindung **X-11** zu. Der Isotopen-Effekt auf die Wasserstoffbrückenbindung der Amide der Peptidstrukturen im Kern der Peptidamphiphile spielt in β -faltblattgebundenen Strukturen kaum eine Rolle und kann vernachlässigt werden.^[251–253] Dies ist eine wichtige Annahme, da sonst durch den Austausch der Wasserstoffe durch Deuterium die Stabilität der Polymere verändert werden würde. Im Verlauf des Experiments würde sich so die Austauschgeschwindigkeit mit dem Deuterierungsgrad der Polymere verändern. Da sich die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung innerhalb von β -Faltblattstrukturen zwischen Wasserstoff und Deuterium nicht unterscheidet, kann die verwendete Methode als nahezu sondenfremd betrachtet werden, die den ungestörten Zustand der supramolekularen Polymere abbildet.

Abbildung 3.44 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Methode. Für das Experiment wird zunächst eine konzentrierte Lösung der Polymere des Peptidamphiphils **X-11** einer Konzentration von 100 μ M in Wasser vollständig equilibriert. Der Lösung ist

Natriumacetat (NaOAc) in einer Konzentration von 5 mM zugesetzt, um die Detektion zu verbessern und die Addukte mit anderen Ionen als Natrium und deren Kombinationen zurückzudrängen.^[116] Zum Start des Experiments wurde die wässrige Lösung in Deuteriumoxid mit 5 mM NaOAc in einem Verhältnis 99:1 verdünnt, um eine 1 μ M Lösung der Polymere von X-11 in 99% Deuteriumoxid zu erhalten. Durch den Lösungsmittelwechsel werden nun die aziden Wasserstoffatome durch Deuterium ersetzt. Dies ist abhängig von der Zugänglichkeit der funktionellen Gruppe im Aggregat durch das Lösungsmittel, dem pKs-Wert und davon, ob das Wasserstoffatom in einer Wasserstoffbrückenbindung involviert ist.^[254–257]

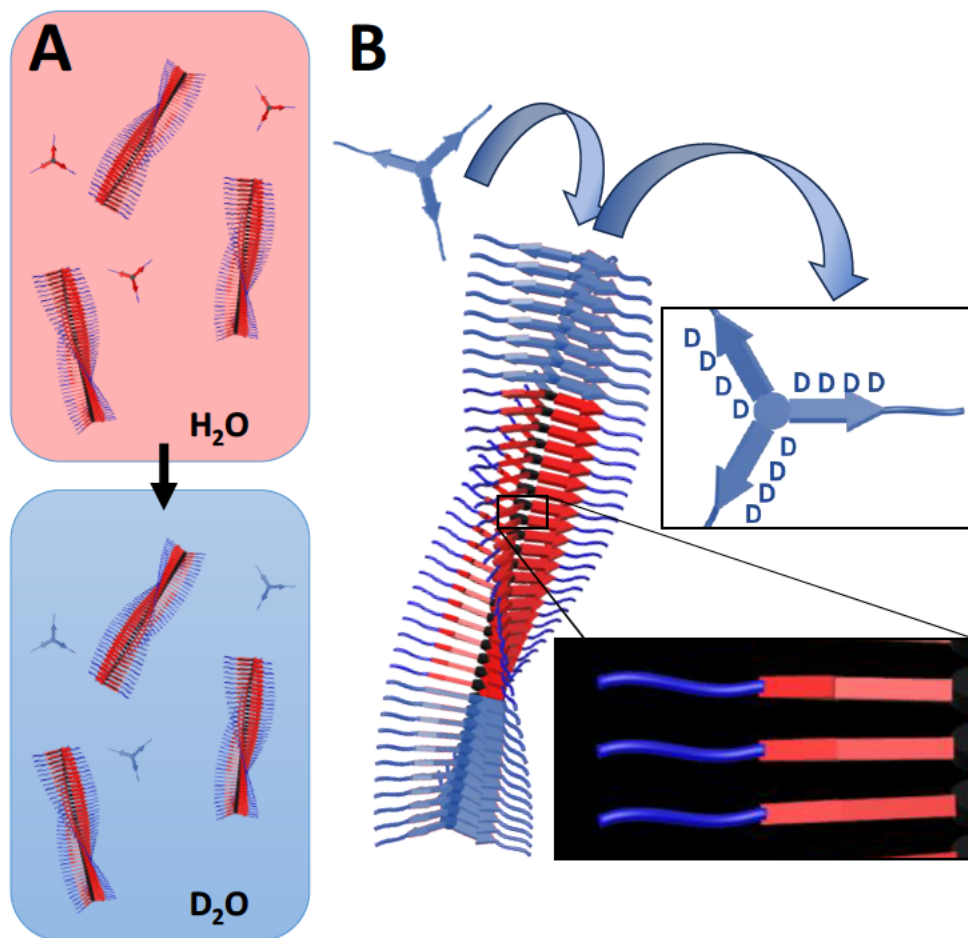


Abbildung 3.44: Schematische Darstellung der Deuterierung der Peptidamphiphile während des HDX-MS-Experiments. A: Verdünnung der equilibrierten Polymerstäbchen in Wasser mit Deuteriumoxid zum Lösungsmittelwechsel von Wasser zu 99% Deuteriumoxid. B: Schematische Darstellung der vollständigen Deuterierung monomerer Bestandteile und der Deuterierung lösungsmittelerreichbarer Positionen innerhalb der Polymerstäbchen.

Direkt zu Beginn werden alle monomeren Bestandteile der Verbindung deuteriert. In diesen liegen keine Wasserstoffbrücken untereinander vor und sind nicht gegen das Lösungsmittel abgeschirmt. Zusätzlich werden lösungsmittelzugängliche Stellen in der

Peripherie der assemblierten Nanostäbchen deuteriert. Die Amidprotonen, die im Inneren der Struktur vorliegen, sind durch den hydrophoben Effekt von Deuteriumoxid abgeschirmt und bilden in einer β -faltblattartigen Struktur Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Protonen dieser Amide sollten nicht durch Deuterium ausgetauscht werden. Erst wenn ein Peptidamphiphil aus dem Stapel depolymerisiert und als Monomerbaustein in Lösung vorliegt, kann dieser vollständig deuteriert werden. Durch die Gleichgewichtsreaktion der Polymerisation/Depolymerisation werden mit der Zeit alle Peptidamphiphile vollständig deuteriert.

Durch die Deuterierung nimmt die molare Masse der Peptidamphiphile um 1 Da pro substituierten Wasserstoff zu. Die molare Masse der Verbindung **X-11** kann so bei vollständiger Deuterierung um 15 Da erhöht und mittels Massenspektrometrie detektiert werden. Es wurde hochauflösende Elektrospray-Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) verwendet, um das hohe Masse-Ladungsverhältnis der Struktur auflösen zu können. In Abbildung 3.45 ist das erhaltene Massenspektrum der Verbindung **X-11** einer Konzentration von 1 μ M in Wasser (5 mM NaOAc) dargestellt. Das eingeschobene Spektrum im oberen rechten Bildausschnitt zeigt, dass neben dem zweifach geladenen Addukt $[\mathbf{X-11}+2\text{Na}]^{2+}$ auch das dreifach, vierfach und fünffach geladene Natriumaddukt gefunden werden konnte. Das zweifach geladene Addukt wies jedoch eine sehr geringe Intensität auf, was vor allem die Detektion geringer Mengen einer höheren Deuterierung erschwert. Die höchste Intensität wies das vierfach geladene Addukt $[\mathbf{X-11}+4\text{Na}]^{4+}$ auf. Durch die hohe Ladung liegen die detektierten Signale der Massenverteilung des Addukts jedoch nur 0,25 m/z voneinander entfernt und sind schwieriger aufzulösen. Die dreifachgeladene Spezies $[\mathbf{X-11}+3\text{Na}]^{3+}$ stellt den besten Kompromiss aus Intensität und Abstand der Signale dar. Der Ausschnitt des Massenspektrums für das Addukt $[\mathbf{X-11}+3\text{Na}]^{3+}$ zeigt die Massenverteilung der detektierten Spezies, die durch die natürliche Häufigkeit schwererer Isotope der Elemente zustande kommt. Das Addukt besitzt die Summenformel $\text{C}_{228}\text{H}_{336}\text{N}_{42}\text{O}_{60}\text{Na}_3$. Mit 228 Kohlenstoffatomen fällt besonders das ^{13}C -Kohlenstoffisotop mit einer natürlichen Häufigkeit von 1,1 % ins Gewicht und sorgt für eine breite Isotopenverteilung, wie sie in Abbildung 3.45 zu sehen ist. Die detektierte Isotopenverteilung spiegelt in hoher Übereinstimmung die theoretisch berechnete Verteilung wider. Eine Gegenüberstellung der detektierten und berechneten Häufigkeiten ist in Tabelle 3.4 gezeigt. Insgesamt können elf Spezies mit einer relativen Häufigkeit über 1 % gefunden werden.

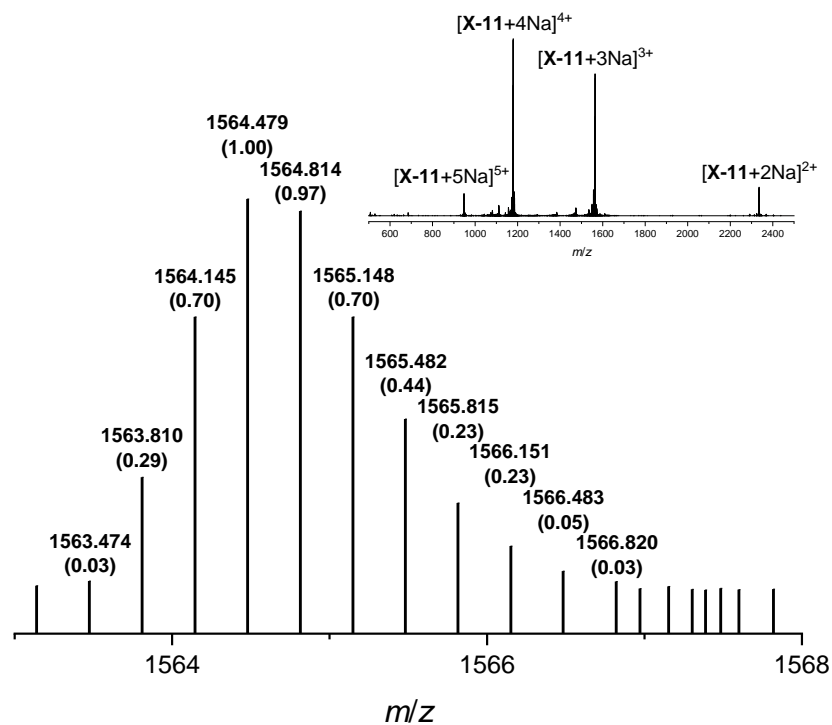


Abbildung 3.45: Massenspektrum der Verbindung **X-11** einer Konzentration von 1 μM in 5 mM NaOAc in Wasser. Der Ausschnitt zeigt das Addukt $[\text{X-11}+3\text{Na}]^{3+}$. Das eingeschobene Spektrum im oberen rechten Bildausschnitt zeigt den gesamten detektierten Bereich mit den Addukten einer Ladung von 2+ bis 5+.

Die Verbindung kann trotz hoher molarer Masse verlässlich detektiert werden. Die breite Isotopenverteilung erschwert jedoch die Auswertung eines HDX-MS-Experiments enorm. Kommt anstelle eines ^{12}C - ein ^{13}C -Isotop in der Verbindung vor, erhöht sich die Masse um 1 Da und das detektierte Masse/Ladungsverhältnis (m/z) der dreifachgeladenen Spezies um 0,33. Wird im HDX-Experiment ein Wasserstoffatom gegen das schwerere Isotop Deuterium ausgetauscht, erhöht sich die Masse und das detektierte Masse/Ladungsverhältnis im selben Maße. Das führt dazu, dass die elf Spezies der Isotopenverteilung für 16 verschiedene Deuterierungsgrade der Verbindung **X-11** (0 bis 15 mal deuteriert) überlagert gemessen werden. Es besteht ein kleiner Unterschied der zusätzlichen Masse durch ein Deuterium gegenüber einem ^{13}C -Isotop, der durch den Massendefekt verursacht wird. Dieser ist auf die unterschiedlichen Bindungsenergien in den Atomkernen der Isotope und den daraus resultierenden unterschiedlichen Massendefekten zurückzuführen.^[258] Die Massendifferenz beträgt aber lediglich 0,00226 Da beziehungsweise $m/z = 0,000753$ und lässt sich durch die Auflösung der HR-ESI-MS nicht auflösen (berechnet mit *IsoPro* 3.1).

Tabelle 3.4: Gegenüberstellung der detektierten und berechneten Isotopenverteilung des Addukts [X-11+3Na]³⁺. Berechnet mit *IsoPro 3.1*.

Detektiert		Berechnet	
<i>m/z</i>	relative Häufigkeit	<i>m/z</i>	relative Häufigkeit
1563,474	0,03		
1563,810	0,29	1563,807	0,26
1564,145	0,70	1564,141	0,70
1564,479	1,00	1564,476	1,00
1564,814	0,97	1564,810	0,97
1565,148	0,70	1565,144	0,72
1565,482	0,44	1565,478	0,44
1565,815	0,23	1565,813	0,23
1566,151	0,12	1566,147	0,10
1566,483	0,05	1566,481	0,04
1566,820	0,03	1566,816	0,01

Der Sachverhalt wird an den gemessenen Spektren während des Experiments deutlich. In Abbildung 3.46 ist ein Massenspektrum der Probe **X-11** des HDX-MS-Experiments zum ersten Messzeitpunkt, direkt nach dem Verdünnen der Probe, gezeigt. Es können zwei nicht getrennte Verteilungen gefunden werden, die die Überlagerung der Isotopenverteilung und Deuterierungsgrade darstellt. Da die natürliche Häufigkeit der Isotope eines Elements konstant ist, ist auch die Isotopenverteilung einer einzigen Verbindung konstant. Der Anteil der Deuterierung während der Dauer des Experiments ist jedoch variabel. So wird deutlich, dass es zwei dominierende Spezies der Deuterierungszahl gibt. Eine Möglichkeit der Auswertung des Deuterierungsgrads ist die Verwendung des HDX-Tools der Software *Mmass*.^[259] Dieses verwendet eine umhüllende Anpassung der Daten der detektierten Massenverteilung, um den Verlauf der Messdaten durch eine Funktion beschreiben zu können. Dann wird aus der Kombination der Isotopenverteilung der eingegebenen Strukturformel und der Anzahl der austauschbaren Deuteriumatome eine Linearkombination berechnet, die die Funktion der Messdaten am besten abbildet. So werden für die Komponenten mit unterschiedlicher Anzahl ausgetauschter Deuteriumatome (0 bis 15) die Anteile an der Verteilung aller Komponenten ermittelt. Mit diesen berechneten Daten wird ersichtlich, dass es sich bei der ersten Verteilung in Abbildung 3.46 um eine Kombination bereits partiell deuterierter Spezies (**pd**) und bei der zweiten Verteilung um die vollständig deuterierte Spezies (**vd**) handelt. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit ähnlichen Experimenten, die in der Literatur beschrieben sind.^[113,116]

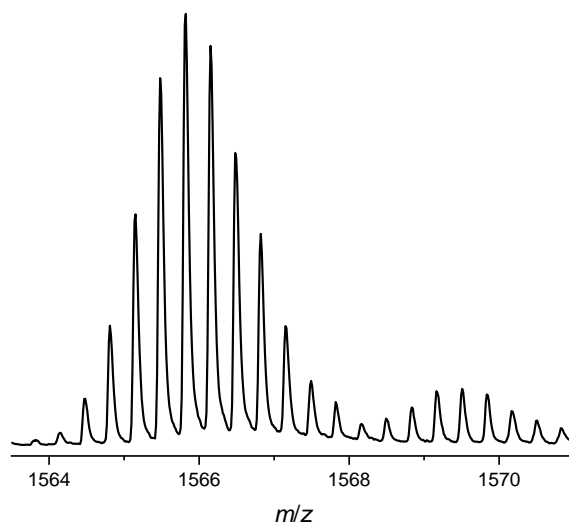


Abbildung 3.46: Massenspektrum der Verbindung **X-11** einer Konzentration von 100 μM in 5 mM NaOAc in Wasser, direkt nach Verdünnung (99:1) in 5 mM NaOAc in Deuteriumoxid. Es kann sofort die zu höheren Massen verschobene Verteilung des Peptidamphiphils sowie die Verteilung der vollständig deuterierten Verbindung (**vd**) dargestellt werden.

Die Auswertung der detektierten Massenverteilungen wurde für alle Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verdünnung vorgenommen. Zur vollständig deuterierten Spezies (**vd**) wurden alle berechneten Deuterierungsgrade von elf bis 15 zusammengefasst. Dies ist aufgrund der Unsicherheit der verwendeten Methode sinnvoll und da aufgrund der hohen Anzahl der Amide in der Struktur statistisch nicht alle Stellen gleichzeitig durch ein Deuterium ausgetauscht werden. Bei 1 Vol-% Wasser in Deuteriumoxid beträgt die Wahrscheinlichkeit P , dass ein Lösungsmittelmolekül Deuterium ist, $P = 0,9899$. Da eine zugängliche Amidposition auch von dem Restanteil Wasser durch die Verdünnung erreicht werden kann, kann der maximal mögliche vollständige Deuterierungsgrad der Verbindung **X-11** im HDX-MS-Experiment $P(15\text{xD})$ durch Kombinatorik mit Gleichung (3.7) berechnet werden.

$$P(15\text{xD}) = \binom{15}{0} \cdot 0,9899^{15} \cdot (1 - 0,9899)^0 = 0,858 \quad (3.7)$$

So ist es nicht möglich, mehr als 86 % der 15-fach deuterierten Spezies zu bilden, wenn ein Volumenprozent Wasser anwesend ist. Wird der Anteil der vollständig deuterierten Spezies gegen die Zeit aufgetragen, kann der Graph in Abbildung 3.47 A erhalten werden.

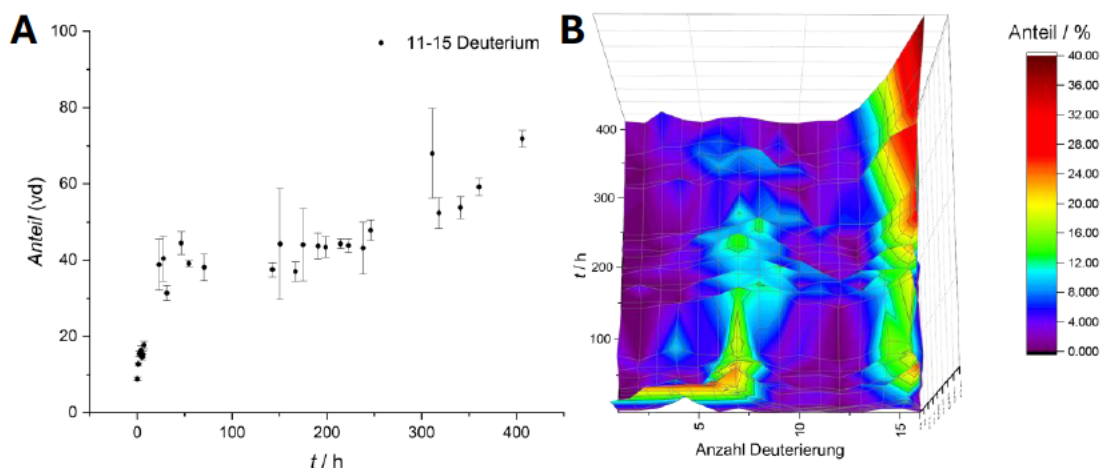


Abbildung 3.47: A: Auftragung des Anteils der vollständig deuterierten Spezies (vd) von den detektierten Deuterierungsgraden des Peptidamphiphils X-11 gegen die Zeit. B: Parametrisches Oberflächendiagramm der Anzahl der Deuterierung mit der Zeit t . Der Anteil des jeweiligen Deuterierungsgrads von der gesamten detektierten Verbindung X-11 ist farbcodiert dargestellt.

Ähnlich des FRET-Verhältnisses kann die Zunahme der vollständig deuterierten Spezies als Maß für den Austausch der Monomere verstanden werden, wenn man davon ausgeht, dass Moleküle der Verbindung X-11 nur vollständig deuteriert werden können, wenn die Monomere aus dem Stäbchen ausgebaut werden und in einem monomeren Zustand gelöst vorliegen. Ein Indiz für diese Annahme kann verdeutlicht werden, wenn alle Anteile ausgetauschter Deuteriumatome mit der Zeit in einem parametrischem Oberflächendiagramm dargestellt werden. In diesem 3D-Diagramm in Abbildung 3.47 B wird der Anteil an allen Komponenten der Verteilung farbcodiert ausgedrückt. Es kann beobachtet werden, dass der Anteil einer nur gering deuterierten Spezies zu Beginn des Experiments schnell zu einer Spezies deuteriert wird, die im Mittel sechs ausgetauschte Deuteriumatome trägt. Ganz rechts in der Grafik wird eine Spezies mit der Zeit gebildet, die alle 15 möglichen Positionen ausgetauscht hat. Zwischen diesen zwei Populationen kann kein weiterer signifikanter Anteil detektiert werden. Es wird angenommen, dass die erste Population eine partiell deuterierte Spezies (pd) darstellt, die nur an Positionen deuteriert wird, die für das Lösungsmittel zugänglich sind. Diese Stellen sind vor allem die Amidprotonen des Dendrons (NH^{Tris}) und gegebenenfalls des Spacers (NH^{Alx}). Die Amide können durch Deuteriumoxid deuteriert werden, indem die Lösungsmittelmoleküle in die hydrophile Peripherie der assemblierten Nanostäbchen eindringen und dort die Amidprotonen austauschen. Hierfür muss keine Depolymerisation stattfinden und die Stellen können direkt im Polymer ersetzt werden. Aus diesem Grund findet der Austausch für diese Positionen deutlich schneller statt als für die vollständig deuterierte Verbindung (vd). Die andere Spezies stellt simpel die vollständig deuterierte Verbindung X-11 (vd) dar, in der (beinahe) alle Amidprotonen durch Deuterium ausgetauscht wurden. Da zwischen beiden Spezies keine anderen

Deuterierungsgrade festgestellt werden konnten, wird davon ausgegangen, dass nach den lösungsmittelerreichbaren Stellen eine weitere Deuterierung nur dann stattfinden kann, wenn ein Peptidamphiphil in einem deassemblierten, molekular gelösten Zustand vorliegt. Hier sind keine Wasserstoffbrückenbindungen mehr zu einem weiteren Peptidamphiphil ausgebildet und alle Amidprotonen sind für das Lösungsmittel zugänglich. Es wird angenommen, dass alle Amidprotonen schnell ausgetauscht werden, bevor eine erneute Polymerisation des Moleküls in das supramolekulare Polymer stattfindet. Für Peptidamphiphile im Polymer tritt ein EX2-Szenario auf. Dieses ist im Hinblick auf die langsame Dynamik und die außerordentliche Stabilität der Strukturen wahrscheinlich und in der Literatur in den meisten Fällen gegeben.^[105,116,260]

Unter diesen Annahmen kann im Verlauf des HDX-MS-Experiments beobachtet werden, dass die supramolekularen Polymere zunächst schnell durch Deuteriumoxid an den lösungsmittelzugänglichen Stellen deuteriert werden und die partiell deuterierte Spezies **pd** bilden. Zudem wird mit der Zeit durch das dynamische Gleichgewicht der Polymerisation/Depolymerisation die Spezies **pd** konsumiert und die vollständig deuterierte Spezies **vd** gebildet.

Wenn die Bildung der Spezies **vd** gegen die Zeit aufgetragen wird, kann ein weiteres Maß für den dynamischen Austausch der Peptidamphiphile zwischen den Polymeren ermittelt werden. In Abbildung 3.48 ist diese Auftragung der Darstellung des FRET-Mischungsexperiments gegenübergestellt. Erneut konnte eine biexponentielle Anpassung der Daten verwendet werden, um die HDX-MS-Daten in einem vergleichbaren Zeitraum anzupassen.

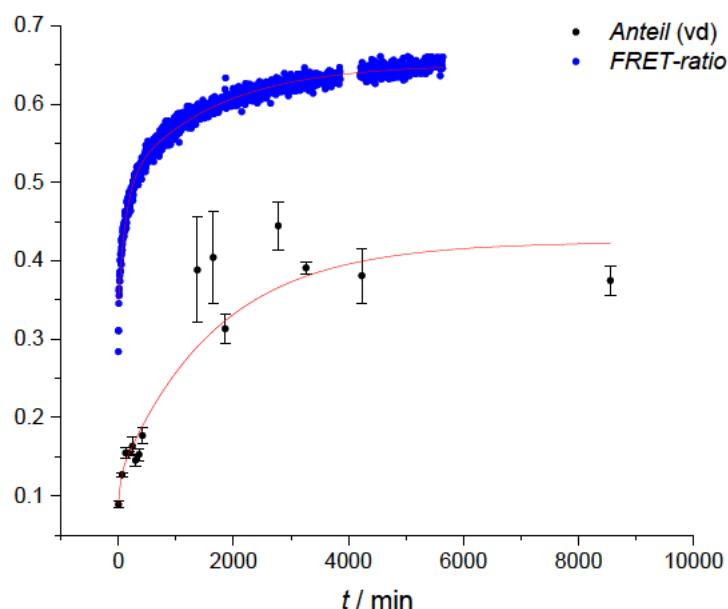


Abbildung 3.48: Vergleich der aufgenommenen Daten zur Ermittlung der Dynamik mittels FRET-Mischungsexperiment (blau) und HDX-MS-Experiment (schwarz) und der jeweiligen biexponentiellen Anpassung.

Die ermittelten Halbwertszeiten sind in Tabelle 3.5 aufgeführt und den Halbwertszeiten des FRET-Mischungsexperiments gegenübergestellt. Ein Vergleich der Halbwertszeiten zeigt, dass die ermittelten Größen vergleichbar sind und in derselben Größenordnung vorliegen. Aufgrund der geringeren Anzahl und Dichte der Messdaten für das HDX-MS-Experiment, insbesondere zu Beginn der Messung, und der relativ hohen Abweichung der ermittelten Anteile in den Triplikaten der Messung, ist der Fehler deutlich höher als im FRET-Mischungsexperiment. Dennoch können vergleichbare Halbwertszeiten erhalten werden.

Tabelle 3.5: Vergleich der Halbwertszeiten des Monomeraustauschs der Probe **FRET^{TEG}**, gemessen durch das FRET-Mischungsexperiment, und der Probe **X-11**, gemessen durch HDX-MS.

	FRET	HDX-MS
τ_1	(92 ± 3) min	(25 ± 23) min
τ_2	(1090 ± 20) min	(1180 ± 450) min

Da eine sehr langsame Dynamik zu beobachten ist und keine deuterierte Population zwischen der **pd** und **vd** gefunden werden kann, liegt der Verdacht nahe, dass die Monomerbestandteile durch einen Polymerisations/Depolymerisationsmechanismus an den Kettenenden zwischen den Polymeren austauschen. Dieser Prozess wurde bereits durch DOBSON *et al.* als Recycling der Moleküle innerhalb der Polymerpopulation beschrieben.^[113] Hier hängt die Rate der Depolymerisation, die zur Deuterierung der molekular gelösten Spezies führt, von der Konzentration der vorhandenen Polymerkettenenden ($2P(t)$) ab. Um diese Theorie zu testen, wurde dieselbe Probe in mehrere Aliquote aufgeteilt und unterschiedlich lange im Wasserbad mit Ultraschall (US) behandelt. Die Einwirkung des Ultraschalls auf die Polymerprobe führte zur Fragmentierung der anisotropen Stäbchen in eine höhere Anzahl kürzerer Polymere. Durch die höhere Anzahl vorhandener Kettenenden sollte sich die Geschwindigkeit des Wasserstoff/Deuteriumaustauschs beschleunigen. Es wird angenommen, dass die Ultraschallbehandlung nicht zum Zerfall einiger Polymerstäbchen in Mono- oder Oligomere führt und die Änderung der Austauschgeschwindigkeit nur auf die geringere Polymerkettenlänge und damit erhöhte Anzahl freier Kettenenden zurückzuführen ist. Das Ergebnis des Ultraschallversuchs ist in Abbildung 3.49 zusammengefasst. Für die Auswertung wurde die Abnahme der **pd** Spezies anstelle der Zunahme der **vd** Spezies beobachtet, da hier nur die ersten Messpunkte relevant sind. Bei langen Beobachtungszeiträumen wird vermutet, dass sich die Polymer-Anzahlkonzentration $P(t)$ nach der Ultraschallbehandlung im Verlauf des Messzeitraums wieder verändert. Durch die Steigung der Abnahme des Anteils der **pd** Spezies kann die Geschwindigkeit des Monomeraustauschs ausgedrückt werden. Es wird ersichtlich, dass die Geschwindigkeit für die kurzen Zeiten der Ultraschallbehandlung unverändert bleibt. Selbst 15 Minuten Ultraschallbehandlung scheint keine Veränderung hervorzubringen. Eine Erhöhung der Geschwindigkeit kann erst für die Probe festgestellt werden, die 30 Minuten mit Ultraschall behandelt wurde (rot). Wird eine Probe für zwei Stunden

behandelt (grün), wird der Effekt sehr deutlich. Diese rein qualitative Untersuchung zeigt die außergewöhnliche Stabilität der untersuchten Polymerstäbchen. Es wird angenommen, dass die Nanostäbchen durch die laterale Aggregation zu Bündeln gegenüber der Fragmentierung stabilisiert werden.^[77,113,261] So führt die Ultraschallbehandlung der Stäbchen zunächst zur Aufspaltung der Bündel in kleinere Zusammenschlüsse. Dies ist schematisch in Abbildung 3.49 B dargestellt. Eine Zunahme der Anzahl freier Kettenenden findet so nur in geringem Maße statt.

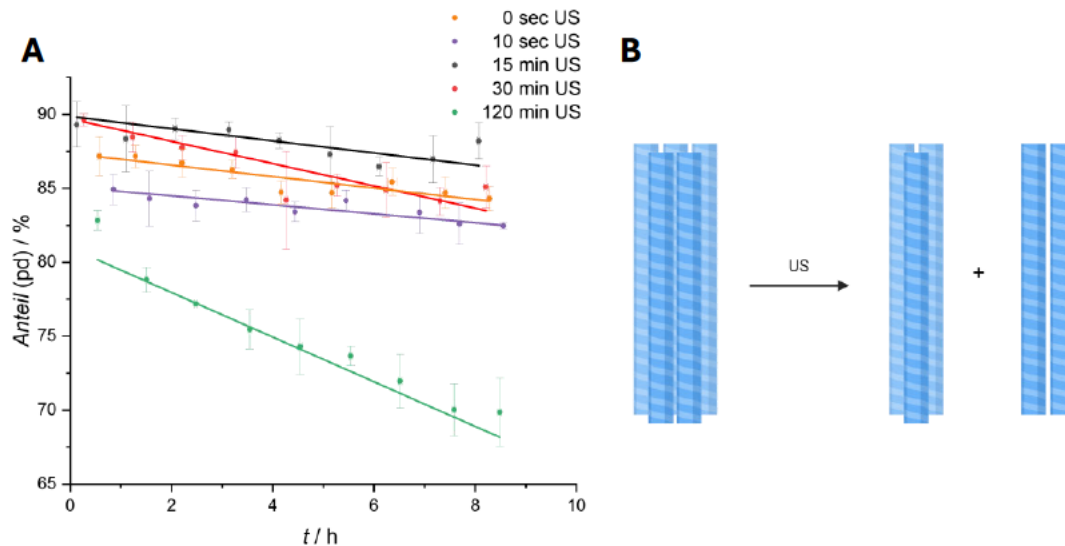


Abbildung 3.49: A: Abnahme des detektierten Anteils der partiell deuterierten Spezies (pd) vom Gesamtteil der detektierten Verbindung X-11 mit der Zeit t . Die Länge der Ultraschallbehandlung (US) der Proben ist in der Legende vermerkt. B: Schematische Darstellung der möglichen Aufspaltung der Stäbchenbündel in kleinere Bündel durch Ultraschallbehandlung.

Durch das FRET-Mischungsexperiment wurde gezeigt, dass der Energietransfer innerhalb desselben assemblierten Stäbchens stattfindet. Der Teilchenabstand zwischen Donor und Akzeptor in Lösung ist zu groß für einen effizienten Energietransfer. Durch die Technik der Akzeptor-Photobleichung-Förster-Resonanzenergietransfer (AccPbFRET)-Methode kann die FRET-Effizienz mittels LSCM in Aufnahmen Pixel für Pixel bestimmt werden.^[262] Hier kann die FRET-Effizienz durch das Bleichen des Energietransferakzeptors ratiometrisch bestimmt werden. Dies ist in den Aufnahmen für $\text{TEG}^{5\%_{\text{ss}}\text{Cy}3+5\%_{\text{ss}}\text{Cy}5}$ in Abbildung 3.50 veranschaulicht.

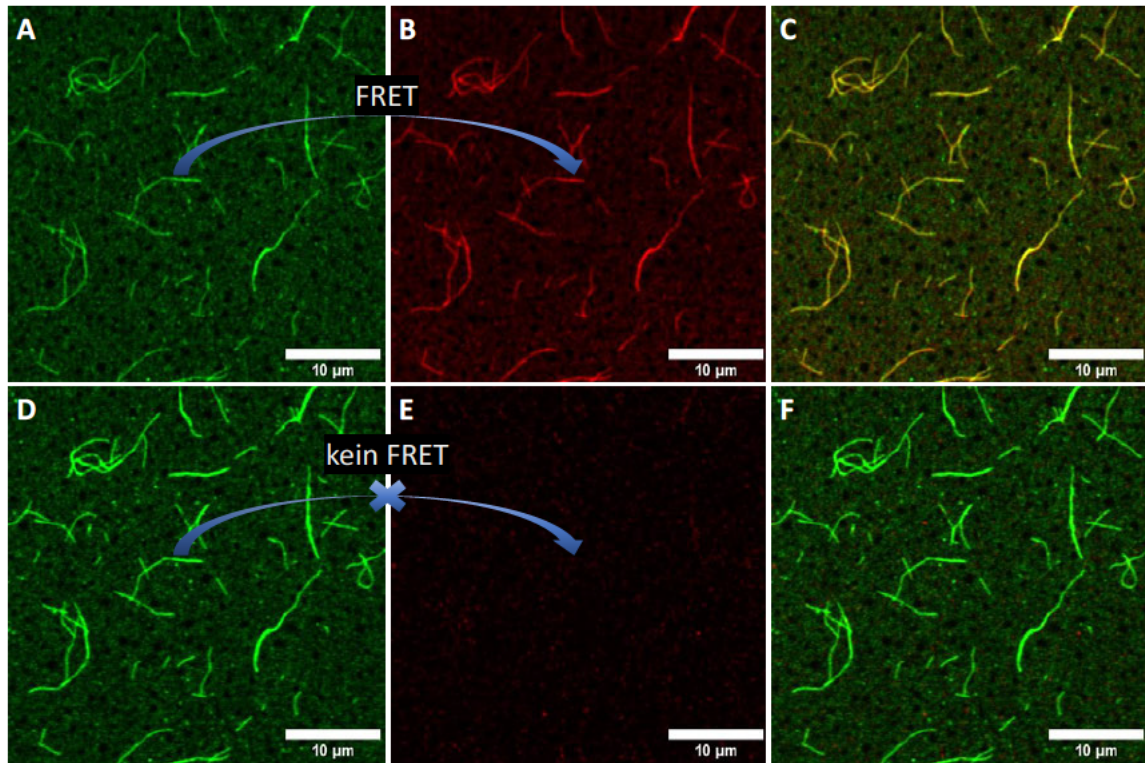


Abbildung 3.50: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der FRET-Probe $\text{TEG}^{5\%}\text{Cy}3+5\%^{5\%}\text{Cy}5$ für die Bestimmung der FRET-Effizienz durch AccPbFRET. In der ersten Zeile (A bis C) sind die Aufnahmen der Probe vor dem Bleichen des Akzeptors dargestellt. Die zweite Zeile (D bis F) zeigt die Aufnahmen der Probe nach dem Bleichen des Akzeptors. A und D stellen den grünen Kanal dar, in dem die Intensität des Donor detektiert werden kann. B und E stellen den roten Kanal dar, in dem die Intensität des Akzeptors detektiert werden kann. C und F zeigen die Überlagerung der grünen und roten Kanäle.

Vor dem Bleichen des Akzeptors können im roten Kanal (B) dieselben Stäbchen abgebildet werden wie im grünen Kanal (A). Dies zeigt die Colokalisation beider farbstofffunktionalisierter Peptidamphiphile in ein Copolymer. Nach dem Bleichen des Akzeptors kann im roten Kanal (E) kaum noch ein Signal detektiert werden. Beim Vergleich der Donorintensität vor dem Bleichen (A) und danach (D) kann eine Zunahme der Intensität beobachtet werden. Da in Abwesenheit eines Akzeptors keine Energie mehr zu diesem übertragen werden kann, steigt die Rate der Emission des Donors.

Nach der ratiometrischen Berechnung der FRET-Effizienz auf Grundlage der Intensitätsdaten kann die FRET-Effizienzkarte in Abbildung 3.51 erhalten werden. Hier ist die FRET-Effizienz farbcodiert für jeden Pixel der Aufnahme dargestellt. Dabei entsprechen warme Farben von rot bis weiß positiven FRET-Effizienzen und kalte Farben von lila bis blau negativen FRET-Effizienzen. Schwarz stellt keinen numerischen Wert dar. Durch einen Vergleich mit Abbildung 3.50 wird sofort ersichtlich, dass FRET nur in den Stäbchen detektiert werden kann. Die mittlere FRET-Effizienz E_{FRET} kann mit $E_{\text{FRET}} = 0,41 \pm 0,16$ bestimmt werden. Hierbei ist die mittlere Donorintensität vor dem Bleichen I_0 von $I_0 = 74,5$ auf eine mittlere Donorintensität nach dem Bleichen I_{pb} von $I_{\text{pb}} = 119,4$

gestiegen. Ein direkter Vergleich der FRET-Effizienz mit dem FRET-Verhältnis aus dem FRET-Mischungsexperiment ist nicht möglich, da das FRET-Verhältnis mit der Quantenausbeute und der Detektionseffizienz der unterschiedlichen Farbstoffe korrigiert werden müsste.^[72] Eine klare Verteilung, wo innerhalb des Stäbchens mehr oder weniger Energietransfer detektiert werden kann, kann für diese Probe nicht gefunden werden. Das ist darauf zurückzuführen, dass die Probe bereits vollständig equilibriert vorliegt. Eine Studie zur Veränderung der Verteilung der FRET-Effizienzen innerhalb des Stäbchens mit der Zeit, direkt nach dem Mischen von Donor- und Akzeptorpolymeren stellt aber ein interessantes Experiment dar. Dieses könnte Informationen über die Austauschmechanismen der Peptidamphiphile liefern. Darüber hinaus sind in Abbildung 3.51 punktförmige Stellen hoher FRET-Effizienz zu finden. Es wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um Nanostäbchen handelt, die nur wenige hundert Nanometer lang sind und nicht durch die Auflösung der Konfokalmikroskopie aufgelöst werden können. Sollte dieser Verdacht bewiesen werden, zeigt das, dass durch diese Methode assemblierte Nanostäbchen belegt werden können, die durch die Auflösung herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie-Methoden nicht aufgezeigt werden können.

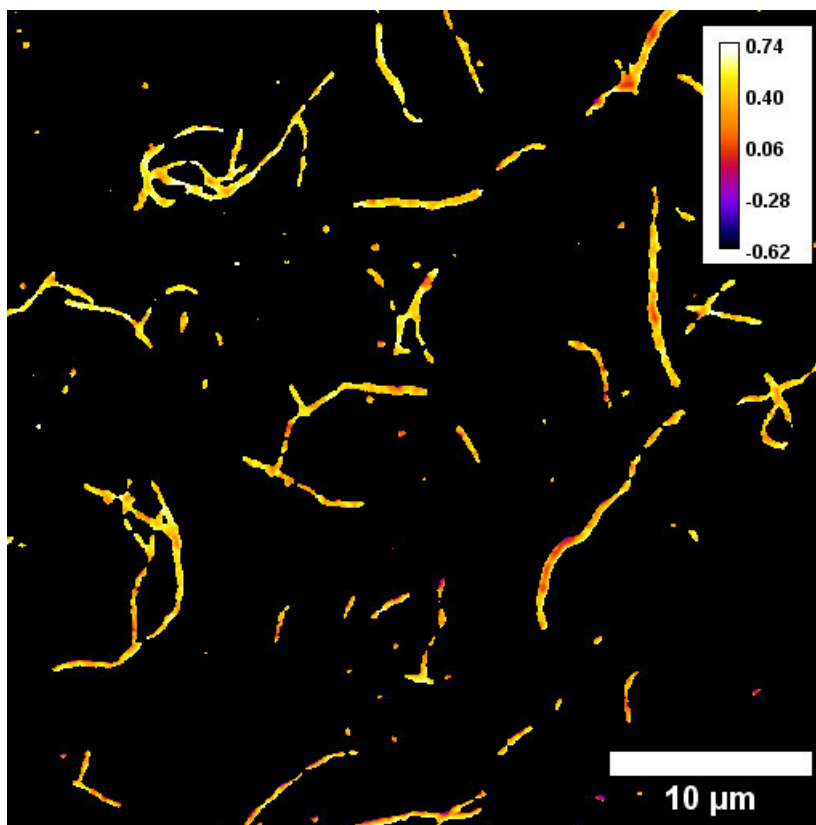


Abbildung 3.51: FRET-Effizienzkarte der Probe $\text{TEG}^{5\%}\text{Cy}3+5\% \text{Cy}5$, die durch AccPbFRET berechnet wurde.

Durch den Förster-Resonanzenergietransfer ändert sich nicht nur die detektierte Fluoreszenzintensität des Donors Sulfo-Cyanin 3. Wegen des zusätzlichen Wegs der Relaxation des angeregten Zustands in Gegenwart des Akzeptors verringert sich auch die

Fluoreszenzlebensdauer τ des Donors (vgl. Gleichung (1.4)). Die Fluoreszenzlebenszeit ist der Kehrwert der Summe aller Raten der Prozesse, die den angeregten Zustand entvölkern.^[67] Neben der Rate der strahlenden Prozesse k_r wie der Fluoreszenz spielt die Rate der strahlungslosen Relaxationen k_{nr} eine entscheidende Rolle. Da der Förster-Resonanzenergietransfer zu den strahlungslosen Relaxationen gehört, reduziert sich durch das Auftreten des Energietransfers die Fluoreszenzlebensdauer.

Analog des AccPbFRET kann durch Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM, engl. *fluorescence lifetime imaging microscopy*) bildgebend der Ort des Energietransfers untersucht werden. Da der zuvor verwendete Donor Sulfo-Cyanin 3 selbst nur eine Fluoreszenzlebensdauer von $\tau = 1,0$ ns besitzt (Daten nicht gezeigt), die durch die Fluoreszenzlöschung und FRET noch weiter sinkt und der Fluoreszenzabfall bereits biexponentiell ist, muss ein geeigneter Farbstoff verwendet werden. In FLIM-Experimenten eignet sich der Farbstoff Alexa Fluor™ 488 (AF488) mit einer Fluoreszenzlebensdauer von $\tau = 4,0$ ns.^[263] AF488 bildet mit dem Akzeptorfarbstoff Alexa Fluor™ 647 (AF647) ebenfalls ein geeignetes FRET-Paar. Hier können die funktionalisierten Peptidamphiphile **X-32** und **X-33** verwendet werden.

Zunächst wurde die Fluoreszenzlebenszeit des freien Farbstoffs AF488 mittels FLIM ermittelt. Dazu wurde eine $2,5 \mu\text{M}$ Lösung des azidfunktionalisierten Farbstoffs **N₃-AF488** (Schema 3.27) in PBS verwendet. Abbildung 3.52 zeigt die FLIM-Aufnahme der Probe des freien Farbstoffs AF488 und das Histogramm des Fluoreszenzabfalls der Lebenszeitmessung. Das Histogramm konnte durch eine monoexponentielle Anpassung gut abgebildet werden und ergab eine Fluoreszenzlebenszeit des freien Farbstoffs $\tau_{\text{AF488frei}} \text{ von } \tau_{\text{AF488frei}} = (4,104 \pm 0,002) \text{ ns}$.

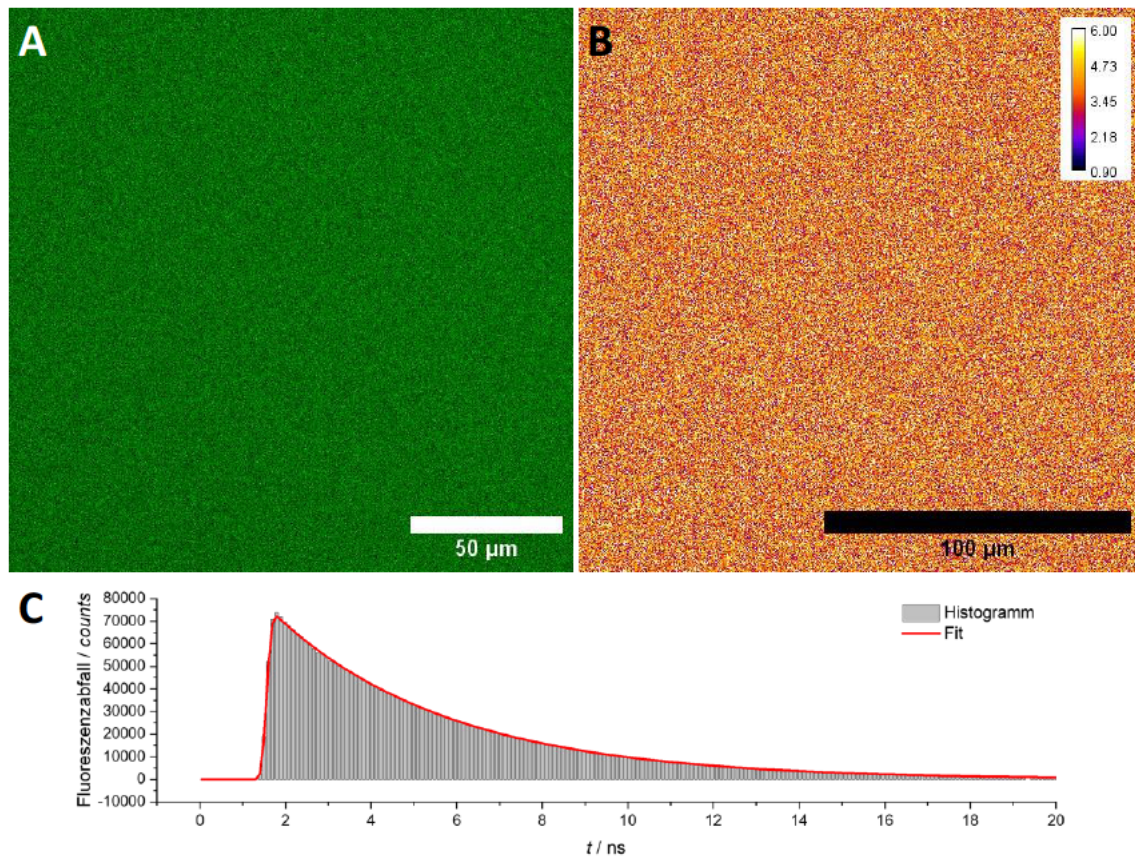


Abbildung 3.52: FLIM-Auswertung des freien Farbstoffs N₃-AF488 einer Konzentration von 2,5 µM in PBS A: Konfokalmikroskopische Aufnahme. B: FLIM-Aufnahme des freien Farbstoffs. Die berechnete Fluoreszenzlebenszeit für jeden Pixel ist farbcodiert dargestellt. C: Histogramm des Fluoreszenzabfalls und der Anpassung der Daten zur Ermittlung der Fluoreszenzlebenszeit.

Wurde die Probe TEG^{5%}AF488 für die FLIM-Analyse verwendet, wurde analog das Ergebnis in Abbildung 3.53 erhalten. In der konfokalmikroskopischen Aufnahme (A) sind die adsorbierten Stäbchen der Copolymerprobe abgebildet. Die FLIM-Aufnahme (B) zeigt die gemessene Fluoreszenzlebenszeit der Stäbchen. Die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{\text{TEG-AF488}}$ konnte ebenfalls durch die monoexponentielle Anpassung des Fluoreszenzabfalls bestimmt werden. Es wurde eine verringerte Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_{\text{TEG-AF488}} = (3,575 \pm 0,005)$ ns erhalten. Diese Verringerung gegenüber des ungebundenen Farbstoffs AF488 ist durch die Änderung der molekularen Umgebung in den aggregierten Stäbchen zu erwarten.^[264]

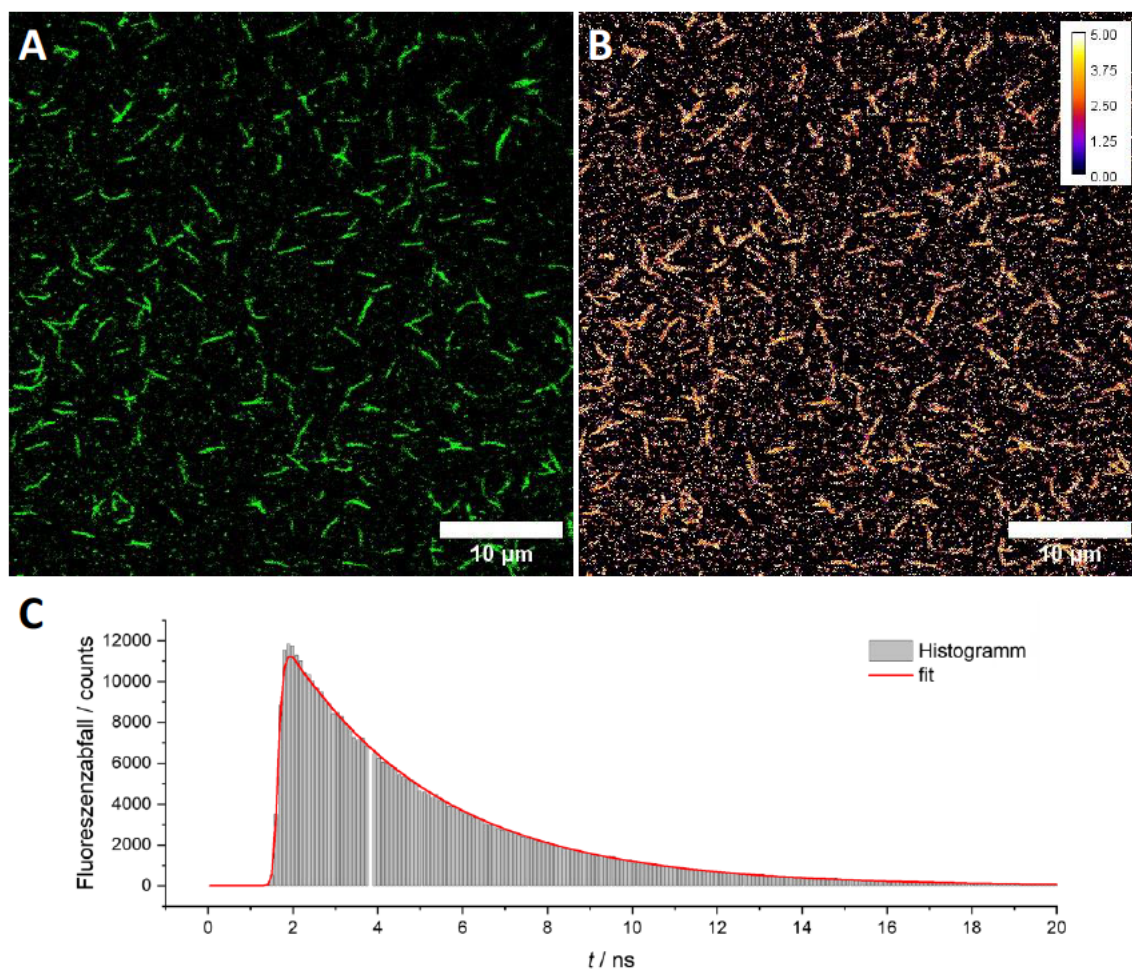


Abbildung 3.53: FLIM-Auswertung der Probe $\text{TEG}^{5\%AF488}$ einer Konzentration von 250 nM in PBS A: Konfokalmikroskopische Aufnahme. B: FLIM-Aufnahme der Probe. Die berechnete Fluoreszenzlebenszeit für jeden Pixel ist farbcodiert dargestellt. C: Histogramm des Fluoreszenzabfalls und der Anpassung der Daten zur Ermittlung der Fluoreszenzlebenszeit.

Wurde nun die FRET-Probe $\text{TEG}^{5\%AF488+5\%AF647}$ mit dem FRET-Paar AF488 und AF647 verwendet, sank die Fluoreszenzdauer $\tau_{\text{TEG-FRET}}$ in den Stäbchen erneut auf $\tau_{\text{TEG-FRET}} = (2,69 \pm 0,04)$ ns ab. Der Fluoreszenzabfall in dieser Probe ist durch den zusätzlichen Relaxationsweg nicht länger monoexponentiell und wurde biexponentiell angepasst. Die FLIM-Analyse dieser Probe ist in Abbildung 3.54 dargestellt. Hier zeigen die konfokalmikroskopischen Aufnahmen erneut colokalisierte Nanostäbchen der Copolymere im grünen Kanal (A) und im roten Kanal (B). Die FLIM-Aufnahme (C) verdeutlicht wieder den Unterschied der Fluoreszenzlebensdauer auf Pixelbasis.

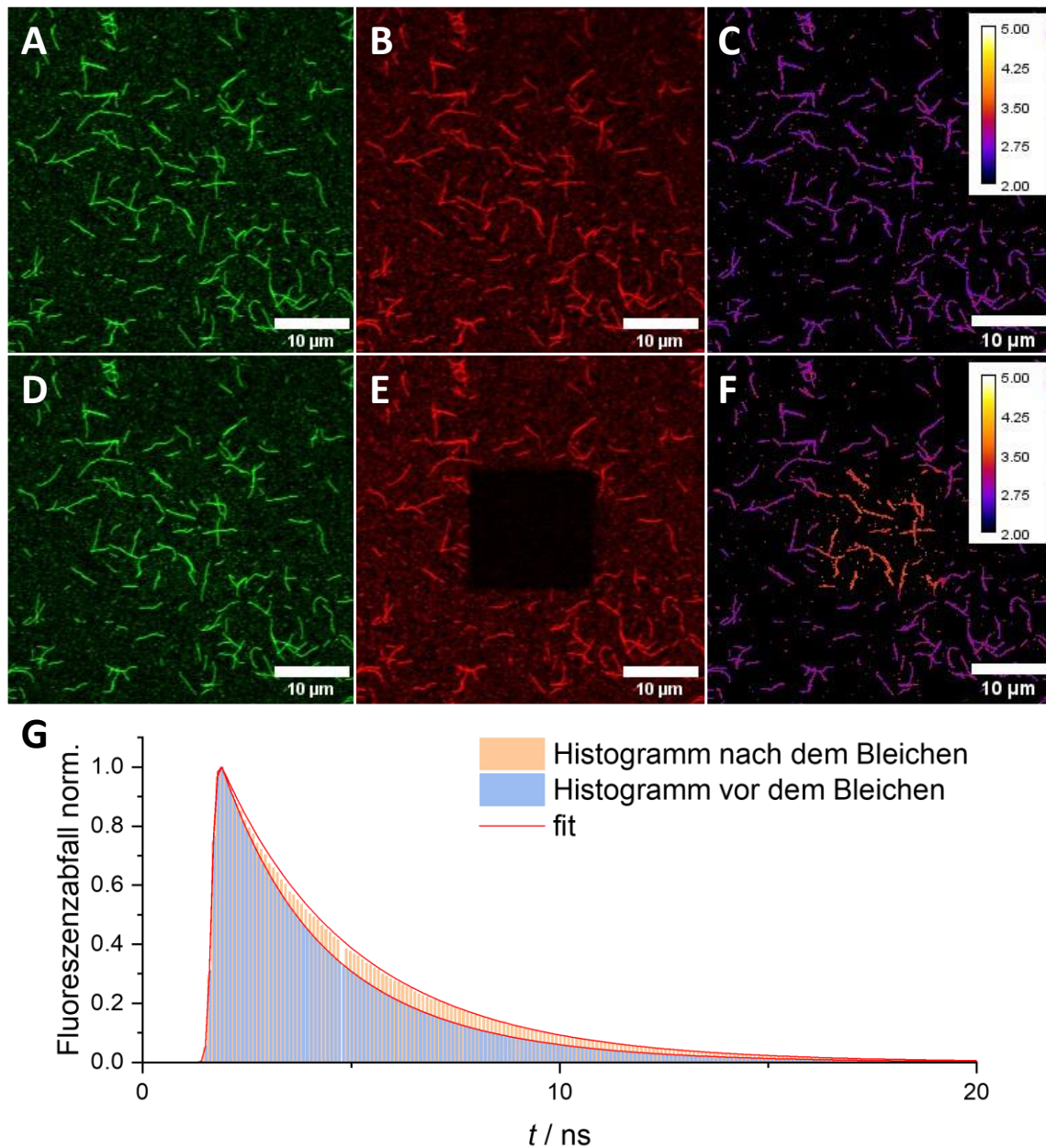


Abbildung 3.54: FLIM-Auswertung der Probe $\text{TEG}^{5\%}\text{AF488}+5\%\text{AF647}$ einer Konzentration von 250 nM in PBS A: Konfokalmikroskopische Aufnahme des grünen Kanals vor dem Bleichen. B: Konfokalmikroskopische Aufnahme des roten Kanals vor dem Bleichen. C: FLIM-Aufnahme der Probe vor dem Bleichen. D: Konfokalmikroskopische Aufnahme des grünen Kanals nach dem Bleichen. E: Konfokalmikroskopische Aufnahme des roten Kanals nach dem Bleichen. F: FLIM-Aufnahme der Probe nach dem Bleichen. Die berechnete Fluoreszenzlebenszeit der FLIM-Aufnahmen für jedes Pixel sind farbcodiert dargestellt. G: Histogramm des Fluoreszenzabfalls und der Anpassungen der Daten zur Ermittlung der Fluoreszenzlebenszeit.

Durch das Bleichen des Energietransferakzeptors AF647 in der Bildmitte konnte für die dort vorliegenden Copolymere der Akzeptor und damit der zusätzliche Relaxationsweg des angeregten Zustands des Donors entfernt werden. Der Vergleich der Aufnahmen des grünen (D) und roten Kanals (E) nach dem Bleichen mit den Aufnahmen in Abbildung 3.54 A und B zeigt das vollständige Bleichen des Akzeptors in der Bildmitte. Beim Messen

der Fluoreszenzlebensdauer in der Aufnahme (F) nach dem Bleichen τ_{pb} des Akzeptors wurde eine Fluoreszenzlebenszeit der Stäbchen innerhalb des gebleichten Bereichs von $\tau_{pb}(\text{innen}) = (3,47 \pm 0,06)$ ns erhalten, während außerhalb des Bereichs eine Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_{pb}(\text{außen}) = (2,81 \pm 0,03)$ ns ermittelt wurde. Durch die Abwesenheit des Akzeptors konnte der Prozess wieder monoexponentiell angepasst werden. Die Histogramme und die Funktion der Anpassung für beide Fälle ist im Histogramm in Abbildung 3.54 G dargestellt. Da hier unterschiedlich große Regionen miteinander verglichen werden und sich die Anzahl der detektierten Photonen stark unterscheidet, wurden die Histogramme zum besseren Vergleich normiert dargestellt. Durch das Bleichen des Akzeptors in der Probe konnte die Lebenszeit der Fluoreszenz des Donors $\tau_{pb}(\text{innen})$ erneut auf die Fluoreszenzlebensdauer des Donors allein $\tau_{\text{TEG-AF488}}$ angehoben werden. Die Fluoreszenzlebensdauer der Stäbchen, die sich außerhalb dieses Bereichs befinden, blieben von dem Bleichen weitestgehend unberührt mit einer immer noch verringerten Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{pb}(\text{außen})$. Der Unterschied der Fluoreszenzlebenszeiten lässt sich durch die FLIM-Aufnahme in Abbildung 3.54 F gut veranschaulichen. Hier können die Stäbchen mit dem Donor AF488, die außerdem den Akzeptor AF647 tragen, sehr eindeutig von den Stäbchen unterschieden werden, die nur den Donor AF488 tragen. Dies zeigt, dass die Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer auf den FRET der Copolymerprobe zurückzuführen ist.

Bei genauerer Untersuchung der Aufnahmen der Probe **TEG^{5%}AF488+5%AF647** fällt auf, dass in vielen Regionen des Hintergrunds eine vergleichbare Fluoreszenzlebensdauer detektiert werden kann. Dies ist besonders deutlich, wenn die FLIM-Aufnahmen nicht in ihrem Intensitätsbereich angepasst werden, wie es in Abbildung 3.55 verdeutlicht ist. Aufnahme A in Abbildung 3.55 zeigt die konfokalmikroskopische Aufnahme der Polymerstäbchen bei hoher Vergrößerung. Die FLIM-Aufnahme in Abbildung 3.55 B beinhaltet die Pixel mit einer Fluoreszenzlebensdauer zwischen 2 ns und 5 ns, die zusätzlich einen Intensitätsschwellwert überschreiten. Hingegen ist die FLIM-Aufnahme in C nicht durch den Intensitätsschwellwert begrenzt. Hier wird deutlich, dass die vergleichbare mittlere Fluoreszenzlebensdauer von 2,8 ns, wie sie für die FRET-Probe auftritt, in allen punktförmigen oder teils geringfügig anisotropen Stellen im Hintergrund der langen Stäbchenbündel hoher Intensität ebenfalls auftritt. Es wird vermutet, dass dies kurze Nanostäbchen darstellt, die durch die Auflösungsgrenze der konfokalen Mikroskopie nicht aufgelöst werden können. So kann der Nachweis dieser Strukturen nicht auf der Grundlage der Morphologie erbracht werden. Die FLIM-Aufnahme legt jedoch nahe, dass es sich hierbei um einen Ort handelt, in dem der Resonanzenergietransfer des Donors auf den Akzeptor auftritt, der in anderen Experimenten nur innerhalb supramolekularer Copolymere der Peptidamphiphile gezeigt werden konnte. So wird vermutet, dass hier ebenfalls kurze Stäbchen vorliegen, die deutlich kürzer sind als die großen Bündel hoher Intensität.

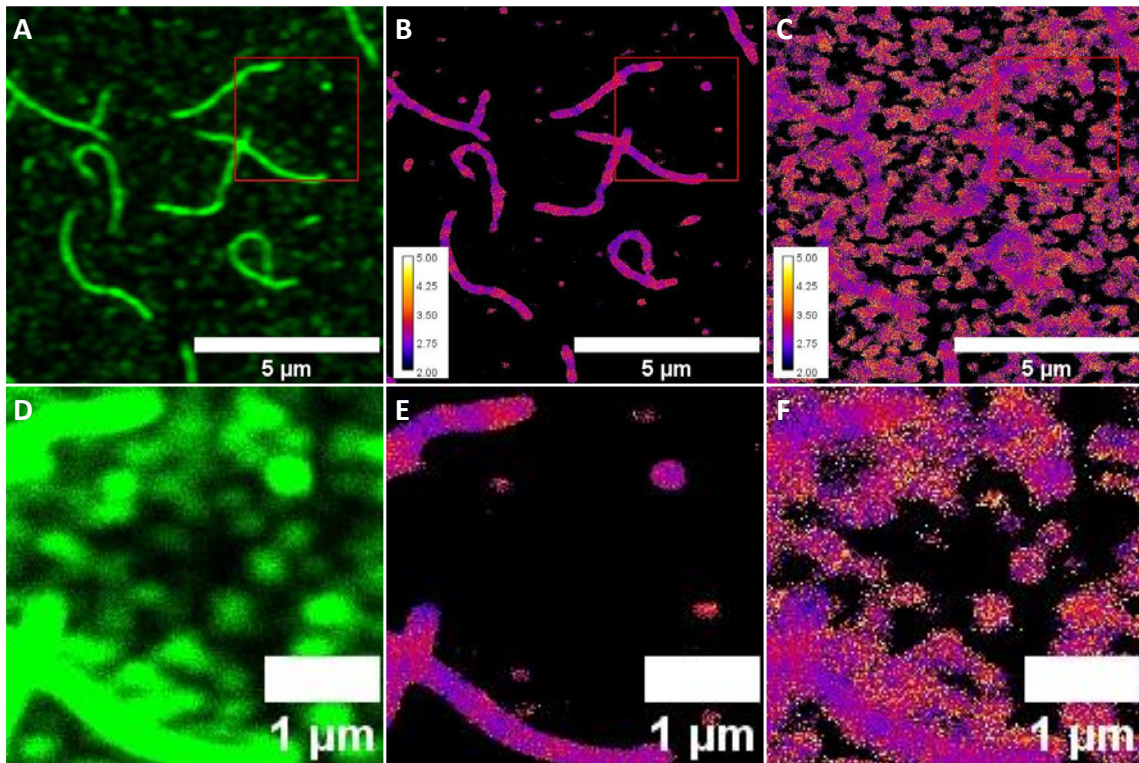


Abbildung 3.55: FLIM-Aufnahmen der Copolymerprobe $\text{TEG}^{5\%}\text{AF488}+5\%\text{AF647}$ in PBS. A: Konfokalmikroskopische Aufnahme der Probe im grünen Kanal. B: Farbcodierte FLIM-Aufnahme mit Intensitätsanpassung. C: Farbcodierte FLIM-Aufnahme ohne Intensitätsanpassung. D-F: Vergrößerung der rot markierten Region der Aufnahmen A-C. Die Farbcodierung der FLIM-Aufnahmen E und F entsprechen der Farbcodierung der Aufnahmen B und C.

Es wurde gezeigt, dass sich durch die Assemblierung der farbstofffunktionalisierten Copolymere die Fluoreszenzlebenszeit des Donorfarbstoff AF488 gegenüber des freien Farbstoffs in Lösung verringert. Wird zusätzlich ein Akzeptorfarbstoff durch Copolymerisation hinzugefügt, wird die Fluoreszenzlebensdauer reversibel weiter verringert. Es wird postuliert, dass durch den reversiblen Charakter dieser Änderung der Polymerisationsvorgang und der dynamische Monomeraustausch dieser supramolekularen Polymere genauer untersucht werden kann. Darüber hinaus wurde durch die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer mittels dieses bildgebenden Verfahrens ebenfalls die Aggregation der supramolekularen Polymere nachgewiesen.

Ein Vergleich der beschriebenen bildgebenden Methoden der Messung des Energietransfers zeigt unterschiedliche Vor- und Nachteile. Durch AccPbFRET wird eine pixelgenaue Messung des Verhältnisses der Donorintensität vor und nach dem Bleichen des Akzeptors genutzt. Es stehen nicht in jedem Pixel die gleiche Anzahl an Fluorophoren zur Verfügung, was die Intensität in jedem Pixel leicht variieren lässt. Da hier der Vergleich in jedem Pixel vor und nach dem Bleichen stattfindet, ist diese Methode weniger anfällig für die Inhomogenität der Probe. Da die Aufnahme vor und nach dem Bleichen aber zu verschiedenen Zeitpunkten stattfindet, ist diese Methode besonders anfällig für

den thermischen Drift der Probe und der Fokusebene sowie der Bewegung der zu untersuchenden Spezies bei unzureichender Fixierung.

FLIM vergleicht in diesem Fall nur die detektierte Fluoreszenzlebenszeit der Fluorophore mit Resonanzenergietransfer in jedem Pixel mit der ermittelten mittleren Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit des Akzeptors. Diese Messung benötigt keinen direkten Vergleich mit einer Aufnahme derselben Proben zu einem anderen Zeitpunkt. Da die Fluoreszenzlebensdauer abhängig ist von der molekularen Umgebung, ist diese Methode etwas anfälliger für die Inhomogenität der Probe sowie Änderungen der direkten Umgebung, jedoch deutlich weniger anfällig für Drift und Bewegung der Spezies. Bei ausreichender Menge detektierter Photonen in einem kurzen Zeitraum ist sogar die Verwendung in lebenden Zellen oder diffusionsgehinderten Proben denkbar.

3.7.4 Peptidamphiphile in Zellaufnahmen

Supramolekulare Peptidamphiphile sowie andere selbstassemblierende Peptide oder Peptidkonjugate eignen sich auf Grundlage der hervorragenden Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und Biofunktionalität für eine Bandbreite biomedizinischer Anwendungen.^[265] Durch die Bildung von multikomponenten Copolymeren mit funktionellen Monomeren können bioaktive supramolekulare Polymere mit hohem Potential in biologischen Anwendungen gebildet werden.^[51-53,265-267] Mit den gewonnenen Erkenntnissen der Peptidamphiphile im wässrigen Medium soll deshalb die Zellaufnahme und Zytotoxizität der Polymere genauer untersucht werden. Um die Zellaufnahme zeigen zu können, wurde auf Konfokalmikroskopie zurückgegriffen. Als relevante Immunzelle wurden Makrophagen der murinen Tumorzelllinie RAW 309 gewählt. Es wurden zunächst Aufnahmen angefertigt, die nur Zellen der Zelllinie enthalten. Diese sind in Abbildung 3.56 exemplarisch dargestellt. Als negative Kontrolle kann gezeigt werden, dass unter den gewählten Bedingungen im grünen Kanal (A) Autofluoreszenz der Zellen aufgenommen werden kann. Der rote Kanal (B) bei höherer Detektionswellenlänge ist aber beinahe vollständig frei von Autofluoreszenz. In Abbildung 3.56 C ist die Hellfeld-Aufnahme der Zellen dargestellt. Die zusammengefügte Aufnahme in D verdeutlicht die detektierte Autofluoreszenz der Zellen im grünen Kanal im Inneren der Zellen. Eine Überlagerung mit Autofluoreszenz aus dem roten Kanal, die zu einer gelben Farbe in der überlagerten Aufnahme führen würde, kann nicht wahrgenommen werden. So stellt der rote Kanal eine geeignete Option der Visualisierung aufgenommener Peptidamphiphile in lebende Zellen dar, die sich klar von der Autofluoreszenz der Zellen unterscheidet.

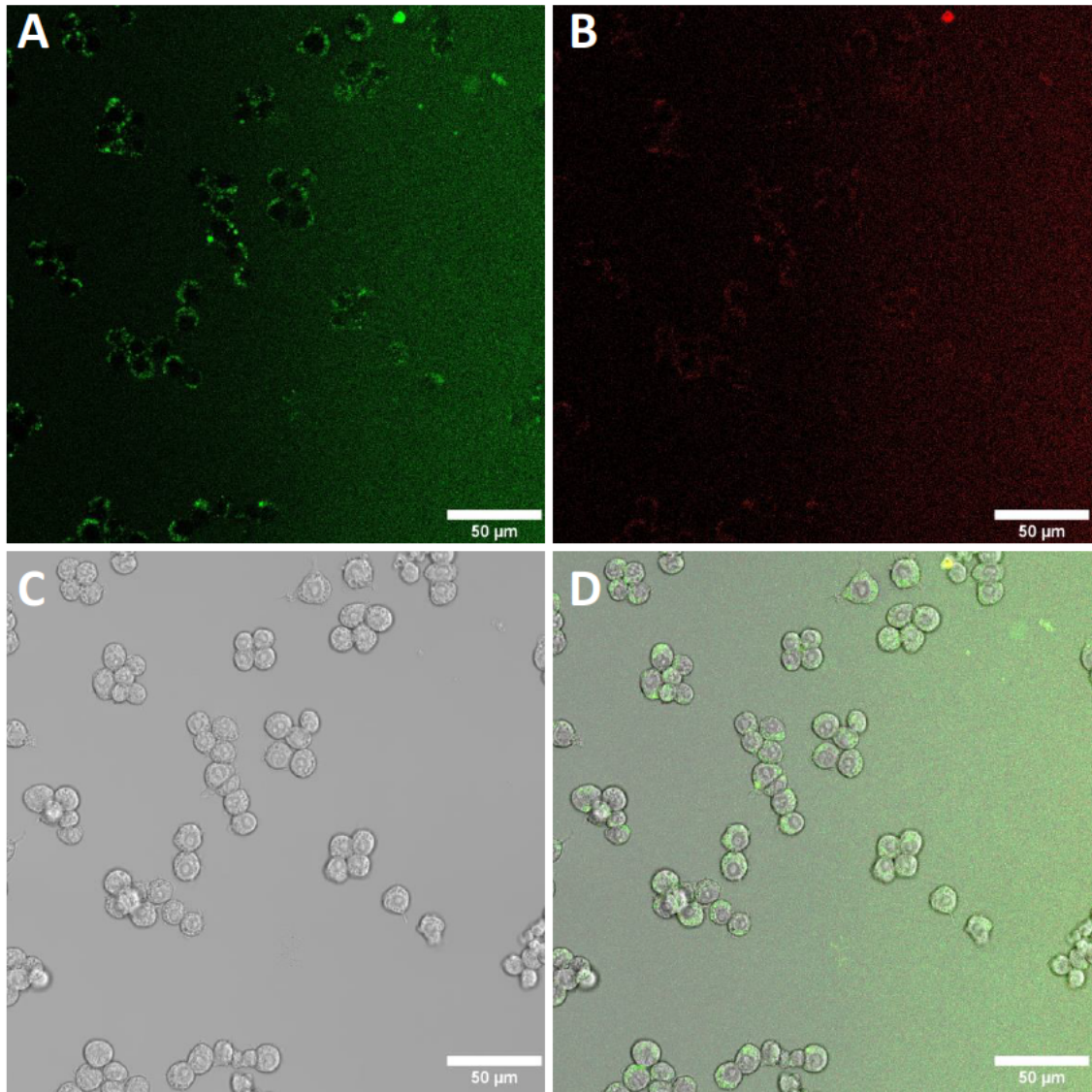


Abbildung 3.56: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Zellen der murinen Tumorzelllinie RAW 309 als Negativ-Kontrollexperiment der Zellaufnahme. A: Aufnahme des grünen Kanals unter Anregung bei $\lambda = 552$ nm und Detektion der Emission im Bereich von 561 bis 629 nm. B: Aufnahme des roten Kanals unter Anregung bei $\lambda = 638$ nm und der Detektion der Emission im Bereich 647 bis 734 nm. C: Hellfeld-mikroskopische Aufnahme der Zellen. D: Überlagerte Aufnahmen der Kanäle A bis C.

Danach wurden die Makrophagen mit der equilibrierten Probe $\text{TEG}^{5\%}\text{Cy3}+5\%\text{Cy5}$ der Konzentration 250 nM inkubiert. Abbildung 3.57 zeigt die Aufnahmen während der Inkubationszeit mit der Probe. Hier können die Nanostäbchen, die in der Lösung diffundieren, dargestellt werden. Diese scheinen in den überlagerten Aufnahmen in D und H nicht colokalisiert vorzuliegen. Dies ist jedoch durch die sequenzielle Aufnahme des grünen und roten Kanals bei der Akquisition zu begründen. Die Stäbchen liegen nicht adsorbiert auf dem Deckgläschenboden vor und diffundieren in Lösung, sodass die Stäbchen zu verschiedenen Zeitpunkten nicht im selben Ort abgebildet werden können.

Während der Inkubationszeit konnte bereits nach wenigen Minuten die Aufnahme der Peptidamphiphile in einem Cluster an Zellen beobachtet werden. Das kann in den Aufnahmen A bis D an der linken Bildseite gezeigt werden. Die Aufnahmen E bis H zeigen den vergrößerten Ausschnitt dieser Zellen. Die Überlagerung der Kanäle in Aufnahme H zeigt, dass die Signale innerhalb der Zellen durch die Colokalisation gelb erscheinen, da sich die Zellen und Vesikel nicht signifikant zwischen den Aufnahmen im grünen und roten Kanal bewegen. Für die frei diffundieren Stäbchen außerhalb der Zellen tritt dies nicht auf. In der Vergrößerung wird auch deutlich, dass die Auflösung der konfokalen Mikroskopie keine Aussage über die Morphologie der aufgenommenen Peptidamphiphile zulässt. Vesikel und Kompartimente in den Zellen sind gewöhnlich nur bis zu 1 μm groß. Die Größe der Makrophage selbst liegt in derselben Größenordnung wie die Länge der abbildbaren Nanostäbchen. Ob in oder auf der Zelle die Peptidamphiphile aggregiert oder molekular gelöst vorliegen, kann hier nicht festgestellt werden.

Andere Zellen in den Aufnahmen A bis D zeigen noch keine Aufnahme in die Zellen. Hier kann nur die geringe Autofluoreszenz des grünen Kanals detektiert werden. Eine Detektion innerhalb der Zellen im roten Kanal kann hier nicht gefunden werden. Der klare Unterschied im roten Kanal zeigt eindeutig die Aufnahme in das Zellcluster oder zumindest die Anlagerung an der Oberfläche der Zellen in diesem Cluster.

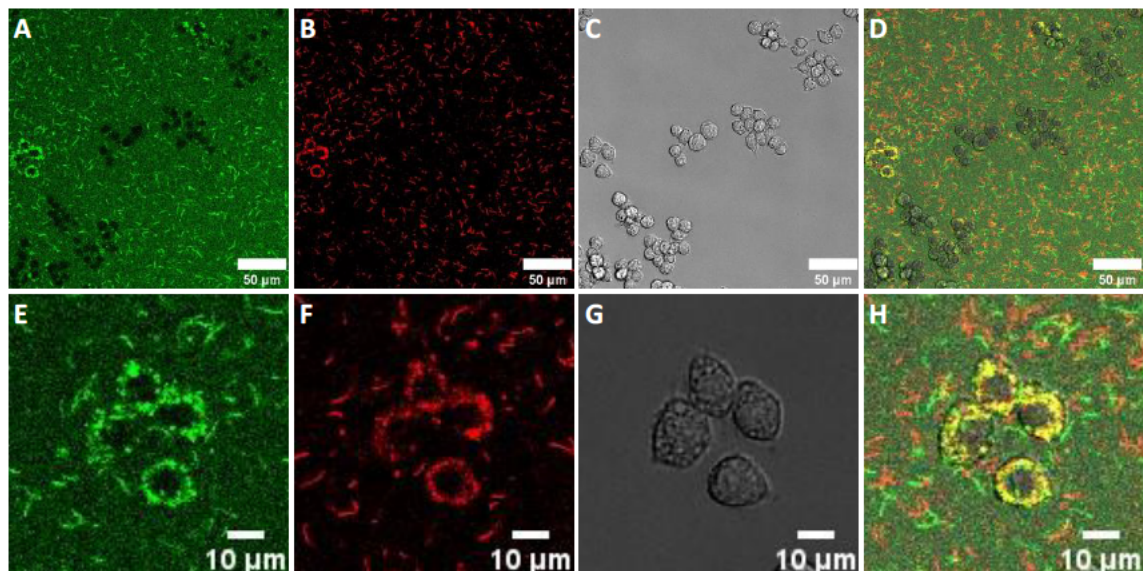


Abbildung 3.57: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Zellen der murinen Tumorzelllinie RAW 309 während der Inkubation der Zellen mit 250 nM der Probe $\text{TEG}^{5\%}\text{Cy3}+5\%}\text{Cy5}$ zur Untersuchung der Zellaufnahme. A: Aufnahme des grünen Kanals unter Anregung bei $\lambda = 552$ nm und Detektion der Emission im Bereich von 561 bis 629 nm. B: Aufnahme des roten Kanals unter Anregung bei $\lambda = 638$ nm und der Detektion der Emission im Bereich 647 bis 734 nm. C: Hellfeldmikroskopische Aufnahme der Zellen. D: Überlagerte Aufnahmen der Kanäle A bis C. Die Aufnahmen E bis H stellen die vergrößerte Region des Zellclusters dar, welche eine Aufnahme der Probe nahelegt.

Zum Beweis der Zellaufnahme wurden nun murine Knochenmark-Makrophagen (BMDM, engl. *bone marrow-derived macrophages*) die zuvor mit den Proben inkubiert wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Die Inkubation und die Durchflusszytometrie wurde von RIEM ATTARIYA durchgeführt. Das Histogramm in Abbildung 3.58 A zeigt die Fluoreszenzintensität der Negativkontrollprobe, die nur BMDM-Zellen ohne Zugabe der Probe enthält. Es wurde der Allophycocyanin (APC)-Kanal der Durchflusszytometrie gewählt, da dieser bei $\lambda = 680$ nm detektiert und ähnlich wie in der Untersuchung der Konfokalmikroskopie das Ergebnis des roten Kanals abbildet. Das hier detektierte Signal der Autofluoreszenz der unbehandelten Zellen wurde als APC-negatives Signal (APC-A-) eingegrenzt. Abbildung 3.58 B hingegen zeigt das Histogramm der Durchflusszytometrie der BMDM, die mit der Probe $\text{TEG}^{5\% \text{Cy}3+5\% \text{Cy}5}$ bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ für zwei Stunden inkubiert wurden. Hier kann eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität detektiert werden. Der Anteil des APC-positiven Signals (APC-A+) beträgt 39,5 % und weist auf die Zellaufnahme der Peptidamphiphile der Probe $\text{TEG}^{5\% \text{Cy}3+5\% \text{Cy}5}$ hin. Zusätzlich wurden die Polymere der Probe $\text{Man}^{5\% \text{Cy}3+5\% \text{Cy}5}$ analog untersucht. Das Histogramm in Abbildung 3.58 C zeigt, dass Peptidamphiphile auf Basis der Triethylenglykolmannosid-Dendrone effizienter von den Makrophagen aufgenommen werden als die Amphiphile der Probe $\text{TEG}^{5\% \text{Cy}3+5\% \text{Cy}5}$. Es wird angenommen, dass die effektive Aufnahme der Polymere durch die Präsentation der Mannose auf der Oberfläche der Nanostäbchen über einen mannoserezeptor-vermittelten Signalweg verbessert wird.^[56]

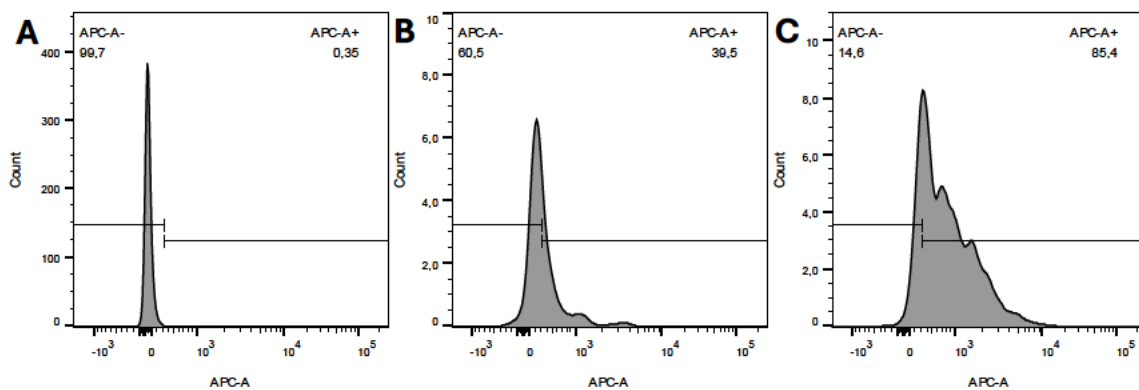


Abbildung 3.58: Histogramme der Durchflusszytometrie der Intensität des Kanals APC ($\lambda = 680$ nm) der zur Ermittlung der Zellaufnahme der Peptidamphiphile eingesetzt wurde. A: Negativkontrollprobe, die ausschließlich die Zellen ohne die Inkubation der Probe enthält. B: Zellen nach Inkubation mit $\text{TEG}^{5\% \text{Cy}3+5\% \text{Cy}5}$ der Konzentration $100 \mu\text{M}$ für zwei Stunden. C: Zellen nach Inkubation mit $\text{Man}^{5\% \text{Cy}3+5\% \text{Cy}5}$ der Konzentration $100 \mu\text{M}$ für zwei Stunden.

Um zuletzt die Zytotoxizität der verwendeten supramolekularen Peptidamphiphile zu testen, wurde ein Kristallviolett-Zytotoxizitätstest von RIEM ATTARIYA durchgeführt. Hier wurde die Zellviabilität der Proben auf die Zellviabilität der unbehandelten Zellen als Negativkontrolle normiert. Das Ergebnis ist im Balkendiagramm in Abbildung 3.59

dargestellt. Die Probe **TEG**^{5%_sCy3+5%_sCy5} zeigt über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich die gleiche Zellviabilität wie die Negativkontrolle. Hier kann keine Zytotoxizität der Peptidamphiphile festgestellt werden. Die Probe **Man**^{5%_sCy3+5%_sCy5} zeigt ebenfalls keine Zytotoxizität. Es kann eine leicht erhöhte Zellviabilität gegenüber der Negativkontrolle festgestellt werden, was eine leichte Erhöhung der Proliferation bei Inkubation mit der Probe **Man**^{5%_sCy3+5%_sCy5} vermuten lässt. Als Positivkontrolle niedriger Zellviabilität wurde eine Inkubation mit einer 20 Vol-% DMSO-Lösung in PBS durchgeführt. Das Positivkontroll-Experiment bestätigt, dass eine verminderte Zellviabilität durch den verwendeten Test korrekt aufgenommen werden kann.

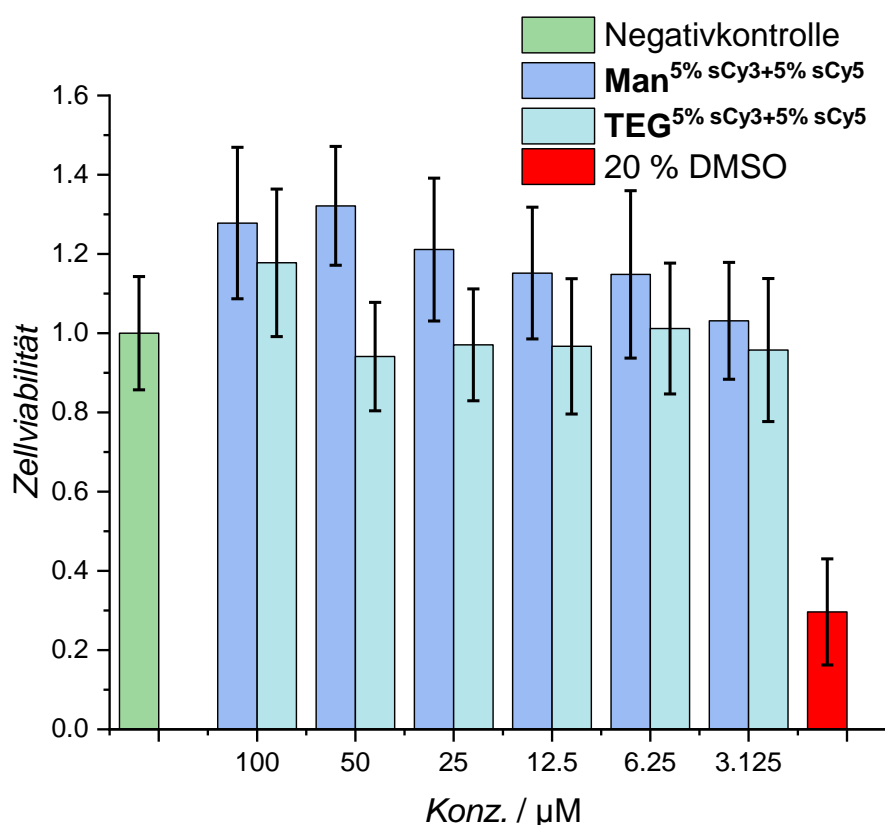


Abbildung 3.59: Zellviabilität der Proben **TEG**^{5%_sCy3+5%_sCy5} und **Man**^{5%_sCy3+5%_sCy5} gegenüber den BMDM, bestimmt durch den Kristallviolett-Zytotoxizitätstest.

Die Verwendung von LSCM und FACS konnte die Zellaufnahme der in dieser Arbeit synthetisierten Peptidamphiphile belegen. Der Kristallviolett-Zytotoxizitätstest zeigt außerdem die geringe Zytotoxizität der Strukturen. Da aber die Auflösung herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie nicht ausreichend ist, um die supramolekularen Polymere in der Zelle zu verfolgen, muss eine andere Methode verwendet werden. Es ist denkbar, dass durch die Verwendung der vorgestellten Methoden AccPbFRET und FLIM die Assemblierung der Peptidamphiphile in Zellen nachgewiesen oder widerlegt werden kann, ohne die Polymerstäbchen in den Aufnahmen auflösen zu können. Hierbei gilt zu untersuchen, ob in den Vesikeln assemblierte Polymerstäbchen vorliegen. FLIM könnte

sogar für den Nachweis der Assemblierung der Peptidamphiphile in lebenden Zellen verwendet werden. Der zeitliche Verlauf der Assemblierung im Inneren der Zelle wäre dabei von besonderem Interesse. Durch die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer oder des FRET könnte untersucht werden, ob sich die Copolymere nach der Aufnahme der Monomere oder kleinerer Oligomere in den Vesikeln bilden oder ob direkt kleine Polymerstäbchen aufgenommen werden.

3.8 Fazit

Dynamik ist ein inhärentes Merkmal supramolekularer Polymere. Es stützt diese responsiven Nanoarchitekturen mit faszinierenden Eigenschaften aus, die sich in vielen Gebieten für unterschiedlichste Anwendungen nutzen lassen. Der Umfang und die Rate des Monomeraustauschs in linearen supramolekularen Polymeren bestimmen die Fähigkeit und die Geschwindigkeit der Anpassung der supramolekularen Polymere auf eine Änderung der Umgebung.^[161] So erlaubt das Verständnis über die Kinetik, die Mechanismen und die Struktur supramolekularer Copolymere das Design dieser vielseitigen Verbindungsklasse. Hierfür sollten in dieser Arbeit funktionalisierte Peptidamphiphile zur Bildung supramolekularer Copolymere synthetisiert werden, um deren Struktur und Dynamik zu untersuchen.

Diskotische Peptidamphiphile auf Basis eines BTA-Kernmotivs, die zur Selbstassemblierung befähigt sind, konnten praktikabel durch zwei Synthesestrategien synthetisiert werden. Durch die Verwendung der Click-Chemie konnte sowohl die dendritische Einheit dieser Peptidamphiphile variabel gestaltet als auch mit unterschiedlichen Sonden versehen werden.

Unter Zuhilfenahme spektroskopischer und verschiedener mikroskopischer Verfahren konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Peptidamphiphile in eindimensionale kolumnar gestapelte supramolekulare Polymere assemblieren. Dabei wurde durch CD-Spektroskopie für das Peptidamphiphil **X-11** ein deutliches thermoresponsives Verhalten durch eine LCST bei circa 60 °C gefunden. Im Vergleich zu dem bekannten Peptidamphiphil **SM^{EG4}** konnten supramolekulare Polymere mit gleichen Strukturmerkmalen angefertigt werden, die aber eine höhere Hydrophobizität aufgrund der zusätzlichen Triazoleinheiten aufweisen. Das führte zu einer geringeren LCST und einer erhöhten Tendenz zur Bündelung von Stäbchen. So konnten lange Stäbchenbündel einer Länge im hohen Mikrometerbereich mit einer deutlich langsameren Dynamik erhalten werden. Durch supraauflösende Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie konnten die Strukturen in einer deutlich erhöhten Auflösung aufgenommen und strukturelle Eigenschaften genauer untersucht werden. So wurden durch dSTORM mikroskopische Aufnahmen individueller Stäbchen am Ende eines Bündels erzeugt, die die Theorie der Zusammenlagerung der Peptidamphiphilnanostäbchen zu Bündeln stützt.

Durch die divergente Synthesestrategie der Peptidamphiphile konnten Verbindungen hergestellt werden, die sich in ihrer Ethylenglykollängenlänge der Dendrone unterscheiden. Bereits durch die Betrachtung von Ethylenglykoldendronen mit zwei bis acht Wiederholungseinheiten konnten die Grenzen der Hydrophobizität und der Hydrophilie bzw. dem sterischen Anspruch der Dendrone aufgezeigt werden. Während die Verbindung mit Diethylenglykoldendron eine zu geringe Wasserlöslichkeit aufwies, ist voraussichtlich die Kombination der Hydrophilie und des sterischen Anspruchs bei einem Octaethylenglykoldendron zu hoch, um lange eindimensionale Nanostäbchen zu bilden.

Mithilfe funktionalisierter Peptidamphiphile konnten farbstoffmarkierte Copolymere angefertigt werden, die in der Probenvorbereitung und Durchführung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung optimiert wurden. So konnte die außerordentliche Länge und Stabilität der Aggregate gezeigt werden. Durch Colokalisationsexperimente wurde die Inkorporation verschiedener Peptidamphiphile in dasselbe Stäbchen gezeigt. Diese Copolymerisation funktioniert für verschieden funktionalisierte Monomere und Peptidamphiphile mit unterschiedlichen Dendronen. So konnte die Morphologie der mikrometerlangen Stäbchen auf Basis des Peptidamphiphils **X-11** auch auf Peptidamphiphile übertragen werden, die als Homopolymer nur winzige Stäbchen oder mizellare Strukturen bilden.

Durch Verwendung von Fluoreszenzmissionsmessungen und Massenspektrometrie konnten zwei Methoden angewandt werden, die die Bestimmung der Halbwertszeit der Austauschkinetik der Monomere zwischen den supramolekularen Polymerstäbchen ermöglichen. Der Vergleich der Methoden zeigte, dass die Verwendung der Farbstoffsonden im FRET-Mischungsexperiment eine untergeordnete Rolle auf die Störung des Polymersystem spielte. Der Vergleich deutet ebenfalls darauf hin, dass die Erhöhung des FRET-Verhältnisses tatsächlich durch die Inkorporation der Bestandteile in dasselbe Stäbchen und nicht durch Zusammenlagerung der Stäbchen verursacht wird. Dieser Fund bestätigt das Ergebnis der Colokalisationsexperimente mittels Konfokalmikroskopie, da hier aufgrund der Auflösung nicht zwischen Stäbchen und Bündeln unterschieden werden konnte.

Ein HDX-MS-Experiment nach unterschiedlicher Ultraschalldauer zeigte die hohe Stabilität der Stäbchen und gibt den Anlass zur Hypothese, dass der Monomeraustausch zwischen den Polymerstäbchen dominiert durch die Polymerisation/Depolymerisation der Stäbchenenden stattfindet. Die hohe Stabilität der Stäbchen wird auch durch die langsame Austauschkinetik und lange Beständigkeit der verdünnten Probelösungen in Mikroskopieexperimenten bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass 30 Minuten Ultraschallbehandlung notwendig war, um die Polymere zu kleineren Stäbchen zu brechen, während in anderen Systemen bereits Unterschiede durch repetitives Pipettieren beobachtet werden können.^[113] Durch lange Ultraschallbehandlung konnte die Austauschkinetik der Monomere beschleunigt werden.

Unter Verwendung von AccPbFRET durch mikroskopische Verfahren konnte der Energietransfer innerhalb der Polymernanostäbchen durch die FRET-Effizienz visualisiert werden. Der Energietransfer tritt in den supramolekularen Copolymeren der donor- und akzeptorfunktionalisierten Peptidamphiphile auf und konnte auf Pixelbasis lokalisiert werden. So konnte er als Indikator für assemblierte supramolekulare Strukturen verwendet werden. Im gleichen Maße wurde die Fluoreszenzlebensdauer in FLIM-Aufnahmen verwendet. Die reduzierte Fluoreszenzlebensdauer eines Donorfarbstoffs in räumlicher Nähe eines Akzeptorfarbstoffs, wie er in assemblierten Copolymeren auftritt, konnte als Visualisierung der eindimensionalen supramolekularen Polymere verwendet werden. Durch diese indirekte Visualisierung assemblierter Donor-Akzeptor-

Copolymere konnten Nanostäbchen nachgewiesen werden, die durch das beugungsbegrenzte Auflösungslimit nicht abgebildet werden können.

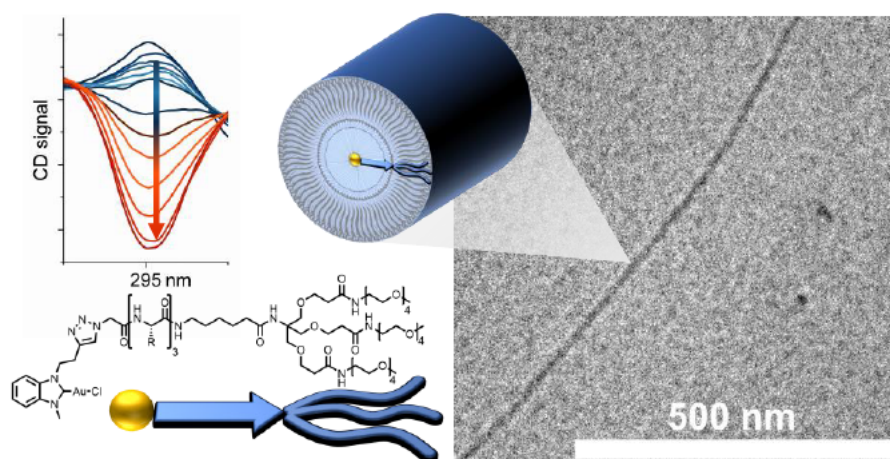
Mittels LSCM und FACS konnte die Zellaufnahme der Peptidamphiphile in Makrophagen der Zelllinie RAW 309 und BMDM bewiesen und visualisiert werden. Ein Zytotoxizitätstest dieser Polymere zeigte eine hervorragende Zellviabilität der verwendeten Zellkulturen. Diese Eigenschaften sowie die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten machen die Peptidamphiphile zu einem aussichtsreichen Kandidaten in der Anwendung vollsynthetischer supramolekularer Biomaterialien.^[52,53,266,268] Die erarbeiteten Methoden des AccPbFRET und FLIM stellen aussichtsreiche Methoden zur weiteren Untersuchung der Zellaufnahme und des Assemblierungsverhaltens supramolekularer Polymere in Zellen dar. Sie ermöglichen die Auswertung des Assemblierungsstatus der supramolekularen Strukturen, ohne diese auflösen zu müssen.

4 Kinetik der Assemblierung von Au(I)-Metallopeptidamphiphilen

Teile dieses Kapitels sind publiziert unter^[232]:

„Impact of sample history and solvent effects on pathway control in supramolecular polymerization of Au(I)-metallopeptide amphiphiles”

M. Thomas, V. Lewe, J. Kölsch, M. Urschbach, J. Erlenbusch, O. S. Stach, P. Besenius,
Polym. Chem. **2023**, *14*, 1888–1892.



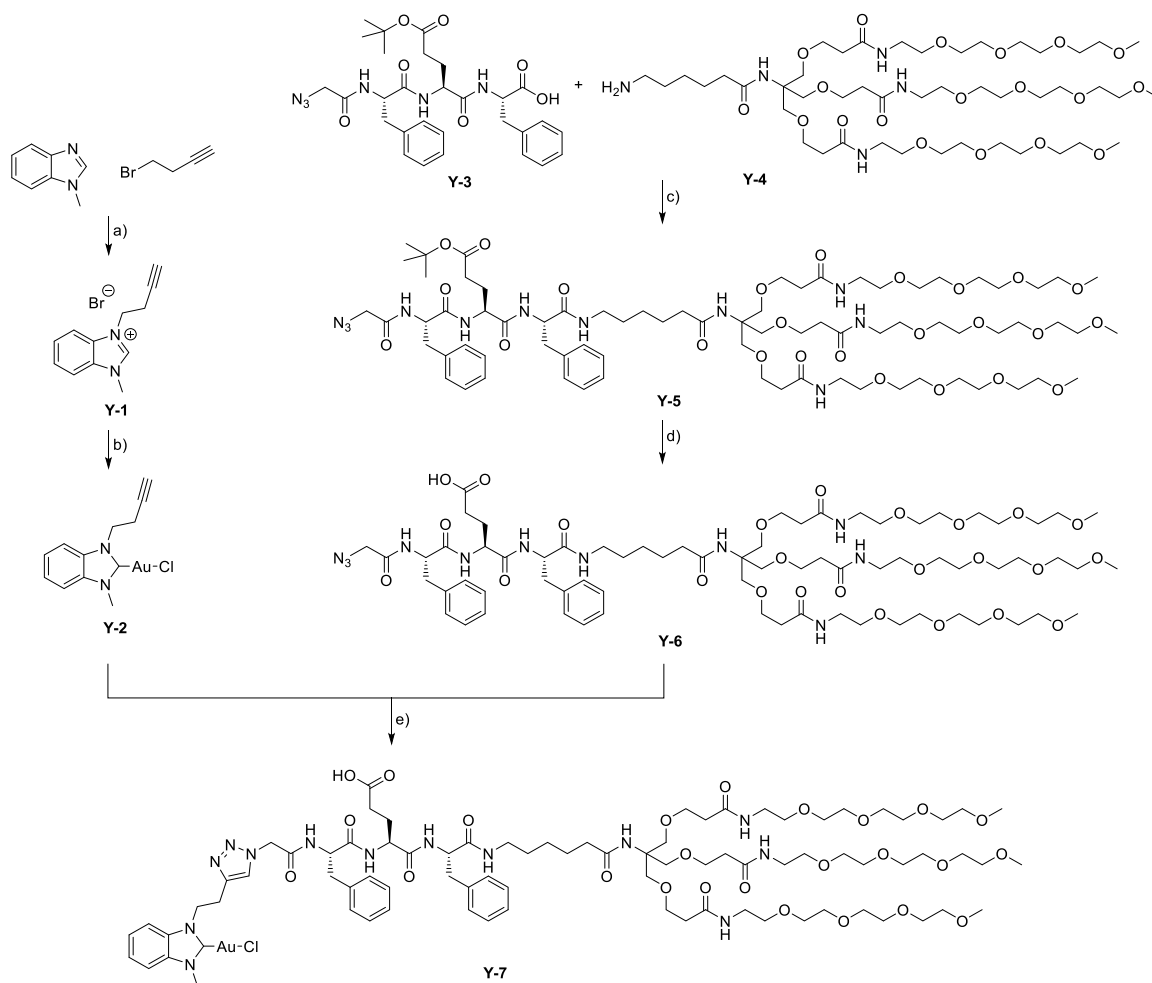
Die genaue kinetische Betrachtung supramolekularer Polymerisationen offenbart wertvolle Informationen über die auftretenden Mechanismen und die Assemblierungspfade der resultierenden Strukturen. Diese sind essenziell für die Entwicklung der supramolekularen Synthese und der Probenvorbereitungsprotokolle. Der Einfluss veränderter Prozessparameter wie Temperatur, Konzentration, Lösungsmittel und Lösungsmittelzusammensetzung auf die supramolekulare Polymerisation ist in zahlreichen Studien untersucht.^[269–277] Die Präparation der molekularen Spezies vor der supramolekularen Polymerisation ist hingegen in der Regel unzureichend protokolliert und selten systematisch erforscht. Dabei sind die Probenvorbereitungsbedingungen, die Probenreinheit und speziell die Isolationsbedingungen von großer Bedeutung.^[278,279] Ein besonderer Fokus der kinetischen Untersuchung liegt deshalb auf dem Einfluss der Isolation und der Probenvorbereitung auf die Kinetik der supramolekularen Polymerisation und deren Pfade für das untersuchte Peptidamphiphil. Daher soll neben der Dynamik im Gleichgewicht auch die Polymerisationskinetik von supramolekularen Peptidamphiphilen untersucht werden.

Die in Kapitel 3 gezeigten BTA-basierten Peptidamphiphile sind aufgrund der enormen Triebkraft der Assemblierung in Wasser für die Verfolgung der Kinetik nicht zugänglich. Deshalb wurde ein lineares Peptidamphiphil verwendet, das sich in der Assemblierungsfähigkeit einstellen lässt. Die Einführung einer Glutaminsäure in die Peptidsequenz des Amphiphils sorgt für eine pH-Responsivität der Struktur. Die reversible Deprotonierung führt eine negative Ladung in das Rückgrat des Peptids ein, die eine Repulsion der Peptidamphiphile bewirkt. So lassen sich durch den pH-Wert der Lösung die attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen, die für die Bildung einer Überstruktur verantwortlich sind, präzise einstellen. Es resultiert die Anpassbarkeit der Triebkraft und der Geschwindigkeit der supramolekularen Polymerisation. Neben der Glutaminsäure wurde ein Gold(I)-NHC-Komplex in die Struktur eingebettet. Der NHC-Komplex bietet eine hohe Reichweite potenzieller Anwendungen durch seine lumineszenten^[280,281], anti-proliferativen^[282,283] und katalytischen Eigenschaften^[284,285]. Im Folgenden eignet er sich aber vor allem als intrinsische Sonde des Peptidamphiphils, die im Inneren der hydrophoben Strukturelemente des supramolekularen Polymers ein charakteristisches CD-Signal erzeugt.

4.1 Synthese des Au(I)-Peptidamphiphils

Für die Synthese eines funktionalisierbaren NHC-Au(I)-Komplexes wurde auf die Synthesestrategie von VEIGE *et al.*^[286] zurückgegriffen, die von LEWE^[287] modifiziert wurde. Die Syntheseübersicht ist in Schema 4.1 dargestellt. In dieser konnte 1-Methylbenzimidazol mit 4-Brom-1-butin in einer nukleophilen Substitution umgesetzt werden, um das alkinmodifizierte Benzimidazoliumsalz **Y-1** zu erhalten. Der NHC-Au(I)-Komplex konnte durch eine modifizierte Synthesevorschrift von LEWE durch Transmetallierung des Liganden aus dem Ag(I)-Komplex erhalten werden.^[174,287] Der NHC-Ag(I)-Komplex konnte *in situ* mit Ag₂O als milde Base hergestellt werden und mit Chlorido(Tetrahydrothiophen)gold(I) ((tht)Au(I)Cl) in das Au(I)-Carben **Y-2** überführt werden. Durch die eingeführte Alkinfunktionalität konnte eine Konjugation durch CuAAC durchgeführt werden. Das Peptidamphiphil wurde ausgehend vom Newkome-ähnlichen Dendron **Y-4** und der pH-responsiven Peptidsequenz Phe-Glu-Phe geplant. Das Peptid dieser Sequenz wurde durch SPPS hergestellt und in einer weiteren Kupplung mit Azidoglycin (**Y-8**) erweitert, um Verbindung **Y-3** zu erhalten. Analog zur Synthese des Peptids **X-8** in Kapitel 3.4 konnte die Abspaltung von der festen Phase durch eine 2-Chlortrityl-Modifikation des Harzes milde mit 20 % TFE in DCM durchgeführt werden, ohne die *tert*-Butyl-Schutzgruppe der Glutaminseitenkette zu entfernen. Das NEWKOME-ähnliche Dendron **Y-4** wurde von OLIVER STACH zur Verfügung gestellt. Dieses konnte direkt in einer PyBOP-vermittelten Amidierung mit dem Peptid **Y-3** zum Peptidamphiphil **Y-5** umgesetzt werden. Nun konnte die *tert*-Butyl-Schutzgruppe in TFA:H₂O (1:1) bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Stunden entfernt werden. Das resultierende Peptidamphiphil **Y-6** konnte in einem letzten Schritt durch CuAAC mit dem NHC-Komplex **Y-2** konjugiert werden. Die Click-Reaktion wurde unter Inertgas und Lichtausschluss mit entgasten Lösungsmitteln bei 45 °C durchgeführt. Dennoch konnte sofort die Bildung von Goldnanopartikeln beobachtet werden. Deshalb wurde der Umsatz der Reaktion durch analytische HPLC verfolgt und nach 7,5 h bei vollem Umsatz abgebrochen. Dazu wurde THF bei vermindertem Druck und 25 °C entfernt und die übrige wässrige Suspension gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in DMSO aufgenommen und die Nanopartikel durch Zentrifugation entfernt.

Kinetik der Assemblierung von Au(I)-Metallopeptidamphiphilen



Schema 4.1: Syntheschema der Darstellung des Au(I)-Peptidamphiphils **Y-7**. a) Toluol, 110 °C, 72 h, **64** %, b) 1) Ag₂O, DCM, RT, 68 h, 2) (tht)Au(I)Cl, NaCl, RT, 2,5 h, **58** %, c) PyBOP, HOBt·H₂O, DMF, 0 °C – RT, 18 h, **79** %, d) TFA:H₂O, 1:1, RT, 2 h, **52** %, e) CuSO₄·5H₂O, TBTA, Natriumascorbat, THF:H₂O, 1:1, 45 °C, 7 h, **47** %.

Zur Reinigung des Au(I)-Peptidamphiphils wurde semi-präparative HPLC verwendet. Da der NHC-Komplex unter sauren Bedingungen nur begrenzt stabil ist, wurde NH₄HCO₃-Puffer (1 mM, pH 7,9) und Acetonitril (CH₃CN) als Eluenten für die Chromatographie verwendet. Der leicht basische pH-Wert sorgt ebenfalls für die Deprotonierung der Glutaminsäure des Au(I)-Peptidamphiphils und vermeidet die Aggregation der Verbindung während der Reinigung durch Coulomb-Abstoßung der Carboxylationen im Wasser-Acetonitril-Gemisch. Die Co-Elution von Verunreinigungen durch Aggregation während der Chromatographie muss zwingend vermieden werden. Verunreinigungen in der Synthese stammen oftmals von den Edukten oder Nebenprodukten dieser. Da sie zum Substrat strukturell verwandt sind, sind diese oftmals schwer abzutrennen oder werden in der gängigen Analytik übersehen. Im Polymerisationsprozess des Peptidamphiphils können strukturell verwandte Verunreinigungen potenziell in die Polymerkette eingebaut werden und diese destabilisieren oder aber verstärken. Dies beeinflusst die Polymerisationskinetik maßgeblich und gilt vermieden zu werden. Das analytische HPLC-Chromatogramm nach der Reinigung ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

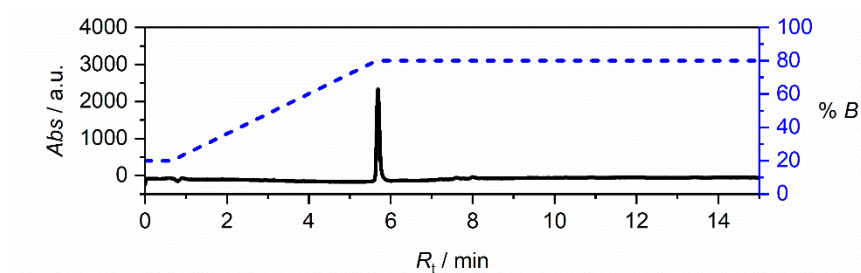


Abbildung 4.1: Analytisches HPLC-Chromatogramm nach Aufreinigung des Au(I)-Peptidamphiphils **Y-7**. Detektion durch Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 215$ nm. Als Eluent A wurde 1 mM NH_4HCO_3 in Milli-Q Wasser und als Eluent B wurde 95 % CH_3CN mit 5 % Milli-Q Wasser verwendet.

Die Produktfraktionen der HPLC wurden gesammelt, vereinigt und lyophilisiert. So wurde das Wasser, Acetonitril sowie NH_4HCO_3 entfernt, sodass die reine Verbindung **Y-7** als farbloses Lyophilisat erhalten werden konnte.

4.2 Evaluierung der Assemblierungskinetik

Als Methode zur Verfolgung der Polymerisationskinetik wurde die CD-Spektroskopie gewählt. Wie für die Peptidamphiphile **X-11** und **X-22** wurden für **Y-7** charakteristische CD-Banden gefunden, deren Bildung mit der Zeit verfolgt werden konnte.

Hierfür wurde zunächst das Lyophilisat der Verbindung in 10 mM Phosphatpuffer (PB) gelöst und sofort CD-Spektren gemessen. Die Spektren für die Lösung einer Konzentration von $c_m = 400 \mu\text{M}$ sind in Abbildung 4.2 A dargestellt. Hier konnte die Evolution der CD-Banden mit der Zeit aufgenommen werden. Es wurden negative Banden bei $\lambda = 230 \text{ nm}$, $\lambda = 242 \text{ nm}$, $\lambda = 286 \text{ nm}$ und $\lambda = 295 \text{ nm}$ sowie positive Banden bei $\lambda = 258 \text{ nm}$ und $\lambda = 275 \text{ nm}$ aufgezeichnet. Das prominenteste Signal stellt hierbei die negative Bande bei $\lambda = 295 \text{ nm}$ dar, die wahrscheinlich auf den NHC-Komplex zurückzuführen ist. Die Ausbildung des Signals dieser Wellenlänge wurde zur Berechnung des Polymerisationsgrads α verwendet. Überraschenderweise zeigte sich, dass die Polymerisation mit dieser Probenvorbereitung selbst bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$ sehr schnell ablief. Der erste gemessene Datenpunkt zeigte bereits einen Polymerisationsgrad von $\alpha = 0,52$. Es wird vermutet, dass bei dieser Polymerisation ein schnelles Wachstum durch Impfkette auftritt.

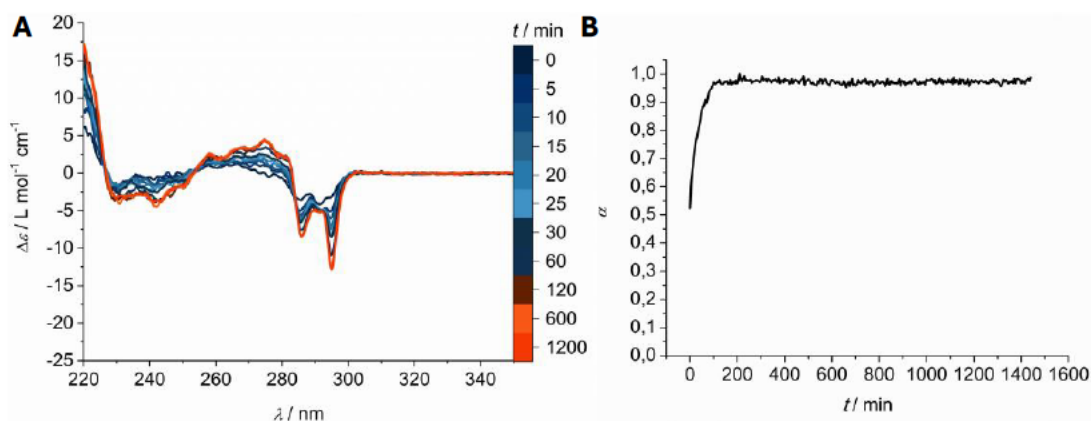


Abbildung 4.2: Kinetische Verfolgung der Polymerisation von **Y-7** in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$ einer Konzentration von $400 \mu\text{M}$ nach dem Lösen des Lyophilisats aus $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). A: CD-Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten. B: Polymerisationsgrad α der Polymerisation mit der Zeit t .

Um die Überführung des Peptidamphiphils in einen molekularen Zustand vor der Polymerisation zu untersuchen, wurden weitere CD-Experimente durchgeführt. Ein molekular gelöster Zustand des Monomers ohne das Vorliegen bereits zuvor gebildeter Präaggregate ist für die korrekte Evaluierung der Polymerisation unerlässlich. Zunächst wurde dafür die pH-Responsivität unter den Bedingungen der Produktaufreinigung untersucht. Hierfür wurden CD-Spektren des Peptidamphiphils **Y-7** in einer Lösungsmittelmischung aus $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, V:V) der Konzentration $c_m = 400 \mu\text{M}$ bei

verschiedenen pH-Werten gemessen. Durch einfaches Lösen des Substrats wurde ein pH-Wert von 6,18 erhalten. Das CD-Spektrum (Abbildung 4.3 A) bei diesem pH-Wert zeigt bereits charakteristische Signale, die auf gebildete supramolekulare Polymere hindeuten. Interessanterweise wurden positive Banden bei $\lambda = 286$ nm und $\lambda = 295$ nm sowie negative Banden bei $\lambda = 227$ nm, $\lambda = 240$ nm, $\lambda = 270$ nm, $\lambda = 282$ nm und $\lambda = 298$ nm erhalten. Diese CD-Signale entsprechen zum Teil denen der Probe in 10 mM PB (Abbildung 4.2 A) mit umgekehrtem Vorzeichen. Die Lösung wurde durch Zugabe von wässriger 1 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 12,17 gebracht. Unter den basischen Bedingungen konnte kein signifikantes CD-Signal mehr für die Probelösung gemessen werden. Dies kann auf die repulsiven Coulomb-Wechselwirkungen der Carboxylationen der Glutaminsäurereste zurückgeführt werden. Der pH-Wert der Lösung wurde mit wässriger 0,1 M HCl-Lösung schrittweise verringert und CD-Spektren gemessen. Bei niedrigen pH-Werten bildeten sich die charakteristischen CD-Banden wieder aus, was der erneuten Formation der geordneten supramolekularen Polymere zugeschrieben werden kann. Wird das CD-Signal bei $\lambda = 295$ nm gegen den pH-Wert aufgetragen, kann der Übergang bei circa pH = 6 gefunden werden (Abbildung 4.3 B). Die Abweichung des apparenten pKs-Werts gegenüber der isolierten Aminosäuren kann in supramolekularen Polymeren beobachtet werden und wird voraussichtlich durch die Aggregation verursacht.^[46] Wurde die pH-Responsivität in wässriger Lösung ohne den Anteil eines organischen Lösungsmittels durchgeführt, konnten erneut negative Banden bei $\lambda = 284$ nm und $\lambda = 292$ nm aufgenommen werden. Erstaunlicherweise konnte selbst bei einem pH-Wert von 11,36 keine Reduktion des CD-Signals festgestellt werden (Abbildung 4.3 C). Dies kann entweder durch eine hohe Stabilität der resultierenden Strukturen oder durch eine kinetische Barriere in Abwesenheit organischer Lösungsmittel auftreten. Zur Überprüfung wurde zunächst eine 200 μ M Lösung von Verbindung **Y-7** in H₂O bei pH = 12,04 gemessen (Abbildung 4.3 D, schwarz). Diese Probe zeigte analog zur 400 μ M Lösung das Auftreten charakteristischer Signale. Daraufhin wurde eine 200 μ M Lösung von **Y-7** in CH₃CN hinzugefügt, um eine 200 μ M Lösung in einem Gemisch H₂O:CH₃CN (1:1, V:V) bei pH = 12,04 zu erhalten. Durch die Zugabe des organischen Lösemittels konnte im CD-Spektrum kein Signal mehr gefunden werden (Abbildung 4.3 D, rot). Anschließend wurde der CH₃CN-Anteil bei 120 mbar und 40 °C entfernt und die Probe auf das vorherige Volumen mit H₂O aufgefüllt (Abbildung 4.3 D, blau). Beim Entfernen des organischen Lösungsmittels kehrte das CD-Signal wieder zurück. Das Experiment zeigt, dass sich supramolekulare Polymere von **Y-7** in Wasser bei einem hohen pH-Wert voraussichtlich nicht in einem kinetisch gefangenen Zustand befinden, da die Ausbildung des charakteristischen CD-Signals aus dem molekular gelösten Zustand nach dem Entfernen des organischen Lösemittelanteils wieder stattfindet. Es widerlegt außerdem die Vermutung, dass die Aggregate nur noch vorhanden sind, weil die Glutaminsäurereste nicht für die Base zugänglich sind und vor der Deprotonierung geschützt werden. Findet die Deassemblierung der Struktur in CH₃CN:H₂O (1:1, V:V) durch die Coulomb-Abstoßung der Carboxylate statt, muss die Struktur der supramolekularen Polymere in Wasser ohne organisches Lösungsmittel trotz der Abstoßung stabil sein.

Kinetik der Assemblierung von Au(I)-Metallopeptidamphiphilen

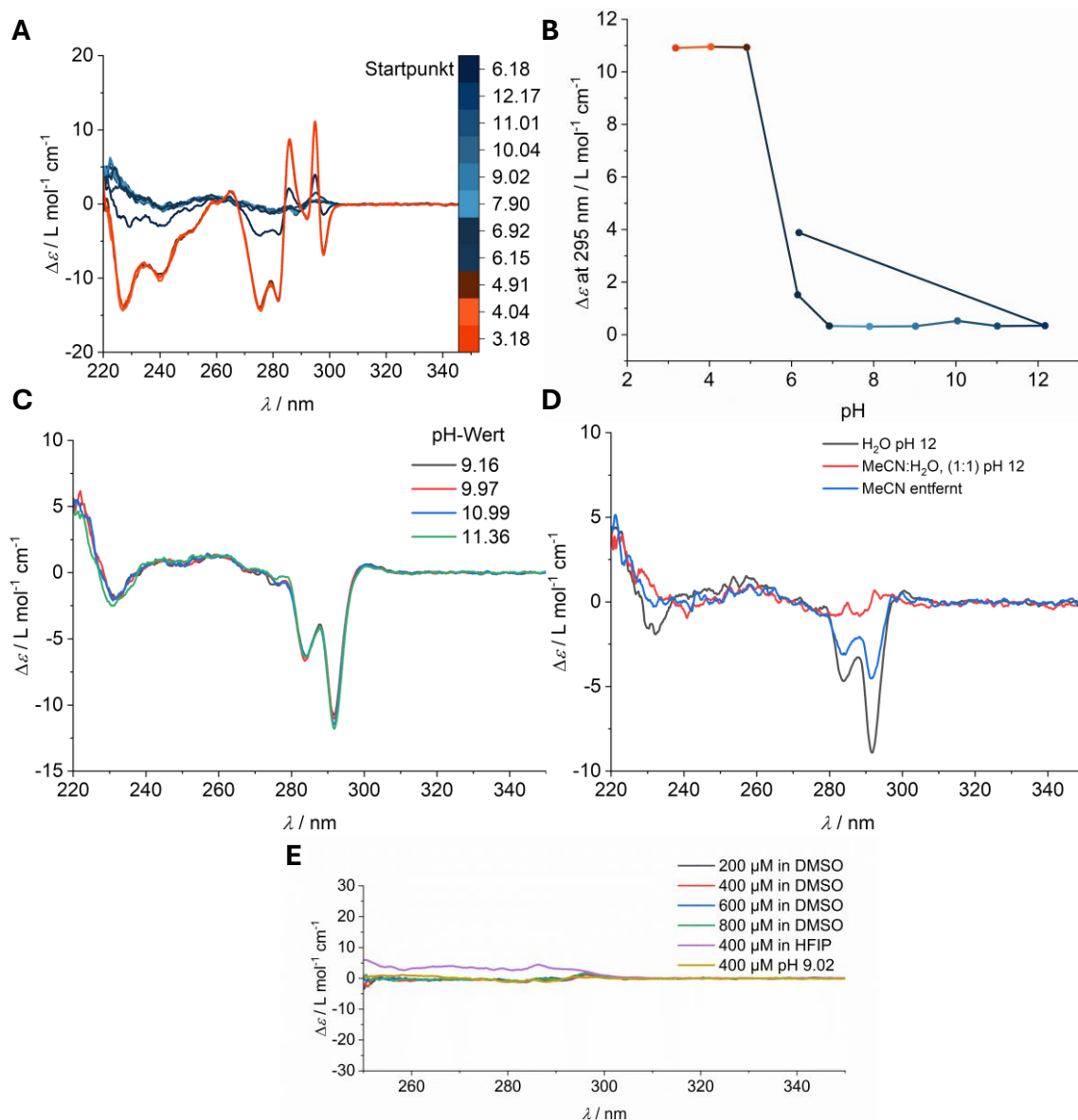


Abbildung 4.3: A: CD-Spektren einer 400 μM Lösung von **Y-7** in $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) bei verschiedenen pH-Werten. B: Auftragung des CD-Signals bei $\lambda = 295 \text{ nm}$ gegen den pH-Wert der Lösung. C: CD-Spektren einer 400 μM Lösung von **Y-7** in H_2O bei verschiedenen pH-Werten. Ohne organischen Lösungsmittelanteil kann keine Veränderung des CD-Signals beobachtet werden. D: CD-Spektren einer 200 μM Lösung von **Y-7** in H_2O vor der Zugabe von CH_3CN , nach der Zugabe und nach dem Entfernen des CH_3CN -Anteils. E: CD-Spektren der Lösung von **Y-7** in verschiedenen Konzentrationen und Lösungsmitteln zum Nachweis des molekular gelösten Zustands der Verbindung.

Das Experiment zeigt, dass die supramolekularen Polymere für Verbindung **Y-7** nicht ohne den Zusatz von organischen Lösemitteln in den molekular gelösten Zustand überführt werden können. Die Probe wurde zusätzlich in DMSO als H-Brückenakzeptor und in HFIP als H-Brückendonator untersucht. In Abbildung 4.3 E werden die CD-Spektren der Lösungen verschiedener Konzentrationen gezeigt. Die Abwesenheit

charakteristischer Signale deutet auf das Vorliegen eines molekular gelösten Zustands der Monomere von Verbindung Y-7 hin.

Um eine supramolekulare Polymerisation aus dem molekular gelösten Zustand zu gewährleisten, wurde die Probe durch das Verdünnen einer konzentrierten HFIP-Lösung von Y-7 mit dem hundertfachen Volumen von 10 mM PB untersucht. Das erhaltene CD-Signal für diese Probenvorbereitung änderte sich mit der Zeit kaum (Abbildung 4.4 A). Durch eine außerordentlich schnelle Bildung des supramolekularen Polymers konnte der zeitliche Verlauf des Polymerisationsgrads nicht in vollem Umfang verfolgt werden. Der erste gemessene Datenpunkt zeigte bereits einen Polymerisationsgrad von $\alpha = 0,88$ (Abbildung 4.4 B). Es ist bekannt, dass fluoridierte Alkohole in der Lage sind peptid- und proteinspezifische Strukturen zu stabilisieren, besonders in geringen Anteilen in Mischungen mit Wasser.^[288-291] Es wird vermutet, dass die Anlagerung der Alkohole zur Abschwächung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Peptiden und zur Verstärkung der gerichteten polaren Wechselwirkungen wie der H-Brücken führt.^[289] Diese Annahme könnte die außerordentliche Polymerisationsgeschwindigkeit erklären. Der Effekt der Stabilisation wird dem Clustern der sterisch anspruchsvollen Alkohole zugesprochen, welches mikroskopisch eine lokale hydrophobe Umgebung schafft.^[291]

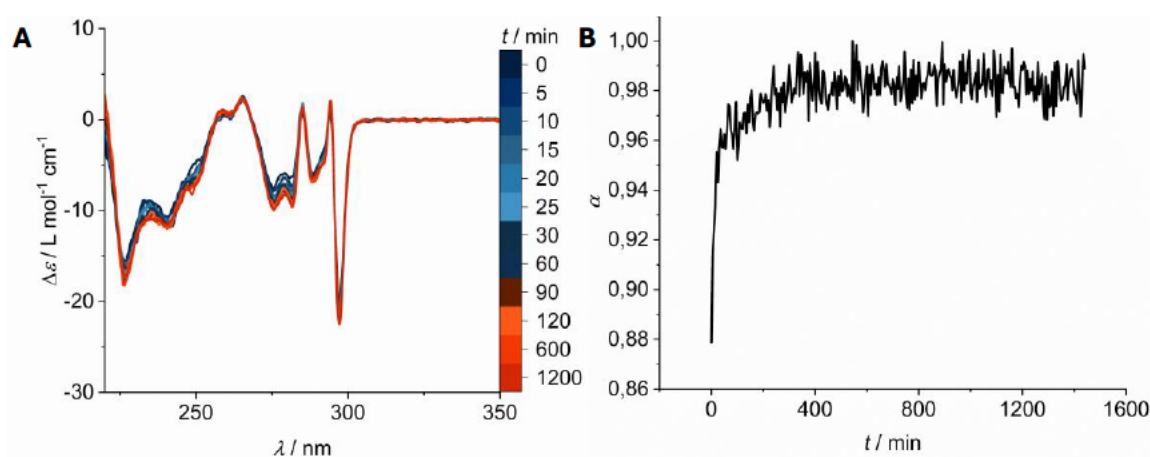


Abbildung 4.4: Kinetische Verfolgung der Polymerisation von Y-7 in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 5 °C einer Konzentration von 400 μM nach der Verdünnung einer 40 mM Lösung in HFIP. A: CD-Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten. B: Polymerisationsgrad α der Polymerisation mit der Zeit t .

TEM-Aufnahmen dieser Verbindungen wurden von [REDACTED] und [REDACTED] angefertigt. Die morphologische Untersuchung der gebildeten Polymere des Au(I)-Peptidamphiphils Y-7 in 10 mM Phosphatpuffer mit 1 Vol.% HFIP-Anteil zeigte die Bildung von separierten Nanostäbchen, die sich nicht zu Clustern zusammenlagern oder bündeln. Die durchschnittliche Länge der Nanostäbchen beträgt lediglich $l_n = 111$ nm ($l_w = 161$ nm, $\text{D} = 1,45$, $n = 691$). Außerdem steht die geringe Tendenz zur lateralen Aggregation und die Separation der eindimensionalen Stäbchen im Kontrast mit den Aggregaten, die in den folgenden Fällen für die Polymere von Y-7 gefunden wurden (vgl. Abbildung 4.7). Die erhaltene Morphologie könnte ebenfalls mit der Mikroheterogenität

des Lösungsmittelgemischs und der daraus folgenden Stabilisierung erklärt werden. Die deutliche Beschleunigung der Polymerisationsgeschwindigkeit und die gefundene Morphologie verdeutlicht, dass selbst geringe Lösungsmittelanteile nicht vernachlässigt werden können.

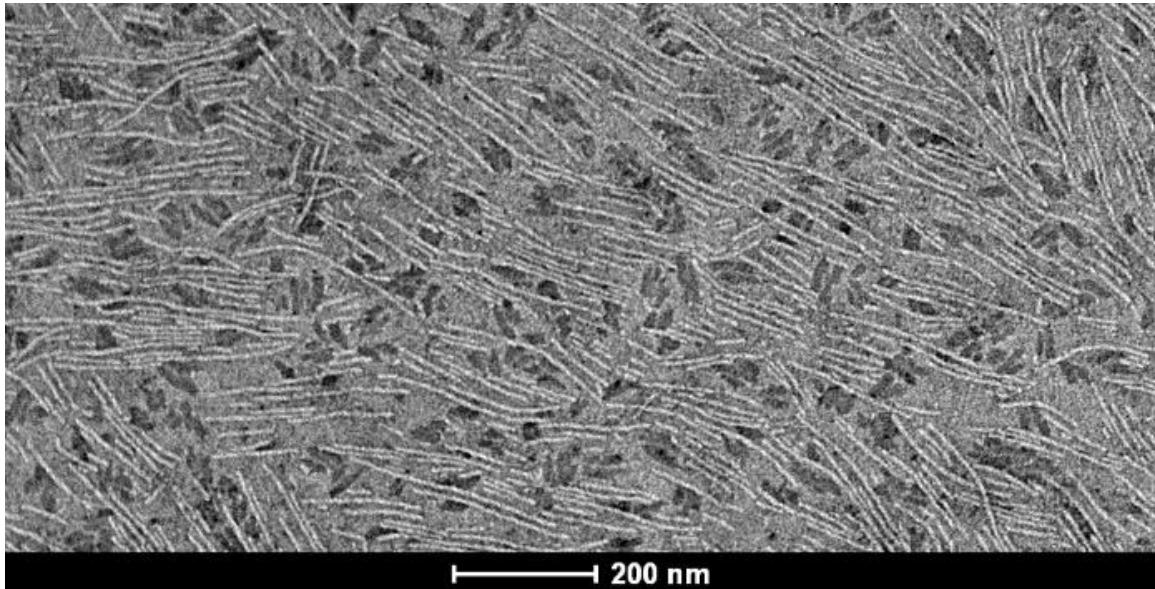


Abbildung 4.5: TEM-Aufnahme einer 400 μM Lösung des Au(I)-Peptidamphiphils Y-7 in 10 mM Phosphatpuffer mit 1 Vol.% HFIP-Anteil. Die kürzeren, räumlich separierten Nanostäbchen besitzen eine Längenverteilung von $l_n = 111$ nm, $l_w = 161$ nm, $\text{D} = 1,45$ ($n = 691$).

Die Kinetikmessung wurde auch ausgehend von der DMSO-Lösung von Y-7 vorgenommen. Wird diese ebenfalls hundertfach verdünnt, kann im Gegensatz zu HFIP eine langsame Polymerisation verfolgt werden. In Abbildung 4.6 ist der Verlauf der CD-Spektren während der Polymerisation abgebildet. Die Verfolgung der Kinetik wurde für Lösungen der Konzentration 200 μM (A), 400 μM (B), 600 μM (C) und 800 μM (D) durchgeführt. Erneut konnte die Bildung negativer Banden bei $\lambda = 286$ nm und $\lambda = 295$ nm sowie positiven Banden bei $\lambda = 258$ nm und $\lambda = 275$ nm beobachtet werden. Unter der Annahme eines vollständig polymerisierten Zustands bei der Sättigung des aufgenommenen CD-Signals bei $\lambda = 295$ nm kann der Polymerisationsgrad α nach Gleichung (6.3) bestimmt werden (vollständige Durchführung in Kapitel 6.1.17). Durch eine logistische Regression des Polymerisationsgrads in Abbildung 4.6 E durch Gleichung (6.4) konnte die Halbwertszeit der Polymerisation t_{50} erhalten werden. Die Halbwertszeit t_{50} beschreibt die Zeit, in der 50 % der finalen Polymerkonzentration $M(t)$ erreicht ist. Durch die konzentrationsabhängige Messung der Polymerisationskinetik konnte das Skalierungsverhalten in der doppellogarithmischen Auftragung von t_{50} gegen die Monomeranfängskonzentration c_m untersucht werden. Die Auftragung in Abbildung 4.6 E zeigt jedoch ein nahezu konzentrationsunabhängiges Skalierungsverhalten.

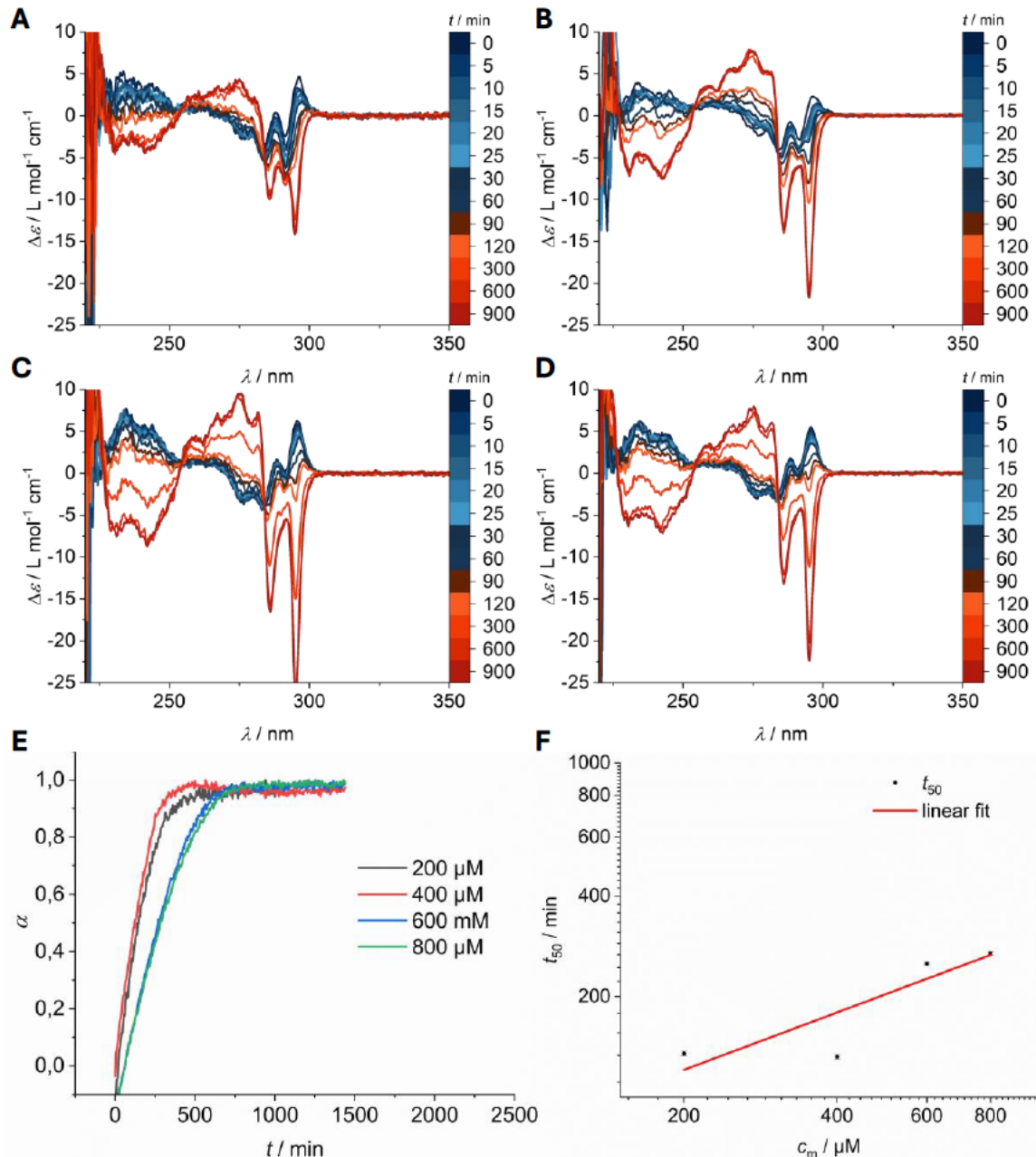


Abbildung 4.6: Kinetische Verfolgung der Polymerisation von Y-7 in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 5 °C verschiedener Konzentrationen nach der Verdünnung (99:1) einer Lösung in DMSO mit 10 mM PB. CD-Spektren der Konzentration 200 μM (A), 400 μM (B), 600 μM (C) und 800 μM (D) zu verschiedenen Zeitpunkten. E: Polymerisationsgrad α der Polymerisation mit der Zeit t . F: Doppellogarithmische Auftragung der Halbwertszeiten der Aggregation t_{50} gegen die Monomerkonzentration c_m . Die lineare Anpassung der Datenpunkte ist in Rot dargestellt.

Die Untersuchung der Morphologie der erhaltenen supramolekularen Polymere durch TEM zeigt zum Teil kurze Nanostäbchen, die separiert vorliegen. Die meisten gefundenen Polymere sind jedoch lange, lateral zu Bündeln zusammengelagerte Nanostäbchen, deren Länge über den Bildausschnitt hinausgeht. Die TEM-Aufnahmen dieser Nanostäbchen

und Bündel ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Die Länge der Aggregate geht über 1 μm hinaus.

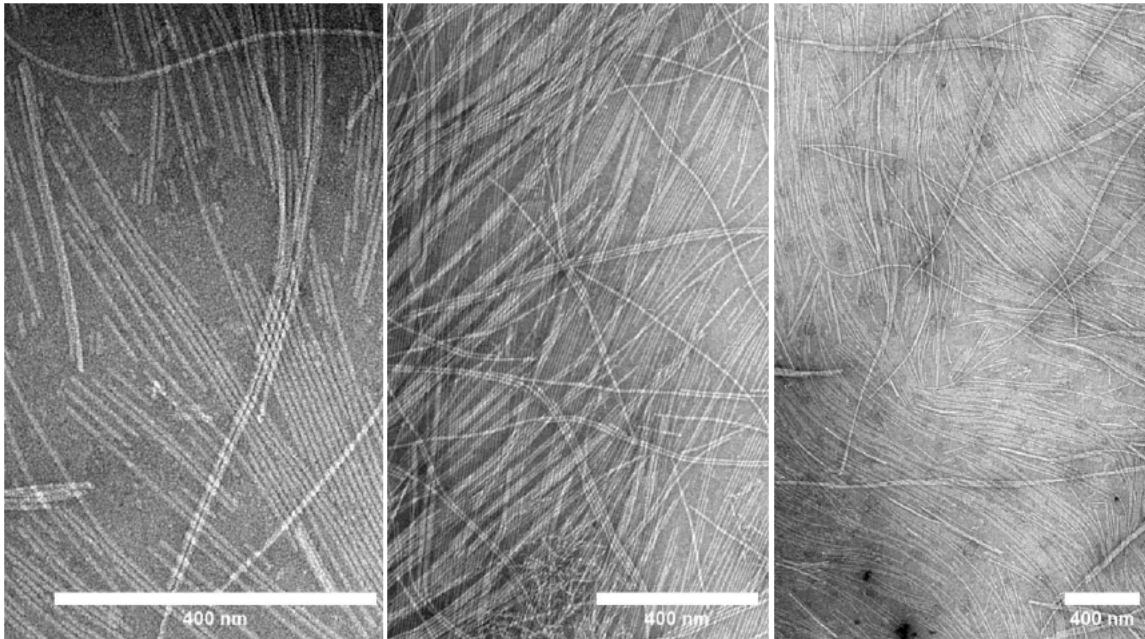


Abbildung 4.7: TEM-Aufnahmen einer 400 μM Lösung des Au(I)-Peptidamphiphils Y-7 in 10 mM Phosphatpuffer mit 1 Vol.% DMSO-Anteil mit unterschiedlicher Vergrößerung. Während vereinzelt kürzere, räumlich separierte Nanostäbchen gefunden werden können, bildet der Großteil der Nanostäbchen lange, zu Bündeln zusammengelagerte Stäbchen.

Wurde die Kinetik der Polymerisation hingegen verfolgt, nachdem die Lösung von Y-7 in DMSO vollständig lyophilisiert und in 10 mM PB aufgenommen wurden, konnte die konzentrationsabhängige Kinetik in Abbildung 4.8 erhalten werden. In der Polymerisation durch diese Probenvorbereitung konnten zu Beginn negative Banden bei $\lambda = 282 \text{ nm}$, $\lambda = 291 \text{ nm}$ und $\lambda = 298 \text{ nm}$ erhalten werden, die in die negativen Signale bei $\lambda = 286 \text{ nm}$ und $\lambda = 295 \text{ nm}$ am Ende der Polymerisation übergangen. Die doppellogarithmische Auftragung der Halbwertszeiten t_{50} gegen die Konzentration c_m in Abbildung 4.8 F zeigt eine Beschleunigung der Polymerisation mit steigender Konzentration. Dies steht im Einklang mit allgemeinen kinetischen Überlegungen. Bei der Untersuchung des Skalierungsverhaltens durch das Potenzgesetz $t_{50} \propto c_m^\gamma$ wurde eine Skalierungsexponent γ von $\gamma = -1.07$ erhalten. Dieser deutet auf einen Mechanismus der Polymerbildung hin, der durch Nukleation-Elongation dominiert ist.^[77,78]

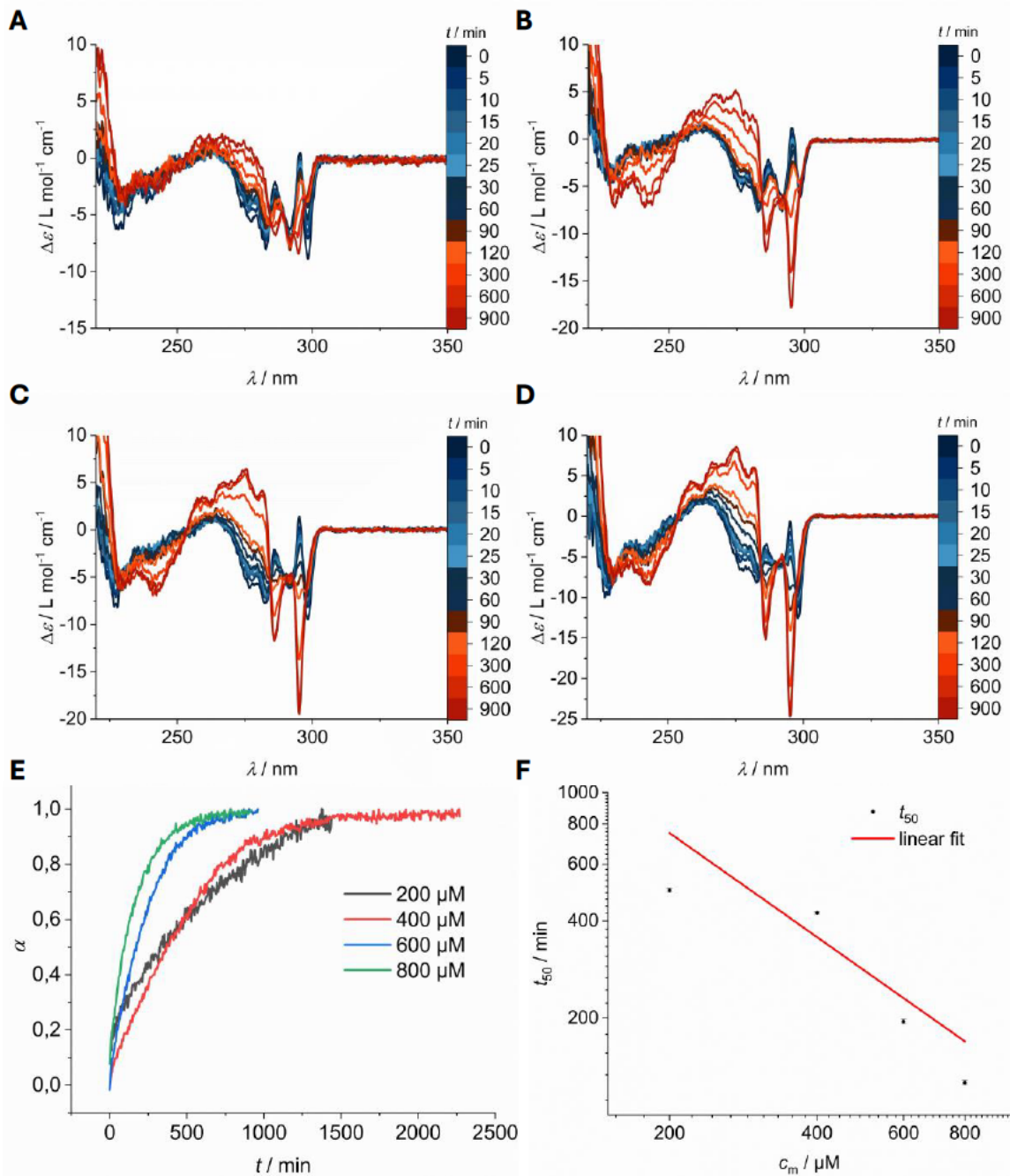


Abbildung 4.8: Kinetische Verfolgung der Polymerisation von Y-7 in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 5 °C verschiedener Konzentrationen nach dem Lösen des Lyophilisats aus DMSO. CD-Spektren der Konzentration 200 μM (A), 400 μM (B), 600 μM (C) und 800 μM (D) zu verschiedenen Zeitpunkten. E: Polymerisationsgrad α der Polymerisation mit der Zeit t . F: Doppellogarithmische Auftragung der Halbwertszeiten der Aggregation t_{50} gegen die Monomerkonzentration c_m . Die lineare Anpassung der Datenpunkte ist in Rot dargestellt.

Um die Morphologie der resultierenden Nanostäbchen der Polymerisation zu untersuchen, wurden Aufnahmen mittels Kryoelektronenmikroskopie (cryo-EM) von XXXXXXXXXX angefertigt. In den Aufnahmen in Abbildung 4.9 können zum ersten Messpunkt direkt nach dem Lösen der Verbindung Y-7 (0 h) keine bzw. nur vereinzelt

kleine, schnell gebildete Nanostäbchen gefunden werden. Vier Tage nach Beginn der Polymerisation (4 d) werden hingegen außerordentlich lange und separat vorliegende Nanostäbchen abgebildet. Sie sind mehrere Mikrometer lang und überschreiten den Bildausschnitt, weshalb sie nicht vollständig gemessen werden können.

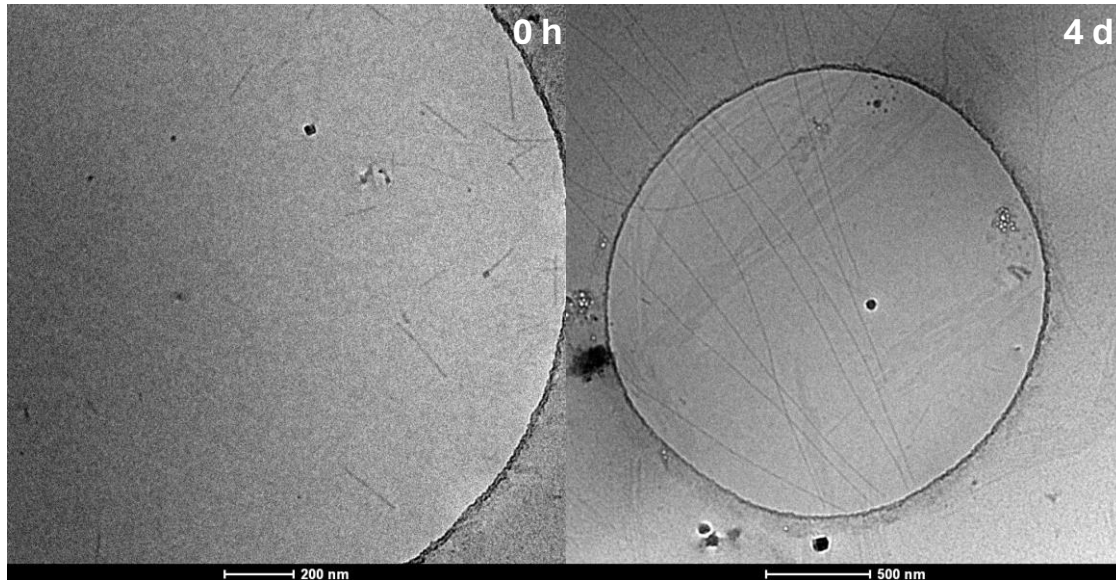


Abbildung 4.9 Cryo-EM Aufnahmen der Verbindung **Y-7** in 10 mM Phosphatpuffer des Lyophilisats aus DMSO direkt nach dem Lösen (0 h) und vier Tage nach Beginn der supramolekularen Polymerisation (4 d).

Die supramolekulare Polymerisation von Verbindung **Y-7** wurde mittels CD-Spektroskopie ausführlich verfolgt. Beim Vergleich der CD-Spektren der Polymerisation bei den unterschiedlichen Vorbereitungsbedingungen konnten zwei unterschiedliche Signalsätze der initialen Messung gefunden werden. Zum direkten Vergleich sind die ersten gemessenen CD-Spektren für diese Bedingungen in Abbildung 4.10 A und B dargestellt. Interessanterweise wurde für die Polymerisation nach dem Lösen des Lyophilisats der Verbindung aus DMSO ein anderer Signalsatz erhalten als bei der Verdünnung einer DMSO-Lösung. Obwohl das CD-Signal bei $\lambda = 295$ nm für die Fälle in Abbildung 4.10 A zu Beginn der Messung null ist, unterscheidet sich das erste gemessene Spektrum während der Polymerisation vom molekular gelösten Zustand in Abbildung 4.3 C. Es deutet auf das Vorliegen von Präaggregaten zu Beginn der Messung hin. Für die gelösten Proben in DMSO konnte in Abbildung 4.3 C gezeigt werden, dass die Verbindung **Y-7** in DMSO molekular gelöst vorliegt. Das erste gemessene Spektrum für diesen Fall zeigte jedoch einen anderen Signalsatz wie die zuvor besprochenen Proben. Dies deutet darauf hin, dass unter den unterschiedlichen Bedingungen verschiedene initial gebildete Spezies erhalten werden. Die Polymerisation für beide Fälle in bzw. aus DMSO (Abbildung 4.6 und Abbildung 4.8) führt jedoch zum gleichen Signalsatz des gebildeten supramolekularen Polymers. Der Lösungsmittelanteil in diesem Vergleich zeigt den besonderen Einfluss bereits kleinster Mengen des Lösemittelzusatzes auf die

Polymerisationskinetik und die kinetischen Pfade der Polymerisation. Demnach können selbst kleinste Mengen organischer Lösungsmittel nicht vernachlässigt werden kann.

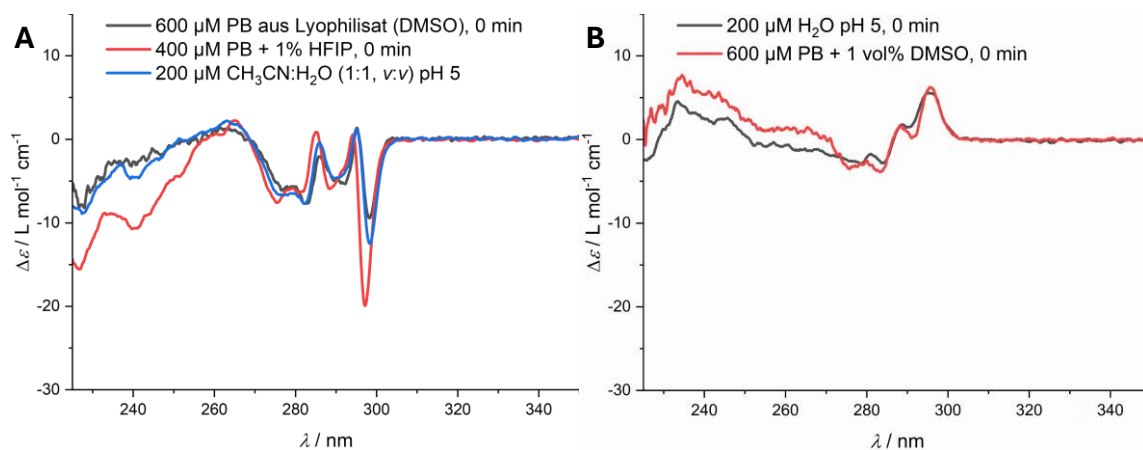


Abbildung 4.10: CD-Spektren der Anfangszustände der supramolekularen Polymerisation des Au(I)-Peptidamphiphils **Y-7** durch unterschiedliche Probenvorbereitung vor dem Experiment.

4.3 Fazit

Supramolekulare Polymere sind in junger Vergangenheit ausgiebig verwendete Architekturen. Die kinetische und mechanistische Erforschung dieser Strukturen ist essenziell für das Verständnis und die Entwicklung derer Eigenschaften. Während für kovalente Polymere robuste Synthesevorschriften und -protokolle zur Bindungsbildung zur Verfügung stehen, wurde auf die Bedeutung von nicht-kovalenten Syntheseprotokollen erst jüngst wieder aufmerksam gemacht.^[278] Darauf aufbauend sollte in dieser Arbeit die systematische Untersuchung der Kinetik von supramolekularen Polymeren in Wasser durchgeführt und der Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Polymerisation und die damit verbundenen Fallstricke aufgezeigt werden.

In der Synthese einer geeigneten Zielstruktur für diese Evaluierung konnte ein lineares Peptidamphiphil **Y-7** mit einer pH-responsiven Peptidsequenz hergestellt werden. Mittels CuAAC konnte das Peptidamphiphil mit einem zuvor hergestellten NHC-Au(I)-Komplex konjugiert werden. Die Einführung des Metallkomplexes konnte als Strukturmotiv der supramolekularen Polymerisation und als intrinsische Sonde für die CD-Spektroskopie genutzt werden. Dank der Einstellbarkeit der Assemblierungstendenz konnte das Peptidamphiphil ausführlich in der Kinetik der supramolekularen Polymerisation unter verschiedenen Bedingungen getestet werden. Durch die Verfolgung der charakteristischen Signale der supramolekularen Aggregate *via* CD-Spektroskopie konnte die Polymerisationskinetik für verschiedene Probenvorbereitungsbedingungen vor der supramolekularen Polymerisation und Anteile organischer Lösungsmittel während der Polymerisation untersucht werden.

Es wurde verdeutlicht, dass die Rolle von organischen Lösungsmitteln in der Reihe von Bedingungen, denen die Probe ausgesetzt war, entscheidend ist. Darüber hinaus sind selbst kleinste Lösungsmittelanteile während der Untersuchung nicht vernachlässigbar. Sie haben einen großen Einfluss auf die Polymerisationskinetik, auf die auftretenden Pfade und die resultierende Morphologie der supramolekularen Polymere. Der große Einfluss dieser Parameter bedingt eine hohe Sorgfalt der Protokollierung von Probenvorbereitungsbedingungen, um reproduzierbare Ergebnisse für nicht-kovalente Prozesse erhalten zu können.^[278]

In einer konzentrationsabhängigen Studie der Polymerisationskinetik der Probe mit optimierten Probenvorbereitungsbedingungen konnte die Polymerisation des Au(I)-Peptidamphiphils **Y-7** in außerordentlich lange, eindimensionale Nanostäbchen vollständig verfolgt werden. Bei der Aufnahme des Skalierungsverhaltens konnte eine konzentrationsabhängige Beschleunigung der Polymerisation festgestellt werden. Der ermittelte Skalierungsexponent der Assemblierung $\gamma = -1,07$ deutet auf einen Polymerisationsprozess hin, der durch Nukleation-Elongation der Peptidamphiphile in eindimensionale Nanostäbchen dominiert ist. Durch diese Herangehensweise konnte ein Einblick in die beteiligten Mechanismen der supramolekularen Polymerisation des Peptidamphiphils erlangt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Peptidamphiphile sind in der Lage in wässrigen Medien spontan in eindimensionale supramolekulare Polymere zu assemblieren. Analog zu klassischen, kovalenten Polymeren ist das grundlegende Verständnis ihrer Kinetik und Dynamik essenziell für die Entwicklung und den Fortschritt dieser Substanzklasse. Kinetische und dynamische Prozesse supramolekularer Polymere beinhalten eine Vielzahl schwacher Wechselwirkungen und involvierter Mechanismen. Das umfassende Verständnis dieser Prozesse ist noch immer unzureichend. Neue Studien des dynamischen Monomeraustauschs oder des Skalierungsverhaltens der supramolekularen Polymerisation liefern Auskunft über die Stabilität von Copolymeren oder dem Wechselspiel konkurrierender Prozesse der Assemblierung. Das Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war daher die Synthese von Peptidamphiphilen und die systematische Untersuchung dieser Eigenschaften für die supramolekularen (Co)Polymere in Wasser.

Der erste Teil dieser Arbeit zeigt die Synthese der diskotischen Peptidamphiphile **X-11** und **X-22** mit einem zentralen Benzoltricarboxamid-Kernmotiv. Hierbei wurde die Darstellung von Peptidamphiphilen im Grammmaßstab erreicht. Durch die Anpassung der Synthesestrategie konnte die variable Multifunktionalisierbarkeit zur Einführung der löslichkeitsvermittelnden dendritischen Teilstruktur der Verbindung ermöglicht werden. Die divergente Synthese ermöglichte hier die einfache Einführung von Methoxyethylenglykolketten mit zwei bis acht Wiederholungseinheiten, die die Grenzen der Löslichkeit und des sterischen Anspruchs der Dendrone in der Ausbildung eindimensionaler supramolekularer Polymere dieser Peptidamphiphile aufzeigte. So konnte eine variable Methode zur Darstellung einer Bibliothek strukturell verwandter Peptidamphiphile demonstriert werden. Dies ist in anschließenden Forschungsarbeiten besonders hinsichtlich der Evaluierung anderer oder mehrerer rezeptoradressierender Gruppen sinnvoll, um die Anwendbarkeit in biomedizinischen Anwendungen zu vergrößern und zu verbessern. Auch die Synthese weiterer Peptidamphiphile kann so zukünftig im Hinblick auf die systematische Untersuchung des Einflusses der einzelnen Strukturelemente auf weitere Eigenschaften wie der Kinetik der Assemblierung oder der Dynamik des Monomeraustauschs im Gleichgewicht durchgeführt werden.

Neben der Synthese der C_3 -symmetrischen Peptidamphiphile mit Ethylenglykol- und Mannosiddendronen war es möglich einfach konjugierte Peptidamphiphile **X-26**, **X-27**, **X-30**, **X-31**, **X-32** und **X-33** herzustellen, die mit unterschiedlichen fluoreszenten Farbstoffen verknüpft werden konnten. Unter Einsatz von CD-Spektroskopie und Elektronen- sowie Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Peptidamphiphile eindimensionale, rigide, supramolekulare Polymere bilden. Für das ethylenglykolbasierte Peptidamphiphile **X-11** konnte die Thermoresponsivität durch eine LCST von circa 60 °C festgestellt werden.

Durch das Mischen der unterschiedlichen Peptidamphiphile konnten Copolymere der verwendeten Komponenten erhalten werden. In einem FRET-Mischungsexperiment wurde mithilfe der farbstofffunktionalisierten Peptidamphiphile der dynamische Austausch der Monomere im Gleichgewicht der supramolekularen Polymere gemessen. Durch das schnell konvergierende FRET-Verhältnis stellte sich das mannosylierte Peptidamphiphil **X-22** als deutlich dynamischer heraus als das ethylenglykol-basierte Peptidamphiphile **X-11**. Auch das Peptidamphiphil **SM^{EG4}**, das im Gegensatz zu **X-11** keine Triazoleinheiten im Dendron trägt, tauschte Monomere zwischen den Stäbchen erheblich schneller aus.

Die farbstofffunktionalisierten Copolymere konnten ebenfalls für die morphologische Untersuchung in Wasser verwendet werden. Der größere Bildausschnitt der Fluoreszenzmikroskopie gegenüber TEM enthüllte rigide Nanostäbchen einer Länge von bis zu 97 μm . Eine Kollisionsstudie mittels LSCM bewies die Coassemblierung der multifunktionalen Peptidamphiphile in dieselben Nanostäbchen. Eine weitere Evaluierung der Dynamik von Copolymeren mit Bestandteilen unterschiedlicher Funktionen sollte der Untersuchung dieser Arbeit angeschlossen werden. So wäre es interessant zu überprüfen, ob in Copolymeren die favorisierten Eigenschaften der Komponenten kombiniert werden können. In diesem Kontext wäre die hohe Stabilität und geringe Dynamik von **X-11** mit der multivalenten Adressierbarkeit von Rezeptoren durch **X-22** von Interesse.

Darüber hinaus konnte mithilfe einer weiteren Methode in HDX-MS-Experimenten die Dynamik der supramolekularen Polymere untersucht werden. Diese „sondenfreie“ Technik ergab eine vergleichbare Austauschkinetik mit dem Ergebnis von **X-11** im FRET-Mischungsexperiment. Dies zeigte, dass die Störung durch die Einführung der Farbstoffsonden im FRET-Mischungsexperiment einen geringen Einfluss auf die Dynamik des Copolymers hat. Ein HDX-MS Experiment mit unterschiedlicher Ultraschallbehandlung der Probe wies zudem auf einen dominanten Austausch der Monomere über die Enden der Nanostäbchen hin. Gegenüber dem FRET-Mischungsexperiment benötigt HDX-MS keine funktionalisierten Derivate der Verbindung und die Austauschkinetik der Monomere des Homopolymers allein konnte untersucht werden. Würden Copolymere in HDX-MS verwendet werden, kann die Dynamik jeder einzelnen Komponente erfasst werden, sofern sich die detektierten Massenverteilungen der Bestandteile nicht überlappen. Diese Untersuchung wäre besonders für den Fall der Copolymere aus dem ethylenglykolbasierten Peptidamphiphile **X-11** und dessen Mannosidderivat **X-22** interessant, da sich hier die Halbwertszeiten des Austauschs deutlich voneinander unterscheiden. So könnte ermittelt werden, ob die Dynamik für dieses Copolymer durch diktierende oder synergistische Effekte beeinflusst wird.

Der Energietransfer innerhalb der Nanostäbchen konnte in bildgebenden Verfahren durch AccPbFRET und FLIM ebenfalls konfokalmikroskopisch gezeigt werden. Hier wurde die räumliche Nähe des FRET-Paares innerhalb der assemblierten Copolymere Pixel für Pixel aufgenommen. Diese Methoden wurden in dieser Arbeit zunächst nur an statischen

Beispielen zur Etablierung der Methoden eingesetzt. Die räumliche und zeitliche Verfolgung des Energietransfers innerhalb der Nanostäbchen sollte jedoch weiter untersucht werden. Die Verfolgung des dynamischen Monomeraustauschs analog des FRET-Mischungsexperiments durch diese bildgebenden Verfahren würde darüber hinaus räum- und zeitliche Informationen liefern und weitere Hinweise zu den involvierten Mechanismen des Austauschs ergeben.

Durch FLIM wurde außerdem gezeigt, dass in den mikroskopischen FRET-Methoden auf kurze supramolekulare Copolymere der farbstofffunktionalisierten Bausteine hingewiesen werden kann, die durch die beugungsbegrenzte Auflösung nicht dargestellt werden konnten. LSM und FACS zeigte zudem die Zellaufnahme der Peptidamphiphile in Makrophagen der Zelllinie RAW 309 und BMDM. Hierbei wurde für die Mannosederivate dieser Verbindungen eine erhöhte Zellaufnahme gezeigt, was auf die Adressierung des Mannoserezeptors und die rezeptor-vermittelte Zellaufnahme zurückgeführt wurde.

Im Kontext der multivalenten Präsentation bioaktiver Komponenten schließt sich die Frage an, ob die Zellaufnahme der Substanz über die freien Monomere in Lösung stattfindet oder kurze Oligo- bzw. Polymere aufgenommen werden. Dies könnte in künftigen Forschungsarbeiten mithilfe von AccPbFRET oder FLIM der FRET-Copolymere nach Inkubation untersucht werden. Durch die Quantifizierung des Energietransfers in den Kompartimenten der Zelle und geeigneten Kontrollexperimenten könnte ein Nachweis der Assemblierung innerhalb der Zelle erbracht werden. Die zeitliche Verfolgung des Energietransfers könnte zusätzlich zeigen, ob eine Veränderung des Assemblierungsstatus auftritt. Hier wären generell zwei Szenarien denkbar. Im Fall der Aufnahme von monomeren Einheiten in die Zelle, könnte eine Zunahme des Energietransfers auf eine Polymerisation der Peptidamphiphile innerhalb der Zelle hindeuten. Im entgegengesetzten Fall, nach der Aufnahme von oligo- oder polymeren Spezies, könnte ein Abfall des Energietransfers mit der Zeit auf eine Depolymerisation infolge der Wechselwirkung mit der hohen Konzentration an Proteinen oder dem Abbau der Peptidamphiphile durch Peptidasen hinweisen.

Zuletzt wurde durch dSTORM eine supraaufgelöste Mikroskopiemethode verwendet, die eine tiefere Einsicht in die Morphologie der Nanostäbchen in Wasser ermöglichte. So konnte gezeigt werden, dass die Nanostäbchen durch laterale Aggregation zu deutlich längeren Bündeln dieser Stäbchen zusammenlagern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Synthese des linearen Peptidamphiphils **Y-7** mit pH-responsiven Eigenschaften realisiert. Dieses konnte durch CuAAC mit einer Sonde **Y-2** konjugiert werden, welche sowohl als Assemblierungsmotiv als auch als Chromophor für die CD-Spektroskopie diente. Die Polymerisation des Peptidamphiphils im wässrigen Medium wurde mittels CD-Spektroskopie verfolgt. Der Fokus der Untersuchung lag dabei auf dem Einfluss organischer Lösungsmittelanteile in wässriger Lösung und den Probenvorbereitungsbedingungen. Hier konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Mengen wie 1 Vol.% HFIP oder DMSO einen deutlichen Einfluss auf die

Polymerisationskinetik und die auftretenden Pfade haben. Morphologische Untersuchungen mittels TEM und cryo-EM verdeutlichten die Beeinflussung der Länge und der Tendenz zur lateralen Aggregation unter den verschiedenen Bedingungen. Es konnten zwei Sätze von CD-Signalen in den ersten Messungen nach dem Start der Polymerisation gefunden werden, die über den Verlauf der Polymerisation zur Ausbildung desselben Signalsatzes des supramolekularen Polymers führte. Daraus wurde geschlussfolgert, dass abhängig von dem zugesetzten Anteil des organischen Lösungsmittels unterschiedliche initiale Spezies gebildet werden, die in anderen kinetischen Polymerisationspfaden zum gleichen supramolekularen Polymer führen.

Eine konzentrationsabhängige Untersuchung der Polymerisationskinetik von **Y-7** mit den optimierten Probenvorbereitungsbedingungen und ohne organischen Lösungsmittelanteil zeigte ein Skalierungsverhalten, dass auf einen Nukleations-Elongations-Mechanismus der supramolekularen Polymerisation hindeutet. Durch die Erkenntnisse dieser Kinetikstudie sei auf den Einfluss organischer Lösungsmittel in wässrigen Systemen hingewiesen, welcher häufig als vernachlässigbar angenommen wird. Diese Studie zeigte wiederholt, dass die gefundenen kinetischen Parameter und erhaltenen Morphologien nur für die spezifisch verwendeten experimentellen Bedingungen gültig sind.

6 Experimental Section

6.1 Methods

6.1.1 Solvents

All solvents were purchased in the best quality available and were used without further purification. Technical grade chloroform was distilled prior to use. In order to prepare absolute solvents, dichloromethane and acetonitrile were distilled from calciumhydride and tetrahydrofuran and 1,4-dioxane from sodium. Solvents were refluxed for several hours and distilled prior to use. Absolute DMF was purchased from *Acros Organics* (New Jersey, USA).

6.1.2 Degasification

Degassed solvents were prepared by using the freeze-pump-thaw-technique was used. In this method solvents were attached to a SCHLENK-line, frozen in liquid nitrogen and the gas atmosphere was pumped off. The stopcock was closed and the liquid nitrogen removed to let the liquid thaw and let the gas phase saturate with dissolved gas. The procedure was repeated at least three times.

6.1.3 Column chromatography

In column chromatography silica gel with a particle size of 0.035–0.070 mm and a pore size of 60 Å by *Acros Organics* (New Jersey, USA) was used. The eluents were freshly prepared of technical grade solvents, unless stated otherwise. A pressure of 0.2–0.6 bar was applied with nitrogen for flash chromatography. The analysis of the collected fractions was performed *via* thin layer chromatography.

6.1.4 Thin layer chromatography

Thin layer chromatography was performed on silica coated aluminum sheets *ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄* by *Macherey-Nagel* (Düren, Germany). The analytes were detected using UV-absorption or staining agents.

UV-absorption $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Sugar-stain solution of 0.25 mL *m*-methoxyphenol and 6.75 mL concentrated sulfuric acid in 250 mL ethanol.

Experimental Section

KMnO ₄ -stain	solution of 6 g KMnO ₄ , 40 g K ₂ CO ₃ and 13 mg NaOH in 600 mL water.
<i>Hanessians</i> stain	solution of 1 g Ce(SO ₄) ₂ , 25 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O and 50 mL saturated sulfuric acid in 450 mL water.
Vanillin-stain	solution of 5 g vanillin, 60 mL acetic acid and 20 mL saturated sulfuric acid in 600 mL methanol.
Ninhydrin-stain	solution of 1.5 g ninhydrin and 15 mL acetic acid in 500 mL methanol.

Staining was achieved upon heating.

6.1.5 NMR spectroscopy

All ¹H- and ¹³C-NMR spectra and corresponding 2D NMR-experiments were performed on an *Acance* III HD 400 (¹H-NMR: 300 MHz, ¹³C-NMR 75 MHz), or *Avance* II 400 (¹H-NMR: 400 MHz, ¹³C-NMR 101 MHz) spectrometer or *Avance* III HD 400 (¹H-NMR: 400 MHz, ¹³C-NMR 101 MHz) spectrometer by *Bruker* (Rheinstätten, Germany) equipped with a 5 mm broadband observe probehead (z gradient) or *Avance* III 600 (¹H-NMR: 600 MHz, ¹³C-NMR 151 MHz) spectrometer by *Bruker* (Rheinstätten, Germany) equipped with a 5 mm cryogenic triple-band inverse probehead (z gradient) using standard Bruker release pulse sequences. All samples were dissolved in deuterated solvents by *Deutero* (Kastellaun, Germany). Evaluations of the spectra were carried out with *MestReNova* 14.1.0 by *Mestrelab Research S.L.* (Santiago de Compostela, Spain). The chemical shifts of the signals were locked relative to the residual solvent peaks reported in literature^[292] and are given in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (0 ppm). Coupling constants were measured in Hz and the nomenclature of the multiplicity of the signals was used as follows:

br = broad signal, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet and m = multiplet.

6.1.6 Size exclusion chromatography

In size exclusion chromatography *Sephadex*TM LH-20 by *GE Healthcare* (Pittsburgh, USA) or *Bio-Beads*[®] S-X1 by *Bio Rad Laboratories GmbH* (Feldkirchen, Germany) was used. The eluent used is stated individually. The analysis of the collected fraction was performed *via* thin layer chromatography.

6.1.7 Mass spectrometry

Mass spectra were recorded on an *Agilent* 6545 QTOF-MS by *Agilent* (Santa Clara, USA), ionized using electrospray ionization (ESI) and detected on a time of flight (TOF) detector.

High molecular weight compounds were measured *via* matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) on an Autoflex maX MALDI-TOF/TOF from *Bruker* (Bremen, Germany). Linear and Reflector TOF mode was used for all samples. The matrix used for ionization is stated for each sample. Data acquisition was performed with *Bruker* flexControl 3.4 (Bremen, Germany) und analysis with *Bruker* flexAnalysis 3.4 (Bremen, Germany).

6.1.8 Medium pressure liquid chromatography (MPLC)

Medium pressure liquid chromatography purification was performed on a Sepacore® X50 Flash purification system by *Büchi* (Essen, Germany). Fractions were collected with a C-660 fraction collector and analysed *via* UV-Photometer C-640 by *Büchi* (Essen, Germany) and TLC. Purifications were conducted either on normal phase with self loaded chromatography columns using silica gel with a particle size of 35 – 70 µm (Kieselgel 60) from *Acros Organics* (Schwerte, Germany), or reversed-phase on commercial C18-columns.

6.1.9 High performance liquid chromatography (HPLC)

The HPLC consists of a PU-4086 semi-preparative binary pump module, an AS-4050 HPLC Autosampler, a MD-4015 Photo Diode Array Detector, a CO-4060 column oven by *Jasco* (Pfungstadt, Germany) and a CHF122SC fraction collector by *Advantec MFS Inc.* (Dublin, USA).

Method A

Purification using the *XBridge* Prep C18 column by *Waters* (Eschborn, Germany) was performed at a flowrate of 18.9 mL/min with the solvents and the time program A, shown below. The particle size of the column is 5 µm, the length 150 mm and the diameter 19 mm.

Table 6.1: Gradient of the solvents used in Method A.

Time /min	Ultrapure water + 0.1% TFA /vol%	Acetonitrile + 0.1% TFA /vol%
0	90	10
2	90	10
22	0	100
30	0	100

Experimental Section

Method B

Purification using NUCLEODUR C18 Pyramid by *Macherey-Nagel* was performed at a flowrate of 18.9 mL/min with the solvents and the time program **B**, shown below. The particle size of the column is 5 μm , the length 250 mm and the diameter 21 mm.

Table 6.2: Gradient of the solvents used in Method B.

Time /min	1 mM NH_4HCO_3 in ultrapure water /vol%	95% Acetonitrile 5% ultrapure water /vol%
0	80	20
8	80	20
32	20	80
40	20	80

Method C

Purification using the Luna C18(2) with TMS endcapping by *Phenomenex* (Aschaffenburg, Germany) was performed at a flowrate of 18.9 mL/min with the solvents and the time program **C**, shown below. The particle size of the column is 10 μm , the length 250 mm and the diameter 21.2 mm.

Table 6.3: Gradient of the solvents used in Method C.

Time /min	Ultrapure water + 0.1% TFA /vol%	Acetonitrile + 0.1% TFA /vol%
0	50	50
1	50	50
30	0	100
40	0	100

Method D

Purification using NUCLEODUR C18 Pyramid by *Macherey-Nagel* was performed at a flowrate of 18.9 mL/min with the solvents and the time program **D**, shown below. The particle size of the column is 5 μm , the length 250 mm and the diameter 21 mm.

Table S6.4: Gradient of the solvents used in Method D.

Time /min	ultrapure water /vol%	Acetonitrile /vol%
0	95	5
3	95	5
28	5	95
40	5	95

Method E

Purification using NUCLEODUR C18 Pyramid by *Macherey-Nagel* was performed at a flowrate of 18.9 mL/min with the solvents and the time program E, shown below. The particle size of the column is 5 μm , the length 250 mm and the diameter 21 mm.

Table S6.5: Gradient of the solvents used in Method E.

Time /min	ultrapure water + 0.1% TFA /vol%	Acetonitrile + 0.1% TFA /vol%
0	95	5
3	95	5
28	5	95
40	5	95

Method F

Purification using the Luna C18(2) with TMS endcapping by *Phenomenex* (Aschaffenburg, Germany) was performed at a flowrate of 18.9 mL/min with the solvents and the time program F, shown below. The particle size of the column is 10 μm , the length 250 mm and the diameter 21.2 mm.

Table 6.6: Gradient of the solvents used in Method F.

Time /min	Ultrapure water + 0.1% TFA /vol%	Acetonitrile + 0.1% TFA /vol%
0	70	30
1	70	30
25	0	100
40	0	100

Experimental Section

Method G

Purification using the Luna C18(2) with TMS endcapping by *Phenomenex* (Aschaffenburg, Germany) was performed at a flowrate of 18.9 mL/min with the solvents and the time program G, shown below. The particle size of the column is 10 μm , the length 250 mm and the diameter 21.2 mm.

Table 6.7: Gradient of the solvents used in Method G.

Time /min	Ultrapure water + 0.1% TFA /vol%	Acetonitrile + 0.1% TFA /vol%
0	90	10
1	90	10
25	20	80
40	20	80

Method H

Purification using NUCLEODUR C18 Pyramid by *Macherey-Nagel* was performed at a flowrate of 18.9 mL/min with the solvents and the time program H, shown below. The particle size of the column is 5 μm , the length 250 mm and the diameter 21 mm.

Table 6.8: Gradient of the solvents used in Method H.

Time /min	ultrapure water + 0.1% TFA /vol%	Acetonitrile + 0.1%TFA /vol%
0	100	0
8	100	0
32	0	100
40	0	100

6.1.10 Specific Rotation

The optical rotation was measured on a Polarimeter 241 by *Perkin-Elmer* (Massachusetts, USA) using a 10 cm glass cuvette containing the sample with a concentration of $c = 1.00 \frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$. The rotation was observed at a wavelength of $\lambda = 589 \text{ nm}$. Specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^T$ was calculated using Biot's law:^[293]

$$[\alpha]_{\text{D}}^T = \frac{100 \cdot \alpha}{c \cdot l} \quad (6.1)$$

With the measured rotation α , the concentration c in $\frac{\text{g}}{100 \text{ mL}}$ and the path length of the cuvette l in dm.

6.1.11 Solid phase peptide synthesis (SPPS)

Solid phase peptide synthesis was carried out on a CS136XT Peptide Synthesizer by CS Bio Co. (Menlo Park, USA). Peptide grade solvents and reagents were used. Peptide synthesis was carried out by a modified version of the standard Fmoc-protocol shown by Atherton and Sheppard.^[201]

6.1.12 Centrifugation

Centrifugation was performed on a *Sigma 202 MK* by *Sigma* (Osterode am Harz, Germany) using 1.5 mL Eppendorf-tubes, or on a *VWR Mega Star 600* by *Avantor* (Darmstadt, Germany) using 15 mL or 50 mL Falcon-tubes.

6.1.13 UV-Vis Spectroscopy

UV-Vis spectra were recorded on a *LAMBDA 365+* spectrophotometer by *Perkin Elmer* (Waltham, USA) using a quartz cuvette. All spectra were corrected for 100% transmittance and baseline subtracted.

6.1.14 Fluorescence spectroscopy

Fluorescence emission spectra were recorded either on a *Varian Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer* by *Agilent Technologies* (Santa Clara, USA) or *F16500 Fluorescence spectrophotometer* by *Perkin Elmer* (Waltham, USA) using quartz cuvettes.

6.1.15 Förster resonance energy transfer (FRET) measurement

Sample preparation:

Stock solutions of the peptide amphiphiles were prepared with a concentration of 250 μM in Milli-Q water. The samples were prepared by combining the stock solutions of the structural monomer and one of the functional monomers in the right ratio and diluting with Milli-Q water to reach a concentration of 25 μM . The solutions were freeze dried and redissolved in DMSO. The solutions were freeze dried and dissolved in DMSO again to assure completely molecularly dissolved monomers. To exchange DMSO with Milli-Q water the solutions were freeze dried and redissolved in Milli-Q water three times. All samples were allowed to equilibrate for at least 48 h at room temperature before each fluorescence experiment.

Experimental Section

FRET measurement:

In preparation of the FRET experiments, two samples containing the structural monomer and one of the dye labeled functional monomers (sCy3 or sCy5) respectively were mixed in a quartz cuvette and immediately measured in the fluorescence spectrometer. The samples were excited at a wavelength of 548 nm and the fluorescence emission was detected at 570 nm for donor emission and 670 nm for the acceptor emission. To calculate the FRET-ratio the following formula was used:

$$FRET - ratio = \frac{I_A}{I_A + I_D} \quad (6.2)$$

The intensity of emission of the acceptor (sCy5) is I_A and the intensity of emission of the donor (sCy3) is I_D . Data were processed with *OriginPro 8* by *OriginLab* (Northampton, USA).

6.1.16 CD-Spectroscopy

Circular dichroism spectroscopy was performed on a J-815 CD-Spectrometer by *Jasco* (Pfungstadt, Germany) using a quartz cuvette of pathlength between 1 mm and 10 mm at various temperatures. Spectra were processed with *Origin 2022* by *OriginLab* (Northampton, USA).

6.1.17 Kinetic CD spectroscopy experiments

Compound Y-7 was used as lyophilizate after HPLC purification. A 1000 μM stock solution of **compound Y-7** was prepared in MeCN:H₂O (1:1) and used for serial dilution to yield samples of the respective concentration. All samples were lyophilized and dissolved in DMSO to measure reference CD-spectra of unassembled species. DMSO solutions were lyophilized again to yield dry colorless powders. The sample and the solvent were pre-tempered in an ice bath at 5 °C and the cuvette in the sample holder of the instrument before each measurement. For the kinetic measurement the sample was dissolved in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and measured immediately. Full CD-spectra were recorded every 5 min at a scanning speed of 50 nm/min. The spectra were corrected by subtraction of the background (solvent and cuvette). The degree of aggregation α was calculated using formula (6.3).

$$\alpha(t) = \frac{\Delta\epsilon^{295}(t) - \Delta\epsilon_{\text{DMSO}}^{295}}{\Delta\epsilon_{\text{min}}^{295} - \Delta\epsilon_{\text{DMSO}}^{295}} \quad (6.3)$$

Where $\Delta\epsilon^{295}(t)$ is the measured CD signal at the wavelength $\lambda = 295$ nm with time t , $\Delta\epsilon_{\text{min}}^{295}$ is the minimal CD signal of all time points at $\lambda = 295$ nm and $\Delta\epsilon_{\text{DMSO}}^{295}$ is the CD

signal of the reference sample of each concentration in DMSO at $\lambda = 295$ nm. The half time of the self-assembly t_{50} can be found when fitting the resulting plots with a logistic fit with formula (6.4).

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{t}{t_{50}}\right)^p} + A_2 \quad (6.4)$$

Where A_1 is the upper asymptote, A_2 is the lower asymptote and p is the power.

pH titration CD measurements:

A 400 μM solution of **compound Y-7** in MeCN:H₂O (1:1) was used for pH titration. The starting pH of the solution was 6.18. The pH was adjusted to pH 12.17 using aqueous 1 M NaOH. Starting from basic pH the solution was adjusted stepwise to pH 3.18 using aqueous 0.1 M HCl. CD spectra were measured at each integer pH value. All spectra were averaged over three replicates and corrected by subtraction of the background (solvent and cuvette).

6.1.18 Hydrogen/deuterium exchange (HDX) mass spectrometry (MS)

Samples were prepared from a 100 μM stock solution of Compound **X-11** that was freeze dried and redissolved in the same volume of 5 mM NaOAc in Milli-Q water. The sample was equilibrated at 25 °C and 400 rpm of shaking for 5 d. Before the HDX-MS measurements the 100 μM sample of **X-11** in 5 mM NaOAc in H₂O was diluted 99:1 in 5 mM NaOAc in D₂O. Mass spectra were measured immediately on an *Agilent* 6545 QTOF-MS by *Agilent* (Santa Clara, USA) using electrospray ionization (ESI) with time of flight (TOF) detector.

sonication HDX-MS experiment:

In these measurements the 100 μM solution of **X-11** in 5 mM NaOAc in H₂O was sonicated in an Emmi-H60 ultrasonic bath sonicator from *EMAG AG* (Mörfelden-Walldorf, Germany) with a frequency of 40 kHz and 240 W power for the stated time before 99:1 dilution in 5 mM NaOAc in D₂O and measurement *via* MS.

MS data were processed in mMass^[259] software with the built in HDX-tool. Fit data and deuteration distribution was further analyzed in *Origin 2022* by *OriginLab* (Northampton, USA).

Experimental Section

6.1.19 Crystal violet cytotoxicity assay

Cytotoxicity assays were performed to examine toxic properties of the supramolecular nanofibers on BMDMs cells. Therefore, $5 \cdot 10^5$ BMDMs per well were plated in 200 μ L complete growth media into a 96-well plate and incubated overnight to allow attachment onto the plate. On the next day 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M, of the supramolecular nanofibers were added and co-cultivated for 7 d. As a positive control a 20 % DMSO solution was added on cells. To visualize the cytolytic activity of the supramolecular material, the remaining target cells were stained with crystal violet. Therefore, the medium was aspirated, and the remaining BMDMs cells were carefully washed with PBS. Afterwards, cells were fixed by the addition of 300 μ L ice-cold methanol-acetone mixture (1:1) and subsequently incubated at 4 °C for 10 min. After the incubation period, the fixation mixture was discarded and 100 μ L crystal violet staining solution (0.5 g crystal violet, 80 mL water, 20 mL methanol) added and incubated for 20 min at room temperature. The staining solution was discarded, wells were washed with water and 125 μ L of the measuring solution (50 % ethanol in 0.1 % acetic acid) were added and the absorption measured on a TECAN Infinite 200Pro (Männedorf, Switzerland) plate reader at 550 nm.

6.1.20 Flow cytometrie (FACS)

10^5 freshly isolated BMDMs were incubated with 25, 50 and 100 μ M of the supramolecular nanofibers for 2 h at 37 °C in PBS. The cells were then washed two times with PBS and incubated with CD11b marker for macrophages (eBioscience) and with fixable viability dye eFluor780 (Invitrogen) to exclude false-positive dead cells. The cells were washed two times and subsequently taken up and analyzed. Flow cytometry data were acquired on a *Canto flow cytometer* (BD Biosciences) and analyzed with *FlowJo* Software (FlowJoLLC).

6.1.21 Laser scanning confocal microscopy (LSCM)

Laser scanning confocal microscopy was performed either on a *Leica* TCS SP8 based on an DMi8 CEL advanced stand (Wetzlar, Germany) or a *Leica* TCS SP5 STED CW (Wetzlar, Germany). A 63x, 1.40NA oil immersion objective was used for all measurements. Microscopy raw data was processed using *ImageJ*^[217]. For every image only brightness and contrast were changed for better visibility.

Sample preparation:

Unless otherwise state, all microscopy samples were prepared from the stock solutions in Tabelle 3.2. stock solutions were diluted 99:1 in PBS to yield a final concentration of 250 nM in 0.99x PBS just before the measurement. The solution was transferred into an *Ibidi* 8-well chamber slide (Gräfelfing, Germany) or a home build channel slide with an etched coverslip. The sample solution was allowed to adsorb for 5 min before washing with PBS.

Channel slide preparation:

The preparation of a channel microscopy slide was performed analogously to a literature example.^[63] Coverslips (#1.5) and microscopy slides were submerged in acetone and treated in an ultrasonic bath for 10 min. the solvent was replaced and the procedure repeated with isopropanol and Milli-Q water. Afterwards only the coverslips were etched in a piranha solution (3:1, conc. H₂SO₄:H₂O₂ (aq., 30 wt.%)) for 15 min. Coverslips were washed thoroughly with Milli-Q water and were sonicated in Milli-Q water for 10 min again. Coverslips and microscopy slides were sonicated in acetone for 10 min, stream dried with N₂ towards one corner and stored in vacuum overnight. To build the channel slide two stripes of double-sided tape were placed onto the slide and the coverslip was placed onto both strips to create a thin channel between the two tape stripes. Channel slides were prepared directly before measurement. The sample was adsorbed to the coverslip according to the procedures stated for the experiment and the two open edges of the coverslip were sealed with clear nail polish.

Ratiometric FRET through acceptor photobleaching (AccPbFRET):

Image acquisition for AccPbFRET was performed on a *Leica* TCS SP8 based on an DMi8 CEL advanced stand (Wetzlar, Germany). The emission of the donor and the acceptor dye was measured by sequential imaging. First the donor was excited at $\lambda = 552$ nm and the donor emission was collected on a HyD detector from $\lambda = 561$ nm to $\lambda = 629$ nm. In the second sequenz the acceptor was excited at $\lambda = 638$ nm und the acceptor emission was collected on the same detector from $\lambda = 647$ nm to $\lambda = 734$ nm. After the acquisition of both prebleach images the acceptor was bleached by the laser at $\lambda = 638$ nm at 100 % laserpower. Postbleach images were acquired using the same sequential imaging as for prebleach images. The FRET-efficiency E_{FRET} was calculated from those images using the *ImageJ*^[217] plugin AccPbFRET^[262] using background and partial acceptor photobleaching correction.

Experimental Section

Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM):

FLIM was performed on a *Leica Stellaris 8 FALCON* (Wetzlar, Germany) using samples in etched channel slides. Analysis was carried out using LASX-FLIM (FALCON) analysis software. *Leica's* n-exponential reconvolution fit model was chosen for fluorescence lifetime calculations. For samples containing only AF488 fluorescence lifetime was fitted monoexponentially. For samples of AF488 which are involved in FRET fluorescence lifetime was fitted biexponentially.

6.1.22 Widefield microscopy

All widefield applications were performed on a *Zeiss Elyra 7* (Oberkochen, Germany) equipped with two sCMOS-cameras on Elyra 7 Duolink, including Laser-widefield imaging, SIM and dSTORM.

Structured illumination microscopy (SIM):

SIM-images were acquired using Lattice SIM mode on Elyra 7 using a lattice spot pattern. 13 phases were acquired and dual-iterative SIM² image reconstruction was used in *Zeiss* (Oberkochen, Germany) Zen Black software.

direct-statistical optical reconstruction microscopy (dSTORM):

dSTORM was performed in STORM-buffer, instead of PBS. The STORM-buffer was freshly prepared before every experiment from 10x stock solutions in PBS and dilution with PBS to the final concentration. The STORM-buffer consists of 50 mM 2-Mercaptoethylamine (MEA), 25 mg/mL glucose, 0.5 mg/mL glucose oxidase (GLOx) and 0.04 mg/mL catalase. After fiber adsorption the sample was washed with STORM-buffer twice.

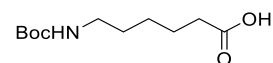
Images were acquired in total internal reflection (TIR) illumination with 561 nm laser for excitation and 405 nm laser for activation. Laserpower was tuned during image time series acquisition. At least 25000 frames were acquired for image reconstruction. Image reconstruction was performed with the software *Picasso*^[294] from JUNGSMANN lab and evaluation of the reconstructed image with *ImageJ*^[217].

6.1.23 TEM

Electron microscopy was performed either by [REDACTED] or [REDACTED]. Transmission electron microscopy (TEM) samples were analyzed on a Tecnai T12 or a Tecnai G2 Spirit from *FEI* (Hillsboro, USA), both equipped with a LaB₆ cathode operating at 120 kV. The former is equipped with a BioTWIN objective lens whereas the latter makes use of a TWIN lens. Images were recorded either using a MegasSYS 1k×1k or a Gatan US1000 2k×2k CCD sensor. 5 μL of the sample were left to absorb to freshly glow discharged copper grids (CF300-Cu, 300 mesh) coated with a 3–4 nm carbon film from *Electron Microscopy Sciences* (Hatfield, USA) for 1 min and negatively stained afterwards for 20 s with 5 μL of a 2 wt.% solution of uranyl acetate. Excess liquid was removed with Whatman® grade 1 filter papers from *GE Healthcare Biosciences* (Uppsalla, Sweden) after each step.

6.2 Synthesis

Compound X-1



6-Aminohexanoic acid (2.62 g, 20.0 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dioxane/H₂O (2/1, 100 mL) and was cooled in an ice bath. 1 M NaOH (20 mL, 20.0 mmol, 1.0 eq.) and di-*tert*-butyl dicarbonate (4.80 g, 22.0 mmol, 1.1 eq.) were added and the suspension was stirred for 30 min at 0 °C. The ice bath was removed and the reaction was stirred at room temperature for 3 d. The clear reaction mixture was extracted with EA (50 mL) and the pH of the aqueous phase was adjusted to pH 1 with 1 M HCl. The acidified aqueous phase was extracted with EA (3 x 50 mL) and the combined organic layers were dried over MgSO₄. The solvent was removed *in vacuo* and the colorless oil was dried under reduced pressure. The dried product crystallizes into colorless crystals.

Yield: 4.62 g (20.0 mmol, quant.) colorless crystals.

MF C₁₁H₂₁NO₄ MW 231.29 [231.1471].

R_F: 0.43 (SiO₂, CH:EA, 1:1).

HR-TOF-MS (ESI, neg.), *m/z*: 230.1401 [M-H]⁻ calc. 230.1398

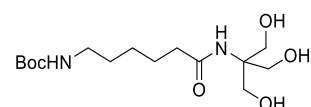
461.2871 [2M-H]⁻ calc. 461.2869

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 11.98 (s, 1H, COOH^{Ahx}), 6.76 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, NH^{Ahx}), 2.88 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz, Ahx^ε), 2.18 (t, 2H, *J* = 2.18 Hz, Ahx^α), 1.47 (p, 2H, *J* = 7.3 Hz, Ahx^β), 1.41–1.29 (m, 11H, 3x CH₃^{Boc}, Ahx^δ), 1.28–1.18 (m, 2H, Ahx^γ).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 174.5 (COOH^{Ahx}), 155.6 (C=O^{Boc}), 77.3 (C_q^{Boc}), 40.1 (Ahx^ε), 33.6 (Ahx^α), 29.2 (Ahx^δ), 28.3 (CH₃^{Boc}), 25.9 (Ahx^γ), 24.2 (Ahx^β).

Compound X-2^[183]

(Boc-Ahx-Tris)



N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-6-aminohexanoic acid (**compound X-1**) (3791 mg, 16.4 mmol, 1.1 eq.), 2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (1805 mg, 14.9 mmol, 1.0 eq.) and 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline (4422 mg, 17.9 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in ethanol (150 mL) and refluxed for 19 h. The solvents were removed *in vacuo*

and the remainder purified on silica gel (EA→EA:MeOH, 10:1→4:1) to yield a colorless amorphous solid.

Yield: 4750 mg (14.2 mmol, 95%) colorless amorphous solid.

MF C₁₅H₃₀N₂O₆ MW 334.41 [334.2104].

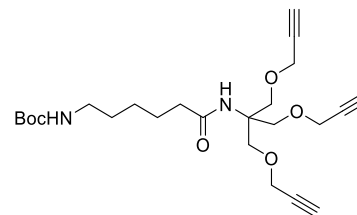
R_F: 0.70 (SiO₂, EA:MeOH, 1:1).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 357.2002 [M+Na]⁺ calc. 357.1996.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 7.10 (s, 1H, NH^{Tris}), 6.75 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH^{Ahx}), 4.76 (t, 3H, *J* = 5.8 Hz, 3x OH^{Tris}), 3.51 (d, 6H, *J* = 5.8 Hz, 3x CH₂OH^{Tris}), 2.87 (pseudo-q, 2H, *J* = 6.7 Hz, Ahx^ε), 2.11 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, Ahx^α), 1.45 (pseudo-quint, 2H, *J* = 7.6 Hz, Ahx^β), 1.40–1.30 (m, 11H, Ahx^δ, 3x CH₃^{Boc}), 1.25–1.15 (m, 2H, Ahx^γ).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 172.22 (C=O^{Ahx}), 156.03 (C=O^{Boc}), 77.77 (C_q^{Boc}), 62.68 (C_q^{Tris}), 62.21 (CH₂OH^{Tris}), 40.22 (Ahx^ε), 36.28 (Ahx^α), 29.76 (Ahx^δ), 28.74 (CH₃^{Boc}), 26.38 (Ahx^γ), 25.56 (Ahx^β).

Compound X-3 (analog ^[295])



Compound X-2 (500.0 mg, 1.495mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DMF (8 mL) in a flame dried SCHLENK flask and cooled down in an ice bath. Propargyl bromide (967 μL, 8.976 mmol, 6.0 eq.) was added and the solution was stirred for 15 min. Freshly powdered KOH (503.7 mg, 8.977 mmol, 6.0 eq.) was added slowly under argon counterflow. The reaction mixture was stirred at 35 °C for 2 d. After complete conversion the solution was diluted with EA (30 mL) and washed with Milli-Q water (3 x 30 mL). The combined aqueous layers were extracted with EA (30 mL) and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified *via* column chromatography (SiO₂, CH:EA, iso. 1:1).

Yield: 541.0 mg (1.206 mmol, 81 %) light yellow waxy solid.

MF C₂₄H₃₆N₂O₆ MW 448.56 [448.2573].

R_F = 0.69 (SiO₂, CH:EA, 1:2).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 449.2653 [M+H]⁺ calc. 449.2646

471.2472 [M+Na]⁺ calc. 471.2465

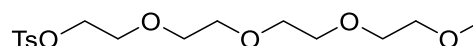
487.2212 [M+K]⁺ calc. 487.2205

Experimental Section

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 296 K, COSY) δ /ppm: 5.68 (s, 1H, NH^{Tris}), 4.56 (bs, 1H, NH^{Ahx}), 4.14 (d, 6H, $J = 2.3$ Hz, $\text{OCH}_2^{\text{propargyl}}$), 3.84 (s, 6H, $\text{OCH}_2^{\text{Tris}}$), 3.10 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, Ahx^ϵ), 2.44 (t, 3H, $J = 2.4$ Hz, $\text{CH}^{\text{propargyl}}$), 2.15 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, Ahx^α), 1.61 (p, 2H, $J = 7.4$ Hz, Ahx^β), 1.52–1.39 (m, 11H, 3x CH_3^{Boc} , Ahx^δ), 1.38–1.28 (m, 2H, Ahx^γ).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 , 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 173.2 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Ahx}}$), 156.1 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Boc}}$), 79.7 ($\text{C}_q^{\text{propargyl}}$), 79.2 (C_q^{Boc}), 74.8 ($\text{CH}^{\text{propargyl}}$), 68.7 ($\text{CH}_2^{\text{Tris}}$), 59.2 (C_q^{Tris}), 58.8 ($\text{OCH}_2^{\text{propargyl}}$), 40.5 (Ahx^ϵ), 37.2 (Ahx^α), 29.9 (Ahx^δ), 28.6 ($\text{OCH}_3^{\text{Boc}}$), 26.3 (Ahx^γ), 25.3 (Ahx^β).

Compound X-4



Tetraethyleneglycol monomethyl ether (16.0 g, 78.33 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (3/1, 120 mL) and NaOH (16.3 g, 407.33 mmol, 5.2 eq.) was added. The solution was cooled down in an ice bath and *para*-toluenesulfonyl chloride (17.9 g, 94.00 mmol, 1.2 eq.) in THF (110 mL) was added dropwise over 2 h. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred for 14 h at room temperature. The solution was extracted with diethyl ether (3 x 100 mL) and the organic layer was washed with Milli-Q water (3 x 100 mL) and dried over MgSO_4 . The solvent was removed *in vacuo* to yield a colorless oil.

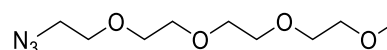
Yield: 25.4 g (70.08 mmol, 89 %) colorless oil.

MF $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{S}$ MW 362.44 [362.1399].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 380.1745 [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$ calc. 380.1737

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 296 K, COSY) δ /ppm: 7.81–7.77 (m, 2H, $H-2$, $H-6$), 7.36–7.31 (m, 2H, $H-3$, $H-5$), 4.19–4.13 (m, 2H, TsOCH_2), 3.70–3.66 (m, 2H, CH_2OCH_3), 3.65–3.61 (m, 6H, 3x OCH_2), 3.58 (s, 4H, 2x OCH_2), 3.55–3.51 (m, 2H, OCH_2), 3.37 (s, 3H, OCH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3^{Ts}).

Compound X-5



Compound X-4 (2000.0 mg, 5.518 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in CH_3CN (150 mL), NaN_3 (717.5 mg, 11.037 mmol, 2.0 eq.) was added and the reaction mixture refluxed for 3 d. The suspension was then concentrated and diluted with Milli-Q water (100 mL). The aqueous solution was extracted with DCM (3 x 50 mL) and the organic layer was washed with Brine (50 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent removed *in vacuo* to yield a colorless oil.

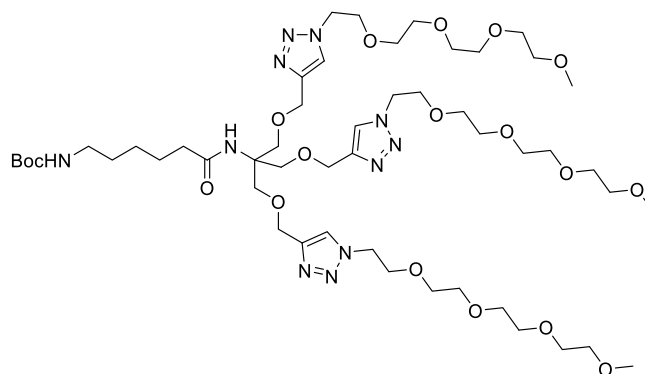
Yield: 1283.0 mg (5.500 mmol, quant.) colorless oil.

MF C₉H₁₉N₃O₄ MW 233.27 [233.1376].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 256.1269 [M+Na]⁺ calc. 256.1268

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ/ppm: 3.70–3.62 (m, 12H, 6x OCH₂), 3.57–3.53 (m, 2H, N₃CH₂), 3.51–3.34 (m, 5H, OCH₂, OCH₃).

Compound X-6



Compound X-3 (50.0 mg, 0.111 mmol, 1.0 eq.) and **Compound X-5** (104.0 mg, 0.446 mmol, 4.0 eq.) were dissolved in DMF (2.5 mL). The solution was degassed by performing three freeze-pump-thaw cycles. CuSO₄·5H₂O (27.8 mg, 0.111 mmol, 1.0 eq.), TBTA (59.1 mg, 0.111 mmol, 1.0 eq.) and sodium ascorbate (22.1 mg, 0.111 mmol, 1.0 eq.) were added under argon counterflow. Another freeze-pump-thaw cycle was performed and the reaction mixture was stirred for 2 d at 60 °C. The solvent was removed *in vacuo* and the remainder purified *via* column chromatography (SiO₂, DCM:MeOH, iso. 10:1).

Yield: 113.8 mg (0.099 mmol, 89 %) light yellow oil.

MF C₅₁H₉₃N₁₁O₁₈ MW 1148.36 [1147.6700].

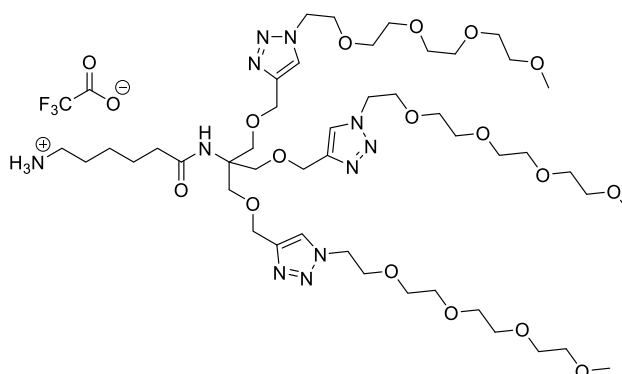
R_F: 0.32 (SiO₂, DCM:MeOH, 10:1).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1170.6589 [M+Na]⁺ calc. 1170.6592

574.8425 [M+2H]²⁺ calc. 574.8423

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 8.00 (s, 3H, H-5^{Trz}), 7.17 (s, 1H, NH^{Tris}), 6.74 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, NH^{Ahx}), 4.50 (t, 6H, *J* = 5.2 Hz, 3x N^{Trz}CH₂), 4.46 (s, 6H, 3x C^{Trz}CH₂), 3.80 (t, 6H, *J* = 5.2 Hz, 3x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.63 (s, 6H, 3x OCH₂^{Tris}), 3.54–3.38 (m, 36H, 18x OCH₂^{EG}), 3.22 (s, 9H, 3x OCH₃^{EG}), 2.85 (q, 2H, *J* = 6.6 Hz, Ahx^ε), 2.03 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, Ahx^α), 1.49–1.11 (m, 15H, Ahx^β, Ahx^δ, 3x CH₃^{Boc}, Ahx^γ).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals, δ/ppm: 124.6 (C-5^{Trz}), 71.7, 70.2, 70.1, 70.0 (OCH₂^{EG}), 69.2 (N^{Trz}CH₂CH₂), 68.4 (OCH₂^{Tris}), 64.6 (C^{Trz}CH₂), 58.5 (OCH₃^{EG}), 49.8 (N^{Trz}CH₂), 28.7 (CH₃^{Boc}).

Compound X-7

Compound X-6 (113.8 mg, 0.099 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM/TFA (1/1, 10 mL) and stirred at room temperature for 5 h. The solvent was removed *in vacuo* and the remainder was co-distilled with toluene (5 x 3 mL). The product was dried under reduced pressure and used without further purification.

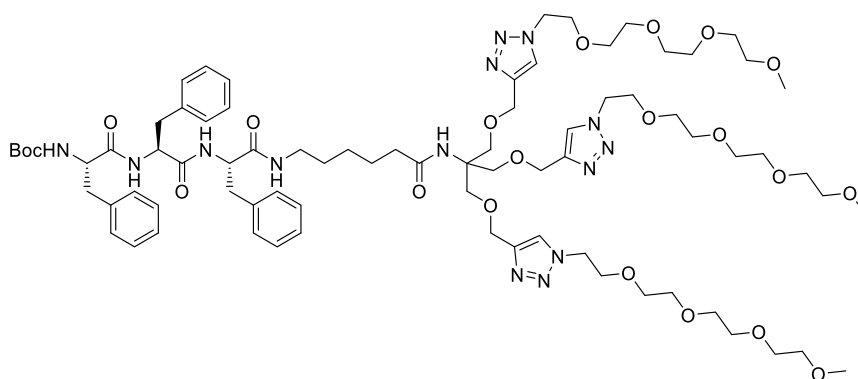
Yield: 115.0 mg (0.099 mmol, quant.) light yellow oil.

MF C₄₆H₈₅N₁₁O₁₆·TFA MW 1162.27 [1161.6104].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1070.6049 [M-TFA+Na]⁺ calc. 1070.6068

535.8069 [M-TFA+H+Na]²⁺ calc. 535.8070

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ/ppm: 8.10 (s, 3H, 3x H-5^{Trz}), 7.96 (bs, 3H, NH₃⁺, Ahx^γ), 4.73-4.49 (m, 12H, 3x N^{Trz}CH₂, 3x C^{Trz}CH₂), 3.95 (bs, 6H, 3xN^{Trz}CH₂CH₂), 3.83 (bs, 6H, 3x OCH₂^{Tris}), 3.72-3.48 (m, 36H, 18x OCH₂^{EG}), 3.37 (s, 9H, 3x OCH₃^{EG}), 2.72 (bs, 2H, Ahx^ε), 2.28 (bs, 2H, Ahx^α), 1.66-1.43 (m, 4H, Ahx^β, Ahx^δ), 1.37-1.24 (m, 2H, Ahx^γ).

Compound X-9

Compound X-8 (66.5 mg, 0.119 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in DMF (5 mL) and PyBOP (61.8 mg, 0.119 mmol, 1.2 eq.), HOBt·H₂O (18.2 mg, 0.119 mmol, 1.2 eq.) and **Compound X-7** (115 mg, 0.099 mmol, 1.0 eq.) were added. The solution was cooled down in an ice bath and the pH was adjusted to pH 9 with NMM. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 d. The reaction was quenched with Milli-Q

water (1 mL), acidified with AcOH (100 μ L) and purified *via* size exclusion chromatography (Sephadex[®] LH-20, MeOH).

Yield: 111.0 mg (0.070 mmol, 71 %) light yellow oil.

MF C₇₈H₁₂₀N₁₄O₂₁ MW 1589.90 [1588.8752].

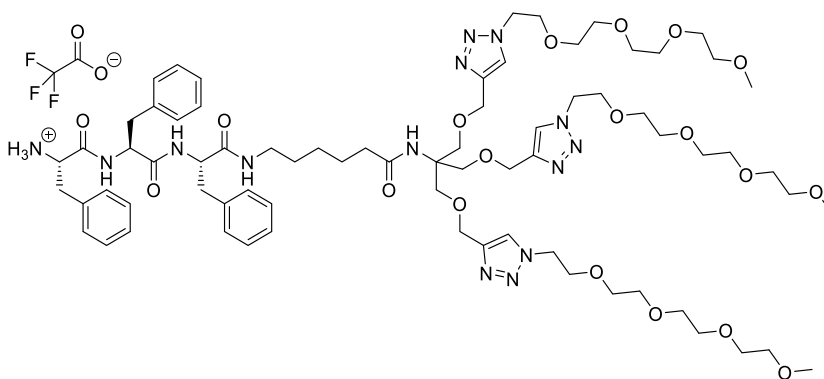
HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1661.8629 [M+Na]⁺ calc. 1611.8644

806.4350 [M+H+Na]²⁺ calc. 806.4358

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 7.72 (s, 3H, 3x *H*-5^{Trz}), 7.33–7.02 (m, 15H, 6x Ahx ^{δ} , 6x Ahx ^{ϵ} , 3x Ahx ^{ζ}), 6.75–6.44 (m, 3H, NH^{Phe²}, NH^{Phe³}, NH^{Ahx}), 6.25 (s, 1H, NH^{Tris}), 5.00–4.88 (m, 1H, NH^{Phe¹}), 4.72–4.61 (m, 1H, Phe ^{α}), 4.57 (s, 6H, 3x C^{Trz}CH₂), 4.53 (t, 6H, *J* = 5.3 Hz, 3x N^{Trz}CH₂), 4.48–4.37 (m, 1H, Phe ^{α}), 4.26–4.12 (m, 1H, Phe ^{α}), 3.87 (t, 6H, *J* = 5.2 Hz, 3x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.81 (s, 6H, 3x C_qCH₂^{Tris}), 3.66–3.57 (m, 30H, 15x OCH₂^{EG}), 3.56–3.49 (m, 6H, 3x CH₂OMe^{EG}), 3.37 (s, 9H, 3x OCH₃^{EG}), 3.19–3.06 (m, 2H, Ahx ^{ϵ}), 3.04–2.82 (m, 6H, 3x Phe ^{β}), 2.12 (t, 2H, *J* = 8.7 Hz, Ahx ^{α}), 1.55 (p, 2H, *J* = 7.6 Hz, Ahx ^{β}), 1.48–1.35 (m, 2H, Ahx ^{δ}), 1.35–1.18 (m, 11H, Ahx ^{γ} , 3x C_qCH₃^{Boc}).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ /ppm: 144.7 (C-4^{Trz}), 129.3, 129.2, 128.9, 128.6, 127.3 (Phe ^{δ} , Phe ^{ϵ} , Phe ^{ζ}), 124.0 (C-5^{Trz}), 72.0, 70.7, 70.6, 69.5 (OCH₂^{EG}), 69.1 (C_qCH₂^{Tris}), 64.7 (C^{Trz}CH₂), 59.1 (OCH₃^{EG}), 50.4 (N^{Trz}CH₂), 28.3 (C_qCH₃^{Boc}).

Compound X-10



Compound X-9 (111 mg, 0.070 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM/TFA (1/1, 10 mL) and stirred at room temperature for 2 h. The solvent was removed *in vacuo* and the remainder was co-distilled with toluene (5 x 6 mL). The crude product was purified *via* HPLC (Method F).

Yield: 67.0 mg (0.042 mmol, 60 %) colorless lyophilizate.

MF C₇₃H₁₁₂N₁₄O₁₉·TFA MW 1603.80 [1602.8157].

R_F: 0.37 (SiO₂, DCM:MeOH, 10:1).

Experimental Section

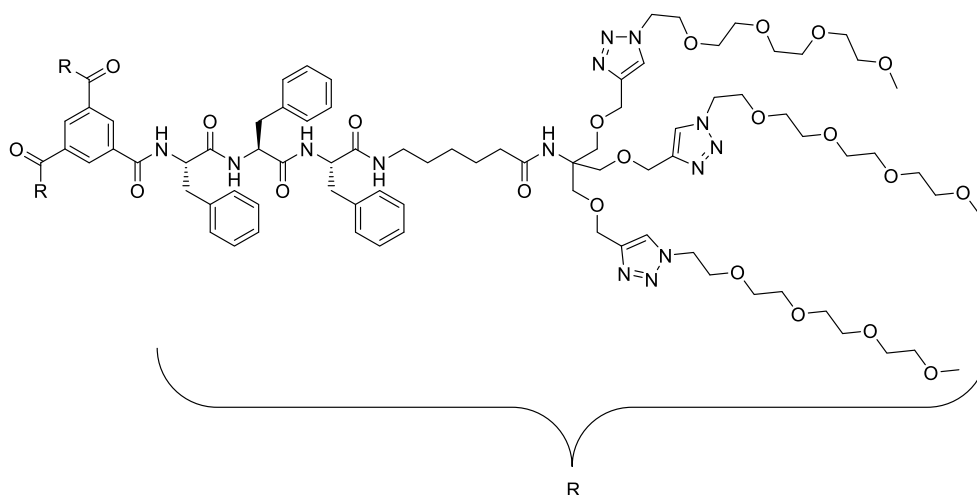
HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 1511.8083 [M+Na]⁺ calc. 1511.8120

756.4083 [M+H+Na]²⁺ calc. 756.4096

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 8.67 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, NH^{Phe2}), 8.39 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, NH^{Phe3}), 8.03–7.93 (m, 6H, NH₃^{Phe1}, 3x *H*-5^{Trz}), 7.84 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz, NH^{Ahx}), 7.29–7.12 (m, 15H, 6x Phe ^{δ} , 6x Phe ^{ϵ} , 3x Phe ^{ζ}), 4.63 (td, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 4.9$ Hz, Phe2 ^{α}), 4.54–4.48 (m, 7H, 3x N^{Trz}CH₂, Phe3 ^{α}), 4.47 (s, 6H, C^{Trz}CH₂), 4.04–3.94 (m, 1H, Phe1 ^{α}), 3.80 (t, 6H, $J = 5.3$ Hz, 3x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.64 (s, 6H, 3x OCH₂^{Tris}), 3.51–3.38 (m, 36H, 18x OCH₂), 3.22 (s, 9H, 3x OCH₃), 3.08–2.77 (m, 8H, Ahx ^{ϵ} , 3x Phe ^{β}), 2.03 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ahx ^{α}), 1.40 (p, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ahx ^{β}), 1.33–1.22 (m, 2H, Ahx ^{δ}), 1.18–1.08 (m, 2H, Ahx ^{γ}).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ /ppm: 143.9 (C-4^{Trz}), 129.6, 129.3, 128.5, 128.1 (Phe ^{δ} , Phe ^{ϵ} , Phe ^{ζ}), 124.1 (C-5^{Trz}), 71.3, 69.8, 69.6, 69.6, 69.6 (OCH₂^{EG}), 68.7 (N^{Trz}CH₂CH₂), 67.9 (OCH₂^{Tris}), 64.1 (C^{Trz}CH₂), 58.0 (OCH₃^{EG}), 49.3 (N^{Trz}CH₂), 38.7 (Phe ^{β}) 37.7 (Ahx ^{ϵ}), 36.0 (Ahx ^{α}), 28.9 (Ahx ^{δ}), 26.2 (Ahx ^{γ}), 25.2 (Ahx ^{β}).

Compound X-11



Trimesic acid (1.0 mg, 0.005 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DMF (1 mL) and PyBOP (7.5 mg, 0.015 mmol, 3.0 eq.) was added. The solution was cooled down in an ice bath and DiPEA (2.4 μ L, 0.015 mmol, 3.0 eq.) was added. **Compound X-10** (30.0 mg, 0.019 mmol, 3.8 eq.) was dissolved in DMF (1 mL) and was added to the reaction mixture. Another portion DiPEA (4.1 μ L, 0.020 mmol, 4.0 eq.) was added to the cooled solution and the ice bath was removed. The reaction was stirred at room temperature and the conversion was checked *via* analytical HPLC. After 16 h the solution was cooled down in an ice bath and another portion of DiPEA (2.4 μ L, 0.015 mmol, 3.0 eq.) and PyBOP (7.5 mg, 0.015 mmol, 3.0 eq.) was added. The ice bath was removed and stirred at room temperature for 24 h. Because the starting material wasn't fully consumed the solution was cooled down in an ice bath again and another portion of DiPEA (2.4 μ L, 0.015 mmol, 3.0 eq.) and PyBOP (7.5 mg, 0.015 mmol, 3.0 eq.) was added. The ice bath was removed and stirred at room temperature for 24 h. The reaction was quenched with Milli-Q water (0.1 mL) and

acidified with AcOH. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product purified *via* size exclusion chromatography (Bio-Beads S-X1, DMF) and then further purified *via* HPLC (Method F).

Yield: 11.1 mg (0.002 mmol, 48 %) colorless lyophilizate.

Or

from **Compound X-55** (9 mg, 0.004 mmol, 1.0 eq.) and **Compound X-60** (15 mg, 0.064 mmol, 18.0 eq.) according to SOP 4. (section 6.2.4)

Yield: 8 mg (1.79 μ mol, 50 %) colorless lyophilizate.

MF C₂₂₈H₃₃₆N₄₂O₆₀ MW 4625.43 [4622.4532].

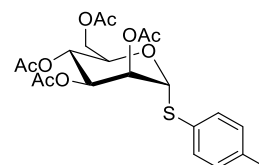
HR-TOF-MS (ESI, pos.), <i>m/z</i> : 2335.2194 [M+2Na] ²⁺	calc. 2335.2192
1564.4796 [M+3Na] ³⁺	calc. 1564.4759
1179.1078 [M+4Na] ⁴⁺	calc. 1179.1042

TOF-MS (MALDI, pos., CHCA) *m/z*: 4647.48 [M+Na]⁺ calc. 4647.45

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 8.68 (d, 3H, *J* = 8.3 Hz, 3x NH^{Phe1}), 8.24–8.18 (m, 6H, 3x NH^{Phe2}, 3x NH^{Phe3}), 8.16 (s, 3H, *H*-2^{BTA}, *H*-4^{BTA}, *H*-6^{BTA}), 8.00 (s, 9H, 9x *H*-5^{Trz}), 7.83 (t, 3H, *J* = 6.0 Hz, 3x NH^{Ahx}), 7.29–7.03 (m, 48H, 18x Phe ^{δ} , 18x Phe ^{ϵ} , 9x Phe ^{ζ} , 3x NH^{Tris}), 4.78–4.72 (m, 3H, 3x Phe1 ^{α}), 4.57 (q, 3H, *J* = 7.8 Hz, Phe2 ^{α}), 4.49 (t, 18H, *J* = 5.2 Hz, 9x N^{Trz}CH₂), 4.48–4.47 (m, 3H, Phe3 ^{α}), 4.46 (s, 18H, 9x C^{Trz}CH₂), 3.79 (t, 18H, *J* = 5.3 Hz, 9x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.64 (s, 18H, OCH₂^{Tris}), 3.52–3.38 (m, 108H, 54x OCH₂^{EG}), 3.20 (s, 27H, OCH₃), 3.05–2.75 (m, 24H, 3x Phe1 ^{β} , 3x Phe2 ^{β} , 3x Phe3 ^{β} , 3x Ahx ^{ϵ}), 2.02 (t, 6H, *J* = 7.5 Hz, 3x Ahx ^{α}), 1.39 (p, 6H, *J* = 7.6 Hz, Ahx ^{β}), 1.30–1.21 (m, 6H, 3x Ahx ^{δ}), 1.11 (p, 6H, *J* = 8.2 Hz, Ahx ^{γ}).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 172.9 (C=O^{Ahx}), 171.4 (C=O^{Phe2}, C=O^{Phe3}), 170.7 (C=O^{Phe1}), 165.7 (C=O^{BTA}), 144.3 (C-4^{Trz}), 138.6, 138.0, 137.9 (Phe ^{γ}), 134.7 (C-1^{BTA}, C-3^{BTA}, C-5^{BTA}), 129.7, 129.6 (C-2^{BTA}, C-4^{BTA}, C-6^{BTA}, Phe ^{ϵ}), 128.5, 128.4 (Phe ^{δ}), 126.7 126.7 (Phe ^{ζ}), 124.6 (C-5^{Trz}), 71.7, 70.2, 70.1, 70.0, 70.0 (OCH₂^{EG}), 69.2 (N^{Trz}CH₂CH₂), 68.3 (OCH₂^{Tris}), 60.0 (C_q^{Tris}), 58.5 (OCH₃^{EG}), 54.9 (Phe1 ^{α}), 54.4 (Phe3 ^{α}), 54.2 (Phe2 ^{α}), 49.8 (N^{Trz}CH₂), 38.9, 38.5, 38.0, 37.6 (Phe1 ^{β} , Phe2 ^{β} , Phe3 ^{β} , Ahx ^{ϵ}), 36.2 (Ahx ^{α}), 29.3 (Ahx ^{δ}), 25.5 (Ahx ^{β}).

Compound X-13



Compound X-37 (2.0 g, 5.1 mmol, 1.0 eq.) was added into a flame dried SCHLENK flask and dried under reduced pressure for 24 h. 4-Methylbenzenethiol was dissolved in dry DCM and stored over 4 Å molecular sieves to prepare a 5.56 M stock solution. 4-

Experimental Section

Methylbenzenethiol stock solution (5.56 M, 1.1 mL, 6.1 mmol, 1.2 eq.) was added and the solution was cooled down in an ice bath. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (48 %, 4.6 mL, 17.9 mmol, 3.5 eq.) was added dropwise over 1 h and the solution was stirred at 0 °C for 30 min. After that the ice bath was removed and the solution was stirred for 4 d at room temperature. The reaction mixture was poured into ice water and the liquid was extracted with DCM (3 x 20 mL). The organic layer was washed with saturated NaHCO_3 solution (3 x 35 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent removed *in vacuo*. The residue was purified *via* column chromatography (SiO_2 , CH:EA, iso. 2:1). Yield: 2.1 g (4.6 mmol, 90 %) yellow oil.

MF $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_9\text{S}$ MW 454.49 [454.1298].

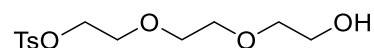
R_f : 0.38 (SiO_2 , CH:EA, 2:1).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 472.1637 [$\text{M} + \text{NH}_4$]⁺ calc. 472.1636

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 296 K, COSY) δ /ppm: 7.37 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $H-3^{\text{STol}}$, $H-5^{\text{STol}}$), 7.12 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, $H-2^{\text{STol}}$, $H-6^{\text{STol}}$), 5.50–5.48 (m, 1H, $H-2^{\text{Man}}$), 5.41 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, $H-1^{\text{Man}}$), 5.33–5.31 (m, 2H, $H-3^{\text{Man}}$, $H-4^{\text{Man}}$), 4.56 (ddd, 1H, $J = 9.9$ Hz, $J = 6.0$ Hz, $J = 2.4$ Hz, $H-5^{\text{Man}}$), 4.30 (dd, 1H, $J = 12.2$ Hz, $J = 5.9$ Hz, $H-6a^{\text{Man}}$), 4.10 (dd, 1H, $J = 11.9$ Hz, $J = 2.1$ Hz, $H-6b^{\text{Man}}$), 2.33 (s, 3H, $\text{CH}_3^{\text{STol}}$), 2.14 (s, 3H, CH_3 (AcO^2)), 2.07 (s, 3H, CH_3 (AcO^3)), 2.06 (s, 3H, CH_3 (AcO^6)), 2.01 (s, 3H, CH_3 (AcO^4)).

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 170.7 (C=O (AcO^6)), 170.1 (C=O (AcO^2)), 170.0 (C=O (AcO^4)), 169.9 (C=O (AcO^3)), 138.6 ($\text{C}-4^{\text{STol}}$), 132.8 ($\text{C}-3^{\text{STol}}$, $\text{C}-5^{\text{STol}}$), 130.1 ($\text{C}-2^{\text{STol}}$, $\text{C}-6^{\text{STol}}$), 128.9 ($\text{C}-1^{\text{STol}}$), 86.2 ($\text{C}-1^{\text{Man}}$), 71.0 ($\text{C}-2^{\text{Man}}$), 69.5 ($\text{C}-5^{\text{Man}}$, $\text{C}-4^{\text{Man}}$), 66.5 ($\text{C}-3^{\text{Man}}$), 62.6 ($\text{C}-6^{\text{Man}}$), 21.3 ($\text{CH}_3^{\text{STol}}$), 21.1 (CH_3 (AcO^2)), 20.9 (CH_3 (AcO^3)), 20.9 (CH_3 (AcO^6)), 20.8 (CH_3 (AcO^4)).

Compound X-14



A SCHLENK flask was charged with triethylene glycol (15.8 g, 104.9 mmol, 10.0 eq.) and dried under reduced pressure for 24 h. Abs. DCM (15 mL) was added and the solution was cooled down in an ice bath. TEA (2.2 mL, 1.6 g, 15.7 mmol, 1.5 eq.) and *p*-toluenesulfonyl chlorid (2.0 g, 10.5 mmol, 1.0 eq.) were added. The reaction mixture was stirred for 1.5 h at 0 °C and 5 d at room temperature. The solution was washed with Milli-Q water (3 x 20 mL) and the aqueous layer was extracted again with DCM (3 x 20 mL). The combined organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified *via* column chromatography (SiO_2 , iso. EA:DCM, 2:1) to yield a colorless oil.

Yield: 2.5 g (8.2 mmol, 78 %) colorless oil.

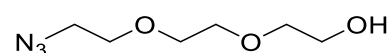
MF $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{S}$ MW 304.36 [304.0981].

R_f : 0.30 (SiO₂, DCM:EA, 1:2).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 327.0878 [M+Na]⁺ calc. 327.0873

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 7.81–7.76 (m, 2H, *H*-2^{Tosyl}, *H*-6^{Tosyl}), 7.51–7.46 (m, 2H, *H*-3^{Tosyl}, *H*-5^{Tosyl}), 4.57 (bs, 1H, OH^{EG}), 4.12–4.09 (m, 2H, TsO-CH₂^{EG}), 3.59–3.55 (m, 2H, TsO-CH₂CH₂^{EG}), 3.49–3.43 (m, 6H, OCH₂^{EG}), 3.40–3.36 (m, 2H, CH₂OH^{EG}), 2.42 (s, 3H, CH₃^{Tosyl}).

Compound X-15



Compound X-14 (1257.0 mg, 4.130 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in MeCN (150 mL) and sodium azide (537.0 mg, 8.260 mmol, 2.0 eq.) was added. The suspension was refluxed for 24 h. Milli-Q water (100 mL) was added to dissolve the precipitate and the aqueous layer was extracted with DCM (3 x 50 mL). The organic layer was washed with brine (50 mL) and the organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo* to yield a light yellow oil. Because the crude product still contained tosylate, the oil was dissolved in MeCN (25 mL) and sodium azide (190.0 mg, 2.923 mmol, 0.7 eq.) was added again. The reaction mixture was refluxed for 5 h, cooled down to room temperature and diluted with Milli-Q water (100 mL). The mixture was extracted with DCM (4 x 50 mL) and the organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo* to yield a light yellow oil.

Yield: 658 mg (3.756 mmol, 91 %) light yellow oil.

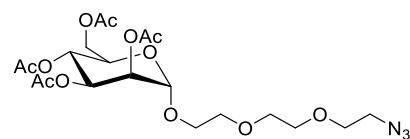
MF C₆H₁₃N₃O₃ MW 175.19 [175.0957].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 198.0851 [M+Na]⁺ calc. 198.0849

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ /ppm: 3.76–3.72 (m, 2H, CH₂OH^{EG}), 3.70–3.65 (m, 6H, OCH₂^{EG}), 3.63–3.60 (m, 2H, CH₂CH₂OH), 3.40 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz, CH₂N₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 72.6 (OCH₂^{EG}), 70.8 (OCH₂^{EG}), 70.5 (OCH₂^{EG}), 70.2 (OCH₂^{EG}), 61.9 (CH₂OH^{EG}), 50.8 (CH₂N₃).

Compound X-16



A flame dried SCHLENK flask was charged with dried 4 Å molecular sieves and **Compound X-13** (1000.0 mg, 2.200 mmol, 1.0 eq.) and **Compound X-15** (578.2 mg, 3.300 mmol, 1.5 eq.) were added and dissolved in abs. DCM (20 mL). The solution was

Experimental Section

stirred over molecular sieves for 24 h to dry the reaction mixture. NIS (594.2 mg, 2.640 mmol, 1.2 eq.) and AgOTf (56.5 mg, 0.220 mmol, 0.1 eq.) were added with argon counterflow and triflic acid (19.3 μ L, 33.0 mg, 0.220 mmol, 0.1 eq.) was added slowly. The reaction was stirred at room temperature for 15 h, diluted with DCM (50 mL) and filtered. The filtrate was washed with Na₂S₂O₃ solution (10 wt%, 2 x 50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified *via* column chromatography (SiO₂, grad. CH:EA 1:1 \rightarrow 1:2).

Yield: 552.0 mg (1.092 mmol, 50 %) light yellow oil.

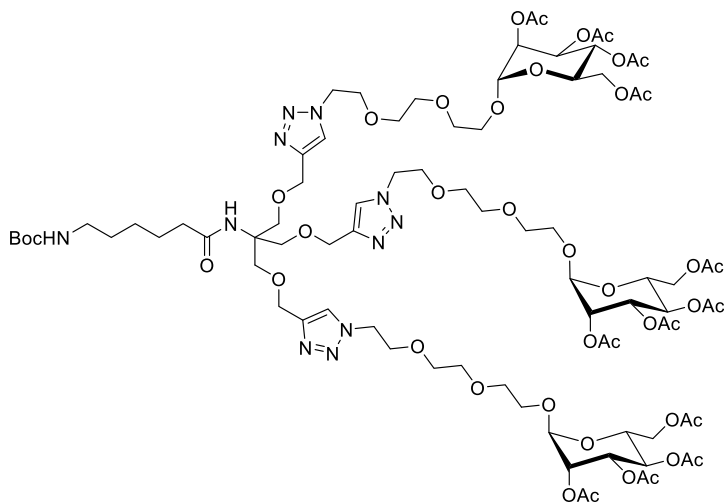
MF C₂₀H₃₁N₃O₁₂ MW 505.48 [505.1908].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 528.1798 [M+Na]⁺ calc. 528.1800

*R*_F = 0.44 (SiO₂, CH:EA, 1:2).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ /ppm: 5.36 (dd, 1H, *J* = 10.0 Hz, *J* = 3.3 Hz, *H*-2^{Man}), 5.30–5.24 (m, 2H, *H*-3^{Man}, *H*-4^{Man}), 4.87 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, *H*-1^{Man}), 4.29 (dd, 1H, *J* = 12.4 Hz, *J* = 5.2 Hz, *H*-6a^{Man}), 4.13–4.04 (m, 2H, *H*-5^{Man}, *H*-6b^{Man}), 3.73–3.62 (m, 10H, OCH₂^{EG}), 3.40 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz, CH₂N₃^{EG}), 2.15 (s, 3H, CH₃ (AcO)), 2.10 (s, 3H, CH₃ (AcO)), 2.04 (s, 3H, CH₃ (AcO)), 1.99 (s, 3H, CH₃ (AcO)).

Compound X-17



Compound X-3 (75.4 mg, 0.168 mmol, 1.0 eq.) and **Compound X-16** (340.0 mg, 0.673 mmol, 4.0 eq.) were dissolved in DMF (5 mL) in a pressure tube and degassed by performing three freeze-pump-thaw cycles. CuSO₄·5H₂O (42.0 mg, 0.168 mmol, 1.0 eq.), TBTA (89.2 mg, 0.168 mmol, 1.0 eq.) and sodium ascorbate (33.3 mg, 0.168 mmol, 1.0 eq.) were added under argon counterflow. Another three freeze-pump-thaw cycles were conducted and the reaction mixture was stirred at 50 °C for 25 h. Another portion of sodium ascorbate (33.3 mg, 0.168 mmol, 1.0 eq.) was added under argon counterflow and two freeze-pump-thaw cycles were conducted. The reaction was stirred at 60 °C for another 48 h until full conversion was achieved. The solvent was removed *in vacuo* and

the remainder purified *via* column chromatography (SiO₂, iso. DCM:MeOH, 10:1), size exclusion chromatography (Bio-Beads S-X1, DMF) and finally MPLC (C18, A: H₂O, B: MeCN, grad. 30 %B to 100 %B).

Yield: 216 mg (0.110 mmol, 65 %) light yellow oil.

MF C₈₄H₁₂₉N₂₂O₄₂

MW 1964.99 [1963.8297].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1964.8326 [M+H]⁺ calc. 1964.8370

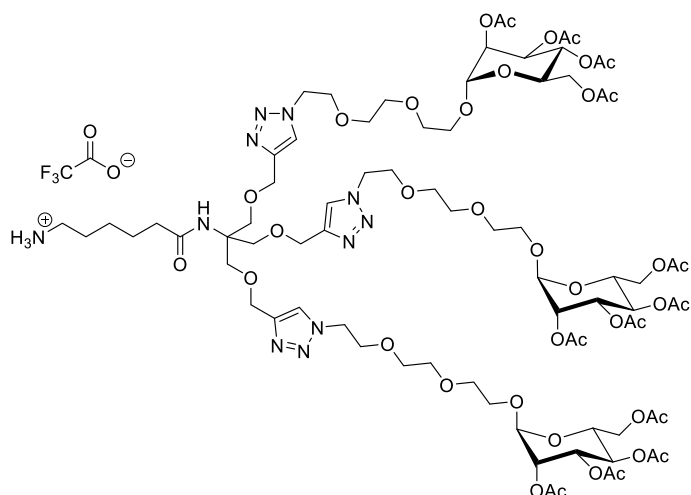
983.9236 [M+2H]²⁺ calc. 982.9221

*R*_F = 0.50 (SiO₂, DCM:MeOH, 10:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ/ppm: 7.73 (s, 3H, 3x *H*-5^{Trz}), 6.29 (s, 1H, *NH*^{Tris}), 5.36–5.28 (m, 6H, 3x *H*-3^{Man}, 3x *H*-4^{Man}), 5.25 (dd, 3H, *J* = 3.3 Hz, *J* = 1.8 Hz, 3x *H*-2^{Man}), 4.87 (d, 3H, *J* = 1.7 Hz, 3x *H*-1^{Man}), 4.59 (s, 6H, 3x *C*^{Trz}CH₂), 4.57 (t, 6H, *J* = 5.2 Hz, 3x *N*^{Trz}CH₂), 4.28 (dd, 3H, *J* = 12.2 Hz, *J* = 5.0 Hz, 3x *H*-6a^{Man}), 4.10 (dd, 3H, *J* = 12.3 Hz, *J* = 2.4 Hz, 3x *H*-6b^{Man}), 4.04 (ddd, 3H, *J* = 9.4 Hz, *J* = 5.0 Hz, *J* = 2.4 Hz, 3x *H*-5^{Man}), 3.90 (t, 6H, *J* = 5.2 Hz, 3x *N*^{Trz}CH₂CH₂), 3.84–3.76 (m, 9H, 3x *OCH*₂^{Tris}, 3x *OCH*'*H*'^{EG}), 3.69–3.59 (m, 21H, 9x *OCH*₂^{EG}, 3x *OCH*'*H*'^{EG}), 3.06 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, *Ahx*^ε), 2.15 (s, 9H, 3x *CH*₃ (OAc)), 2.10 (s, 9H, 3x *CH*₃ (OAc)), 2.09–2.04 (m, 2H, *Ahx*^α), 2.03 (s, 9H, 3x *CH*₃ (OAc)), 1.98 (s, 9H, 3x *CH*₃ (OAc)), 1.58 (p, 2H, *J* = 7.5 Hz, *Ahx*^β), 1.51–1.39 (m, 11H, *Ahx*^δ; 3x *CH*₃^{Boc}), 1.36–1.27 (m, 2H, *Ahx*^γ).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 170.8, 170.2, 170.1, 169.9 (C=O (OAc)), 144.6 (C-4^{Trz}), 124.0 (C-5^{Trz}), 97.8 (C-1^{Man}), 70.8, 70.7, 70.1 (OCH₂^{EG}), 69.7 (*N*^{Trz}CH₂CH₂), 69.6 (C-2^{Man}), 69.2 (C-4^{Man}, OCH₂^{Tris}), 68.6 (C-5^{Man}), 67.5 (OCH₂^{EG}), 66.2 (C-3^{Man}), 64.7 (C^{Trz}CH₂), 62.5 (C-6^{Man}), 59.8 (C_q^{Tris}), 50.5 (*N*^{Trz}CH₂), 40.5 (*Ahx*^ε), 37.1 (*Ahx*^α), 29.8 (*Ahx*^δ), 28.6 (CH₃^{Boc}), 26.4 (*Ahx*^γ), 25.4 (*Ahx*^β), 21.1, 20.9, 20.9 20.9 (CH₃ (OAc)).

Compound X-18



Compound X-17 (113.8 mg, 0.099 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM/TFA (1/1, 10 mL) and stirred for 5 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and co-distilled with toluene (5 x 3 mL). The crude oil was dried under reduced pressure.

Yield: 184.0 mg (0.099 mmol, quant.) light yellow oil.

MF C₇₉H₁₂₁N₁₁O₄₀·TFA

MW 1865.88 [1864.7845].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1886.7653 [M-TFA+Na]⁺

calc. 1886.7664

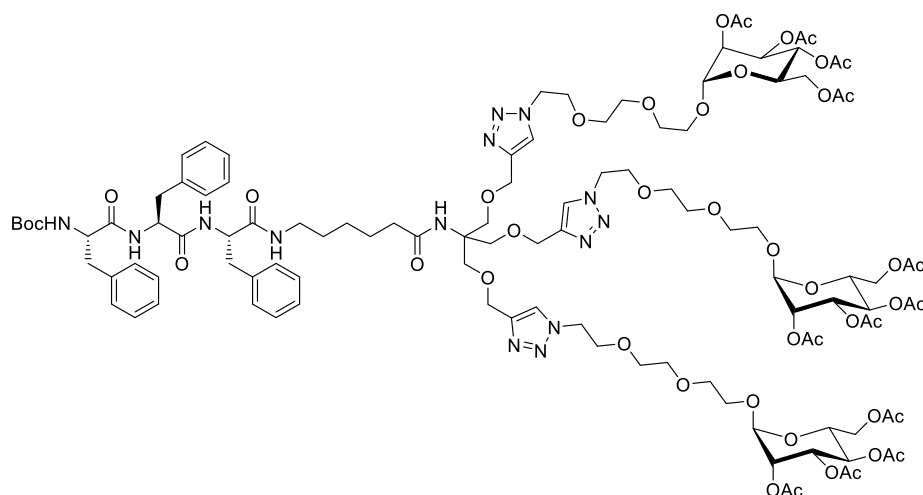
954.8754 [M-TFA+2Na]²⁺

calc. 954.8778

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ/ppm: 7.88 (s, 3H, 3x *H*-5^{Trz}), 5.34–5.27 (m, 6H, 3x *H*-3^{Man}, 3x *H*-4^{Man}), 5.27–5.22 (m, 3H, 3x *H*-2^{Man}), 4.87 (d, 3H, *J* = 1.6 Hz, 3x *H*-1^{Man}), 4.69–4.52 (m, 12H, 3x C^{Trz}CH₂, 3x N^{Trz}CH₂), 4.28 (dd, 3H, *J* = 12.2 Hz, *J* = 4.9 Hz, 3x *H*-6a^{Man}), 4.15–3.99 (m, 6H, 3x *H*-6b^{Man}, 3x *H*-5^{Man}), 3.98–3.88 (t, 6H, *J* = 5.2 Hz, 3x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.86–3.75 (m, 9H, 3x OCH₂^{Tris}, 3x OCH'H^{EG}), 3.71–3.52 (m, 21H, 9x OCH₂^{EG}, 3x OCH'H^{EG}), 3.14–3.00 (m, 2H, Ahx^ε), 2.33–2.23 (m, 2H, Ahx^α), 2.15 (s, 3H, CH₃ (OAc)), 2.10 (s, 3H, CH₃ (OAc)), 2.04 (s, 3H, CH₃ (OAc)), 1.98 (s, 3H, CH₃ (OAc)), 1.78–1.66 (m, 2H, Ahx^β), 1.66–1.52 (m, 2H, Ahx^δ), 1.41–1.28 (m, 2H, Ahx^γ).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ/ppm: 170.8 (C=O (OAc)), 97.7 (C-1^{Man}), 70.5, 70.0, 69.5, 69.1, 68.5 (OCH₂^{EG}, C-2^{Man}, C-4^{Man}, C-5^{Man}), 67.4 (C-6^{Man}), 66.1 (C-3^{Man}), 20.9, 20.8 (CH₃ (OAc)).

Compound X-19



A round bottom flask was charged with **Compound X-8** (74.3 mg, 0.133 mmol, 1.2 eq.), PyBOP (69.1 mg, 0.133 mmol, 1.2 eq.) and HOBt·H₂O (20.3 mg, 0.133 mmol, 1.2 eq.). **Compound X-18** (219.0 mg, 0.111 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DMF (5 mL) and added to the flask. The solution was cooled down in an ice bath and NMM (29.2 μ L, 0.266 mmol, 2.4 eq.) was added in three equal portions over the course of 1 h. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The solution was cooled down in an ice bath again and another portion of NMM (100.0 μ L, 0.911 mmol, 8.2 eq.), **Compound X-8** (37.2 mg, 0.067 mmol, 0.6 eq.) and PyBOP (69.1 mg, 0.133 mmol, 1.2 eq.) was added. The ice bath was removed and the reaction was stirred at room temperature for additional 31 h. The reaction was quenched by addition of Milli-Q water (100 μ L) and acetic acid (100 μ L). The solvent was removed *in vacuo* and the remainder dissolved in MeOH (1 mL) and purified *via* size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH).

Yield: 240 mg (0.100 mmol, 90 %) light yellow oil.

MF C₁₁₁H₁₅₆N₁₄O₄₅ MW 2406.52 [2405.0349].

R_F: 0.43 (SiO₂, DCM:MeOH, 10:1).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 2407.0405 [M+H]⁺ calc. 2407.0456

1204.0248 [M+2H]²⁺ calc. 1204.0264

1226.0060 [M+2Na]²⁺ calc. 1226.0084

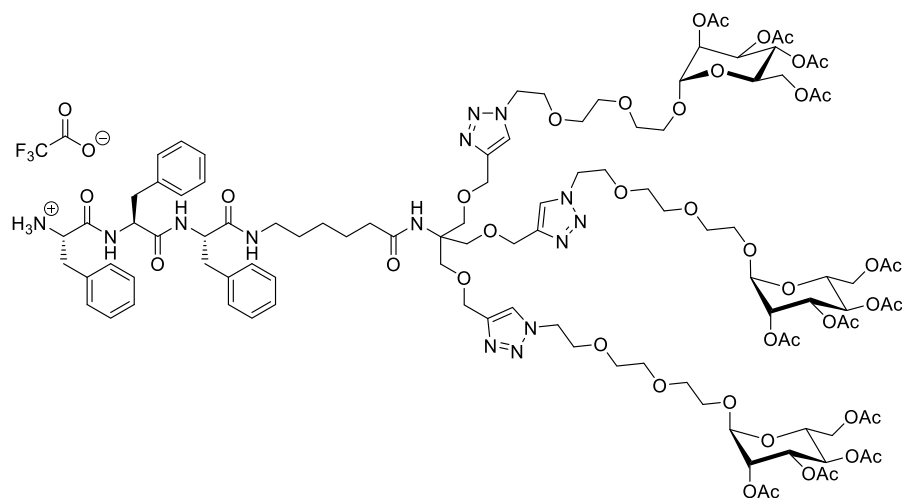
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ /ppm: 7.72 (s, 3H, 3x H-5^{Trz}), 7.31–6.89 (m, 15H, 6x Phe^o, 6x Phe^e, 3x Phe^c), 6.71 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, NH^{Phe}), 6.63 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz, NH^{Phe}), 6.50 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, NH^{Phe}), 6.29 (s, 1H, NH^{Tris}), 5.38–5.27 (m, 6H, 3x H-3^{Man}, 3x H-4^{Man}), 5.25 (dd, 3H, *J* = 3.1 Hz, *J* = 1.8 Hz, 3x H-2^{Man}), 4.87 (d, 3H, *J* = 1.7 Hz, 3x H-1^{Man}), 4.72–4.49 (m, 14H, 3x C^{Trz}CH₂, 3x N^{Trz}CH₂, 2x Phe ^{α}), 4.49–4.38 (m, 1H, Phe ^{α}), 4.28 (dd, 3H, *J* = 12.2 Hz, *J* = 4.9 Hz, 3x H-6a^{Man}), 4.14–3.98 (m, 6H, 3x H-6b^{Man}, 3x H-5^{Man}), 3.89 (t, 6H, *J* = 5.2 Hz, 3x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.85–3.73 (m, 9H, 3x OCH₂^{Tris}, 3x OCH^{H'}EG), 3.69–3.59 (m, 21H,

Experimental Section

9x OCH₂^{EG}, 3x OCH'H''^{EG}, 3.23–2.81 (m, 8H, Ahx^ε, 3x Phe^β), 2.19–1.94 (m, 14H, 4x CH₃ (OAc), Ahx^α), 1.60–1.48 (m, 2H, Ahx^β), 1.48–1.35 (m, 2H, Ahx^δ), 1.35–1.16 (m, 11H, 3x CH₃^{Boc}, Ahx^γ).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 170.8, 170.2, 170.1, 169.9 (C=O (OAc)), 144.6 (C-4^{Trz}), 128.9, 128.6, 127.3 (Phe^δ, Phe^ε, Phe^ζ), 124.0 (C-5^{Trz}), 97.8 (C-1^{Man}), 70.8, 70.6, 70.1 (OCH₂^{EG}), 69.7 (C-2^{Man}, N^{Trz}CH₂CH₂), 67.5 (OCH₂^{EG}), 66.2 (C-3^{Man}), 64.7 (C^{Trz}CH₂), 62.5 (C-6^{Man}), 50.4 (N^{Trz}CH₂), 37.4 (Phe^β), 28.3 (CH₃^{Boc}), 21.1, 20.9 (CH₃ (OAc)).

Compound X-20



Compound X-19 (240.0 mg, 0.100 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM/TFA (1/1, 10 mL) and stirred at room temperature for 2 h. The solvent was removed *in vacuo* and the remainder was co-distilled with toluene (5 x 6 mL) and purified *via* HPLC (Method F).

Yield: 131.0 mg (0.054 mmol, 54 %) light yellow oil.

MF C₁₀₆H₁₄₈N₁₄O₄₃·TFA

MW 2420.4282

[2418.9753].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1153.9990 [M-TFA+2H]²⁺

calc. 1154.0002

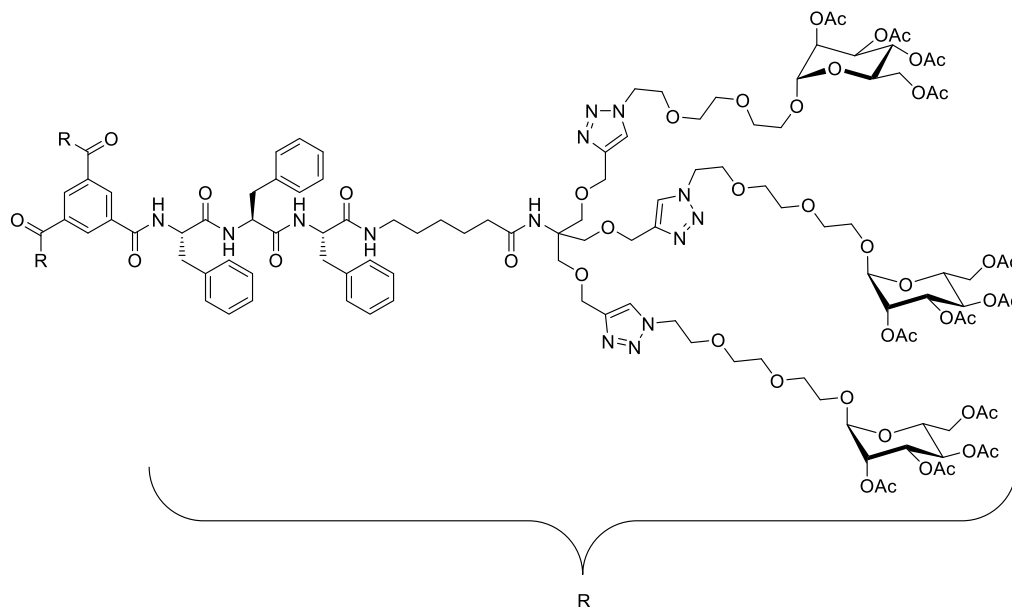
769.6682 [M-TFA+3H]²⁺

calc. 769.6692

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 8.68 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, NH^{Phe}), 8.42 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH^{Phe}), 8.03–7.94 (m, 6H, NH₃^{+Phe}, 3x H-5^{Trz}), 7.85 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, NH^{Ahx}), 7.31–7.01 (m, 15H, 6x Phe^δ, 6x Phe^ε, 3x Phe^ζ, NH^{Tris}), 5.15–5.07 (m, 9H, 3x H-2^{Man}, 3x H-3^{Man}, 3x H-4^{Man}), 4.91 (d, 3H, *J* = 1.4 Hz, 3x H-1^{Man}), 4.51 (t, 6H, *J* = 5.2 Hz, 3x N^{Trz}CH₂), 4.47 (s, 6H, 3x C^{Trz}CH₂), 4.15 (dd, 3H, *J* = 12.2 Hz, *J* = 5.1 Hz, 3x H-6a^{Man}), 4.08–3.94 (m, 6H, 3x H-5^{Man}, 3x H-6b^{Man}), 3.82 (t, 6H, *J* = 5.3 Hz, 3x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.76–3.46 (m, 30H, 3x C_q^{Tris}CH₂, 12x OCH₂^{EG}), 3.09–2.70 (m, 8H, 3x Phe^β, Ahx^ε), 2.11 (s, 9H, 3x CH₃ (OAc)), 2.01 (s, 18H, 6x CH₃ (OAc)), 1.94 (s, 9H, 3x CH₃ (OAc)), 1.46–1.34 (m, 2H, Ahx^β), 1.34–1.21 (m, 2H, Ahx^δ), 1.21–1.06 (m, 2H, Ahx^γ).

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals, δ/ppm : 124.3 (C-5^{Trz}), 96.7 (C-1^{Man}), 69.6, 69.5 (OCH_2^{EG}), 69.2 (C-2^{Man}), 68.7 (C-4^{Man}, $\text{N}^{\text{Trz}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 67.8 (C-5^{Man}, $\text{C}_q\text{CH}_2^{\text{Tris}}$), 66.6 (OCH_2^{EG}), 65.4 (C-3^{Man}), 64.1 ($\text{C}^{\text{Trz}}\text{CH}_2$), 61.9 (C-6^{Man}), 49.3 ($\text{N}^{\text{Trz}}\text{CH}_2$), 20.6, 20.5, 20.4 (CH_3 (OAc)).

Compound X-21



Peptide grade DMF was degassed for 10 min by passing a stream of argon through the liquid. Trimesic acid (0.9 mg, 0.004 mmol, 1.0 eq.) and Compound X-20 (45.0 mg, 0.019 mmol, 4.5 eq.) were dissolved in degassed DMF (1 mL) and PyBOP (6.4 mg, 0.012 mmol, 3.0 eq.) was added. The reaction mixture was cooled down in an ice bath and DiPEA (6.48 μL , 0.036 mmol, 9.0 eq.) was added over the course of 30 min. The ice bath was removed and the reaction stirred at room temperature for 6 h. The flask was cooled down again in an ice bath and further DiPEA (2.16 μL , 0.012 mmol, 3.0 eq.) and PyBOP (6.4 mg, 0.012 mmol, 3.0 eq.) were added. The ice bath was removed and the reaction was stirred for another 22 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of Milli-Q water (0.1 mL) and acetic acid (0.1 mL) and the solvent was removed *in vacuo*. The remainder was purified *via* size exclusion chromatography (Bio Beads S-X1, DMF).

Yield: 20.6 mg (0.003 mmol, 73 %) light yellow oil.

MF $\text{C}_{327}\text{H}_{444}\text{N}_{42}\text{O}_{132}$

MW 7075.31 [7073.9422].

R_f : 0.36 (SiO_2 , $\text{DCM}:\text{MeOH}$, 20:1).

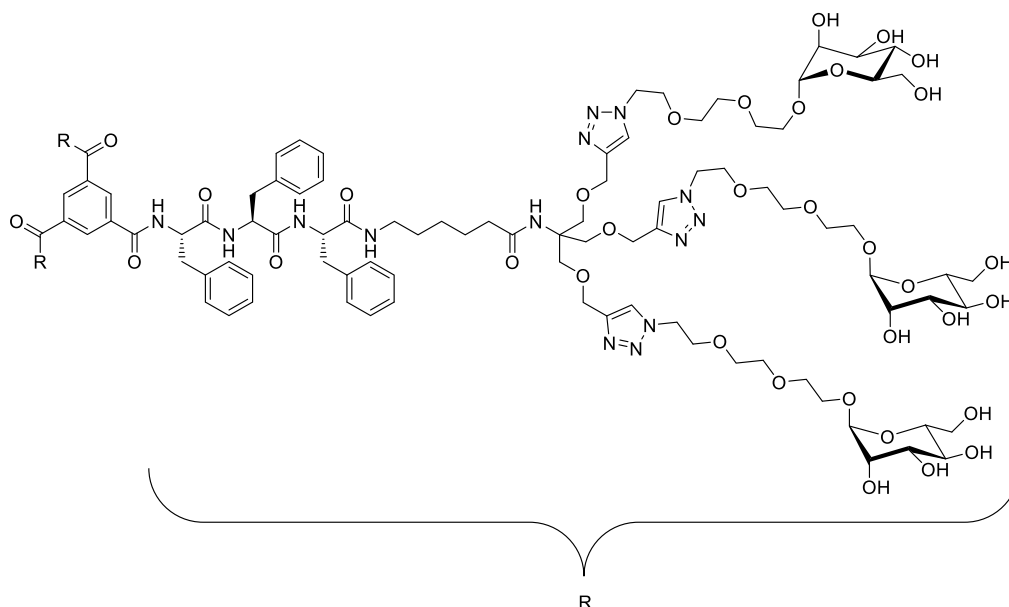
^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, COSY) δ/ppm : 8.66 (d, 3H, $J = 8.0$ Hz, 3x NH^{Phe1}), 8.24–8.17 (m, 6H, NH^{Phe2} , NH^{Phe3}), 8.16 (s, 3H, $H\text{-}2^{\text{BTA}}$, $H\text{-}4^{\text{BTA}}$, $H\text{-}6^{\text{BTA}}$), 8.00 (s, 9H, 9x $H\text{-}5^{\text{Trz}}$), 7.84–7.80 (m, 3H, 3x NH^{Ahx}), 7.29–7.03 (m, 48H, 18x Phe^{d} , 18x Phe^{e} , 9x Phe^{c} , 3x NH^{Tris}), 5.12–5.07 (m, 27H, 9x $H\text{-}2^{\text{Man}}$, 9x $H\text{-}3^{\text{Man}}$, 9x $H\text{-}4^{\text{Man}}$), 4.90 (d, 9H, $J = 1.5$ Hz, 9x $H\text{-}1^{\text{Man}}$), 4.78–4.72 (m, 3H, 3x $\text{Phe}1^{\alpha}$), 4.60–4.54 (m, 3H, 3x $\text{Phe}2^{\alpha}$), 4.50 (t, 18H, $J = 5.3$ Hz, 9x $\text{N}^{\text{Trz}}\text{CH}_2$), 4.48–

Experimental Section

4.44 (m, 21H, 3x Phe3^α, 9xC^{Trz}CH₂), 4.14 (dd, 9H, *J* = 12.2 Hz, *J* = 5.1 Hz, 9x *H*-6a^{Man}), 4.03 (dd, 9H, *J* = 12.2 Hz, *J* = 2.5 Hz, 9x *H*-6b^{Man}), 4.00–3.95 (m, 9H, 9x *H*-5^{Man}), 3.81 (t, 18H, *J* = 5.3 Hz, 9x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.70 (dt, 9H, *J* = 11.0 Hz, *J* = 4.4 Hz, 9x OCH'^{H'}EG), 3.63 (s, 18H, 9x C_qCH₂^{Tris}), 3.61–3.41 (m, 81H, 36x OCH₂^{EG}, 9x OCH'^{H'}EG), 3.05–2.74 (m, 24H, 9x Phe^β, 3x Ahx^ε), 2.10 (s, 27H, 9x CH₃ (OAc)), 2.00 (s, 60H, 18x CH₃ (OAc), 3x Ahx^α), 1.92 (s, 27H, 9x CH₃ (OAc)), 1.43–1.35 (m, 6H, 3x Ahx^β), 1.30–1.22 (m, 6H, 3x Ahx^δ), 1.15–1.07 (m, 6H, Ahx^γ).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 172.5 (C=O^{Ahx}), 171.0, 170.5, 170.3 (C=O^{Phe}), 170.1, 169.7, 169.5 (C=O (OAc)), 165.3 (C=O^{BTA}), 143.9 (C-4^{Trz}), 138.2, 137.6, 137.5 (Phe^γ), 129.2, 129.2, 128.1, 128.1, 128.0 (Phe^δ, Phe^ε), 126.3, 126.3 (Phe^ζ), 124.1 (C-5^{Trz}), 96.6 (C-1^{Man}), 69.7, 69.5, 69.2 (OCH₂^{EG}), 68.8 (N^{Trz}CH₂CH₂), 68.7 (C-2^{Man}), 67.9 (C_qCH₂^{Tris}), 67.8 (C-5^{Man}), 66.6 (OCH₂^{EG}), 65.4 (C-4^{Man}), 64.1 (C^{Trz}CH₂), 61.9 (C-6^{Man}), 59.5 (C_q^{Tris}), 54.4 (Phe1^α), 54.0 (Phe3^α), 53.8 (Phe2^α), 49.3 (N^{Trz}CH₂), 38.5, 38.1, 37.6, 37.1 (Phe^β, Ahx^ε), 35.8 (Ahx^α), 28.8 (Ahx^δ), 26.0 (Ahx^γ), 25.0 (Ahx^β), 20.6, 20.5, 20.5, 20.5 (CH₃ (OAc)).

Compound X-22



Compound X-21 (28.5 mg, 0.004 mmol, 1.0 eq.) was suspended in MeOH/DCM (9/1, 20 mL) and NaOMe in MeOH (0.5 M, 550 μL) was added to adjust the pH to 10.5. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h and was quenched by addition of acetic acid (20 μL) afterwards. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified *via* size exclusion chromatography (BioBeads S-X1, DMF), before further purification *via* HPLC (Method F).

Yield: 8.3 mg (0.0015 mmol, 37 %) colorless lyophilizate.

MF C₂₅₅H₃₇₂N₄₂O₉₆

MW 5561.98 [5558.5518].

Experimental Section

solution (6 mL). The resulting suspension was centrifuged again to collect the precipitate after discarding the supernatant. The crude solid was suspended in Milli-Q water and lyophilized to yield a light yellow amorphous solid.

Yield: 40.8 mg (0.043 mmol, 78%) light yellow amorphous solid.

MF C₅₂H₅₈N₆O₁₂ MW 947.06 [946.4113].

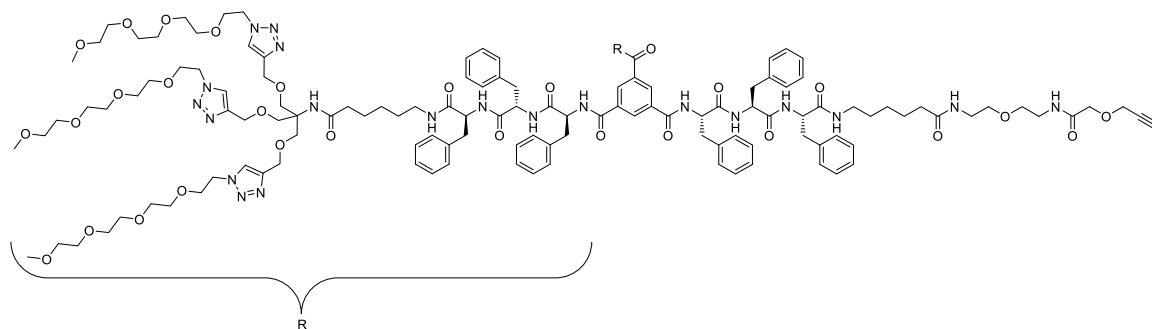
R_F: 0.64 (SiO₂, DCM:MeOH, 4:1 + 0.1 % AcOH).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 969.3999 [M+Na]⁺ calc. 969.4005.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 9.04 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, NH^{Phe-1}), 8.55 (s, 3H, H-2^{BTA}, H-4^{BTA}, H-6^{BTA}), 8.19 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, NH^{Phe-2}), 8.15 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, NH^{Phe-3}), 7.87 (m, 3H, NH^{Ahx}, 2xNH^{EG}), 7.30–7.05 (m, 15H, 6xPhe^δ, 6xPhe^ε, 3xPhe^ζ), 4.73 (ddd, 1H, *J* = 10.8 Hz, *J* = 8.5 Hz, *J* = 4.3 Hz, Phe-1^α), 4.53 (ddd, 1H, *J* = 8.5 Hz, *J* = 8.4 Hz, *J* = 4.8 Hz, Phe-2^α), 4.45 (ddd, 1H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 8.2 Hz, *J* = 6.0 Hz, Phe-3^α), 4.21 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, CH₂^{PGA}), 3.89 (s, 2H, OCH₂-CO^{PGA}), 3.50 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, CH^{PGA}), 3.14–3.08 (m, 4H, 2xNHCH₂^{EG}), 3.05–2.90 (m, 10H, Ahx^ε, 2xOCH₂^{EG}, Phe-1^β, Phe-3^β), 2.86–2.77 (m, 2H, Phe-2^β), 2.01 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, Ahx^α), 1.43 (quint, 2H, *J* = 7.6 Hz, Ahx^β), 1.32–1.26 (m, 2H, Ahx^δ), 1.18–1.09 (m, 2H, Ahx^γ).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 172.35 (C=O^{Ahx}), 170.98, 170.41, 170.29 (C=O^{Phe}), 168.65 (C=O^{PGA}), 166.15 (C=O^{BTA-3}, C=O^{BTA-5}), 164.67 (C=O^{BTA-1}), 138.31, 137.58, 137.30 (Phe^γ), 132.22 (C-2^{BTA}, C-4^{BTA}, C-6^{BTA}), 131.49 (C_q-1^{BTA}, C_q-3^{BTA}, C_q-5^{BTA}), 129.26, 129.18, 129.09, 128.07, 128.04, 127.95 (Phe^δ, Phe^ε), 126.28, 126.20 (Phe^ζ), 79.60 (C_q^{PGA}), 77.92, (CH^{PGA}), 68.33 (OCH₂-CO^{PGA}), 57.84 (CH₂^{PGA}), 54.78 (Phe-1^α), 54.05 (Phe-3^α), 53.93 (Phe-2^α), 38.46, 38.22, 38.03 (Ahx^ε, Phe^β, OCH₂^{EG}, NHCH₂^{EG}), 37.46, 36.63 (Phe^β), 35.38 (Ahx^α), 28.75 (Ahx^δ), 26.03 (Ahx^γ), 24.96 (Ahx^β).

Compound X-25



Compound X-24 (5.9 mg, 0.006 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DMF (1 mL) and PyBOP (6.8 mg, 0.013 mmol, 2.1 eq.) was added. The solution was cooled down in an ice bath and DiPEA (2.16 μL, 0.012 mmol, 2.0 eq.) was added. **Compound X-10** (30.0 mg, 0.019 mmol, 3.0 eq.) dissolved in DMF (0.5 mL) was added and the cooled reaction was stirred for 30 min. Another portion of DiPEA (3.24 μL, 0.018 mmol, 3.0 eq.) was added and the ice

bath removed to stir the reaction at room temperature. After 17 h the reaction mixture was cooled again in an ice bath and another portion of PyBOP (6.8 mg, 0.013 mmol, 2.1 eq.) and DiPEA (5.43 μ L, 0.031 mmol, 5 eq.) were added. The ice bath was removed and the reaction was stirred for another 47 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of H₂O (0.1 mL) and acetic acid (0.1 mL) and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified *via* size exclusion chromatography (BioBeads S-X1, DMF) before further purification *via* HPLC (Method F).

Yield: 6.7 mg (0.0017 mmol, 28 %) colorless lyophilizate.

MF C₁₉₇H₂₇₈N₃₄O₄₈

MW 3890.58 [3888.0358].

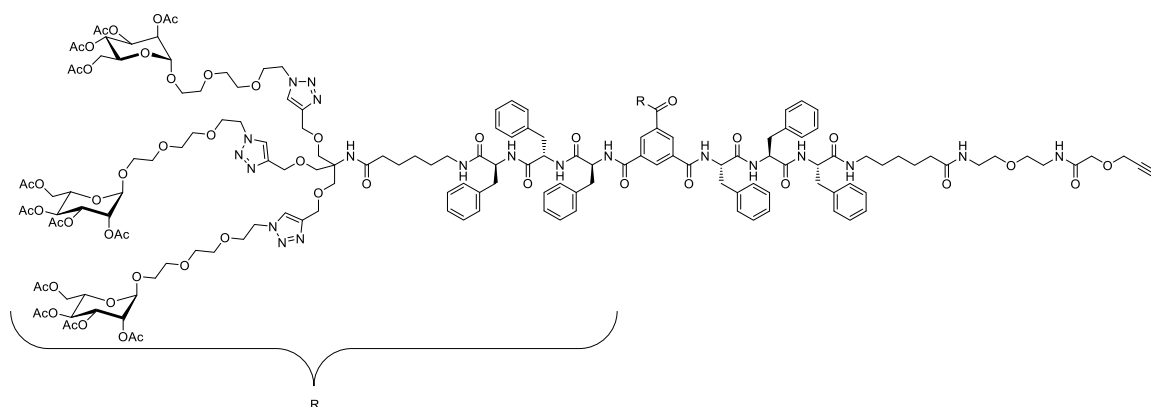
TOF-MS (MALDI, pos., CHCA), *m/z*: 3908.22 [M+Na]⁺ calc. 3911.03

3923.83 [M+K]⁺ calc. 3927.00

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 8.68 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, 3x NH^{Phe1}), 8.24–8.18 (m, 6H, 3x NH^{Phe2}, 3x NH^{Phe3}), 8.17 (s, 3H, *H*-2^{BTA}, *H*-4^{BTA}, *H*-6^{BTA}), 8.00 (s, 6H, 6x *H*-5^{Trz}), 7.86–7.76 (m, 5H, 3xNH^{Ahx}, 2xNH^{EG}), 7.29–7.03 (m, 47H, 18x Phe ^{δ} , 18x Phe ^{ϵ} , 9x Phe ^{ζ} , 2x NH^{Tris}), 4.78–4.72 (m, 3H, 3x Phe1 ^{α}), 4.60–4.54 (m, 3H, 3x Phe2 ^{α}), 4.49 (t, 12H, *J* = 5.2 Hz, 6x N^{Trz}CH₂), 4.48–4.42 (m, 15H, 6x C^{Trz}CH₂, 3x Phe3 ^{α}), 4.21 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, CH₂-C \equiv CH^{PGA}), 3.91 (s, 2H, C=OCH₂O^{PGA}), 3.79 (t, 12H, *J* = 5.3 Hz, 6x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.64 (s, 12H, OCH₂^{Tris}), 3.52 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, CH₂C \equiv CH^{PGA}), 3.52–3.43 (m, 60H, 30x OCH₂^{EG}), 3.41–3.37 (m, 16H, 8x OCH₂^{EG}), 3.24 (q, 2H, *J* = 6.0 Hz, NHCH₂^{EG}), 3.21 (s, 18H, 6x OCH₃^{EG}), 3.17 (q, 2H, *J* = 6.0 Hz, NHCH₂^{EG}), 3.05–2.75 (m, 24H, 3x Ahx ^{ϵ} , 9x Phe ^{β}), 2.03 (q, 6H, *J* = 7.6 Hz, Ahx ^{α}), 1.46–1.35 (m, 6H, Ahx ^{β}), 1.27 (p, 6H, *J* = 7.4 Hz, Ahx ^{δ}), 1.16–1.07 (m, 6H, Ahx ^{γ}).

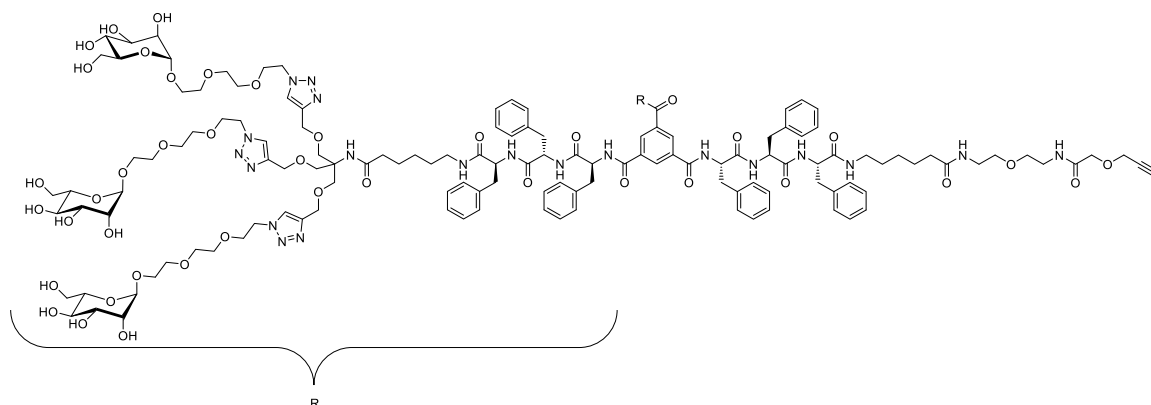
¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 172.9 (C=O^{Ahx}), 172.6 (C=O^{Ahx}), 171.4, 170.9, 170.7 (C=O^{Phe}), 169.0 (C=O^{PGA}), 165.7 (C=O^{BTA}), 144.3 (C-4^{Trz}), 138.6, 138.0, 137.9 (Phe ^{γ}), 129.7, 129.6, 129.6, 128.5, 128.5, 128.4, 126.7, 126.7 (C-2^{BTA}, C-4^{BTA}, C-6^{BTA}, Phe ^{δ} , Phe ^{ϵ} , Phe ^{ζ}), 124.6 (C-5^{Trz}), 80.0 (CH₂C \equiv CH), 78.4 (CH₂C \equiv CH), 71.7, 70.2, 70.1, 70.0, 70.0, 69.3 (OCH₂^{EG}), 69.2 (N^{Trz}CH₂CH₂), 69.0 (OCH₂^{EG}), 68.7 (C=OCH₂O^{PGA}), 68.3 (OCH₂^{Tris}), 64.6 (C^{Trz}CH₂), 60.0 (C_q^{Tris}), 58.5 (OCH₃^{EG}), 58.2 (CH₂C \equiv CH^{PGA}), 54.9, 54.4, 54.2 (Phe ^{α}) 49.8 (N^{Trz}CH₂), 38.9, 38.4, 38.0, 37.5 (Phe ^{β} , Ahx ^{ϵ} , NHCH₂^{EG}), 36.2, 35.7 (Ahx ^{α}), 29.3, 29.2 (Ahx ^{δ}), 26.5, 26.4 (Ahx ^{γ}), 25.4 (Ahx ^{β}).

Compound X-28



Compound X-24 (3.9 mg, 0.004 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DMF (1 mL) and PyBOP (4.5 mg, 0.009 mmol, 2.1 eq.) was added. The solution was cooled down in an ice bath and DiPEA (1.44 μ L, 0.008 mmol, 2.0 eq.) was added. Compound **X-20** (30.0 mg, 0.012 mmol, 3.0 eq.) was added and the cooled reaction was stirred for 10 min. Another portion of DiPEA (2.19 μ L, 0.012 mmol, 3.0 eq.) was added and the ice bath removed to stir the reaction at room temperature. After 17 h the reaction mixture was cooled again in an ice bath and another portion of PyBOP (4.5 mg, 0.009 mmol, 2.1 eq.) and DiPEA (5.04 μ L, 0.028 mmol, 7 eq.) were added. The ice bath was removed and the reaction was stirred for another 47 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of H₂O (0.1 mL) and acetic acid (0.1 mL) and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified *via* size exclusion chromatography (BioBeads S-X1, DMF). The product was used without further purification for the deprotection step.

Compound X-29



Compound X-28 (22.6 mg, 0.004 mmol, 1.0 eq.) was suspended in dry MeOH (5 mL) and NaOMe (0.5 M in MeOH, 600 μ L) was added to adjust the pH to pH 9. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, the reaction was quenched by addition of acetic acid (40 μ L) and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified *via* size exclusion chromatography (BioBeads S-X1, DMF) before further purification *via* HPLC (Method E).

Yield: 7.0 mg (0.0016 mmol, 40 %) colorless lyophilizate.

MF C₂₁₅H₃₀₂N₃₄O₇₂

MW 4514.95 [4512.1015].

TOF-MS (MALDI, pos., CHCA), *m/z*: 4536.64 [M+Na]⁺

calc. 4537.10

4552.96 [M+K]⁺

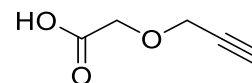
calc. 4553.07

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 8.67 (d, 3H, *J* = 9.5 Hz, 3x NH^{Phe1}), 8.25–8.18 (m, 6H, 3x NH^{Phe2}, 3x NH^{Phe3}), 8.16 (s, 3H, *H*-2^{BTA}, *H*-4^{BTA}, *H*-6^{BTA}), 8.01 (s, 6H, 6x *H*-5^{Trz}), 7.86–7.80 (m, 4H, 3x NH^{Ahx}, NH^{EG}), 7.78 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, NH^{EG}), 7.29–7.02 (m, 47H, 18x Phe^δ, 18x Phe^ε, 9x Phe^ζ, 2x NH^{Tris}), 4.78–4.70 (m, 15H, 6x OH-4^{Man}, 3x Phe1^α, 6x OH-2^{Man}), 4.62 (d, 6H, *J* = 1.6 Hz, 6x *H*-1^{Man}), 4.61–4.53 (m, 9H, 6x OH-3^{Man}, 3x Phe2^α), 4.50 (t, 12H, *J* = 5.3 Hz, 6x N^{Trz}CH₂), 4.49–4.43 (m, 21H, 6x C^{Trz}CH₂, 3x Phe3^α, 6x OH-6^{Man}), 4.21 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, CH₂C≡CH^{PGA}), 3.91 (s, 2H, C=OCH₂O^{PGA}), 3.80 (t, 12H, *J* = 5.3 Hz, N^{Trz}CH₂CH₂), 3.67–3.60 (m, 24H, 6x *H*-6a^{Man}, 6x C_qCH₂^{Tris}, 6x OCH'H''), 3.59–3.57 (m, 6H, 6x *H*-2^{Man}), 3.53–3.37 (m, 59H, CH₂C≡CH^{PGA}, 6x *H*-6b^{Man}, 6x *H*-3^{Man}, 6x OCH'H'', 20x OCH₂^{EG}), 3.30 (ddd, 6H, *J* = 9.3 Hz, *J* = 6.2 Hz, *J* = 2.1 Hz, 6x *H*-5^{Man}), 3.24 (q, 2H, *J* = 6.0 Hz, NHCH₂^{EG}), 3.17 (q, 2H, *J* = 5.8 Hz, NHCH₂^{EG}), 3.05–2.74 (m, 24H, 3x Ahx^ε, 9x Phe^β), 2.05–1.98 (m, 6H, 3x Ahx^α), 1.46–1.34 (m, 6H, Ahx^β), 1.31–1.22 (m, 6H, Ahx^δ), 1.17–1.07 (m, 6H, Ahx^γ).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 172.6 (C=O^{Ahx}), 172.2 (C=O^{Ahx}), 171.0, 170.6, 170.3 (C=O^{Phe}), 168.6 (C=O^{PGA}), 165.3 (C=O^{BTA}), 143.9 (C-4^{Trz}), 138.2, 137.6, 137.5 (Phe^γ), 129.3, 129.2, 128.1, 128.1, 128.0, 126.3, 126.3 (C-2^{BTA}, C-4^{BTA}, C-6^{BTA}, Phe^δ, Phe^ε, Phe^ζ), 124.2 (C-5^{Trz}), 100.0 (C-1^{Man}), 79.6 (CH₂C≡CH^{PGA}), 78.0 (CH₂C≡CH^{PGA}), 74.0 (C-5^{Man}), 71.0 (C-3^{Man}), 70.3 (C-2^{Man}), 69.7, 69.5, 69.5, 68.9 (OCH₂^{EG}, C_qCH₂^{Tris}), 68.8 (N^{Trz}CH₂CH₂), 68.6 (OCH₂^{EG}), 68.3 (C=OCH₂O^{PGA}), 67.9 (OCH₂^{EG}), 67.0 (C-4^{Man}), 65.7 (OCH₂^{EG}), 64.1 (C^{Trz}CH₂), 61.3 (C-6^{Man}), 59.6 (C_q^{Tris}), 57.8 (CH₂C≡CH^{PGA}), 54.5, 54.0, 53.8 (Phe^α), 49.4 (N^{Trz}CH₂), 38.5, 38.1, 38.0, 37.6, 37.1 (Ahx^ε, Phe^β, NHCH₂^{EG}), 35.3 (Ahx^α), 28.9 (Ahx^δ), 26.0 (Ahx^γ), 25.0 (Ahx^β).

Compound X-32

Propargyl glycolic acid (PGA)



A SCHLENK flask was charged with abs. THF (60 mL) and NaH (60 wt% in mineral oil, 1420.38 mg, 35.509 mmol, 2.1 eq.) was added. The suspension was cooled in an ice bath and propargyl alcohol (1.00 mL, 948.00 mg, 16.909 mmol, 1.0 eq.) was added slowly. After the gas evolution subsided bromoacetic acid (2584.46 mg, 18.600 mmol, 1.1 eq.) in THF (10 mL) was added over a period of 10 min. The ice bath was removed and the reaction mixture stirred at room temperature for 19 h. The reaction was quenched by the addition of Milli-Q water (10 mL) and the suspension was acidified by addition of conc. H₂SO₄

Experimental Section

(1 mL) to reach pH 1. The solution was diluted with Milli-Q water (50 mL) and extracted with diethyl ether (4 x 50 mL). The combined extract was washed with Milli-Q water (50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo* to yield a light yellow oil. The product was used without further purification.

Yield: 1809 mg (15.855 mmol, 94 %) light yellow oil.

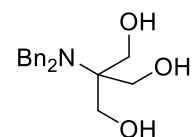
MF C₅H₆O₃ MW 114.10 [114.0317].

HR-TOF-MS (ESI, neg.), *m/z*: 113.0245 [M-H]⁻ calc. 133.0244

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ/ppm: 7.85 (bs, 1H, COOH), 4.33 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, OCH₂^{propargyl}), 4.27 (s, 2H, CH₂COOH), 2.51 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, CH^{propargyl}).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 174.9 (C=O), 78.1 (C_q^{propargyl}), 76.2 (CH^{propargyl}), 65.8 (CH₂COOH), 58.5 (OCH₂^{propargyl}).

Compound X-34



Tris(hydroxymethyl) amino methane (5.50 g, 45.40 mmol, 1.0 eq.) and potassium carbonate (1.38 g, 100.00 mmol, 2.2 eq.) were suspended in DMF and benzyl bromide (1.71 g, 100.00 mmol, 2.2 eq.) was added under ice cooling. The reaction mixture was stirred overnight at reflux. The solution was cooled down, filtered and the solids collected. The solvent of the filtrate was removed under reduced pressure. After the addition of chloroform (300 mL) to the residue, the organic layer was washed with water (3 x 200 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ solution (200 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and chloroform was removed under reduced pressure. A colorless solid and an orange viscous oil remained, which were recrystallized in ethyl acetate (3 mL). The solid was collected by vacuum filtration and washed with cold ethyl acetate to obtain colorless needle-shaped crystals.

Yield: 8.19 g (27.17 mmol, 60 %) colorless solid.

MF C₁₈H₂₃NO₃ MW 301.38 [301.1678].

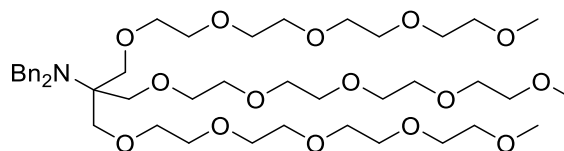
R_F: 0.24 (SiO₂, CH:EA, 1:1).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 302,1749 [M+H]⁺ calc. 302.1751

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 7.23 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H, 2x *H*-2^{Bn}, 2x *H*-6^{Bn}), 7.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H, 2x *H*-3^{Bn}, 2x *H*-5^{Bn}), 7.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2x *H*-4^{Bn}), 4.29 (t, *J* = 5.1 Hz, 3H, CH₂OH^{Tris}), 3.96 (s, 4H, 2x CH₂^{Bn}), 3.50 (d, *J* = 5.1 Hz, 6H, 3xCH₂-OH^{Tris}).

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 143.0 (C-1^{Bn}), 128.5 (C-2^{Bn}, C-6^{Bn}), 128.2 (C-3^{Bn}, C-5^{Bn}), 126.5 (C-4^{Bn}), 65.9 (C_q^{Tris}), 61.3 (CH₂OH^{Tris}), 54.1 (CH₂^{Bn}).

Compound X-35



Dried 1,4-dioxane (75 mL) was placed in a dry SCHLENK flask and **Compound X-34** (1.50 g, 4.98 mmol, 1.0 eq.) was added under argon counterflow. The suspension was stirred until it was completely dissolved. While the solution was cooled down to 0 °C, sodium hydride (60 w%, 3.98 g, 99.54 mmol, 20.0 eq.) was added in small portions under argon counterflow. Once gas evolution was no longer observed, the flask was sealed with a septum and the reaction mixture was stirred at room temperature for one hour. A solution of **Compound X-4** (7.22 g, 19.91 mmol, 4.0 eq.) in dioxane (10 mL) was added to the reaction mixture *via* a septum using a syringe. The reaction was stirred for 10 d at room temperature under a nitrogen atmosphere. After this time, isopropanol (50 mL) was added in small portions to remove excess sodium hydride and then the mixture was poured into ice water (250 mL). After extraction with DCM (3 x 50 mL), the organic layer was dried over NaSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the orange residue was purified *via* MPLC (SiO₂, A: DCM, B: MeOH, grad. 0 %B to 20 %B) to give a light yellow oil.

Yield: 3.15 mg (3.61 mmol, 73 %) light yellow oil.

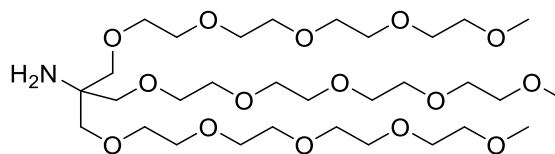
MF C₄₅H₇₇NO₁₅ MW 872.10 [871.5293].

R_F: 0.39 (SiO₂, DCM:MeOH, 20:1).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 872.5361 [M+H]⁺ calc. 872.5366.

^1H NMR (300 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ /ppm: 7.29 (d, J = 6.5 Hz, 4H, 2x H -2^{Bn}, 2x H -6^{Bn}), 7.14 (t, J = 7.1 Hz, 4H, 2x H -3^{Bn}, 2x H -5^{Bn}), 7.06 (t, J = 7.1 Hz, 2H, 2x H -4^{Bn}), 4.00 (s, 4H, 2x CH₂^{Bn}), 3.66 – 3.58 (m, 48H, 21x OCH₂^{EG}, 3x C_qCH₂^{Tris}), 3.57 – 3.55 (m, 6H, 3x CH₂OCH₃^{EG}), 3.39 (s, 9H, 3x OCH₃^{EG}).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃, 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 142.6 (C-1^{Bn}), 128.4 (C-2^{Bn}, C-6^{Bn}), 127.6 (C-3^{Bn}, C-5^{Bn}), 126.0 (C-4^{Bn}), 71.9, 71.8, 70.8, 77.66, 70.5, 70.5 (OCH₂^{EG}), 64.4 (C_q^{Tris}) 59.1 (OCH₃^{EG}), 54.8 (CH₂^{Bn}).

Compound X-36

Palladium on activated charcoal (258.44 mg, 10 wt%) and ammonium formate (1.10 g, 17.44 mmol, 5.0 eq.) were added to a solution of **Compound X-35** (3.04 g, 3.48 mmol, 1.0 eq.) and methanol (200 mL). The suspension was stirred at reflux for 7 d. After that the suspension was cooled down and the finely suspended Palladium on activated charcoal was filtered through a pad of *Celite® Hyflo Super Cel®* and the solvent was removed under reduced pressure. Saturated NaHCO₃ solution (50 mL) was added to the residue and the mixture was extracted with DCM (5 x 25 mL). After the organic layer was dried over NaSO₄, the solvent was removed *in vacuo*. The residue was dissolved in diethyl ether and filtered again using a PTFE syringe filter (0.45 μm, 25 mm). A yellowish oil was obtained after the solvent was removed under reduced pressure.

Yield: 2.32 g (3.35 mmol, 96 %) light yellow oil.

Or

Compound X-35 (40.0 mg, 0.046 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in liquid ammonia and cooled in an acetone/dry ice cooling bath with acetone/dry ice condenser under inert atmosphere. Sodium (42.2 mg, 1.836 mmol, 40.0 eq.) was added under argon counterflow and the deep blue solution was stirred for 1 h. The cooling bath was removed and the solution was allowed to warm up to room temperature to evaporate the ammonia. EtOH (200 μL) was added to the residue under cooling in an ice bath before the remainder was dissolved in MeOH (20 mL). The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified *via* column chromatography (SiO₂, DCM:MeOH, grad. 20:1 to 4:1). Product containing fractions were combined and the solvent removed *in vacuo*. The residue was dissolved in a mixture of sat. NaHCO₃ solution (20 mL) and DCM (10 mL) and extracted with DCM (5 x 10 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo* to yield the product as light yellow oil.

Yield: 28.5mg (0.041 mmol, 89 %) light yellow oil.

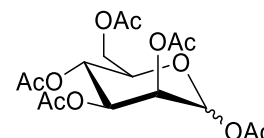
MF C₃₁H₆₅NO₁₅ MW 691.85 [691.4354].

R_F: 0.30 (SiO₂, DCM:MeOH, 10:1).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 692.4403 [M+H]⁺ calc. 692.4427.

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN, 296 K, COSY) δ/ppm: 3.59 – 3.50 (m, 42H, 18x OCH₂^{EG}, 3x C_qCH₂^{Tris}), 3.49 – 3.44 (m, 6H, 3x CH₂CH₂OCH₃^{EG}), 3.31 – 3.29 (m, 15H, 3x CH₂OCH₃^{EG}, 3x OCH₃^{EG}).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 73.0 (CH₂OCH₃^{EG}), 71.6, 70.9, 70.3, 70.2, 70.2, 70.0 (OCH₂^{EG}), 57.9 (OCH₃^{EG}), 56.0 (C_q^{Tris}).

Compound X-37^[183]**(Ac₅Man)**

D-Mannose (10.0 g, 56 mmol, 1 eq.) was dissolved in pyridine (100 mL) and cooled to 0 °C in an ice bath. Acetic anhydride (52.5 mL, 555 mmol, 10 eq.) was added dropwise within 30 min. The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature, before the addition of another portion of acetic anhydride (15.0 mL, 159 mmol, 3 eq.). After stirring for another three hours at room temperature, solvents were removed *in vacuo*. The residue was taken up with ethyl acetate (100 mL) and washed with 1 M hydrogen chloride solution (2 x 100 mL), Milli-Q water (2 x 100 mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate and concentrated *in vacuo*. The resulting solution was co-distilled with toluene (3 x 20 mL) and dichloromethane (2 x 20 mL). Drying under vacuum conditions yields a yellow oil.

Yield: 21.7 g (56 mmol, quant.) yellow oil.

MF C₁₆H₂₂O₁₁ MW 390.34 [390.1162].

$R_F = 0.32$ (SiO₂, CH:EA, 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +45.8^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

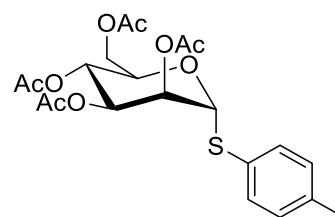
HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 413.1055 [M+Na]⁺ calc. 413.1054.

NMR signals of the α -anomer:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ /ppm: 6.07 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, $H-1$), 5.36–5.32 (m, 2H, $H-3$, $H-4$), 5.26–5.24 (m, 1H, $H-2$), 4.27 (dd, 1H, $J = 11.9$ Hz, $J = 4.2$ Hz, $H-6a$), 4.16–4.00 (m, 2H, $H-6b$ {4.11}, $H-5$ {4.04}), 2.17 (s, 6H, CH₃ (AcO¹), CH₃ (AcO²)), 2.09 (s, 3H, CH₃ (AcO⁶)), 2.05 (s, 3H, CH₃ (AcO³)), 2.00 (s, 3H, CH₃ (AcO⁴)).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 170.70 (C=O (AcO⁶)), 170.02 (C=O (AcO²)), 169.77 (C=O (AcO⁴)), 169.57 (C=O (AcO³)), 168.09 (C=O (AcO¹)), 90.61 (C-1), 70.62 (C-5), 68.74 (C-4), 68.33 (C-2), 65.52 (C-3), 62.15 (C-6), 20.95 (CH₃ (AcO¹)), 20.82 (CH₃ (AcO²)), 20.76 (CH₃ (AcO⁶)), 20.72 (CH₃ (AcO³)), 20.69 (CH₃ (AcO⁴)).

Compound X-44



Compound X-37 (5.0 g, 12.8 mmol, 1.0 eq.) was added to a flame dried SCHLENK flask and dried under reduced pressure for 48 h. Dry DCM (36 mL) was added through septum as well as 4-toluenethiol (5.56 M in dry DCM, 2.8 mL, 15.4 mmol, 1.2 eq.). The solution was cooled down in an ice bath and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (48 % in Et_2O , 11.5 mL, 44.8 mmol, 3.5 eq.) was added dropwise over the course of 90 min through a syringe. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred at room temperature for 28 h. The solution was poured into an ice-cold sat. NaHCO_3 solution and extracted with DCM (3 x 50 mL). The organic layer was washed with sat. NaHCO_3 solution (3 x 50 mL) and brine (50 mL) and dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified *via* column chromatography (SiO_2 , CH:EA, grad. 3:1 \rightarrow 2:1) to separate the α -thioglycoside. Yield: 5.1 g (11.2 mmol, 88 %) yellow oil.

MF $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_9\text{S}$ MW 454.49 [454.1298].

R_f : 0.37 (SiO_2 , CH:EA, 2:1).

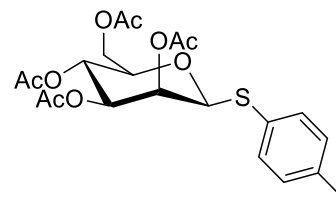
HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 477.1195 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 477.1190

931.2476 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 931.2488

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , 296 K, COSY) δ /ppm: 7.37 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $H\text{-}3^{\text{STol}}$, $H\text{-}5^{\text{STol}}$), 7.12 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, $H\text{-}2^{\text{STol}}$, $H\text{-}6^{\text{STol}}$), 5.50–5.48 (m, 1H, $H\text{-}2^{\text{Man}}$), 5.41 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, $H\text{-}1^{\text{Man}}$), 5.33–5.30 (m, 2H, $H\text{-}3^{\text{Man}}$, $H\text{-}4^{\text{Man}}$), 4.56 (ddd, 1H, $J = 9.9$ Hz, $J = 6.0$ Hz, $J = 2.4$ Hz, $H\text{-}5^{\text{Man}}$), 4.30 (dd, 1H, $J = 12.2$ Hz, $J = 5.9$ Hz, $H\text{-}6\text{a}^{\text{Man}}$), 4.13–4.08 (m, 1H, $H\text{-}6\text{b}^{\text{Man}}$), 2.33 (s, 3H, $\text{CH}_3^{\text{STol}}$), 2.14 (s, 3H, CH_3 (OAc)), 2.07 (s, 3H, CH_3 (OAc)), 2.06 (s, 3H, CH_3 (OAc)), 2.01 (s, 3H, CH_3 (OAc)),

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3 , 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 170.7 (C=O (OAc)), 170.1 (C=O (OAc)), 170.0 (C=O (OAc)), 169.9 (C=O (OAc)), 138.6 ($\text{C-}4^{\text{STol}}$), 132.8 ($\text{C-}3^{\text{STol}}$, $\text{C-}5^{\text{STol}}$), 130.1 ($\text{C-}2^{\text{STol}}$, $\text{C-}6^{\text{STol}}$), 128.9 ($\text{C-}1^{\text{STol}}$), 86.2 ($\text{C-}1^{\text{Man}}$), 70.0 ($\text{C-}2^{\text{Man}}$), 69.5 ($\text{C-}3^{\text{Man}}$), 69.5 ($\text{C-}5^{\text{Man}}$), 66.5 ($\text{C-}4^{\text{Man}}$), 62.6 ($\text{C-}6^{\text{Man}}$), 21.3 ($\text{CH}_3^{\text{STol}}$), 21.1 (CH_3 (OAc)), 20.9 (CH_3 (OAc)), 20.9 (CH_3 (OAc)), 20.8 (CH_3 (OAc)).

Compound X-45



Compound X-37 (5.0 g, 12.8 mmol, 1.0 eq.) was added to a flame dried SCHLENK flask and dried under reduced pressure for 48 h. Dry DCM (36 mL) was added through septum as well as 4-toluenethiol (5.56 M in dry DCM, 2.8 mL, 15.4 mmol, 1.2 eq.). The solution was cooled down in an ice bath and $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (48 % in Et_2O , 11.5 mL, 44.8 mmol, 3.5 eq.) was added dropwise over the course of 90 min through a syringe. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred at room temperature for 28 h. The solution was poured into an ice-cold sat. NaHCO_3 solution and extracted with DCM (3 x 50 mL). The organic layer was washed with sat. NaHCO_3 solution (3 x 50 mL) and brine (50 mL) and dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified *via* column chromatography (SiO_2 , CH:EA, grad. 3:1 \rightarrow 2:1) to separate the β -thioglycoside. Yield: 0.6 g (1.3 mmol, 10 %) yellow oil.

MF $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_9\text{S}$ MW 454.49 [454.1298].

R_f : 0.30 (SiO_2 , CH:EA, 2:1).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 477.1195 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 477.1190

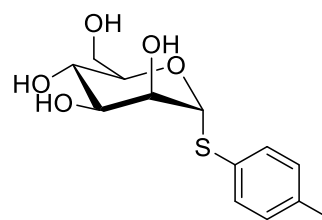
931.2476 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 931.2488

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 296 K, COSY) δ /ppm: 7.42 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $H\text{-}3^{\text{STol}}$, $H\text{-}5^{\text{STol}}$), 7.12 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, $H\text{-}2^{\text{STol}}$, $H\text{-}6^{\text{STol}}$), 5.65 (dd, 1H, $J = 8.1$ Hz, $H\text{-}2^{\text{Man}}$), 5.27 (t, 1H, $J = 10.0$ Hz, $H\text{-}4^{\text{Man}}$), 5.04 (dd, 1H, $J = 10.1$ Hz, $J = 3.5$ Hz, $H\text{-}3^{\text{Man}}$), 4.84 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz, $H\text{-}1^{\text{Man}}$), 4.28 (dd, 1H, $J = 12.2$ Hz, $J = 6.4$ Hz, $H\text{-}6\text{a}^{\text{Man}}$), 4.16 (dd, 1H, $J = 12.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz, $H\text{-}6\text{b}^{\text{Man}}$), 3.66 (ddd, 1H, $J = 10.0$ Hz, $J = 6.4$ Hz, $J = 2.5$ Hz, $H\text{-}5^{\text{Man}}$), 2.34 (s, 3H, $\text{CH}_3^{\text{STol}}$), 2.21 (s, 3H, CH_3 (OAc)), 2.09 (s, 3H, CH_3 (OAc)), 2.04 (s, 3H, CH_3 (OAc)), 1.98 (s, 3H, CH_3 (OAc)),

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3 , 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 170.8 (C=O (OAc)), 170.4 (C=O (OAc)), 170.2 (C=O (OAc)), 169.8 (C=O (OAc)), 138.7 ($\text{C}\text{-}4^{\text{STol}}$), 132.8 ($\text{C}\text{-}3^{\text{STol}}$, $\text{C}\text{-}5^{\text{STol}}$), 130.0 ($\text{C}\text{-}2^{\text{STol}}$, $\text{C}\text{-}6^{\text{STol}}$), 129.5 ($\text{C}\text{-}1^{\text{STol}}$), 86.2 ($\text{C}\text{-}1^{\text{Man}}$), 76.6 ($\text{C}\text{-}5^{\text{Man}}$), 72.0 ($\text{C}\text{-}3^{\text{Man}}$), 70.7 ($\text{C}\text{-}2^{\text{Man}}$), 65.9 ($\text{C}\text{-}4^{\text{Man}}$), 63.0 ($\text{C}\text{-}6^{\text{Man}}$), 21.3 ($\text{CH}_3^{\text{STol}}$), 21.2 (CH_3 (OAc)), 20.9 (CH_3 (OAc)), 20.8 (CH_3 (OAc)), 20.7 (CH_3 (OAc)).

Experimental Section

Compound X-46

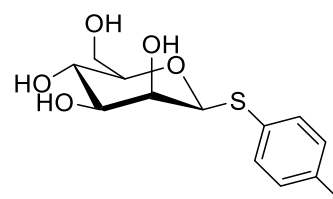


Compound X-44 (4916 mg, 10.817 mmol, 1.0 eq.) was dried under reduced pressure before it was dissolved in dry MeOH (25 mL). NaOMe solution in Methanol (0.5 M, 5 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 19 h. The reaction was quenched by addition of acetic acid (155 μ L) and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was used without further purification.

Yellow oil.

MF $C_{13}H_{18}O_5S$ MW 286.34 [286.0875].

Compound X-47

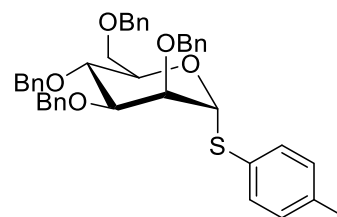


Compound X-45 (274 mg, 0.603 mmol, 1.0 eq.) was dried under reduced pressure before it was dissolved in dry MeOH (5 mL). NaOMe solution in Methanol (0.5 M, 0.3 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 19 h. The reaction was quenched by addition of acetic acid (9 μ L) and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was used without further purification.

Colorless, amorphous solid

MF $C_{13}H_{18}O_5S$ MW 286.34 [286.0875].

Compound X-48



Crude product **Compound X-46** (3092.5 mg, 10.8 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DMF (85 mL) and cooled in an ice bath. NaH (56 wt% in mineral oil, 2314.3 mg, 54.0 mmol,

5.0 eq.) was added in small portions and waited to react for 1 h. Benzyl bromid (6.414 mL, 54.0 mmol, 5.0 eq.) was added over the course of 10 min and the ice bath was removed. The reaction mixture was stirred at room temperature for 44 h before being poured into ice water (100 mL). The product was extracted with DCM (3 x 100 mL) and washed with 1 M HCl (2 x 100 mL), Milli-Q water (2 x 100 mL) and brine (2 x 100 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. The product was further purified *via* column chromatography (SiO₂, iso. CH:EA, 6:1).

Yield: 6205.5 mg (9.6 mmol, 89 %) light yellow oil.

R_F: 0.37 (SiO₂, CH:EA, 6:1).

MF C₄₁H₄₂O₅S MW 646.84 [646.2753].

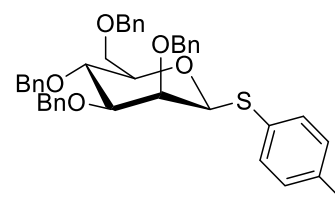
HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 664.3098 [M+NH₄]⁺ calc. 664.3091

1315.5402 [2M+Na]⁺ calc. 1315.5398

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ/ppm: 7.39–7.18 (m, 22H, 20x H^{Ar-Bn}, H-3^{STol}, H-5^{STol}), 7.04 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, H-2^{STol}, H-6^{STol}), 5.55 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H-1^{Man}), 4.91 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz, CH'H''^{Bn}), 4.77–4.44 (m, 7H, 3x CH₂^{Bn}, CH'H''^{Bn}), 4.30 (ddd, 1H, *J* = 9.8 Hz, *J* = 5.0 Hz, *J* = 2.0 Hz, H-5^{Man}), 4.06 (t, 1H, *J* = 9.5 Hz, H-4^{Man}), 4.00 (dd, 1H, *J* = 3.1 Hz, *J* = 1.7 Hz, H-2^{Man}), 3.90–3.81 (m, 2H, H-3^{Man}, H-6a^{Man}), 3.75 (dd, 1H, *J* = 10.9 Hz, *J* = 2.0 Hz, H-6b^{Man}), 2.31 (s, 3H, CH₃^{STol}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 138.6, 138.5, 138.3, 138.1 (C-1^{Bn}), 137.7 (C-4^{STol}), 132.3 (C-3^{STol}, C-5^{STol}), 130.6 (C-1^{STol}), 129.9 (C-2^{STol}, C-6^{STol}), 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.1, 138.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6 (CH^{Ar-Bn}), 86.1 (C-1^{Man}), 80.3 (C-3^{Man}), 76.3 (C-2^{Man}), 75.3 (CH₂^{Bn}), 75.2 (C-4^{Man}), 73.4 (CH₂^{Bn}), 72.8 (C-5^{Man}), 72.2, 72.0 (CH₂^{Bn}), 69.4 (C-6^{Man}), 21.2 (CH₃^{STol}).

Compound X-49



Crude product **Compound X-47** (172.6 mg, 0.6 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DMF (10 mL) and cooled in an ice bath. NaH (56 wt% in mineral oil, 129.2 mg, 3.0 mmol, 5.0 eq.) was added in small portions and waited to react for 1 h. Benzyl bromide (358 μL, 3.0 mmol, 5.0 eq.) was added over the course of 10 min and the ice bath was removed after stirring for 1 h. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h before being poured into ice water (20 mL). The product was extracted with DCM (3 x 20 mL) and washed with 1 M HCl (2 x 20 mL), Milli-Q water (2 x 20 mL) and brine (2 x 20 mL). The

Experimental Section

organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed *in vacuo*. The product was further purified *via* column chromatography (SiO_2 , iso. CH:EA, 6:1).

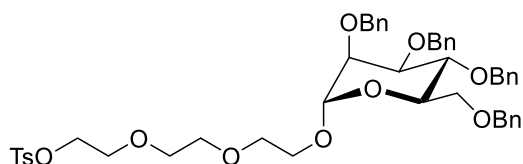
Yield: 314.9 mg (0.5 mmol, 81 %) colorless, amorphous solid.

MF $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{S}$ MW 646.84 [646.2753].

R_F : 0.46 (SiO_2 , CH:EA, 6:1).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 296 K, COSY) δ /ppm: 7.51–7.19 (m, 22H, 20x $H^{\text{Ar-Bn}}$, $H\text{-}3^{\text{STol}}$, $H\text{-}5^{\text{STol}}$), 7.02 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $H\text{-}2^{\text{STol}}$, $H\text{-}6^{\text{STol}}$), 5.04 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, $\text{CH}'\text{H}''^{\text{Bn}}$), 4.91–4.85 (m, 2H, 2x $\text{CH}'\text{H}''^{\text{Bn}}$), 4.76–4.54 (m, 6H, $\text{CH}'\text{H}''$, 4x $\text{CH}'\text{H}''$, $H\text{-}3^{\text{Man}}$), 4.15 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, $H\text{-}1^{\text{Man}}$), 3.94 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, $H\text{-}4^{\text{Man}}$), 3.84 (dd, 1H, $J = 11.0$ Hz, $J = 1.9$ Hz, $H\text{-}6a^{\text{Man}}$), 3.74 (dd, 1H, $J = 11.0$ Hz, $J = 6.5$ Hz, $H\text{-}6b^{\text{Man}}$), 3.62 (dd, 1H, $J = 9.4$ Hz, $J = 2.9$ Hz, $H\text{-}2^{\text{Man}}$), 3.50 (ddd, 1H, $J = 9.7$ Hz, $J = 6.5$ Hz, $J = 1.9$ Hz, $H\text{-}5^{\text{Man}}$), 2.29 (s, 3H, $\text{CH}_3^{\text{STol}}$).

Compound X-50



A flame dried SCHLENK flask was charged with 4 Å molecular sieves. **Compound X-48** (1000.0 mg, 1.546 mmol, 1.0 eq.) and **Compound X-14** (705.8 mg, 2.319 mmol, 1.5 eq.) were dissolved in dry DCM (30 mL). DMTST was prepared freshly by addition of dimethyl disulfide (274.8 μL , 3.092 mmol, 2.0 eq.) and methyl trifluoromethanesulfonate (339.2 μL , 3.092 mmol, 2.0 eq.) in dry DCM (1 mL) in a different sealed container. The DMTST solution was stirred for 1 h at room temperature before being added to the SCHLENK flask. The reaction mixture was stirred for 3 d. The molecular sieves were removed by filtration and the product solution was washed with Milli-Q water (3 x 50 mL), and brine (50 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified *via* column chromatography (SiO_2 , grad. CH:EA, 3:1 \rightarrow 1:1).

Yield: 725.0 mg (0.877 mmol, 57 %) light yellow oil.

MF $\text{C}_{47}\text{H}_{54}\text{O}_{11}\text{S}$ MW 827.00 [826.3387].

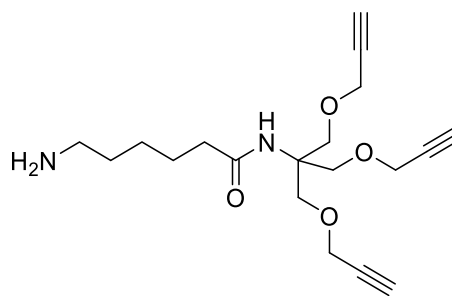
R_F : 0.54 (SiO_2 , CH:EA, 1:1).

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 849.3286 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 849.3279

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 296 K, COSY) δ /ppm: 7.81 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $H\text{-}2^{\text{Tos}}$, $H\text{-}6^{\text{Tos}}$), 7.42–7.16 (m, 22H, 20x $H^{\text{Ar-Bn}}$, $H\text{-}3^{\text{Tos}}$, $H\text{-}5^{\text{Tos}}$), 4.95 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, $H\text{-}1^{\text{Man}}$), 4.90 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, $\text{CH}'\text{H}''^{\text{Bn}}$), 4.81–4.51 (m, 7H, $\text{CH}'\text{H}''^{\text{Bn}}$, 3x CH_2^{Bn}), 4.16–4.12 (m, 2H, OCH_2^{EG}), 4.01 (t, 1H, $J = 9.1$ Hz, $H\text{-}4$), 3.94 (dd, 1H, $J = 9.3$ Hz, $J = 3.0$ Hz, $H\text{-}3^{\text{Man}}$), 3.87 (dd, 1H, $J = 3.1$ Hz, $J = 1.9$ Hz, $H\text{-}2^{\text{Man}}$), 3.83–3.72 (m, 4H, $H\text{-}5^{\text{Man}}$, $H\text{-}6a^{\text{Man}}$, OCH_2^{EG}), 3.68–3.65 (m, 2H, OCH_2^{EG}), 3.62–3.52 (m, 7H, $H\text{-}6b^{\text{Man}}$, 3x OCH_2^{EG}), 2.45 (s, 3H, CH_3^{Tos}).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 , 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm : 144.9 (C-1^{Tos}), 138.7, 138.6, 138.5, 138.5 (C-1^{Bn}), 133.1 (C-4^{Tos}), 128.4, 128.2 (C^{Ar-Bn}), 128.1 (C-2^{Tos}, C-6^{Tos}), 127.9, 127.7, 127.7, 127.6, 127.6 (C^{Ar-Bn}), 98.1 (C-1^{Man}), 80.3 (C-3^{Man}), 75.3 (CH₂^{Bn}), 75.1 (C-4^{Man}), 74.8 (C-2^{Man}), 73.5, 72.7, 72.2 (CH₂^{Bn}), 72.0 (C-5^{Man}), 70.9, 70.6, 70.3, 69.4, 69.3, 68.8 (OCH₂^{EG}), 66.6 (C-6^{Man}), 21.7 (CH₃^{Tos}).

Compound X-52



Compound X-3 (942 mg, 2.100 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM/TFA (1/1, 25 mL) and stirred at room temperature for 2 h. The solvents were removed *in vacuo* and co-distilled with toluene (5 x 6 mL). The residue was dissolved in DCM (50 mL) and washed with sat. NaHCO_3 (2 x 50 mL). The aqueous phase was extracted with DCM (2 x 50 mL) and the combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent was removed *in vacuo*.

Yield: 650 mg (1.865 mmol, 89 %) light yellow oil.

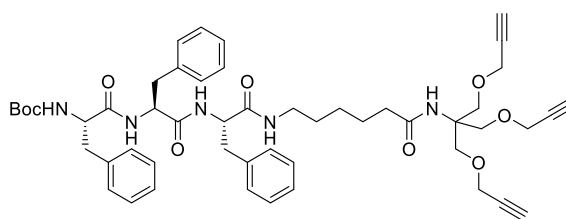
MF $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ MW 348.44 [348.2049].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 349.2126 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc. 349.2122

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 296 K, COSY) δ/ppm : 5.72 (s, 1H, NH^{Tris}), 4.15 (d, 6H, $J = 2.3$ Hz, 3x $\text{CH}_2^{\text{propargyl}}$), 3.84 (s, 6H, 3x $\text{C}_q\text{CH}_2^{\text{Tris}}$), 2.74 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, Ahx^ϵ), 2.45 (t, 3H, $J = 2.4$ Hz, $\text{CH}^{\text{propargyl}}$), 2.17 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, Ahx^α), 1.62 (p, 2H, $J = 7.4$ Hz, Ahx^β), 1.57–1.44 (m, 2H, Ahx^δ), 1.44–1.30 (m, 2H, Ahx^γ).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm : 173.3 (C=O^{Ahx}), 79.7 (C_q^{propargyl}), 74.9 (CH^{propargyl}), 68.7 (C_qCH₂^{Tris}), 59.3 (C_q^{Tris}), 58.8 (CH₂^{propargyl}), 41.7 (Ahx^ϵ), 37.2 (Ahx^α), 32.5 (Ahx^δ), 26.3 (Ahx^γ), 25.4 (Ahx^β).

Compound X-53



Peptide grade DMF was degassed for 10 min by passing a stream of argon through the liquid. **Compound X-8** (1148 mg, 2.052 mmol, 1.1 eq.), HOBt·H₂O (343 mg, 2.239 mmol, 1.2 eq.) and **Compound X-52** (650 mg, 1.865 mmol, 1.0 eq.) were dissolved in degassed DMF (20 mL). PyBOP (1165 mg, 2.239 mmol, 1.2 eq.) was added and the reaction mixture was cooled down in an ice bath. DiPEA (666 μ L, 3.917 mmol, 2.1 eq.) was added slowly in two portions. After addition, the ice bath was removed, the reaction vessel closed and the solution was stirred at room temperature and exclusion of light for 4 d. Afterwards, the reaction was quenched by addition of water (1 mL) and AcOH (100 μ L). The crude product was precipitated from ice cold Et₂O, redissolved in DMSO and precipitated from H₂O. After precipitation the crude product was further purified *via* column chromatography (SiO₂, DCM:MeOH, iso. 20:1).

Yield: 488 mg (0.548 mmol, 29 %) colorless amorphous solid.

MF C₅₁H₆₃N₅O₉ MW 890.09 [889.4626].

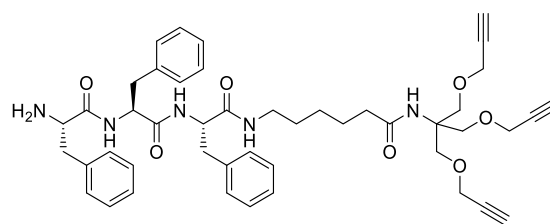
HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 890.4692 [M+H]⁺ calc. 890.4699

912.4522 [M+Na]⁺ calc. 912.4518

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 8.21 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, NH^{Phe2}), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH^{Phe3}), 7.81 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH^{Ahx}), 7.28–7.11 (m, 16H, 6x Phe ^{δ} , 6x Phe ^{ϵ} , 3x Phe ^{ζ} , NH^{Tris}), 6.90 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, NH^{Phe1}), 4.63–4.51 (m, 1H, Phe ^{α}), 4.45 (q, 1H, *J* = 7.7 Hz, Phe ^{α}), 4.16–4.03 (m, 7H, 3x CH₂^{propargyl}, Phe ^{α}), 3.65 (m, 3H, C_qCH₂^{Tris}), 3.42 (t, 3H, *J* = 2.4 Hz, CH^{propargyl}), 3.07–2.56 (m, 8H, 3x Phe ^{β} , Ahx ^{ϵ}), 2.04 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, Ahx ^{α}), 1.40 (p, 2H, *J* = 7.4 Hz, Ahx ^{β}), 1.35–1.20 (m, 11H, 3x CH₃^{Boc}, Ahx ^{δ}), 1.20–1.10 (m, 2H, Ahx ^{γ}).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) resolvable signals δ /ppm: 129.1, 128.0 (Phe ^{δ} , Phe ^{ϵ} , Phe ^{ζ}), 80.3 (C_q^{propargyl}), 77.2 (CH^{propargyl}), 67.7 (C_qCH₂^{Tris}), 58.1 (CH₂^{propargyl}), 28.1 CH₃^{Boc}, 25.5 (Ahx ^{γ}), 25.0 (Ahx ^{β}).

Compound X-54



Compound X-53 (480 mg, 0.539 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in TFA:DCM (1:1, 10 mL) and stirred at room temperature for 2.5 h. The solvents were removed *in vacuo* and co-distilled with toluene (3 x 12 mL). The residue was dissolved in DCM (50 mL) and washed with sat. NaHCO₃ (2 x 50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The residue was suspended in H₂O, sonicated and freeze dried.

Yield: 426 mg (0.539 mmol, quant.) colorless lyophilizate.

MF C₄₆H₅₅N₅O₇

MW 789.97 [789.4101].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 790.4178 [M+H]⁺

calc. 790.4174

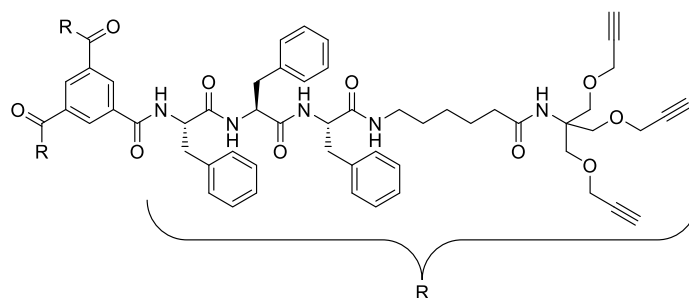
1579.8280 [M+2H]²⁺

calc. 1579.8275

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 8.26 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, NH^{Phe2}), 7.99 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, NH^{Phe3}), 7.88 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH^{Ahx}), 7.30–7.04 (m, 16H, 6x Phe^δ, 6x Phe^ε, 3x Phe^ζ, NH^{Tris}), 4.55 (q, 1H, *J* = 5.9 Hz, Phe2^α), 4.50–4.41 (m, 1H, Phe3^α), 4.12 (d, 6H, *J* = 2.4 Hz, 3x CH^{2propargyl}), 3.66 (s, 6H, 3x C_qCH₂), 3.42 (t, 3H *J* = 2.3 Hz, CH^{propargyl}), 3.33–3.29 (m, 1H, Phe1^α), 3.11–2.72 (m, 8H, 3x Phe^β, Ahx^ε), 2.05 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, Ahx^α), 1.43 (p, 2H, *J* = 7.3 Hz, Ahx^β), 1.37–1.25 (m, 2H, Ahx^δ), 1.25–1.10 (m, 2H, Ahx^γ).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ/ppm: 129.8, 129.6, 128.6, 128.5 (Phe^δ, Phe^ε, Phe^ζ), 80.7 (C_q^{propargyl}), 77.7 (CH^{propargyl}), 69.6 (C_qCH₂^{Tris}), 58.6 (CH₂^{propargyl}), 56.4 (Phe1^α).

Compound X-55



Peptide grade DMF was degassed for 10 min by passing a stream of argon through the liquid. **Compound X-54** (100.0 mg, 0.111 mmol, 4.0 eq.), BTC (5.8 mg, 0.028 mmol, 1.0 eq.), HOBt·H₂O (17.0 mg, 0.111 mmol, 4.0 eq.) and PyBOP (57.6 mg, 0.111 mmol, 4.0 eq.) were

Experimental Section

dissolved in degassed DMF (5 mL) and cooled down in an ice bath. DiPEA (33.7 μ L, 0.194 mmol, 7.0 eq.) was added, the reaction vessel was closed and the reaction mixture was stirred under exclusion of light for 2 d. The reaction was quenched by addition of H₂O (100 μ L) and AcOH (100 μ L). The solution was concentrated under reduced pressure and purified *via* size exclusion chromatography (BioBeads S-X1, DMF) and HPLC (Method C).

Yield: 24.1 mg (0.010 mmol, 36 %) colorless lyophilizate.

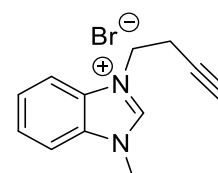
MF C₁₄₇H₁₆₅N₁₅O₂₄ MW 2526.02 [2524.2152].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1263.6164 [M+2H]²⁺ calc. 1263.6149

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 8.68 (d, 3H, *J* = 8.3 Hz, 3x NH^{Phe1}), 8.24–8.11 (m, 9H, *H*-2^{BTA}, *H*-4^{BTA}, *H*-6^{BTA}, 3x NH^{Phe2}, 3x NH^{Phe3}), 7.81 (t, 3H, *J* = 5.7 Hz, NH^{Ahx}), 7.32–6.99 (m, 48H, 18x Phe ^{δ} , 18x Phe ^{ϵ} , 9x Phe ^{ζ} , 3x NH^{Tris}), 4.80–4.70 (m, 3H, 3x Phe1 ^{α}), 4.57 (q, 3H, *J* = 8.0 Hz, 3x Phe2 ^{α}), 4.47 (q, 3H, *J* = 7.6 Hz, 3x Phe3 ^{α}), 4.11 (d, 18H, *J* = 2.4 Hz, 9x CH₂^{propargyl}), 3.65 (s, 18H, 9x C_qCH₂^{Tris}), 3.41 (t, 9H, *J* = 2.4 Hz, 9x CH^{propargyl}), 3.08–2.74 (m, 24H, 9x Phe ^{β} , 3x Ahx ^{ϵ}), 2.03 (t, 6H, *J* = 7.4 Hz, 3x Ahx ^{α}), 1.41 (p, 6H, *J* = 7.6 Hz, 3x Ahx ^{β}), 1.34–1.23 (m, 6H, 3x Ahx ^{δ}), 1.20–1.09 (m, 6H, 3x Ahx ^{γ}).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 173.0 (C=O^{Ahx}), 171.4, 170.9, 170.7 (C=O^{Phe}), 165.7 (C-1^{BTA}, C-3^{BTA}, C-5^{BTA}), 138.6, 138.0, 137.9 (Phe ^{γ}), 129.6, 128.5, 126.7 (Phe ^{δ} , Phe ^{ϵ} , Phe ^{ζ} , C-2^{BTA}, C-4^{BTA}, C-6^{BTA}), 80.7 (C_q^{propargyl}), 77.6 (CH^{propargyl}), 68.2 (C_qCH₂^{Tris}), 59.5 (C_q^{Tris}), 58.6 (CH₂^{propargyl}), 54.9, 54.4 (Phe ^{α}), 38.9, 38.5, 38.0, 37.5 (Phe ^{β} , Ahx ^{ϵ}), 36.2 (Ahx ^{α}), 29.2 (Ahx ^{δ}), 26.4 (Ahx ^{γ}), 25.5 (Ahx ^{β}).

Compound Y-1^[232]



1-Methyl-1*H*-benzo[*d*]-imidazole (356.5 mg, 2.699 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in 10 mL toluene. 4-Bromobut-1-yne (538.5 mg, 4.049 mmol, 1.5 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at 110 °C for 72 h. The precipitated salt was filtered and washed with diethyl ether (3 x 5 mL). The product was dried under reduced pressure to yield an off-white amorphous solid.

Yield: 454 mg (1.719 mmol, 64 %) off-white amorphous solid.

MF C₁₂H₁₃BrN₂ MW 265.15 [264.0262].

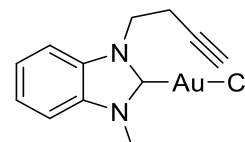
HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 185.1071 [M-Br]⁺ calc. 185.1073.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 296 K, COSY) δ /ppm: 11.23 (s, 1H, *H*-2^{BzIm}), 7.87–7.80 (m, 1H, *H*-4^{BzIm}), 7.77–7.71 (m, 1H, *H*-7^{BzIm}), 7.68–7.61 (m, 2H, *H*-5^{BzIm}, *H*-6^{BzIm}), 4.84 (t, 2H, *J* =

6.5 Hz, $N^{BzIm}CH_2$), 4.29 (s, 3H, $N^{BzIm}CH_3$), 3.02 (td, 2H, $J = 6.5$ Hz, $J = 2.7$ Hz, $N^{BzIm}CH_2CH_2$), 2.05 (t, 1H, $J = 2.6$ Hz, CH^{alkyne}).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm : 143.4 (C-2^{BzIm}), 131.9, 131.4 (C-3a^{BzIm}, C-7a^{BzIm}), 127.4, 127.4 (C-5^{BzIm}, C-6^{BzIm}), 113.4 (C-4^{BzIm}), 113.0 (C-7^{BzIm}), 78.9 (C_q^{alkyne}), 73.1 (CH^{alkyne}), 46.1 ($N^{BzIm}CH_2$), 34.1 ($N^{BzIm}CH_3$), 20.4 ($N^{BzIm}CH_2CH_2$).

Compound Y-2^[232]



The reaction was performed under SCHLENK conditions with degassed solvents under exclusion of light. **Compound Y-1** (200.0 mg, 0.754 mmol, 1.0 eq.) and Ag_2O (104.9 mg, 0.453 mmol, 0.6 eq.) were mixed in dry DCM (9 mL) and stirred for 68 h at room temperature. (tht)Au(I)Cl (241.8 mg, 0.754 mmol, 1.0 eq.) and NaCl (66.1 mg, 1.131 mmol, 1.5 eq.) were added under argon counterflow and stirred for another 2.5 h. The suspension was filtered and washed with DCM. The filtrate was concentrated and precipitated in diethyl ether at -20 °C. the precipitate was centrifuged for 10 min at 13500 rpm and the supernatant was discarded to yield an off-white crystalline solid.

Yield: 184 mg (0.441 mmol, 58 %) off-white crystals.

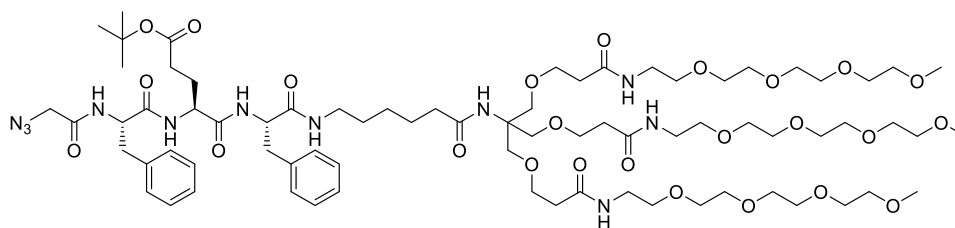
MF $C_{12}H_{12}AuClN_2$ MW 416.66 [416.0355].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 422.0926 [$M-Cl+ACN$]⁺ calc. 422.0931,

381.0665 [$M-Cl$]⁺ calc. 381.0666.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 296 K, COSY) δ/ppm : 7.61–7.55 (m, 1H, $H-4^{BzIm}$), 7.51–7.42 (m, 3H, $H-5^{BzIm}$, $H-6^{BzIm}$, $H-7^{BzIm}$), 4.63 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, $N^{BzIm}CH_2$), 4.06 (s, 3H, $N^{BzIm}CH_3$), 2.88 (td, 2H, $J = 6.9$ Hz, $J = 2.6$ Hz, $N^{BzIm}CH_2CH_2$), 2.00 (t, 1H, $J = 2.7$ Hz, CH^{alkyne}).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm : 178.9 (CAu), 133.8, 133.2 (C-3a^{BzIm}, C-7a^{BzIm}), 124.9, 124.8 (C-5^{BzIm}, C-6^{BzIm}), 111.7 (C-4^{BzIm}), 111.5 (C-7^{BzIm}), 79.7 (C_q^{alkyne}), 72.3 (CH^{alkyne}), 47.0 ($N^{BzIm}CH_2$), 35.5 ($N^{BzIm}CH_3$), 20.6 ($N^{BzIm}CH_2CH_2$).

Compound Y-5^[232]

Compound Y-3 (165.1 mg, 0.223 mmol, 1.3 eq.) and **compound Y-4** (175.0 mg, 0.172 mmol, 1.0 eq.) were dissolved in peptide grade DMF (1 mL) and PyBOP (134.2 mg, 0.258 mmol, 1.5 eq.) and HOBt · H₂O (34.8 mg, 0.258 mmol, 1.5 eq.) were added. The solution was cooled in an ice bath and DIPEA (44.9 μL, 0.258 mmol, 1.5 eq.) was added portionwise. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was subjected to size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, MeOH). The product was dissolved in H₂O and lyophilized to yield a colorless lyophilizate.

Yield: 215.0 mg (0.136 mmol, 79 %) colorless lyophilizate.

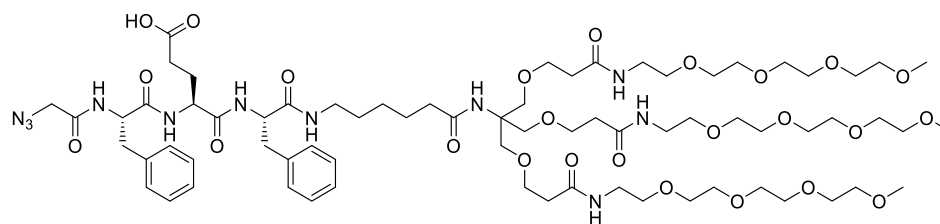
MF C₇₅H₁₂₅N₁₁O₂₅ MW 1580.88 [1579.8848].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1602.8742 [M+Na]⁺ calc. 1602.8740,

812.9328 [M+2Na]²⁺ calc. 812.9316.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 8.32 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, NH^{Phe}), 8.26 (d, *J* = 7.9 Hz 1H, NH^{Glu}), 7.94–7.87 (m, 5H, 3xNH^{Dnd}, NH^{Phe}, NH^{Ahx}), 7.26–7.12 (m, 10H, 4xPhe^δ, 4xPhe^ε, 2xPhe^ζ), 6.98 (s, 1H, NH^{Tris}), 4.60–4.53 (m, 1H, Phe^α), 4.48–4.41 (m, 1H, Phe^α), 4.23 (q, 1H, *J* = 7.8 Hz, Glu^α), 3.80–3.69 (m, 2H, Gly^α), 3.59–3.45 (m, 36H, 18xOCH₂^{EG}), 3.43–3.38 (m, 6H, 3xNHCH₂CH₂^{Dnd}), 3.23 (s, 9H, 3xOCH₃^{Dnd}), 3.19 (q, 6H, *J* = 5.9 Hz, NHCH₂^{Dnd}), 3.10–2.89 (m, 4H, Ahx^ε, 2xPhe^β), 2.81 (dd, 1H, *J* = 13.7 Hz, *J* = 8.4 Hz, Phe^{β'}), 2.72 (dd, 1H, *J* = 14.0 Hz, *J* = 10.0 Hz, Phe^{β''}), 2.29 (t, 6H, *J* = 6.4 Hz, COCH₂^{Dnd}), 2.18–2.11 (m, 2H, Glu^γ), 2.04 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, Ahx^α), 1.88–1.77 (m, 1H, Glu^{β'}), 1.77–1.64 (m, 1H, Glu^{β''}), 1.44–1.36 (m, 11H, 3xCH₃^{tBu}Ahx^β), 1.31 (p, 2H, *J* = 7.4 Hz, Ahx^δ), 1.15 (p, 2H, *J* = 7.1 Hz, Ahx^γ).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 172.4 (C=O^{Phe}), 171.7 (C=O^{Phe}), 170.9 (C=O^{Glu}), 170.5 (C=O^{Ahx}), 170.3 (C=O^{Dnd}), 167.3 (C=O^{Gly}), 137.6, 137.6 (Phe^γ), 129.2 (Phe^ε), 128.1, 128.1 (Phe^δ), 126.3, 126.3 (Phe^ζ), 79.7 (C_q^{tBu}) 71.3, 69.8, 69.8, 69.7, 69.6, 69.1 (OCH₂^{EG}), 68.3 (OCH₂^{Tris}), 67.3 (COCH₂CH₂^{Dnd}), 59.5 (C_q^{Tris}), 58.1 (OCH₃^{EG}), 53.9, 53.8 (Phe^α), 52.0 (Glu^α), 50.5 (Gly^α), 38.5 (Ahx^ε, NHCH₂^{Dnd}), 37.9, 37.5 (Phe^β), 35.9 (Ahx^α, COCH₂^{Dnd}), 31.2 (Glu^γ), 28.8 (Ahx^δ), 27.8, (CH₃^{tBu}), 27.4 (Glu^β), 26.0 (Ahx^γ), 25.0 (Ahx^β).

Compound Y-6^[232]

Compound Y-5 (199 mg, 0.126 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in TFA:H₂O, 1:1 (vol%, 10 mL) and stirred at room temperature for 2 h. Solvents were removed *in vacuo* and the crude product was co-distilled with toluene (3 x 12 mL) and dried under reduced pressure. The product was purified *via* HPLC (Method **H**) to yield a colorless solid after lyophilization.

Yield: 100 mg (0.066 mmol, 52 %) colorless lyophilizate.

MF C₇₁H₁₁₇N₁₁O₂₅

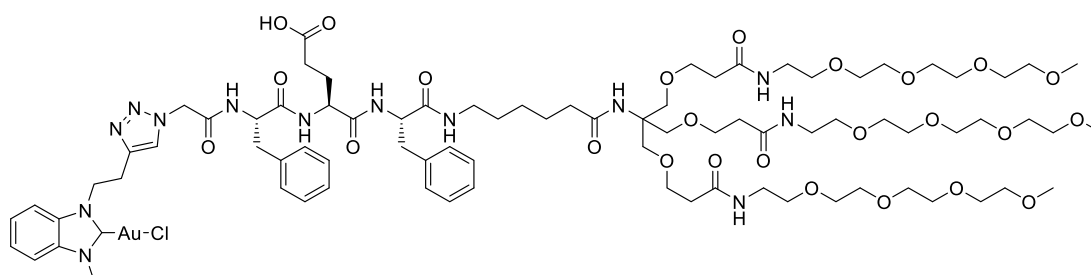
MW 1524.77 [1523.8222].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1546.8114 [M+Na]⁺ calc. 1546.8114,

784.9010 [M+2Na]²⁺ calc. 784.9003.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 8.32 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, NH^{Phe}), 8.26 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH^{Glu}), 7.95–7.87 (m, 5H, 3xNH^{Dnd}, NH^{Phe}, NH^{Ahx}), 7.24–7.13 (m, 10H, 4xPhe^δ, 4xPhe^ε, 2xPhe^ζ), 6.98 (s, 1H, NH^{Tris}), 4.60–4.53 (m, 1H, Phe^α), 4.45 (q, 1H, *J* = 7.7 Hz, Phe^α), 4.23 (q, 1H, *J* = 7.5 Hz, Glu^α), 3.82–3.69 (m, 2H, Gly^α), 3.58–3.46 (m, 36H, 18xOCH₂^{EG}), 3.43–3.37 (m, 6H, 3xNHCH₂CH₂^{Dnd}), 3.23 (s, 9H, 3xOCH₃^{Dnd}), 3.19 (q, 6H, *J* = 5.8 Hz, NHCH₂^{Dnd}), 3.09–2.86 (m, 4H, Ahx^ε, 2xPhe^β), 2.82 (dd, 1H, *J* = 13.6 Hz, *J* = 8.5 Hz, Phe^{β'}), 2.72 (dd, 1H, *J* = 14.0 Hz, *J* = 10.0 Hz, Phe^{β''}), 2.29 (t, 6H, *J* = 6.4 Hz, COCH₂^{Dnd}), 2.21–2.15 (m, 2H, Glu^γ), 2.04 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, Ahx^α), 1.90–1.79 (m, 1H, Glu^β), 1.78–1.67 (m, 1H, Glu^{β'}), 1.40 (p, 2H, *J* = 7.6 Hz, Ahx^β), 1.29 (p, 2H, *J* = 7.4 Hz, Ahx^δ), 1.19–1.09 (m, 2H, Ahx^γ).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 174.0 (COOH), 172.4 (C=O^{Phe}), 170.9 (C=O^{Phe}), 170.6 (C=O^{Glu}), 170.3 (C=O^{Ahx}), 170.3 (C=O^{Dnd}), 167.3 (C=O^{Gly}), 137.6, 137.6 (Phe^γ), 129.2 (Phe^ε), 128.1 (Phe^δ), 126.3 (Phe^ζ), 71.3, 69.8, 69.7, 69.6, 69.1 (OCH₂^{EG}), 68.3 (OCH₂^{Tris}), 67.3 (COCH₂CH₂^{Dnd}), 59.5 (C_q^{Tris}), 58.1 (OCH₃^{EG}), 53.9, 53.8 (Phe^α), 52.1 (Glu^α), 50.5 (Gly^α), 38.5 (Ahx^ε, NHCH₂^{Dnd}), 37.9, 37.5 (Phe^β), 35.9 (Ahx^α, COCH₂^{Dnd}), 30.1 (Glu^γ), 28.8 (Ahx^δ), 27.4 (Glu^β), 26.0 (Ahx^γ), 25.0 (Ahx^β).

Compound Y-7^[232]

The reaction was performed under SCHLENK conditions with degassed solvents under exclusion of light. **Compound Y-6** (140.0 mg, 0.092 mmol, 1.0 eq.) and **compound Y-2** (42.1 mg, 0.101 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in THF:H₂O, 1:1 (vol%, 4 mL). CuSO₄ · 5H₂O (4.6 mg, 0.018 mmol, 0.2 eq.), TBTA (9.7 mg, 0.018 mmol, 0.2 eq.) and sodium L-ascorbate (3.7 mg, 0.018 mmol, 0.2 eq.) were dissolved in THF:H₂O, 1:1 (vol%, 5 mL) separately and added to the solution. The mixture was stirred at 45 °C for 7 h until full conversion monitored via analytical HPLC. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and lyophilized. The crude product was dissolved in DMSO, centrifuged to remove gold nanoparticles and purified *via* HPLC (Method **B**) to yield a colorless lyophilizate.

Yield: 82.8 mg (0.043 mmol, 47 %) colorless lyophilizate.

MF C₈₃H₁₂₉AuClN₁₃O₂₅

MW 1941.43 [1939.86].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 1927.8720 [M-H-Cl+Na]⁺ calc. 1927.8780.

HR-TOF-MS (ESI, neg.), *m/z*: 1903.8663 [M-Cl-2H]⁻ calc. 1903.8815.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 12.15 (bs, 1H, COOH), 8.32 (bs, 1H, NH^{Glu}), 8.01 (bs, 1H, NH^{Phe}), 7.99–7.89 (m, 5H, NH^{Phe}, 3xNH^{Dnd}, NH^{Ahx}), 7.85 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, *H*-7^{BzIm}), 7.67 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, *H*-4^{BzIm}), 7.54–7.44 (m, 2H, *H*-5^{BzIm}, *H*-6^{BzIm}), 7.24–7.16 (m, 4H, 2xPhe^δ, 2xPhe^ε), 7.16–7.08 (m, 3H, 2xPhe^ε, Phe^ζ), 7.07–7.02 (m, 2H, Phe^δ), 6.92 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Phe^ε), 5.00–4.80 (m, 4H, Gly^α, N^{BzIm}CH₂), 4.56 (q, 1H, *J* = 7.6 Hz, Phe^α), 4.45 (q, 1H, *J* = 7.6 Hz, Phe^α), 4.22 (q, 1H, *J* = 7.4 Hz, Glu^α), 3.76 (s, 3H, N^{BzIm}CH₃), 3.56–3.51 (m, 12H, 3xC_qCH₂^{Tris}, 3xCOCH₂CH₂^{Dnd}), 3.50–3.48 (m, 30H, 15xOCH₂^{Dnd}), 3.42–3.37 (m, 12H, 6xOCH₂^{Dnd}), 3.34–3.28 (m, 2H, N^{BzIm}CH₂CH₂), 3.22 (s, 9H, OCH₃^{Dnd}), 3.19 (q, 6H, *J* = 5.9 Hz, NHCH₂^{Dnd}), 3.08–3.01 (m, 1H, Ahx^{ε'}), 2.95–2.86 (m, 3H, Ahx^{ε''}, 2xPhe^{β'}), 2.80 (dd, 1H, *J* = 13.6 Hz, *J* = 8.1 Hz, Phe^{β''}), 2.71 (q, 1H, *J* = 13.4 Hz, *J* = 9.2 Hz, Phe^{β''}), 2.29 (t, 6H, *J* = 6.5 Hz, 3xCOCH₂^{Dnd}), 2.16 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, Glu^γ), 2.03 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, Ahx^α), 1.86–1.78 (m, 1H, Glu^{β'}), 1.75–1.65 (m, 1H, Glu^{β''}), 1.39 (p, 2H, *J* = 7.4 Hz, Ahx^β), 1.29 (p, 2H, *J* = 6.8 Hz, Ahx^δ), 1.13 (p, 2H, *J* = 6.8 Hz, Ahx^γ).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 195.04 (CAu), 174.03 (COO^{Glu}), 172.45 (C=O^{Tris}), 170.86 (C=O^{Phe}), 170.66 (C=O^{Glu}), 170.36 (C=O^{Phe}), 170.30 (C=O^{Ahx}), 166.85 (C=O^{Gly}), 137.54, 138.39 (Phe^γ), 133.72, 132.70 (C-3a^{BzIm}, C-7a^{BzIm}), 129.22, 129.19 (Phe^ε), 128.07, 127.91 (Phe^δ), 126.31, 126.09 (Phe^ζ), 124.23, 124.06 (C-5^{BzIm}, C-6^{BzIm}), 111.92 (C-4^{BzIm}, C-7^{BzIm}), 71.31, 69.84, 69.82, 69.76, 69.63, 69.17 (OCH₂^{EG}), 68.28 (OCH₂^{Tris}), 67.35

(COCH₂CH₂^{Dnd}), 59.54 (C_q^{Tris}), 58.09 (OCH₃^{Dnd}), 53.96 (Glu^α), 53.84 (Gly^α), 53.64 (Phe^α), 52.03 (Phe^α), 48.57 (N^{BzIm}CH₂), 38.56 (NHCH₂^{Dnd}), 38.01 (Ahx^ε), 37.79 (Phe^β), 35.86 (Ahx^α, COCH₂^{Dnd}), 34.39 (N^{BzIm}CH₃), 30.22 (Glu^γ), 28.82 (Ahx^δ), 27.51 (Glu^β), 26.06 (Ahx^γ), 25.06 (Ahx^β).

6.2.1 SOP 1: Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC)

For the functionalization of alkyne-modified Monomers CuAAC was used with azide functionalized dyes. For the Cu(I) source the in-situ reduction of CuSO₄ by NaAsc was used with the stabilizing ligand TBTA in an H₂O-DMSO mixture.

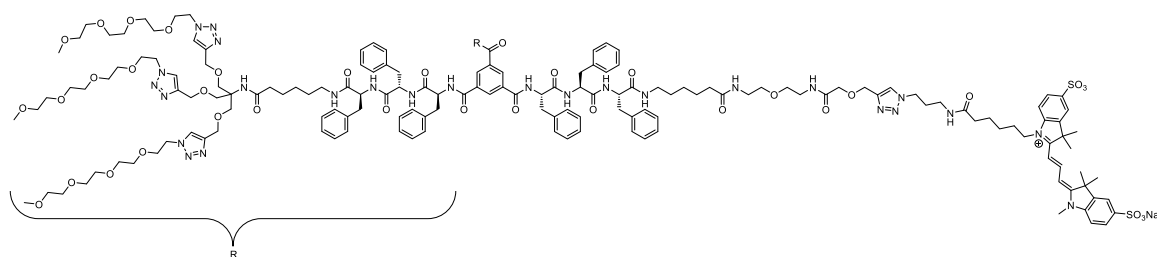
Milli-Q water and DMSO were degassed by performing three freeze-pump-thaw cycles individually. The solvents were used to prepare following stock solution:

Table 9: Degassed stock solutions used for Monomer functionalization by CuAAC.

compound	concentration	equivalent
CuSO ₄ ·5H ₂ O in H ₂ O	20 mM	0.5 eq.
NaAsc in H ₂ O	10 mM	1.0 eq.
TBTA in DMSO	20 mM	0.5 eq.
Alkyne-derivative in DMSO	various	1.0 eq.
Azide-derivative in DMSO	various	1.0 eq.

CuSO₄·5H₂O-, TBTA-, Alkyne- and Azide-stock solutions were added into a SCHLENK flask. Another three freeze-pump-thaw cycles were conducted with the reaction mixture. The NaAsc-stock solution was added under argon counterflow and two freeze-pump-thaw cycles were performed. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere and exclusion of light for 6 d. To remove the copper from the sample the solution was diluted with Milli-Q water and the copper exchanged on Amberlite™ IRC-748 ion exchange resin. The solvent was removed *via* lyophilization and the crude product was purified *via* size exclusion chromatography (BioBeads S-X1, DMF), or HPLC (Method E).

Compound X-26



Reaction was performed using **Compound X-25** (1.72 mM, 3.0 mg, 0.771 μmol , 1.0 eq.) and sulfo-Cyanine 3-azide (1.57 mM, 0.57 mg, 0.771 μmol , 1.0 eq.) according to SOP 1.

Yield: 3.0 mg (0.650 μmol , 84 %) bright red lyophilizate.

MF $\text{C}_{230}\text{H}_{321}\text{N}_{40}\text{NaO}_{55}\text{S}_2$

MW 4613.43 [4610.2890].

TOF-MS (MALDI, pos., CHCA), m/z : 4610.16 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calc. 4611.29

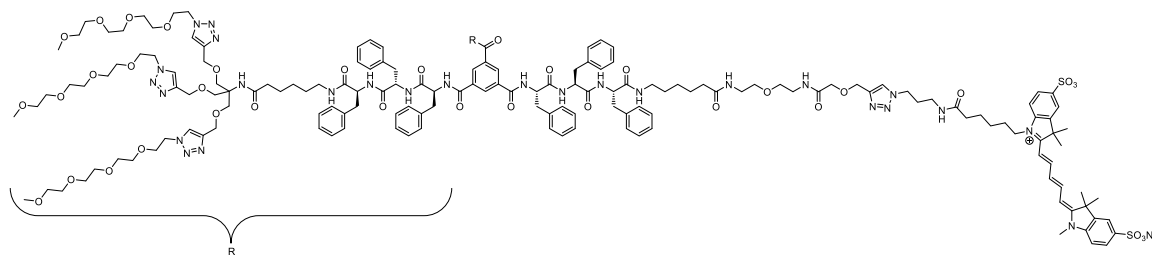
4632.77 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 4633.27

4648.96 $[\text{M}+\text{K}]^+$ calc. 4649.24

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, COSY) δ/ppm : 8.68 (d, 3H, $J = 8.1$ Hz, $3x \text{NH}^{\text{Phe1}}$), 8.36–8.30 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{sCy3}}$), 8.23–8.15 (m, 10H, $H-2^{\text{BTA}}$, $H-4^{\text{BTA}}$, $H-6^{\text{BTA}}$, $3x \text{NH}^{\text{Phe2}}$, $3x \text{NH}^{\text{Phe3}}$, $H-5^{\text{Trz,sCy3}}$), 8.00 (s, 6H, $6x H-5^{\text{Trz,Dnd}}$), 7.89 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, NH^{Pr}), 7.85–7.80 (m, 6H, $3x \text{NH}^{\text{Ahx}}$, NH^{EG} , $H-6^{\text{sCy3}}$, $H-6'^{\text{sCy3}}$), 7.76 (t, 1H, $J = 5.9$ Hz, NH^{EG}), 7.69–7.66 (m, 2H, $H-4^{\text{sCy3}}$, $H-4'^{\text{sCy3}}$), 7.39 (dd, 2H, $J = 8.3$ Hz, $J = 5.6$ Hz, $H-7^{\text{sCy3}}$, $H-7'^{\text{sCy3}}$), 7.29–7.03 (m, 47H, $18x \text{Phe}^\delta$, $18x \text{Phe}^\epsilon$, $9x \text{Phe}^\zeta$, $2x \text{NH}^{\text{Tris}}$), 6.51–6.44 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{sCy3}}$), 4.78–4.71 (m, 3H, $3x \text{Phe}^{1\alpha}$), 4.61–4.54 (m, 5H, $3x \text{Phe}^{2\alpha}$, $\text{C}^{\text{Trz,sCy3}}\text{CH}_2$), 4.52–4.43 (m, 27H, $6x \text{N}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$, $6x \text{C}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$, $3x \text{Phe}^{3\alpha}$), 4.32 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, $\text{N}^{\text{Trz,sCy3}}\text{CH}_2$), 4.10 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, $\text{Ahx}^{\epsilon,\text{sCy3}}$), 3.90 (s, 2H, $\text{C}=\text{OCH}_2\text{O}^{\text{GA}}$), 3.79 (t, 12H, $J = 5.3$ Hz, $\text{N}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.63 (s, 12H, $6x \text{C}_q\text{CH}_2^{\text{Tris}}$), 3.51–3.43 (m, 63H, $30x \text{OCH}_2^{\text{EG}}$, $\text{N}-1'\text{CH}_3^{\text{sCy3}}$), 3.41–3.37 (m, 16H, $8x \text{OCH}_2^{\text{EG}}$), 3.24 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, $\text{NHCH}_2^{\text{EG}}$), 3.20 (s, 18H, OCH_3^{EG}), 3.18–3.15 (m, 2H, $\text{NHCH}_2^{\text{EG}}$), 3.05–2.74 (m, 26H, $9x \text{Phe}^\beta$, $3x \text{Ahx}^\epsilon$, $\text{N}^{\text{Trz,sCy3}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.06 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, $\text{Ahx}^{\alpha,\text{sCy3}}$), 2.02 (t, 6H, $J = 7.4$ Hz, Ahx^α), 1.85 (p, 2H, $J = 7.0$ Hz, $\text{N}^{\text{Trz,sCy3}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.74–1.64 (m, 14H, $2x \text{C}-3^{\text{sCy3}}\text{CH}_3$, $2x \text{C}-3'^{\text{sCy3}}\text{CH}_3$, $\text{Ahx}^{\delta,\text{sCy3}}$), 1.55 (p, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{Ahx}^{\beta,\text{sCy3}}$), 1.45–1.32 (m, 8H, $3x \text{Ahx}^\beta$, $\text{Ahx}^{\gamma,\text{sCy3}}$), 1.30–1.22 (m, 6H, Ahx^δ), 1.15–1.08 (m, 6H, Ahx^γ).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ/ppm : 172.5 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Tris}}$), 172.2 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Ahx}}$), 171.0 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 170.3 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Ahx,sCy3}}$), 168.9 ($\text{C}=\text{O}^{\text{GA}}$), 165.3 ($\text{C}=\text{O}^{\text{BTA}}$), 143.9 ($\text{C}-4^{\text{Trz,Dnd}}$), 143.2 ($\text{C}-4^{\text{Trz,sCy3}}$), 138.2, 137.6, 137.5 (Phe^γ), 129.2, 129.2, 128.1, 128.1, 128.0 (Phe^δ , Phe^ϵ , Phe^ζ , $\text{C}-2^{\text{BTA}}$, $\text{C}-4^{\text{BTA}}$, $\text{C}-6^{\text{BTA}}$), 126.3 ($\text{C}-4^{\text{sCy3}}$, $\text{C}-4'^{\text{sCy3}}$), 124.4 ($\text{C}-5^{\text{Trz,sCy3}}$), 124.1 ($\text{C}-5^{\text{Trz,Dnd}}$), 119.8 ($\text{C}-6^{\text{sCy3}}$, $\text{C}-6'^{\text{sCy3}}$), 110.8 ($\text{C}-7^{\text{sCy3}}$, $\text{C}-7'^{\text{sCy3}}$), 71.3, 69.8, 69.6, 69.6, 68.9, 68.9, 68.7, 68.6 (OCH_2^{EG}), 67.9 ($\text{OCH}_2^{\text{Tris}}$), 64.1 ($\text{C}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$), 63.7 ($\text{C}^{\text{Trz,sCy3}}\text{CH}_2$), 59.5 (C_q^{Tris}), 58.1 (OCH_3^{EG}), 57.5 ($\text{N}-1'\text{sCy3}\text{CH}_3$), 54.5, 54.0, 53.8 (Phe^α), 49.3 ($\text{N}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$), 48.9 ($\text{C}-3^{\text{sCy3}}$, $\text{C}-3'^{\text{sCy3}}$), 47.2 ($\text{N}^{\text{Trz,sCy3}}\text{CH}_2$), 38.5, 38.1, 37.9, 37.6, 37.1 (Phe^β , $\text{NHCH}_2^{\text{EG}}$), 35.8 (Ahx^ϵ), 35.7 ($\text{Ahx}^{\epsilon,\text{sCy3}}$), 35.2 (Ahx^α), 35.1 ($\text{Ahx}^{\alpha,\text{sCy3}}$), 30.0 ($\text{N}^{\text{Trz,sCy3}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 28.8 (Ahx^δ), 27.4, 27.2 ($\text{C}-3\text{CH}_3^{\text{sCy3}}$, $\text{C}-3'\text{CH}_3^{\text{sCy3}}$), 26.8 ($\text{Ahx}^{\delta,\text{sCy3}}$), 26.0 (Ahx^γ), 25.7 ($\text{Ahx}^{\gamma,\text{sCy3}}$), 25.0 (Ahx^β , $\text{Ahx}^{\beta,\text{sCy3}}$).

Compound X-27



Reaction was performed using **Compound X-25** (1.72 mM, 3.0 mg, 0.771 μmol , 1.0 eq.) and sulfo-Cyanine 5-azide (1.52 mM, 0.59 mg, 0.771 μmol , 1.0 eq.) according to SOP 1.

Yield: 3.1 mg (0.668 mmol, 87 %) bright blue lyophilizate.

MF $\text{C}_{232}\text{H}_{323}\text{N}_{40}\text{NaO}_{55}\text{S}_2$

MW 4639.47 [4636.3047].

TOF-MS (MALDI, pos., CHCA), m/z : 4661.66 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 4661.30

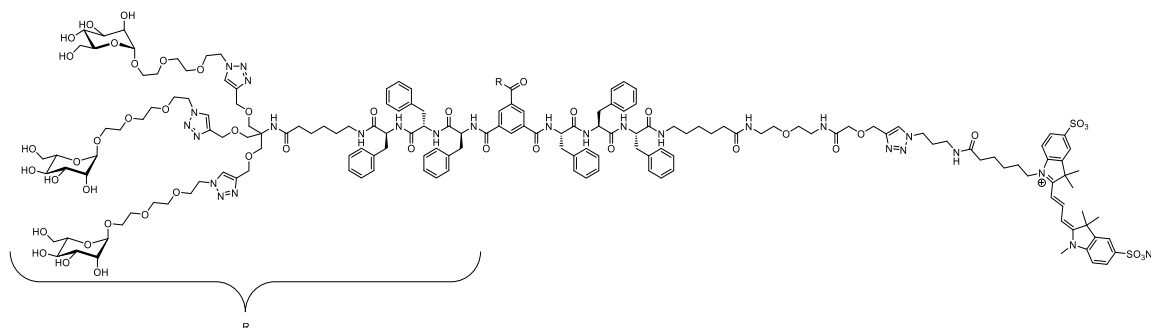
^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, COSY) δ/ppm : 8.68 (d, 3H, $J = 8.1$ Hz, $3\times \text{NH}^{\text{Phe1}}$), 8.35 (t, 2H, $J = 13.1$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{sCy5}}$), 8.25–8.13 (m, 10H, $H-2^{\text{BTA}}$, $H-4^{\text{BTA}}$, $H-6^{\text{BTA}}$, $3\times \text{NH}^{\text{Phe2}}$, $3\times \text{NH}^{\text{Phe3}}$, $H-5^{\text{Trz,sCy5}}$), 8.00 (s, 6H, $6\times H-5^{\text{Trz,Dnd}}$), 7.88 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz, NH^{Pr}), 7.85–7.80 (m, 6H, $3\times \text{NH}^{\text{Ahx}}$, NH^{EG} , $H-6^{\text{sCy5}}$, $H-6'^{\text{sCy5}}$), 7.75 (t, 1H, $J = 5.9$ Hz, NH^{EG}), 7.66–7.61 (m, 2H, $H-4^{\text{sCy5}}$, $H-4'^{\text{sCy5}}$), 7.31 (dd, 2H, $J = 8.3$ Hz, $J = 5.3$ Hz, $H-7^{\text{sCy5}}$, $H-7'^{\text{sCy5}}$), 7.29–7.03 (m, 47H, 18x Phe^{δ} , 18x Phe^{ϵ} , 9x Phe^{ζ} , 2x NH^{Tris}), 6.54 (t, 1H, $J = 12.3$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{sCy5}}$), 6.30 (d, 1H, $J = 13.7$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{sCy5}}$), 6.25 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{sCy5}}$), 4.78–4.71 (m, 3H, $3\times \text{Phe1}^{\alpha}$), 4.61–4.53 (m, 5H, $3\times \text{Phe2}^{\alpha}$, $\text{C}^{\text{Trz,sCy5CH}_2}$), 4.52–4.43 (m, 27H, $6\times \text{N}^{\text{Trz,DndCH}_2}$, $6\times \text{C}^{\text{Trz,DndCH}_2}$, $3\times \text{Phe3}^{\alpha}$), 4.32 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, $\text{N}^{\text{Trz,sCy5CH}_2}$), 4.11–4.05 (m, 2H, $\text{Ahx}^{\epsilon,\text{sCy5}}$), 3.89 (s, 2H, $\text{C}=\text{OCH}_2\text{O}^{\text{GA}}$), 3.79 (t, 12H, $J = 5.3$ Hz, $\text{N}^{\text{Trz,DndCH}_2\text{CH}_2}$), 3.63 (s, 12H, $6\times \text{C}_q\text{CH}_2^{\text{Tris}}$), 3.58 (s, 3H, $\text{N-1}'\text{CH}_3^{\text{sCy5}}$), 3.51–3.42 (m, 60H, $30\times \text{OCH}_2^{\text{EG}}$), 3.41–3.37 (m, 16H, $8\times \text{OCH}_2^{\text{EG}}$), 3.24 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, $\text{NHCH}_2^{\text{EG}}$), 3.20 (s, 18H, OCH_3^{EG}), 3.16 (q, 2H, $J = 6.3$ Hz, $\text{NHCH}_2^{\text{EG}}$), 3.05–2.75 (m, 26H, 9x Phe^{β} , $3\times \text{Ahx}^{\epsilon}$, $\text{N}^{\text{Trz,sCy5CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2}$), 2.06–1.99 (m, 8H, $3\times \text{Ahx}^{\alpha}$, $\text{Ahx}^{\alpha,\text{sCy5}}$), 1.85 (p, 2H, $J = 7.0$ Hz, $\text{N}^{\text{Trz,sCy5CH}_2\text{CH}_2}$), 1.73–1.61 (m, 14H, $2\times \text{C-3}^{\text{sCy5CH}_3}$, $2\times \text{C-3}'^{\text{sCy5CH}_3}$, $\text{Ahx}^{\delta,\text{sCy5}}$), 1.53 (p, 2H, $J = 7.3$ Hz, $\text{Ahx}^{\beta,\text{sCy5}}$), 1.45–1.35 (m, 6H, $3\times \text{Ahx}^{\beta}$), 1.33–1.22 (m, 8H, $3\times \text{Ahx}^{\delta}$, $\text{Ahx}^{\gamma,\text{sCy5}}$), 1.15–1.09 (m, 6H, $3\times \text{Ahx}^{\gamma}$).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ/ppm : 172.9 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Tris}}$), 172.5 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Ahx}}$), 171.0 ($\text{C}=\text{O}^{\text{Phe}}$), 168.9 ($\text{C}=\text{O}^{\text{GA}}$), 165.3 ($\text{C}=\text{O}^{\text{BTA}}$), 143.9 ($\text{C-4}^{\text{Trz,Dnd}}$), 143.2 ($\text{C-4}^{\text{Trz,sCy5}}$), 138.2, 137.6, 137.5 (Phe^{γ}), 129.2, 129.2, 129.2, 128.1, 128.0 (Phe^{δ} , Phe^{ϵ} , Phe^{ζ} , C-2^{BTA} , C-4^{BTA} , C-6^{BTA}), 126.3 (C-4^{sCy5} , $\text{C-4}'^{\text{sCy5}}$), 126.2 ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{sCy5}}$), 124.4 ($\text{C-5}^{\text{Trz,sCy5}}$), 124.1 ($\text{C-5}^{\text{Trz,Dnd}}$), 71.3, 69.8, 69.6, 69.6, 68.9, 68.9, 68.7, 68.6 (OCH_2^{EG}), 67.9 ($\text{OCH}_2^{\text{Tris}}$), 64.1 ($\text{C}^{\text{Trz,DndCH}_2}$), 63.7 ($\text{C}^{\text{Trz,sCy5CH}_2}$), 59.5 (C_q^{Tris}), 58.1 (OCH_3^{EG}), 54.5, 54.0, 53.8 (Phe^{α}), 49.3 ($\text{N}^{\text{Trz,DndCH}_2}$), 48.9 (C-3^{sCy5} , $\text{C-3}'^{\text{sCy5}}$), 47.2 ($\text{N}^{\text{Trz,sCy5CH}_2}$), 38.5, 38.1, 37.9, 37.6, 37.1 (Phe^{β} , $\text{NHCH}_2^{\text{EG}}$), 35.8 (Ahx^{ϵ}), 35.7 ($\text{Ahx}^{\epsilon,\text{sCy5}}$), 35.2 (Ahx^{α}), 35.1 ($\text{Ahx}^{\alpha,\text{sCy5}}$), 30.0

Experimental Section

(N^{Trz,sCy5}CH₂CH₂), 28.8, 28.8 (Ahx^δ), 27.1, 26.9 (C-3CH₃^{sCy5}, C-3'CH₃^{sCy5}), 26.8 (Ahx^{δ,sCy5}), 26.0, 26.0 (Ahx^γ), 25.7 (Ahx^{γ,sCy5}), 25.0 (Ahx^β, Ahx^{β,sCy5}).

Compound X-30



Reaction was performed using **Compound X-29** (1.55 mM, 3.5 mg, 0.775 μmol, 1.0 eq.) and sulfo-Cyanine 3-azide (1.57 mM, 0.57 mg, 0.775 μmol, 1.0 eq.) according to SOP 1.

Yield: 3.2 mg (0.611 mmol, 79 %) bright red lyophilizate.

MF C₂₄₈H₃₄₃N₄₀NaO₇₉S₂

MW 5235.78 [5232.3391].

TOF-MS (MALDI, pos., CHCA), *m/z*: 5258.99 [M+Na]⁺

calc. 5257.34

5275.26 [M+K]⁺

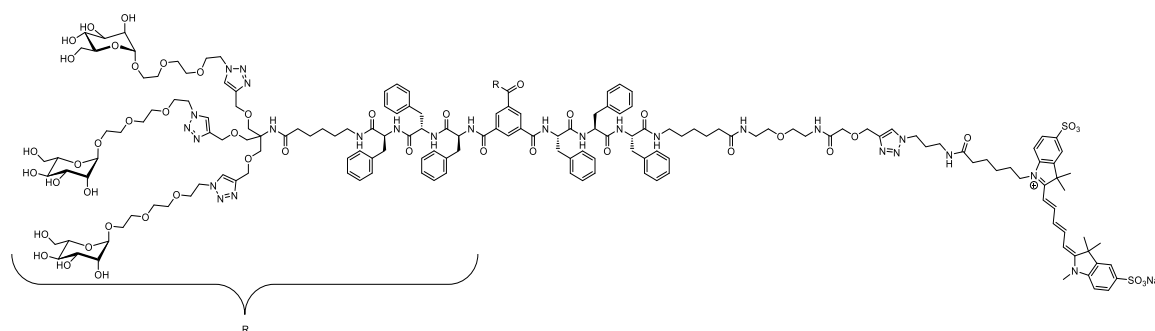
calc. 5273.31

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 8.72–8.64 (m, 3H, 3x NH^{Phe1}), 8.33 (t, 1H, *J* = 13.4 Hz, CH=CH-CH^{sCy3}), 8.24–8.19 (m, 6H, 3x NH^{Phe2}, 3x NH^{Phe3}), 8.18 (s, 1H, H-5^{Trz,sCy3}), 8.16 (s, 3H, H-2^{BTA}, H-4^{BTA}, H-6^{BTA}), 8.01 (s, 6H, 6x H-5^{Trz,Dnd}), 7.89 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH^{Pr}), 7.86–7.80 (m, 6H, 3x NH^{Ahx}, NH^{EG}, H-6^{sCy3}, H-6'^{sCy3}), 7.78–7.74 (m, 1H, NH^{EG}), 7.68 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-4^{sCy3}, H-4'^{sCy3}), 7.39 (dd, 2H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 5.6 Hz, H-7^{sCy3}, H-7'^{sCy3}), 7.29–7.03 (m, 47H, 18x Phe^δ, 18x Phe^ε, 9x Phe^ζ, 2x NH^{Tris}), 6.48 (t, 2H, *J* = 12.8 Hz, CH=CH-CH^{sCy3}), 4.82–4.68 (m, 15H, 3x Phe1^α, 6x OH-4^{Man}, 6x OH-2^{Man}), 4.65–4.54 (m, 17H, 3x Phe2^α, C^{Trz,sCy3}CH₂, 6x H-1^{Man}, 6x OH-3^{Man}) 4.53–4.44 (m, 31H, 6x N^{Trz,Dnd}CH₂, 6x C^{Trz,Dnd}CH₂, 3x Phe3^α, 6x OH-6^{Man}), 4.32 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, N^{Trz,sCy3}CH₂), 4.13–4.08 (m, 2H, Ahx^{ε,sCy3}), 3.89 (s, 2H, C=OCH₂O^{GA}), 3.80 (t, 12H, *J* = 5.3 Hz, 6x N^{Trz,Dnd}CH₂CH₂), 3.69–3.61 (m, 24H, 6x C_qCH₂^{Tris}, 6x H-6a^{Man}, 6x OCH'H''), 3.60–3.57 (m, 6H, 6x H-2^{Man}), 3.53–3.39 (m, 64H, 6x H-3^{Man}, 6x H-4^{Man}, 6x H-6b^{Man}, 6x OCH'H'', 20x OCH₂^{EG}), 3.32–3.28 (m, 6H, H-5^{Man}), 3.27–3.21 (m, 2H, NHCH₂^{EG}), 3.16 (q, 2H, *J* = 5.8 Hz, NHCH₂^{EG}), 3.13–2.75 (m, 26H, 9x Phe^β, 3x Ahx^{ε,Dnd}, N^{Trz,sCy3}CH₂CH₂CH₂), 2.08–1.99 (m, 8H, 3x Ahx^{α,Dnd}, Ahx^{α,sCy3}), 1.86 (p, 2H, *J* = 7.0 Hz, N^{Trz,sCy3}CH₂CH₂), 1.74–1.65 (m, 14H, 2x C-3^{sCy3}CH₃, 2x C-3'^{sCy3}CH₃, Ahx^{δ,sCy3}), 1.55 (p, 2H, *J* = 7.5 Hz, Ahx^{β,sCy3}), 1.45–1.32 (m, 8H, 3x Ahx^{β,Dnd}, Ahx^{γ,sCy3}), 1.30–1.21 (m, 6H, 3x Ahx^{δ,Dnd}), 1.21–1.07 (m, 6H, 3x Ahx^{γ,Dnd}).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ/ppm: 172.6, 172.2, 172.0, 171.0, 170.5, 170.3 (C=O), 168.9 (C=O^{GA}), 165.6 (C=O^{BTA}), 143.9 (C-4^{Trz,Dnd}), 143.2 (C-4^{Trz,sCy3}), 138.2, 137.5 (Phe^γ), 129.2, 129.2, 128.1, 128.1, 128.0 (Phe^δ, Phe^ε, Phe^ζ, C-2^{BTA}, C-4^{BTA},

C-6^{BTA}), 126.3 (C-4^{sCy3}, C-4'^{sCy3}), 124.2 (C-5^{Trz,Dnd}), 100.0 (C-1^{Man}), 74.0 (C-5^{Man}), 72.6, 72.4 (OCH₂^{EG}), 70.9 (C-3^{Man}), 70.3 (C-2^{Man}), 69.8, 69.7, 69.5, 69.5, 68.9, 68.9, 68.8 (OCH₂^{EG}), 68.6 (N^{Trz,Dnd}CH₂CH₂), 67.0 (C-4^{Man}), 65.7 (OCH'^{H''EG}), 64.1 (C^{Trz,Dnd}CH₂), 63.7 (C^{Trz,sCy3}CH₂), 61.3 (C-6^{Man}), 59.6 (C_q^{Tris}), 54.3, 53.8 (Phe^α), 49.3 (N^{Trz,Dnd}CH₂), 47.2 (N^{Trz,sCy3}CH₂), 38.4, 37.9 (Phe^β, Ahx^{ε,Dnd}, NHCH₂^{EG}), 35.8 (N^{Trz,sCy3}CH₂CH₂CH₂), 35.2, 35.1 (Ahx^{α,Dnd}, Ahx^{α,sCy3}), 30.0 (N^{Trz,sCy3}CH₂CH₂), 28.8 (Ahx^{δ,Dnd}, Ahx^{δ,sCy3}), 27.4, 27.2 (C-3^{sCy3}CH₃, C-3'^{sCy3}CH₃), 26.0 (Ahx^{γ,Dnd}, Ahx^{γ,sCy3}), 25.0 (Ahx^{β,Dnd}, Ahx^{β,sCy3}).

Compound X-31



Reaction was performed using **Compound X-29** (1.55 mM, 3.5 mg, 0.775 μmol, 1.0 eq.) and sulfo-Cyanine 5-azide (1.66 mM, 0.59 mg, 0.775 μmol, 1.0 eq.) according to SOP 1.

Yield: 3.9 mg (0.741 mmol, 96 %) bright blue lyophilizate.

MF C₂₅₀H₃₄₅N₄₀NaO₇₉S₂

MW 5261.82 [5258.3548].

TOF-MS (MALDI, pos., CHCA), *m/z*: 5260.24 [M+H]⁺

calc. 5261.35

5283.14 [M+Na]⁺

calc. 5283.33

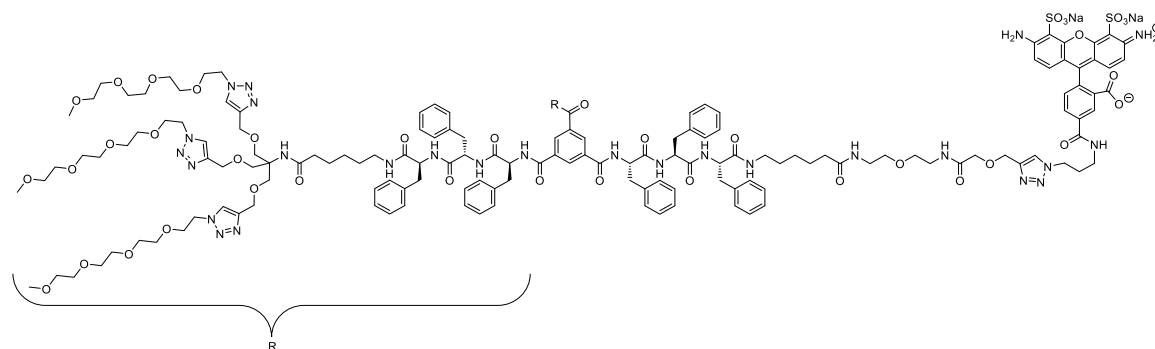
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ/ppm: 8.76–8.65 (m, 3H, 3x NH^{Phe1}), 8.35 (t, 2H, *J* = 13.0 Hz, CH=CH-CH=CH-CH^{sCy5}), 8.24–8.19 (m, 6H, 3x NH^{Phe2}, 3x NH^{Phe3}), 8.18 (s, 1H, H-5^{Trz,sCy5}), 8.16 (s, 3H, H-2^{BTA}, H-4^{BTA}, H-6^{BTA}), 8.01 (s, 6H, 6x H-5^{Trz,Dnd}), 7.88 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH^{Pr}), 7.86–7.80 (m, 6H, 3x NH^{Ahx}, NH^{EG}, H-6^{sCy5}, H-6'^{sCy5}), 7.76 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, NH^{EG}), 7.65–7.62 (m, 2H, H-4^{sCy5}, H-4'^{sCy5}), 7.31 (dd, 2H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 5.4 Hz, H-7^{sCy5}, H-7'^{sCy5}), 7.29–7.03 (m, 47H, 18x Phe^δ, 18x Phe^ε, 9x Phe^ζ, 2x NH^{Tris}), 6.54 (t, 1H, *J* = 12.3 Hz, CH=CH-CH=CH-CH^{sCy5}), 6.30 (d, 1H, *J* = 13.7 Hz, CH=CH-CH=CH-CH^{sCy5}), 6.25 (d, 1H, *J* = 13.8 Hz, CH=CH-CH=CH-CH^{sCy5}), 4.80–4.71 (m, 15H, 3x Phe^{1α}, 6x OH-4^{Man}, 6x OH-2^{Man}), 4.67–4.54 (m, 17H, 3x Phe^{2α}, C^{Trz,sCy5}CH₂, 6x H-1^{Man}, 6x OH-3^{Man}), 4.53–4.44 (m, 31H, 6x N^{Trz,Dnd}CH₂, 6x C^{Trz,Dnd}CH₂, 3x Phe^{3α}, 6x OH-6^{Man}), 4.32 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, N^{Trz,sCy5}CH₂), 4.10–4.05 (m, 2H, Ahx^{ε,sCy5}), 3.89 (s, 2H, C=OCH₂O^{GA}), 3.80 (t, 12H, *J* = 5.3 Hz, 6x N^{Trz,Dnd}CH₂CH₂), 3.67–3.61 (m, 24H, 6x C_qCH₂^{Tris}, 6x H-6a^{Man}, 6x OCH'^{H''}), 3.59–3.56 (m, 6H, 6x H-2^{Man}), 3.53–3.40 (m, 64H, 6x H-3^{Man}, 6x H-4^{Man}, 6x H-6b^{Man}, 6x OCH'^{H''}, 20x OCH₂^{EG}), 3.32–3.28 (m, 6H, H-5^{Man}), 3.26–3.22 (m, 2H, NHCH₂^{EG}), 3.18–3.14 (m, 2H, NHCH₂^{EG}), 3.05–2.76 (m, 26H, 9x Phe^β, 3x Ahx^{ε,Dnd}, N^{Trz,sCy5}CH₂CH₂CH₂), 2.06–1.99 (m, 8H, 3x Ahx^{α,Dnd}, Ahx^{α,sCy5}), 1.85 (p, 2H, *J* = 6.9 Hz, N^{Trz,sCy5}CH₂CH₂), 1.71–1.63 (m, 14H, 2x C-

Experimental Section

$3^{s\text{Cy}5}\text{CH}_3$, $2\times \text{C-}3'^{s\text{Cy}5}\text{CH}_3$, $\text{Ahx}^{\delta,s\text{Cy}5}$), 1.52 (p, 2H, $J = 7.5$ Hz, $\text{Ahx}^{\beta,s\text{Cy}5}$), 1.45–1.34 (m, 6H, $3\times \text{Ahx}^{\beta,\text{Dnd}}$), 1.32–1.21 (m, 8H, $3\times \text{Ahx}^{\delta,\text{Dnd}}$, $\text{Ahx}^{\gamma,s\text{Cy}5}$), 1.15–1.07 (m, 6H, $3\times \text{Ahx}^{\gamma,\text{Dnd}}$).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ/ppm : 172.6, 172.2, 172.1, 171.0, 170.5, 170.3 (C=O), 168.9 (C=O^{GA}), 165.6 (C=O^{BTA}), 143.9 (C-4^{Trz,Dnd}), 143.2 (C-4^{Trz,sCy5}), 138.2, 137.6 (Phe ^{γ}), 129.2, 129.2, 128.1, 128.0 (Phe ^{δ} , Phe ^{ϵ} , Phe ^{ζ} , C-2^{BTA}, C-4^{BTA}, C-6^{BTA}), 126.3 (C-4^{sCy5}, C-4'^{sCy5}), 124.4 (C-5^{Trz,sCy5}), 124.2 (C-5^{Trz,Dnd}), 100.0 (C-1^{Man}), 74.0 (C-5^{Man}), 72.6 (OCH₂^{EG}), 70.9 (C-3^{Man}), 70.3 (C-2^{Man}), 69.7, 69.5, 69.5, 68.9, 68.9, 68.8 (OCH₂^{EG}), 68.6 (N^{Trz,Dnd}CH₂CH₂), 67.0 (C-4^{Man}), 65.7 (OCH'H''^{EG}), 64.1 (C^{Trz,Dnd}CH₂), 63.7 (C^{Trz,sCy5}CH₂), 61.3 (C-6^{Man}), 59.6 (C_q^{Tris}), 53.8 (Phe ^{α}), 49.4 (N^{Trz,Dnd}CH₂), 47.2 (N^{Trz,sCy5}CH₂), 38.5, 37.9, 37.6 (Phe ^{β} , Ahx ^{ϵ ,Dnd}, NHCH₂^{EG}), 35.8 (N^{Trz,sCy5}CH₂CH₂CH₂), 35.7, 35.2 (Ahx ^{α ,Dnd}, Ahx ^{α ,sCy5}), 30.0 (N^{Trz,sCy5}CH₂CH₂), 28.8, 28.8 (Ahx ^{δ ,Dnd}, Ahx ^{δ ,sCy5}), 27.1, 26.9 (C-3^{sCy5}CH₃, C-3'^{sCy5}CH₃), 26.1 (Ahx ^{γ ,Dnd}, Ahx ^{γ ,sCy5}), 25.0, 24.9 (Ahx ^{β ,Dnd}, Ahx ^{β ,sCy5}).

Compound X-32



Reaction was performed using **Compound X-25** (5.6 mg, 1.44 μmol , 1.0 eq.) and AF488-azide (7.22 mM, 1.0 mg, 1.44 μmol , 1.0 eq.) according to SOP 1.

Yield: 1.3 mg (0.29 μmol , 20 %) bright yellow lyophilizate.

MF C₂₂₁H₂₉₆N₄₀Na₂O₅₈S₂

MW 4551.12 [4548.0679].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 1539.6851 [M+3Na]³⁺

calc. 1539.6808

1160.5122 [M+4Na]⁴⁺

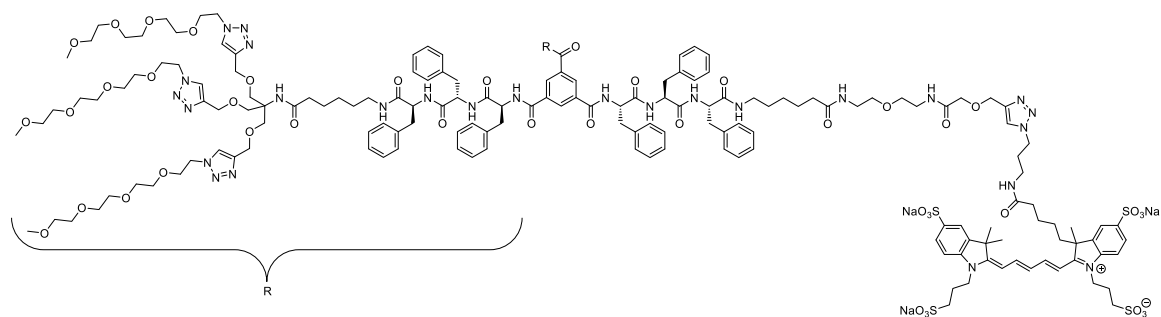
calc. 1160.5079

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, COSY) δ/ppm : 8.92 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, NH^{AF488}), 8.76–8.69 (m, 3H, $3\times \text{NH}^{\text{Phe}}$), 8.43 (s, 1H, CH^{AF488}), 8.36–8.26 (m, 6H, $6\times \text{NH}^{\text{Phe}}$), 8.25–8.21 (m, 2H, H-5^{Trz,AF488}, CH^{AF488}), 8.17 (s, 3H, H-2^{BTA}, H-4^{BTA}, H-6^{BTA}), 8.00 (s, 6H, $6\times \text{H-}5^{\text{Trz,Dnd}}$), 7.91–7.85 (m, 3H, $3\times \text{NH}^{\text{Ahx}}$), 7.83 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz, NH^{EG}), 7.76 (t, 1H, $J = 5.8$ Hz, NH^{EG}), 7.39–7.03 (m, 48H, $2\times \text{NH}^{\text{Tris}}$, CH^{AF488}, $18\times \text{Phe}^{\delta}$, $18\times \text{Phe}^{\epsilon}$, $9\times \text{Phe}^{\zeta}$), 6.83 (bs, 4H, $2\times \text{NH}_2^{\text{AF488}}$), 6.41 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, CH^{AF488}), 6.31 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, CH^{AF488}), 4.77–4.70 (m, 3H, $3\times \text{Phe}^{\alpha}$), 4.59 (s, 2H, C^{Trz,AF488}CH₂), 4.58–4.52 (m, 3H, $3\times \text{Phe}^{\alpha}$), 4.49 (t, 6H, $J = 5.2$ Hz, $6\times \text{N}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$), 4.48–4.42 (m, 17H, $6\times \text{C}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$, N^{Trz,AF488}CH₂, $3\times \text{Phe}^{\alpha}$), 3.91 (s, 2H, C=OCH₂O^{GA}), 3.79 (t, 12H, $J = 5.3$ Hz, $6\times \text{N}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.63 (s, 12H, $6\times \text{C}_q\text{CH}_2^{\text{Tris}}$), 3.51–3.38 (m, 76H, $38\times \text{OCH}_2^{\text{EG}}$), 3.32–3.29 (m, 2H, NH^{AF488}CH₂), 3.25 (q, 2H, $J = 6.2$ Hz, NH^{EG}CH₂), 3.20 (s, 18H, $6\times \text{OCH}_3^{\text{EG}}$),

3.16 (q, 2H, $J = 5.8$ Hz, $\text{NH}^{\text{EG}}\text{CH}_2$), 3.06–2.74 (m, 24H, 9x Phe^{β} , 3x Ahx^{ϵ}), 2.12 (p, 2H, $J = 6.9$ Hz, $\text{N}^{\text{Trz,AF488}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.04–1.98 (m, 6H, 3x Ahx^{α}), 1.45–1.34 (m, 6H, 3x Ahx^{β}), 1.31–1.16 (m, 6H, Ahx^{δ}), 1.16–1.03 (m, 6H, Ahx^{γ}).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ/ppm : 144.3 ($\text{C-}4^{\text{Trz,Dnd}}$), 129.6, 128.5 (Phe^{δ} , Phe^{ϵ}), 124.6 ($\text{C-}5^{\text{Trz,Dnd}}$), 71.7, 70.2, 70.1, 70.0, 70.0 (OCH_2^{EG}), 69.2 ($\text{N}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 68.3 ($\text{C}_q\text{CH}_2^{\text{Tris}}$), 64.6 ($\text{C}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$), 58.5 (OCH_3^{EG}), 49.8 ($\text{N}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$).

Compound X-33



Reaction was performed using **Compound X-25** (3.7 mg, 0.96 μmol , 1.0 eq.) and AF647-azide (4.80 mM, 1.0 mg, 0.96 μmol , 1.0 eq.) according to SOP 1.

Yield: 1.3 mg (0.27 mmol, 28 %) bright blue lyophilizate.

MF $\text{C}_{235}\text{H}_{325}\text{N}_{40}\text{Na}_3\text{O}_{61}\text{S}_4$

MW 4883.61 [4880.2135].

TOF-MS (MALDI, pos., CHCA), m/z : 4905.03 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

calc. 4905.21

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, COSY) δ/ppm : 8.74–8.63 (m, 3H, 3x NH^{Phe}), 8.35–8.29 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{AF647}}$), 8.27–8.18 (m, 7H, 6x NH^{Phe} , $H-5^{\text{Trz,AF647}}$), 8.16 (s, 3H, $H-2^{\text{BTA}}$, $H-4^{\text{BTA}}$, $H-6^{\text{BTA}}$), 8.00 (s, 6H, 6x $H-5^{\text{Trz,Dnd}}$), 7.89–7.80 (m, 5H, 2x NH^{EG} , 3x NH^{Ahx}), 7.63–7.56 (m, 2H, $H-4^{\text{AF647}}$, $H-4'^{\text{AF647}}$), 7.39 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $H-7^{\text{AF647}}$), 7.35 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $H-7'^{\text{AF647}}$), 7.30–7.03 (m, 47H, 18x Phe^{δ} , 18x Phe^{ϵ} , 9x Phe^{ζ} , 2x NH^{Tris}), 6.51 (t, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{AF647}}$), 6.47–6.39 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^{\text{AF647}}$), 4.78–4.69 (m, 3H, 3x Ahx^{α}), 4.61–4.53 (m, 5H, 3x Phe^{α} , $\text{C}^{\text{Trz,AF647}}\text{CH}_2$), 4.49 (t, 12H, $J = 5.3$ Hz, 6x $\text{N}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$), 4.46–4.43 (m, 15H, 6x $\text{C}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2$, 3x Phe^{α}), 4.30–4.18 (m, 6H, $\text{N}^{\text{Trz,AF647}}\text{CH}_2$, $\text{N-}1^{\text{AF647}}\text{CH}_2$, $\text{N-}1'^{\text{AF647}}\text{CH}_2$), 3.89 (s, 2H, $\text{C}=\text{OCH}_2\text{O}^{\text{GA}}$), 3.79 (t, 12H, $J = 5.3$ Hz, 6x $\text{N}^{\text{Trz,Dnd}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.63 (s, 12H, 6x $\text{C}_q\text{CH}_2^{\text{Tris}}$), 3.50–3.43 (m, 60H, 30x OCH_2^{EG}), 3.41–3.38 (m, 16H, 8x OCH_2^{EG}), 3.25 (q, 2H, $J = 6.5$ Hz, $\text{NHCH}_2^{\text{EG}}$), 3.20 (s, 18H, 6x OCH_3^{EG}), 3.16 (q, 2H, $J = 5.8$ Hz, $\text{NHCH}_2^{\text{EG}}$), 3.05–2.75 (m, 24H, 9x Phe^{β} , 3x Ahx^{ϵ}), 2.60–2.55 (m, 2H, $\text{N}^{\text{Trz,AF647}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.04–1.94 (m, 10H, 3x Ahx^{α} , $\text{C}=\text{OCH}_2^{\text{AF647}}$, $\text{N}^{\text{Trz,AF647}}\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.70–1.60 (m, 9H, 3x $\text{CH}_3^{\text{AF647}}$), 1.44–1.36 (m, 8H, 3x Ahx^{β} , $\text{C}=\text{OCH}_2\text{CH}_2^{\text{AF647}}$), 1.34–1.19 (m, 8H, 3x Ahx^{δ} , $\text{C}=\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2^{\text{AF647}}$), 1.13–1.06 (m, 8H, 3x Ahx^{γ} , $\text{C}=\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2^{\text{AF647}}$).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ/ppm : 143.9 ($\text{C-}4^{\text{Trz,Dnd}}$), 129.2, 128.1 (Phe^{δ} , Phe^{ϵ}), 124.2 ($\text{C-}5^{\text{Trz,Dnd}}$), 71.3, 69.8, 69.6, 69.6, 69.6 (OCH_2^{EG}), 68.7

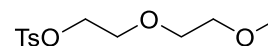
Experimental Section

(N^{Trz,Dnd}CH₂CH₂), 67.9 (C_qCH₂^{Tris}), 64.1 (C^{Trz,Dnd}CH₂), 58.1 (OCH₃^{EG}), 49.3 (N^{Trz,Dnd}CH₂), 29.1 (Ahx^δ), 26.0 (Ahx^γ), 25.0 (Ahx^β).

6.2.2 SOP 2: Tosylation

For the tosylation of ethyleneglycol derivatives, the substrate (1.0 eq.) and NaOH (1.5 eq.) were dissolved in THF:H₂O (5:1). The solution was cooled down in an ice bath and *p*-toluenesulfonyl chloride (1.4 eq.) dissolved in THF was added slowly. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. After complete reaction, the mixture was poured onto ice and the product was extracted with DCM (5x). The organic layer was washed with 1 M HCl (1x) and brine (1x). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*.

Compound X-56



Compound X-56 was synthesized according to SOP 2 from diethyleneglycol monomethyl ether (1.00 g, 8.32 mmol, 1.0 eq.).

Yield: 2.20 g (8.01 mmol, 96 %) light yellow oil.

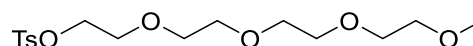
MF C₁₂H₁₈O₅S MW 274.33 [274.0875].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 297.0766 [M+Na]⁺ calc. 297.0767.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K, COSY) δ/ppm: 7.83–7.76 (m, 2H, H-2^{Tos}, H-6^{Tos}), 7.37–7.29 (m, 2H, H-3^{Tos}, H-5^{Tos}), 4.20–4.13 (m, 2H, TosOCH₂), 3.72–3.65 (m, 2H, TosOCH₂CH₂), 3.61–3.54 (m, 2H, OCH₂^{EG}), 3.51–3.44 (m, 2H, OCH₂^{EG}), 3.34 (s, 3H, OCH₃^{EG}), 2.44 (s, 3H, CH₃^{Tos}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K, HSQC, HMBC) δ/ppm: 144.9 (C-4^{Tos}), 133.1 (C-1^{Tos}), 129.9 (C-3^{Tos}, C-5^{Tos}), 128.1 (C-2^{Tos}, C-6^{Tos}), 71.9, 70.8, 69.4, 68.8 (OCH₂^{EG}), 59.2 (OCH₃^{EG}), 21.8 (CH₃^{Tos}).

Compound X-57



Compound X-57 was synthesized according to SOP 2 from tetraethyleneglycol monomethyl ether (1.00 g, 4.80 mmol, 1.0 eq.).

Yield: 1.50 g (4.13 mmol, 86 %) light yellow oil.

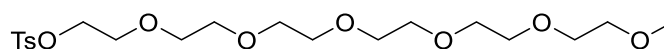
MF C₁₆H₂₆O₇S MW 362.44 [362.1399].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 385.1299 [M+Na]⁺ calc. 385.1291.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K, COSY) δ /ppm: 7.85–7.75 (m, 2H, *H*-2^{Tos}, *H*-6^{Tos}), 7.34 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, *H*-3^{Tos}, *H*-5^{Tos}), 4.20–4.11 (m, 2H, TosOCH₂), 3.72–3.66 (m, 2H, TosOCH₂CH₂), 3.66–3.60 (m, 6H, 3x OCH₂^{EG}), 3.60–3.51 (m, 6H, 3xOCH₂^{EG}), 3.37 (s, 3H, OCH₃^{EG}), 2.44 (s, 3H, CH₃^{Tos}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 144.8 (C-4^{Tos}), 133.0 (C-1^{Tos}), 129.8 (C-3^{Tos}, C-5^{Tos}), 128.0 (C-2^{Tos}, C-6^{Tos}), 71.9, 70.6, 70.8, 70.6, 70.5, 69.3, 68.7 (OCH₂^{EG}), 59.1 (OCH₃^{EG}), 21.7 (CH₃^{Tos}).

Compound X-58



Compound X-58 was synthesized according to SOP 2 from hexaethyleneglycol monomethyl ether (1.00 g, 3.37 mmol, 1.0 eq.).

Yield: 1.44 g (3.20 mmol, 95 %) light yellow oil.

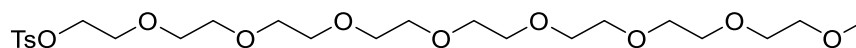
MF C₂₀H₃₄O₉S MW 450.54 [450.1924].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 473.1839 [M+Na]⁺ calc. 473.1816.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K, COSY) δ /ppm: 7.84–7.71 (m, 2H, *H*-2^{Tos}, *H*-6^{Tos}), 7.34 (m, 2H, *H*-3^{Tos}, *H*-5^{Tos}), 4.20–4.10 (m, 2H, TosOCH₂), 3.75–3.49 (m, 22H, 11x OCH₂^{EG}), 3.37 (s, 3H, OCH₃^{EG}), 2.44 (s, 3H, CH₃^{Tos}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 144.8 (C-4^{Tos}), 133.0 (C-1^{Tos}), 129.8 (C-3^{Tos}, C-5^{Tos}), 128.0 (C-2^{Tos}, C-6^{Tos}), 71.9, 70.8, 70.6, 70.6, 70.5, 69.3, 68.7 (OCH₂^{EG}), 59.1 (OCH₃^{EG}), 21.7 (CH₃^{Tos}).

Compound X-59



Compound X-59 was synthesized according to SOP 2 from octaethyleneglycol monomethyl ether (1.00 g, 2.60 mmol, 1.0 eq.).

Yield: 1.24 g (2.29 mmol, 88 %) light yellow oil.

MF C₂₄H₄₂O₁₁S MW 538.65 [538.2448].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 556.2796 [M+Na]⁺ calc. 556.2786.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K, COSY) δ /ppm: 7.84–7.75 (m, 2H, *H*-2^{Tos}, *H*-6^{Tos}), 7.34 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, *H*-3^{Tos}, *H*-5^{Tos}), 4.20–4.11 (m, 2H, TosOCH₂), 3.73–3.49 (m, 30H, 15x OCH₂^{EG}), 3.37 (s, 3H, OCH₃^{EG}), 2.44 (s, 3H, CH₃^{Tos}).

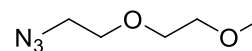
Experimental Section

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 298 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 129.8 (C-3^{Tos}, C-5^{Tos}), 128.0 (C-2^{Tos}, C-6^{Tos}), 72.0, 70.8, 70.6, 70.6, 70.5, 69.3, 68.7 (OCH_2^{EG}), 59.1 (OCH_3^{EG}), 21.7 (CH_3^{Tos}).

6.2.3 SOP 3: Azidation

For the azidation of ethyleneglycol tosylates, the substrate (1.0 eq.) was dissolved in acetone:H₂O (3:1) and NaN₃ (2.0 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at 75 °C for 65 h. After reaction, acetone was removed under reduced pressure and the solution was diluted with H₂O. The aqueous solution was extracted with either Et₂O or DCM (5x) dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*.

Compound X-60



Compound X-60 was synthesized according to SOP 3 from **Compound X-56** (2.20 g, 8.01 mmol, 1.0 eq.).

Yield: 0.44 g (3.03 mmol, 38 %) light yellow oil.

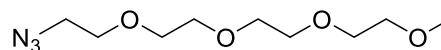
MF C₅H₁₁N₃O₂ MW 145.16 [145.0851].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 168.0737 [M+Na]⁺ calc. 168.0743.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 298 K, COSY) δ /ppm: 3.70–3.61 (m, 4H, 2x OCH_2^{EG}), 3.60–3.53 (m, 2H, OCH_2^{EG}), 3.45–3.36 (m, 5H, N_3CH_2 , OCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 298 K, HSQC, HMBC) δ /ppm: 70.6, 70.1 (OCH_2^{EG}), 59.2 (OCH_3), 50.7 (N_3CH_2).

Compound X-61



Compound X-61 was synthesized according to SOP 3 from **Compound X-57** (1.50 g, 4.13 mmol, 1.0 eq.).

Yield: 0.76 g (3.28 mmol, 79 %) light yellow oil.

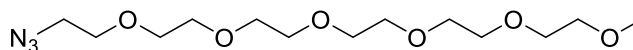
MF C₉H₁₉N₃O₄ MW 233.27 [233.1376].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 256.1267 [M+Na]⁺ calc. 256.1268.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 298 K, COSY) δ /ppm: 3.72–3.61 (m, 12H, 6x OCH_2^{EG}), 3.58–3.50 (m, 2H, OCH_2^{EG}), 3.43–3.34 (m, 5H, N_3CH_2 , OCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 298 K, HSQC, HMBC) δ/ppm : 72.0, 70.7, 70.7, 70.5, 70.1 (OCH_2^{EG}), 59.1 (OCH_3), 50.7 (N_3CH_2).

Compound X-62



Compound X-62 was synthesized according to SOP 3 from **Compound X-58** (1.44 g, 3.20 mmol, 1.0 eq.).

Yield: 0.79 g (2.46 mmol, 77 %) light yellow oil.

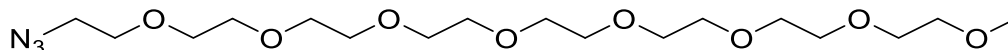
MF $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6$ MW 321.37 [321.1900].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 344.1788 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 344.1792.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 298 K, COSY) δ/ppm : 3.70–3.61 (m, 20H, 10x OCH_2^{EG}), 3.56–3.52 (m, 2H, OCH_2^{EG}), 3.41–3.35 (m, 5H, N_3CH_2 , OCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 298 K, HSQC, HMBC) δ/ppm : 72.0, 70.7, 70.7, 70.7, 70.6, 70.5, 70.1 (OCH_2^{EG}), 59.1 (OCH_3), 50.7 (N_3CH_2).

Compound X-63



Compound X-63 was synthesized according to SOP 3 from **Compound X-59** (1.24 g, 2.29 mmol, 1.0 eq.).

Yield: 0.76 g (1.86 mmol, 81 %) light yellow oil.

MF $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_8$ MW 409.48 [409.2424].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), m/z : 427.2759 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 427.2762.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 298 K, COSY) δ/ppm : 3.70–3.60 (m, 28H, 14x OCH_2^{EG}), 3.57–3.51 (m, 2H, OCH_2^{EG}), 3.41–3.33 (m, 5H, N_3CH_2 , OCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 298 K, HSQC, HMBC) δ/ppm : 72.0, 70.7, 70.7, 70.7, 70.6, 70.5, 70.1 (OCH_2^{EG}), 59.1 (OCH_3), 50.7 (N_3CH_2).

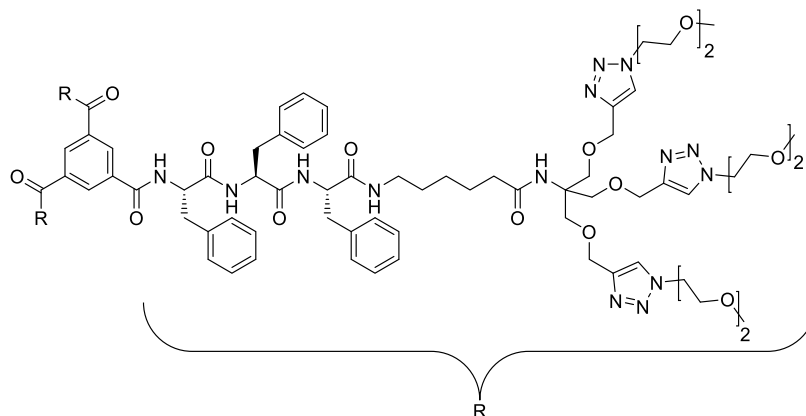
6.2.4 SOP 4: “Nonaclick”

For dendron functionalization of **Compound X-55** in a “nonaclick”-reaction, **Compound X-55** (1.0 eq.) and the azide ethylenglycol derivative (18.0 eq.) was dissolved in DMF. The solution was degassed by three freeze-pump-thaw cycles. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.0 eq.), sodium

Experimental Section

ascorbate (3.0 eq.) and TBTA (3.0 eq.) were added under argon counterflow. The resulting solution was stirred at 40 °C for 22 d. After that, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in a mixture of DMSO:H₂O (1:1). Copper was exchanged on Amberlite™ IRC-748 ion exchange resin. The solvent was removed *via* lyophilization and the crude product was purified *via* size exclusion chromatography (BioBeads S-X1, DMF), before further purification *via* HPLC (Method H).

Compound X-64



Compound X-64 was synthesized according to SOP 4 from **Compound X-55** (9 mg, 0.004 mmol, 1.0 eq.) and **Compound X-60** (9 mg, 0.064 mmol, 18.0 eq.).

Yield: 3 mg (0.76 μ mol, 21 %) colorless lyophilizate.

MF C₁₉₂H₂₆₄N₄₂O₄₂

MW 3832.48 [3829.9813].

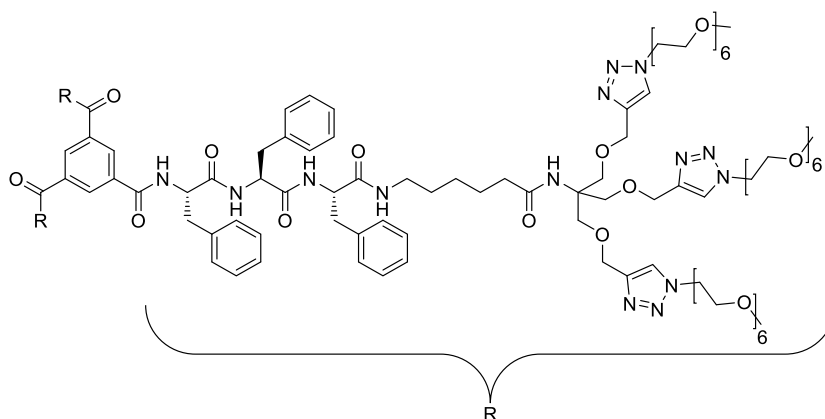
TOF-MS (MALDI, pos., CHCA), *m/z*: 3895.59 [M+Cu]⁺

calc. 3894.92.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 8.71–8.64 (s, 3H, 3x NH^{Phe-1}), 8.24–8.12 (m, 9H, 3x NH^{Phe-2}, 3x NH^{Phe-3}, H-2^{BTA}, H-4^{BTA}, H-6^{BTA}), 7.99 (s, 9H, H-5^{Trz}), 7.82 (s, 3H, 3x NH^{Ahx}), 7.33–7.01 (m, 48H, 18x Phe ^{δ} , 18x Phe ^{ϵ} , 9x Phe ^{ζ} , 3x NH^{Tris}), 4.82–4.70 (m, 3H, 3x Phe ^{α}), 4.67–4.34 (m, 42H, 9x C^{Trz}CH₂, 9x N^{Trz}CH₂, 6x Phe ^{α}), 3.78 (t, 18H, *J* = 5.2 Hz, 9x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.69–3.58 (m, 18H, 9x C_qCH₂^{Tris}), 3.55–3.25 (m, 36H, 18x OCH₂^{EG}), 3.18 (s, 27H, 9x OCH₃^{EG}), 3.22–3.12 (m, 24H, 3x Ahx ^{ϵ} , 9x Phe ^{β}), 2.14–1.95 (m, 6H, 3x Ahx ^{α}), 1.56–0.92 (m, 18H, 3x Ahx ^{β} , 3x Ahx ^{γ} , 3x Ahx ^{δ}).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ /ppm: 144.3 (C_q^{Trz}), 129.6, 129.6, 128.5, 128.5, 128.4, 124.5, (C-2^{BTA}, C-4^{BTA}, C-6^{BTA}, Phe ^{δ} , Phe ^{ϵ} , Phe ^{ζ}), 71.5, 69.8, 69.2 (C_qCH₂^{Tris}), 68.3 (N^{Trz}CH₂CH₂), 64.6 (C^{Trz}CH₂), 60.0 (C_q^{Tris}), 58.5 (OCH₃^{EG}), 49.8 (N^{Trz}CH₂).

Compound X-65



Compound X-65 was synthesized according to SOP 4 from **Compound X-55** (10 mg, 0.004 mmol, 1.0 eq.) and **Compound X-62** (23 mg, 0.071 mmol, 18.0 eq.).

Yield: 11 mg (2.09 μ mol, 53 %) colorless lyophilizate.

MF C₂₆₄H₄₀₈N₄₂O₇₈

MW 5418.38 [5414.9251].

TOF-MS (MALDI, pos., CHCA), *m/z*: 5440.35 [M+Na]⁺

calc. 5439.92

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY) δ /ppm: 8.77–8.62 (s, 3H, 3x NH^{Phe-1}), 8.31–8.05 (m, 9H, 3x NH^{Phe-2}, 3x NH^{Phe-3}, H-2^{BTA}, H-4^{BTA}, H-6^{BTA}), 8.00 (s, 9H, H-5^{Trz}), 7.84 (s, 3H, 3x NH^{Ahx}), 7.36–6.98 (m, 48H, 18x Phe ^{δ} , 18x Phe ^{ϵ} , 9x Phe ^{ζ} , 3x NH^{Tris}), 4.78–4.70 (m, 3H, 3x Phe ^{α}), 4.67–4.30 (m, 42H, 9x C^{Trz}CH₂, 9x N^{Trz}CH₂, 6x Phe ^{α}), 3.80 (t, *J* = 5.2 Hz, 18H, 9x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.79 (t, 18H, *J* = 5.4 Hz, 9x N^{Trz}CH₂CH₂), 3.63 (s, 18H, 9x C_qCH₂^{Tris}), 3.54–3.42 (m, 180H, 90x OCH₂^{EG}), 3.21 (s, 27H, 9x OCH₃^{EG}), 3.06–2.74 (m, 24H, 9x Phe ^{β} , 3x Ahx ^{ϵ}), 2.22–1.88 (m, 6H, 3x Ahx ^{α}), 1.67–0.96 (m, 18H, 3x Ahx ^{β} , 3x Ahx ^{γ} , 3x Ahx ^{δ}).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC) resolved signals δ /ppm: 144.3 (C_q^{Trz}), 138.0, 137.9, 129.7, 129.6, 129.1, 128.5, 128.5, 128.4, 124.6, (C-2^{BTA}, C-4^{BTA}, C-6^{BTA}, Phe ^{δ} , Phe ^{ϵ} , Phe ^{ζ}), 71.7, 70.2, 70.2, 70.1, 70.0, 70.0, 69.2 (OCH₂^{EG}), 68.3 (N^{Trz}CH₂CH₂), 64.6 (C^{Trz}CH₂O), 60.0 (C_q^{Tris}), 58.5 (OCH₃^{EG}), 49.8 (N^{Trz}CH₂^{EG}).

6.3 Solid phase peptide synthesis

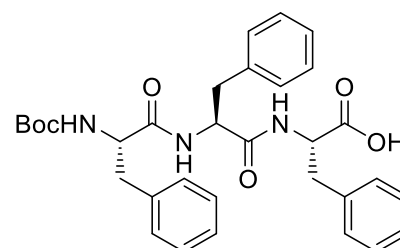
Solid phase peptide synthesis was performed using the standard Fmoc-protocol without capping, hence consisting of the following two steps:^[201]

1. Fmoc-deprotection: The Fmoc protecting group was cleaved from the amino acid using a solution of 20% piperidine in DMF.
2. Coupling: To couple the amino acid, 4 eq. of the Fmoc protected amino acid was used with 4 eq. of 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), 4 eq. 1-hydroxybenzotriazol (HOBt) and 6 eq. diisopropylethylamine (DIPEA) in DMF, added to the free amine of the amino acid on the resin.

For each amino acid only one coupling step was performed. The procedure was repeated for all amino acids in the sequence.

Compound X-8^[183]

(Boc-F₃)



To load the amino acid on the resin, Fmoc-Phe-OH (2.48 g, 6.40 mmol, 2.0 eq.) was dissolved in DCM (20 mL). The solution was added to 2-chlorotriylchloride resin (1.6 mmol/g loading capacity, 2.00 g, 3.20 mmol, 1.0 eq.) in a *Merrifield* reactor and DIPEA (1.11 mL, 6.40 mmol, 2.0 eq.) was added. The reaction mixture was shaken for five minutes at room temperature, another portion of DIPEA (1.67 mL, 9.60 mmol, 3.0 eq.) was added and shaking was continued for 60 min. To cap non-functionalized sites on the resin, methanol (2 mL) was added and the suspension was shaken for 15 min at room temperature. After the reaction, the vessel was drained and washed with DCM (3 x 10 mL), DMF (3 x 10 mL) and DCM (3 x 10 mL) again. The loaded resin was used without further drying and was subjected to the solid phase peptide synthesis as described above.

Experimental Section

Table 6.10: Chemicals and masses used in SPPS of compound **15**.

equivalents	building block	weight
1	Fmoc-Phe-2-Cl-Trt resin	
4	Fmoc-Phe-OH	5.46 g
4	Boc-Phe-OH	3.74 g

Boc-Phe-OH was used as the last amino acid to introduce the Boc-protecting group in the short peptide sequence. After solid phase peptide synthesis, the resin was transferred to a MERRIFIELD reactor to cleave the peptide from the resin. A cleavage cocktail of TFE (3 mL) in DCM (12 mL) was added and the suspension was shaken for one hour. The solution was filtered, and the cleavage procedure was repeated three times. The solutions were combined and the solvent removed *in vacuo* and co-distilled with toluene (5 x 12 mL). The residue was taken up in Milli-Q water and subjected to lyophilization to yield the peptide as colorless amorphous solid.

Yield: 1.71 g (3.05 mmol, 95%) colorless amorphous lyophilizate.

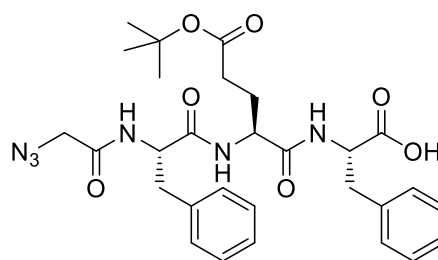
MF C₃₂H₃₇N₃O₆ MW 559.66 [559.2682].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 582.2584 [M+Na]⁺ calc. 582.2574.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, COSY), rotamers (A: major, B: minor), A:B, 80:20, δ /ppm: 8.45–8.33 (m, 1H, NH^F), 7.98 (d, 0.2H, $J_{\text{NH}^{\text{F}},\text{F}^{\alpha}}^{\square} = 8.4$ Hz, NH^F-B), 7.90 (d, 0.8H, $J_{\text{NH}^{\text{F}},\text{F}^{\alpha}}^{\square} = 8.4$ Hz, NH^F-A), 7.30–7.10 (m, 15H, 6x^F^δ, 6x^F^ε, 3x^F^ζ), 6.86 (d, 0.8H, $J_{\text{NH}^{\text{F}},\text{F}^{\alpha}}^{\square} = 8.9$ Hz, NH^F-A), 6.41 (d, 0.2H, $J_{\text{NH}^{\text{F}},\text{F}^{\alpha}}^{\square} = 8.7$ Hz, NH^F-B), 4.67–4.53 (m, 1H, F^α), 4.45 (td, 1H, $J_{\text{F}^{\alpha},\text{F}^{\beta}}^{\square} = 8.2$ Hz, $J_{\text{F}^{\alpha},\text{NH}^{\text{F}}}^{\square} = 5.4$ Hz, F^α), 4.13–4.03 (m, 0.8H, F^α-A), 4.03–3.95 (m, 0.2H, F^α-B), 3.12–2.97, 2.97–2.88, 2.83–2.73, 2.63–2.53 (m, 6H, 3x^F^β), 1.26 (s, 7.2H, CH₃^{Boc}-A), 1.08 (s, 1.8H, CH₃^{Boc}-B).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K, HSQC, HMBC), rotamers (A: major, B: minor), δ /ppm: 172.72 (C=O^F), 171.28 (C=O^F), 170.97 (C=O^F), 155.03 (C=O^{Boc}), 138.14, 137.49, 137.36 (F^γ), 129.40, 129.13, 128.25, 127.99, 126.49, 126.27, 126.12 (F^δ, F^ε, F^ζ), 78.10 (C_q^{Boc}), 55.82, 53.49, 53.31 (F^α), 37.83, 37.59, 36.71 (F^β), 28.12 (CH₃^{Boc}-A), 27.72 (CH₃^{Boc}-B).

Compound Y-3



To load the amino acid on the resin, Fmoc-Phe-OH (1.24 g, 3.20 mmol, 2.0 eq.) was dissolved in DCM (10 mL). The solution was added to 2-chlorotrylchloride resin (1.6 mmol/g loading capacity, 1.00 g, 1.60 mmol, 1.0 eq.) in a MERRIFIELD reactor and DIPEA (0.56 mL, 3.20 mmol, 2.0 eq.) was added. The reaction mixture was shaken for five minutes at room temperature, another portion of DiPEA (0.84 mL, 4.80 mmol, 3.0 eq.) was added and shaking was continued for 60 min. To cap non-functionalized sites on the resin, methanol (1 mL) was added and the suspension was shaken for 15 min at room temperature. After the reaction, the vessel was drained and washed with DCM (3 x 10 mL), DMF (3 x 10 mL) and DCM (3 x 10 mL) again. The loaded resin was used without further drying and was subjected to the solid phase peptide synthesis as described above.

Table 6.11: Chemicals and masses used in SPPS of compound 15.

equivalents	building block	weight
1	Fmoc-Phe-2-Cl-Trt resin	
5	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	3.74 g
5	Fmoc-Phe-OH	3.41 g
5	N ₃ -Ac-OH	0.889 g

After solid phase peptide synthesis, the resin was transferred to a Merrifield reactor to cleave the peptide from the resin. A cleavage cocktail of TFE (5 mL) in DCM (5 mL) was added and the suspension was shaken for one hour. The solution was filtered, and the cleavage procedure was repeated two times. The solutions were combined and the solvent removed *in vacuo* and co-distilled with toluene (5 x 12 mL). The residue was taken up in Milli-Q water and subjected to lyophilization to yield the peptide as colorless amorphous solid.

Yield: 929 mg (1.60 mmol, quant.) colorless lyophilizate.

MF C₂₉H₃₆N₆O₇ MW 580.64 [580.2645].

HR-TOF-MS (ESI, pos.), *m/z*: 579.2557 [M+H]⁺ calc. 579.2572.

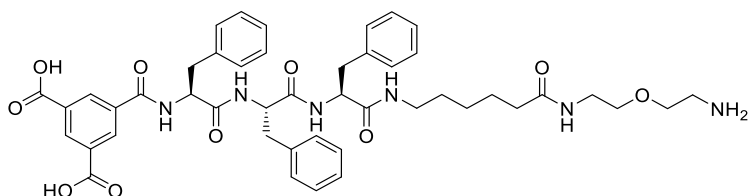
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K) δ /ppm: 12.79 (bs, 1H, COOH), 8.31 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, NH^{Phe}), 8.23 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, NH^{Glu}), 8.15 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, NH^{Phe}), 7.30–7.14 (m, 10H, 4x Phe^δ, 4x Phe^ε, 2x Phe^ζ), 4.62–4.55 (m, 1H, Phe^α), 4.47–4.40 (m, 1H, Glu^α), 4.33–4.26 (m, 1H, Phe^α), 3.90–3.69 (m, 2H, Gly^α), 3.08 (dd, 1H, *J* = 14.0 Hz, *J* = 5.1 Hz, Phe^{β-a}), 2.99–2.88

Experimental Section

(m, 2H, Phe^{β-a}, Phe^{β-b}), (dd, 1H, $J = 13.9$ Hz, $J = 10.0$ Hz, Phe^{β-b}), 2.25–2.16 (m, 2H, Glu^γ), 1.92–1.80 (m, 1H, Glu^{β-a}), 1.79–1.67 (m, 1H, Glu^{β-b}), 1.40 (s, 9H, 3x CH₃^{OrBu}).

Compound X-23^[183]

(BTA-F₃-Ahx-EG₂-NH₂)



Solid phase peptide synthesis was performed as described above using the preloaded custom resin Bis-(2-aminoethyl) ether trityl polystyrene resin with a loading of 0.5 mmol/g (1000 mg, 0.500 mmol, 10.0 eq.) from *Rapp Polymere* (Tübingen, Germany).

Table 6.12: Chemicals and masses used in SPPS of compound **21**.

equivalents	building block	weight
1	NH ₂ -EG ₂ -Trt resin	1000 mg
5	Fmoc-Ahx-OH	972 mg
5	Fmoc-Phe-OH	1065 mg
5	Fmoc-Phe-OH	1065 mg
5	Fmoc-Phe-OH	1065 mg

The trimesic acid was coupled manually by transferring it into a *Merrifield* reactor. Trimesic acid (578 mg, 2.750 mmol, 5.5 eq.), HATU (950 mg, 2.500 mmol, 5.0 eq.), HOAt (340 mg, 2.500 mmol, 5.0 eq.) and DIPEA (1.39 mL, 7.980 mmol, 16.0 eq.) were dissolved in peptide grade DMF (100 mL) and stirred for 30 min before adding the activated ester to the resin. The resin was shaken 90 min, before the coupling solution was drained. The resin was washed with THF:H₂O (4:1, 50 mL) once and DCM (5 x 50 mL). The resulting peptide was cleaved from the resin using TFA:H₂O:TIS (38:1:1, 2 x 15 mL) by shaking for two hours individually. The combined solutions were removed *in vacuo* and co-distilled with toluene (3 x 15 mL). The residue was taken up in Milli-Q water and subjected to lyophilization. The crude material was purified *via* HPLC (Method A). Removal of the solvent and subsequent lyophilization yields a colorless amorphous solid.

Yield: 288 mg (0.338 mmol, 68%) colorless amorphous lyophilizate.

MF C₄₆H₅₄N₆O₁₀

MW 850.97 [850.3901].

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 296 K) δ/ppm: 9.05 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, NH^{Phe-1}), 8.56 (s, 3H, H-2^{BTA}, H-4^{BTA}, H-6^{BTA}), 8.16 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, NH^{Phe-2}), 8.12 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, NH^{Phe-3}), 7.86–7.75 (m, 4H, NH^{Ahx}, NH^{EG}, NH₂^{EG}), 7.30–7.05 (m, 15H, 6xPhe^δ, 6xPhe^ε, 3xPhe^ζ), 4.73

(ddd, 1H, $J = 10.6$ Hz, $J = 8.4$ Hz, $J = 4.4$ Hz, Phe-1 $^{\alpha}$), 4.54 (td, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, Phe-2 $^{\alpha}$), 4.46 (td, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 6.0$ Hz, Phe-3 $^{\alpha}$), 3.56 (t, 2H, $J = 5.2$ Hz, OCH $_2^{\text{EG}}$), 3.42 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz, OCH $_2^{\text{EG}}$), 3.23 (q, 2H, $J = 5.8$ Hz, Ahx $^{\epsilon}$), 3.05–2.90 (m, 8H, Phe-1 $^{\beta}$, Phe-3 $^{\beta}$, NHCH $_2^{\text{EG}}$, NH $_2$ CH $_2^{\text{EG}}$), 2.87–2.76 (m, 2H, Phe-2 $^{\beta}$), 2.05 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ahx $^{\alpha}$), 1.45 (quint, 2H, $J = 7.6$ Hz, Ahx $^{\beta}$), 1.35–1.22 (m, 2H, Ahx $^{\delta}$), 1.20–1.09 (m, 2H, Ahx $^{\gamma}$).

7 Literaturverzeichnis

- [1] T. F. A. De Greef, M. M. J. Smulders, M. Wolffs, A. P. H. J. Schenning, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5687–5754.
- [2] E. Krieg, M. M. C. Bastings, P. Besenius, B. Rybtchinski, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2414–2477.
- [3] J. M. Lehn, *Science* **1993**, *260*, 1762–1763.
- [4] L. Brunsveld, B. J. B. Folmer, E. W. Meijer, R. P. Sijbesma, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 4071–4098.
- [5] C. Janke, M. Kneussel, *Trends Neurosci.* **2010**, *33*, 362–372.
- [6] C. Stourmaras, A. Gravanis, A. N. Margioris, F. Lang, *Cytoskeleton* **2014**, *71*, 285–293.
- [7] R. Dominguez, K. C. Holmes, *Annu. Rev. Biophys.* **2011**, *40*, 169–186.
- [8] T. D. Pollard, G. G. Borisy, *Cell* **2003**, *113*, 549.
- [9] T. D. Pollard, L. Blanchoin, R. D. Mullins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 545–576.
- [10] H. E. Huxley, *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 281–308.
- [11] A. Wegner, *J. Mol. Biol.* **1976**, *108*, 139–150.
- [12] G. J. Brouhard, L. M. Rice, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 451–463.
- [13] T. Mitchison, M. Kirschner, *Nature* **1984**, *312*, 237–242.
- [14] M. Fändrich, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2066–2078.
- [15] G. Merlini, V. Bellotti, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 583–596.
- [16] P. Scheltens, B. De Strooper, M. Kivipelto, H. Holstege, G. Chételat, C. E. Teunissen, J. Cummings, W. M. van der Flier, *Lancet* **2021**, *397*, 1577–1590.
- [17] R. P. Sijbesma, F. H. Beijer, L. Brunsveld, B. J. B. Folmer, J. H. K. K. Hirschberg, R. F. M. Lange, J. K. L. Lowe, E. W. Meijer, *Science* **1997**, *278*, 1601–1604.
- [18] S. H. M. Söntjens, R. P. Sijbesma, M. H. P. Van Genderen, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7487–7493.
- [19] C. Fouquey, J. Lehn, A. Levelut, *Adv. Mater.* **1990**, *2*, 254–257.
- [20] T. Aida, A. Takemura, M. Fuse, S. Inoue, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, *26*, 391.
- [21] P. K. Hashim, J. Bergueiro, E. W. Meijer, T. Aida, *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *105*, 101250.
- [22] C. M. A. Leenders, M. B. Baker, I. A. B. Pijpers, R. P. M. Lafleur, L. Albertazzi, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Soft Matter* **2016**, *12*, 2887–2893.
- [23] P. Besenius, K. P. van den Hout, H. M. H. G. Albers, T. F. A. de Greef, L. L. C. Olijve, T. M. Hermans, B. F. M. de Waal, P. H. H. Bomans, N. A. J. M. Sommerdijk, G. Portale, A. R. A. Palmans, M. H. P. van Genderen, J. A. J. M. Vekemans, E. W. Meijer,

- Chem. – A Eur. J.* **2011**, *17*, 5193–5203.
- [24] P. Yakovchuk, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 564–574.
- [25] M. M. Safont-Sempere, G. Fernández, F. Würthner, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5784–5814.
- [26] H. Kar, S. Ghosh, *Isr. J. Chem.* **2019**, *59*, 881–891.
- [27] H. Frisch, E. Fritz, F. Stricker, L. Schmäser, D. Spitzer, T. Weidner, B. J. Ravoo, P. Besenius, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 7242–7246.
- [28] S. Engel, D. Spitzer, L. L. Rodrigues, E.-C. Fritz, D. Straßburger, M. Schönhoff, B. J. Ravoo, P. Besenius, *Faraday Discuss.* **2017**, *204*, 53–67.
- [29] D. Görl, X. Zhang, V. Stepanenko, F. Würthner, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–8.
- [30] S. Yagai, S. Hamamura, H. Wang, V. Stepanenko, T. Seki, K. Unoike, Y. Kikkawa, T. Karatsu, A. Kitamura, F. Würthner, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3926–3929.
- [31] W. Zhang, W. Jin, T. Fukushima, A. Saeki, S. Seki, T. Aida, *Science* **2011**, *334*, 340–343.
- [32] S. H. Jung, D. Bochicchio, G. M. Pavan, M. Takeuchi, K. Sugiyasu, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 10570–10577.
- [33] A. Das, G. Vantomme, A. J. Markvoort, H. M. M. ten Eikelder, M. Garcia-Iglesias, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7036–7044.
- [34] E. Elacqua, D. S. Lye, M. Weck, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2405–2416.
- [35] M. Ueda, T. Aoki, T. Akiyama, T. Nakamuro, K. Yamashita, H. Yanagisawa, O. Nureki, M. Kikkawa, E. Nakamura, T. Aida, Y. Itoh, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 5121–5126.
- [36] H. Wang, J. Mills, B. Sun, H. Cui, *Prog. Polym. Sci.* **2024**, *148*, 101769.
- [37] B. Adelizzi, N. J. Van Zee, L. N. J. de Windt, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 6110–6121.
- [38] M. Hartlieb, E. D. H. Mansfield, S. Perrier, *Polym. Chem.* **2020**, *11*, 1083–1110.
- [39] A. Sarkar, R. Sasmal, C. Empereur-mot, D. Bochicchio, S. V. K. Kompella, K. Sharma, S. Dhiman, B. Sundaram, S. S. Agasti, G. M. Pavan, S. J. George, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 7606–7617.
- [40] B. N. S. Thota, X. Lou, D. Bochicchio, T. F. E. Paffen, R. P. M. Lafleur, J. L. J. van Dongen, S. Ehrmann, R. Haag, G. M. Pavan, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, *57*, 6843–6847.
- [41] A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 8948–8968.
- [42] A. R. A. Palmans, J. A. J. M. Vekemans, E. E. Havinga, E. W. Meijer, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1997**, *36*, 2648–2651.
- [43] S. J. George, Ž. Tomović, M. M. J. Smulders, T. F. A. de Greef, P. E. L. G. Leclère, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *Angew. Chemie* **2007**, *119*, 8354–8359.

- [44] T. Kim, T. Mori, T. Aida, D. Miyajima, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6689–6694.
- [45] F. Helmich, M. M. J. Smulders, C. C. Lee, A. P. H. J. Schenning, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12238–12246.
- [46] P. Ahlers, H. Frisch, P. Besenius, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 7245–7250.
- [47] C. M. Berac, L. Zengerling, D. Straßburger, R. Otter, M. Urschbach, P. Besenius, *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41*, 1900476.
- [48] D. Spitzer, L. L. Rodrigues, D. Straßburger, M. Mezger, P. Besenius, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56*, 15461–15465.
- [49] Q. Song, S. Goia, J. Yang, S. C. L. Hall, M. Staniforth, V. G. Stavros, S. Perrier, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 382–389.
- [50] P. Besenius, Y. Goedegebure, M. Driesse, M. Koay, P. H. H. Bomans, A. R. A. Palmans, P. Y. W. Dankers, E. W. Meijer, *Soft Matter* **2011**, *7*, 7980.
- [51] M. B. Baker, R. P. J. Gosens, L. Albertazzi, N. M. Matsumoto, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 207–213.
- [52] D. Straßburger, Development of Fully Synthetic MUC1 Antitumor Vaccines Based on a Modular Supramolecular Polymer Platform, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2019**.
- [53] M. Urschbach, Entwicklung Supramolekularer Multikomponenten- Copolymere Zum Aufbau Depotbildender Glycokonjugatvakzine, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2022**.
- [54] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koks, J. Dernedde, C. Graf, E. Knapp, R. Haag, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472–10498.
- [55] Y. H. Chung, H. Cai, N. F. Steinmetz, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *156*, 214–235.
- [56] D. Straßburger, N. Stergiou, M. Urschbach, H. Yurugi, D. Spitzer, D. Schollmeyer, E. Schmitt, P. Besenius, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 912–916.
- [57] M. Biancalana, S. Koide, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, *1804*, 1405–1412.
- [58] J. C. Sang, J.-E. Lee, A. J. Dear, S. De, G. Meisl, A. M. Thackray, R. Bujdoso, T. P. J. Knowles, D. Klenerman, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4588–4597.
- [59] Y. Qian, K. Kaur, J. C. Foster, J. B. Matson, *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 1077–1086.
- [60] J. C. Foster, S. C. Radzinski, X. Zou, C. V. Finkielstein, J. B. Matson, *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 1300–1306.
- [61] M. Ziaunys, K. Mikalauskaite, V. Smirnovas, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20303.
- [62] W. BECKER, *J. Microsc.* **2012**, *247*, 119–136.
- [63] L. Albertazzi, D. van der Zwaag, C. M. A. Leenders, R. Fitzner, R. W. van der Hofstad, E. W. Meijer, *Science* **2014**, *344*, 491–495.

- [64] J. Y. Rho, J. C. Brendel, L. R. MacFarlane, E. D. H. Mansfield, R. Peltier, S. Rogers, M. Hartlieb, S. Perrier, *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1704569.
- [65] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in Der Organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [66] P. Atkins, R. Friedman, *Molecular Quantum Mechanics, Fourth Edition*, Oxford University Press, New York, **2005**.
- [67] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**.
- [68] M. Kasha, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14.
- [69] M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641–2684.
- [70] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819–846.
- [71] A. Kaur, S. Dhakal, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2020**, *123*, 115777.
- [72] R. Roy, S. Hohng, T. Ha, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 507–516.
- [73] J. A. Broussard, K. J. Green, *J. Invest. Dermatol.* **2017**, *137*, e185–e191.
- [74] M. B. Baker, L. Albertazzi, I. K. Voets, C. M. A. Leenders, A. R. A. Palmans, G. M. Pavan, E. W. Meijer, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6234.
- [75] M. M. J. Smulders, M. M. L. Nieuwenhuizen, T. F. A. De Greef, P. Van Der Schoot, A. P. H. J. Schenning, E. W. Meijer, *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16*, 362–367.
- [76] D. Zhao, J. S. Moore, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3471–3491.
- [77] S. I. A. Cohen, M. Vendruscolo, M. E. Welland, C. M. Dobson, E. M. Terentjev, T. P. J. Knowles, *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 065105.
- [78] G. Meisl, L. Rajah, S. A. I. Cohen, M. Pfammatter, A. Šarić, E. Hellstrand, A. K. Buell, A. Aguzzi, S. Linse, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, T. P. J. Knowles, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 7087–7097.
- [79] R. P. M. Lafleur, S. M. C. Schoenmakers, P. Madhikar, D. Bochicchio, B. Baumeier, A. R. A. Palmans, G. M. Pavan, E. W. Meijer, *Macromolecules* **2019**, *52*, 3049–3055.
- [80] D. Bochicchio, M. Salvalaglio, G. M. Pavan, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 147.
- [81] A. L. de Marco, D. Bochicchio, A. Gardin, G. Doni, G. M. Pavan, *ACS Nano* **2021**, *15*, 14229–14241.
- [82] N. S. Tiwari, P. van der Schoot, *Eur. Phys. J. E* **2017**, *40*, 65.
- [83] A. Wegner, J. Engel, *Biophys. Chem.* **1975**, *3*, 215–225.
- [84] A. Lomakin, D. B. Teplow, D. A. Kirschner, G. B. Benedek, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 7942–7947.
- [85] H. Levine, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404–410.
- [86] Z. Toprakcioglu, P. Challa, C. Xu, T. P. J. Knowles, *ACS Nano* **2019**, *13*, 13940–13948.

- [87] G. Meisl, J. B. Kirkegaard, P. Arosio, T. C. T. Michaels, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, S. Linse, T. P. J. Knowles, *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 252–272.
- [88] T. Scheibel, J. Bloom, S. L. Lindquist, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 2287–2292.
- [89] W. P. Esler, E. R. Stimson, J. M. Jennings, H. V. Vinters, J. R. Ghilardi, J. P. Lee, P. W. Mantyh, J. E. Maggio, *Biochemistry* **2000**, *39*, 6288–6295.
- [90] A. K. Buell, J. R. Blundell, C. M. Dobson, M. E. Welland, E. M. Terentjev, T. P. J. Knowles, *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104*, 228101.
- [91] G. Meisl, X. Yang, E. Hellstrand, B. Frohm, J. B. Kirkegaard, S. I. A. Cohen, C. M. Dobson, S. Linse, T. P. J. Knowles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 9384–9389.
- [92] G. Meisl, X. Yang, C. M. Dobson, S. Linse, T. P. J. Knowles, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 4352–4362.
- [93] W. T. Gallonde, C. Poidevin, F. Houard, E. Caytan, V. Dorcet, A. Fihey, K. Bernot, S. Rigaut, O. Galangau, *Angew. Chemie* **2023**, *135*, e202313696.
- [94] D. Zaguri, M. R. Zimmermann, G. Meisl, A. Levin, S. Rencus-Lazar, T. P. J. Knowles, E. Gazit, *ACS Nano* **2021**, *15*, 18305–18311.
- [95] H. Itabashi, K. Tashiro, S. Koshikawa, S. Datta, S. Yagai, *Chem. Commun.* **2023**, *59*, 7375–7378.
- [96] S. Sarkar, A. Sarkar, A. Som, S. S. Agasti, S. J. George, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 11777–11787.
- [97] R. M. Izatt, J. S. Bradshaw, S. A. Nielsen, J. D. Lamb, J. J. Christensen, D. Sen, *Chem. Rev.* **1985**, *85*, 271–339.
- [98] M. D. Lechner, *Einführung in Die Kinetik*, **2018**.
- [99] H. Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, **2000**.
- [100] J. Rebek, S. V. Luis, L. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5011–5012.
- [101] E. Freire, V. J. Hilser, D. Dowdy, T. G. Oas, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 9903–9908.
- [102] D. G. Donne, J. H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T. L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, P. E. Wright, H. J. Dyson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 13452–13457.
- [103] D. M. Vu, E. S. Peterson, R. B. Dyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6546–6547.
- [104] M. B. Prigozhin, M. Gruebele, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 3372.
- [105] L. Konermann, J. Pan, Y. H. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1224–1234.
- [106] S. W. Englander, *Biochemistry* **1963**, *2*, 798–807.
- [107] B. A. Krantz, R. S. Dothager, T. R. Sosnick, *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 463–475.
- [108] A. Matouschek, J. T. Kellis, L. Serrano, A. R. Fersht, *Nature* **1989**, *340*, 122–126.
- [109] B. Schuler, H. Hofmann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 36–47.

- [110] H. S. Chung, W. A. Eaton, *Nature* **2013**, 502, 685–688.
- [111] S. W. Englander, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, 17, 1481–1489.
- [112] Y. H. Liu, A. Belcheva, L. Konermann, D. Golemi-Kotra, *J. Mol. Biol.* **2009**, 391, 149–163.
- [113] N. Carulla, G. L. Caddy, D. R. Hall, J. Zurdo, M. Gairí, M. Feliz, E. Giralt, C. V. Robinson, C. M. Dobson, *Nature* **2005**, 436, 554–558.
- [114] K. A. Murray, M. P. Hughes, C. J. Hu, M. R. Sawaya, L. Salwinski, H. Pan, S. W. French, P. M. Seidler, D. S. Eisenberg, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2022**, 29, 529–536.
- [115] Z. Qi, C. Schlaich, C. A. Schalley, *Chem. – A Eur. J.* **2013**, 19, 14867–14875.
- [116] X. Lou, R. P. M. Lafleur, C. M. A. Leenders, S. M. C. Schoenmakers, N. M. Matsumoto, M. B. Baker, J. L. J. van Dongen, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Nat. Commun.* **2017**, 8, 15420.
- [117] L. Albertazzi, N. van der Veecken, M. B. Baker, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 16166–16168.
- [118] P. Rajdev, S. Ghosh, *J. Phys. Chem. B* **2019**, 123, 327–342.
- [119] S. I. S. Hendrikse, S. P. W. Wijnands, R. P. M. Lafleur, M. J. Pouderoijen, H. M. Janssen, P. Y. W. Dankers, E. W. Meijer, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 2279–2282.
- [120] A. Kaeser, I. Fischer, R. Abbel, P. Besenius, D. Dasgupta, M. A. J. Gillisen, G. Portale, A. L. Stevens, L. M. Herz, A. P. H. J. Schenning, *ACS Nano* **2013**, 7, 408–416.
- [121] C.-B. Huang, L. Xu, J.-L. Zhu, Y.-X. Wang, B. Sun, X. Li, H.-B. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 9459–9462.
- [122] A. Sarkar, S. Dhiman, A. Chalishazar, S. J. George, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, 56, 13767–13771.
- [123] A. Pal, P. Besenius, R. P. Sijbesma, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 12987–12989.
- [124] A. Diaspro, P. Bianchini, *La Riv. del Nuovo Cim.* **2020**, 43, 385–455.
- [125] R. T. Borlinghaus, *Konfokale Mikroskopie in Weiß*, **2016**.
- [126] E. Abbe, *Arch. für Mikroskopische Anat.* **1873**, 9, 413–468.
- [127] D. B. Murphy, M. W. Davidson, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, Wiley, **2012**.
- [128] J.-A. Conchello, J. W. Lichtman, *Nat. Methods* **2005**, 2, 920–931.
- [129] R. Yuste, *Nat. Methods* **2005**, 2, 902–904.
- [130] F. Helmchen, W. Denk, *Nat. Methods* **2005**, 2, 932–940.
- [131] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, *Nature* **1995**, 374, 555–559.
- [132] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Science*

- 2003, 300, 2061–2065.
- [133] D. Axelrod, *Encycl. Cell Biol.* **2023**, 2, 73–85.
- [134] J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, A. Kenworthy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 444–456.
- [135] J. G. McNally, *Methods Cell Biol.* **2008**, 85, 329–351.
- [136] E. L. Elson, *Biophys. J.* **2011**, 101, 2855–2870.
- [137] E. Haustein, P. Schwille, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, 36, 151–169.
- [138] M. A. Digman, V. R. Caiolfa, M. Zamai, E. Gratton, *Biophys. J.* **2008**, 94, L14–L16.
- [139] R. M. Clegg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 103–110.
- [140] A. K. Kenworthy, *Methods* **2001**, 24, 289–296.
- [141] A. Aung, A. Cui, L. Maiorino, A. P. Amini, J. R. Gregory, M. Bukenya, Y. Zhang, H. Lee, C. A. Cottrell, D. M. Morgan, M. Silva, H. Suh, J. D. Kirkpatrick, P. Amlashi, T. Remba, L. M. Froehle, S. Xiao, W. Abraham, J. Adams, J. C. Love, P. Huyett, D. S. Kwon, N. Hacohen, W. R. Schief, S. N. Bhatia, D. J. Irvine, *Science* **2023**, 379, eabn8934.
- [142] T. A. Klar, S. W. Hell, *Opt. Lett.* **1999**, 24, 954.
- [143] G. Donnert, J. Keller, R. Medda, M. A. Andrei, S. O. Rizzoli, R. Lührmann, R. Jahn, C. Eggeling, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 11440–11445.
- [144] M. G. L. Gustafsson, *J. Microsc.* **2000**, 198, 82–87.
- [145] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, 313, 1642–1645.
- [146] W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 12596–12602.
- [147] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, 3, 793–796.
- [148] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, 47, 6172–6176.
- [149] M. Lelek, M. T. Gyparaki, G. Beliu, F. Schueder, J. Griffié, S. Manley, R. Jungmann, M. Sauer, M. Lakadamyali, C. Zimmer, *Nat. Rev. Methods Prim.* **2021**, 1, 39.
- [150] M. Sauer, M. Heilemann, *Chem. Rev.* **2017**, 117, 7478–7509.
- [151] L. Nahidiazar, A. V. Agronskaia, J. Broertjes, B. van den Broek, K. Jalink, *PLoS One* **2016**, 11, e0158884.
- [152] S. C. M. Reinhardt, L. A. Masullo, I. Baudrexel, P. R. Steen, R. Kowalewski, A. S. Eklund, S. Strauss, E. M. Unterauer, T. Schlichthaerle, M. T. Strauss, C. Klein, R. Jungmann, *Nature* **2023**, 617, 711–716.
- [153] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, X. Zhuang, *Science* **2007**, 317, 1749–1753.
- [154] B. Huang, M. Bates, X. Zhuang, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 993–1016.

- [155] S. Han, M. Raabe, L. Hodgson, J. Mantell, P. Verkade, T. Lasser, K. Landfester, T. Weil, I. Lieberwirth, *Nano Lett.* **2019**, *19*, 2178–2185.
- [156] P. de Boer, J. P. Hoogenboom, B. N. G. Giepmans, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 503–513.
- [157] T. Andrian, Y. Muela, L. Delgado, L. Albertazzi, S. Pujals, *Nanoscale* **2023**, *15*, 14615–14627.
- [158] T. F. Martens, K. Remaut, J. Demeester, S. C. De Smedt, K. Braeckmans, *Nano Today* **2014**, *9*, 344–364.
- [159] A. Ortiz-Perez, M. Zhang, L. W. Fitzpatrick, C. Izquierdo-Lozano, L. Albertazzi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2024**, *204*, 115138.
- [160] S. Dhiman, T. Andrian, B. S. Gonzalez, M. M. E. Tholen, Y. Wang, L. Albertazzi, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 2152–2166.
- [161] R. P. M. Lafleur, X. Lou, G. M. Pavan, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 6199–6209.
- [162] A. R. A. Palmans, J. a. J. M. Vekemans, E. E. Havinga, E. W. Meijer, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1997**, *36*, 2648–2651.
- [163] L. Brunsveld, A. P. H. J. Schenning, M. A. C. Broeren, H. M. Janssen, J. A. J. M. Vekemans, E. W. Meijer, *Chem. Lett.* **2000**, *29*, 292–293.
- [164] M. A. VandenBerg, S. Xian, Y. Xiang, M. J. Webber, *Macromol. Biosci.* **2023**, *2300001*, 1–10.
- [165] K. Yano, Y. Itoh, F. Araoka, G. Watanabe, T. Hikima, T. Aida, *Science* **2019**, *363*, 161–165.
- [166] F. V. Gruschwitz, T. Klein, M. T. Kuchenbrod, N. Moriyama, S. Fujii, I. Nischang, S. Hoepfener, K. Sakurai, U. S. Schubert, J. C. Brendel, *ACS Macro Lett.* **2021**, *10*, 837–843.
- [167] C. K. Smith, J. M. Withka, L. Regan, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5510–5517.
- [168] D. L. Minor, P. S. Kim, *Nature* **1994**, *367*, 660–663.
- [169] C. M. A. Leenders, L. Albertazzi, T. Mes, M. M. E. Koenigs, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1963.
- [170] N. Fukaya, S. Ogi, H. Sotome, K. J. Fujimoto, T. Yanai, N. Bäumer, G. Fernández, H. Miyasaka, S. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 22479–22492.
- [171] E. Fuentes, Y. Gabaldón, M. Collado, S. Dhiman, J. A. Berrocal, S. Pujals, L. Albertazzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 21196–21205.
- [172] B. N. S. Thota, X. Lou, D. Bochicchio, T. F. E. Paffen, R. P. M. Lafleur, J. L. J. van Dongen, S. Ehrmann, R. Haag, G. M. Pavan, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, *57*, 6843–6847.
- [173] R. Appel, J. Fuchs, S. M. Tyrrell, P. A. Korevaar, M. C. A. Stuart, I. K. Voets, M. Schönhoff, P. Besenius, *Chem. – A Eur. J.* **2015**, *21*, 19257–19264.

- [174] V. Lewe, M. Preuss, E. A. Woźnica, D. Spitzer, R. Otter, P. Besenius, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 9498–9501.
- [175] B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1651–1652.
- [176] C. Schüll, L. Nuhn, C. Mangold, E. Christ, R. Zentel, H. Frey, *Macromolecules* **2012**, *45*, 5901–5910.
- [177] W. H. Hartung, R. Simonoff, *Org. React.* **2011**, 263–326.
- [178] J. Clayden, N. Greeves, W. Stuart, W. Peter, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2001**.
- [179] S. Rajagopal, A. F. Spatola, *Appl. Catal. A Gen.* **1997**, *152*, 69–81.
- [180] S. Rajagopal, A. F. Spatola, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1347–1355.
- [181] T. Keler, V. Ramakrishna, M. W. Fanger, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2004**, *4*, 1953–1962.
- [182] V. Apostolopoulos, I. Mckenzie, *Curr. Mol. Med.* **2001**, *1*, 469–474.
- [183] M. Thomas, Synthese Farbstoffmarkierter Glykosylierter Peptidamphiphile Zur Fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung Der Selbstassemblierung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2020**.
- [184] R. U. Lemieux, *Adv. Carbohydr. Chem.* **1954**, *9*, 1–57.
- [185] G. Wulff, W. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, 33–46.
- [186] G. Zemplén, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1926**, *59*, 1254–1266.
- [187] P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9–C12.
- [188] P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, *52*, 179–205.
- [189] P. Fügedi, P. J. Garegg, H. Lönn, T. Norberg, *Glycoconj. J.* **1987**, *4*, 97–108.
- [190] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [191] Nobelprize.org, “The Nobel Price in Chemistry 2022,” can be found under <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/summary/>, **2024**.
- [192] S. K. Wang, P. H. Liang, R. D. Astronomo, T. L. Hsu, S. L. Hsieh, D. R. Burton, C. H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 3690–3695.
- [193] Y. M. Chabre, C. Contino-Pépin, V. Placide, C. S. Tze, R. Roy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5602–5605.
- [194] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [195] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [196] J. M. Kovacs, C. T. Mant, R. S. Hodges, *Pept. Sci.* **2006**, *84*, 283–297.
- [197] F. Biedermann, W. M. Nau, H. Schneider, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 11158–11171.

- [198] H. Schneider, *Angew. Chemie* **2009**, *121*, 3982–4036.
- [199] B. A. Schweitzer, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1863–1872.
- [200] T. T. Herskovits, *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, *97*, 474–484.
- [201] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 537.
- [202] P. Athanassopoulos, K. Barlos, D. Gatos, O. Hatzi, C. Tzavara, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5645–5648.
- [203] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219–1222.
- [204] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208.
- [205] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
- [206] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2034–2040.
- [207] G. Windridge, E. C. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6318–6319.
- [208] G. M. Coppinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1372–1373.
- [209] J. Muzart, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8313–8323.
- [210] S. Ding, N. Jiao, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 9226–9237.
- [211] Y. Wan, M. Alterman, M. Larhed, A. Hallberg, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6232–6235.
- [212] W. Liu, C. Chen, H. Liu, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1721–1726.
- [213] T. Heuser, E. Weyandt, A. Walther, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 13258–13262.
- [214] A. Sorrenti, J. Leira-Iglesias, A. Sato, T. M. Hermans, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15899.
- [215] D. Spitzer, L. L. Rodrigues, D. Straßburger, M. Mezger, P. Besenius, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56*, 15461–15465.
- [216] Y. Sang, M. Liu, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 633–656.
- [217] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.
- [218] O. Zagorodko, T. Melnyk, O. Rogier, V. J. Nebot, M. J. Vicent, *Polym. Chem.* **2021**, *12*, 3478–3487.
- [219] X. Liu, M. Li, J. Liu, Y. Song, B. Hu, C. Wu, A. A. Liu, H. Zhou, J. Long, L. Shi, Z. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 9312–9323.
- [220] S. Ghosh, X. Q. Li, V. Stepanenko, F. Würthner, *Chem. - A Eur. J.* **2008**, *14*, 11343–11357.
- [221] D. Straßburger, S. Herziger, K. Huth, M. Urschbach, R. Haag, P. Besenius, *Beilstein J. Org. Chem.* **2021**, *17*, 97–104.
- [222] B. M. Bulheller, A. Rodger, J. D. Hirst, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 2020–2035.
- [223] H. Frisch, J. P. Unsleber, D. Lüdeker, M. Peterlechner, G. Brunklaus, M. Waller, P.

- Besenius, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 10097–10101.
- [224] O. S. Stach, K. Breul, C. M. Berač, M. Urschbach, S. Seiffert, P. Besenius, *Macromol. Rapid Commun.* **2022**, *43*, 1–7.
- [225] V. Y. Grinberg, T. V. Burova, N. V. Grinberg, A. S. Dubovik, V. S. Papkov, A. R. Khokhlov, *Polymer* **2015**, *73*, 86–90.
- [226] S. V. Aathimankandan, E. N. Savariar, S. Thayumanavan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14922–14929.
- [227] Y. Haba, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 234–237.
- [228] K. Moon, H. Kim, E. Lee, M. Lee, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 6807–6810.
- [229] D. Görl, B. Soberats, S. Herbst, V. Stepanenko, F. Würthner, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6786–6790.
- [230] T. Aida, E. W. Meijer, *Isr. J. Chem.* **2020**, *60*, 33–47.
- [231] L. Albertazzi, F. J. Martinez-Veracoechea, C. M. A. Leenders, I. K. Voets, D. Frenkel, E. W. Meijer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 12203–12208.
- [232] M. Thomas, V. Lewe, J. Kölsch, M. Urschbach, J. Erlenbusch, O. S. Stach, P. Besenius, *Polym. Chem.* **2023**, *14*, 1888–1892.
- [233] *Gefördert Durch Das Gutenberg Forschungskolleg Und Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) – 497845157, n.d.*
- [234] *Support by the IMB Microscopy Core Facility Is Gratefully Acknowledged., n.d.*
- [235] P. A. Korevaar, C. Schaefer, T. F. A. de Greef, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13482–13491.
- [236] G. Pescitelli, L. Di Bari, N. Berova, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 5211–5233.
- [237] T. P. J. Knowles, C. A. Waudby, G. L. Devlin, S. I. A. Cohen, A. Aguzzi, M. Vendruscolo, E. M. Terentjev, M. E. Welland, C. M. Dobson, *Science* **2009**, *326*, 1533–1537.
- [238] K. C. Kunes, D. L. Cox, R. R. P. Singh, *Phys. Rev. E* **2005**, *72*, 051915.
- [239] R. M. P. da Silva, D. van der Zwaag, L. Albertazzi, S. S. Lee, E. W. Meijer, S. I. Stupp, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11561.
- [240] R. Khurana, C. Ionescu-Zanetti, M. Pope, J. Li, L. Nielson, M. Ramírez-Alvarado, L. Regan, A. L. Fink, S. A. Carter, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1135–1144.
- [241] C. Ionescu-Zanetti, R. Khurana, J. R. Gillespie, J. S. Petrick, L. C. Trabachino, L. J. Minert, S. A. Carter, A. L. Fink, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 13175–13179.
- [242] Leica, “The Most Versatile Beam Splitter Discover - AOBS ®,” can be found under <https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/konfokalmikroskope/p/leica-tcs-sp8/>, **2014**.
- [243] S. Van De Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann,

- M. Sauer, *Nat. Protoc.* **2011**, 6, 991–1009.
- [244] “AF488-Azid von Lumiprobe,” can be found under <https://de.lumiprobe.com/p/alexa-fluor-488-azide>, **2024**.
- [245] “AF647-Azid von Lumiprobe,” can be found under <https://de.lumiprobe.com/p/af647-azide>, **2024**.
- [246] “Sulfo-Cyanin3-Azid von Lumiprobe,” can be found under <https://de.lumiprobe.com/p/sulfo-cy3-azide>, **2024**.
- [247] “Sulfo-Cyanin5-Azid von Lumiprobe,” can be found under <https://de.lumiprobe.com/p/sulfo-cy5-azide>, **2024**.
- [248] A. Yu, C. A. Tolbert, D. A. Farrow, D. M. Jonas, *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106, 9407–9419.
- [249] M. C. Murphy, I. Rasnik, W. Cheng, T. M. Lohman, T. Ha, *Biophys. J.* **2004**, 86, 2530–2537.
- [250] S. M. C. Schoenmakers, A. J. H. Spiering, S. Herziger, C. Böttcher, R. Haag, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *ACS Macro Lett.* **2022**, 11, 711–715.
- [251] B. A. Krantz, A. K. Srivastava, S. Nauli, D. Baker, R. T. Sauer, T. R. Sosnick, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 458–463.
- [252] L. S. Itzhaki, P. A. Evans, *Protein Sci.* **1996**, 5, 140–146.
- [253] M. J. Parker, A. R. Clarke, *Biochemistry* **1997**, 36, 5786–5794.
- [254] J. G. Mandell, A. Baerga-Ortiz, A. M. Falick, E. A. Komives, *Methods Mol. Biol.* **2005**, 305, 65–79.
- [255] J. R. Engen, D. L. Smith, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 256 A–265 A.
- [256] D. Babić, S. Kazazić, D. M. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2019**, 33, 1248–1257.
- [257] N. Carulla, M. Zhou, M. Arimon, M. Gairí, E. Giralt, C. V. Robinson, C. M. Dobson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106, 7828–7833.
- [258] J. Blöck-Neuhaus, *Elementare Teilchen: Moderne Physik von Den Atomen Bis Zum Standard-Modell*, **2010**.
- [259] M. Strohal, D. Kavan, P. Novák, M. Volný, V. Havlíček, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 4648–4651.
- [260] D. L. Smith, Y. Deng, Z. Zhang, *J. Mass Spectrom.* **1997**, 32, 135–146.
- [261] S. I. A. Cohen, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, T. P. J. Knowles, *J. Chem. Phys.* **2011**, 135, 065107.
- [262] J. Roszik, J. Szöllösi, G. Vereb, *BMC Bioinformatics* **2008**, 9, 346.
- [263] E. Rusinova, V. Tretyachenko-Ladokhina, O. E. Vele, D. F. Senear, J. B. Alexander Ross, *Anal. Biochem.* **2002**, 308, 18–25.

- [264] K. König, Ed. , *Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging*, De Gruyter, **2018**.
- [265] C. J. C. Edwards-Gayle, I. W. Hamley, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5867–5876.
- [266] L. Li, L. Wu, M. Urschbach, D. Straßburger, X. Liu, P. Besenius, G. Chen, *ACS Polym. Au* **2022**, *2*, 478–485.
- [267] M. H. Bakker, C. C. Lee, E. W. Meijer, P. Y. W. Dankers, L. Albertazzi, *ACS Nano* **2016**, *10*, 1845–1852.
- [268] D. Straßburger, N. Stergiou, M. Urschbach, H. Yurugi, D. Spitzer, D. Schollmeyer, E. Schmitt, P. Besenius, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 912–916.
- [269] F. Xu, L. Pfeifer, S. Crespi, F. K.-C. Leung, M. C. A. Stuart, S. J. Wezenberg, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 5990–5997.
- [270] G. Ghosh, S. Ghosh, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 5720–5723.
- [271] N. A. M. S. Caturello, Z. Csók, G. Fernández, R. Q. Albuquerque, *Chem. – A Eur. J.* **2016**, *22*, 17681–17689.
- [272] F. Würthner, S. Yao, U. Beginn, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42*, 3247–3250.
- [273] S. Ogi, K. Sugiyasu, S. Manna, S. Samitsu, M. Takeuchi, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 188–195.
- [274] F. Aparicio, F. García, L. Sánchez, *Chem. – A Eur. J.* **2013**, *19*, 3239–3248.
- [275] G. Ghosh, A. Chakraborty, P. Pal, B. Jana, S. Ghosh, *Chem. – A Eur. J.* **2022**, *28*, e202201082.
- [276] H. Kar, G. Ghosh, S. Ghosh, *Chem. – A Eur. J.* **2017**, *23*, 10536–10542.
- [277] M. Hifsudheen, R. K. Mishra, B. Vedhanarayanan, V. K. Praveen, A. Ajayaghosh, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56*, 12634–12638.
- [278] G. Vantomme, E. W. Meijer, *Science* **2019**, *363*, 1396–1397.
- [279] T. Schnitzer, M. D. Preuss, J. van Basten, S. M. C. Schoenmakers, A. J. H. Spiering, G. Vantomme, E. W. Meijer, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2022**, *61*, e202206738.
- [280] M. Vaddamanu, A. Sathyanarayana, Y. Masaya, S. Sugiyama, O. Kazuhisa, K. Velappan, M. Nandeshwar, K. Hisano, O. Tsutsumi, G. Prabusankar, *Chem. – An Asian J.* **2021**, *16*, 521–529.
- [281] A. Gómez-Suárez, D. J. Nelson, D. G. Thompson, D. B. Cordes, D. Graham, A. M. Z. Slawin, S. P. Nolan, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2216–2223.
- [282] J. Lemke, A. Pinto, P. Niehoff, V. Vasylyeva, N. Metzler-Nolte, *Dalt. Trans.* **2009**, 7063–7070.
- [283] M. Mora, M. C. Gimeno, R. Visbal, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 447–462.
- [284] H. Sak, M. Mawick, N. Krause, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 5821–5829.
- [285] H. Petersen, M. Ballmann, N. Krause, R. Weberskirch, *ChemCatChem* **2022**, *14*,

- e202200727.
- [286] M. E. Garner, W. Niu, X. Chen, I. Ghiviriga, K. A. Abboud, W. Tan, A. S. Veige, *Dalt. Trans.* **2015**, *44*, 1914–1923.
- [287] V. Lewe, *Synthese Und Selbstassemblierung von Peptidischen, NHC-Basierten Au(I)-Metalloamphiphilen in Wasser*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2017**.
- [288] N. Schönbrunner, W. Josef, J. Engels, H. Georg, T. Kiefhaber, *J. Mol. Biol.* **1996**, *260*, 432–445.
- [289] N. Hirota, Y. Goto, K. Mizuno, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 416–421.
- [290] P. Luo, R. L. Baldwin, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8413–8421.
- [291] D.-P. Hong, M. Hoshino, R. Kuboi, Y. Goto, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8427–8433.
- [292] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [293] G. Lippke, H. Thaler, *Starch/Stärke* **1970**, *22*, 344–351.
- [294] J. Schnitzbauer, M. T. Strauss, T. Schlichthaerle, F. Schueder, R. Jungmann, *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1198–1228.
- [295] M. Rao, K. Kanagaraj, C. Fan, J. Ji, C. Xiao, X. Wei, W. Wu, C. Yang, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1680–1683.

8 Danksagung

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] Gefördert durch das Gutenberg Forschungskolleg und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) – 497845157. *Funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation), project number – 497845157.* Zuletzt muss ich auch den Mitarbeitern der Core Facility Mikroskopie des IMB danken, die mich in viele unterschiedliche Mikroskope und Mikroskopiemethoden eingewiesen haben und mir bei Fragestellungen immer zur Seite standen. *Support by the IMB Microscopy Core Facility is gratefully acknowledged.* Gefördert durch das Gutenberg Forschungskolleg und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) – 497669232. *Funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation), project number – 497669232.*

[REDACTED]

[REDACTED]

Danksagung

[REDACTED]

9 Analytikdaten/Anhang

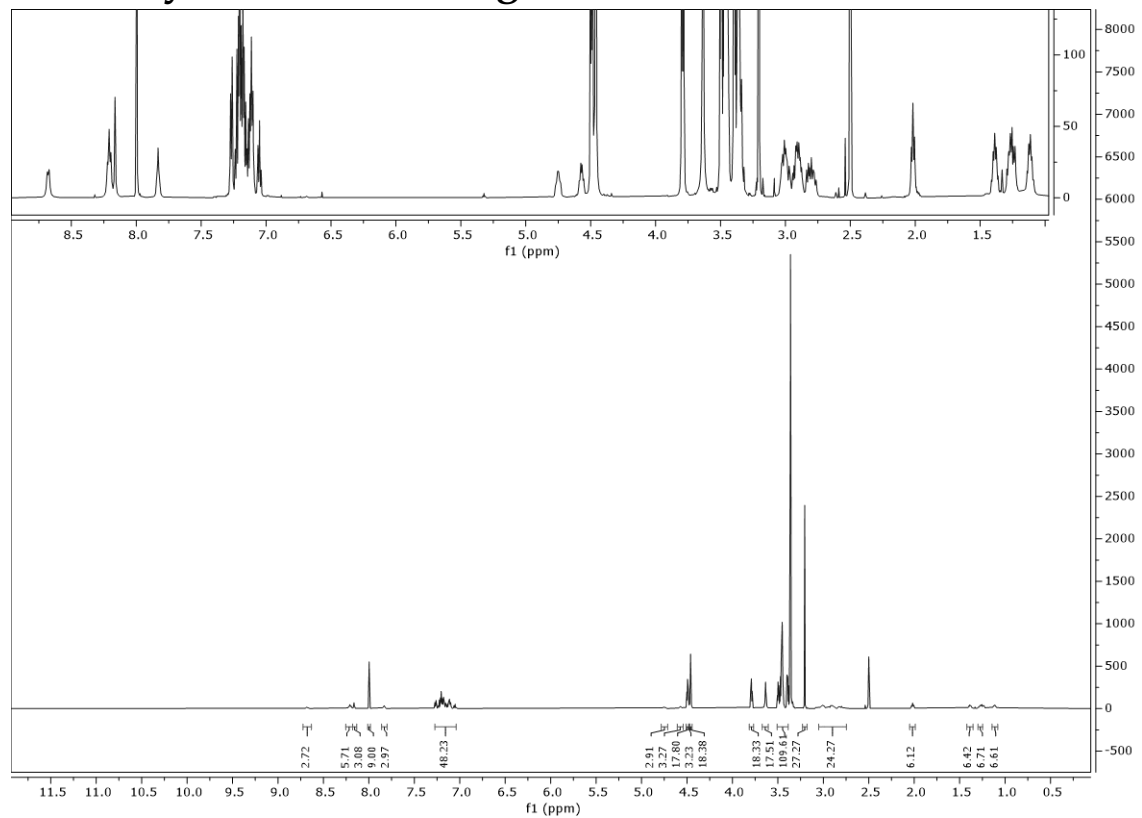


Abbildung 9.1: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-11.

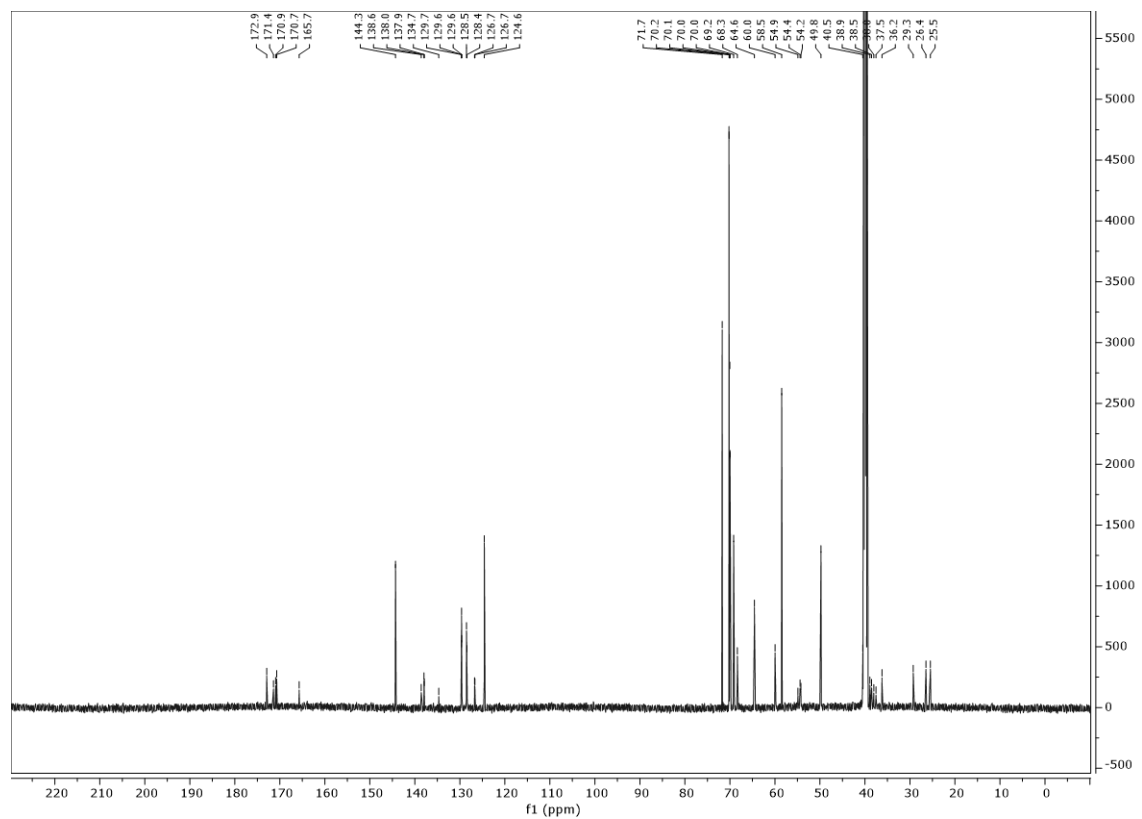


Abbildung 9.2: ¹³C-NMR-Spektrum (151 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-11.

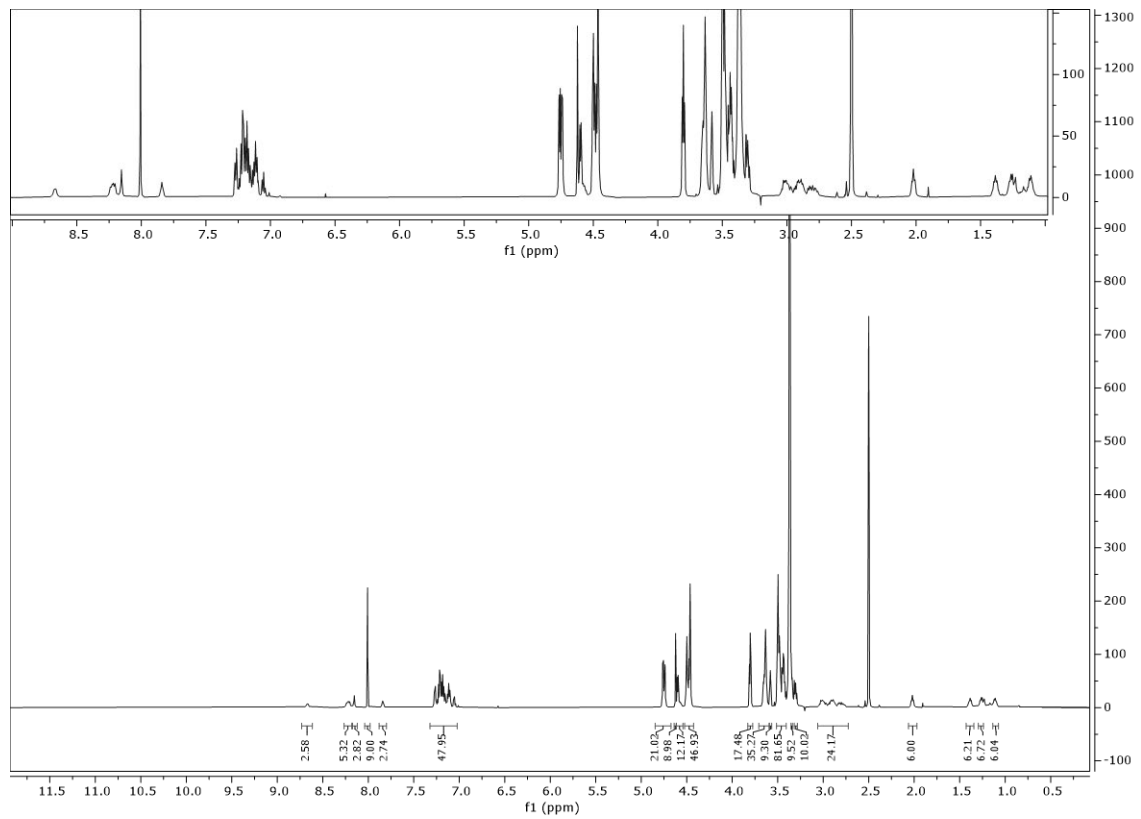


Abbildung 9.3: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-22.

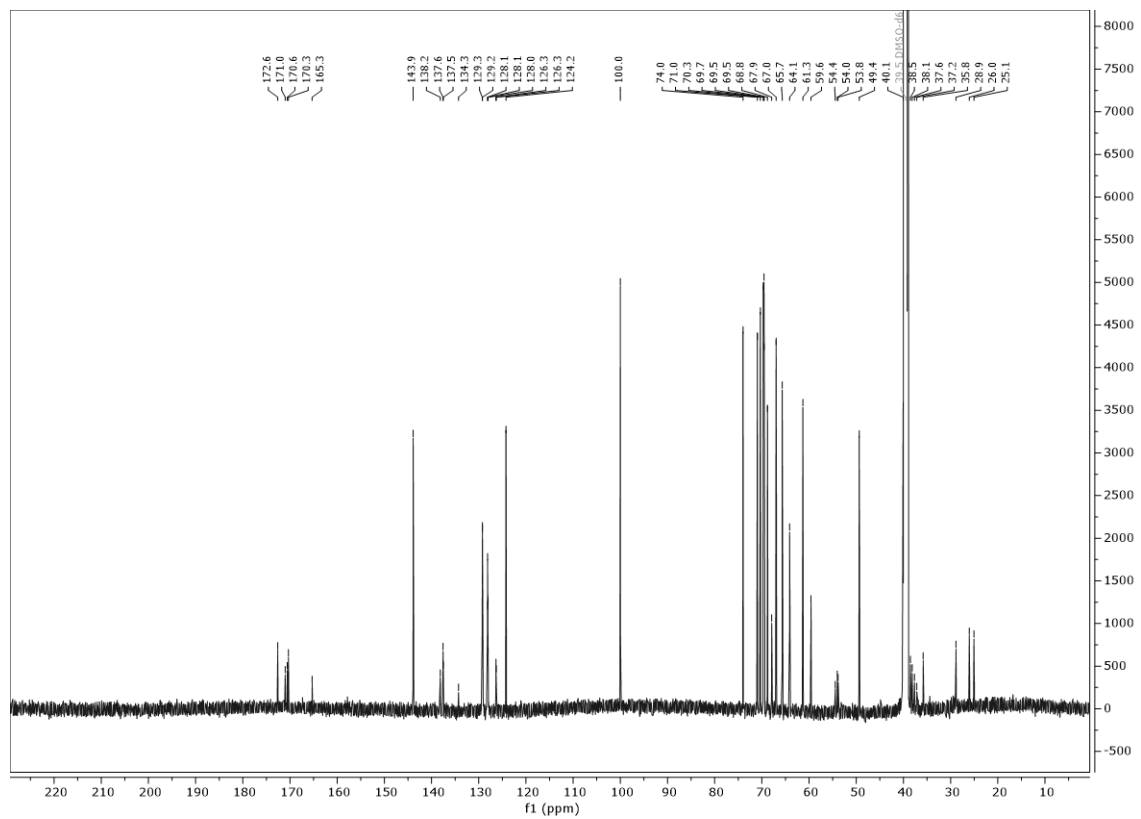
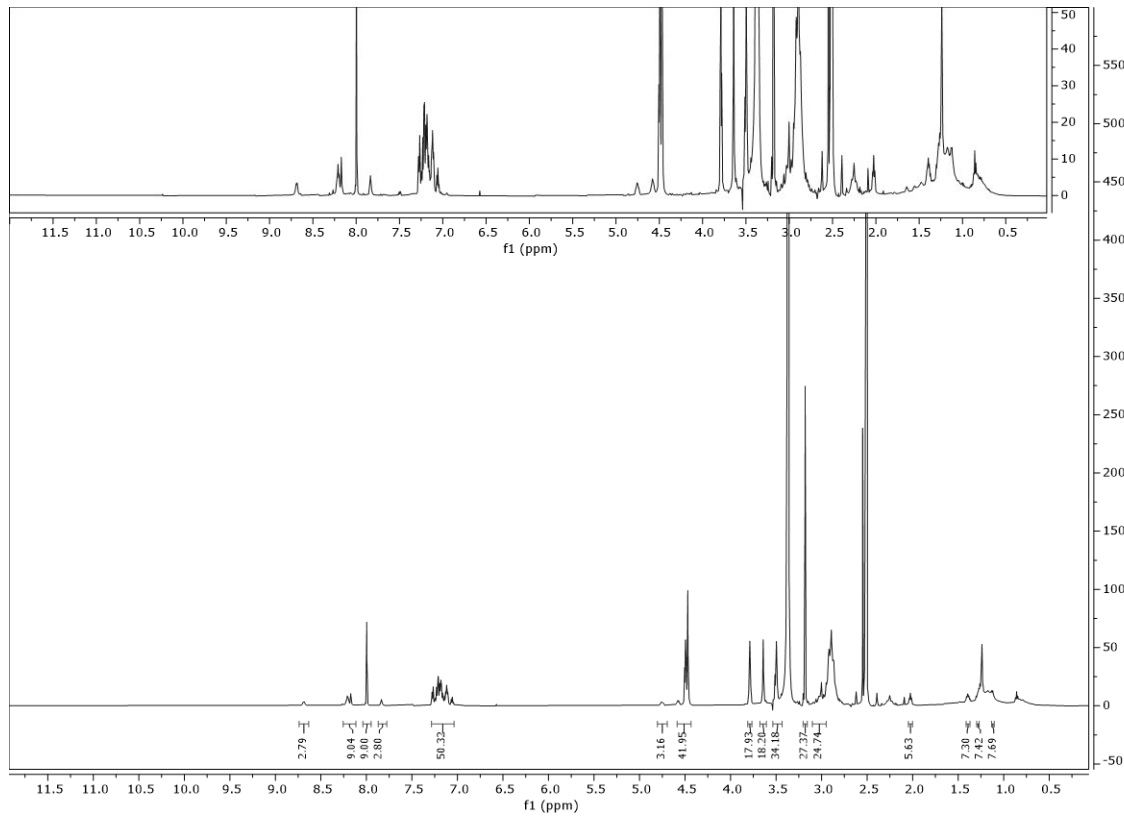
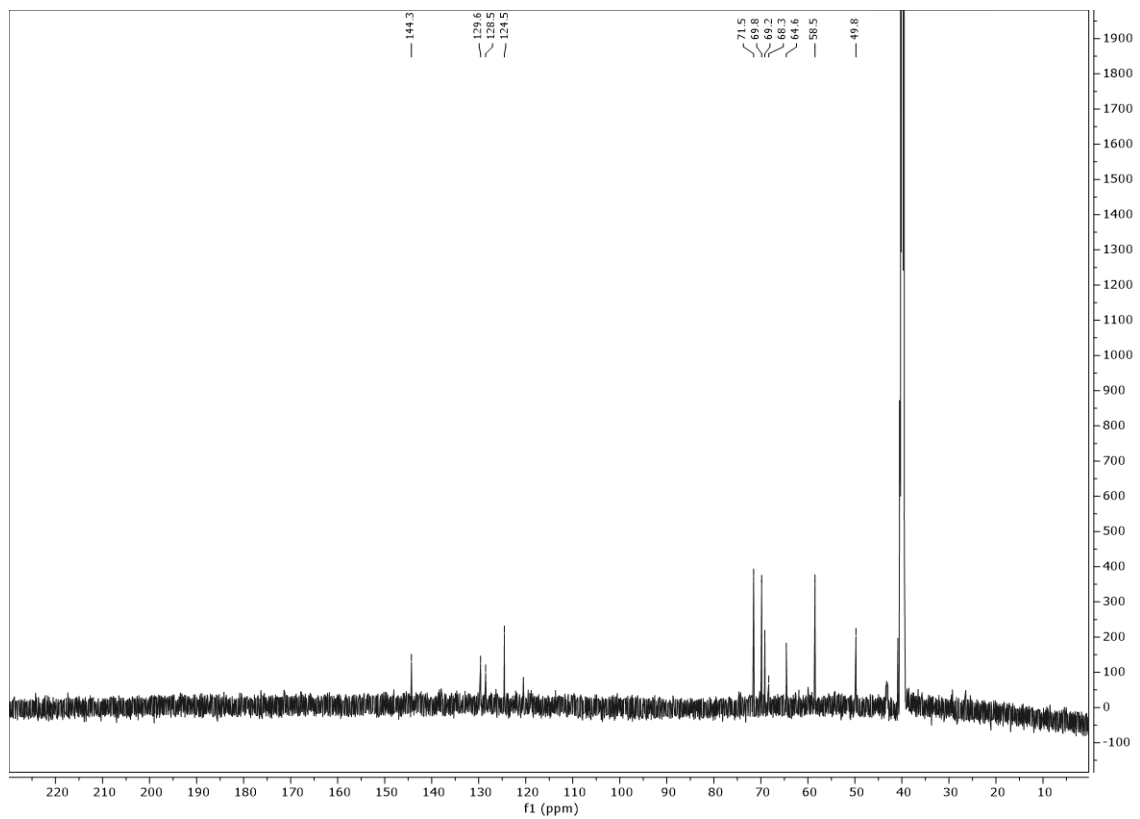


Abbildung 9.4: ^{13}C -NMR-Spektrum (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-22.

Abbildung 9.5: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-64.Abbildung 9.6: ¹³C-NMR-Spektrum (151 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-64.

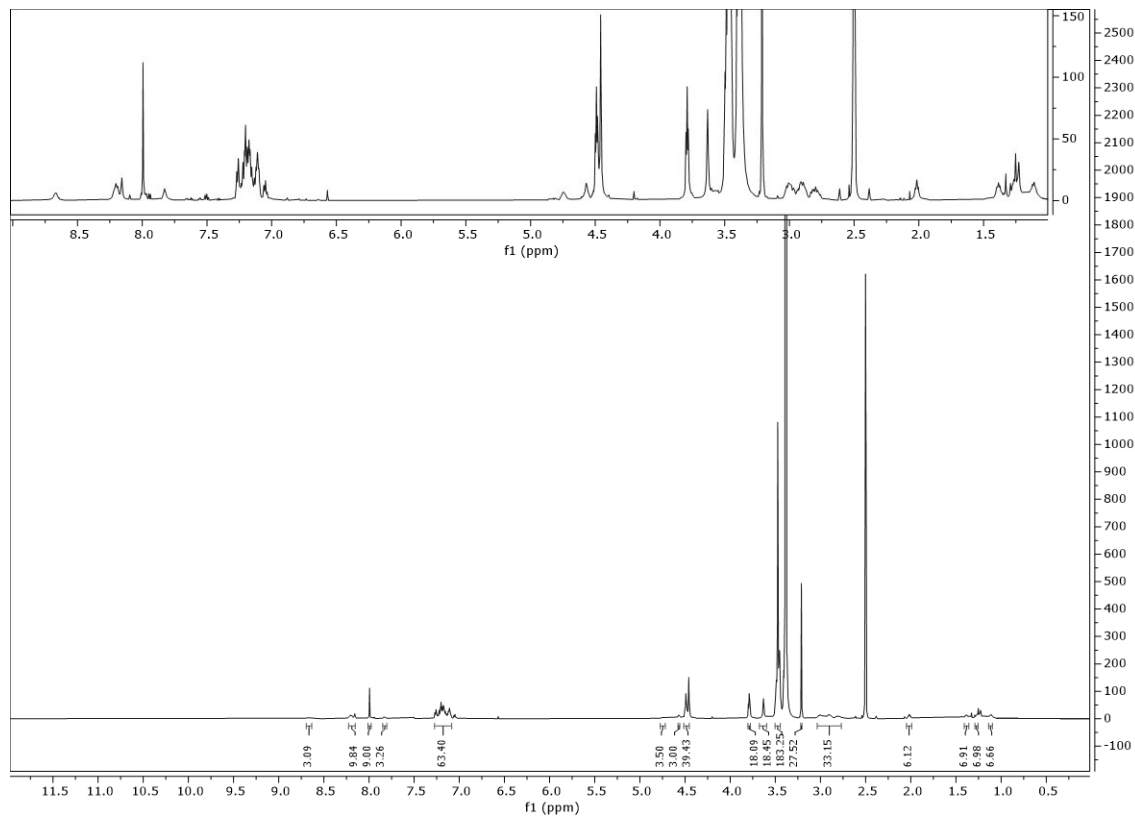


Abbildung 9.7: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-65.

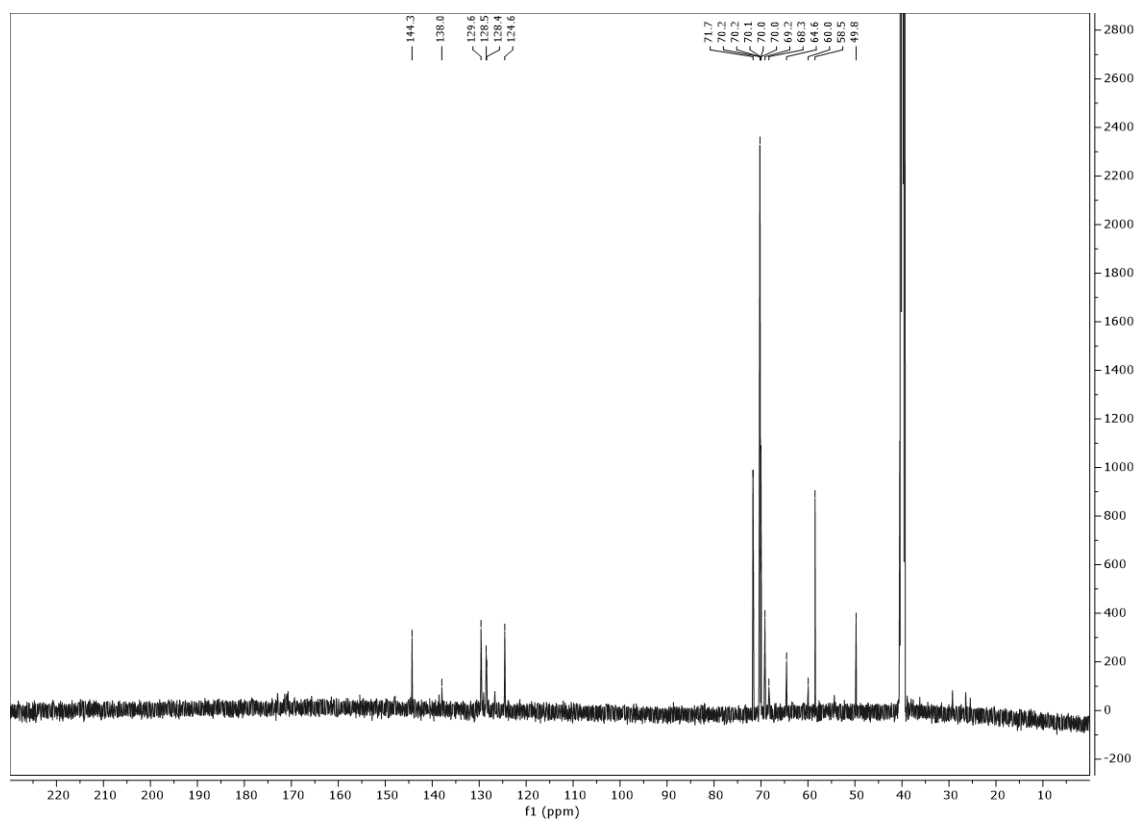
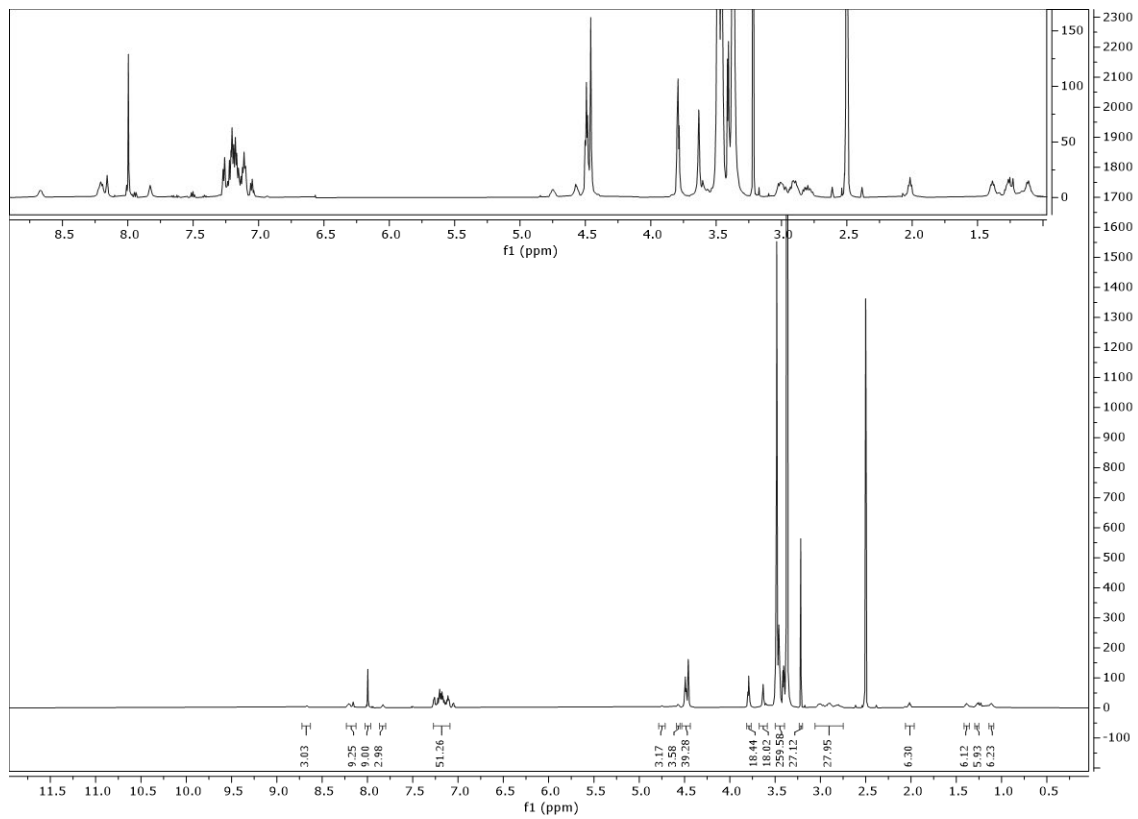
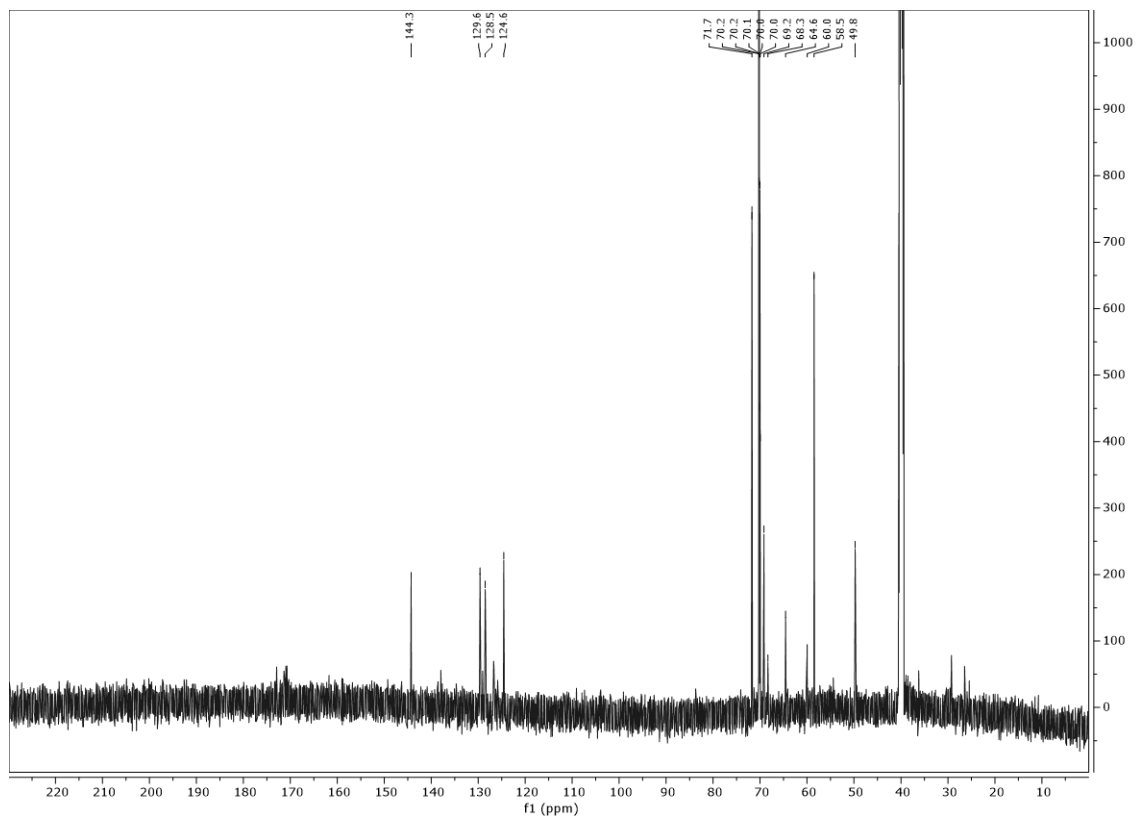


Abbildung 9.8: ¹³C-NMR-Spektrum (151 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-65.

Abbildung 9.9: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-66.Abbildung 9.10: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-66.

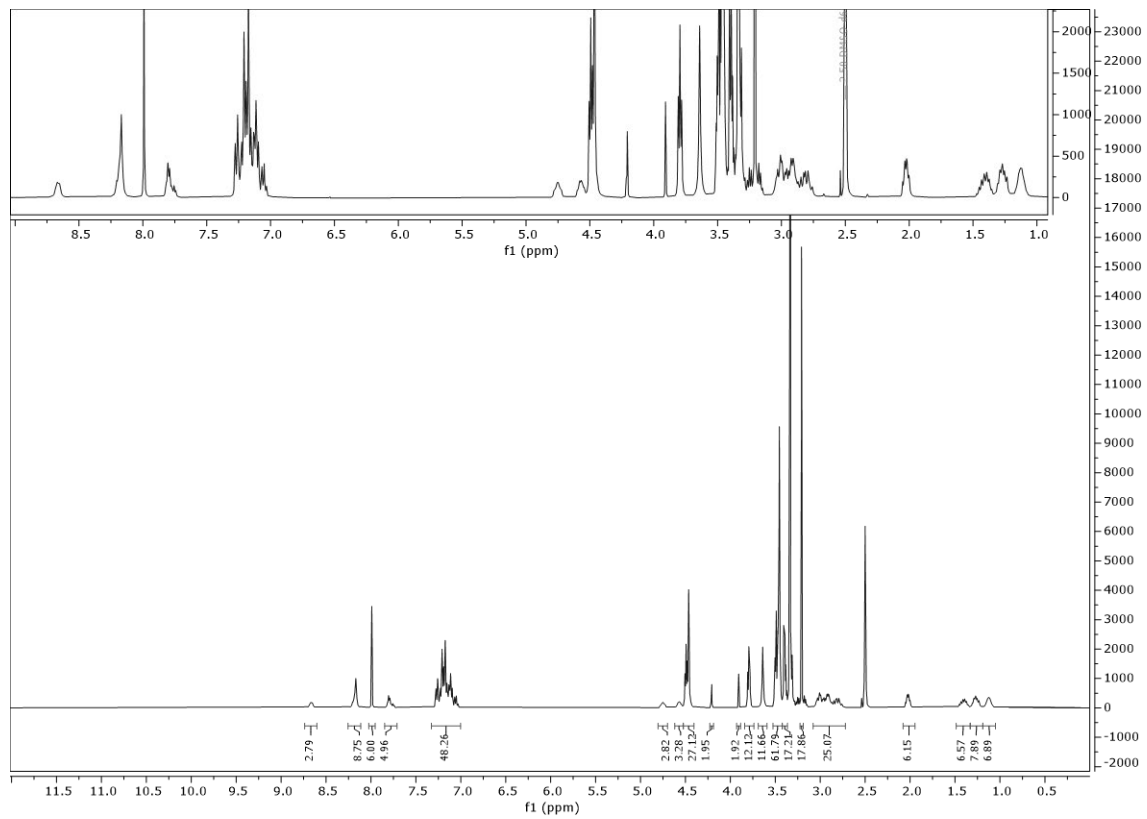


Abbildung 9.11: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-25.

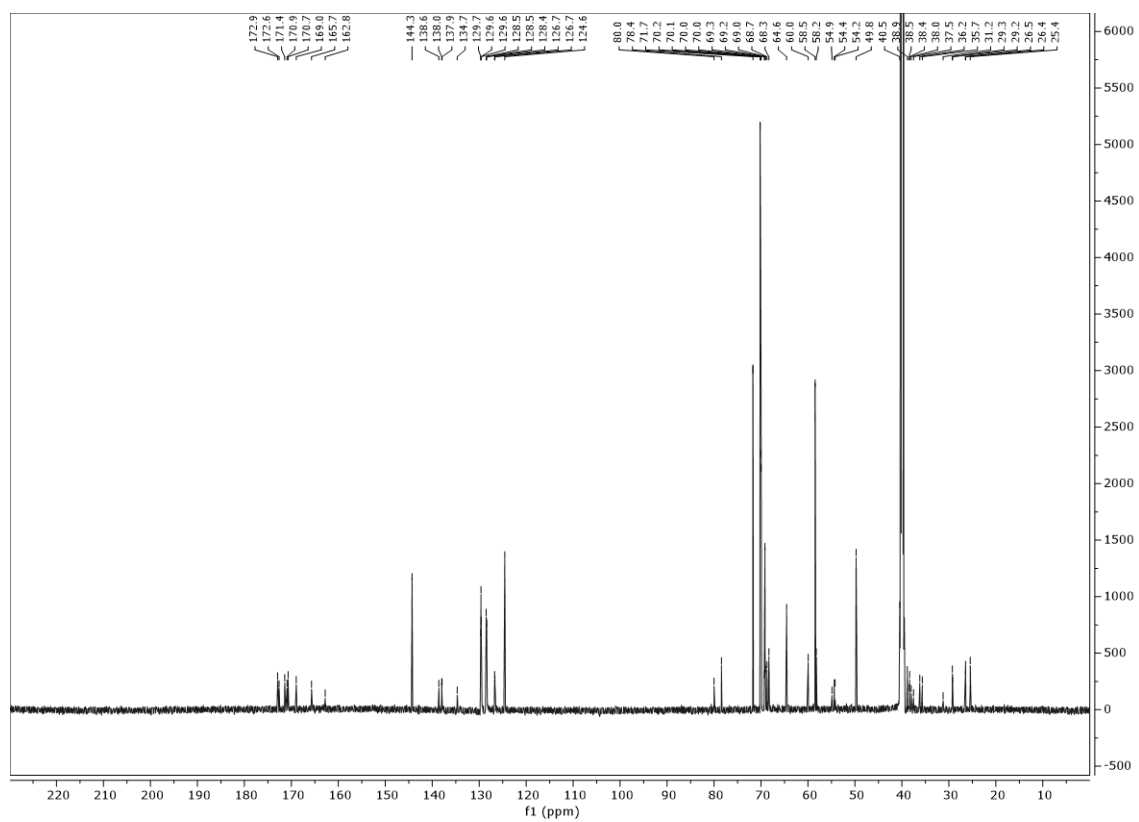
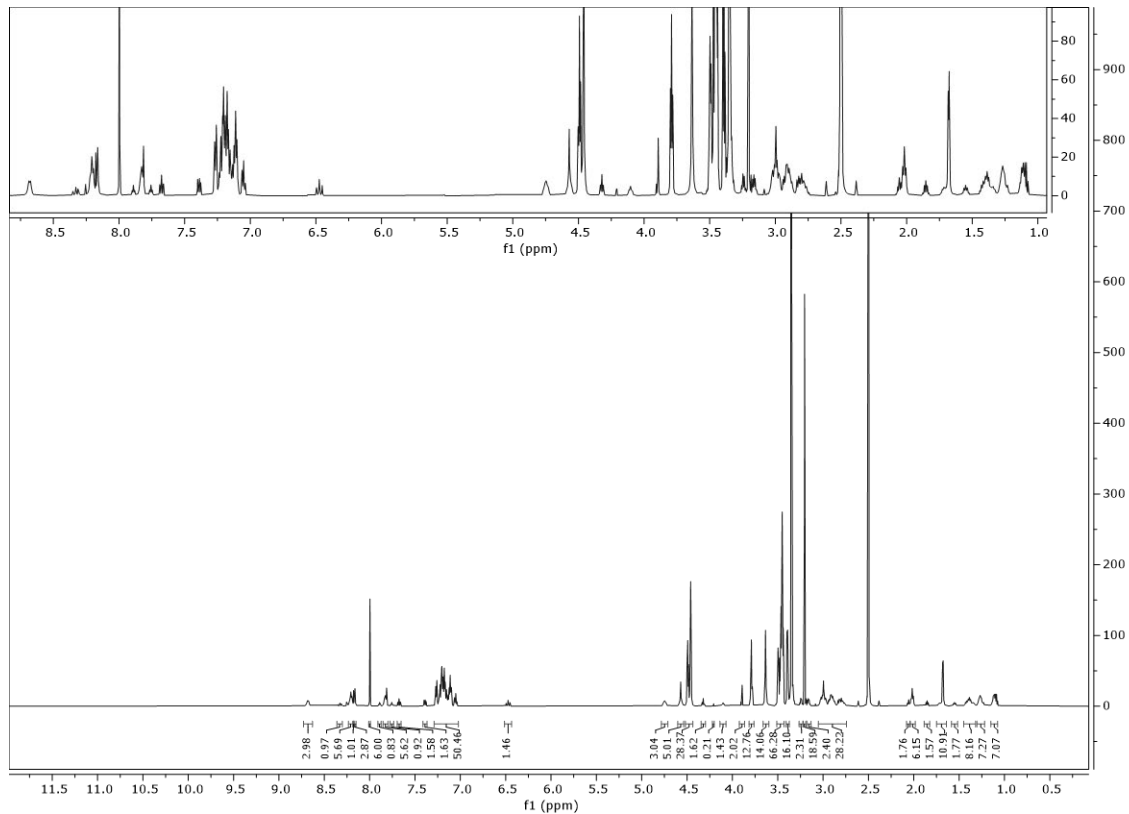
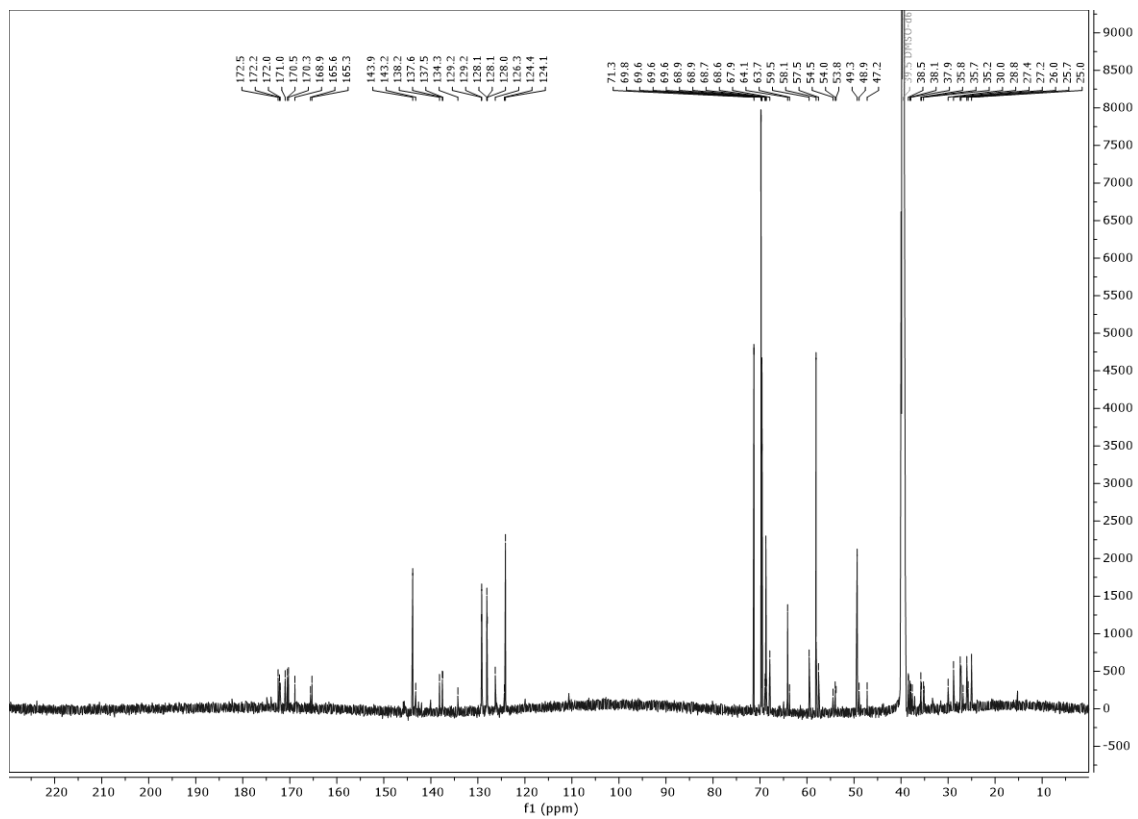


Abbildung 9.12: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-25.

Abbildung 9.13: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-26.Abbildung 9.14: ¹³C-NMR-Spektrum (151 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-26.

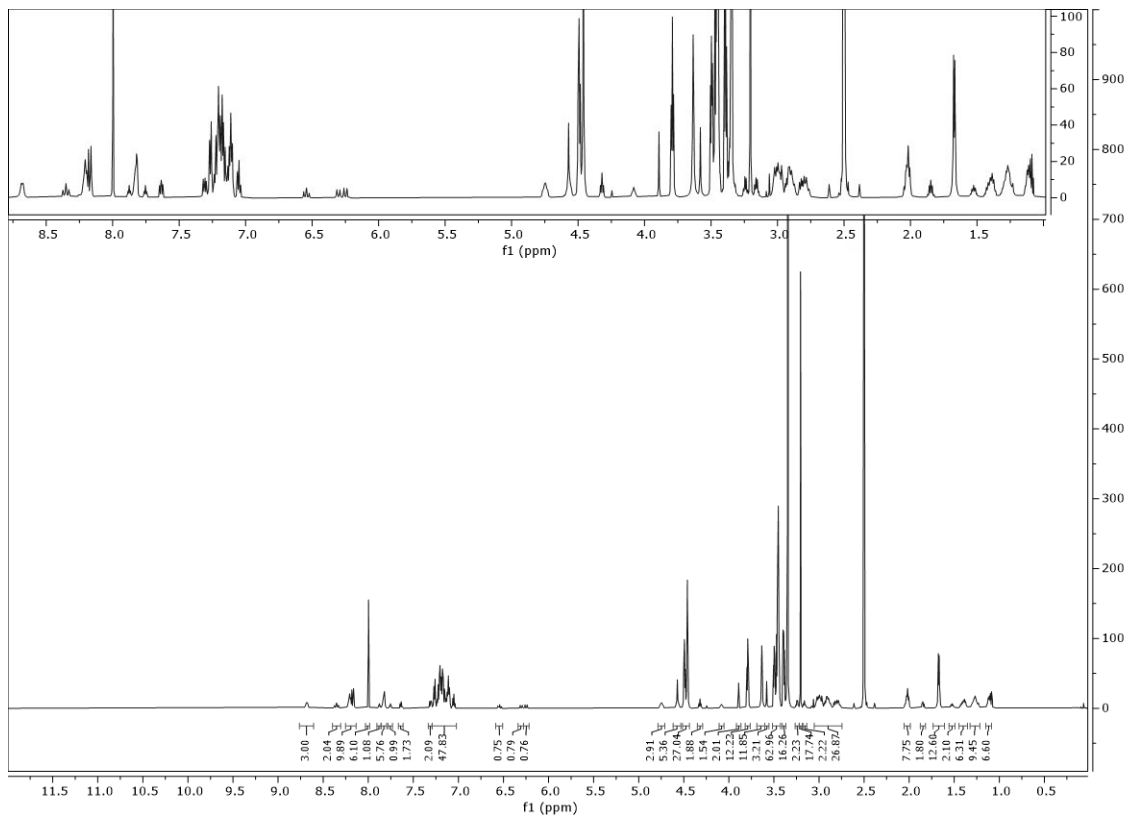


Abbildung 9.15: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-27.

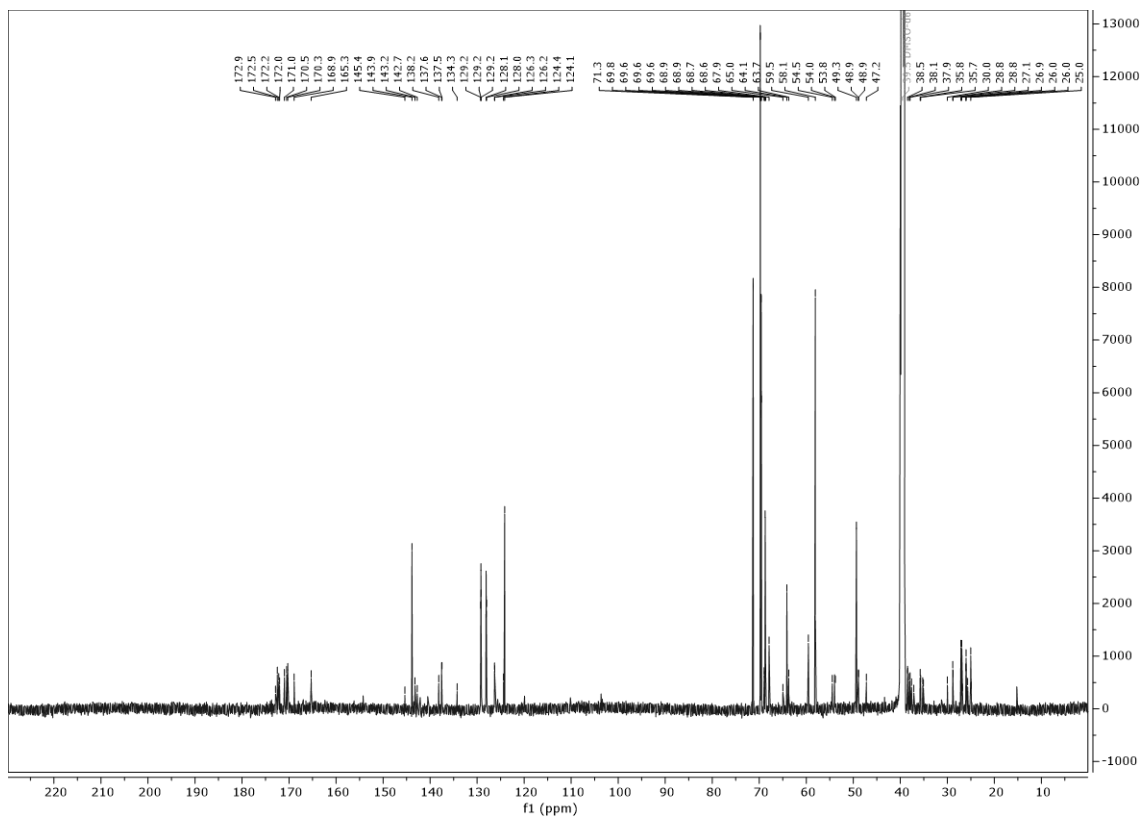
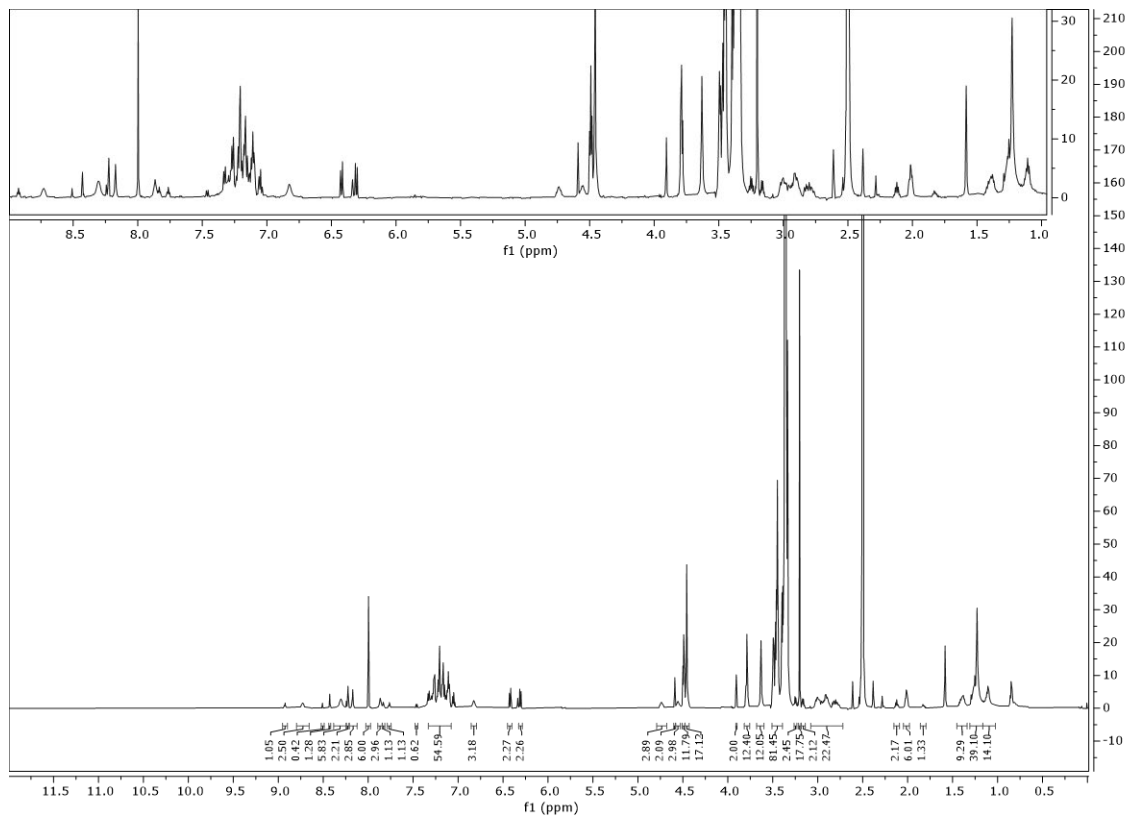
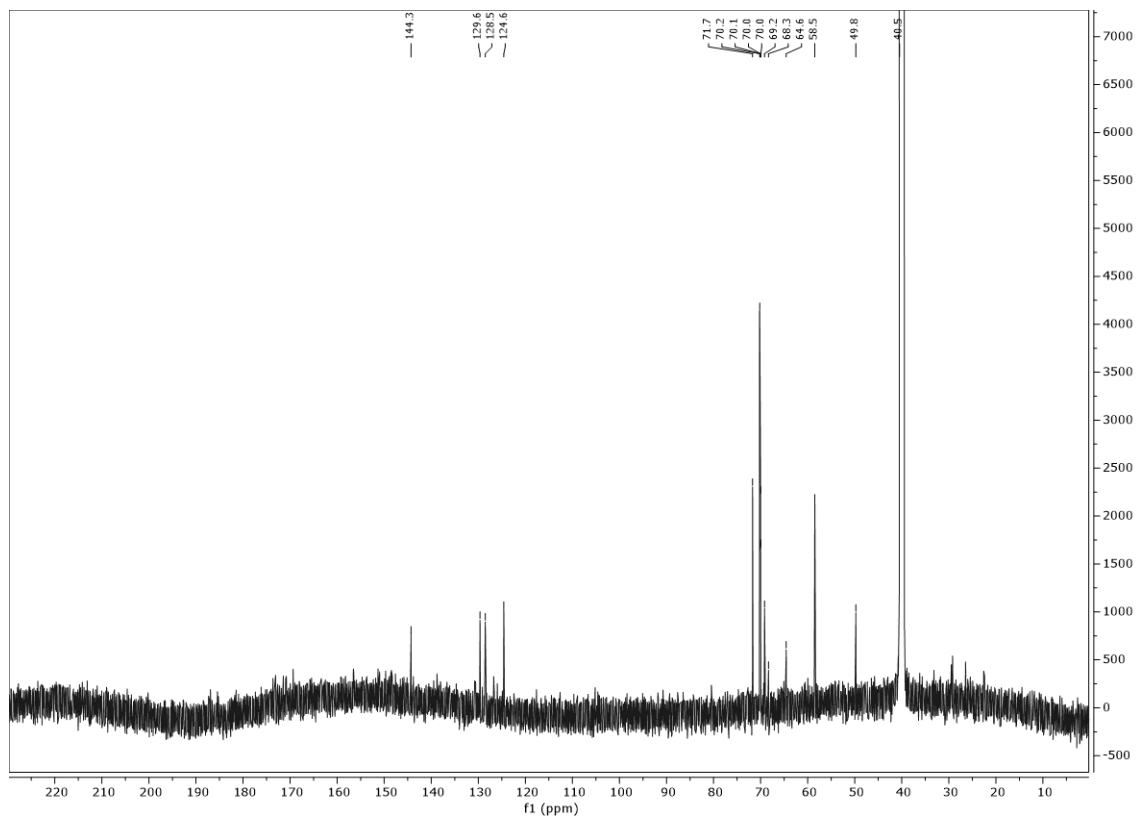


Abbildung 9.16: ¹³C-NMR-Spektrum (151 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-27.

Abbildung 9.17: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-32.Abbildung 9.18: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-32.

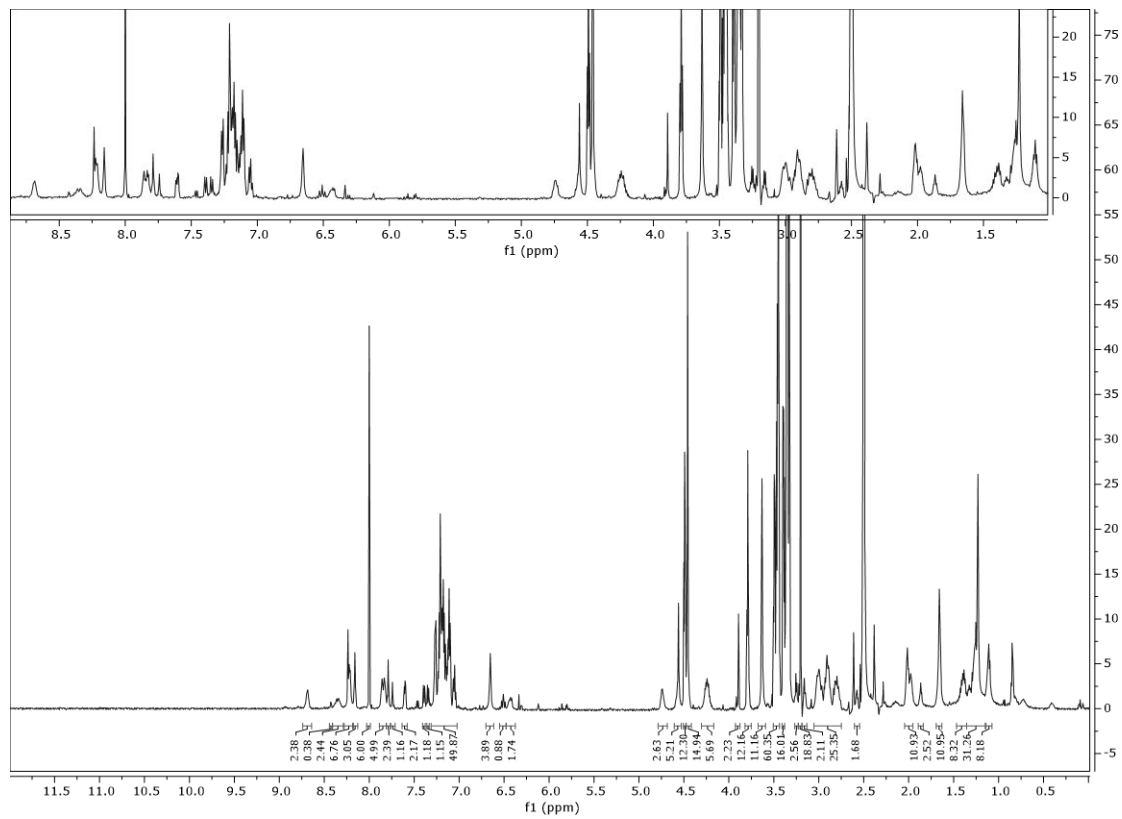


Abbildung 9.19: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-33.

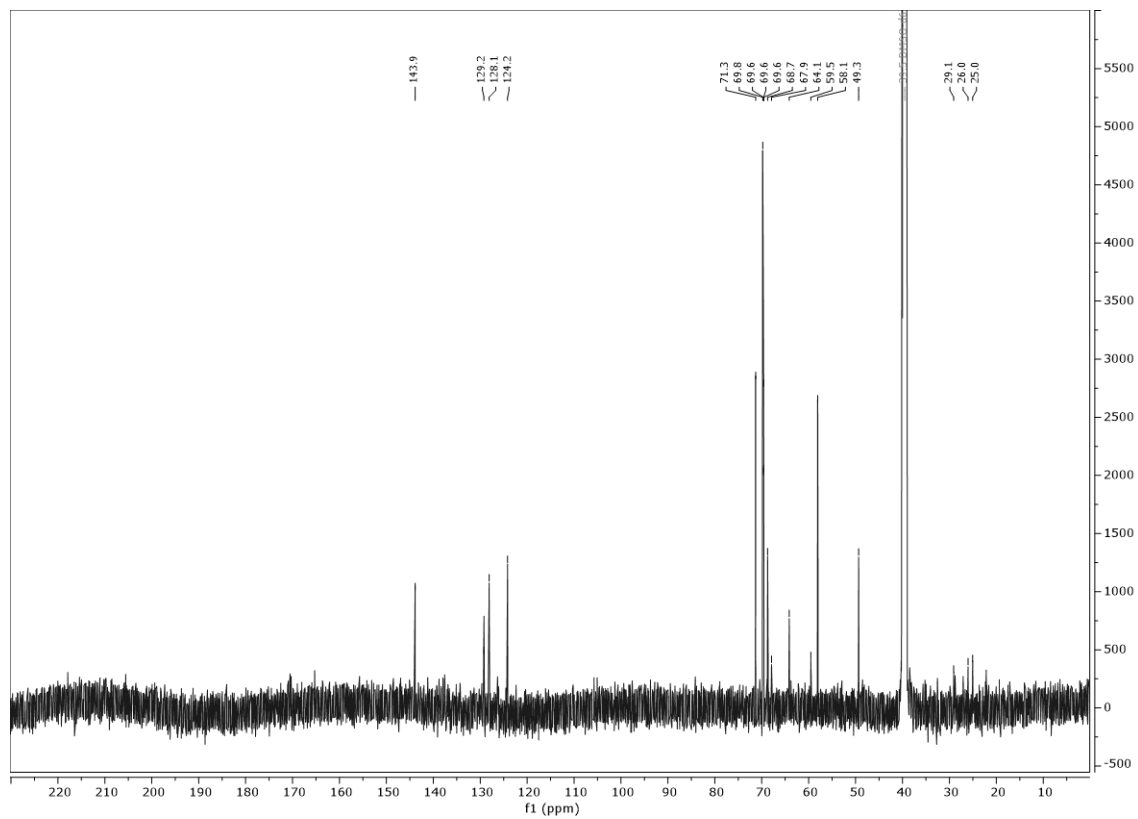
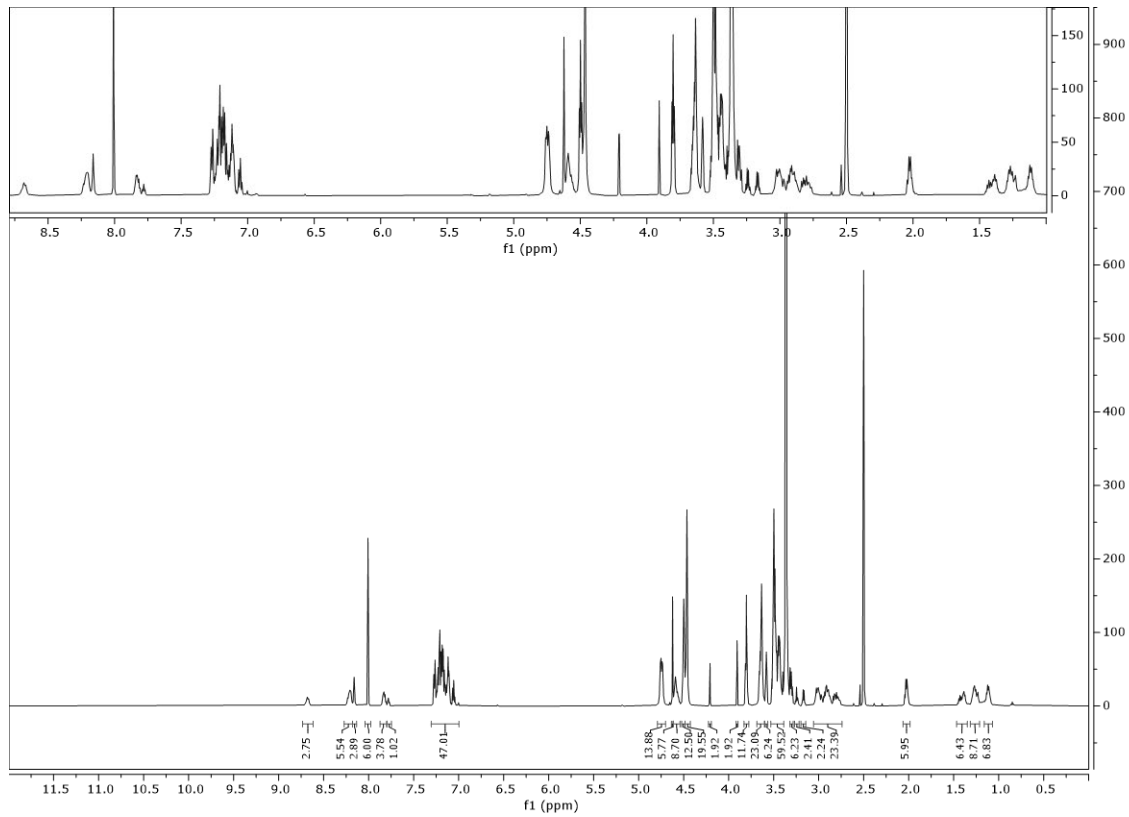
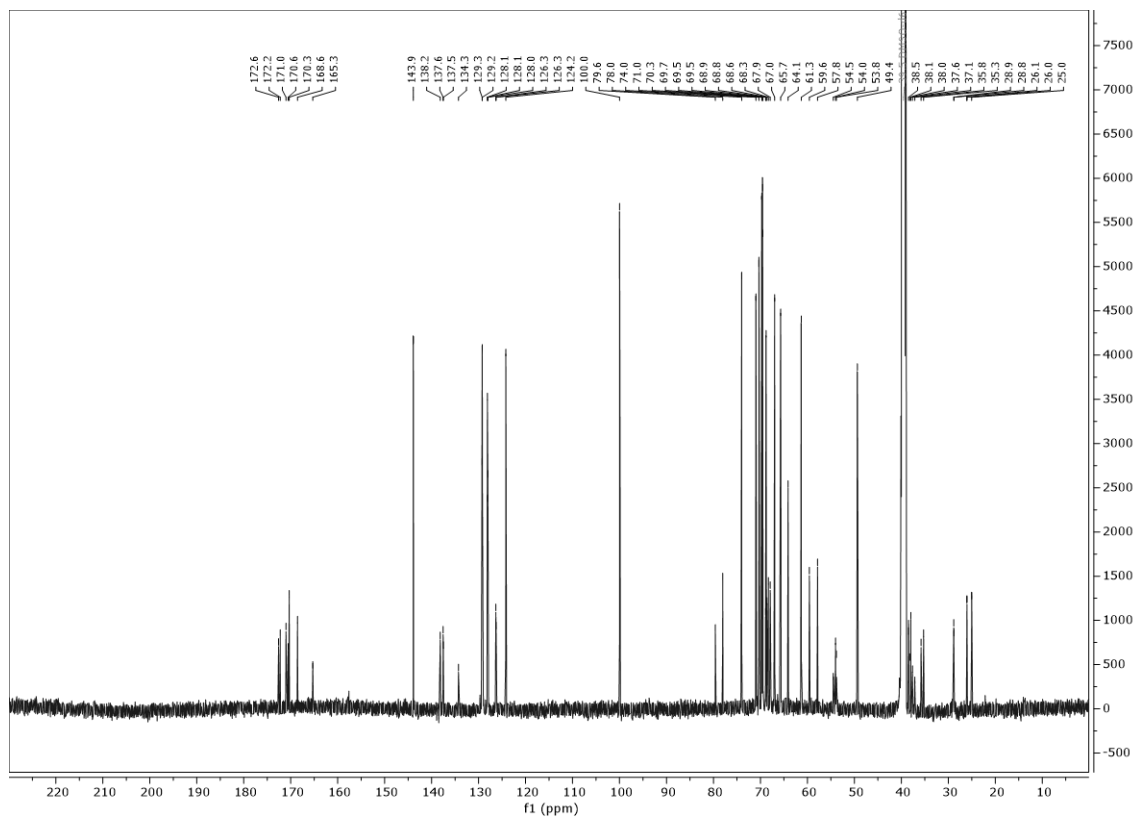


Abbildung 9.20: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-33.

Abbildung 9.21: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-29.Abbildung 9.22: ¹³C-NMR-Spektrum (151 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung X-29.

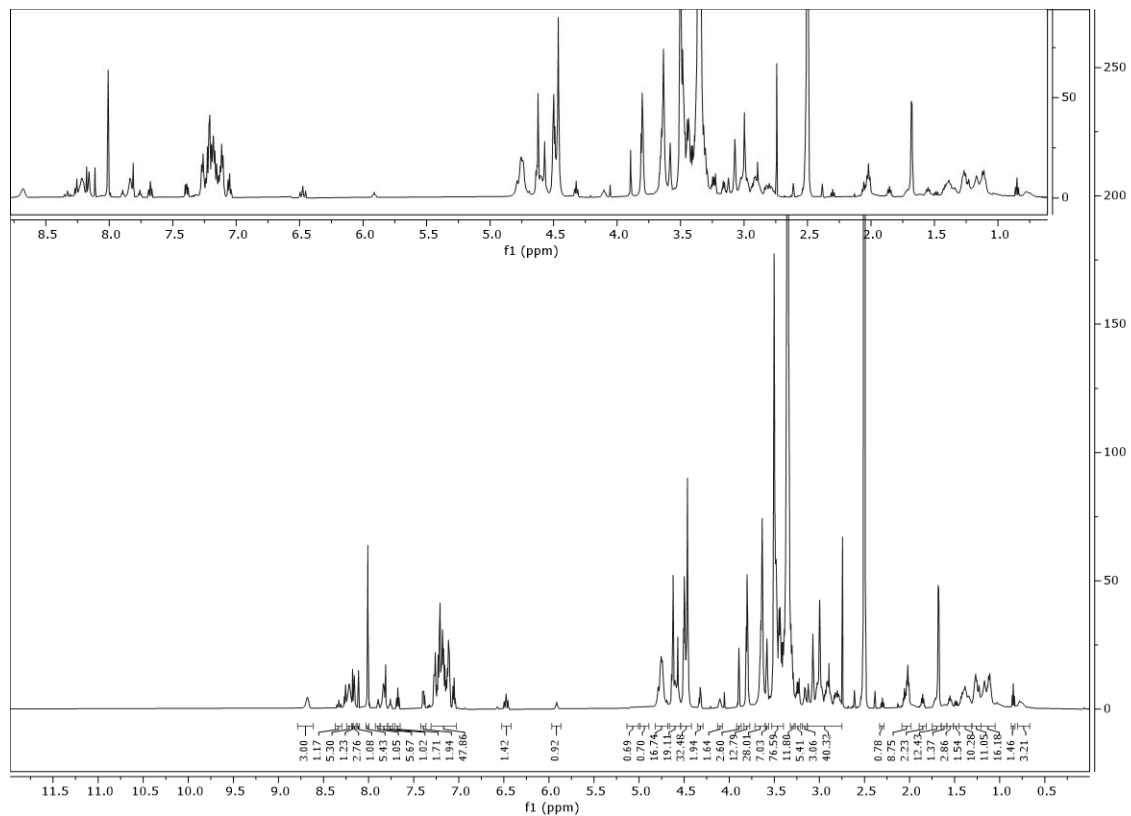


Abbildung 9.23: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-30.

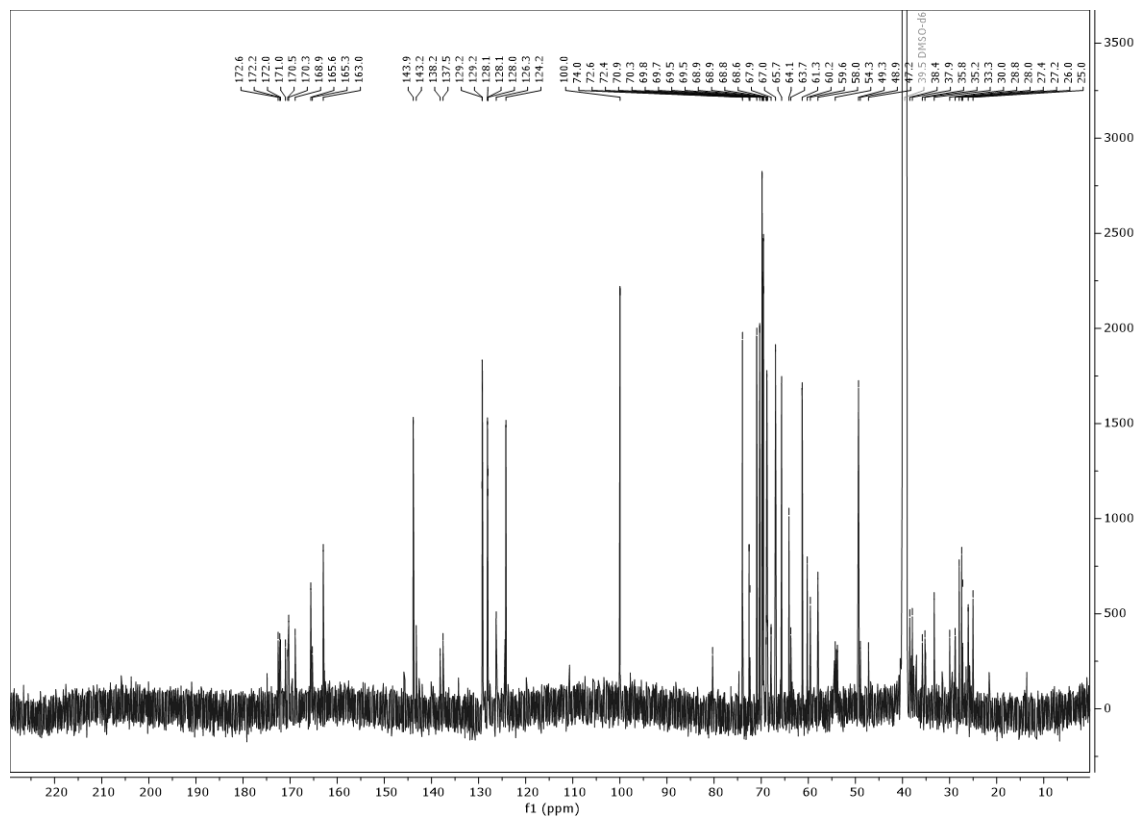
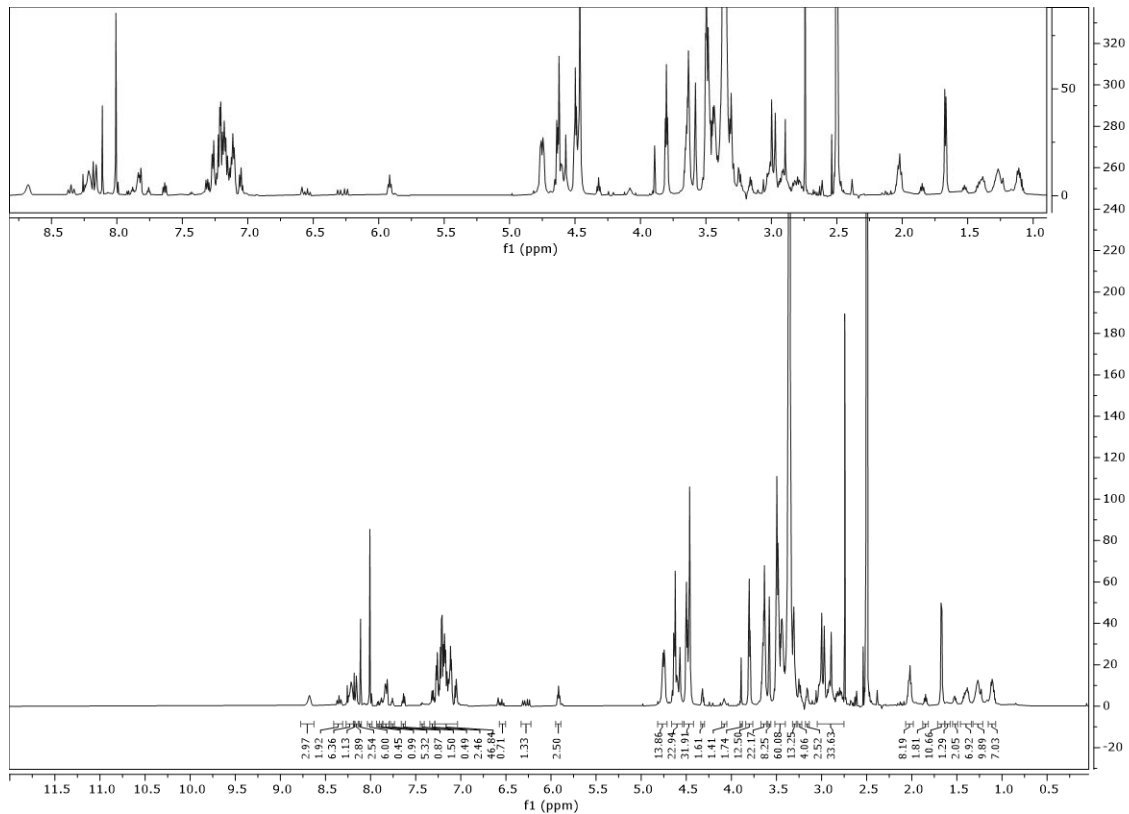
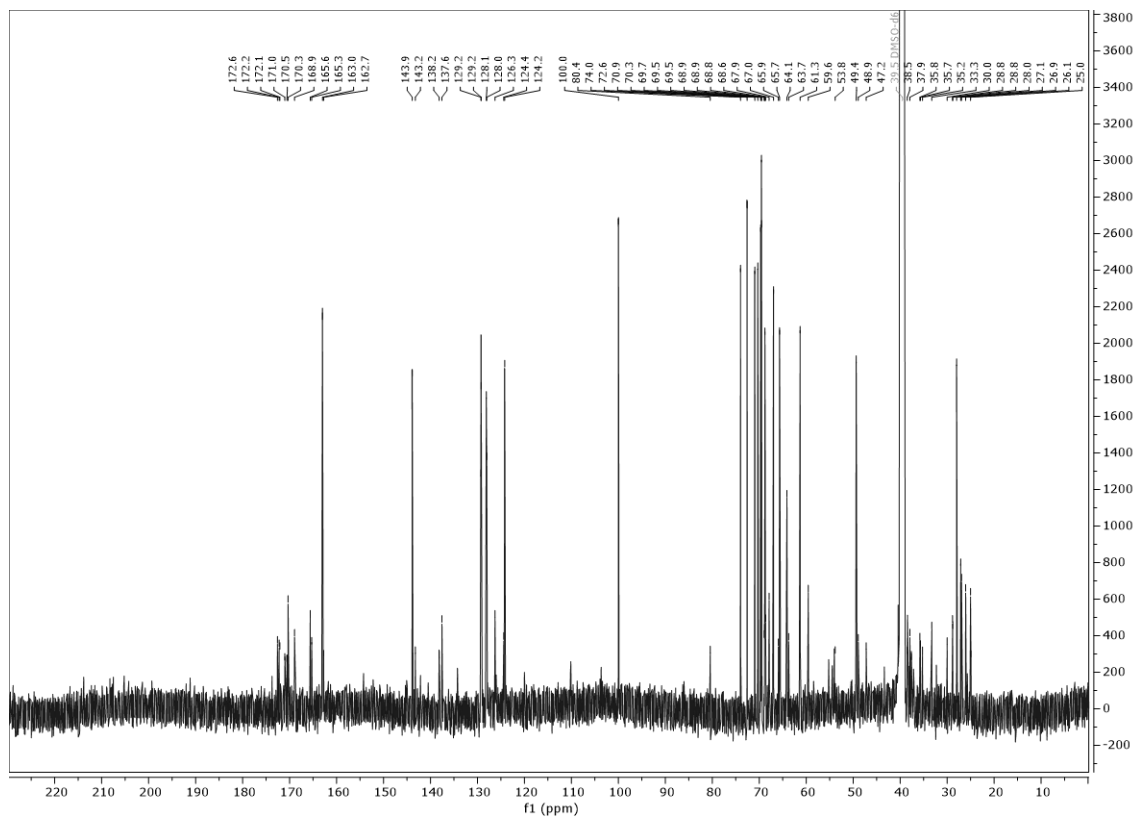


Abbildung 9.24: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-30.

Abbildung 9.25: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-31.Abbildung 9.26: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von Verbindung X-31.

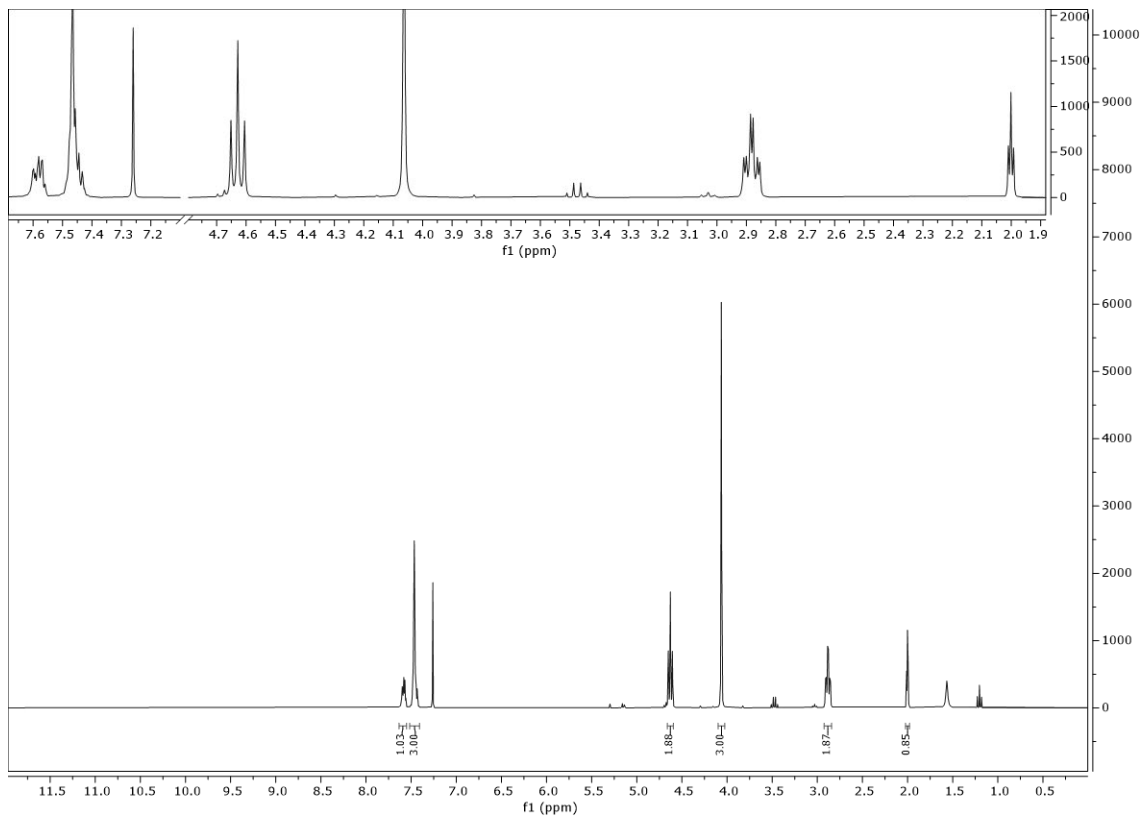


Abbildung 9.27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von Verbindung Y-2.

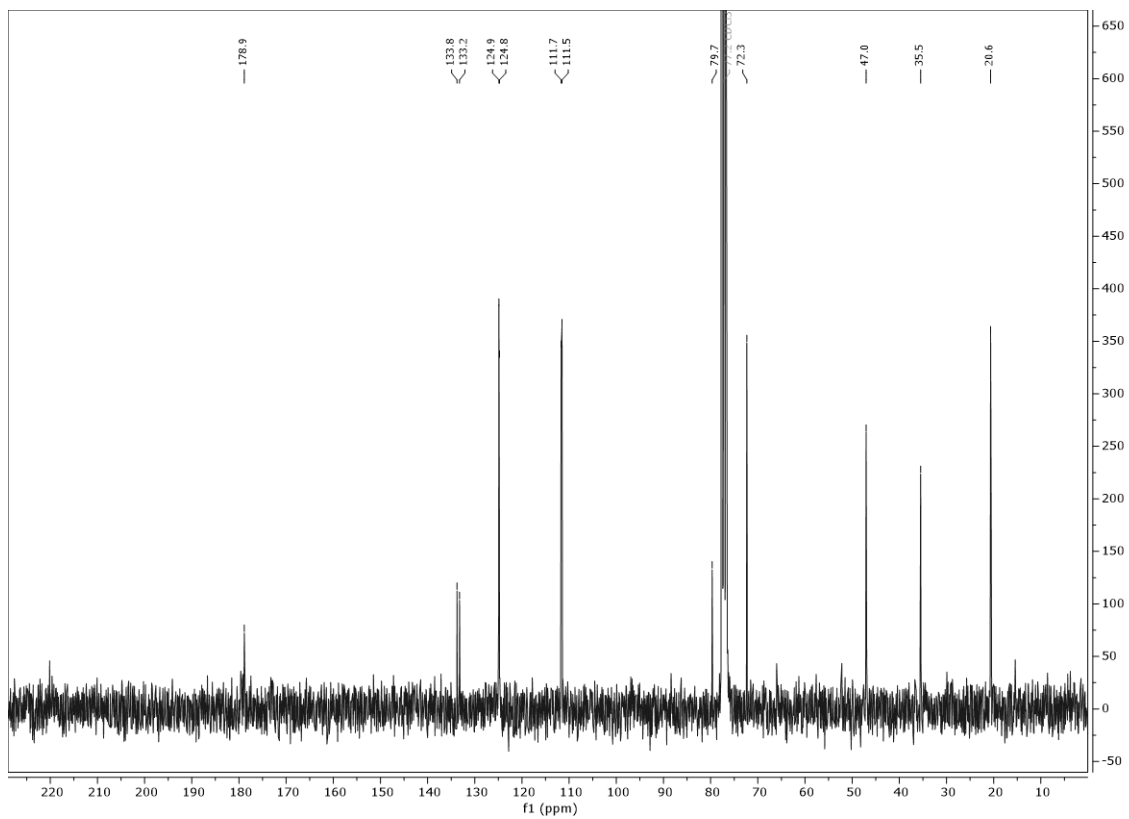
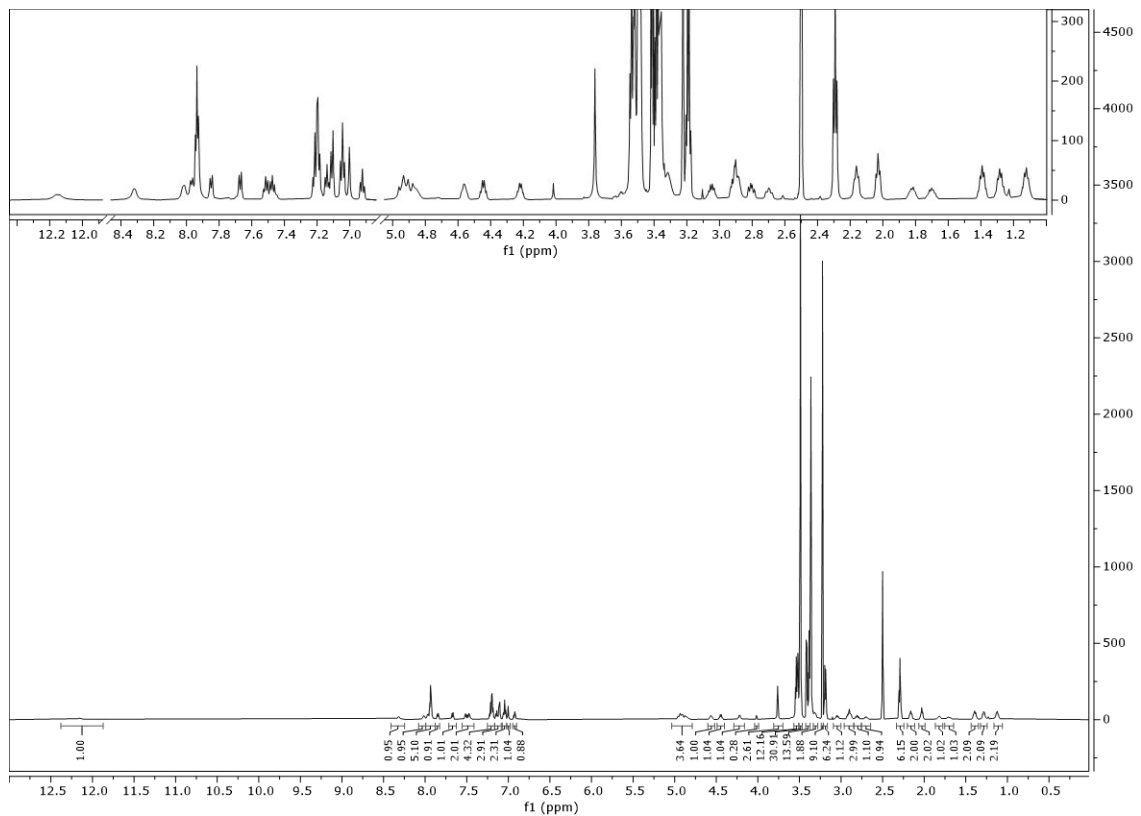
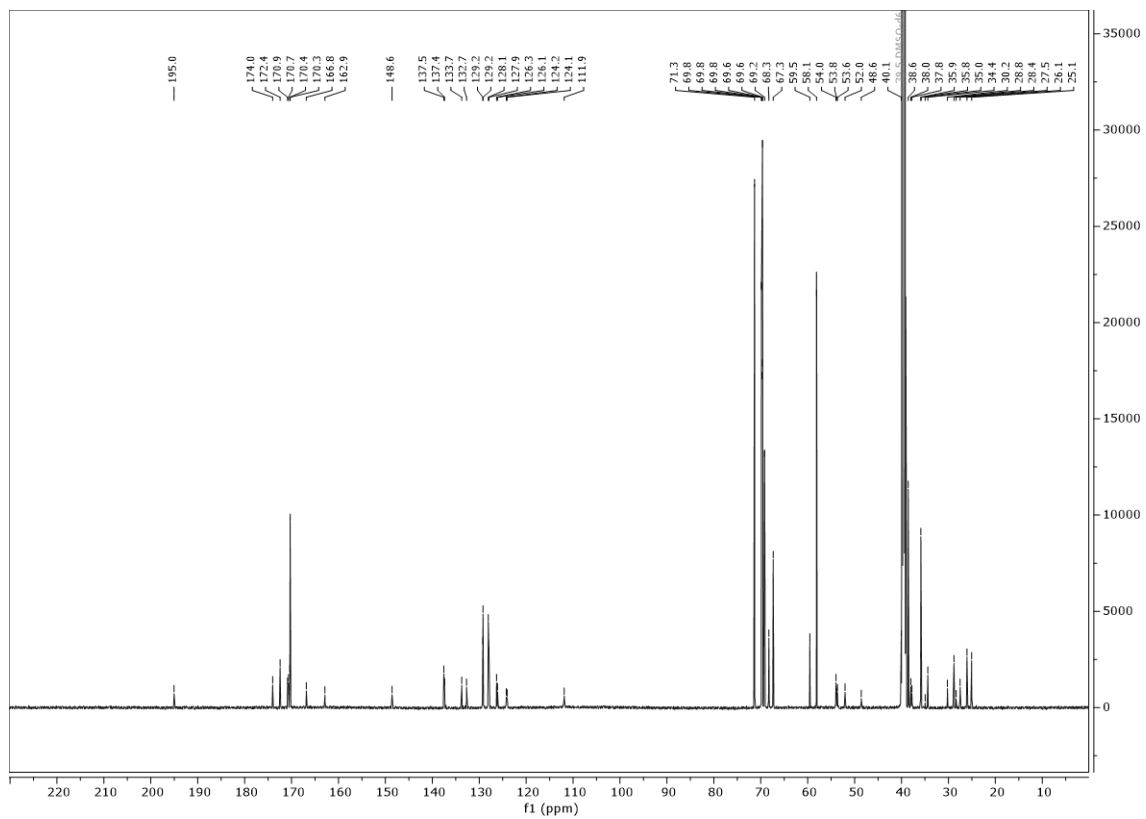


Abbildung 9.28: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75 MHz, CDCl_3) von Verbindung Y-2.

Abbildung 9.29: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung Y-7.Abbildung 9.30: ¹³C-NMR-Spektrum (151 MHz, DMSO-*d*₆) von Verbindung Y-7.

Versicherung

für das Gesuch um Zulassung zur Promotion im Fachbereich 09 an der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

Hiermit versichere ich Thomas, Marius gemäß § 10 Abs. 3d
Name, Vorname

der Promotionsordnung vom 24.07.2007:

- Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.
- Ich hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit als Prüfungsarbeit für folgende Prüfungen eingereicht.

(Bezeichnung der Prüfung)

(Bezeichnung und Ort der Prüfungsstelle)

- Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

11.07.2024

Datum



Unterschrift