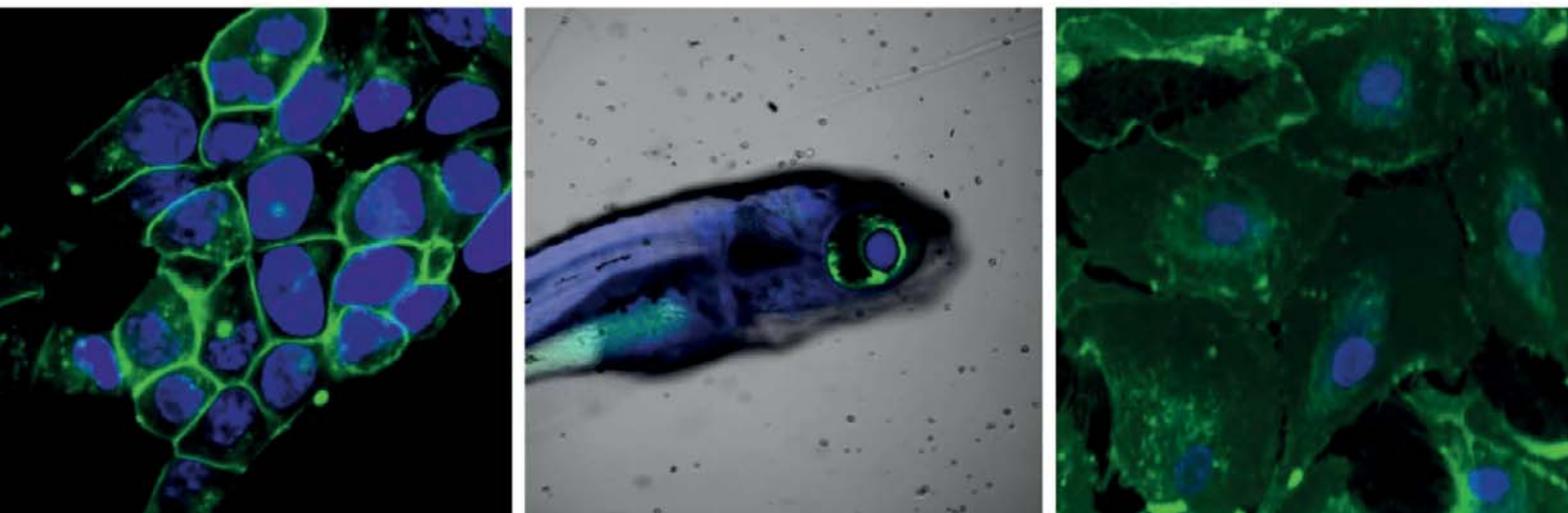


# *In vivo* Markierung von Glykostrukturen mit Hilfe neuartiger, bioorthogonaler Azid-Alkin 1,3-dipolarer Cycloadditionen

Judith Seltenreich





*In vivo* Markierung von Glykostrukturen mit Hilfe neuartiger, bioorthogonaler Azid-Alkin 1,3-dipolarer Cycloadditionen





# ***In vivo* Markierung von Glykostrukturen mit Hilfe neuartiger, bioorthogonaler Azid-Alkin 1,3-dipolarer Cycloadditionen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) – Universitätsbereich  
genehmigte

## **Dissertation**

von  
Dipl.-Chem. Judith Esther Seltenreich, geb. Bender  
aus  
Mosbach

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky  
Referent: Priv.-Doz. Dr. Ute Schepers  
Korreferent: Prof. Dr. Clemens Heske  
Tag der mündlichen Prüfung: 18.07. 2014



### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2014

Zugl.: Karlsruhe (KIT), Univ., Diss., 2014

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2014

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2014

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-95404-778-9

eISBN 978-3-7369-4778-8



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Priv.-Doz. Dr. Ute Schepers vom 01. November 2011 bis zum 04. Juni 2014 am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG), Karlsruher Institut für Technologie (KIT), durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Clemens Heske danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

H. Möller, V. Böhrsch, J. Bentrop, J. Bender, S. Hinderlich and C. P. R. Hackenberger, Glycan-spezifisches metabolisches Oligosaccharid-Engineering von C7-substituierten Sialinsäuren, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**.

J. E. Seltenreich, M. Wallesch, D. Volz, D. Wagner, C. Bednarek, C. Grabher, T. Baumann, S. Bräse and U. Schepers, In vivo bioorthogonal labeling of the glycocalyx using a luminescent, self-clickable copper complex in an intramolecular-catalyzed Click reaction, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014** (in Arbeit).

**Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.**

**Karlsruhe, im Juli 2014**

**Judith Seltenreich**





Für Jens, Josia  
und meinen Vater





## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung .....	3
2.1	Die Glykokalyx.....	4
2.2	Die endotheliale Glykokalyx .....	6
2.3	Zusammensetzung der Glykokalyx.....	7
2.3.1	Glykoproteine.....	7
2.3.1.2	O- Glykane.....	10
2.3.2	Proteoglykane .....	12
2.3.3	Glykolipide .....	14
2.4	Die Charakterisierung der Glykanstrukturen auf der Zelloberfläche .....	16
2.4.1	Darstellungsmethoden der Glykokalyx.....	16
2.4.2	Metabolisierung von unnatürlichen Monosacchariden .....	16
2.4.3	Click-Chemie.....	23
3	Ziel der Arbeit.....	31
4	Ergebnisse und Diskussion.....	33
4.1	Labelling von Glykostrukturen in diversen Zelllinien .....	33
4.1.1	Cu-freie Click-Reaktion (SPAAC) mit ClickFITC und ClickCy5 .....	33
4.1.2	Hochdurchsatzverfahren zur Quantifizierung von Glykostrukturen auf der Zellmembran .....	49
4.2	Markierung von Glykan-gebundenen Sialinsäuren mit Hilfe der SPAAC.....	51
4.3	Intramolekulare CuAAC mit Cu(I)-Komplexen aus Emittermaterialien von organischen Leuchtdioden (OLEDs).....	62
4.3.1	Toxikologische Untersuchungen zur intramolekular-katalysierten CuAAC .....	71
4.3.2	Intramolekular-katalysierte CuAAC im Zebrafischmodell .....	72
4.3.3	PyrPHOS-Cu(I)-Komplexe mit heteroleptischen organischen Liganden ... ..	78
4.4	Neue Cu-basierte Fluoreszenzfarbstoffe aus Emittermaterialien von OLEDs.....	82
5	Experimenteller Teil .....	87
5.1	Zellkultur .....	87
5.1.1	Tumor- und Primärzelllinien .....	87
5.1.2	Kryokonservierung von Zelllinien .....	87



5.1.3	Verwendung von BG Matrigel™ bei SHSY5Y Zellen .....	88
5.2	Cu-freie Click-Reaktion mit ClickFITC- bzw. ClickCy5.....	88
5.3	Cu-katalysierte Click-Reaktion mit PyrPHOS-Cu(I)-Komplex .....	89
5.4	FACS Analyse .....	89
5.5	Zellkernfärbung mit Hoechst 33342.....	90
5.6	Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd.....	90
5.7	MTT-Test.....	90
5.8	Statistische Auswertung .....	91
5.8.1	MTT Test.....	91
5.8.2	Hochdurchsatzverfahren.....	91
5.9	Behandlung der Zebrafisch Embryonen .....	92
5.9.1	Gewinnung der Zebrafisch Embryonen.....	92
5.9.2	Haltung der Eier .....	92
5.9.3	Start der Zucker- und Click-Injektion.....	92
5.9.4	Unterdrückung der Pigmentierung und Narkotisierung .....	93
5.9.5	Dechorionieren mit Pronase und Entdottern .....	94
5.9.6	Fixierung, Permeabilisierung und Färbung von Zebrafischembryonen .	94
5.9.7	Einbettung der fixierten Embryonen.....	95
5.9.8	Fixierung mit Methanol als Alternative zur PFA-Fixierung .....	96
5.10	Western-Blot als Nachweis der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle .....	96
5.10.1	Probeaufbereitung und Verdau .....	96
5.10.2	Gießen des Gels .....	96
5.10.3	Vorbereiten des Gel-Gießstandes.....	97
5.10.4	Gießen des Trenngels .....	97
5.10.5	Gießen des Sammelgels.....	97
5.10.6	Probenaufbereitung und Gelelektrophorese .....	97
5.10.7	Semi-Dry Blot.....	98
5.11	Immunnachweis.....	98
5.12	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-4-azido-4-desoxy-(1,3,6- <i>O</i> -acetyl)-mannosamin (Ac <sub>3</sub> -4-Azido-ManNAc) .....	99
5.13	Metabolischer Einbau von Azidozuckern, Click-Reaktion und Analyse des Glykaneinbaus in Glykoproteine .....	101
6	Materialverzeichnis .....	103
6.1	Zelllinien .....	103
6.2	Zellmedien .....	104



6.3	Versuchstiere .....	106
6.4	Verbrauchsmaterialien.....	106
6.5	Analytik.....	108
6.6	Chemikalien und Reagenzien.....	109
7	Abkürzungsverzeichnis .....	113
8	Literaturverzeichnis .....	119
9	Lebenslauf .....	129
10	Danksagungen.....	133





## 1 Zusammenfassung

Zuckerverbindungen, auch Glykostrukturen genannt, liegen in nahezu allen lebenden Systemen vor. Mit Hilfe der Massenspektrometrie oder anderen analytischen Techniken, wie der *Time-of-Flight*-Sekundärionenmassenspektrometrie (ToF-SIMS), ist die Charakterisierung dieser Glykane möglich. Allerdings sind diese Techniken sehr aufwendig und umfassen eine sehr komplexe Analytik. Aus diesem Grund ist die Entwicklung anderer, simplerer Methoden erforderlich. Dazu gehört die posttranslationale Modifizierung der Zuckerstrukturen mittels intramolekularer bioorthogonaler Click-Reaktion, die im Zuge der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Dabei wurden peracetylierte unnatürliche Azidozucker ( $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  (peracetyliertes *N*-Acetyl-azidogalaktosamin) und  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  (peracetyliertes *N*-Acetyl-azidomannosamin)) als sogenannte Zuckervorläufer sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt, wobei eine Azid-Gruppe als bioorthogonale Gruppe fungierte. Nach 3-tägiger Metabolisierung werden die Glykostrukturen in die Zelloberfläche integriert. Um die Glykostrukturen zu visualisieren, wurden sowohl Kupfer(Cu(I))-katalysierte als auch Cu-freie Reagenzien als Fluorophore eingesetzt. Zur Markierung wurde die 1,3-dipolare Cycloaddition (Click-Reaktion) mit Alkinen durchgeführt. Dabei wurden neue Reagenzien sowohl für die etablierte *Strain-Promoted* Alkin-Azid 1,3-dipolare Cycloaddition (SPAAC) als auch für die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) synthetisiert und in Zellen und *in vivo* getestet. Dabei standen besonders die Verbesserung der Reaktionskinetik und die Entwicklung bleichstabiler Fluorophore im Vordergrund. Des Weiteren wurde ein unnatürlicher Azidozucker (*N*-Acetyl-4-azido-4-desoxymannosamin,  $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$ ) synthetisiert, der Sialinsäure-Spezifität zeigte. Dabei wurde die Azido-Gruppe vom C2- zum C4-Atom verschoben.  $\text{Ac}_3\text{-4-Azido-ManNAc}$  wurde in 24 hpf (engl. *hours post fertilization*, Stunden nach der Befruchtung) Zebrafisch Embryonen mikroinjiziert, um so den Verlauf der Verbreitung dieser Zucker während der Embryogenese zu beobachten und mittels Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO zu visualisieren. Entlang des Zebrafisch-Rückgrats konnten Glykostrukturen beobachtet werden. Außerdem waren die Azidozucker im Neuralrohr vorzufinden. In den anderen Organen, wie Leber, Herz, Niere oder Magen-Darm-Trakt, konnten die Azidozucker mit Hilfe des Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO nicht visualisiert werden. Neben der Cu-freien Methode wurde auch eine neuartige intramolekulare Cu-katalysierte Click-Reaktion ausgetestet. Dazu wurde ein neuer fluoreszenter, selbst-katalytisch clickender Cu(I)-Komplex (Butinyl-PyrPHOS-Cu(I)-Komplex) entwickelt, der überwiegend als Emittermaterial in organischen Leuchtdioden verwendet wurde. Durch diese Cu-katalysierte intramolekulare bioorthogonale Click-Reaktion konnte eine Verkapselung der Glykostrukturen tumorassoziierter Zellen beobachtet werden. Hinzu kommt noch, dass die Markierung der Glykostrukturen in nur zwei Reaktionsschritten ablaufen und im Zebrafisch Embryo bereits durch das simple „Baden“ in einer Lösung bestehend aus Azidozucker und Butinyl-PyrPHOS-Cu(I)-Komplex ausgetestet wurden. Eine Besonderheit war, dass in der Retina von 72-120 hpf Zebrafisch Embryonen eine starke Fluoreszenz auftauchte, die zuvor noch nie beobachtet wurde. Dabei ist die Cu(I)-Toxizität, die im Allgemeinen in Zellen



und einem Organismus sehr hoch ist, aufgrund der Abschirmung durch die alkylierten Seitenketten des Cu(I)-Komplexes sehr gering. Dieser Cu(I)-Komplex kann demnach als selbst-clickendes Fluorophor zur Markierung der Glykokalyx in *in vivo* Experimenten eingesetzt werden ohne dabei die Glykokalyx zu beschädigen.



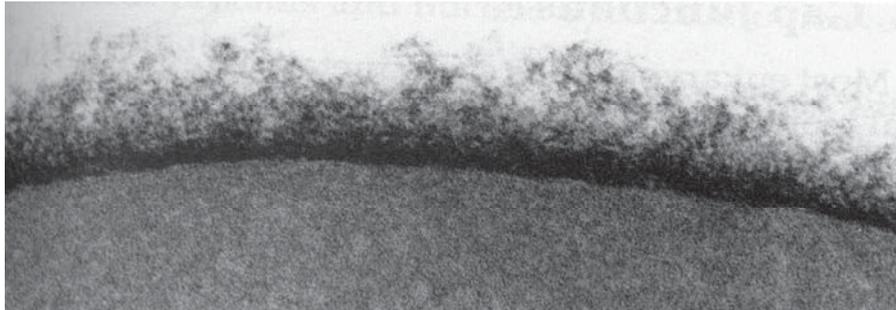
## 2 Einleitung

Kohlenhydrate spielen im lebenden Organismus eine sehr wichtige Rolle. Die Grundbausteine aller Kohlenhydrate sind Monosaccharide, sogenannte Einfachzucker, wie Glukose, Galaktose oder Mannose. Sie sind wichtige Energielieferanten. Außerdem sind sie an Prozessen, wie Zell-Zell Erkennung, Zellschutz und Bildung von neuem Gewebe, beteiligt. Kohlenhydrate sind außerdem ein wesentlicher Grundbaustein der DNS (Desoxyribonukleinsäure). Besonders die individuelle Oberflächenbeschaffenheit von Zellen ist essentiell für die Erkennung vieler lebenswichtiger Faktoren. Zu diesen Faktoren gehören ganze Zellen, Proteine, Wachstumsfaktoren, und Botenstoffe sowie Pathogene und Wirkstoffe. Die Erkennung solcher Faktoren ist hoch spezifisch und individuell für jeden Zelltyp und basiert häufig auf Interaktionen mit entsprechenden Rezeptoren auf der extrazellulären Seite der Zellmembran. Neben den klassischen Protein-Rezeptoren spielen Protein- und Lipid-gebundene Glykostrukturen eine wichtige Rolle bei der Zellerkennung. Die großen Oligosaccharidbestandteile der Glykokonjugate bilden dabei eine Zuckerschicht auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran, die als Glykokalyx bezeichnet wird. (Pavelka and Roth 2010) Die Glykokalyx ist für jeden Zelltyp spezifisch und ändert sich häufig signifikant während der Zelldifferenzierung in der Embryogenese und Morphogenese oder bei pathogenen Prozessen wie z.B. der Tumorbildung. So besitzen beispielsweise kanzerogene Zellen eine andere Zuckerdekoration als gesunde Zellen. (Rambourg and Leblond 1967) Die Kohlenhydratschicht von Zellmembranen ist zum einen für die Zell-Zell-Wechselwirkung und zum anderen für die Interaktionen zwischen Zellen und der Umgebung verantwortlich. Außerdem beeinflusst eine Veränderung der Kohlenhydratstruktur sowohl die Zelldifferenzierung, als auch die neoplastische Transformation (Umwandlung einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle durch Aktivierung eines Onkogens). Organe und Gewebe unterscheiden sich demnach im Aufbau der Kohlenhydratverbindung der Zelloberfläche. Jede eukaryotische Zelle besitzt Kohlenhydrate an der Zelloberfläche. (Dabelsteen et al. 1991) Zudem sind diese Bausteine individuell je nach Entwicklungsstadium einer Zelle oder auch in bestimmten Zellverbänden, beispielsweise Geweben, exprimiert. (Espinosa-Marzal et al. 2013) Es existiert demnach eine Vielzahl unterschiedlicher Glykostrukturen und Glykane in Abhängigkeit der physiologischen Umgebung. Die Gesamtheit aller Kohlenhydratstrukturen in der Zelle oder im Organismus nennt man Glykom. Sowohl Glykoproteine, Proteoglykane und Glykolipide bestehen in einfacher, als auch in konjugierter Form aus Oligosacchariden (Glykanen). Da das Glykom nicht genetisch kodiert, sondern durch posttranslationale Modifizierungen von Proteinen und Lipiden generiert wird, ist es trotz vieler Einzelstudien bisher nicht gelungen, seine Rolle bei Zellerkennungsprozessen umfassend zu klären. (Argüeso 2013)



## 2.1 Die Glykokalyx

Die Glykokalyx leitet sich vom Griechischen, *glykos* = Zucker und *kalyx* = Mantel, ab. Sie ist ein Multikomponentensystem bestehend aus Glykoproteinen (Espinosa-Marzal et al. 2013), Glykolipiden, Proteoglykanen, Glykosaminoglykane (Dudas and Semeniken 2012; Gasimli et al. 2012), Bindungsproteinen, Enzymen, Rezeptorstellen und Antigenen. Unter anderem bildet sie auch die viskose Schleimhülle eukaryotischer Zellen und ist zwischen 200 nm und mehrere Mikrometer dick (Abbildung 2.1.1).



**Abbildung 2.1.1| Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer Glykokalyx.** Als Glykokalyx wird das Zuckergerüst auf der extrazellulären Seite der Zelloberfläche bezeichnet.(Voet and Voet 2004)

In vielen Fällen ermöglicht die Glykokalyx sogar erst, dass sich einzelne Zellen zu Zellverbänden zusammenschließen, indem sich gleichartig differenzierte Zellen an ihrem Oberflächenzuckermuster erkennen. Wie bereits oben erwähnt werden zahlreiche Funktionen, wie Zell-Zell-Erkennungsprozesse, Rezeptoreigenschaften, Zellhaftungsprozesse und Schutzfunktionen gegenüber Pathogenen der Glykokalyx zugeschrieben. Membranverankerte Glykoproteine und Glykolipide der Glykokalyx bilden eine essentielle Barrierefunktion.(Mauris et al. 2013) Beispielsweise schützen sie die Zelle vor Pathogenen, indem sie das Anhaften dieser vermeiden und somit deren Nährboden eliminieren. Außerdem verleiht die Glykokalyx den Zellen Antigen- und Blutgerinnungseigenschaften, die für das Immunsystem von außerordentlich großer Bedeutung sind.(Hudak et al. 2014) Schließlich kann gesagt werden, dass die Glykoproteine der Glykokalyx Träger der zellulären Immunisierung sind, da körpereigene Glykoproteine bereits eine starke Abwehr gegenüber körperfremden Glykoproteinen zeigen. Die wichtigsten Funktionen der Glykokalyx sind in der Tabelle 2.1.1 dargestellt.(Saladin 2011)

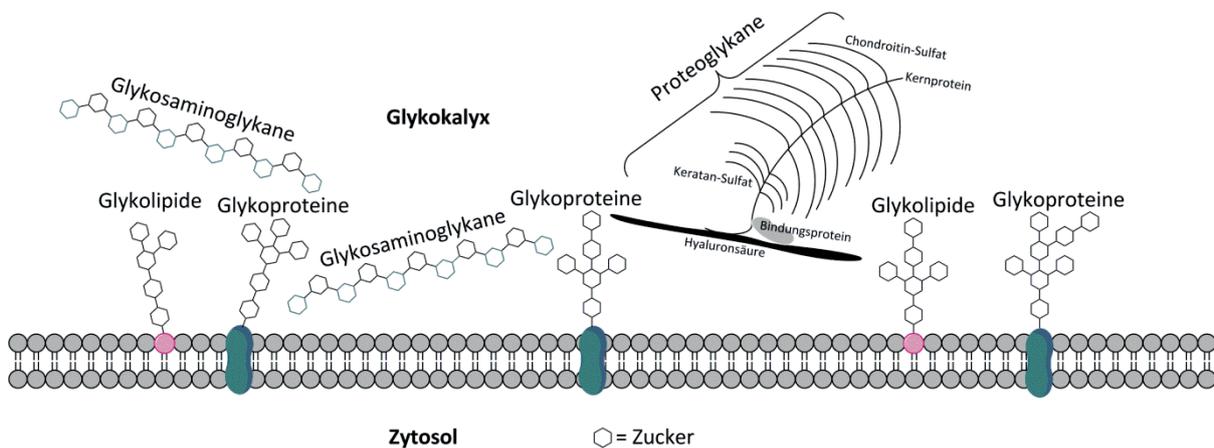
**Tabelle 2.1.1| Die wichtigsten Funktionen der Glykokalyx.(Saladin 2011)**

<b>Funktion der Glykokalyx</b>	
Schutzfunktion	Bedecken die äußere Zelloberfläche und dienen als Barriere- und Filterfunktion
Immunisierung	Fremde Organismen werden von ihr erkannt und an das Immunsystem selektiv weitergeleitet



Schutz vor Tumorzellen	Veränderungen der Glykokalyx durch Tumorzellen werden sofort vom Immunsystem erkannt und zerstört
Gute Transplantationsfähigkeit	Hauptverantwortlich für die Verträglichkeit von Bluttransfusionen oder Organtransplantationen und für die Gewebsbildung
Gewebsbildung	Sorgt für den Zusammenschluss einzelner Zellen zu Zellverbänden
Befruchtung von Eizellen	Ermöglicht Spermien an ein Ei zu binden
Embryonalentwicklung	Embryonale Zellen werden an den Bestimmungsort im Organismus geführt

Die wichtigsten Zucker der Glykokalyx sind Glukose, Galaktose, Fukose, *N*-Acetylglukosamin, *N*-Acetylgalaktosamin und *N*-Acetylneuraminsäure. Dabei sind die Zucker kovalent an Proteine und Lipide gebunden, die weit in den extrazellulären Raum hinausragen, aber auch fest in der Zellmembran verankert sind (Abbildung 2.1.2).



**Abbildung 2.1.2| Aufbau der Glykokalyx.** Zur Glykokalyx gehören Glykoproteine, Glykolipide, Proteoglykane, sowie Glykosaminoglykane. Die Oligosaccharide (Glykane) der Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykolipiden bilden den äußeren Zellmantel.

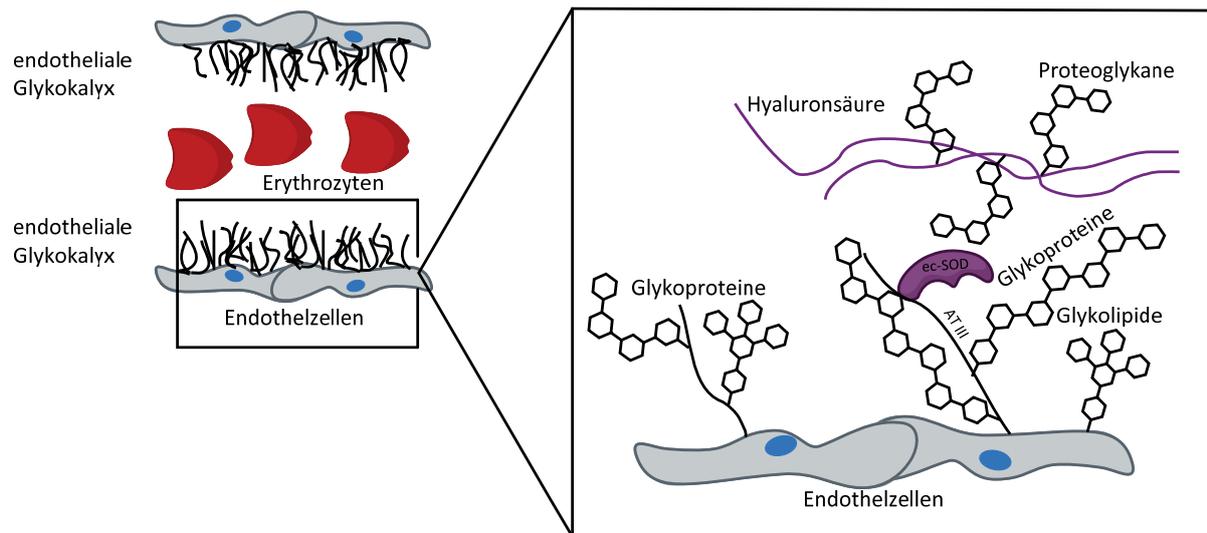
Im Allgemeinen ummanteln die Kohlenhydratstrukturen die Zelle auf der extrazellulären Seite der Zelloberfläche (Abbildung 2.1.1).(Voet and Voet 2004) Durch die Neubildung von Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glykolipiden, Glykosaminoglykanen (GAG), und assoziierten Plasmaproteinen wird die Glykokalyx ständig regeneriert.(Trouillon and Ewing 2013) Dabei werden die Proteinstrukturen der Glykoproteine im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) gebildet und in den



Golgi Apparat transportiert. Dort werden die Zuckermoleküle an Proteine und Lipide gekuppelt. Diese Hauptbestandteile der Glykokalyx gelangen dann vom Golgi Apparat über den sekretorischen vesikulären Transport an die Plasmamembran.

## 2.2 Die endotheliale Glykokalyx

Die endotheliale Glykokalyx ist die kohlenhydratreiche Schutzschicht des vaskulären Endothels, des Magen-Darm-Traktes, der Atmungsorgane und der Urogenitalorgane (Harn- und Geschlechtsorgane). Sie besteht aus einer Vielzahl von Glykostrukturen überwiegend Heparan-Sulfaten, Chondroitin-Sulfaten, Glypican-1 und Syndecan-1 bzw. Glycosaminoglykanen (GAGs). (Cruz-Chu et al. 2014; Frati-Munari 2013; Zeng and Tarbell 2014) Die Glykokalyx wird durch weitere lösliche Plasmakomponenten der Extrazellulärmatrix erweitert, die direkt oder über lösliche Proteoglykane und GAG miteinander verlinkt werden können. Dadurch wird ein Netzwerk aus membrangebundenen Proteoglykanen und GAGs gebildet, über das auch lösliche Moleküle eingebaut werden können. Schließlich entsteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der löslichen Molekülschicht und der Schicht mit dem zirkulierenden Blut (Abbildung 2.2.1). Dieses Gleichgewicht ist letztendlich für den Aufbau und die Dicke der endothelialen Glykokalyx verantwortlich. Die Glykokalyx des Endothels ist aufgrund ihrer ständigen Regeneration sehr dynamisch. Zudem steht der membrangebundene Anteil ständig in Kontakt mit löslichen Glykokalyx-Bestandteilen, die ebenfalls andocken und wieder ausgetauscht werden, sodass es keine Grenze zwischen lokal synthetisierten und assoziierten Elementen gibt. (Reitsma et al. 2007) Aus diesem Grund ist es schwierig, die Glykokalyx geometrisch zu definieren. Sie ist demnach mit einem Korallenriff vergleichbar, denn an ihr sind zahlreiche Strukturen gebunden, die sich gegen die (Blut-)Strömung stemmen und dabei Moleküle filtrieren können. (Chappell et al. 2008) Sie kleiden das gesamte Blut-Gefäß aus. *In vivo* Experimente haben bisher gezeigt, dass die endotheliale Glykokalyx in muskulären Kapillaren eine Dicke von ungefähr 0,5  $\mu\text{m}$  (Vink and Duling 1996) in Arterien 2 bis 3  $\mu\text{m}$  (van Haaren et al. 2003) und in den großen Arterien, wie der Aorta, sogar 4,5  $\mu\text{m}$  (Megens R.T.A 2007) besitzen kann. Neben der Filter- und Barrierefunktion (Lipowsky 2012) werden der endothelialen Glykokalyx weitere physiologische Funktionen zugeschrieben. Sie gehört zusammen mit den Plasmaproteinen zur Oberflächenschicht der Blutgefäße (engl. *endothelial surface layer*, ESL) (Fu and Tarbell 2013; Pries et al. 2000b) Je dünner diese Schicht ist, desto mehr steigt die Permeabilität der Gefäßwand, d.h. umso poröser wird sie. Es wird auch davon ausgegangen, dass die Glykokalyx physiologisch und pathophysiologisch für zahlreiche Krankheiten wie Hyperglykämie (Überzucker) (Nieuwdorp et al. 2006), septischer Schock (Nelson et al. 2008), Arteriosklerose (Nieuwdorp et al. 2005) und Ischämie/Reperfusion (Rehm et al. 2007; van Golen et al. 2013) eine zentrale Rolle spielt. (Chappell et al. 2008) Jedoch ist diese Zuckerschicht, die bereits 1966 elektronenmikroskopisch von Luft nachgewiesen wurde, schwierig zu markieren. (Luft 1966) Ein Grund dafür ist, dass für die Elektronenmikroskopie das zu untersuchende Gewebe fixiert werden muss.



**Abbildung 2.2.1| Schematischer Aufbau der endothelialen Glykokalyx.** Auf der linken Seite ist die endotheliale Glykokalyx auf der luminalen Seite des vaskulären Endothels gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Komponenten der endothelialen Glykokalyx dargestellt. Sowohl Proteoglykane mit ihren langen unverzweigten Glykosaminoglykan-Seitenketten (GAG-Seitenketten), als auch Glykoproteine mit ihren kurzen verzweigten kohlenhydrathaltigen Seitenketten sind fest mit den Endothelzellen verankert. An diese Kohlenhydrate sind weitere gelöste Komponenten, wie lösliche Proteoglykane, Hyaluronsäuren und zahlreiche andere Proteine (z.B. Enzyme wie die extrazelluläre Superoxid Dismutasen (ec-SOD) oder Blutgerinnungshemmstoffe wie Antithrombin III (AT III)), angelagert. Zusammen bilden sie die endotheliale Glykokalyx, die als Barriere zwischen Blutgefäßen und Endothelzellen fungiert. (Reitsma et al. 2007)

Allerdings ist die Glykokalyx sehr empfindlich und kann durch diesen Prozess vollständig zerstört werden. Ebenso kann eine zu hohe und lange Laserintensität die Schichtdicke der Glykokalyx stark herabsetzen. Daher bedarf es noch vieler Untersuchungen bezüglich der Visualisierung der endothelialen Glykokalyx. Zudem besteht noch deutlicher Aufklärungsbedarf hinsichtlich des Aufbaus und aller Funktionen. Dennoch ist bereits bekannt, dass die Glykokalyx ein wichtiger Faktor in der vaskulären Physiologie und Pathologie ist. (Fрати-Munari 2013; Pries et al. 2000a; Yang and Schmidt 2014)

## 2.3 Zusammensetzung der Glykokalyx

### 2.3.1 Glykoproteine

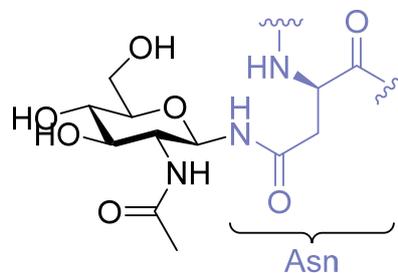
Die überwiegenden Bestandteile der Glykokalyx sind Glykoproteine. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass Glykoproteine für die zelluläre Immunität eine große Rolle spielen. Ein Beispiel ist hier das  $\alpha$ -1-saure Glykoprotein (engl.  *$\alpha$ -1-acid glycoprotein*, AGP), das in der Leber als Immunantwort einer Entzündung oder Infektion gebildet wird. Es ist ein Protein aus 183 Aminosäuren mit fünf N-gebundenen Glykanen, die 45% der Gesamtmasse von 43 kDa ausmachen. (Fournier et al. 2000) Auch bei der Bildung und Entwicklung des zentralen Nervensystems (engl. *central nervous system*, ZNS) bilden Glykoproteine ein wichtiges Fundament. Die meisten Glykoproteine können sowohl als membrangebundene Glykoproteine, wie beispielsweise Kanalproteine oder Rezeptoren, als auch in gelöster Form, wie beispielsweise als Transport-



proteine oder Serumproteine, vorliegen. Im Organismus werden Glykoproteinen zahlreiche Funktionen zugeschrieben. Sie dienen zum einen als Wechselwirkungspartner in Zell-Zellerkennungsprozessen und zum anderen sind sie für die Kommunikation der Zelle mit deren Umgebung verantwortlich. Zusätzlich zu den integralen Glykoproteinen können weitere Glykoproteine an die Zellmembran adsorbieren, die wiederum untereinander vernetzt sein können. Glykoproteine sind aus einem Protein und einer oder mehrerer kovalent aneinander gebundenen Kohlenhydratverbindung (Monosaccharide, Disaccharide oder Polysaccharide) aufgebaut. Die meisten Glykoproteine lassen sich in drei Gruppen unterteilen: i) die *N*-gebundenen Glykane, die durch eine  $\beta$ -*N*-glykosidische Bindung an eine Polypeptidkette anknüpfen, ii) die *O*-gebundenen Glykane, die über eine  $\alpha$ -*O*-glykosidische Bindung an eine Polypeptidkette gebunden sind und iii) Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Membran-Anker, die über eine Amid-Gruppe zwischen dem Mannose-6-Phosphoethanolamin und dem terminalen C-Atom der Carboxylgruppe an eine Polypeptidkette gebunden ist. Dabei werden die Kohlenhydrat-Gruppen kovalent an Asparagin (Asn)-, Serin (Ser)-, Threonin (Thr)- oder Hydroxylysinreste gebunden. Die Länge der gebundenen Kohlenhydrate kann dabei stark variieren. (Lange et al. ; Marti et al. 1988)

### 2.3.1.1 *N*-Glykane

Bei einer *N*-Glykosylierung (Zhang et al. 2004) ist ein Glykan direkt an den Asn-Rest der Proteinsequenz -Asn-X-Ser/Thr- gebunden, wobei X eine Aminosäure ist. (Abbildung 2.3.1).

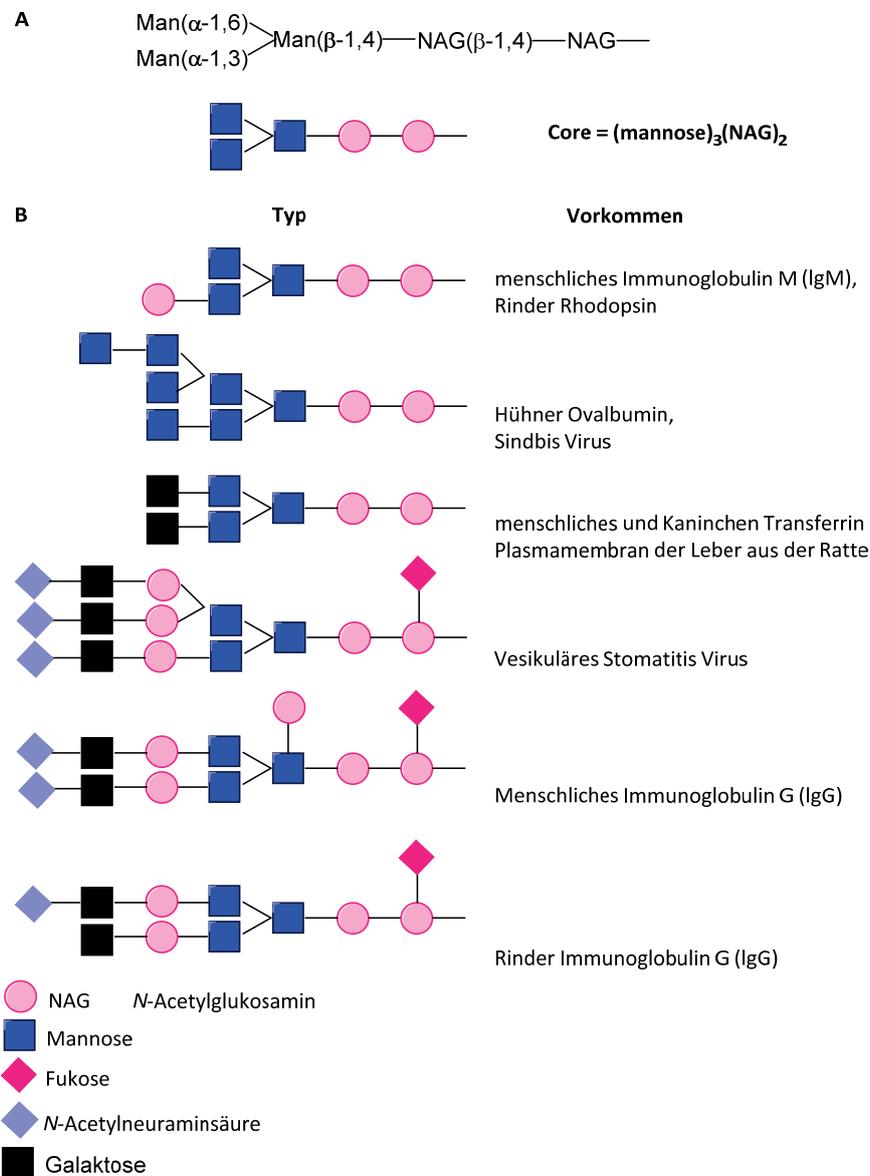


**Abbildung 2.3.1| *N*-gebundenes Glykan (*N*-Acetylglucosamin, *N*-gebundenes GlcNAc).** Bei einem *N*-gebundenen GlcNAc assoziiert ein Glucosamin an einem Asparagin(Asn)-Rest der Proteinsequenz -Asn-X-Ser/Thr-. Dabei ist X eine beliebige Aminosäure (mit Ausnahme von Prolin).

Bei einem klassischen Glykoprotein besteht die Grundstruktur (*core*) aus zwei *N*-Acetylglucosamin- und drei Mannose-Einheiten (Abbildung 2.3.2). An die terminale Mannose-Sequenz können weitere Oligosaccharidketten, auch Antennen genannt, gebunden sein. *N*-gebundene Glykoproteine werden in vier Schritten synthetisiert: 1. Synthese des lipidgebundenen Kohlenstoffvorläufers Dolicholphosphat, 2. Transfer der Dolicholphosphatkette an eine *N*-gebundene Polypeptidseite des Asn-Restes, 3. Entfernen einiger Zuckervorläufer und 4. die Addition der dabei entstandenen Zucker-Ketten an den „Core“. Die Glykosylierung der Proteine findet im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und im Golgi Apparat statt. (Berg et al. 2007) Synthetisiert werden die *N*-Glykane im RER. Verantwortlich für den Aufbau der

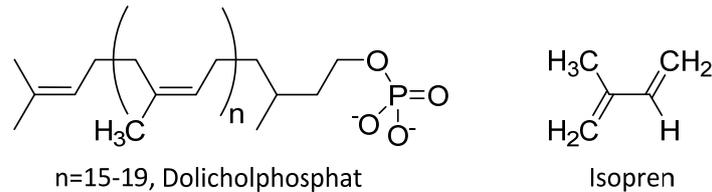


Glykoproteine ist Dolicholphosphat, ein in der ER-Membran lokalisiertes Lipidmolekül bestehend aus mindestens 20 Isopren-(C<sub>5</sub>-)Einheiten (Abbildung 2.3.3).



**Abbildung 2.3.2| N-gebundene Oligosaccharide.** **A**, Kernstruktur (*Core*) des *N*-gebundenen Glykans, (mannose)<sub>3</sub>(NAG)<sub>2</sub>. Jedes *N*-gebundene Glykoprotein besitzt ein Pentasaccharid-*Core*. Dieser *Core* dient als Grundstruktur für zahlreiche *N*-gebundenen Glykoproteine. **B**, Einige Beispiele zu *N*-gebundenen Oligosacchariden. (Berg et al. 2007; Dorland et al. 1981; Voet and Voet 2004)

Dolicholphosphat fixiert wachsende Saccharidketten an der RER-Membran. Vor dem Transport zum Golgi Apparat wird Dolicholphosphat hydrolysiert. Dabei entsteht Dolicholmonophosphat, an das zwei *N*-Acetylglukosamineinheiten (UDP-aktiviert) und fünf Mannoseeinheiten (GDP-aktiviert) angehängt werden. Außerdem gibt es für jede Zuckereinheit an die Kette eine Monosaccharid-spezifische Glykosyltransferase. Anschließend kommt es zur Translokation des dabei entstandenen Dolichol-PP-Oligosaccharids von der zytosolischen Seite in das Lumen des ERs. (Berg et al. 2007)

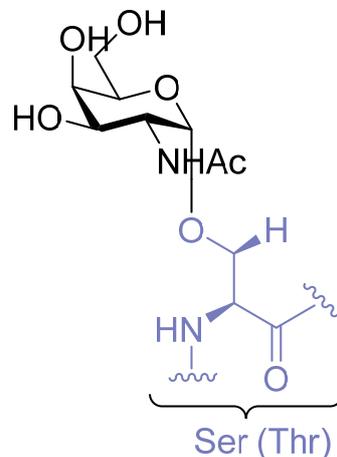


**Abbildung 2.3.3| Dolicholphosphat.** Die terminale Phosphatgruppe ist die Bindungsstelle des aktivierten Oligosaccharids, die anschließend auf einen Asn-Rest der Polypeptidkette übertragen wird.

Dadurch werden auch neue an Dolicholmonophosphat gebundene Zucker ins Lumen des ERs transportiert, sodass die Zuckeraddition im Lumen des ERs fortgesetzt werden kann. Nach der korrekten Faltung des Glykoproteins wird eine Mannoseeinheit über eine  $\alpha$ -1,2-Mannosidase entfernt und das Glykoprotein wird in einem vesikulären Transport zum Golgi Apparat transportiert. Die Glykoproteine werden im Golgi Apparat mit *N*-Acetylglukosaminphosphatresten versehen. Die fertig synthetisierten Glykoproteine werden dann an die Zelloberfläche exozytiert, wo sie schließlich am Aufbau der Glykokalyx beteiligt sind. (Voet and Voet 2004)

### 2.3.1.2 O- Glykane

Bei einem O-gebundenen Glykan wird ein Glukosamin an die Hydroxyl(OH-)-Gruppe von Ser- oder Thr-Resten gekuppelt (Abbildung 2.3.4). Die O-Glykosylierung findet ausschließlich im Golgi Apparat statt. Dabei gilt der Golgi Apparat als Sortierungszentrum von Glykoproteinen zur Plasmamembran und den Lysosomen. Ein Fehler während der Glykosylierung kann zu Stoffwechselkrankheiten führen. Eine genaue Funktion und Anheftung der Kohlenhydrate an die Proteine ist besonders wichtig für deren Stabilität, Verarbeitung und Zielsteuerung (*targeting*). Demnach ist die richtige Modifikation von Proteinen durch Kohlenhydrate sehr wichtig. So ist beispielsweise die Muskeldystrophie, bekannter unter dem Namen CDG-Syndrom (*congenital disorders of glycosylation*, angeborene Erkrankung der Glykosylierung) auf unzureichende Glykosylierung von Membranproteinen zurückzuführen. (Jaeken and Matthijs 2007; Lehle et al. 2006; Morava et al. 2008)

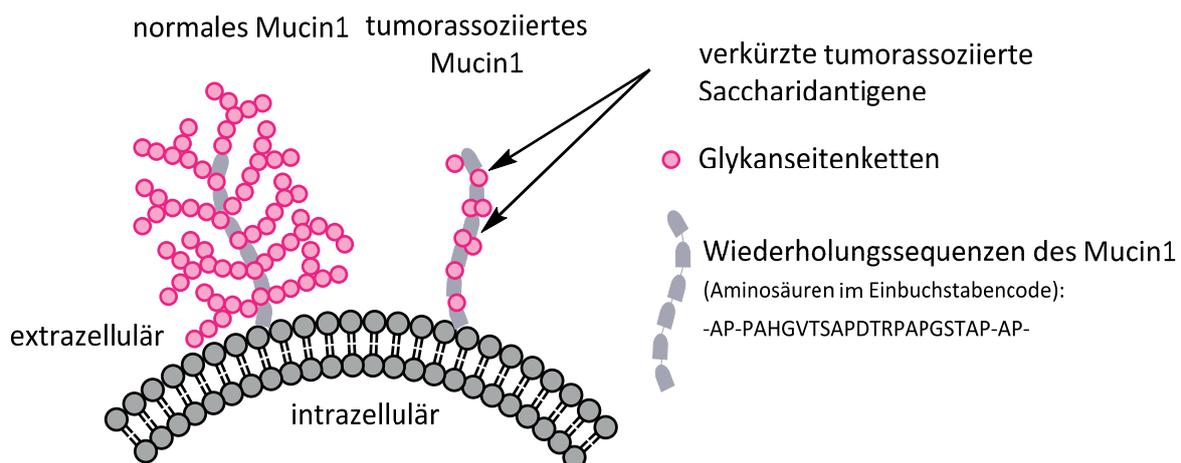


**Abbildung 2.3.4| O-gebundenes Glykan (O-Acetylgalaktosamin, O-gebundenes GalNAc).** Bei O-gebundenen GalNAc wird ein Glukosamin an die Hydroxyl(OH-)-Gruppe von Ser bzw. Thr angelagert.



### 2.3.1.3 Mucin1

Bereits 1890 konnte Emil von Behring (Nobelpreis für Physiologie und Medizin 1901) zeigen, dass kranke Zellen vom Organismus selbst produzierende, endogene Moleküle, wie Glykolipide, Glykoproteine und Proteine, tragen, die wiederum nur schwach immunogen sind, sodass der Organismus gegenüber dieser Art der Zuckerstrukturen eine natürliche Toleranz aufweist. (Kunz et al. 2012) 83 Jahre später hat Springer et al. festgestellt, dass sich die Membran von Glykoproteinen von normalen Epithelzellen und epithelialen Tumorzellen unterscheiden. (Springer 1984) Verantwortlich dafür sind die Kohlenhydratseitenketten. Im Fokus steht vor allem das in die äußere Zellmembran verankerte Glykoprotein Mucin1. Mucin1 gehört zu den Glykoproteinen, dass in der äußeren Zellmembran verankert ist. Aufgrund seiner hohen Glykosylierung kann das Mucin1 weit in den extrazellulären Raum hinausragen und deckt an den Stellen das Proteinrückgrat vollständig ab (Abbildung 2.3.5). (Linden et al. 2008) Im Vergleich dazu sind die Kohlenhydratseitenketten epithelialer Tumorzellen häufig sehr viel kürzer und liegen in sialylierter Form vor. Diese Kohlenhydratseitenketten werden somit als tumorassoziierte Kohlenhydratantigene bezeichnet. Die kurzen Saccharidseitenketten sind  $\alpha$ -glykosidisch an Ser oder Thr geknüpft und gelten als assoziierte Kohlenhydratantigene. Mucin1 wird auf fast allen Epithelzellen exprimiert, dazu zählen beispielsweise Epithelzellen der Brust, der Prostata, des Dickdarms und des Pankreas. Auf den epithelialen Tumorzellen ist Mucin1 jedoch stark überexprimiert und wird daher als Tumormarker eingesetzt. (Hanisch and MÄ¼ller 2000; Singh and Bandyopadhyay 2007a) Der extrazelluläre Teil des Mucin1 besteht aus Wiederholungssequenzen, sogenannten „*Tandem Repeats*“, bestehend aus fünf potenziellen O-Glykosylierungsstellen, drei Threonin- und zwei Serin-Resten. (Singh and Bandyopadhyay 2007b)



**Abbildung 2.3.5| Normales und tumorassoziiertes Mucin1 auf Epithelzellen.** Zu sehen ist das Mucin1 Membranglykoproteingerüst. Auf normalen Epithelzellen ragen die Glykanseitenketten weit in den extrazellulären Raum hinaus, währenddessen die Kohlenhydratseitenketten auf Tumorzellen verkürzt vorliegen. (Kunz et al. 2012)

Aufgrund der Größe (300-400 kDa) und der negativen Ladungen an der Zelloberfläche verhindert es die Adhäsion anderer Zellen und Mikroorganismen an Epithelzellen. Da es sogar die Mikrovilli (Ausstülpung der Zelloberfläche) überragt, verhindert



Mucin1, dass Bakterien an die äußeren Epithelzellwände gelangen. Studien haben jedoch gezeigt, dass Mucin1 von Tumorzellen zur Immunisierung weniger spezifisch eingesetzt werden kann, da auf jedem Proteinstrang von tumorassoziiertem Mucin1 sowohl kurze, als auch lange Kohlenhydratseitenketten abwechselnd verankert sind. Demnach lassen sich reine tumortypische Glykoproteinstrukturen nicht isolieren. (Kunz et al. 2012; Prof. Dr. Horst Kunz 2012) In den vergangenen Jahren gewann das Mucin1 immer mehr an Bedeutung, da es vor allem für eine Immundifferenzierung zwischen Normal- und Tumorzellen einsetzbar ist.

### 2.3.2 Proteoglykane

Neben den klassischen Glykoproteinen bilden die Proteoglykane eine wichtige Klasse der Glykostrukturen, die bei der Zellerkennung eine Rolle spielen. Dabei aggregieren Proteine und Glykosaminoglykane (GAG) sowohl kovalent als auch nicht kovalent miteinander. (Hacker et al. 2005) Sie sind ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix als auch der Zelloberfläche und bilden zusammen mit den Glykoproteinen und Glykolipiden die Glykokalyx. (Reitsma S. 2007) Dabei bilden sie große Komplexe zu anderen Proteoglykanen, zu Hyaluronsäure und zu Faserproteinen, wie beispielsweise Kollagen. Sie spielen auch eine Rolle bei der Bewegung von Molekülen durch die extrazelluläre Matrix. Dadurch können sie die Aktivität und Stabilität von Proteinen in der Matrix beeinflussen. Somit werden Proteoglykanen zahlreiche Funktionen zugeschrieben: i) zum einen sind sie an der Gewebsbildung, ii) an der Filterfunktion (Sortierung der Moleküle nach Größe und Polarität) und iii) an der Regulierung der Proteinaktivierung beteiligt. Folglich bilden sie große Komplexe. Sie bestehen aus einem zentralen, Zellmembran-durchspannenden oder Lipid-gebundenen Proteinrückgrat und einer oder mehreren linearen Zuckerketten, den sogenannten Glykosaminoglykanen. Diese Glykosaminoglykane setzen sich aus bis zu 1000 repetitiven Disaccharideinheiten (bis zu 50.000 bei Hyaluronsäuren) zusammen, die im Allgemeinen aus einer Uronsäure und einem sulfatierten Aminosucker (Glykosamin) bestehen. Anhand der Zusammensetzung ihres Disaccharids unterscheidet man zwischen Heparin und Heparan-Sulfat- (HS), Chondroitin-Sulfat- (CS), Dermatan-Sulfat- (DS), sowie Keratan-Sulfat- (KS) Proteoglykanen. (Grobe et al. 2002) Im Fall der Heparan-Sulfat-Proteoglykane bestehen diese Zuckerreste aus negativ geladenen *N*-acetylierten/*N*-sulfatierten Glukosamin- und D-Glucuronsäure- oder ihren C5-epimeren L-Iduronsäure-Resten. Aufgrund der Carboxylat- und Sulfatgruppen sind sowohl die Glykosaminoglykane als auch die durch sie modifizierten Proteoglykane stark negativ geladen und stark hydratisiert und können elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Interaktionspartnern eingehen. (Reitsma et al. 2007) Dazu gehören Rezeptoren anderer Zellen (Integrine, Rezeptor-Tyrosinkinasen, etc.), Proteine und Wachstumsfaktoren (z.B. *fibroblast growth factor* (FGF)), Signalmoleküle (Wnt, Hedgehog etc.), Chemokine, Enzyme (z.B. Lipasen) und andere Moleküle, die den Metabolismus der Zellen, den Transport von Wirkstoffen und auch den Informationstransfer innerhalb der Zelle beeinflussen. Proteoglykane sind maßgeblich an der Regulation der Zellmigration und Adhäsion sowie Signalmolekül-(Morphogen)-Gradienten beteiligt, die



während der Entwicklung von vielzelligen Lebewesen eine wichtige Rolle spielen. So wird z.B. die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Nervenzellen in der frühen Entwicklungsphase des Nervensystems durch die Interaktion des Wachstumsfaktors FGF-1 mit einem spezifischen Heparan-Sulfat gesteuert, während in der späteren Entwicklungsphase die FGF-2 Bindung an einer anderen Heparan-Sulfat-Modifikation entscheidend ist. Heparan-Sulfate bilden außerdem große Komplexe sowohl mit anderen Proteoglykanen als auch mit sekretierten Zuckerstrukturen wie der Hyaluronsäure, Heparin, sowie mit Faserproteinen wie dem Kollagen und bilden damit die extrazelluläre Matrix, die die Stabilität von Organen ermöglicht. Sie sind außerdem an der Bindung von kleinen kationischen Molekülspezies beteiligt und regulieren durch die Einlagerung von Wasser die Bewegung von kleinen Molekülen durch die Matrix. Ein wichtiger Aspekt ist daher die Erkennung von vielen therapeutischen Wirkstoffen und Transportvesikeln wie z.B. Liposomen und zellpenetrierenden Peptiden, die häufig positiv geladen sind. Dabei ist nach heutigen Erkenntnissen nur eine lineare Sequenz von 5-6 Monosacchariden für die Erkennung von anderen Bindungspartnern notwendig. Die außerordentliche Spezifität von Zellerkennungsprozessen wird daher durch die große Heterogenität der Proteoglykan-Familie begründet. Zu einer ausgeprägten Heterogenität führt sowohl die Variabilität im Ausmaß der Sulfatierung als auch der Grad der Epimerisierung der (Mono)saccharide. Befindet sich z.B. viel *L*-Iduronsäure in den Heparan-Sulfaten, so bilden sich komplexe helikale Strukturen aus. Betrachtet man allein die Proteoglykane, so bekommt man eine Diversität von über 4000 Pentasacchariden als Erkennungssequenzen (Heparin/Heparan-Sulfat = 2916, Chondroitin-Sulfat/ Dermatan-Sulfat = 999, Keratan-Sulfat = 64, Hyaluronan = 2). Zusammen mit den ca. 3000 möglichen Erkennungssequenzen von zahlreichen *N*- und *O*-Glykanen und Glykolipiden kommt man auf eine Diversität von möglichen 7000 Erkennungssequenzen im humanen Glykom, wobei diese Anzahl wahrscheinlich noch deutlich nach oben korrigiert werden muss, da verzweigte Glykostrukturen in heutigen Schätzungen nicht berücksichtigt wurden. Die Bindungsaffinitäten von Mono- bis Trisacchariden, wie sie in kleinen Glykanen vorkommen, sind gering ( $K_d = 10^{-3} - 10^{-6}$  M), wohingegen sie bei den Pentasacchariderkennungsmotiven deutlich höher sind ( $K_d = 10^{-6} - 10^{-8}$  M). Ein Proteoglykan kann auch mehr als einen Typ von Glykosaminoglykan-Ketten tragen, die bei multivalenten Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Dadurch kann es zu einer Bindungsaffinitätssteigerung um mehrere Größenordnungen durch Quervernetzungen auf der Zelloberfläche kommen, obwohl die eigentliche Bindungsaffinität der isolierten Bindungspartner *in vitro* niedrig ist. Neben den klassischen Proteoglykanen sind Sialinsäuren aufgrund ihrer enormen Strukturdiversität und ihrer exponierten Lage auf Zelloberflächen an einer Vielzahl von spezifischen Erkennungsprozessen beteiligt. Allgemein kommen Sialinsäuren in Glykoproteinen und Lipiden, den sogenannten Glykosphingolipiden, als terminale Zucker vor. Sie sind gewöhnlich als Monomere über  $\alpha$ -2,3- oder  $\alpha$ -2,6-glykosidische Bindungen an Galaktose, *N*-Acetylgalaktosamin oder *N*-Acetylglukosamin gebunden. (Iozzo 1998)



**Tabelle 2.3.1| Die Länge der Kernproteine (Core proteins) einiger Proteoglykane.**(Iozzo 1998; Voet and Voet 2004)

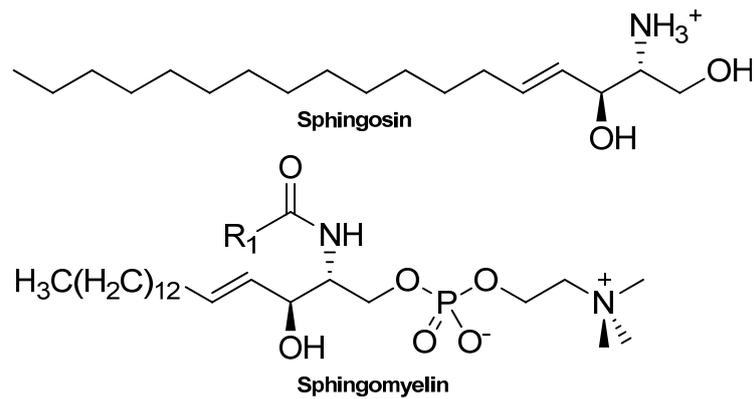
Proteoglykan	Länge des Kernproteins Molekulare Masse (kD)	Glykosaminoglykan
Proteoglykane, die mit der Hyaluronsäure wechselwirken		
<b>Aggrekan</b>	<b>220</b>	<b>CS (ca. 100), KS (ca. 30)</b>
<b>Versikan</b>	<b>265-370</b>	<b>CS/DS (10-30)</b>
<b>Neurokan</b>	<b>136</b>	<b>CS (3-7)</b>
Proteoglykane der Basallamina		
<b>Perlekan</b>	<b>400-467</b>	<b>Heparin/CS (3)</b>
<b>Agrin</b>	<b>250</b>	<b>Heparin (3)</b>
<b>Bamakan</b>	<b>138</b>	<b>CS (3)</b>
Kleine Leucin-reiche Proteoglykane		
<b>Dekorin</b>	<b>40</b>	<b>DS/CS (1)</b>
<b>Fibromodulin</b>	<b>42</b>	<b>KS (2-3)</b>
<b>Osteoglycin</b>	<b>35</b>	<b>KS (2-3)</b>

\*Abkürzungen: CS=Chondroitin-Sulfat; DS=Dermatan-Sulfat; KS=Keratan-Sulfat

Darüber hinaus gibt es auch terminal polysialylierte bzw. *N*-Glykanstrukturen. Polysialinsäure (PSA) ist der Sammelbegriff für Homo- und Heteropolymere aus mehr als 200 Sialinsäuren, deren Heterogenität aus der Kombination aus hauptsächlich drei Sialinsäuren (*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), *N*-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc) und Ketodesoxyonulosonsäure (KDN)), die jeweils *O*-acetyliert oder *O*-lactyliert vorliegen können, besteht. Physikochemische Analysen haben ergeben, dass Polysialinsäuren in Lösung in helikaler Form, ähnlich wie Stärke oder Glykogen, mit ca. neun Monomeren pro Windung vorliegen. Dabei gehen die Sialinsäuren untereinander  $\alpha$ -2,8- oder  $\alpha$ -2,9-glykosidische Verknüpfungen ein. Polysialinsäuren sind wegen ihrer enormen Polymerisationsgrade sehr große Moleküle. Durch ihre multiplen negativen Ladungen sind sie stark hydrophile Moleküle, deren Raumanspruch durch die Hydrathülle noch erhöht wird. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Polysialinsäuren in der Lage, Zell-Zell-Interaktionen zu beeinflussen. In der Tabelle 2.3.1 sind die Kernproteine einiger Proteoglykane abgebildet (Tabelle 2.3.1).(Voet and Voet 2004)

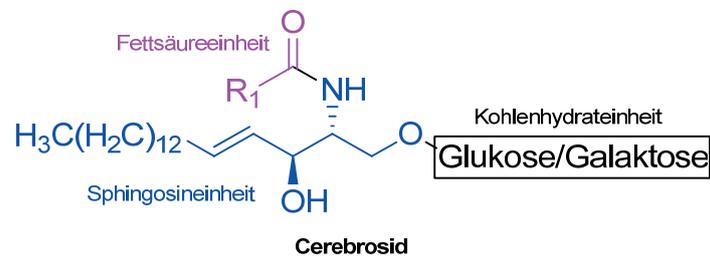
### 2.3.3 Glykolipide

Neben den proteingebundenen Glykostrukturen gibt es noch die lipidgebundenen Glykostrukturen, die ebenfalls in der Zellerkennung eine wichtige Rolle spielen. Glykolipide gehören zur Familie der Membranlipide. Sie leiten sich von Sphingosin oder Sphingomyelin ab (Abbildung 2.3.6) Dabei ist die Aminogruppe des Sphingosin- oder Sphingomyelingerundgerüsts mit einer Fettsäure acyliert. In Glykolipiden sind demnach ein oder mehrere Kohlenhydrateinheiten mit diesem Sphingosin- grundgerüst verankert (Abbildung 2.3.6).



**Abbildung 2.3.6| Die Strukturen von Sphingosin und Sphingomyelin.**

Die einfachsten Glykolipide mit nur einem Kohlenhydratrest sind die Cerebroside (Abbildung 2.3.7).



**Abbildung 2.3.7| Struktur des Cerebroside.** Das Cerebroside ist das einfachste Glykolipid bestehend aus nur einer Kohlenhydrateinheit.

Auch kurzen sialinsäurehaltigen Glykostrukturen wie den Glykosphingolipiden bzw. den Gangliosiden werden Zellerkennungsprozesse zugeordnet. Dieser Oligosaccharidanteil wird auf der Außenseite der Zellmembran präsentiert, wo er für biologische Prozesse wie Zell-Adhäsion oder Zell-Zell-Interaktionen von Bedeutung ist. Ganglioside finden sich vor allem in den Zellmembranen des zentralen Nervensystems. Sialinsäuren sind hier z.B. Bestandteil der sogenannten Sialyl-LewisX-Struktur, eines Tetrasaccharids, das nicht nur für die eigentliche Zellerkennung von z.B. Toxinen und Viren, sondern auch für verschiedene Signaltransduktionsprozesse von Bedeutung ist. Dabei ist noch zu erwähnen, dass Glykolipide asymmetrisch in der Membran angeordnet sind und sich immer auf der extrazellulären Seite der Zellmembran befinden. In wässrigen Medien liegen Glykolipide bevorzugt in der Lipiddoppelschicht vor. Der Grund dafür ist, dass die Fettsäureeinheiten zu sperrig sind, um sich als Mizelle anzuordnen. Es gibt auch GPI-Anker (Glykosylphosphatidylinositol-Anker), die eine Brücke zwischen Membran und Proteine bilden. Ihre Hauptaufgabe ist es, Glykoproteine der Zelloberfläche an der Außenseite der Plasmamembran fest zu verankern, die sonst nicht in der Membran sitzen. Glykolipide und viele Membranproteine bilden in der Membran keine starren, statischen Strukturen. Vielmehr sind sie permanent in lateraler Bewegung. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie lassen sich die schnellen lateralen Bewegungen der Glykolipide nachweisen. (Berg et al. 2007; Im et al. 2013)



## 2.4 Die Charakterisierung der Glykanstrukturen auf der Zelloberfläche

### 2.4.1 Darstellungsmethoden der Glykokalyx

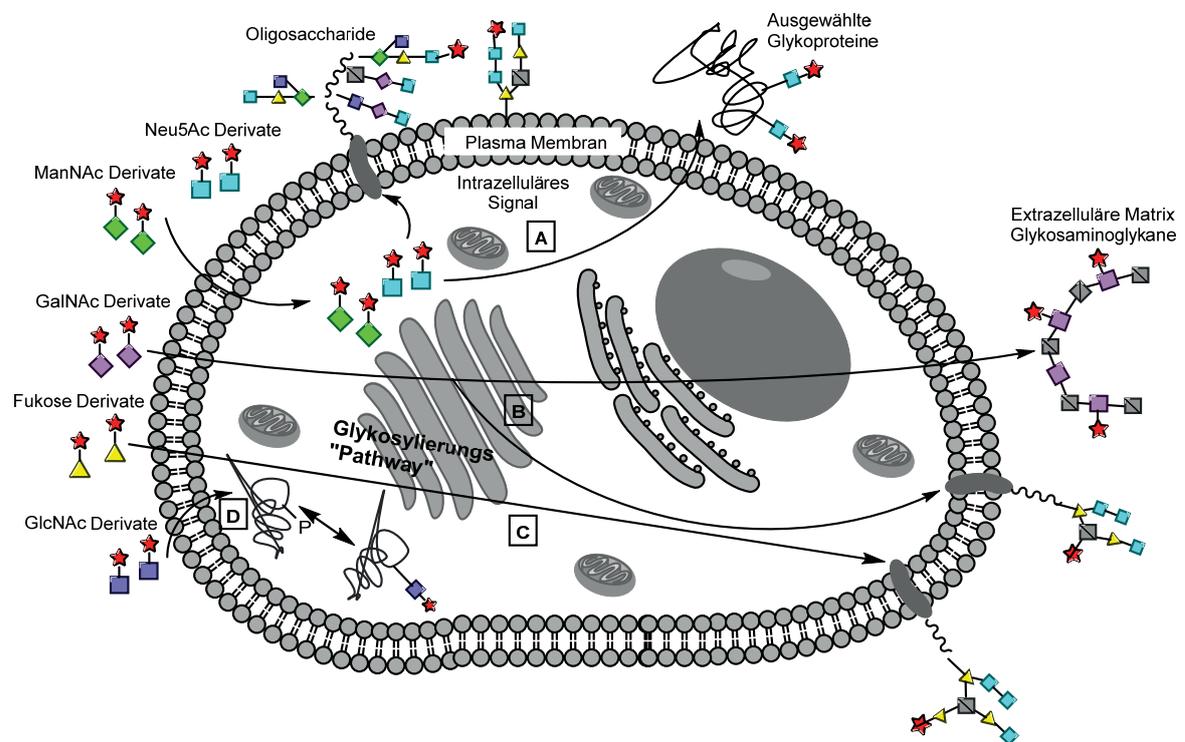
Wie bereits oben schon erwähnt ist die Glykokalyx sehr empfindlich gegenüber zahlreichen Markierungsversuchen. So konnte die Glykokalyx mit Hilfe der Elektronenmikroskopie visualisiert werden.(Ebong et al. 2011; Hladik 1966; Marsh and Waugh 2013) Ein besonderes Merkmal der Glykokalyx ist, dass sie je nach Zellart und/oder Gewebetyp eine unterschiedliche Dicke aufweist.(Rambourg and Leblond 1967) So haben Adamson und Clough 1991 bereits gezeigt, dass die endotheliale Glykokalyx mit Hilfe eines quantitativen Markers, dem kationischen Ferritin, markiert werden kann.(Beeman et al. 2013) Dabei kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen des kationischen Ferritins mit der negativ-geladenen Glykokalyx (z.B. den Sialinsäuren und Glykosaminoglykanen) der Zelloberfläche. Die Masse des Ferritinmarkers erhöht schließlich den Kontrast in der elektronenmikroskopischen Untersuchung, sodass die Dicke der Glykokalyx dargestellt werden kann. Des Weiteren kann die Glykokalyx bereits lichtmikroskopisch mit einer PAS-Färbung detektiert werden. PAS ist die englische Abkürzung für *periodic acid Schiff reaction*, bei der kohlenhydrathaltige Komponenten mit Periodsäure und Schiff-Reagenz angefärbt werden können.(Zeng et al. 2009) Trotz allem wird noch immer nach einer Methode geforscht, die es ermöglicht, die Glykokalyx *in vivo* zu markieren ohne deren Topologie und Funktion zu zerstören. Neben dieser Mikroskopiemethode und den bereits erwähnten Elektronenmikroskopie-basierten Charakterisierungsmethoden wurden bereits zahlreiche Technologien entwickelt, um die Zuckerstrukturen genauer zu charakterisieren, da konventionelle und biochemische Methoden zur Strukturaufklärung aufgrund der fehlenden genetischen Kodierung des Glykoms wegfallen.(Agard and Bertozzi 2009) Heutzutage werden Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht.(Haslam et al. 2006; Kondo et al. 2006) Die Massenspektrometrie ist allerdings sehr aufwendig. Daher werden seit einigen Jahren neue Methoden entwickelt, die einfacher zu handhaben sind. Zuckerstrukturen lassen sich bereits gut synthetisieren. Dadurch lassen sich zelluläre Glykane modifizieren und metabolisch markieren, sodass die Glykandynamik und Topologie mit Hilfe bioorthogonaler Modifikationen der Zucker rekonstruiert werden können.(Som et al. 1980)

### 2.4.2 Metabolisierung von unnatürlichen Monosacchariden

#### 2.4.2.1 Sialinsäure-Engineering

Es werden bereits zahlreiche rekombinierte Glykoproteine in der Pharmakologie und in der angewandten Medizin eingesetzt. So verändern beispielsweise Antikörper, Wachstumsfaktoren, Hormone, Impfstoffe und Kontrastmittel den natürlichen Aufbau der Glykoproteine.(Möller et al. 2012; Sinclair and Elliott 2005) Allerdings müssen diese Glykoproteine im lebenden System erst aktiviert werden. Demnach wurde das metabolische Oligosaccharid-Engineering (MOE) eingeführt (Abbildung 2.4.1), mit dessen Hilfe proteingebundene Glykane soweit verändert werden können, dass sie

zur Behandlung von zahlreichen Krankheiten einsetzbar sind. (Almaraz et al. 2012; Campbell et al. 2007) Dabei wurden von Campbell et al. unnatürliche Formen der *N*-Acetyl-glukosamine (GlcNAc), *N*-Acetyl-galaktosamine (GalNAc), Fukose und Sialinsäure in die Glykokonjugate eingebaut, die schließlich an der Zelloberfläche anhafteten. Eine beliebte funktionelle Gruppe der modifizierten Zuckervorläufer sind Ketone, Thiole und vor allem Azide. Denn durch den Einbau chemisch modifizierter Zucker in die Glykaneinheit soll versucht werden therapeutisch nutzbare Glykoproteine zu etablieren. Durch die modifizierten Zucker wird schließlich die molekulare Stabilität als auch die Aktivierung *in vivo* erhöht. Fukose, GalNAc, GlcNAc, *N*-Acetyl-mannosamin (ManNAc) und *N*-Acetyl-sialinsäure (Neu5Ac) werden schon im MOE zellulärer Glykane eingesetzt. (Kayser et al. 1992)



**Abbildung 2.4.1| Metabolisches Oligosaccharid-Engineering (MOE) zur Einführung funktioneller Gruppen an die Zelloberfläche.** Mit Hilfe der MOE lassen sich funktionelle Gruppen an die Zelloberfläche bringen. **A**, Beim Sialinsäure-Engineering werden ManNAc- und Sialinsäure-Derivate zur Einführung funktioneller Gruppen in die Glykokalyx oder in ausgewählte Glykoproteine verwendet, die nach der Einlagerung auf der extrazellulären Seite der Zelle für zahlreiche Markierungsreaktionen zur Verfügung stehen. **B**, GalNAc-Derivate können in die extrazelluläre Matrix von Glykosaminoglykanen eingebaut werden. **C**, Fukose-Derivate können dagegen fukosyl-modifizierte Glykane markieren, wohingegen **D**, GlcNAc-Derivate O-GlcNAc modifizierte Proteine markieren können.

Die häufigsten Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche sind die Sialinsäuren *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Bergfeld et al. zeigte 2012, dass Glykanstrukturen sowohl für die Stabilisierung der Zellmembran, als auch für zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den Zellen verantwortlich sind. Zum Einführen von funktionellen Gruppen beim Sialinsäure-Engineering werden vor allem ManNAc-Derivate und Sialinsäuren eingesetzt. Reuter et al. demonstrierte bereits 1992, dass unnatürliche Zuckervarianten des *N*-Acetylmannosamins



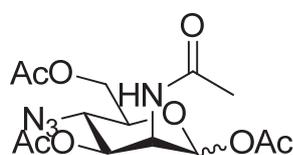
(ManNAc), bei dem der *N*-Acyl-Substituent durch eine andere funktionelle Gruppe ersetzt werden kann, als Vorläufer in der Biosynthese der Sialinsäure dienen kann. Er tauscht die Sialinsäure-Reste an der Zelloberfläche durch *N*-Propanoyl-Derivate aus und erhielt dadurch *N*-Propanoylmannosamine (ManNProp). (Kayser et al. 1992) Eine ähnliche Technik wurde eingesetzt, um einen verfrühten Abbruch der Kohlenhydratkette in den Neuronen zu induzieren. (Agard and Bertozzi 2009) Damit können neuronale Zell-Adhäsions-Moleküle (NCAM), die eine Rolle bei der Bildung der neuronalen Plastizität über Polysialinsäure (PSA) spielen, mit einem 2,8-gebundenen Sialinsäure-Rest verlinkt werden. (Durbec and Cremer 2001; Mahal et al. 2001) GalNAc-Derivate werden in die extrazelluläre Matrix (engl. *extra cellular matrix*, ECM) von Polysacchariden und in *O*-gekuppelte Glykane eingebaut. Fukose-Derivate werden zur Analyse fukosylierter Glykane eingesetzt. GlcNAc-Derivate werden schließlich zur Visualisierung *O*-GlcNAc modifizierte Proteine eingesetzt. In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 2.4.1) sind die bereits bekanntesten Monosaccharide dargestellt, die für das MOE eingesetzt werden. (Campbell et al. 2007)

**Tabelle 2.4.1| Monosaccharid-Derivate für das metabolische Oligosaccharid-Engineering (MOE).** (Campbell et al. 2007)

Struktur	Name	Substituent
	ManNAc (natürlicher Zucker)	$R^1 = -CH_3$ , $R^2 = H$
	Ac <sub>4</sub> ManNAc	$R^1 = -CH_3$ , $R^2 = -COCH_3$ (Ac)
	Prop <sub>4</sub> ManNac	$R^1 = -CH_3$ , $R^2 = -COCH_2CH_3$
	But <sub>4</sub> ManNAc	$R^1 = -CH_3$ , $R^2 = -CO(CH_2)_2CH_3$
	ManNProp	$R^1 = -CH_2CH_3$ , $R^2 = H$
	ManNBut	$R^1 = -(CH_2)_2CH_3$ , $R^2 = H$
	ManNPent	$R^1 = -(CH_2)_3CH_3$ , $R^2 = H$
	ManNHex	$R^1 = -(CH_2)_4CH_3$ , $R^2 = H$
	ManNHept	$R^1 = -(CH_2)_5CH_3$ , $R^2 = H$
	Ac <sub>4</sub> ManNLev	$R^1 = -(CH_2)_2COCH_3$ , $R^2 = Ac$
	Ac <sub>4</sub> ManNOxoHex	$R^1 = -(CH_2)_3COCH_3$ , $R^2 = Ac$
	Ac <sub>4</sub> ManNAz	$R^1 = -CH_2N_3$ , $R^2 = Ac$
	Ac <sub>5</sub> ManNGc	$R^1 = -CH_2OAc$ , $R^2 = Ac$
	Ac <sub>5</sub> ManNTGc	$R^1 = -CH_2Sac$ , $R^2 = Ac$

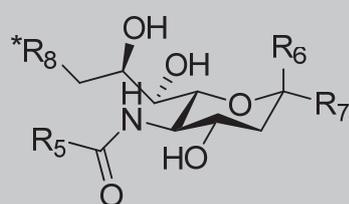


Besonderes ManNAc-Derivat  
Vorläufer der Sialinsäure Biosynthese (Sia7Az)



Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc  
(synthetisiert von Thomson und von Itzstein)(Thomson and von Itzstein 1995a)

Sialinsäure-Derivate  
Metabolische Erneuerung von Neu5Ac



Neu5Ac (Menschliche Sialinsäure)  
Neu5Gc

R<sup>5</sup>=-CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>=-OH, R<sup>7</sup>=-CO<sub>2</sub>H

Neu5Ac-Me-ester

R<sup>5</sup>=-CH<sub>2</sub>OH, R<sup>6</sup>=-OH, R<sup>7</sup>=-CO<sub>2</sub>H

Neu5Ac-Et-ester

R<sup>5</sup>=-CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>=-OH, R<sup>7</sup>=-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

5-N-fluorAc-Neu

R<sup>5</sup>=-CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>=-OH, R<sup>7</sup>=-CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

5-N-trifluorAc-Neu

R<sup>5</sup>=-CH<sub>2</sub>F, R<sup>6</sup>=-OH, R<sup>7</sup>=-CO<sub>2</sub>H

5-N-Gly-Neu

R<sup>5</sup>=-CF<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>=-OH, R<sup>7</sup>=-CO<sub>2</sub>H

5-N-Succ-Neu

R<sup>5</sup>=-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, R<sup>6</sup>=-OH, R<sup>7</sup>=-CO<sub>2</sub>H

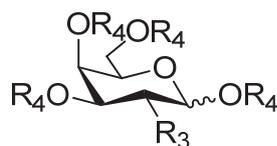
CMP-Sia-FITC

R<sup>5</sup>=-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, R<sup>6</sup>=-OH, R<sup>7</sup>=CO<sub>2</sub>H

R<sup>5</sup>=-CH<sub>2</sub>-FITC, R<sup>6</sup>=-OCMP, R<sup>7</sup>=-CO<sub>2</sub>H

\*R<sup>8</sup> = -OH

GalNAc-Derivate  
Metabolische Erneuerung von GalNAc



GalNAc  
(natürlicher Zucker)  
2-KetoGal

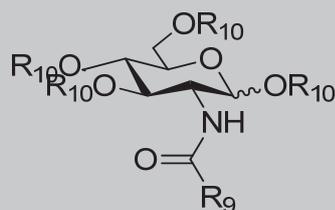
R<sup>3</sup>=-NHCOCH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>=H

Ac<sub>4</sub>GalNAz

R<sup>3</sup>=-CH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>=Ac

R<sup>3</sup>=-NHCOCH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>=Ac

GlcNA- Derivate  
Metabolische Erneuerung von O-GlcNAc



GlcNAc  
(natürlicher Zucker)  
GlcNLev

R<sup>9</sup>=-CH<sub>3</sub>, R<sup>10</sup>=H

Ac<sub>4</sub>GlcNAz

R<sup>9</sup>=-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>, R<sup>10</sup>=H

R<sup>9</sup>=-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, R<sup>10</sup>=Ac



Fukose-Derivate	Fukose	$R^{11} = -CH_3$
<b>Metabolische Erneuerung von Fukose</b>	(natürlicher Zucker)	
	6-Azidofukose	$R^{11} = -CH_2N_3$
	6-Alkynylfukose	$R^{11} = -CCH$

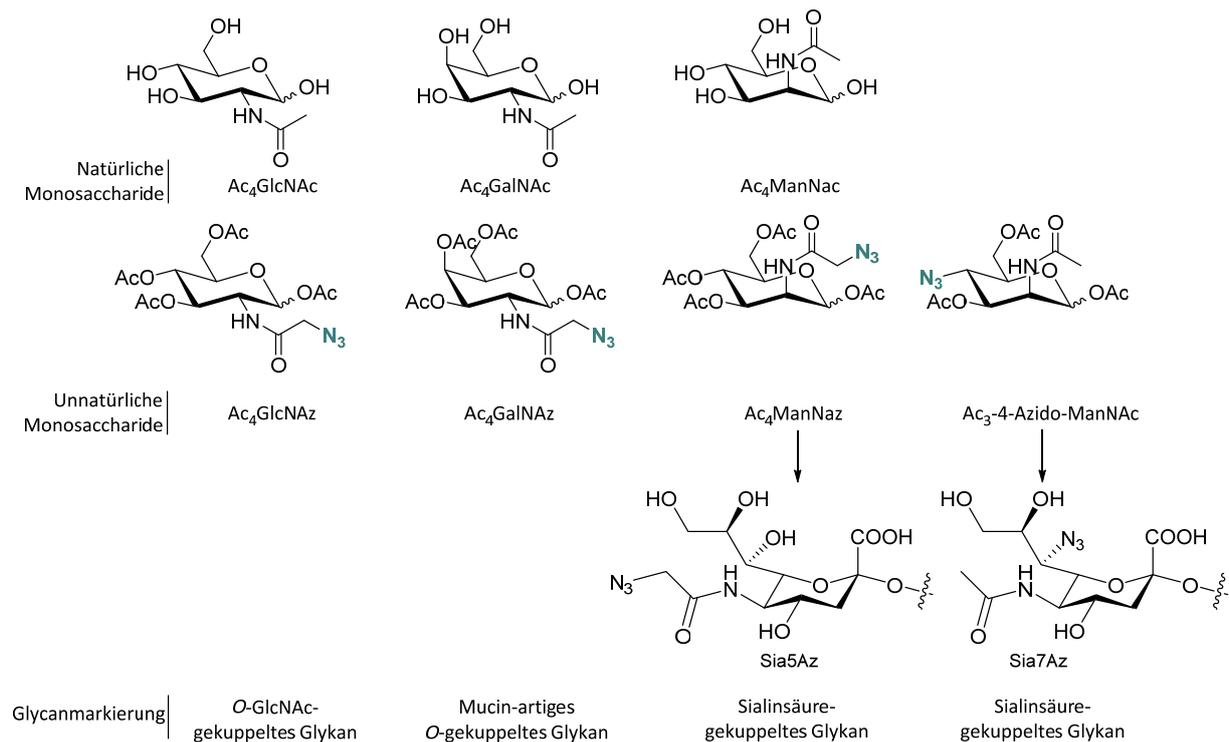
ManNAc = *N*-Acetylmannosamin, Neu5Ac = *N*-Acetylneuraminsäure, auch bekannt unter dem Namen Sialinsäure, GalNAc = *N*-Acetylgalaktosamin, GlcNAc = *N*-Acetylglucosamin, CMP = Cytidin Monophosphat und FITC = Fluorescein-Isothiocyanat.

### 2.4.2.2 Azid-/Alkin-modifizierte Monosaccharide

Wie bereits bereits in Tabelle 2.4.1 beschrieben gibt es verschiedene Möglichkeiten verschiedene derivatisierte Monosachharide in Glykostrukturen einzubauen. Um letztendlich Glykostrukturen zu markieren und zu visualisieren musste eine neue bio-orthogonale Markierungsstrategie entwickelt werden. In früheren Arbeiten vor allem von Bertozzi und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass einige natürliche Zuckerreste *in vivo* durch die entsprechenden Alkin- oder Azidozucker wie z.B. Azidoglucosamin ersetzt werden, ohne die Integrität von Zellen zu verändern. Eine metabolisch tolerierte Derivatisierungsreaktion stellt dabei die Kupfer-katalysierte (CuAAC) bzw. Kupfer-freie *Strain-promoted* Alkin-Azid 1,3-dipolare Cyloaddition (SPAAC) bzw. die Staudinger-Ligation an Azid-modifizierten Zuckern dar. Diese bio-orthogonalen Reaktionen können genutzt werden, um die metabolisierten Azido- bzw. Alkinzucker mit Fluorophoren und anderen Ankern zu markieren. In Abhängigkeit der Inkubationszeiten und Konzentration der synthetisierten Monosaccharide werden in erster Linie nur die neu synthetisierten Glykane markiert und nicht das gesamte Glykom.

unnatürliche Monosaccharide	Ac <sub>4</sub> GlcNAz	Ac <sub>4</sub> GalNAz	Ac <sub>4</sub> ManNAz	Ac <sub>3</sub> -4-Azido-ManNAc
Glykanmarkierung	O-GlcNAc-gekuppelte Glykane	Mucin-artige O-gekuppelte Glykane	Sialinsäure-gekuppelte Glykane	Sialinsäure-gekuppelte Glykane

**Abbildung 2.4.2] Peracetylierte modifizierte Monosaccharide zur bioorthogonalen Markierung von Glykanen der Glykokalyx.** Ac<sub>4</sub>GlcNAz = peracetyliertes *N*-Acetyl-azidoglucosamin, Ac<sub>4</sub>GalNAz = peracetyliertes *N*-Acetyl-azidogalaktosamin, Ac<sub>4</sub>ManNAz = peracetyliertes *N*-Acetyl-azidomannosamin (Laughlin et al. 2006) und Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc = *N*-Acetyl-4-azido-4-desoxymannosamin.



**Abbildung 2.4.3| Natürliche und unnatürlich modifizierte Zucker und deren Glykan Markierung.** Auf der rechten Seite dieser Abbildung ist die Umwandlung von einem C4-modifizierten Ac<sub>3-4</sub>-Azido-ManNAc in C7-modifizierte Sialinsäure (Sia7Az) gezeigt.

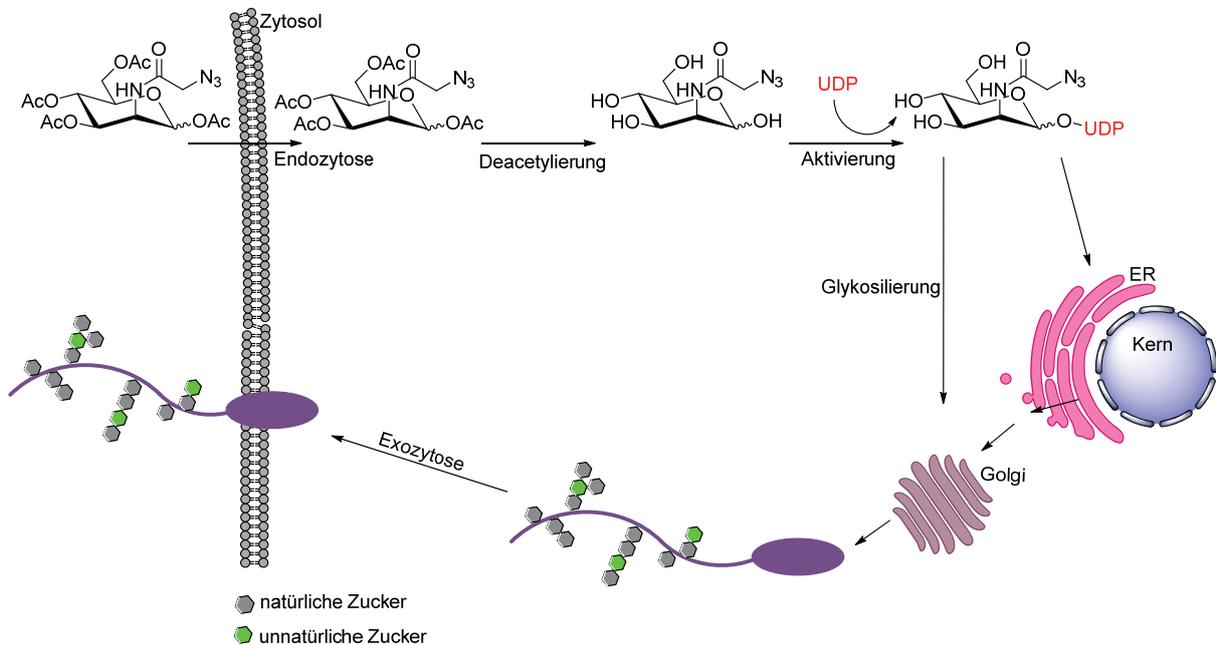
Diese Technik erlaubt daher auch sequentielle Markierungen über die Zeit. Im ersten Schritt werden Glykoproteine lebender Zellen bzw. Organismen mit Hilfe synthetisierten, Azid-funktionalisierten Monosacchariden (peracetylierte Azidozucker) markiert. (Abbildung 2.4.2) Im zweiten Schritt werden die Glykane, die über ein Proteingerüst mit der Zellmembran verankert sind, kovalent an bioorthogonale Fluorophore gebunden und visualisiert. Da die sequentielle Markierung der verschiedenen Zuckerbausteine an lebenden Zellen durchgeführt werden kann, ohne eine genetische Manipulation von Zellen vorzunehmen, können nicht nur proliferierende, sondern auch stark differenzierte Zellen und Modellorganismen wie z.B. Zebrafisch und *Xenopus* mit Hilfe verschiedener lichtoptischer Mikroskopieverfahren untersucht werden. Hinzu kommt vor allem ein C4-modifiziertes ManNAc-Derivat, das Ac<sub>3-4</sub>-Azido-ManNAc (*N*-Acetyl-4-azido-4-desoxymannosamin), das neu syntetisiert wurde, indem die Azido-Gruppe auf ein anderes C-Atom übertragen wurde. Dadurch sollte ein Sialinsäure-spezifischer Zuckervorläufer modifiziert werden (Abbildung 2.4.3), mit dessen Hilfe gerade Glykoproteine besser und schneller visualisiert werden könnten.

### 2.4.2.3 Metabolisierung unnatürlicher Monosaccharide

Verstoffwechselt werden die unnatürlich modifizierten Azidozucker über den sogenannten „salvage pathway“ (Abbildung 2.4.4). (Laughlin et al. 2006) Zunächst wird der Azidozucker endozytiert und ins das Zytosol freigesetzt. Anschließend werden die Zucker deacetyliert und es kommt zur Phosphorylierung durch Phosphorylasen. Danach erfolgt in der Regel eine Aktivierung mit Uridindiphosphat (UDP). In Abhän-



gigkeit des eingesetzten Zuckers kann auch eine Aktivierung mit GDP oder CMP (Cytidinmonophosphat) erfolgen. So gelangt der eingeschleuste Zucker an das ER und den Golgi Apparat. Es kommt schließlich zur vollständigen Metabolisierung der Zucker in die naszierenden Glykostrukturen und somit zum Transport der bioorthogonal modifizierten Proteine und Lipide an die Zelloberfläche.



**Abbildung 2.4.4| Metabolisierung von Glykanstrukturen über den „salvage pathway“.** Der unnatürliche Zucker, in dem Fall ManNAz, wird endozytiert und gelangt somit ins Zytosol, wo er deacetyliert und anschließend mit UDP aktiviert wird. Nach der Glykosylierung, die am ER und dem Golgi Apparat abläuft, wird der Zucker an ein Protein oder Lipid gebunden und wandert schließlich an die Zelloberfläche. Dort ragen die Zuckerstrukturen weit in den extrazellulären Raum hinaus und bilden die Glykokalyx. (Laughlin et al. 2006)

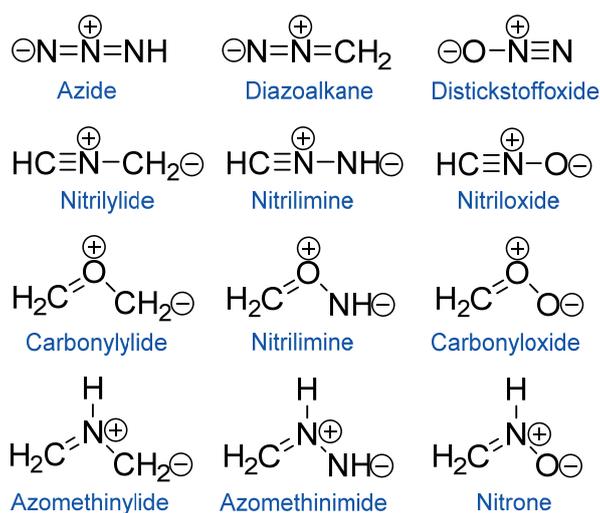
#### 2.4.2.4 Markierung der Glykoproteine über den O-GlcNAc „salvage pathway“

Zahlreiche zytoplasmatische Proteine werden reversibel über den O-GlcNAc „salvage pathway“ glykosyliert. (Boyce et al. 2011) Es gibt bereits Studien, die belegen, dass Ac<sub>4</sub>GlcNAz zellpenetrierend ist und Proteine markieren kann. Allerdings markiert Ac<sub>4</sub>GlcNAz Glykoproteine an der Zelloberfläche weniger stark, als andere Azidozucker, wie beispielsweise Ac<sub>4</sub>GalNAz, mit dessen Hilfe Mucin-artige Glykoproteine visualisiert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass GlcNAz ebenfalls durch den GlcNAc-Salvage pathway metabolisiert wird, allerdings nur zu einem geringen Teil, da es nicht über die Phosphorylase UDP-aktiviert werden kann. Allerdings ist es seit langem bekannt, dass die UDP-Galactose 4'-Epimerase (GALE) UDP-GlcNAc aus seinem C4 Epimer, UDP-N-Acetylgalaktosamin (UDP-GalNAc) umwandeln kann. (Boyce et al. 2011) Da N-AcetylGalNAz sehr gut UDP-aktivierbar ist, bietet der GalNAc-salvage pathway eine gute Möglichkeit aus Ac<sub>4</sub>GalNAz UDP-GlcNAz zu generieren.



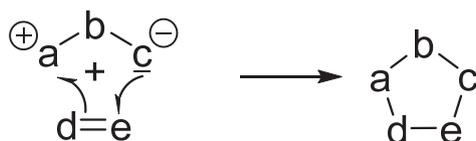
### 2.4.3 Click-Chemie

Die oben beschriebenen metabolisierten Azido-/Alkinzuckerderivate können nun in einer bioorthogonalen 1,3-dipolaren Cycloaddition mit verschiedener Fluorophoren oder anderen Markierungssubstanzen zur Markierung umgesetzt werden. Die 1,3-dipolare Cycloaddition ist eine der prominentesten sogenannten Click-Reaktionen. 2001 führten Sharpless et al. den Begriff Click-Reaktion ein. Unter Click-Reaktion wird eine Reaktion definiert, die i) stereospezifisch abläuft, ii) eine hohe Produktstabilität aufweist, iii) keine störenden Nebenprodukte erzeugt, iv) unter einfachen Reaktionsbedingungen mit hoher Kinetik abläuft und v) ein breites Anwendungsspektrum aufweist. (Kolb et al. 2001) Die Click-Chemie gewann in diesem Jahrhundert zunehmend an Bedeutung. Wie der Name schon sagt, ist die Click-Reaktion eine sehr einfache, sichere und effiziente Methode, um Biomoleküle oftmals chemoselektive und biorthogonal zu markieren. Mit dieser Methode werden komplizierte Reaktionen mit komplexen Apparaturen, sehr anspruchsvolle Reaktionsbedingungen (wie Temperatur und Druck) und sehr aufwendig zu reinigende Reaktionsprodukte durch eine einfach ablaufende Reaktion ersetzt. (Kolb et al. 2001)



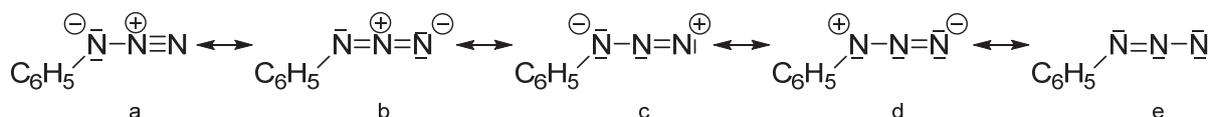
**Abbildung 2.4.5| Die wichtigsten 1,3-Dipole.** Auch das Ozon ( $\ominus\text{O}-\text{O}-\text{O}^+$ ) ist ein häufig benutzter 1,3-Dipol. (Braese et al. 2008)

Zur Click-Reaktion gehört bereits eine Vielzahl von Reaktionen. Dazu gehören die Diels-Alder-Cycloadditionen, Thiol-En-Additionen, Oximbildung und vor allem Cu-katalysierte Huisgen-Azid-Alkin-Cycloadditionen (CuAAC). Vor allem die letztgenannte Reaktion, auch 1,3-dipolare Cycloaddition genannt, gewann durch Huisgen in den 60er Jahren zunehmend an Bedeutung. (Huisgen 1963a) Dabei addiert ein 1,3-Dipol an Alkene. Dabei entsteht ein Fünfring. Die wichtigsten 1,3-Dipole sind in Abbildung 2.4.5 dargestellt. (Braese et al. 2008) Mit Hilfe der Click-Reaktion konnten demnach zwei kleine Einheiten von Heteroatomen verlinkt werden (C-X-C) (Schema 2.4.1).



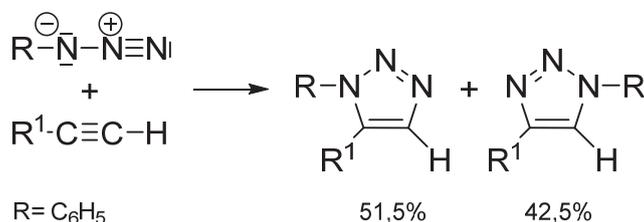
**Schema 2.4.1| Allgemeine 1,3-dipolare Cycloaddition.** Dabei addiert ein 1,3-Dipol an ein Alken unter Bildung eines 1,2,3-Triazols (Fünfring).

Dabei ist das Azid ein Intermediat (Schema 2.4.2) zwischen einer Einfach- und Doppelbindung, einer Einfach- und Dreifachbindung und einer Doppel- und Doppelbindung. Das C-Atom ist mit dem N-Atom über einen stumpfen Winkel verknüpft und der N-N-Abstand beträgt 1,26 und 1,11 Å. (Huisgen 1963a)



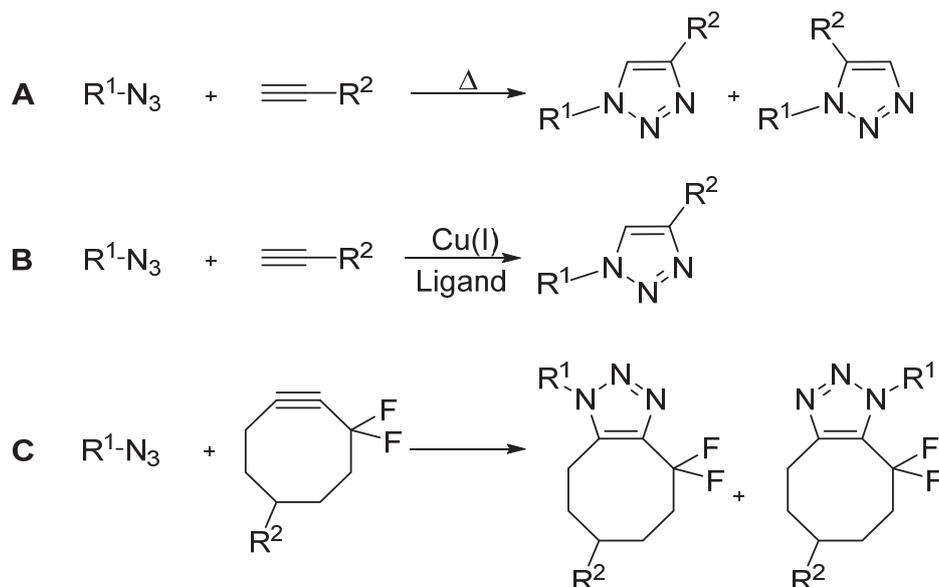
**Schema 2.4.2| Das Azid als Intermediat (a-e).**

Huisgen beschrieb die Cycloaddition von Phenylaziden und Phenylacetalen. Es bilden sich dabei 1,4- und 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazole in nahezu gleicher Ausbeute (Schema 2.4.3). (Orner and Kirmse 1958; Taylor and Gagan 2002) Die dabei entstandenen Isomere sind aufgrund sehr unterschiedlicher Löslichkeit leicht zu trennen. Wegen der Zersetzung der Diazoverbindungen wurde die Reaktion bei Raumtemperatur oder unter Kühlung durchgeführt.



**Schema 2.4.3| 1,3-dipolare Cycloaddition nach Huisgen 1963.** Ein lineares Alkin reagiert mit einem Azid unter Bildung eines 1,4- und 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazols in nahezu gleicher Menge.

Allerdings fordern Huisgen-Azid-Alkin-Cycloadditionen ohne Übergangsmetallkatalysator hohe Temperaturen, um eine ausreichende Ausbeute zu erzielen. Außerdem verläuft die 1,3-dipolare Cycloaddition ohne Übergangsmetallkatalysator nicht regioselektiv und sehr langsam (Schema 2.4.4 A). Durch den Einsatz von katalytischen Mengen an Cu(I) kommt es zu einer schnellen, hocheffizienten und regioselektiven Cu-katalysierten Azid-Alkin 1,3-dipolaren Cycloaddition (CuAAC) (Schema 2.4.4 B). (Grabosch et al. 2013; Tornøe et al. 2002) Kurze Zeit darauf zeigte Sharpless et al., dass die CuAAC in *tert*-Butylalkohol, Ethanol und Wasser einsetzbar ist. (Lutz 2008; Rostovtsev et al. 2002) Bertozzi et al. zeigte schließlich, dass eine Click-Reaktion mit einem gespannten Ringsystem, einem Cyclooctin-Ring, ohne Katalysator stattfinden kann (Schema 2.4.4 C). (Baskin et al. 2007)

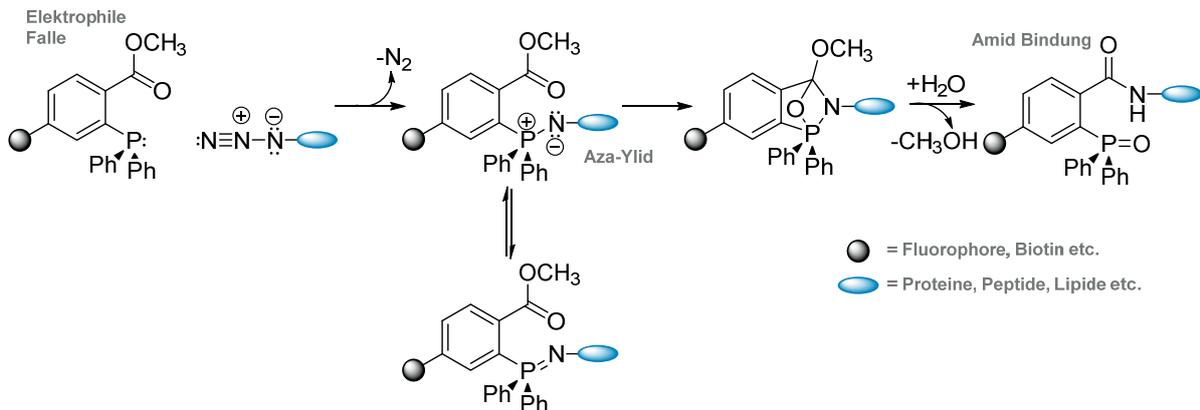


**Schema 2.4.4| Unterschiedliche Typen der Azid-Alkin Cycloadditionen. A**, Huisgen-Azid-Alkin-Cycloaddition (thermische Cycloaddition).(Huisgen 1963a; Huisgen 1963b, 1984; Laue and Plagens 1998; Rodionov et al. 2005) **B**, Cu(I)-katalysierte Cycloaddition.(Rodionov et al., 2005(Bock et al. 2006; Hein and Fokin 2010; Kolb et al. 2001; Meldal and Tornøe 2008; Rostovtsev et al. 2002; Tornøe and Meldal 2001; Wu and Fokin 2007) **C**, Durch Ringspannung begünstigte Cycloaddition (wird zusätzlich durch Fluor aktiviert).(Baskin et al. 2007; Díaz et al. 2004)

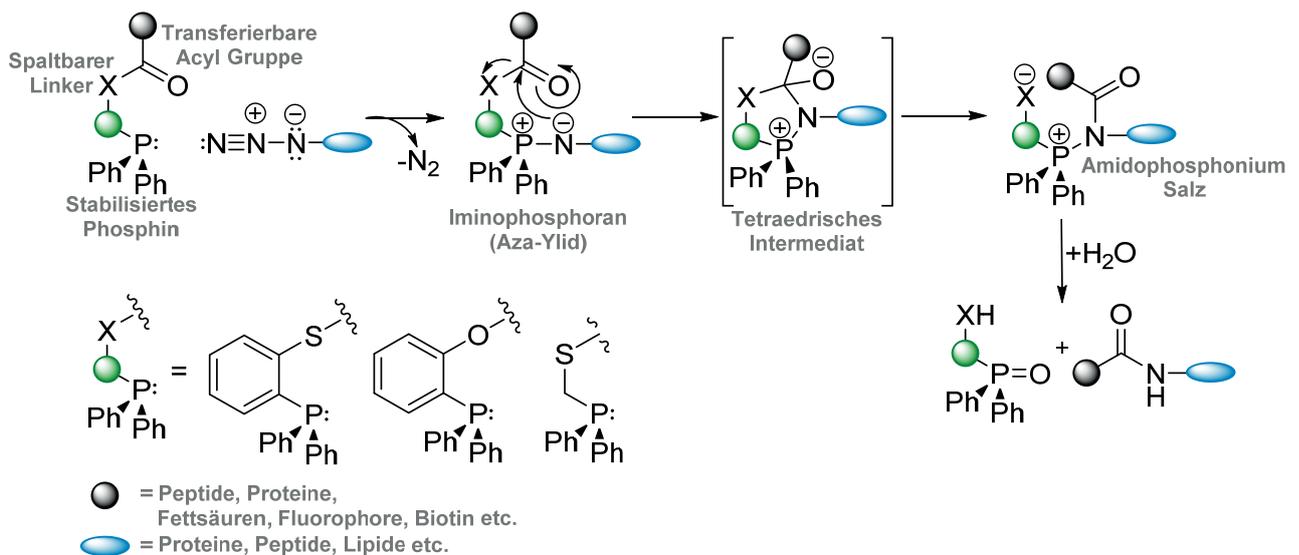
Aus der Cu-freien und der Cu-katalysierten bioorthogonalen Azid-Alkin-Cycloaddition wurde demnach eine sehr wichtige chemoselektive Anwendungsmöglichkeit erschaffen, um chemoselektive Funktionalisierungen in biologischen Systemen durchzuführen.(Rostovtsev et al., 2002, Tornøe and Meldal, 2001, Wu and Fokin, 2007, Bock et al., 2006, Meldal and Tornøe, 2008, Hein and Fokin, 2010) Die Cu-freie bioorthogonale Reaktion unter Verwendung der gespannten Ringe ermöglicht durch unnatürliche, chemoselektive Gruppen, Biomoleküle posttranslational sogar in lebenden Systemen zu modifizieren.(Prescher and Bertozzi 2006) Der Vorteil von Aziden ist, dass sie in der Natur nicht vorkommen und eine Vielzahl an Biomolekülen markieren können. Als milde Elektrophile reagieren Azide auch nicht mit Aminen oder anderen Nucleophilen, die in biologischen Systemen zahlreich vorhanden sind. So können beispielsweise Mucin-artige Glykoproteine markiert werden.(Hang et al. 2003) Neben der 1,3-dipolaren Cycloaddition wird häufig die sogenannte Staudinger-Ligation eingesetzt, um Azid-modifizierte Biomoleküle chemoselektiv zu markieren. Dabei basiert die Staudinger-Ligation auf der Reaktion von Aziden mit Phosphinen, die eine stabile Amid-Bindung bilden.(Hang et al. 2003) Es gibt die „normale“ (Schema 2.4.5) und die „spurlose“ (Schema 2.4.6) Staudinger-Ligation.(Schilling et al. 2011) Aufgrund der hervorragenden Bioorthogonalität von Aziden und Triarylphosphinen ist die Staudinger-Ligation gerade in zellulärer Umgebung und im Tiermodell anwendbar. Doch bedauerlicherweise gibt es einige Einschränkungen dieser Kupplungsmethode: *i*) sie verläuft relativ langsam und *ii*) es müssen relativ hohe Konzentrationen an Triarylphosphinen (> 250  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt werden. Durch die Einführung von elektronenschiebenden Gruppen an den Arylsubstituenten oder durch den Austausch von Aryl- gegen Alkylsubstituenten kann die Staudinger-



Ligation unter den Bedingungen nicht stattfinden, da das gebildete Produkt (Phosphanoxid) sehr anfällig gegenüber Oxidation ist.

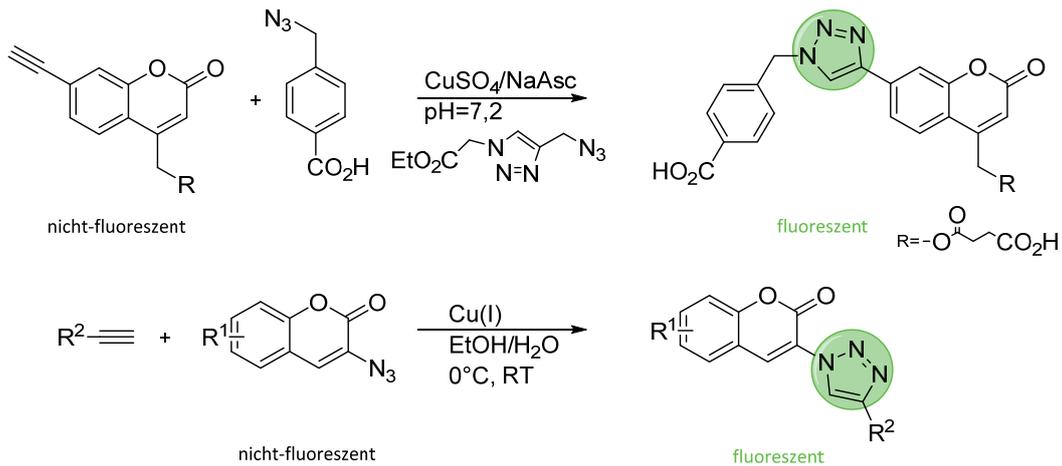


**Schema 2.4.5| Staudinger-Ligation eines *ortho*-Phosphin Terephthalsäure Derivats.** Die Staudinger-Ligation zeigt die Bildung einer stabilen Amid-Bindung. (Hang et al. 2003; Saxon and Bertozzi 2000a; Schilling et al. 2011)



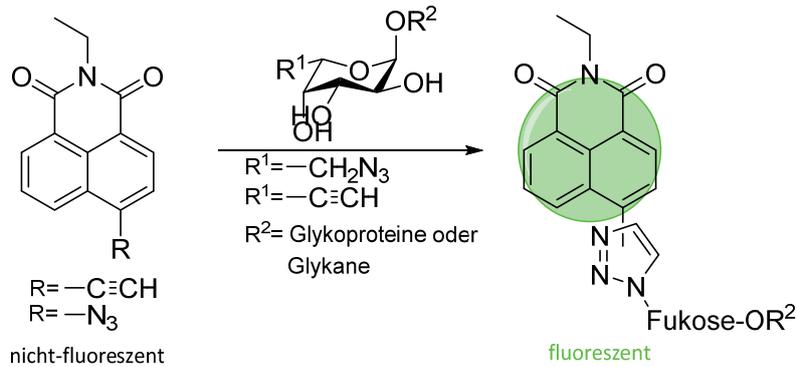
**Schema 2.4.6| „Spurlose“ Staudinger-Ligation zur Kupplung von Proteinen, Peptiden, Fluorophore mit Proteinen/Peptiden.** (Schilling et al. 2011)

Im Vergleich zur Staudinger Ligation ist die Reaktion von Aziden mit Alkinen unter Ausbildung eines Triazolrings daher bevorzugt, da sie eine schnellere Reaktionskinetik zeigt. (Rostovtsev et al. 2002; Tornøe et al. 2002) Durch die überraschend gute Anwendung in biologischen Systemen wurden verschiedene Anwendungen etabliert. Neben der Anwendung mit fluorophorgekoppelten Alkinen gibt es bereits viele Anwendungen, die eine Echtzeitkontrolle der CuAAC in biologischen Systemen erlauben. So wurden fluoreszente Cumarin-Derivate synthetisiert (Schema 2.4.7) (Lemieux et al. 2003; van Berkel et al. 2009), die nach Bildung des Triazolrings fluoreszieren. Dabei wird zunächst eine Alkin-Gruppe am C7-Atom eingeführt, um so die Fluoreszenz von Cumarin zu unterdrücken. (Le Droumaguet et al. 2010)



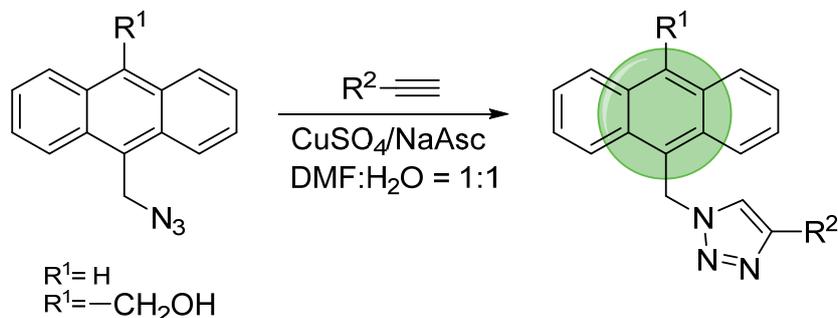
**Schema 2.4.7] Cu-katalysierte Click-Reaktion mit Coumarin-Derivaten.**(Le Droumaguet et al. 2010)

Unter anderem lassen sich mit der CuAAC Glykoproteine und Glykane *in vivo* mittels 1,8-Naphthalimid-Fluorophoren detektieren (Schema 2.4.8).



**Schema 2.4.8] Cu-katalysierte Click-Reaktion mit 1,8-Naphthalimiden.**(Le Droumaguet et al. 2010)

Es können auch Azid-Anthracene und Alkine als Fluorophore eingesetzt werden (Schema 2.4.9). Dabei ist Anthracen ein beliebtes Fluorophor, da das Triazol-Produkt fast die gleiche Absorptionsintensität besitzt als die des Anthracen-Derivates. Dagegen ist das Emissionsspektrum stärker als das des Azides. Mit der photoinduzierten Elektronenübertragung (engl. *photo-induced electron transfer*, PTE) wird von der Azid-Gruppe Elektronen auf Anthracen übertragen, das wiederum die Fluoreszenz des Farbstoffes verhindert.



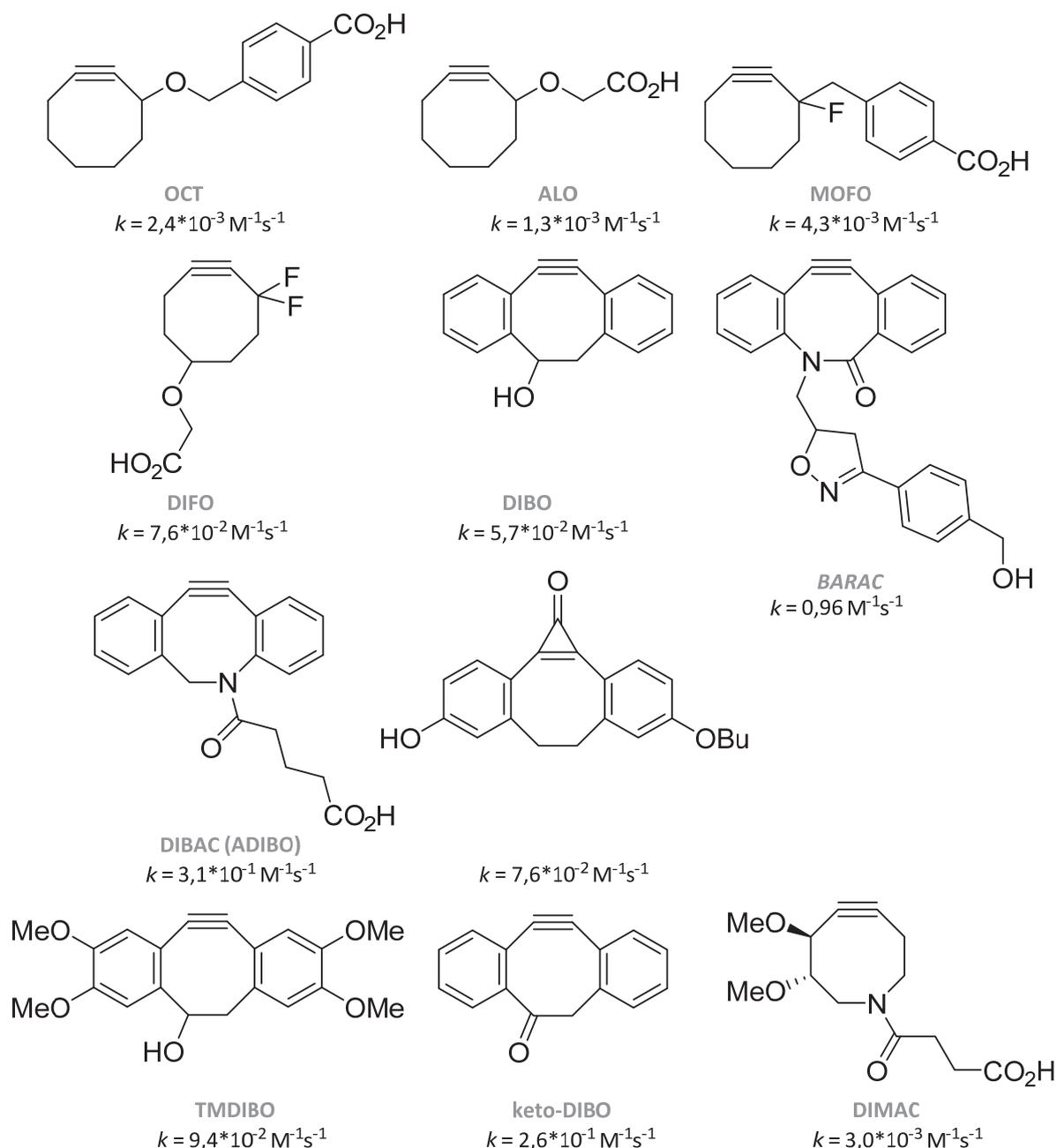
**Schema 2.4.9] Cu-katalysierte Click-Reaktion mit Azido-Anthracene und Alkine.**(Le Droumaguet et al. 2010)



Der größte Nachteil der CuAAC ist jedoch die Anwesenheit von Kupfer während der Reaktion, da das einwertige Cu-Ion sehr toxisch für lebende Zellen und Organismen ist (LD<sub>50</sub>-Wert von Cu(I) 29 µM). Daher werden überwiegend Cu-freie Azid-Alkin-Cycloadditionen SPAAC für Lebendexperimente bevorzugt verwendet. Mit der SPAAC werden bevorzugt intrazelluläre Markierungen vorgenommen. (Agard and Bertozzi 2009; Hangauer and Bertozzi 2008; Prescher and Bertozzi 2006; Prescher et al. 2004) Anstelle von terminalen Alkinen können auch organische Azide mit Oxanobornadiene über eine 1,3-dipolare Cycloaddition-Retro-Diels-Alder-Tandemreaktion (tandem crDA) verlinkt werden. Diese Reaktion läuft bereits bei RT viel schneller ab als die Huisgen-Azid-Alkin-Cycloaddition. Allerdings kommt es zur Bildung eines relativ toxischen Nebenproduktes (einem Furan). (van Berkel et al. 2008)

### 2.4.3.1 Cu-freie Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC)

Gerade Glykanstrukturen in natürlichen Glykoproteinen lassen sich mit Hilfe der Cu-freien SPAAC und der Einführung von modifizierten Azidozuckern metabolisch markieren (Schema 2.4.4 C). (Baskin et al. 2007; Belardi et al. 2013; Jewett and Bertozzi 2010; Sletten and Bertozzi 2009a) Allerdings kann man keine eindeutige Aussage darüber treffen, welche Zuckerstrukturen im Einzelnen markiert wurden. (Mahal et al. 1997; Saxon and Bertozzi 2000b) Es gibt eine Vielzahl von Cyclooctinen, die für die Cu-freie Azid-Alkin-Cycloaddition in Frage kommen. (Baskin et al. 2007) Außerdem kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch elektronenziehende Substituenten in der  $\alpha$ -Position der Dreifachbindung (Cyclooctin) deutlich verbessert werden. Fluorsubstituenten sind in biologischer Umgebung relativ inert und erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit etwas (4-fach schneller) (Sletten and Bertozzi 2009a). Aus dem Grund werden bevorzugt difluorierte Cyclooctine (DIFO, Abbildung 2.4.6) für eine noch schnellere (60-fach schneller,  $k = 10^{-1} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) (Baskin et al. 2007) und effiziente Azid-Alkin-Cycloaddition eingesetzt. (Lutz 2008) Mit DIFO gelang es vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten bei Markierungsexperimenten zu erzielen wie für die CuAAC. Demnach eignen sich DIFO-Fluorophor-Konjugate als perfekte Marker für Azid-modifizierte Biomoleküle in komplexen biologischen Systemen, einschließlich lebender Zellen und Zebrafisch Embryonen (Laughlin et al. 2008), die zudem eine sehr geringe Hintergrundfluoreszenz aufweisen. (Sletten and Bertozzi 2009a) Cyclooctin ist neben dem Cycloheptin das kleinste stabilste Cycloalkin mit dessen Hilfe Zelloberflächenglykane ohne erkennbare zytotoxische Effekte markiert werden können. (Agard et al. 2004; Almeida et al. 2013) 2008 gelang es Bertozzi et al. eine mehrfarbige Markierung von Glykanstrukturen in Zebrafisch Embryonen *in vivo* zu generieren. Demnach wurden die subzelluläre Glykanstrukturen während der Zebrafisch-entwicklung mit einem unnatürlich modifizierten Zucker *in vivo* detektiert. 60 Stunden nach der Befruchtung (engl. *hours post fertilization*, hpf) konnte eine signifikante Markierung in den olfaktorischen Organen, den Brustflossen und im Kieferbereich beobachtet werden. (Laughlin et al. 2008)



**Abbildung 2.4.6| Cyclooctine zur Anwendung der Cu-freien Azid-Alkin-Cycloaddition.** i) OCT = erste Cyclooctin, dass an Biotin gekuppelt werden konnte. ii) ALO = „Aryl-less“ octyne, besitzt eine bessere Wasserlöslichkeit. iii) MOFO = *mono*-fluoriertes Cyclooctin. iv) DIFO = Difluorcyclooctin. v) DIBO = Dibenzocyclooctin. vi) BARAC = Biarylazacyclooctinon. vii) DIBAC (ADIBO) = ein BARAC-Derivat mit einem *exo*-cyclischen Amid; . viii) Di-Methoxy-DIBO. ix) TMDIBO = *tetra*-Methoxy-DIBO. x) keto-DIBO = *keto*-substituiertes Dibenzocyclooctin. xi) DIMAC = Di-Methoxy-Aza-Cyclooctin. Hier sind die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten abgebildet. (Sletten and Bertozzi 2011)





### 3 Ziel der Arbeit

Aufgrund dieser Komplexität und Heterogenität ist die genaue Analyse der Oberflächentopologie der Glykokalyx verschiedener Zellen eine große Herausforderung. Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MALDI-TOF, *matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight spectrometry*) oder mit der Mikrochip Elektrophorese kann die Zusammensetzung von Glykanen nachgewiesen werden. (Yamada K 2011) Diese komplexen analytischen Methoden sind jedoch so aufwendig, dass sie in Experimenten *in vivo* eher ungeeignet sind. Hier wäre eine schnelle und einfachere Technik von großem Vorteil. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Etablierung neuartiger fluoreszenzbasierter Methoden zur Analyse der Topologie/Topographie des Glykoms in Zellen und ganzen Organismen, die es erlauben in späteren Arbeiten die komplexe Fragestellung der Zellerkennung aufgrund der Vielfalt des Glykoms zu untersuchen, um Rückschlüsse auf generelle Mechanismen zu erhalten. Dazu sollten bereits etablierte Markierungsverfahren wie die von C. Bertozzi eingeführte „*Strain-promoted Azid-Alkin Cycloaddition*“ (SPAAC) weiterentwickelt werden und neuartige bioorthogonale Markierungsverfahren basierend auf der Cu-katalysierten Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) an lebenden Zellen entwickelt werden. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auch auf der Einführung neuartiger Fluorophore aus Emittermaterialien von organischen Leuchtdioden (OLEDs).





## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Labelling von Glykostrukturen in diversen Zelllinien

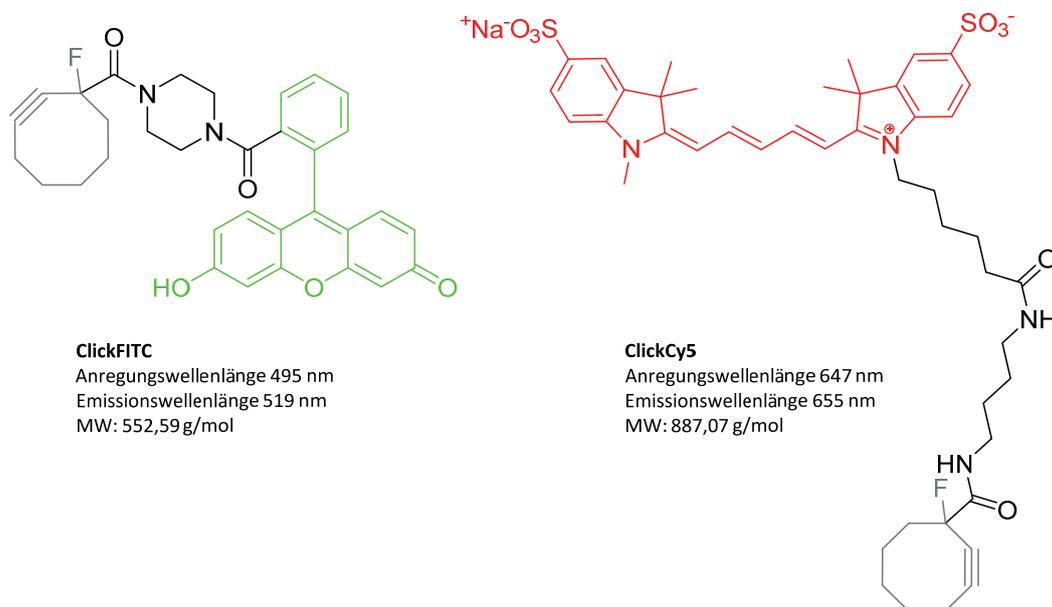
In der Einleitung wurde bereits verdeutlicht, dass jede Zelle eine unterschiedliche Topologie der Zuckerstrukturen aufweist. Diese individuelle Glykostrukturtopologie kann Aufschluss darüber geben, um welche Zelle es sich handelt und wie diese Zelle tatsächlich vorliegt. Durch die Zugabe eines unnatürlichen Zuckers (in dem Fall ein peracetylierter Azidozucker) auf die Zellen, wird zunächst der Zucker über den „*salvage pathway*“ metabolisiert und anschließend in die Glykokalyx eingebaut. Mit Hilfe der bioorthogonalen Click-Reaktion lassen sich die Azidogruppen auf der extrazellulären Seite der Zellmembran nachweisen. Ziel war es, Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche so zu markieren, dass sie mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert werden können. Demnach „clickt“ ein disubstituiertes Cyclooctin (gespannter Ring), das an das Fluorophor Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) bzw. Cyanin5 (Cy5) gekuppelt wurde, an die Azido-Gruppe, die schließlich visualisiert werden kann. Außerdem sollte über ein Hochdurchsatzverfahren und einer statistischen Auswertung geklärt werden, ob es einen signifikanten Unterschied in der Topologie der Glykokalyx zwischen einzelnen Zelllinien gibt. Als Zuckervorläufer (*Precursor*) wurden zunächst Ac<sub>4</sub>GalNAz und Ac<sub>4</sub>ManNAz (Abbildung 2.4.2) eingesetzt, deren Strukturen und Metabolisierung bereits im Abschnitt 2.4.2 ausführlich beschrieben wurden.

#### 4.1.1 Cu-freie Click-Reaktion (SPAAC) mit ClickFITC und ClickCy5

Zunächst wurden Hela wt-Zellen (humane Gebärmutterhalskrebszellen), HepG2 Zellen (humane Leberkarzinomazellen), SHSY5Y Zellen (humane Neuroblastomzellen), HUVEC (humane Nabelschnurendothelzellen) und Meb4 Zellen (murine Melanomzellen) mit 80 µM Ac<sub>4</sub>GalNAz und Ac<sub>4</sub>ManNAz für drei Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Die Synthese der Azidozucker erfolgte in Zusammenarbeit mit Danny Wagner und Tobias Hagendorn aus der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Bräse, KIT. (Abbildung 2.4.2). In der anschließenden bioorthogonalen als „*Strain-promoted Azid-Alkin Cycloaddition*“ (SPAAC) bekannten Click-Reaktion wurden die metabolisierten Azidozucker mit verschiedenen Cyclooctinen umgesetzt (Abbildung 4.1.1, Schema 4.1.1 und Schema 4.1.2). Dabei sind FITC und Cy5 Fluorophore, die an zwei verschiedene disubstituierte Cyclooctingerüste gekuppelt sind. Dabei hat ClickFITC eine Anregungswellenlänge von 495 nm und eine Emissionswellenlänge von 519 nm. ClickCy5 wird bei 647 nm angeregt und emittiert bei 655 nm. Beide Fluorophore sind pH-Wert unempfindlich und produzieren wenig Autofluoreszenz in biologischen Systemen, sodass sie bevorzugt in Experimenten *in vivo* angewendet werden können. Zur besseren Differenzierung der einzelnen Zellen, wurde die DNA in den Zellkernen mit 0,5 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) angefärbt. Durch die Färbung der Zellkerne konnten gleichzeitig Rückschlüsse auf die Integrität der Zellen getroffen werden. Nachdem die Azidozucker nach 3-tägiger Inkubationszeit in die Glykokalyx eingebaut waren, wurden sie mit 20 µM ClickFITC und ClickCy5



(Abbildung 4.1.1, Schema 4.1.1 und Schema 4.1.2) über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> behandelt. Anschließend konnte mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie eine Markierung der Plasmamembran und der perinuklearen endosomalen/lysosomalen Kompartimente detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass in den Kontrollen, die nur mit den Fluorophor markierten Cyclooctinen behandelt wurden, wie bereits beschrieben, keine Fluoreszenz zu beobachten war und ClickFITC und ClickCy5 in freier Form nicht in Zellen aufgenommen werden. (Kaufmann 2012) Es konnte gezeigt werden, dass die Azidozuckervorläufer in der Zelle metabolisiert und in Zuckerstrukturen der Glykokalyx eingebaut wurden. Daraus ließ sich schließen, dass die Färbungen, die innerhalb der Zelle zu erkennen waren, aus endozytierten membranständigen Zuckern resultierten, die in den Lysosomen akkumulierten.

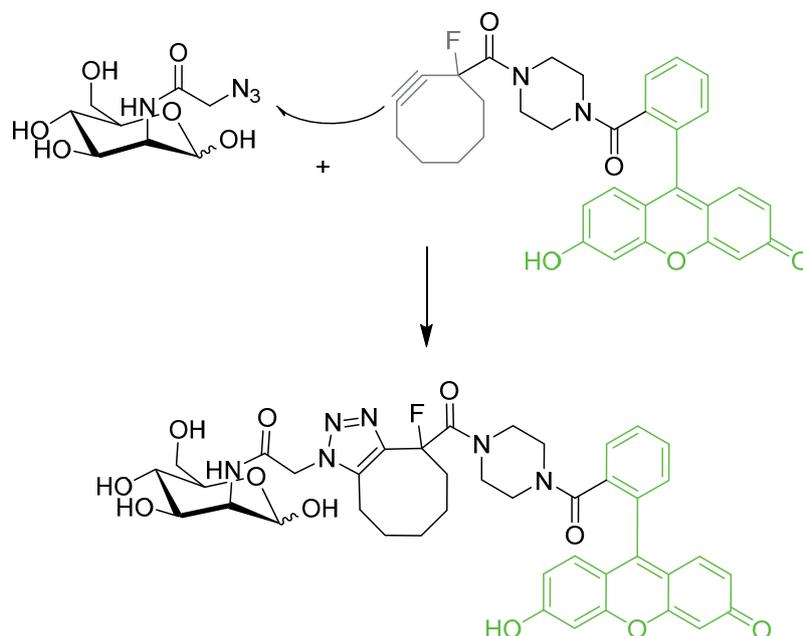


**Abbildung 4.1.1| ClickFITC (grün) und ClickCy5 (rot) gekuppelt an ein Cyclooctin (grau).** ClickFITC besitzt eine Anregungswellenlänge von 495 nm und eine Emissionswellenlänge von 519 nm. ClickCy5 dagegen wird bei 647 nm angeregt und emittiert bei 655 nm. MW = Molekulargewicht (engl. *molecular weight*).

Da der Einbau der Azidozucker nur kompetitiv zu den entsprechenden biosynthetischen natürlichen Zuckerbausteinen verläuft, betrug die Inkubationszeit der Zellen mit dem Azidozucker ca. drei Tage, um eine entsprechende Markierung (ca. 2% der natürlichen Zucker) der Zelloberfläche zu erreichen. Eine Verkürzung der Inkubationszeiten der unnatürlich modifizierten Azidozucker ergab nur eine dementsprechend schwächere Fluoreszenz. Währenddessen konnten die Inkubationszeiten der Cyclooctine auf 1-24 Stunden verkürzt werden. Innerhalb von 24 Stunden konnte eine signifikante Fluoreszenz der Glykokalyx beobachtet werden. Um die Topologie der Oberflächenzucker verschiedener Zelllinien durch Quantifizierung des Einbaus von Ac<sub>4</sub>ManNAz bzw. Ac<sub>4</sub>GalNAz zu untersuchen, war es zunächst notwendig, die Azidozucker auf unterschiedlichen Zelllinien auszutesten und die entsprechenden Quantifizierungsparameter zu ermitteln. Parallel dazu sollte untersucht werden, inwiefern sich dieses Verfahren auf unterschiedliche, primäre Zelltypen bezüglich der

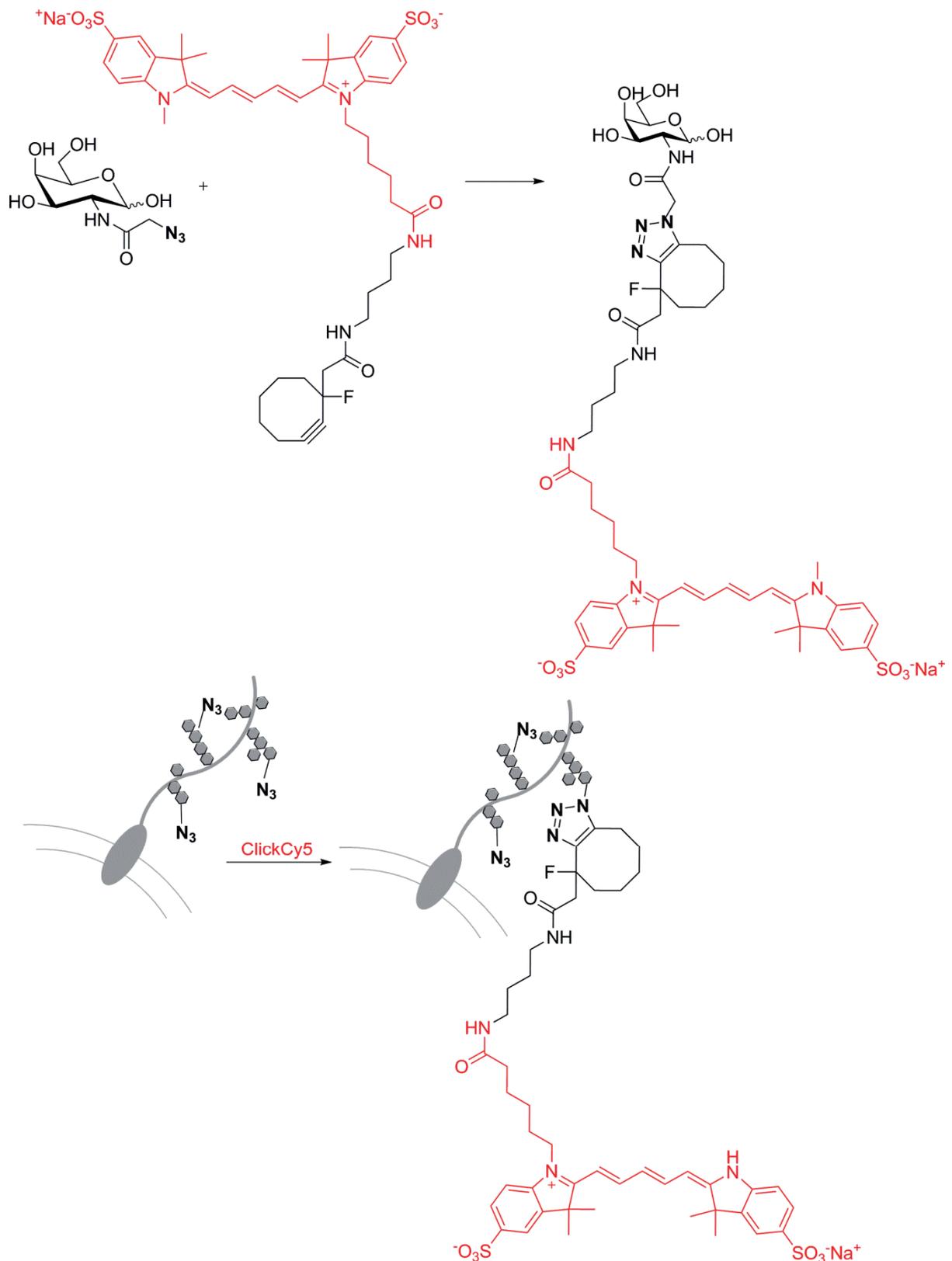


Aufnahme der Zucker und der Selektivität der Click-Reaktion übertragen lässt. Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, dass diverse Komponenten der Glykokalyx mit Hilfe von ClickFITC kartographiert werden können. (Kaufmann 2012) In der hier vorliegenden Arbeit sollten weitere Zelllinien getestet werden und neue Cyclooctingrundgerüste, wie das hier vorgestellte Click-Cy5 (Hagendorn 2014) ausgetestet (Abbildung 4.1.1) und mit dem FITC-gekuppelten Cyclooctingrundgerüst verglichen werden. Unter anderem sollte die Methode mittels ClickFITC etabliert werden, indem sowohl die Konzentrationen als auch die Inkubationszeiten individuell auf die Zellen angepasst wurden. Ein weiteres Ziel war nun eine systematische Analyse zur Markierung der Glykane auf bestimmten Zelllinien auf das *in vivo* Modell Zebrafisch zu übertragen. So könnten Zell-Zellerkennungsprozesse genauer beschrieben werden.

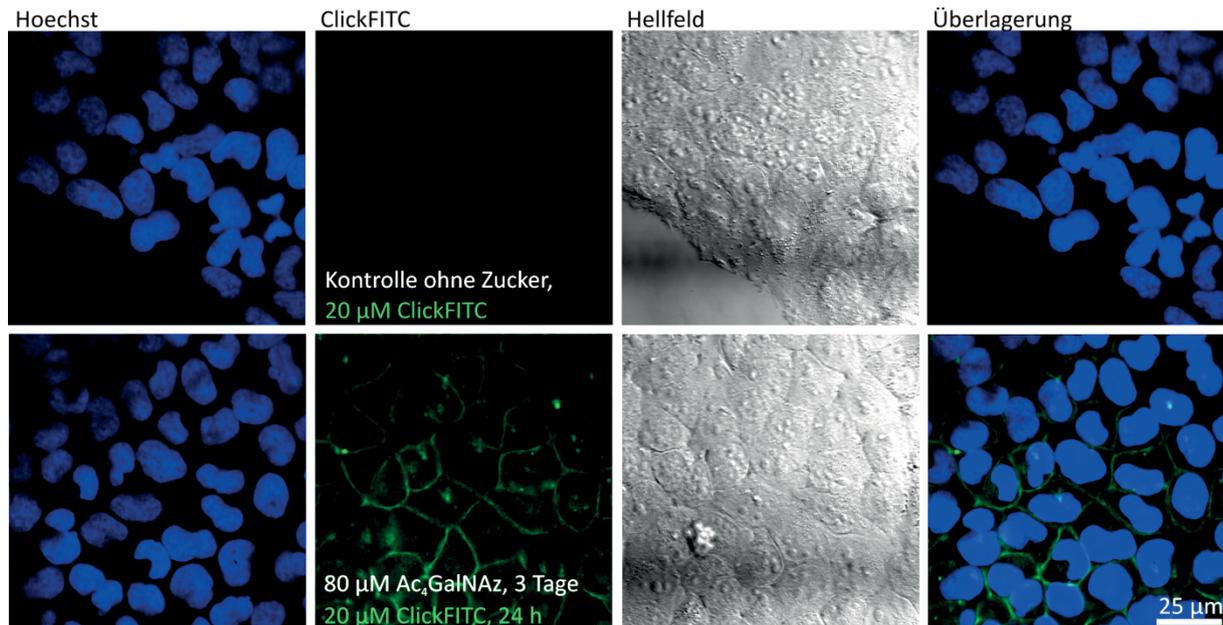


**Schema 4.1.1| Bioorthogonale Click-Reaktion eines in die Glykokalyx eingebauten unnatürlichen Azidozuckers mit einem FITC-gekuppelten Cyclooctin.** Dabei clickt Ac<sub>4</sub>ManNAz an ClickFITC.

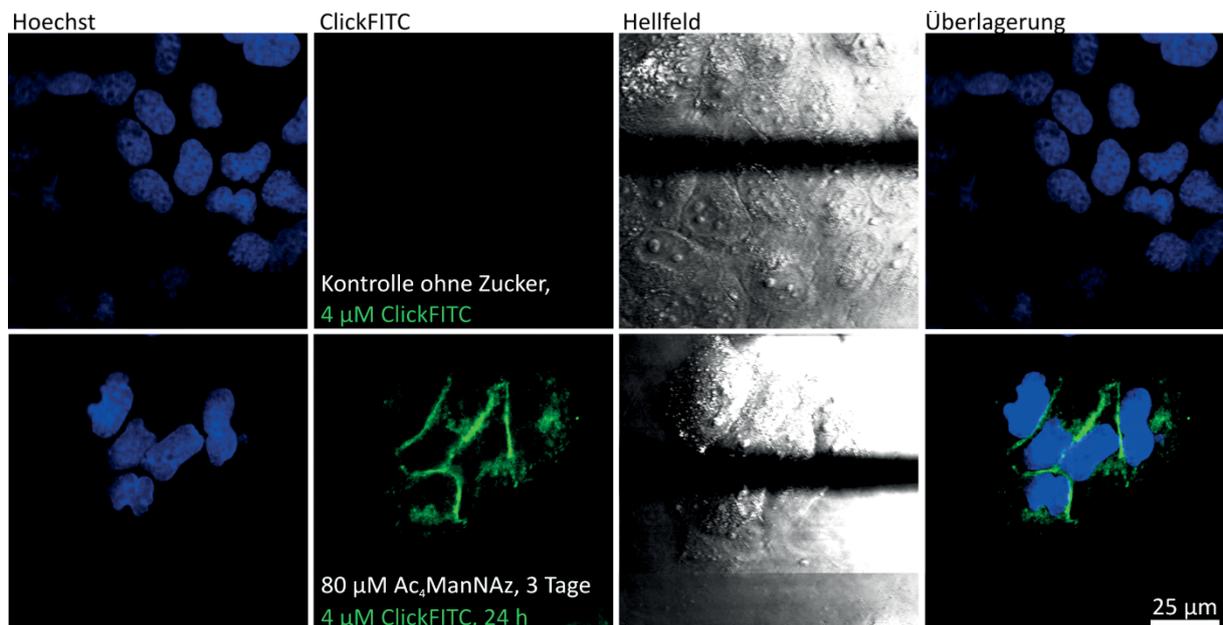
In einer ersten qualitativen Untersuchung der Zuckerdekoration auf diversen Zellen wurde die Click-Reaktion mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (*Leica SP5, DMI6000*, Inversmikroskop) visualisiert. Die daraus resultierenden Aufnahmen wurden mittels der Software *LAS AF (2.2.1 build 4842)* ausgewertet.



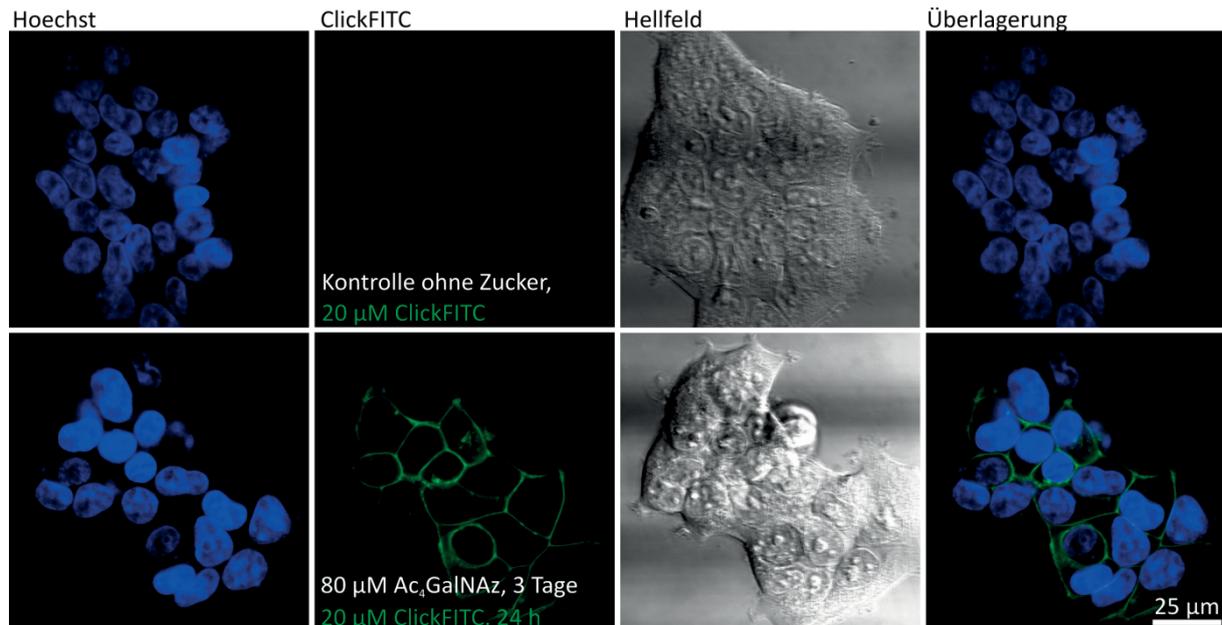
**Schema 4.1.2| Zuckermarkierung von Ac<sub>4</sub>GalNAz mittels der *Strain-promoted* Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC) von ClickCy5 auf der Zelloberfläche.** Durch die bioorthogonale Click-Reaktion lassen sich Azidozucker an Fluorophore in nur einem Schritt kuppeln. Der Azidozucker (Ac<sub>4</sub>GalNAz) ist bereits Teil der Glykokalyx und kann dadurch visualisiert werden. Analog zu dieser Methode klickt ClickFITC ebenfalls an ein Azidozucker.



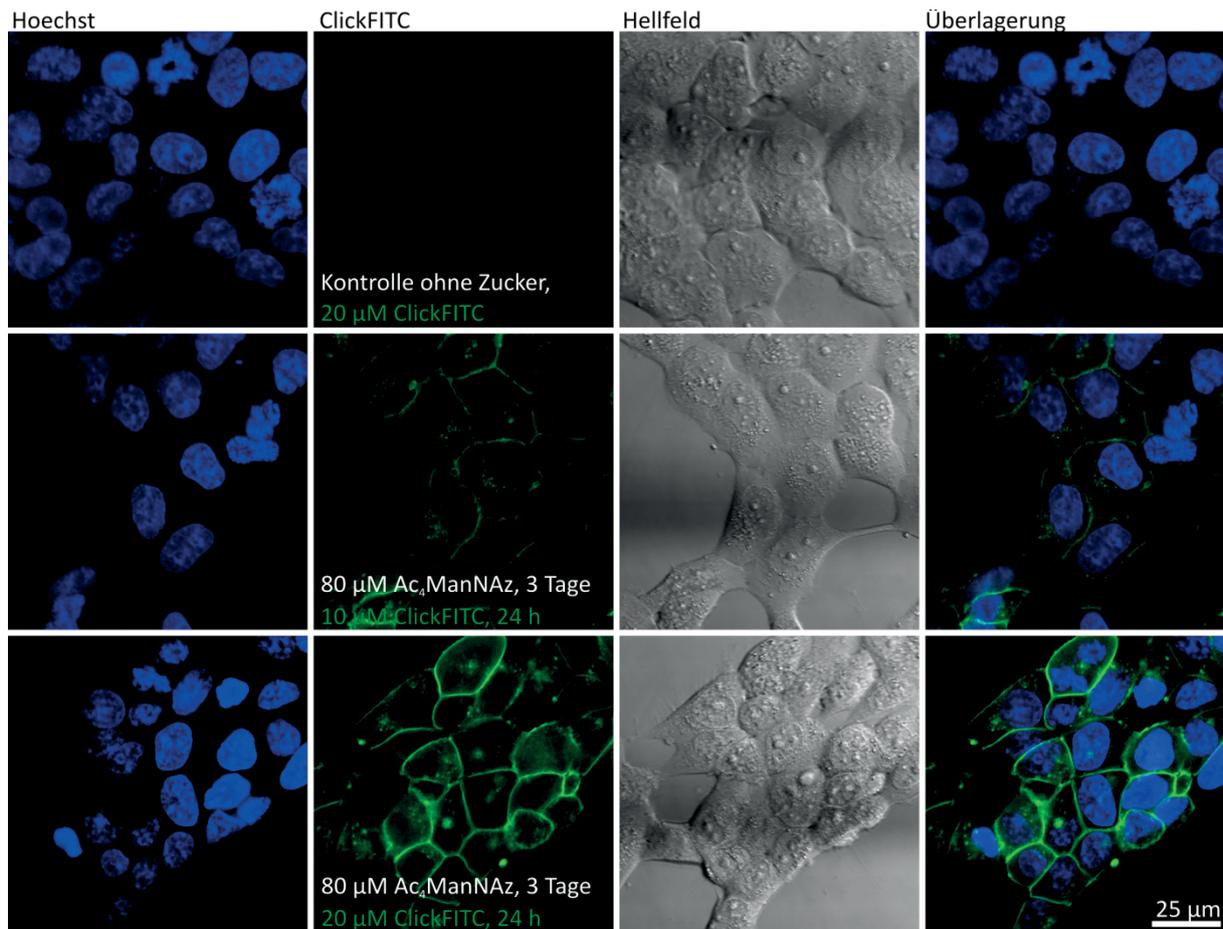
**Abbildung 4.1.2| Glykolabeling bei HeLa Zellen (humane Gebärmutterhalskarzinomazellen) mit 20 µM ClickFITC (24 Stunden)**  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80 µM Ac<sub>4</sub>GalNAz 3 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 20 µM ClickFITC 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers mit 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



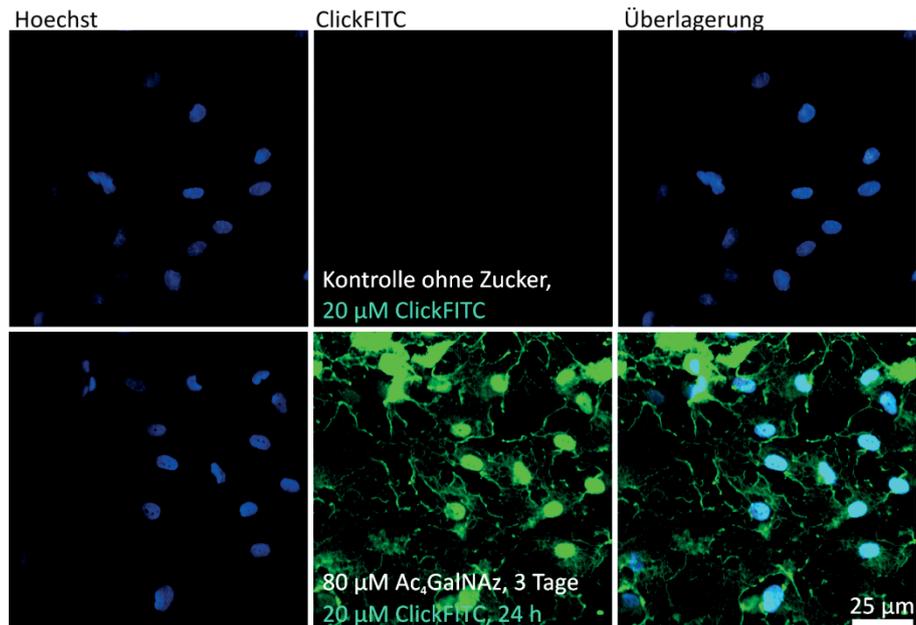
**Abbildung 4.1.3| Glykolabeling bei HeLa Zellen (humane Gebärmutterhalskarzinomazellen) mit 4 µM ClickFITC (24 Stunden)**  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80 µM Ac<sub>4</sub>ManNAz 3 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 4 µM ClickFITC 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



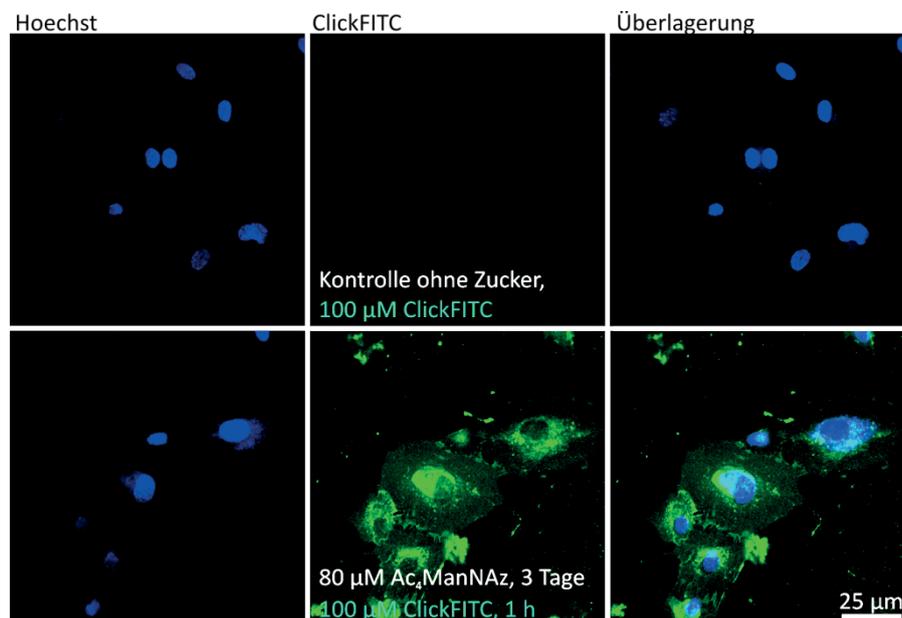
**Abbildung 4.1.4| Glykolabeling bei HepG2 Zellen (humane Leberkarzinomazellen) mit 20  $\mu$ M ClickFITC (24 Stunden)**  $1 \times 10^4$  HepG2 Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu$ M Ac<sub>4</sub>GalNAz 3 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 20  $\mu$ M ClickFITC 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (Leica SP5, Inversmikroskop).



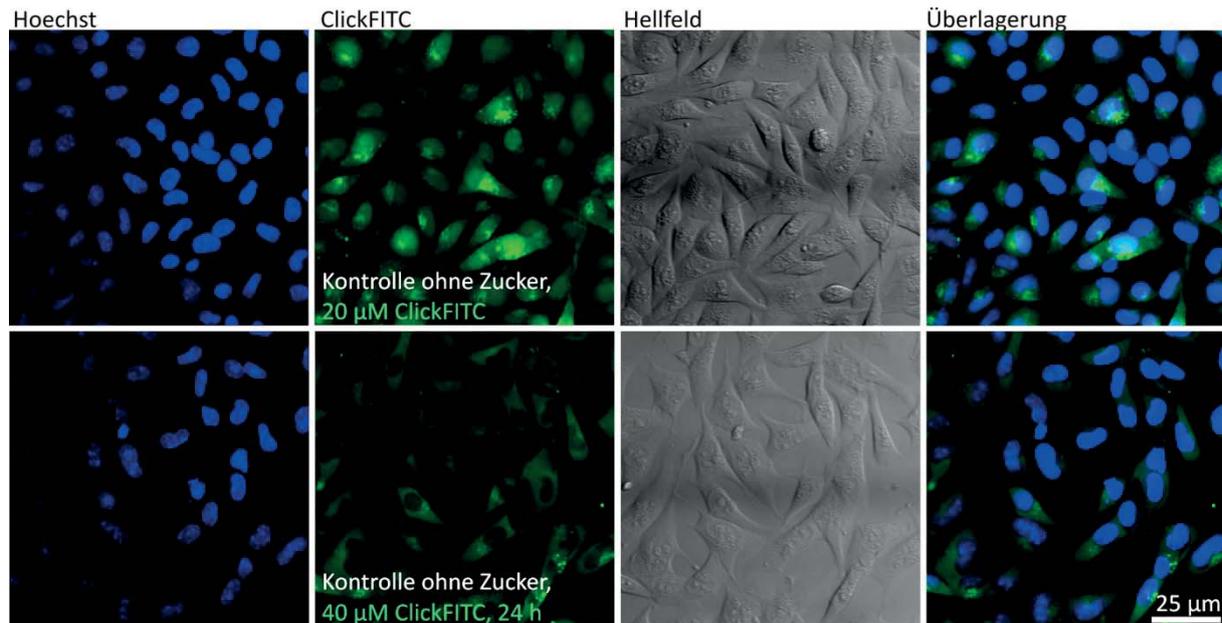
**Abbildung 4.1.5| Glykolabeling bei HepG2 Zellen (humane Leberkarzinomazellen) mit 10 bzw. 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC (24 Stunden)**  $1 \times 10^4$  HepG2 Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  3 Tage bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 10 bzw. 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC 24 Stunden bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



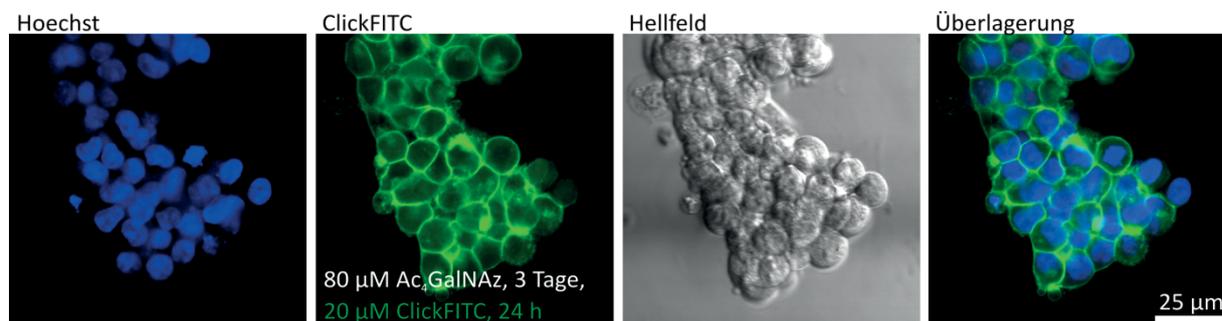
**Abbildung 4.1.6] Glykolabeling bei HUVEC Zellen (humane Nabelschnurendothelzellen) mit 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC (24 Stunden).**  $1 \times 10^4$  HUVEC Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  3 Tage bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC 24 Stunden bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



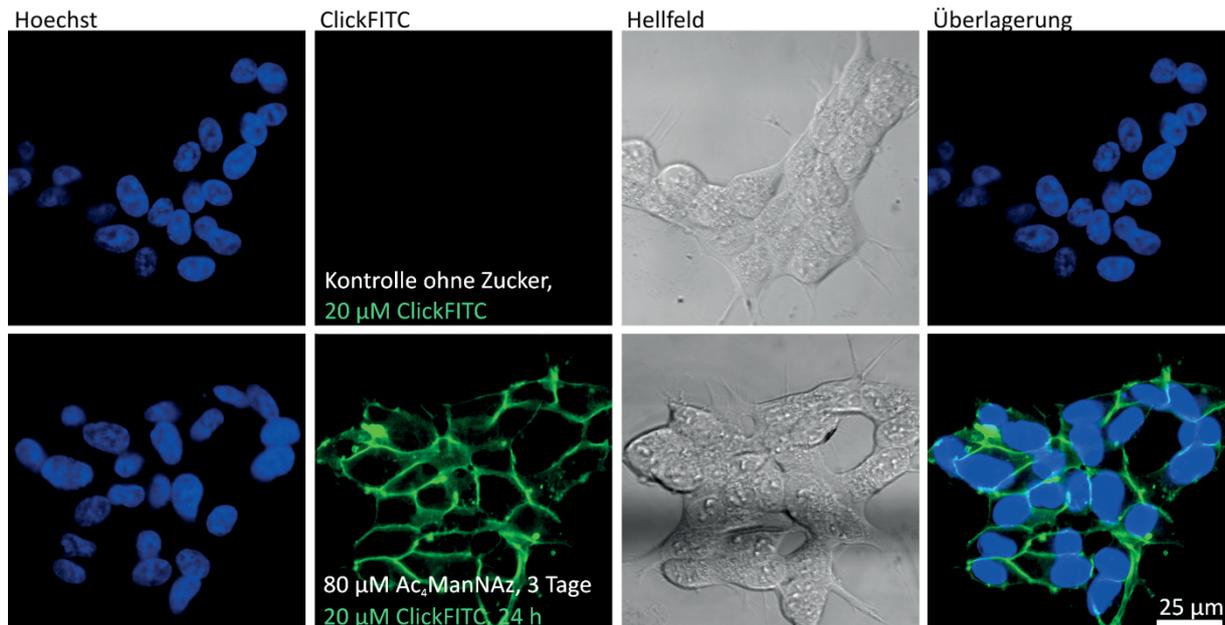
**Abbildung 4.1.7] Glykolabeling bei HUVEC Zellen (humane Nabelschnurendothelzellen) mit 100  $\mu\text{M}$  ClickFITC (1 Stunde).**  $1 \times 10^4$  HUVEC Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  3 Tage bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 100  $\mu\text{M}$  ClickFITC 1 Stunde bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



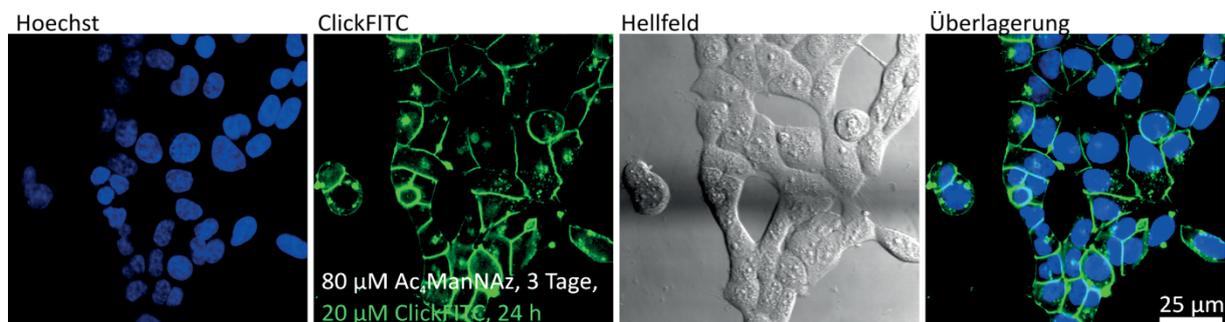
**Abbildung 4.1.8| Glykolabeling bei Meb4 Zellen (murine Melanomzellen aus der Maus) mit 20 bzw. 40  $\mu\text{M}$  ClickFITC (24 Stunden).**  $1 \times 10^4$  Meb4 Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 20 bzw. 40  $\mu\text{M}$  ClickFITC 24 Stunden bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



**Abbildung 4.1.9| Glykolabeling bei SHSY5Y Zellen (humane Neuroblastomzellen) mit 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC (24 Stunden).**  $1 \times 10^4$  SHSY5Y Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  3 Tage bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC 24 Stunden bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



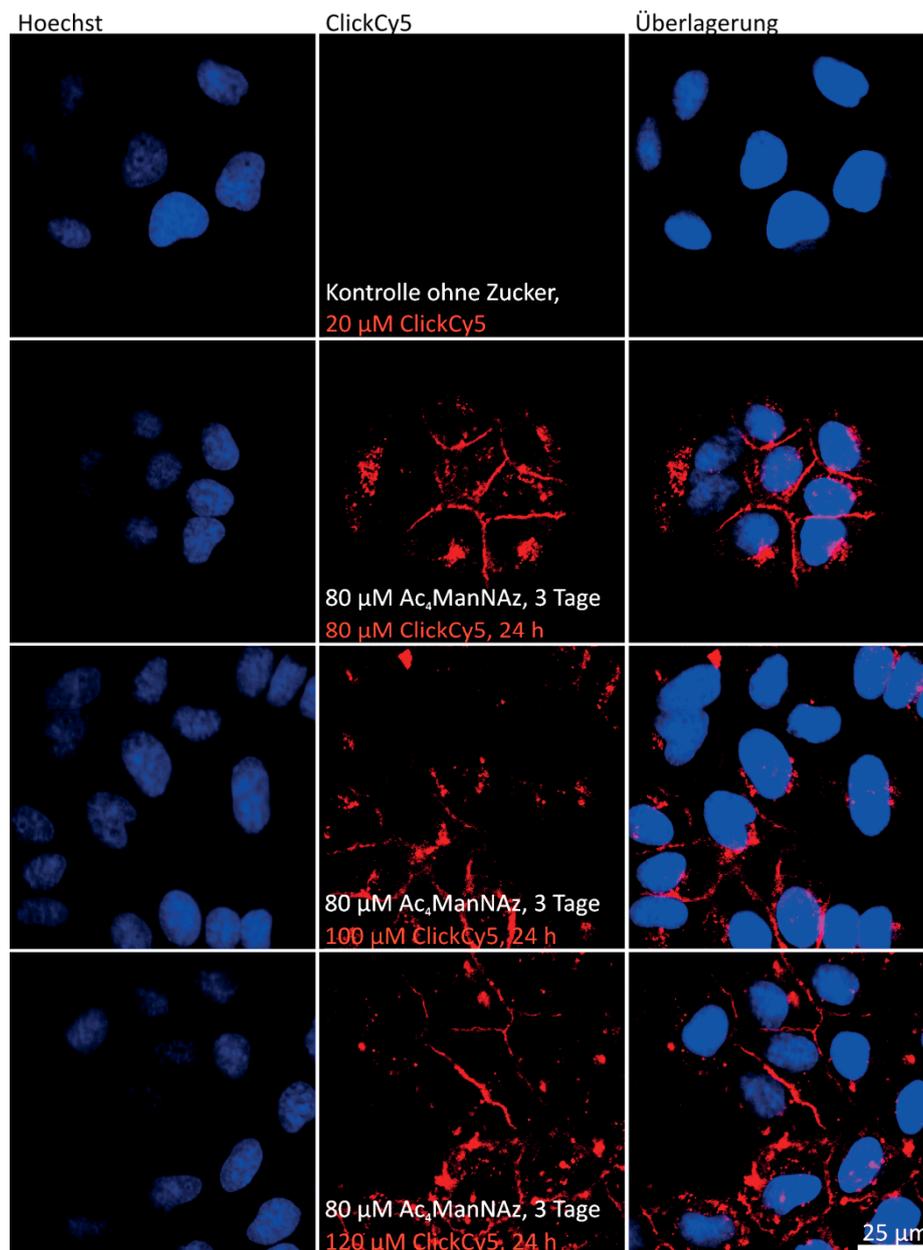
**Abbildung 4.1.10| Glykolabeling bei SHSY5Y Zellen (humane Neuroblastomzellen) mit 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC (24 Stunden).**  $1 \times 10^4$  SHSY5Y Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  3 Tage bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC 24 Stunden bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



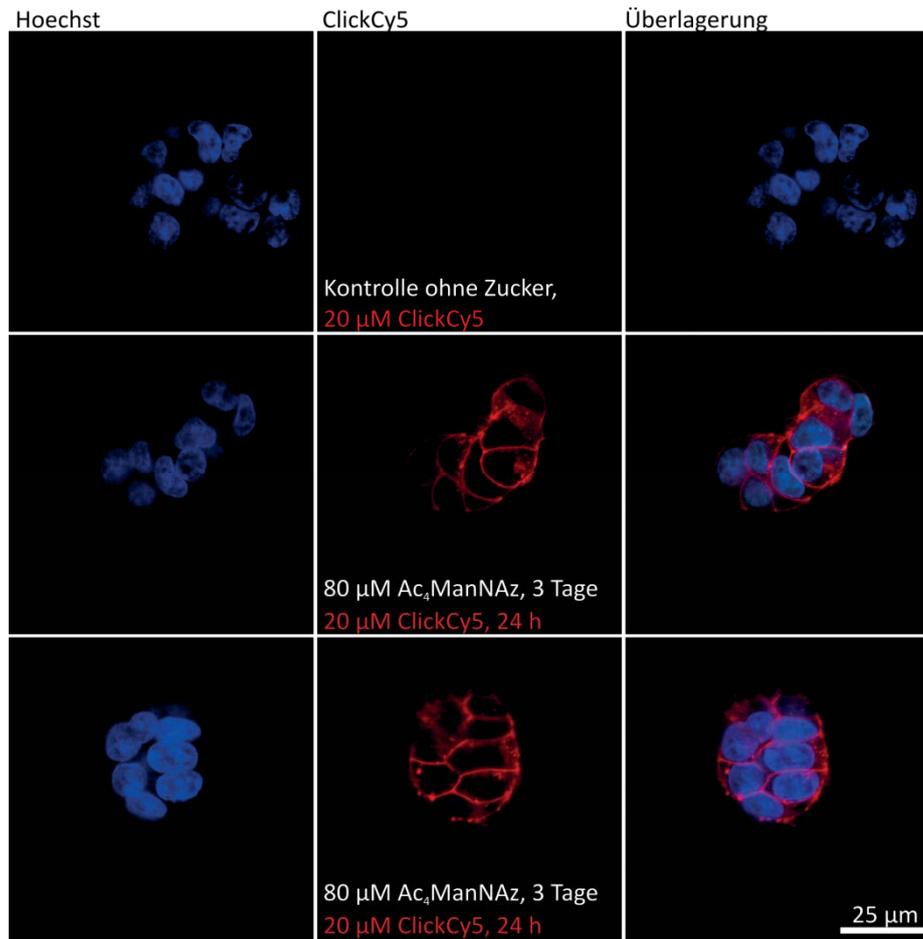
**Abbildung 4.1.11| Glykolabeling bei SHSY5Y Zellen (humane Neuroblastomzellen) mit 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC (24 Stunden).**  $1 \times 10^4$  SHSY5Y Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  3 Tage bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 20  $\mu\text{M}$  ClickFITC 24 Stunden bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickFITCs betrug 495 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



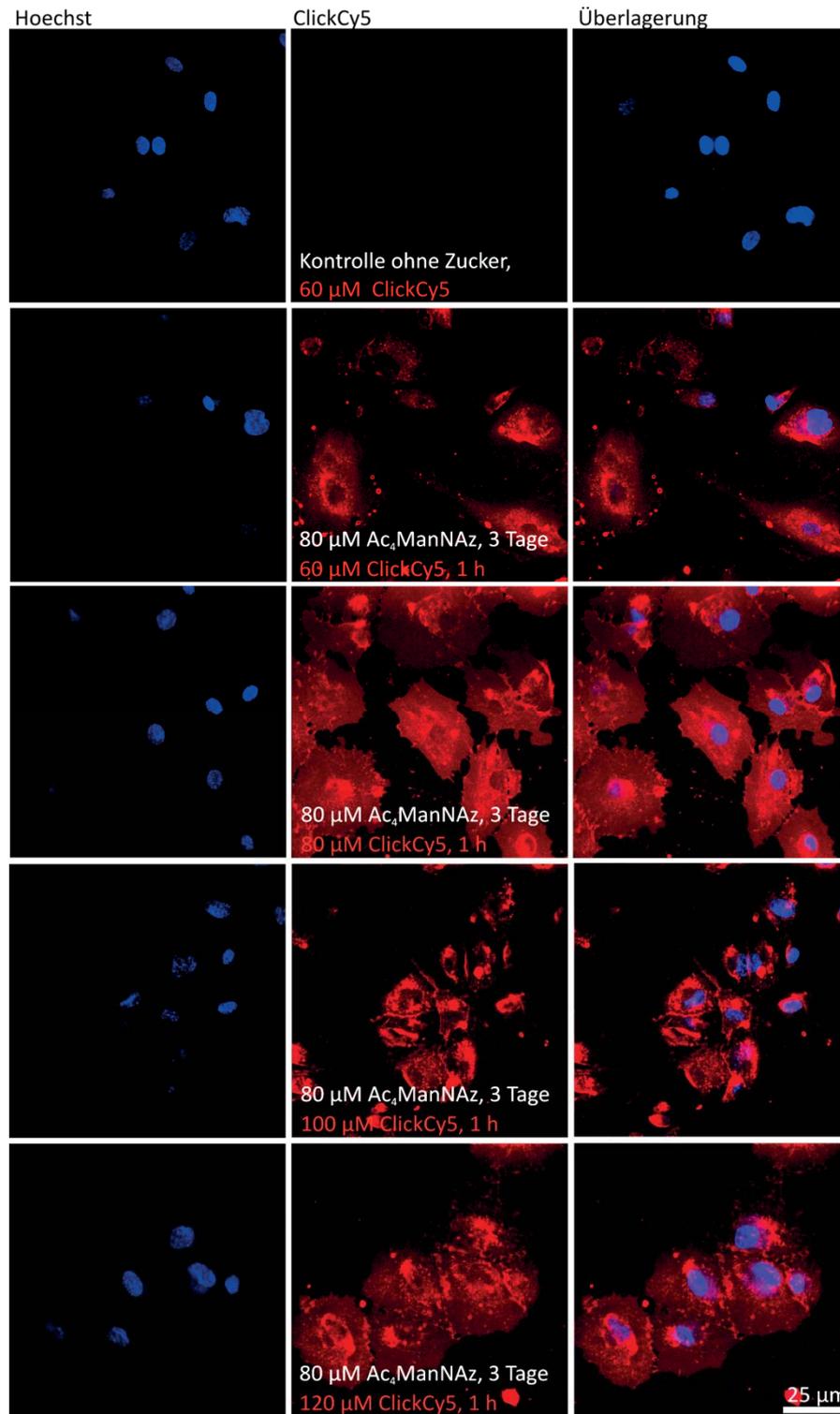
#### 4.1.1.1 Glykostrukturtopologisierung mittels ClickCy5



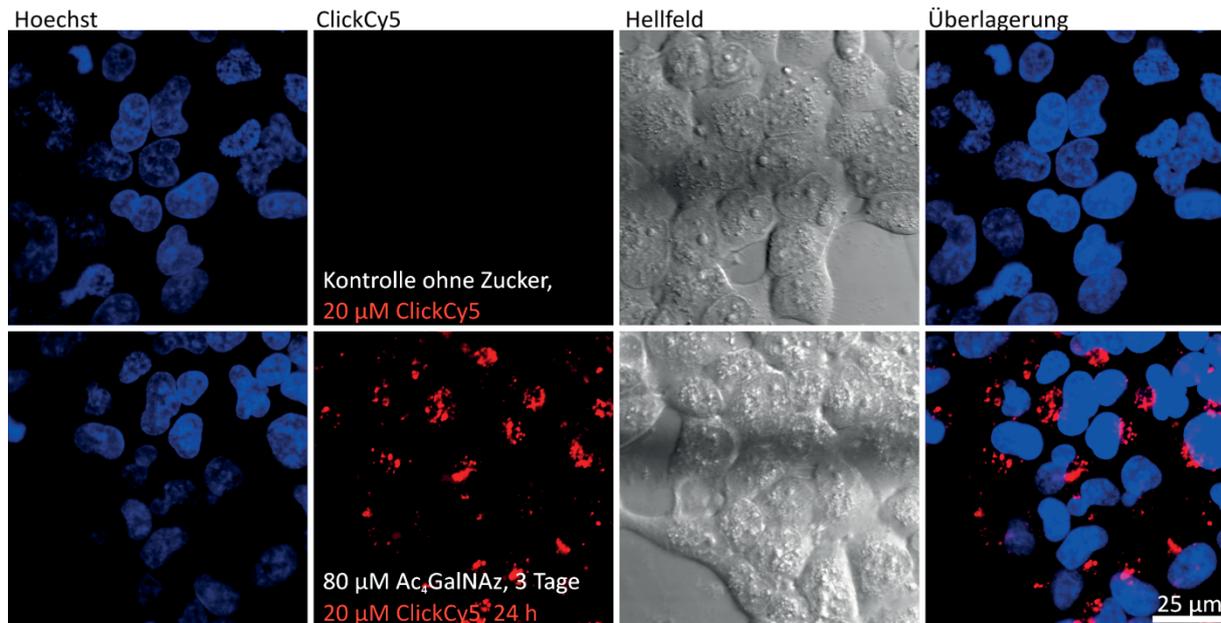
**Abbildung 4.1.12| Glykolabeling bei HeLa Zellen (humane Gebärmutterhalskarzinomazellen) mit 80, 100 und 120  $\mu\text{M}$  ClickCy5 (24 Stunden).**  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  3 Tage bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 20, 80, 100 und 120  $\mu\text{M}$  ClickCy5 24 Stunden bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickCy5 betrug 647 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



**Abbildung 4.1.13| Glykolabeling bei HepG2 Zellen (humane Leberkarzinomazellen) mit 20  $\mu$ M ClickCy5 (24 Stunden).**  $1 \times 10^4$  HepG2 Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu$ M Ac<sub>4</sub>ManNAz 3 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 20  $\mu$ M ClickCy5 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickCy5 betrug 647 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop).



**Abbildung 4.1.14| Glykolabeling bei HUVEC Zellen (humane Nabelschnurendothelzellen) mit 60, 80, 100 und 120  $\mu\text{M}$  ClickCy5 (1 Stunde).**  $1 \times 10^4$  HUVEC Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbiTreat) mit 80  $\mu\text{M}$  Ac<sub>4</sub>ManNAz 3 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 60, 80, 100 und 120  $\mu\text{M}$  ClickCy5 1 Stunde bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickCy5 betrug 647 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop). Kleine Vesikel konnten in der perinuklearen Region der Zelle beobachtet werden.



**Abbildung 4.1.15| Glykolabeling bei SHSY5Y Zellen (humane Neuroblastomzellen) mit 20 µM ClickCy5 (24 Stunden).**  $1 \times 10^4$  SHSY5Y Zellen wurden in einer 8-Well-ibidi-Platte (IbidiTreat) mit 80 µM  $Ac_4GalNAz$  3 Tage bei 37 °C und 5%  $CO_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-3mal mit Medium gewaschen und mit 20 µM ClickCy5 24 Stunden bei 37 °C und 5%  $CO_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut 2-3mal mit PBS (-/-) gewaschen und 15 Minuten mit 0,5 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) behandelt. Die Anregungswellenlänge des ClickCy5 betrug 647 nm. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa 360 nm (*Leica SP5*, Inversmikroskop). Kleine Vesikel konnten in der perinuklearen Region der Zelle beobachtet werden.

Zunächst zeigte sich bei allen Zelllinien eine charakteristische Anfärbung der Zellmembran, wobei ein deutlich stärkerer Einbau von  $Ac_4ManNAz$  gegenüber  $Ac_4GalNAz$  zu erkennen war. So konnte mit Hilfe der intramolekularen Cu-freien bio-orthogonalen Click-Reaktion mit ClickFITC die Glykokalyx zwar deutlich angefärbt werden, jedoch waren zum Teil auch kleine Vesikel im Inneren einiger Zellen zu erkennen. Es wird davon ausgegangen, dass der Azidozucker ( $Ac_4GalNAz$  bzw.  $Ac_4ManNAz$ ) nach drei Tagen bereits vollständig metabolisiert war. Durch die relativ hohe Konzentration an ClickFITC wurde die Glykokalyx der HeLa, HepG2, HUVEC und SHSY5Y Zellen angefärbt. Deutlich zu erkennen war unter anderem, dass die Emissionswellenlänge des Hoechst Farbstoffes 33342 leicht in die des ClickFITCs streute. Daher war es sehr wichtig bei den nachfolgenden „live“-Aufnahmen des gleichen Bildausschnittes den UV-Laser auszuschalten, um keine überlappende Fluoreszenz zu erzeugen. In Abbildung 4.1.2, Abbildung 4.1.3, Abbildung 4.1.5, Abbildung 4.1.6, Abbildung 4.1.6 und Abbildung 4.1.9 konnte eine deutliche Färbung der Glykokalyx beobachtet werden. Hinzu kommt, dass bei diesen Aufnahmen die Zellmembranen intensiver gefärbt waren als das Innere der Zelle. Bei einer Erniedrigung der ClickFITC Konzentration von 20 µM auf 4 µM konnte ebenfalls die Glykokalyx visualisiert werden (Abbildung 4.1.3). Allerdings war die Markierung nicht so stark wie bei der Markierung mit 20 µM ClickFITC. Eine Besonderheit ist vor allem, dass ClickFITC die Zellmembran im lebenden System nicht passieren kann. Dadurch konnten die fluoreszierenden intrazellulären Vesikel im perinuklearen Bereich der Zellen den Endosomen zugeschrieben werden, die bereits das gekuppelte Click-



Produkt endozytieren konnten. Aus diesem Grund wurden die Inkubationszeiten des ClickFITCs verkürzt und gleichzeitig die Konzentration erhöht (Abbildung 4.1.7). Dennoch konnte auch bei der Kurzfärbung der HUVEC Zellen von nur einer Stunde mit 80  $\mu\text{M}$  ClickFITC eine Click-Reaktion an der Zellmembran detektiert werden. Obwohl die Reaktionszeit deutlich verkürzt werden konnte, ist sie dennoch im Vergleich zu anderen SPAAC fähigen Cyclooctinen, die in den letzten Jahren von C. Bertozzi und Mitarbeitern vorgestellt wurden, relativ langsam. (Sletten and Bertozzi 2011) Dabei wurden DIFO 488 (Difluorcyclooctin, 100  $\mu\text{M}$ , 1 Minute) und BARAC (Biarylazacyclooctin)-Fluorescein (5  $\mu\text{M}$ , 5 Minuten) als Cyclooctine in der Markierung von HeLa Zellen eingesetzt. Trotz der langsameren Click-Reaktion der hier vorgestellten Cyclooctine gibt es jedoch auch Vorteile. Sowohl das oben erwähnte BARAC als auch das Difluorcyclooctin sind gegenüber den hier vorgestellten Cyclooctinen synthetisch sehr aufwendig und auch deutlich instabiler. Die Synthese der beiden vorgestellten Cyclooctine ist dreistufig, einfach und erfolgt fast quantitativ. (Hagendorn 2014; Kaufmann 2012) Zur Ermittlung der Einbauraten der Azidozucker und damit der Präsenz der biosynthetischen Zucker in der Glykokalyx wurde in Zusammenarbeit mit Markus Reischl vom Institut für Angewandte Informatik und Urban Liebel und Ravindra Peravali, Institut für Toxikologie und Genetik, ein automatisiertes Screening- und Quantifizierungs-verfahren des Einbaus von  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  gegenüber  $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  in die Glykokalyx der Plasmamembran einer Vielzahl verschiedener Zelllinien entwickelt. Mit Hilfe qualitativen optischen Analyse konnten signifikante Unterschiede zwischen der Einbaurate von  $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  und  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  besonders bei HUVEC und SHSY5Y Zellen sowie Meb4 Melanomzellen beobachtet werden. Im entsprechenden Vergleich der Einbaumuster von  $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  und  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  zwischen verschiedenen Zelllinien konnten bei den Tumorzellen wie z.B. HeLa, HepG2 keine größeren Unterschiede festgestellt werden. Primäre Zellen wie z.B HUVECs und SHSY5Y sowie Meb4 zeigen dagegen veränderte Muster, die in weiteren Untersuchungen nun charakterisiert werden (Abbildung 4.1.8, Abbildung 4.1.14 und Abbildung 4.1.15). (Kaufmann 2012) Bei den HUVECs waren signifikante Differenzen der Färbung der äußeren Zellmembran erkennbar, die bisher nicht erklärt werden konnten und die Gegenstand weiterer Charakterisierungen sind. Der Grund dafür könnte sein, dass HUVECs eine relativ flache Zellform besitzen und eine konfokale Mikroskopie nicht den gewünschten Zellrand sondern auch Teile der Oberfläche der Zellen detektiert. Anders verhielten sich die Meb4 Zellen (Abbildung 4.1.8), in denen keine signifikante Fluoreszenz der Zellmembranen sondern eine gleichmäßige Verteilung des Fluorophors in Cytosol und im Kern beobachtet werden konnte. Möglicherweise kann das Cyclooctin und der damit verbundene Linker in Meb4 Zellen aufgenommen werden. Die weitere Charakterisierung dieser Beobachtung ist Gegenstand der Masterarbeit von Bettina Olshausen am Institut für Toxikologie und Genetik. Ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität der Glykokalyx konnte vor allem bei den SHSY5Y Zellen beobachtet werden. In allen Zelllinien konnte beobachtet werden, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen Konzentration des ClickFITCs und der Färbung der Glykokalyx gibt. An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass ClickFITC, das bereits in allen Proben auch



als Kontrolle eingesetzt wurde, ohne Lösungsmittel keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen zeigte. Jedoch konnten bei höheren Konzentrationen (80 und 100  $\mu\text{M}$ ) erste Stressreaktionen beobachtet werden, die durch die erhöhte Konzentration von circa 6% Dimethylformamid als Lösungsmittel, in dem ClickFITC gelöst wurde, induziert wurden. Eine entsprechende Kontrolle mit reinem DMF zeigte den gleichen zellulären Stress. Alle Kontrollen der Abbildung 4.1.2 bis Abbildung 4.1.10 wurden mit ClickFITC ohne Zuckerinkubation durchgeführt.

Parallel zu den qualitativen Untersuchungen mit ClickFITC wurde das zweite Cyclooctingrundgerüst getestet, das sich besonders zur Ankupplung gängiger positiv geladener Fluorophore eignet. Geladene Fluorophore sind in der Regel deutlich besser wasserlöslich und daher für die Inkubation in lebenden Organismen, wie z.B. dem Zebrafisch besser geeignet, da auf Lösungsmittel wie DMF verzichtet werden kann. Bei der SPAAC mit ClickCy5 waren sehr starke Ähnlichkeiten zur ClickFITC Färbung zu beobachten. Beide Grundgerüste sind für die Click-Reaktion an der Plasmamembran geeignet. Allerdings zeigten sich besonders in der Intensität der Fluoreszenz Unterschiede, die durch erhöhte Konzentrationen ausgleichbar war. Bei den HeLa Zellen konnte allerdings erst bei einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  ClickCy5 eine signifikante Markierung der Zellmembranen detektiert werden (Abbildung 4.1.12). Eine höhere Konzentration als 80  $\mu\text{M}$  ClickCy5 versprach keine intensivere Färbung der Zellmembranen. Allerdings wurde beobachtet, dass die Fluoreszenz von kleinen roten Vesikeln im Inneren der Zelle mit steigender Konzentration an ClickCy5 zunahm. In den HepG2 Zellen dagegen wurde eine intensive Glykokalyxmarkierung beobachtet (Abbildung 4.1.13). Je nach Einstellung des Fokus waren bei den HUVECs einzelne äußere Zellmembranen zu beobachten. Außerdem war in den HUVECs die Fluoreszenz im Inneren der Zelle viel stärker als an der Zellmembran (Abbildung 4.1.14). Ein deutlicher Unterschied zu den anderen Zelllinien wurde letztendlich bei den SHSY5Y Zellen gezeigt (Abbildung 4.1.15). Obwohl die Glykokalyx bei dieser Zelllinie mit ClickCy5 bei den ersten Markierungsversuchen nicht angefärbt werden konnte, waren trotzdem kleine rote, intensiv fluoreszierende Vesikel in den SHSY5Y Zellen zu beobachten. Die roten Vesikel im Inneren der Zellen ließen sich dadurch begründen, dass die Ladung des Fluorophors ein Andocken an die Plasmamembran und somit eine Endozytose begünstigt, bevor es zur SPAAC kommt. Ein Vergleich zwischen ClickFITC und ClickCy5 zeigt im wesentlichen eine bessere Click-Effizienz von ClickFITC, da eine vorzeitige unspezifische Endozytose des ClickCy5 die Konzentration im Medium schnell erniedrigt und damit höhere Konzentrationen an Click Reagenz zur effizienten Markierung der Azidozucker an der Plasmamembran benötigt werden. Während bei ClickFITC endosomale Fluoreszenz allein von der Internalisierung markierter Strukturen herrührt, zeigt ClickCy5 eine zusätzliche Akkumulation in den Endosomen durch unspezifische Endozytose. ClickCy5 eignet sich daher nur zur qualitativen Markierung der Plasmamembran. Es kann hier besonders in der Einzelmolekülmikroskopie und Spektroskopie (z.B. STED und FCS) eingesetzt werden, da in diesen Anwendungen nur die markierten Glykostrukturen betrachtet werden. Im Vergleich zum ClickFITC zeigte die Markierung mit ClickCy5 keine signifikanten Unterschiede zwischen  $\text{Ac}_4\text{GalManNAz}$ - und  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$ -metabolisierten Zellen,



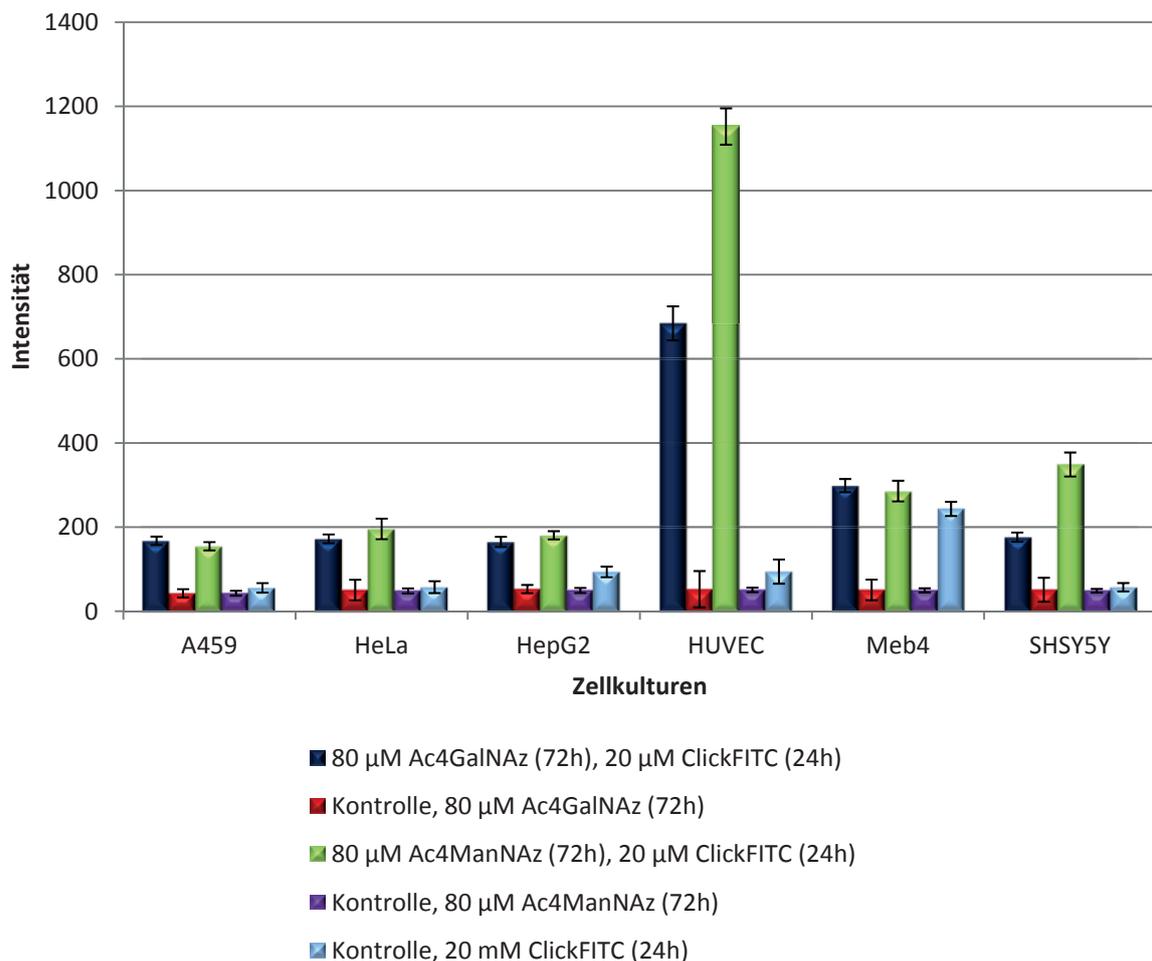
wodurch eine Verwendung von ClickCy5 in weiteren Quantifizierungen des Zuckereinbaus in die Glykokalyx ausgeschlossen wurde.

#### **4.1.2 Hochdurchsatzverfahren zur Quantifizierung von Glykostrukturen auf der Zellmembran**

Zur Ermittlung der Einbauraten der Azidozucker und damit der Präsenz der biosynthetischen Zucker in der Glykokalyx wurde in Zusammenarbeit mit Markus Reischl vom Institut für Angewandte Informatik und Urban Liebel und Ravindra Peravali, Institut für Toxikologie und Genetik, ein automatisiertes Screening- und Quantifizierungsverfahren des Einbaus von Ac<sub>4</sub>ManNAz gegenüber Ac<sub>4</sub>GalNAz in die Glykokalyx der Plasmamembran einer Vielzahl verschiedener Zelllinien entwickelt. Der grundsätzliche Ablauf des Hochdurchsatzverfahrens unterscheidet sich in erster Linie nicht in der Methode und den Reagenzien, die bereits oben schon beschrieben wurden. Vielmehr kann mit Hilfe dieses Verfahrens eine sehr große Anzahl an Bildern in nur einem Schritt mikroskopiert werden. Dazu wurden die Zellen in 96-Well-ibidi-Platten (IbiTreat) ausgesät. Es wurden 1x10<sup>4</sup> Zellen/Well auf eine 96-Well-ibidi-Platte ausgesät und für drei Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre mit dem entsprechenden Azidozucker (80 µM) inkubiert. Das Zellvolumen pro Well betrug 200 µl. Bei HUVEC Zellen wurden 5x10<sup>4</sup> Zellen/Well ausgesät. Nach der Azidozucker-Inkubation musste die Platte 2mal mit je 100 µl PBS (-/-) gewaschen werden. Danach wurden die Wells mit 20 µM ClickFITC für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre behandelt. Nach der Click-Inkubation mussten die Zellen erneut mit 100 µl PBS (-/-) gewaschen werden. Nach dem Waschen wurden schließlich die Zellkerne mit 0,5 µg/ml Hoechst 33342 für 5 Minuten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre angefärbt. Schließlich wurden die Proben direkt nach der Inkubation gemessen und ausgewertet. Mit einer Konzentration von 80 µM ClickFITC war es möglich, die Färbezeit auf 1 bis 3 Stunden zu verkürzen. Damit ließen sich viele parallele Experimente mit unterschiedlichen Zelllinien durchführen. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Olympus ScanR-Mikroskops detektiert. Das Mikroskop zeichnete sich dadurch aus, dass es sowohl einen Autofokus, wie auch einen automatischen Objektisch besaß, um so die Zellen vollautomatisiert aufzunehmen. Die Bilder wurden zunächst im IrfanView betrachtet und sortiert. Somit wurden bereits unscharfe oder überbelichtete Aufnahmen selektiert und entfernt. Außerdem wurden auch diejenigen Bilder im Voraus aussortiert, bei denen keine Zellen zu erkennen waren und in denen nur apoptotische Zellen vorlagen. Für die Auswertung wurde ein speziell für Quantifizierung von fluorophoren an der Zelloberfläche entwickeltes Programm verwendet. Das Skript dazu wurde von Markus Reischl am Institut für Angewandte Informatik (IAI) programmiert und basiert auf einer MatLab Anwendung. Die automatisierte Bildverarbeitung erkennt und zählt die mit Hoechst 33342 markierten Zellkerne, die sich in Größe und Helligkeit von dem Hintergrund unterscheiden. Im nächsten Schritt wurden um die erkannten Zellkerne in einem bestimmten Abstand mehrere konzentrische Kreise gezogen. Dadurch ergaben sich Flächen, die zum einen das endosomale/lysosomale Kompartiment und zum anderen



die Plasmamembran statistisch abdecken. In den Flächen wird die Fluoreszenzintensität gemessen und mit der Fluoreszenzintensität des Hintergrunds verglichen werden. Parallel dazu wurde eine Hintergrundkorrektur durchgeführt, da die Zellaufnahmen im Hintergrund trotz gleicher Messparameter durch einen automatischen Helligkeitsausgleich variierten. Das Skript wurde so programmiert, dass alle Experimente getrennt und identisch analysiert werden konnten. Es wurden jeweils zwei Helligkeitswerte pro Well ausgegeben (einen Helligkeitsbereich von einem engeren und einen weiter entfernten Bereich). Außerdem wurde ein Wert für die analysierte Pixelzahl berechnet, der proportional zur Zellzahl des jeweiligen Bildausschnittes war. Dies ermöglichte, dass jede einzelne Zelle gleich stark in die Auswertung mit einfluss.



**Abbildung 4.1.16| Auswertung der ClickFITC-Inkubation mit Hilfe des Hochdurchsatzverfahren.**

So konnte mit Hilfe der verschiedenen Flächenauswertungen eine deutliche Fluoreszenzintensität an der Plasmamembran und im endosomalen/lysosomalen System detektiert werden. Wie aber bereits bei der qualitativen Analyse gezeigt werden konnte, stammt die endosomale/lysosomale Fluoreszenz von bereits internalisierter Plasmamembran und kann somit in eine gesamte Quantifizierung mit einbezogen werden. Wie ebenfalls in der qualitativen Auswertung gezeigt wurde, zeigte sich zunächst bei allen Zelllinien eine charakteristische Anfärbung der



Zellmembran, wobei ein deutlich stärkerer Einbau von Ac<sub>4</sub>ManNAz gegenüber Ac<sub>4</sub>GalNAz zu erkennen war. Im entsprechenden Vergleich der Einbaumuster von Ac<sub>4</sub>GalNAz und Ac<sub>4</sub>ManNAz zwischen verschiedenen Zelllinien konnten bei den Tumorzellen wie z.B. HeLa, HepG2 keine größeren Unterschiede festgestellt werden. Murine Meb4 zeigten in Analogie zur qualitativen Analyse dagegen veränderte Muster, die in weiteren Untersuchungen nun charakterisiert werden. Außerdem zeigte sich bei HUVECs ein deutlich erhöhter Einbau von Ac<sub>4</sub>GalNAz gegenüber Ac<sub>4</sub>ManNAz, während die anderen Zellen einen stärkeren Einbau von Ac<sub>4</sub>ManNAz zeigen (Abbildung 4.1.16). Außerdem konnte auch hier eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität in der ClickFITC Kontrolle der Meb4 Zellen festgestellt werden, was auf eine Aufnahme des Farbstoffes in diesen Zellen schließen lässt.

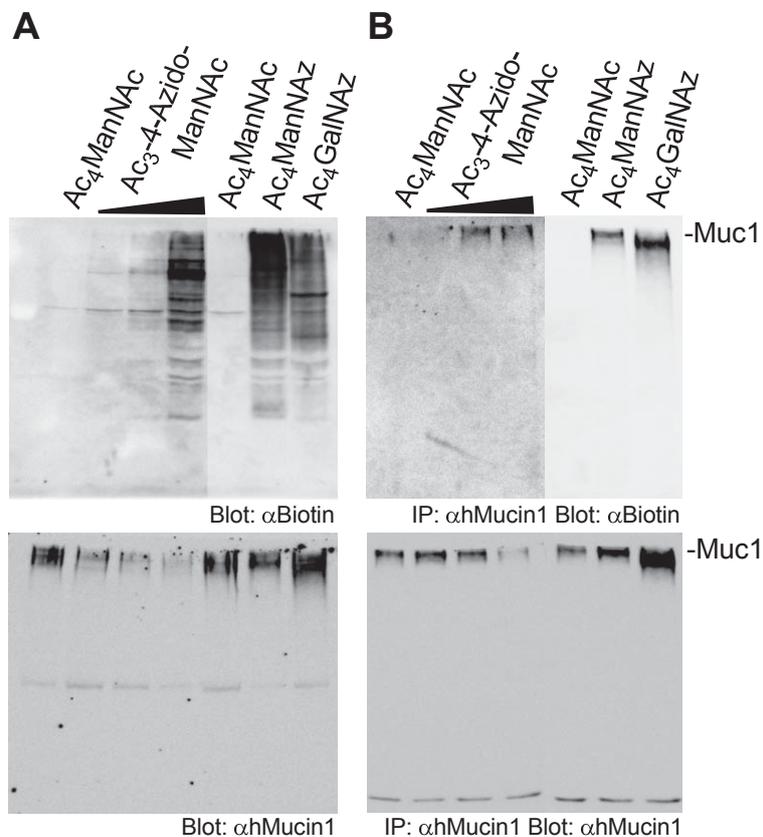
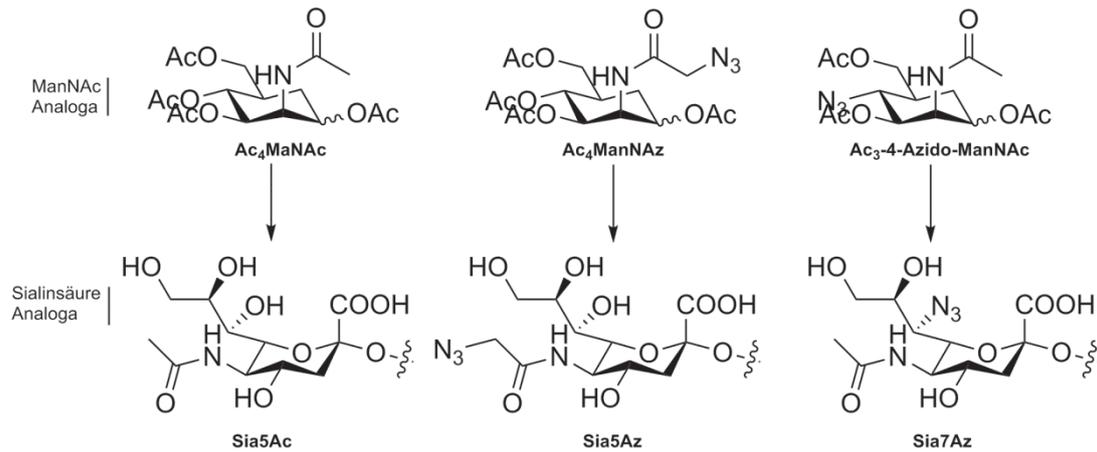
Ein wesentlicher Vorteil des Hochdurchsatzverfahrens ist, dass innerhalb weniger Wochen eine statistische Auswertung über den Einbau von spezifischen Azidozuckern gemacht werden konnte. Die Auswertung von Zellbildern mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ist wesentlich zeitaufwendiger. Eine erste Analyse verschiedener Zelllinien zeigt bereits Unterschiede in der Zuckermetabolisierung und der Präsentation der verschiedenen Zucker an der Zelloberfläche von Tumorzellen im Vergleich zu HUVECs und Meb4 Zellen. Basierend auf diesen ersten Experimenten werden nun Zell-Chips hergestellt, die eine ganze Bibliothek verschiedener Zellen umfassen. Zur ersten Etablierung der Methode mussten die Bilder aus dem Screening-Ansatz noch manuell sortiert werden. Weitere Verbesserungen der Methode werden daher nach Etablierung der Zellbibliothek durchgeführt.

## 4.2 Markierung von Glykan-gebundenen Sialinsäuren mit Hilfe der SPAAC

Neben Ac<sub>4</sub>GalNAz und Ac<sub>4</sub>ManNAz existiert bereits eine Vielzahl chemisch modifizierter Monosaccharide, die speziell für das metabolische Oligosaccharid-Engineering (MOE) entwickelt wurden. (Oetke et al. 2002) Dadurch können auch Zucker, die weitere funktionelle Gruppen tragen, welche unter natürlichen Bedingungen nach dem „Salvage pathway“ im Golgi und im sekretorischen System, sowie später an der Plasmamembran zugefügt werden, bioorthogonal funktionalisiert werden. Anschließend können die funktionalisierten Zucker an der Plasmamembran in Analogie zu den oben aufgeführten Zuckern, Ac<sub>4</sub>GalNAz und Ac<sub>4</sub>ManNAz, individuell markiert werden. Vor allem die Sialinsäuren und deren metabolische Vorstufe ManNAc sind aufgrund der terminalen Position in den Glykoproteinen eine wichtige Ausgangsstruktur für das MOE. (Möller et al. 2012) Demnach sind bereits zahlreiche ManNAc-Derivate mit *N*-Acetyl-modifizierten Seitenketten bekannt, die über die Sialinsäurebiosynthese in die entsprechende Sialinsäure eingebaut werden. Folglich spielen die *N*-Acyl-Seitenketten in der Sialinsäurebiosynthese eine bedeutende Rolle. C9-modifizierte Sialinsäure-Derivate können direkt metabolisiert und an die Zelloberfläche gebracht werden. (Du et al. 2009; Han et al. 2005) Auch lassen sich sialinsäuretragende Glykane für Markierungsreaktionen selektiv spalten. Diese bisherigen Erkenntnisse führten zur Überlegung, ob es demnach möglich



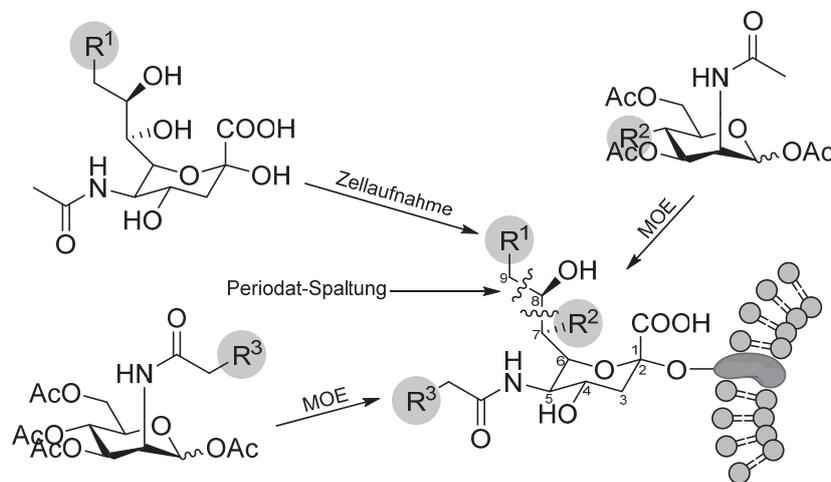
wäre, andere ManNAc-Derivate, die direkt am Zucker-Sechsring modifiziert sind, direkt in die Sialinsäurebiosynthese einzubauen. Dabei lag das Augenmerk auf der C4-Position, da diese Position bei der Glykoproteinsynthese enzymatisch nicht modifiziert wird und direkt C7-modifizierte sialinsäurehaltige Glykoproteine liefern würde. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Christian Hackenberger und Stephan Hinderlich ein C4-modifiziertes ManNAc-Derivat synthetisiert, das sogenannte *N*-Acetyl-4-azido-4-desoxymannosamin ( $Ac_3$ -4-Azido-ManNAc) (Abbildung 4.2.1). Nun stellte sich die Frage, ob es möglich wäre, diesen neu synthetisierten, C4-modifizierten Zucker nach der Metabolisierung in Sialinsäuren mit Hilfe der SPAAC zu visualisieren. Die Synthese wurde nach einer optimierten Literaturvorschrift durchgeführt. (Honda et al. 2002; Thomson and von Itzstein 1995b) Anschließend wurden Hek293 Zellen (Nierenkarzinomazellen) mit einem Mangel an UDP-*N*-Acetylglukosamin-2-Epimerase/MANNAc-Kinase (GNE) eingesetzt, um einen erhöhten Einbau von ManNAc-Derivaten im direkten Vergleich zu GNE-exprimierten Zellen zu beobachten. (Moller et al. 2011) GNE-defiziente Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Sialinsäuren nur aus ManNAc und dessen Derivaten aufbauen und kein ManNAc aus GlcNAc epimerisieren. Dadurch erzielt man bei der Gabe von ManNAc- und Sialinsäure-Derivaten eine höhere Einbaurate in die Glykokalyx. So wurden demnach GNE-defiziente und GNE-exprimierte Hek293 Zellen sowohl mit 100, 250 und 500  $\mu$ M  $Ac_3$ -4-Azido-ManNAc als auch mit peracetylierten  $Ac_4$ ManNAc (*N*-Acetylmannosamin) und  $Ac_4$ ManNAz (*N*-Azido-acetylmannosamin) behandelt. Damit die eingebauten Azidozucker quantifiziert und analysiert sowie visualisiert werden konnten, wurde die Plasmamembran isoliert und mit alkinyliertem Biotin umgesetzt. Außerdem wurden zur Markierung der membranständigen Zuckerstrukturen eine SPAAC mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO durchgeführt. (Rostovtsev et al. 2002; Sawa et al. 2006; Tornøe et al. 2002) Nach der Auftrennung der Proben mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnten die Azidoglykoproteine mit einem spezifischen anti-Biotin-Antikörper (Abnova) mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und mit der Western-Blot-Analyse detektiert werden (Abbildung 4.2.1). Im Gegensatz zu GNE-exprimierten Zellen konnte in den GNE-defizienten Zellen, die mit  $Ac_3$ -4-Azido-ManNAc behandelt wurden, ein konzentrationsabhängiges Signal beobachtet werden, das mit dem Signal der GNE-defizienten Zellen, die mit  $Ac_4$ ManNAz behandelt wurden, nahezu übereinstimmte (Abbildung 4.2.1). Diese Ergebnisse lieferten einen eindeutigen Beweis für den Einbau der  $Ac_3$ -4-Azido-ManNAc in extrazelluläre Glykoproteine durch die enzymatische Metabolisierung des neu synthetisierten, modifizierten Azidozuckers. Um rückständige Azidosialinsäuren an der Zelloberfläche zu detektieren, wurden die Zellen mit Alkynyl-Biotin behandelt. Es konnte jedoch kein Signal im Western-Blot (Abbildung 4.2.1) beobachtet werden. Daraus ließ sich schließen, dass  $Ac_3$ -4-Azido-ManNAc bereits in die C7-modifizierte Sialinsäure (7-Azido-7-desoxy-*N*-acetylneuraminsäure, Sia7Az) umgewandelt wurde. Denn Sialinsäuren und Glykosaminoglykane kommen bevorzugt in der Glykokalyx als anionische Komponenten vor. Außerdem zeigten anionische Oligosaccharide der apikalen Glykokalyx eine außerordentlich gute Barrierefunktion. ((Palte and Raines 2012)



**Abbildung 4.2.1| A**, Konzentrationsabhängiger Einbau peracetylierter (Ac<sub>3</sub>-, Ac<sub>4</sub>-)ManNAc-Analoga in Zelloberflächen-Glykoproteine von Mucin1-exprimierenden MCF7-Zellen. Die Zellen wurden drei Tage mit steigender Konzentration an Ac<sub>3-4</sub>-Azido-ManNAc (100, 250 und 500  $\mu$ M) bzw. Ac<sub>4</sub>ManNAc, Ac<sub>4</sub>ManNAz und Ac<sub>4</sub>GalNAz (je 500  $\mu$ M) behandelt. Die Zelloberflächen-Glykoproteine wurden mit Biotin markiert. Mittels Western-Blot-Analyse konnten Azid-modifizierte Sialinsäuren oder GalNAz in Glykoproteinen beobachtet werden (oben). Mit Hilfe des Immunoblottings wurde eine membranassoziierte Mucin1-Expression beobachtet (unten). **B**, Einbau von Ac<sub>3-4</sub>-Azido-ManNAc in Glykane löslichen, O-glykosylierten Mucin1. Dabei wurde Mucin1 aus den mit Azidzuckern behandelten MCF7-Zellen gelöst und nach der Immunpräzipitation in einer CuAAC mit Alkynyl-Biotin versetzt und mittels Western-Blot-Analyse visualisiert.



Zur Bestimmung des Einbaus an Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc in die Glykoproteine der Zelloberfläche wurden die mit dem Azidozucker behandelten Membranen mit Hilfe der HPLC (*high pressure laser chromatography*) analysiert. Da dieses Projekt eine Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Christian P. R. Hackenberger von der Freien Universität Berlin und der von Stephan Hinderlich der Beuth Hochschule für Technik in Berlin war, wurden dort die HPLC Messungen durchgeführt. Außerdem wurde hier auch die Identität von Sia7Az durch kombinierte Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS) bestätigt. (Möller et al. 2012) Mit Hilfe dieser Methoden wurde ein sehr hoher Anteil an eingebauten Sia7Az gefunden, woraus sich schließen lässt, dass sich Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc sehr gut als Sialinsäurevorläufer verstoffwechseln lässt. Außerdem wurde bewiesen, dass Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc bevorzugt in O-Glykane eingebaut wurde. Es gab bereits Studien, mit deren Hilfe die C7-Position in Sialinsäuren durch Periodat-Spaltung modifiziert werden konnte. Jedoch führte diese Modifikation immer zur Entfernung der C8- und C9-Positionen. (Zeng et al. 2009) Deshalb wurde ein C4-modifizierter Azidozucker (Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc) eingesetzt, der metabolisch in Sia7Az umgewandelt werden konnte. Dadurch wurde eine Funktionalisierung an der C7-Position ermöglicht (Abbildung 4.2.2). Interessanterweise wurde Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc nicht in N-glykosylierte Proteine eingebaut. Dennoch konnten sie in O-glykosylierten Proteinen nachgewiesen werden. Schließlich könnte Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc als Werkzeug zur spezifischen Markierung von O-gekuppelten Glykoproteine angewendet werden, wohingegen ManNAc-Derivate unspezifischer markieren.



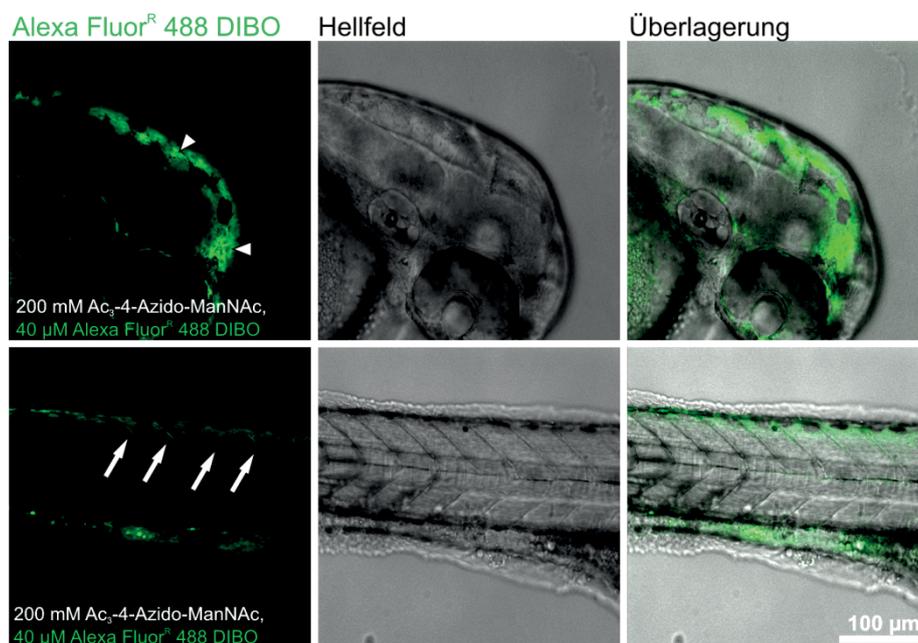
**Abbildung 4.2.2| Strukturmodifizierung über das metabolische Oligosaccharid-Engineering (MOE) von Glykan-gebundenen Sialinsäuren durch chemisch modifizierte ManNAc-Derivate.** Die C7-Position kann mittels Periodat-Spaltung modifiziert werden. (Zeng et al. 2009) Allerdings kommt es gleichzeitig zum Zersetzen der modifizierten Sialinsäure (linke Seite). Besser ist der Einbau von Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc (oben rechts), das direkt in modifizierte Sialinsäure-Derivate umgewandelt werden kann.

Damit eignen sich modifizierte Sialinsäuren neben ManNAz-Derivaten als effizientes Werkzeug, um die Glykokalyx mit Hilfe der CuAAC und SPAAC selektiv anzufärben und selektiv Sialinsäuren und damit Polysialinsäuren in lebenden Zellen und Organismen zu markieren. Im Zuge dieser Arbeiten wurde Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc auch für die Glykanmarkierung im Zebrafisch Embryo eingesetzt.



#### 4.2.1.1 Glykostrukturmarkierung im Zebrafisch

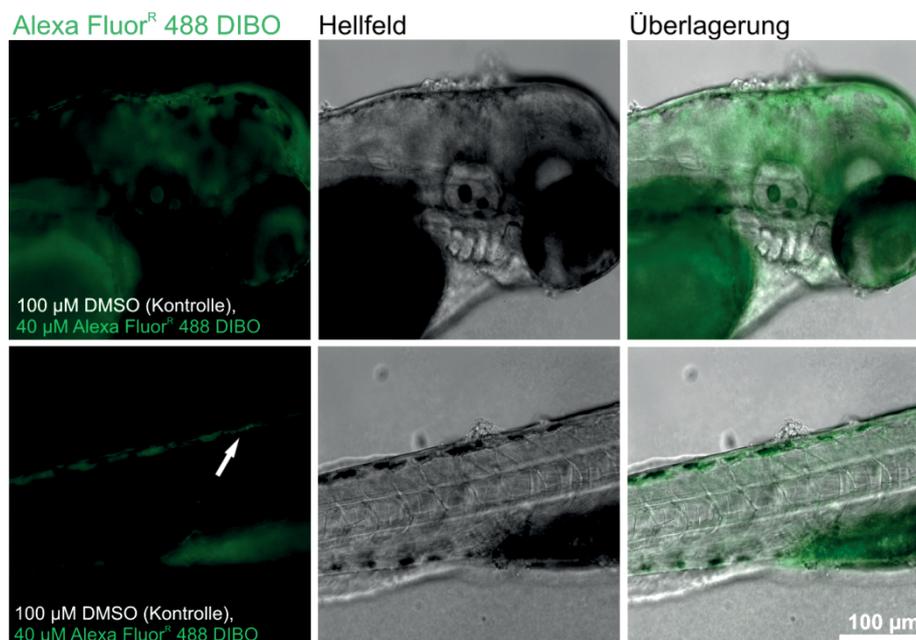
Um den Einbau von Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc in Zebrafisch Embryonen zu bestimmen, wurden zunächst Zebrafischbärblinge (*danio rerio*) unter Standardbedingungen gepaart (siehe Experimenteller Teil, Handhabung von Zebrafisch Embryonen). Der Zebrafischbärbling (*Danio rerio*) ist ein Vertreter der Cyprinidae aus der Familie der Karpfenfische. Seine ursprüngliche Heimat ist der vorderasiatische Raum (Pakistan, Indien, Bangladesch). In den 80iger Jahren wurde er von Georg Streißinger als Modellorganismus in der molekularen Biologie eingeführt. Heute gilt der Zebrafisch als eines der wichtigsten Modellorganismen in der Forschung von Vertebraten. Er wird vor allem eingesetzt, weil er klein, transparent und sich nach der Befruchtung schnell entwickelt. Außerdem besitzt er nur 24 Stunden nach der Befruchtung (24 hpf) bereits alle wichtigen Körperteile wie Vorderhirn, Mittelhirn, Hinterhirn, Rückenmark, Augen, *Chorda dorsalis*, Neuralrohr, Hauptblutgefäße, Herz, Magen-Darm-Trakt, Sinnesorgane, Rachen, Kiemenbogen, und Somiten. Auch können gezielte Punktmutationen im Zebrafischgenom durchgeführt werden. So lassen sich stabile mutante Zebrafischlinien mit sogenannten genetischen *Screens* durchführen. Die Funktionalisierung von Genen während der Embryogenese im Zebrafisch wurde bereits von Christiane Nüsslein-Volhard durchgeführt. (Nüsslein-Volhard 2012) Des Weiteren können auch Sequenzierungen des Zebrafischgenoms durchgeführt werden. Besonders für die Untersuchung von neurobiologischen Prozessen eignet sich der Zebrafisch sehr gut. Denn die neuronalen Grundbausteine des Gehirns sind im 24 hpf Zebrafisch Embryo bereits angelegt.



**Abbildung 4.2.3| In vivo Markierung von Zebrafischglykanen durch modifizierte Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc und Alexa Fluor® 488 DIBO.** Zebrafisch Embryonen wurden 24 hpf intraventrikulär mit 100 µM Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc injiziert. Danach wurden 48 hpf Zebrafisch Embryonen ebenfalls intraventrikulär mit 40 µM Alexa Fluor® 488 DIBO injiziert. So konnten eingebaute Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc markiert werden. Die Fluoreszenzmarkierung wurde in 72 hpf Zebrafisch Embryonen mit Hilfe eines ApoTomes.2 (Zeiss) analysiert. Die kurzen weißen Pfeile markieren das Mittel- und Hinterhirn. Die langen weißen Pfeile dagegen markieren schwach gefärbte dorsale Myosepta.



Die Expression spezifischer DNA-Bausteine kann mittels Injektion von DNA-Vektoren oder Morpholinos in den Dotter erfolgen. Da bis zum 4-Zellstadium keinen Übergang zwischen Dotter und Zellen gibt. Für die Durchführung der bioorthogonalen Alkin-Azid-Cycloaddition werden zunächst die modifizierten Azidozucker ( $Ac_4GalNAz$ ,  $Ac_4ManNAz$  und  $Ac_3-4-Azido-ManNAc$ ) in das Hinterhirn von 24 hpf Zebrafisch Embryonen injiziert. Die Zebrafisch Embryonen wurden zunächst in 0,1 mg/ml Tricaine (Sigma) anästhesiert, das in Embryomedium gelöst war. Dann wurden 24 hpf (engl. *hours post fertilization*, Stunden nach der Befruchtung) Zebrafisch Embryonen in den Hinterhirnventrikel mit 100  $\mu M$   $Ac_3-4-Azido-ManNAc$  (in DMSO gelöst) injiziert. Als Kontrolle wurde nur 100  $\mu M$  DMSO injiziert. Danach wurden 48 hpf Zebrafisch Embryonen mit 40  $\mu M$  Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO ebenfalls in den Hinterhirnventrikel injiziert. Dabei clickt Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO in einer SPAAC an die Azid-Gruppe des modifizierten Azidozuckers. Danach konnten die lebenden Embryonen 72 hpf mit Hilfe eines ApoTomes.2 (Zeiss) analysiert werden. Es konnte eine signifikante Markierung der Glykanstrukturen im Mittel- sowie im Hinterhirn beobachtet werden (Abbildung 4.2.3), obwohl in den Kontroll Embryos eine leichte Hintergrundfärbung des gesamten Zebrafisch Embryos zu erkennen war (Abbildung 4.2.4). Zusätzlich wurde eine schwache Färbung der dorsalen Myosepta beobachtet (lange weiße Pfeile in Abbildung 4.2.3).



**Abbildung 4.2.4| In vivo Markierung von Zebrafischglykanen mit DMSO und Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO.** Zebrafisch Embryonen wurden 24 hpf intraventrikulär mit 100  $\mu M$  DMSO injiziert. Danach wurden 48 hpf Zebrafisch Embryonen ebenfalls intraventrikulär mit 40  $\mu M$  Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO injiziert. Diese Abbildung sollte als Kontrolle eingesetzt werden. Die Fluoreszenzmarkierung wurde in 72 hpf Zebrafisch Embryonen mit Hilfe eines ApoTomes.2 (Zeiss) analysiert. Obwohl keine Click-Reaktion in den Kontrollfischen stattfand, konnte jedoch eine schwache Hintergrundfärbung beobachtet werden. Die langen weißen Pfeile zeigen sehr schwach gefärbte dorsale Myosepta.

Durch die Markierung von Teilen des zentralen Nervensystems (ZNS) und der Myosepta konnte der Einbau von  $Ac_3-4-Azido-ManNAc$  in Sialinsäuren von stark O-glykosylierten Proteinen gezeigt werden. (Moore et al. 2008) Damit der spezifische

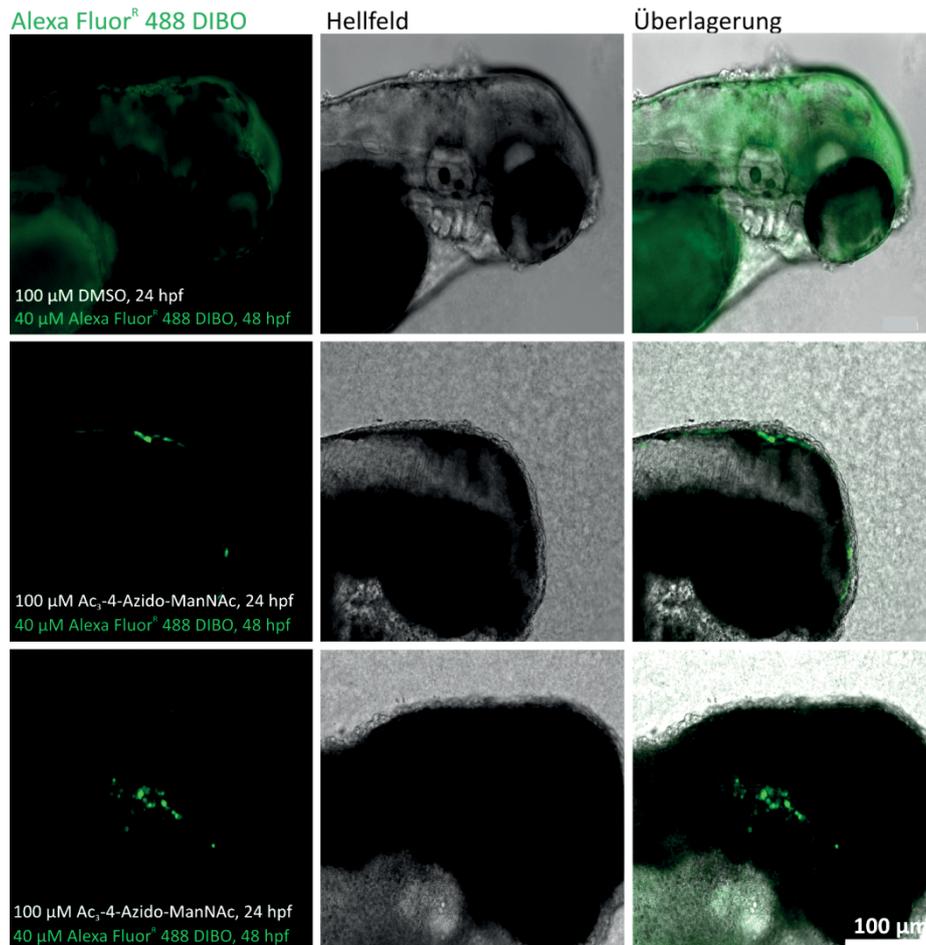


Einbau von Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc in Sialinsäuren O-glykosylierter Proteine sowohl in Säugerzellen als auch im Zebrafisch Embryo genauer bewiesen werden könnte, sind weitere detaillierte biochemische Studien notwendig. Die ersten Ergebnisse zeigten, dass Ac<sub>3</sub>-4-Azio-ManNAc auch im Zebrafisch in polysialinsäurehaltige Strukturen des Hirns metabolisiert wurde und mit SPAAC nachgewiesen werden konnte. Außerdem wurde die Umwandlung des C4-modifizierten Azidozuckers in C7-modifizierte Sialinsäuren gezeigt (Abbildung 4.2.2).

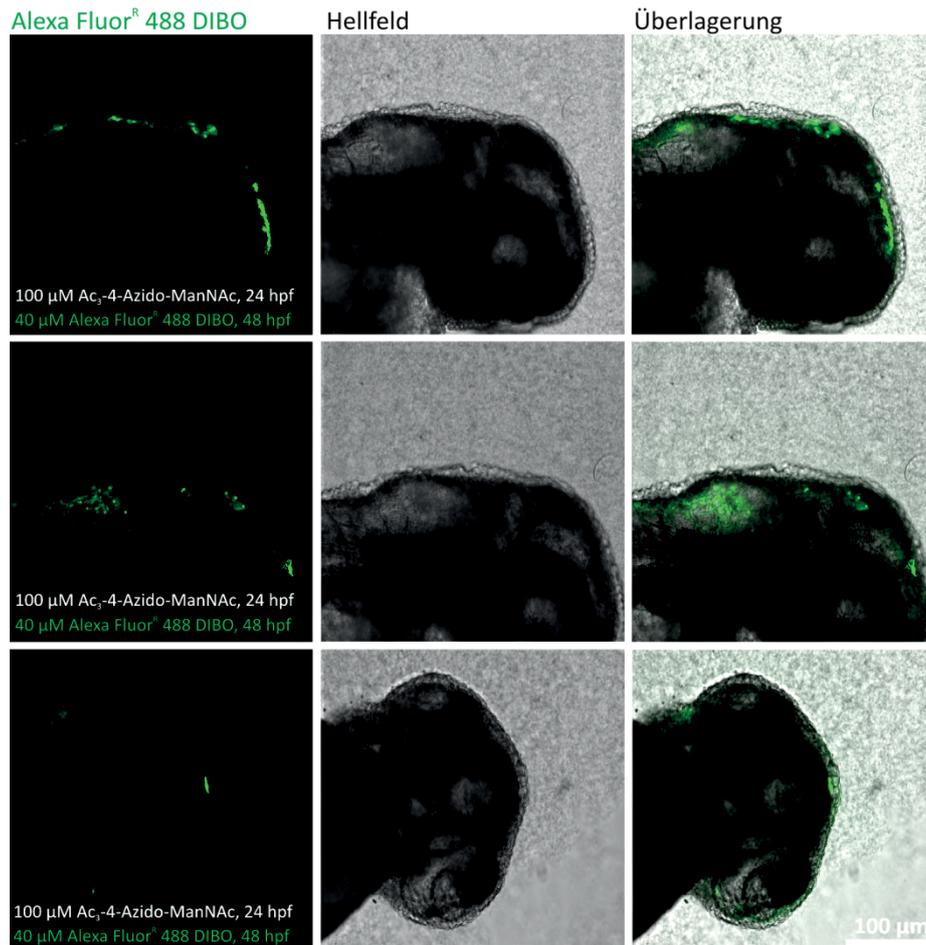
Darüber hinaus wurden weitere Versuche im Zebrafisch Embryo durchgeführt. Denn es stellte sich die Frage, inwiefern die in Abbildung 2.4.2 modifizierten Azidozucker *in vivo* anwendbar sind. Könnte mit Hilfe der SPAAC andere Regionen oder sogar spezifische Organe im Zebrafisch Embryo angefärbt werden? Was würden die modifizierten Azidozucker während der Zebrafisch Entwicklung markieren? Gäbe es Hinweise auf einen spezifischen Einbau dieser Azidozucker? Um all diese Fragen beantworten zu können, wurde eine Serie von Experimenten gestartet, die in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben werden. Zum einen sollte bei dieser Versuchsreihe intramolekulare Glykane im Zebrafisch Embryo *in vivo* mit Hilfe der Cu-freien bioorthogonalen Azid-Alkin-Cycloaddition markiert werden. Dazu ließen sich sowohl die neu modifizierten Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc als auch Ac<sub>4</sub>GalNAz und Ac<sub>4</sub>ManNAz in den Zebrafisch Embryo einbauen. Im Abschnitt 4.2 wurde bereits gezeigt, dass vor allem Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc und Ac<sub>4</sub>ManNAz in den Zebrafisch eingebaut wurden. Zebrafisch Embryonen wurden 24 hpf intraventrikulär mit 100 µM Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc, Ac<sub>4</sub>ManNAz bzw. DMSO (Kontrolle) injiziert. Danach wurden 48 hpf Zebrafisch Embryonen intraventrikulär mit 40 µM Alexa Fluor® 488 DIFO injiziert. Schließlich wurde die Fluoreszenzmarkierung in 72 hpf Zebrafisch Embryonen mit Hilfe eines ApoTomes.2 (Zeiss) analysiert. Die obere Zeile der Abbildung 4.2.5 zeigte eine leichte Hintergrundfluoreszenz der Kontroll-Zebrafisch Embryonen im gesamten Zebrafisch. Dennoch konnte in der mittleren Zeile der Abbildung 4.2.5 eine klare Fluoreszenz im Vorderhirn beobachtet werden. Wohingegen in der untersten Zeile dieser Abbildung eine deutliche Fluoreszenzmarkierung im Mittelhirn detektiert werden konnte. Des weiteren wurde eine klare Fluoreszenz in den olfaktorischen Bereichen, im Rachenbereich und im Kiemenbogen detektiert (unterste Zeile der Abbildung 4.2.6). In der Abbildung 4.2.6 wurde die Kontrolle weggelassen, da sie der Kontrolle der Abbildung 4.2.5 entsprach. Neben den Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc wurden auch Ac<sub>4</sub>ManNAz im lebenden Zebrafisch Embryo ausgetestet. Interessanterweise konnte eine signifikante Färbung der Myosepta in 72 hpf Zebrafisch Embryonen nachgewiesen werden (Abbildung 4.2.7). In Abbildung 4.2.8 konnte in den Kontroll-Zebrafischen keine posteriore Fluoreszenzmarkierung detektiert werden. Allerdings zeigte die Schuppenschicht und das Rückenmark eine deutliche Fluoreszenz. Außerdem wurde im gesamten Zebrafisch eine Pigmentierung beobachtet. Diese Pigmentierung könnte eventuell zu einer Fehlinterpretation führen, da glykangebundene Glykoproteine dadurch nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Darüber hinaus wurde in der Abbildung 4.2.9 eine durchgängige Fluoreszenzmarkierung entlang des Rückenmarks und der *Chorda dorsalis* (*chorda* = Darm, *dorsum* = Rücken, auch Notochord genannt) und des Neuralrohr beobachtet werden. Das Neuralrohr entsteht bereits in



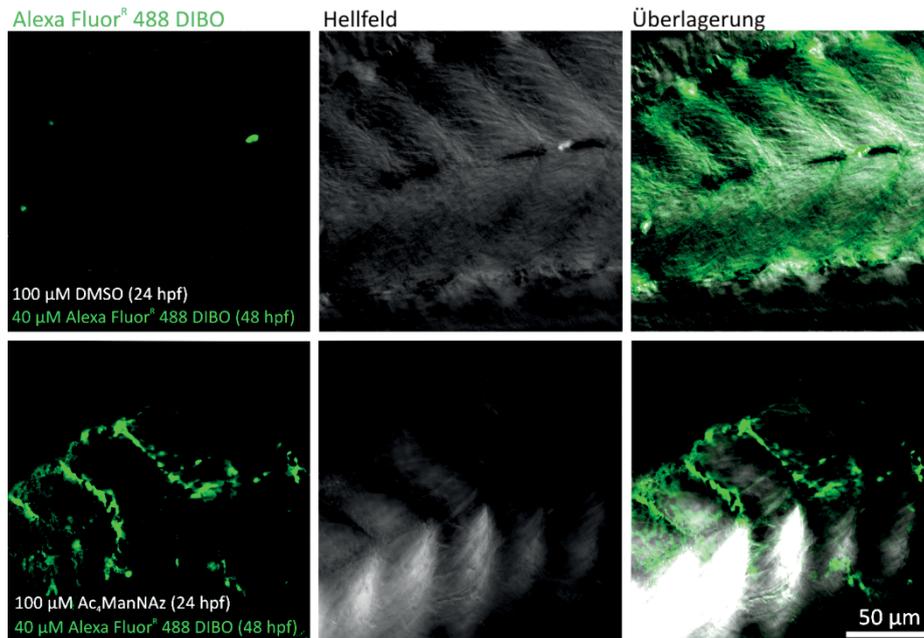
der ersten Entwicklungsstufe des ZNS von Wirbeltieren. Es entsteht durch eine Einwölbung des Ektoderms an der Neuralplatte. Aus dem Neuralrohr werden letztendlich Rückenmark und das Gehirn gebildet. Dagegen bildet sich aus dem Lumen (Innenraum) des Neuralrohres das Ventrikelsystem des Gehirns und der Zentralgang des Rückenmarks. Dagegen liegt der *Chorda dorsalis* im frühen Entwicklungsstadium zwischen Neuralrohr und Kiemen-Darm. Es dient zum Schutz, zur Festigkeit und als Ansatzpunkt für die Muskulatur. Bei allen Vertebraten wird der *Chorda dorsalis* embryonal angelegt, bildet sich aber während der Ontogenese (Individualentwicklung) meist vollständig zurück. Es induziert außerdem die Bildung des Neuralrohres (Nervenbahn), das sich wiederum zum ZNS aus Rückenmark und Gehirn entwickelt. Ac<sub>4</sub>GalNAz-behandelte Zebrafische zeigten keine signifikanten Markierungen. Aus diesem Grund wurden sie an dieser Stelle nicht in dieser Arbeit mit aufgenommen. Eine große Fehlerquote bei der Durchführung dieser Experimente lag darin, dass durch zweimalige Mikroinjektion der Zebrafische zunächst mit den unnatürlich modifizierten Azidozuckern (24 hpf) und dann mit dem Click-Reagenz behandelt wurden. Das heißt, dass der Zebrafisch zweimal innerhalb kürzester Zeit anästhesiert werden musste. Auch konnte während der Mikroinjektion nicht genau nachgewiesen werden, ob der modifizierte Azidozucker nach 24 Stunden metabolisiert war. Dennoch wurde eine starke Fluoreszenz im anterioren Bereich des Zebrafisches detektiert. So wurden neben Mittel- und Hinterhirn, auch Teile des Rückenmarks, der Myosepta und der olfaktorischen Organe, wie die des Rachen- und Kieferbogens, detektiert. Die Zebrafisch Embryonen zeigten in allen Experimenten keine toxischen Effekte gegenüber den Azidozuckern. Ebenso war auch das eingesetzte Alkinylierte-Fluorophor (Alexa Fluor® 488 DIBO) nicht toxisch. Hirnventrikel, die mit den entsprechenden modifizierten Azidozucker (Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc, Ac<sub>4</sub>GalNAz und Ac<sub>4</sub>ManNAz) injiziert wurden, sind mit Hirnwasser (*liquor cerebro spinalis*) gefüllte Hohlräume. Sie bilden zusammen mit dem Rückenmarkskanal den inneren Liquorraum, der sich wiederum in dem Zentralkanal des Rückenmarks fortsetzt. Lokalisiert ist er im Rhombencephalon (großes Rautenhirn), der wiederum zum ZNS gehört und mit dem Subdrachnoidalraum (spaltförmige Raum des ZNS) in Verbindung steht.



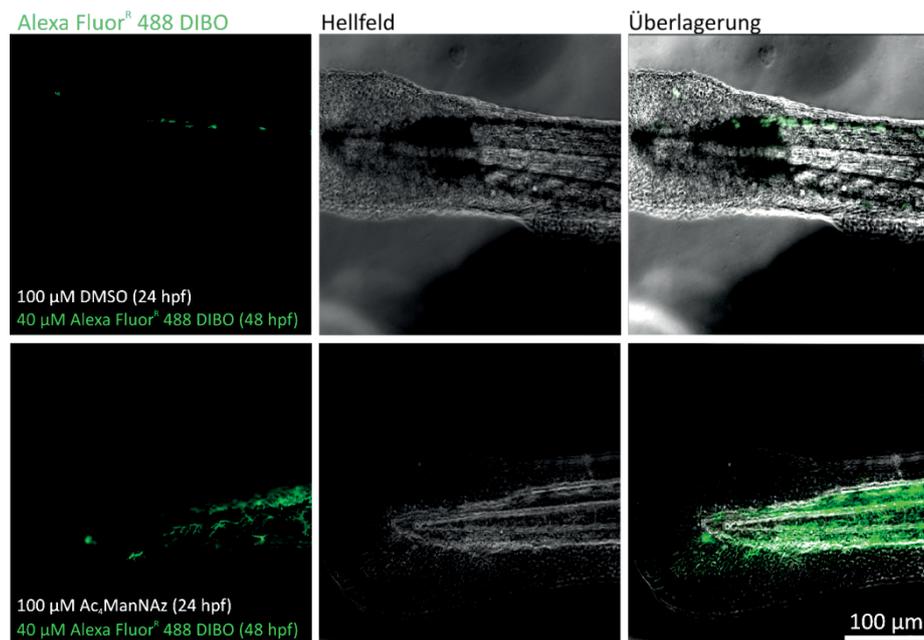
**Abbildung 4.2.5| *In vivo* Markierung von Zebrafischglykanen mit Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc und Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO.** Zebrafisch Embryonen wurden 24 hpf intraventrikulär mit 100  $\mu$ M Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc bzw. DMSO (Kontrolle) injiziert. Danach wurden 48 hpf Zebrafisch Embryonen ebenfalls intraventrikulär mit 40  $\mu$ M Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO injiziert. Die obere Zeile zeigt die Kontrolle, in der im gesamten Zebrafisch eine leichte Hintergrundfluoreszenz zu erkennen war. In der mittleren Zeile konnte eine klare Fluoreszenz im Vorderhirn beobachtet werden. Wohingegen in der untersten Zeile eine deutliche Fluoreszenzmarkierung im Mittelhirn detektiert werden konnte. Die Fluoreszenzmarkierung wurde in 72 hpf Zebrafisch Embryonen mit Hilfe eines ApoTomes.2 (Zeiss) analysiert.



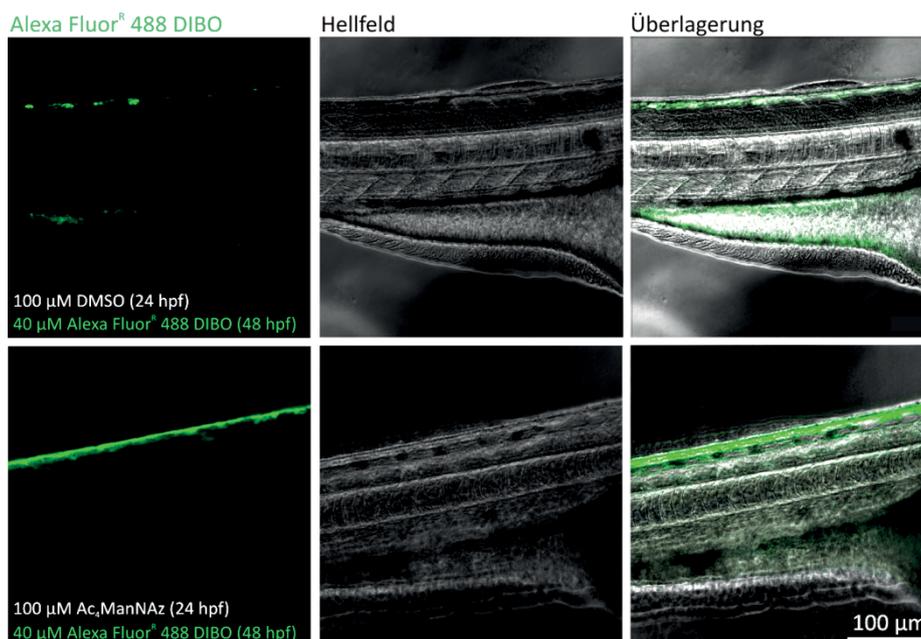
**Abbildung 4.2.6| Weitere *in vivo* Markierungen von Zebrafischglykanen mit Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc und Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO.** Zebrafisch Embryonen wurden 24 hpf intraventrikulär mit 100  $\mu\text{M}$  Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc injiziert. Danach wurden 48 hpf Zebrafisch Embryonen ebenfalls intraventrikulär mit 40  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 DIBO injiziert. Die obere Zeile zeigt eine klare Fluoreszenz im Vorderhirn. In der mittleren Zeile konnte eine deutliche Fluoreszenzmarkierung im Mittelhirn und in den olfaktorischen Bereichen detektiert werden. Wohingegen die unterste Zeile eine signifikante Markierung im Rachenbereich bzw. im Kiemenbogen zeigte. Die Fluoreszenzmarkierung wurde in 72 hpf Zebrafisch Embryonen mit Hilfe eines ApoTomes.2 (Zeiss) analysiert. Die Kontrolle wurde hier weggelassen, da sie der Kontrolle von Abbildung 4.2.5 entsprach.



**Abbildung 4.2.7| *In vivo* Markierungen von Zebrafischglykanen mit  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  und Alexa Fluor® 488 DIBO.** Zebrafisch Embryonen wurden 24 hpf intraventrikulär mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  bzw. DMSO (Kontrolle) injiziert. Danach wurden 48 hpf Zebrafisch Embryonen ebenfalls intraventrikulär mit 40  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor® 488 DIBO injiziert. Die obere Zeile zeigt eine schwache Fluoreszenz im gesamten Flossenbereich. In der unteren Zeile konnte eine deutliche Fluoreszenzmarkierung in den Myosepta beobachtet werden. Die Fluoreszenzmarkierung wurde in 72 hpf Zebrafisch Embryonen mit Hilfe eines ApoTomes.2 (Zeiss) analysiert.



**Abbildung 4.2.8| *In vivo* Markierungen von Zebrafischglykanen mit  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  und Alexa Fluor® 488 DIBO an der Rückenflosse.** Zebrafisch Embryonen wurden 24 hpf intraventrikulär mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  bzw. DMSO (Kontrolle) injiziert. Danach wurden 48 hpf Zebrafisch Embryonen ebenfalls intraventrikulär mit 40  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor® DIFO 488 injiziert. Die obere Zeile zeigt die Kontrolle mit DMSO, in der keine posteriore Fluoreszenzmarkierung zu erkennen war. In der unteren Zeile konnte jedoch eine deutliche Fluoreszenzmarkierung auf der Schuppenschicht und im Rückenmark beobachtet werden. Außerdem wurde eine Pigmentierung im gesamten Zebrafisch beobachtet. Die Fluoreszenzmarkierung wurde in 72 hpf Zebrafisch Embryonen mit Hilfe eines ApoTomes.2 (Zeiss) analysiert.



**Abbildung 4.2.9| *In vivo* Markierungen von Zebrafischglykanen mit  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  und Alexa Fluor® 488 DIBO.** Zebrafisch Embryonen wurden 24 hpf intraventrikulär mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  bzw. DMSO (Kontrolle) injiziert. Danach wurden 48 hpf Zebrafisch Embryonen ebenfalls intraventrikulär mit 40  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor® 488 DIBO injiziert. Die obere Zeile zeigt eine schwache Fluoreszenz im Bereich des Rückenmarks. In der unteren Zeile konnte eine deutliche Fluoreszenzmarkierung im Rückenmark und in der *Chorda dorsalis* beobachtet werden. Die Fluoreszenzmarkierung wurde in 72 hpf Zebrafisch Embryonen mit Hilfe eines ApoTomes.2 (Zeiss) analysiert.

Neben dieser hirnspezifischen Markierung von sialinsäurehaltigen O-Glykanen und den Markierungen mit  $\text{Ac}_4\text{-GalNAz}$ ,  $\text{Ac}_4\text{-ManNAz}$  mit Hilfe der SPAAC konnte gezeigt werden, dass sich diese Vorläufer gut für die Markierung von Glykostrukturen im Zebrafisch eignen. Jedoch haben alle SPAACs noch einige Schwächen, um besonders in Entwicklungsstudien im Zebrafisch eingesetzt werden zu können. Zum einen ist die Reaktionskinetik der SPAAC gegenüber der Cu(I)-katalysierten Variante (CuAAC) deutlich schlechter und zum anderen werden neue Fluorophor-gekoppelte Alkine benötigt, die bleichstabiler sind, um verschiedene Zuckerstrukturen in *in vivo* zeitabhängigen Experimenten über einen längeren Zeitraum und sequentiell zu verfolgen. Um die schnellere Kinetik der Cu-katalysierten Click-Reaktion zu nutzen und gleichzeitig die Kupfertoxizität zu minimieren sowie neue bleichstabilere Fluorophore zu generieren, wurde ein Alkin-modifizierter Cu(I)-Komplex eingesetzt, der ursprünglich als Emittiermaterial für organischen Leuchtdioden (engl. *organic light-emitting diodes*, OLEDs) entwickelt wurde.

### 4.3 Intramolekulare CuAAC mit Cu(I)-Komplexen aus Emittiermaterialien von organischen Leuchtdioden (OLEDs)

Es existiert bereits eine Vielzahl an Cu-Komplexen, die in erster Linie in OLEDs als Emittiermaterial eingesetzt werden. Die Emitterschicht in OLEDs sind Metallkomplexe bestehend aus Übergangsmetallen oder Lanthanoiden und organischen Liganden, wie beispielsweise Polymere. Neben der Emitterschicht bestehen die Bauteile eines OLEDs noch aus einer Elektronentransportschicht (engl. *electron transport layer*) und



einer Lochtransportschicht (engl. *hole transporting layer*). Die Emitterschicht befindet sich zwischen diesen beiden Schichten. Von der Kathode, an der sich die Elektronentransportschicht befindet, werden Elektronen in das Energieniveau des untersten unbesetzten Molekülorbitals (LUMO; engl. *lowest unoccupied molecular orbital*) übertragen. Dadurch bewegen sich die Elektronen über die LUMOs benachbarter Moleküle in Richtung Anode. Die daraus resultierende positive Ladung geht in die höchsten besetzten Molekülorbitale (HOMOs; engl. *highest occupied molecular orbital*) der Lochtransportschicht über. Positive Ladung wird in OLEDs immer als Loch (engl. *hole*) bezeichnet. Die „Löcher“ bewegen sich demnach über die HOMOs von Molekül zu Molekül in Richtung Kathode. Schließlich bewegen sich die unterschiedlich geladenen Teilchen von entgegengesetzter Seite in Richtung Emitterschicht, an der sie unter Bildung von Excitons verbinden können. Ein Exciton beschreibt einen gebundenen Zustand zu einem Elektron und einem Loch. Dabei werden die Moleküle der Emitterschicht angeregt und emittieren beim Übergang in den Grundzustand Licht. Gerade für metabolische Prozesse in biologischen Systemen, die schwierig zu modifizieren sind, ist die Suche nach geeigneten bleichstabilen Fluorophoren unumgänglich. So wurden in den letzten Jahren viele Seltenerdenmetallkomplexe, die auch in Quantenpunkten eingesetzt werden, in biologischen Systemen mit Erfolg getestet. Rajendran et al. konnte beispielsweise Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe der Förster-Resonanz-Energie (FRET) (Rajendran et al. 2013) zwischen Peptidgebundenen Lanthanoid-Komplexen und GFP-gekuppelten Proteinen messen. Als Lanthanoid-Komplex (Chen et al. 2013) wurde Terbium(III) (Tb (III)) (Nchimi-Nono et al. 2013) verwendet. Dabei ermöglichen zellpenetrierende Peptide (engl. *cell-penetrating peptides*, CPPs) die Einschleusung von Tb(III)-Komplexen ins Zellinnere. Es kommt schließlich zur selektiven Markierung des Rezeptor-Fusionsmoleküls. Bisher konnten bei dieser Methode keine Hintergrundfluoreszenz beobachtet werden. Eine andere Methode Protein-Protein-Wechselwirkungen zu beobachten ist die Markierung mit Hilfe eines Ruthenium(II)-(Ru(II))Komplexes.(Babu et al. 2013) Jedoch kann die Methode in komplizierten biologischen Systemen nicht eingesetzt werden, da die Komplexe zum einen nicht besonders stabil sind, und zum anderen eine sehr schwache Fluoreszenz gegenüber natürlichen Fluorophoren aufweisen. Da Biomarker vor allem für die Diagnostik von Krankheitsbildern im frühen Entwicklungsstadium immer mehr an Bedeutung gewinnen, muss nach einer Methode geforscht werden, die es ermöglicht mit relativ geringem Aufwand eine selektive Markierung *in vivo* durchzuführen. Genauer gesagt muss die Reaktion schnell, spezifisch und bioorthogonal ablaufen, damit eine effiziente Markierung überhaupt detektiert werden kann. Es wird demnach nach lumineszenten Farbstoffen gesucht, die i) eine gute Quantenausbeute zeigen, ii) gut detektierbar sind und iii) keine zytotoxischen Effekte *in vivo* zeigen. Die gängigsten Fluorophore sind eine Kombination aus Komplexen auf Lanthanoid-Basis bzw. Übergangsmetall-Komplexen (deren Metalle sehr teuer sind) und organischen Liganden (ein organisches Polymer).(Hermanson 2008) Als Übergangsmetall für die neue Generation von Emittermaterialien wurde hier gezielt Cu(I) verwendet, da dieses Metall im Gegensatz zu Iridium(III) oder Platin(II) viel billiger ist.

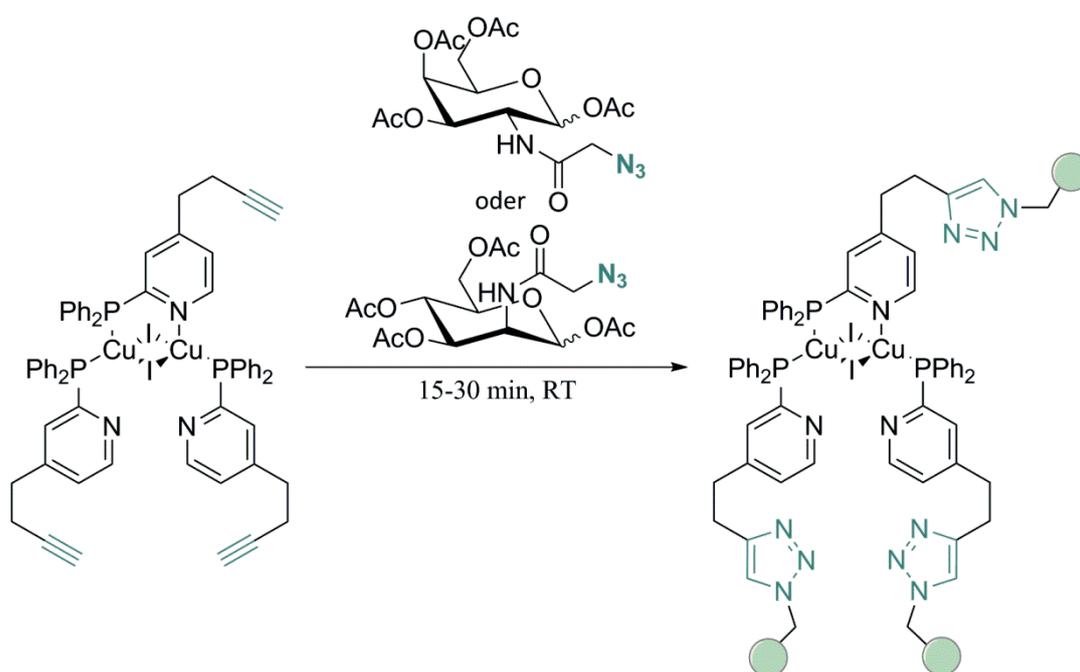


In dieser Arbeit sollten jedoch hoch lumineszente Cu(I)-Komplexe im lebenden System verwendet werden, die in erster Linie Glykostrukturen auf der Zelloberfläche mit Hilfe der bioorthogonalen CuAAC markieren können und die wie ClickFITC und ClickCy5 nicht in das Zellinnere gelangen können. Denn die Click-Reaktion ist eine weit verbreitete Methode, um Biokonjugate zu markieren. (Lallana et al. 2011; Lallana et al. 2012; Laughlin et al. 2008; Le Droumaguet et al. 2010; Lutz 2008; Milles et al. 2012; Rudat et al. 2011; Sletten and Bertozzi 2009a) Ein Vorteil der Cu(I)-katalysierten CuAAC gegenüber der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen SPAAC ist die schnelle Reaktionskinetik. So lassen sich DNA-Konjugate (Salic and Mitchison 2008) und einfache terminale Alkin-Verbindungen (Wang et al. 2003) mit Azidfluorescein (Arnold and Locklin 2013; Rotman and Heldman 1980) Cu(I)-katalytisch markieren. Für die Cu-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition wurde ein Cu(I)-Komplex mit polymeren Liganden eingesetzt, der zum einen als Katalysator und zum anderen als Fluorophor *in vivo* Experimenten einsetzbar war. Genauer gesagt wurde ein homoleptischer (Zink et al. 2012; Zink et al. 2011) hoch fluoreszenter Cu(I)-Komplex mit Alkin-substituierten Diphenylphosphinopyrrolidin-Liganden, PyrPHOS-Cu(I)-Komplex (Schema 2.4.1), eingesetzt. Das Grundgerüst des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes ist ein schmetterlingsartiger  $\text{Cu}_2\text{-I}_2$ -Kern umgeben von drei einzähligen *N,P*-Liganden. PyrPHOS-Liganden lassen sich einfach modifizieren und der gesamte Komplex kann in einem Schritt synthetisiert werden. Außerdem kann die Farbe des Cu(I)-Komplexes durch eine Veränderung des LUMO-Levels der *N,P*-Liganden verschoben werden. Durch diesen „*Shift*“ lassen sich Fluorophore in allen möglichen Farbvarianten herstellen. (Volz et al. 2013; Zink et al. 2012; Zink et al. 2013) Der Cu(I)-Komplex zeichnete sich vor allem darin aus, dass er mittels thermogravimetrischer Analyse (TGA) auch bei Temperaturen über 100°C noch stabil war. Die bei einer CuAAC gebildeten 1,4-disubstituierten Triazolringe zersetzten sich erst bei einer Temperatur von 230°C. Des Weiteren zeigte das UV-VIS Spektrum dieses Cu(I)-Komplexes keine Zersetzung während der CuAAC, was dessen Stabilität zusätzlich bestätigte. (Volz et al. 2012) Eine besondere photophysikalische Eigenschaft dieses PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes ist vor allem das Emissionsspektrum bei 550 nm. (Yersin et al. 2011) Denn nach der Click-Reaktion verschiebt sich das Emissionsspektrum nur gering. Außerdem ist die Quantenausbeute sehr hoch. Ein Nachteil von CuAACs ist, dass Cu(I) in Experimenten *in vivo* toxisch wirkt. Da Cu(I)-Ionen Radikale bilden, die wiederum intrazellulär reaktiven Sauerstoff erzeugen. (Lallana et al. 2011; Lallana et al. 2012) Dennoch liefern CuAACs sehr selektiv und schnell ablaufende Click-Reaktionen. (Debets et al. 2011; Presolski et al. 2010) Allerdings konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass ein komplexiertes Cu(I) weniger toxisch ist, da Cu(I) durch organische Liganden bereits so abgeschirmt wird und nicht in die Zellen freigesetzt wird. (de Boer et al. 2012; Uttamapinant et al. 2012)

Durch den Einsatz dieses PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes konnte innerhalb von wenigen Minuten die Glykanstrukturen markiert werden. Dabei wurde der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex selbst als Cu(I)-Katalysator eingesetzt. Wie in Schema 4.3.1. bereits gezeigt, handelte es sich hierbei um einen dreifachen Alkin-substituierten Cu(I)-Komplex, der bioorthogonal nur an Azid-Gruppen bindet. Primär wurden diese Cu(I)-



Komplexe synthetisiert, um Komplexe mit Benzyl-Aziden oder Azido-Polymeren zu funktionalisieren. Aufgrund der dreifachen Alkin-Substituenten des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes kann der Komplex mit Hilfe der CuAAC quervernetzen (Volz et al. 2012) (Schema 4.3.1 und Schema 4.3.2), was auch in den Abbildung 4.3.2 bis Abbildung 4.3.5 gezeigt werden konnte. Dabei bildete der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex eine Kapsel, die einzelne Zellen zu Zellverbänden einschließen konnte. Dieser Nebeneffekt kann auch für entsprechende Anwendungen zur Zellverkapselung z.B. von Stammzellen genutzt werden (ein Patent ist bereits beim europäischen Patentamt eingereicht). Außerdem zeichnete sich dieser PyrPHOS-Cu(I)-Komplex vor allem durch i) seine Bleichstabilität, ii) seine starke Fluoreszenz nach der Click-Reaktion und iii) seine selbst-katalytische Eigenschaft aus. Des Weiteren kann die Konzentration des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes in einer intramolekular-katalysierten CuAAC drastisch reduziert werden, was auch eine Reduzierung der Cu(I)-Ionen *in vivo* bedeutete. Außerdem wird die Freisetzung von Cu(I)-Ionen durch den Alkin-substituierten Chelat-Effekt stark herabgesetzt. (Uttamapinant et al. 2012)

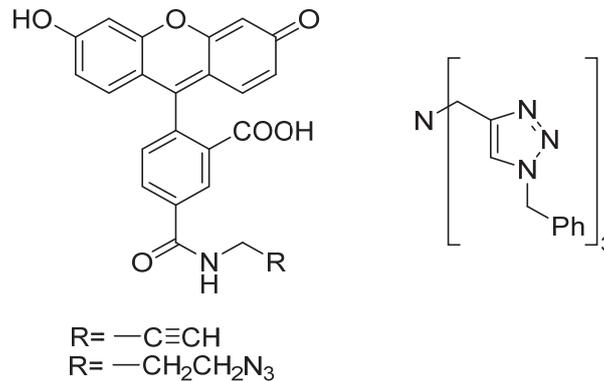


**Schema 4.3.1| Homoleptisch, selbst-clickender und katalytisch wirkender Cu(I)-Komplex.** Die Abbildung zeigt einen homoleptischen, butinyl-substituierten PyrPHOS-Cu(I)-Komplex, der als ein hoch fluoreszentes, selbst-clickendes Fluorophor in einer Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition eingesetzt wurde. Dadurch ließen sich neben Zellen auch Zebrafisch Embryonen *in vivo* anfärben.

Obwohl bereits Ligand-stabilisierte Cu(I)-Komplexe in biologischen Systemen eingesetzt wurden, wurde nur der Katalysator komplexiert und nicht das Alkin. Es gab schon einige Studien, die versuchten, Cu(I)-Ionen an Histidin oder Liganden, wie Tris(triazolmethyl)amine, zu verlinken, umso deren Toxizität zu verringern (Abbildung 4.3.1). (Kennedy et al. 2011; Soriano del Amo et al. 2010) Die Liganden sind demnach in der Lage das Cu(I)-Ion soweit zu stabilisieren, indem sie es abschirmen und



die Bildung freier Radikale somit unterbinden, indem sie oxidativen Stress vermeiden.



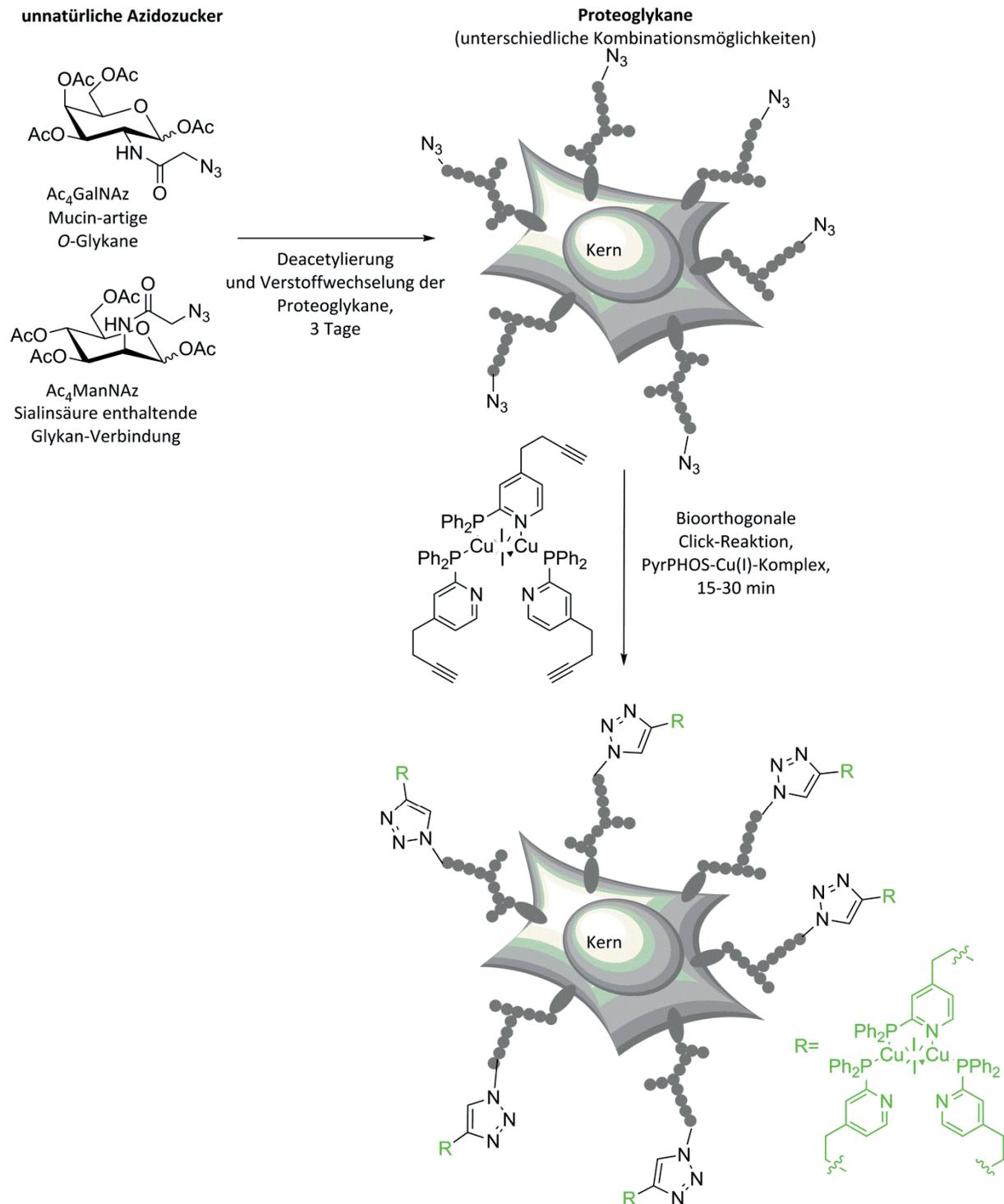
**Abbildung 4.3.1| Alkin-Azid-Farbstoff (links) und Tris(triazolyl)phosphinamin (rechts) zur selektiven Cu(I)-katalysierten Click-Reaktion.** Dabei wird Tris(triazolyl)phosphinamin als Ligand von Cu(I)-Verbindungen eingesetzt und schützt Proteine auf der Zelloberfläche vor schädlichen Cu(I)-Verbindungen. (Wang et al. 2003)

Auch Wang et al. zeigte 2003 eine selektive Anwendung der Cu(I)-Komplexe in biologischen Systemen. Sie zeigten vor allem, dass durch den Zusatz von Tris(triazolmethyl)amin die Reaktionsgeschwindigkeit drastisch verbessert werden konnte. (Wang et al. 2003) Dieser hier gezeigte PyrPHOS-Cu(I)-Komplex ist das erste Beispiel für einen selbst-clickbaren Komplex, der sowohl als Cu(I)-Katalysator als auch als Fluorophor fungiert. Diese Art von Cu(I)-Komplexen, wurde in biologischen Systemen noch nicht angewendet. Die Synthese, spektroskopische und photophysikalische Eigenschaften wurden bereits von Daniel Volz (Ak Stefan Bräse) und Manuela Wallesch (Ak Stefan Bräse) charakterisiert. (Volz et al. 2012) Außerdem ist die photolumineszente Quantenausbeute hoch ( $\phi_{PL} = 0,66$ ), was einen großer Vorteil für die Anwendung in biologischen Systemen darstellt. Denn dadurch konnten bei den nachfolgenden Experimenten eine sehr geringe Menge (20  $\mu$ M oder weniger) an PyrPHOS-Cu(I)-Komplex dazugegeben werden. Des Weiteren liegt die Stokes-Verschiebung bei 180 nm, sodass ein klarer Unterschied zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge festgestellt werden konnte. (Volz et al. 2012) Nun stellte sich die Frage, ob dieser Cu(I)-katalysierte Komplex für Markierungszwecke *in vivo* einsetzbar wäre. Mit Hilfe der bioorthogonalen CuAAC sollte die Biokompatibilität des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes auf Zellen und in der frühen Zebrafischentwicklung für die Markierung von Glykanstrukturen nun angewendet werden.

$1 \times 10^4$  HeLa Zellen und Zebrafisch Embryonen wurden mit 80  $\mu$ M  $Ac_4GalNAz$  bzw.  $Ac_4ManNAz$  inkubiert. Dabei entsprach die Inkubationszeit der Azidozucker auf HeLa Zellen 3 Tage. In Zebrafisch Embryonen genügte eine Inkubationszeit der Azidozucker von 24 Stunden hpf. Nach der Zuckerinkubation wurde 20 bzw. 40  $\mu$ M PyrPHOS-Cu(I)-Komplex in Abhängigkeit der Zeit (2, 5, 10, 15 und 30 Minuten) auf die Zellen/Embryonen gegeben. Die modifizierten Zucker wurden anschließend metabolisiert und in die Glykokalyx eingebaut. Es konnte in den folgenden Markierungsexperimenten gezeigt werden, dass der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex an Azid-



gebundene Glykostrukturen der Zelloberfläche unter Ausbildung eines Triazol-rings bindet.

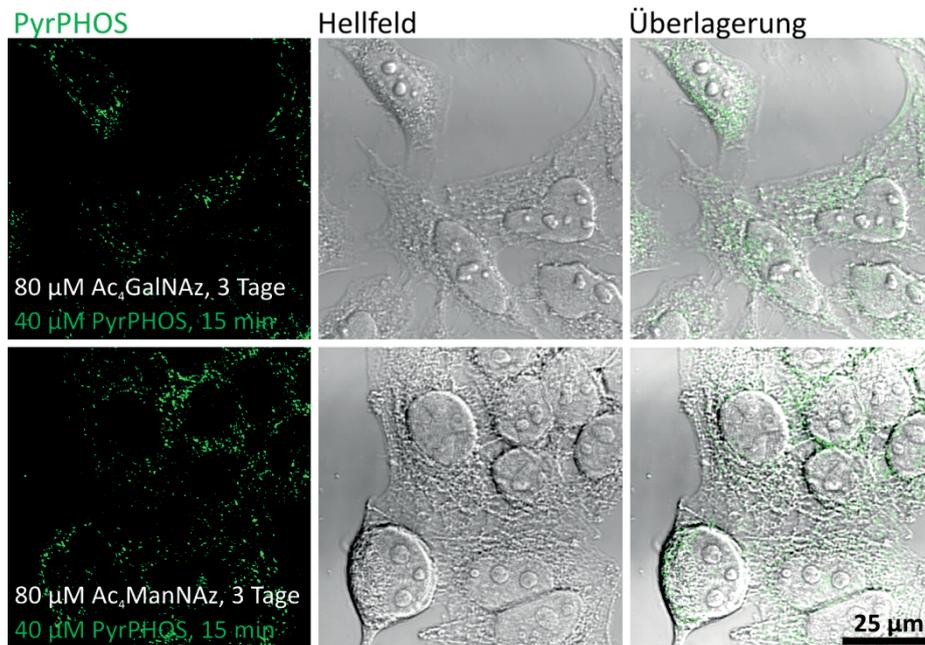


**Schema 4.3.2| Bioorthogonale CuAAC zur Visualisierung von Glykostrukturen auf der Zelloberfläche.** Mit Hilfe der Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition konnten Zelloberflächenglykane visualisiert werden. Zellen und Zebrafisch Embryonen wurden mit 80  $\mu$ M Ac<sub>4</sub>GalNAz bzw. Ac<sub>4</sub>ManNAz inkubiert. Die modifizierten Zucker wurden anschließend metabolisiert und in die Glykokalyx eingebaut, an der sie schließlich markiert werden konnten. Demnach clickt der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex (grün) an Azid-gebundenen Glykostrukturen der Zelloberfläche. Es waren demnach drei mögliche Anknüpfungspunkte des Cu(I)-Komplexes an Azid-modifizierte Glykane möglich.

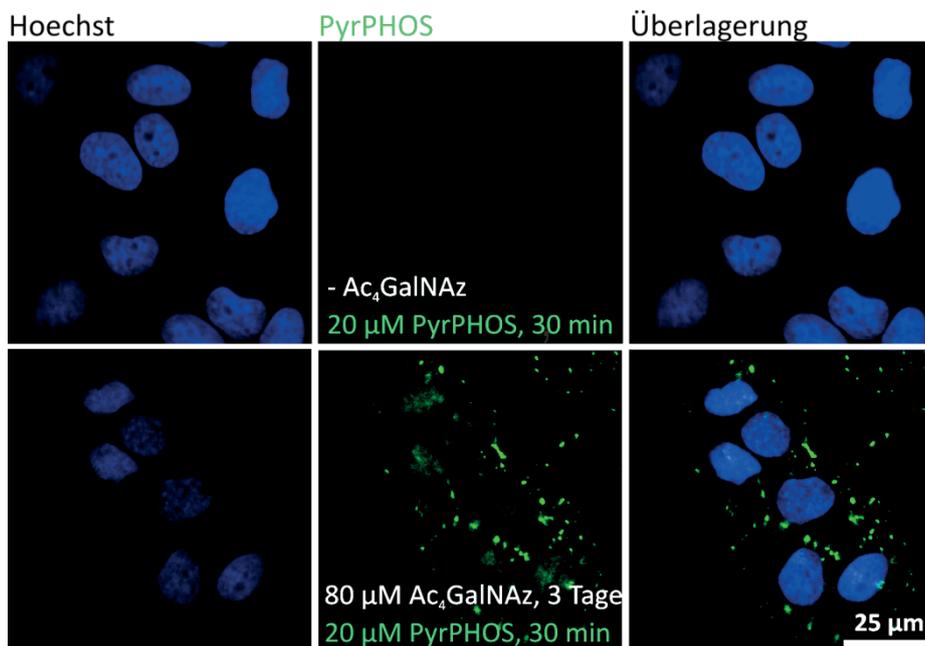


Aufgrund der drei Alkin-substituierten Diphenylphosphinopyrridin-Liganden waren demnach drei mögliche Bindungen des Cu(I)-Komplexes an Azid-modifizierte Glykane möglich (Schema 4.3.2).

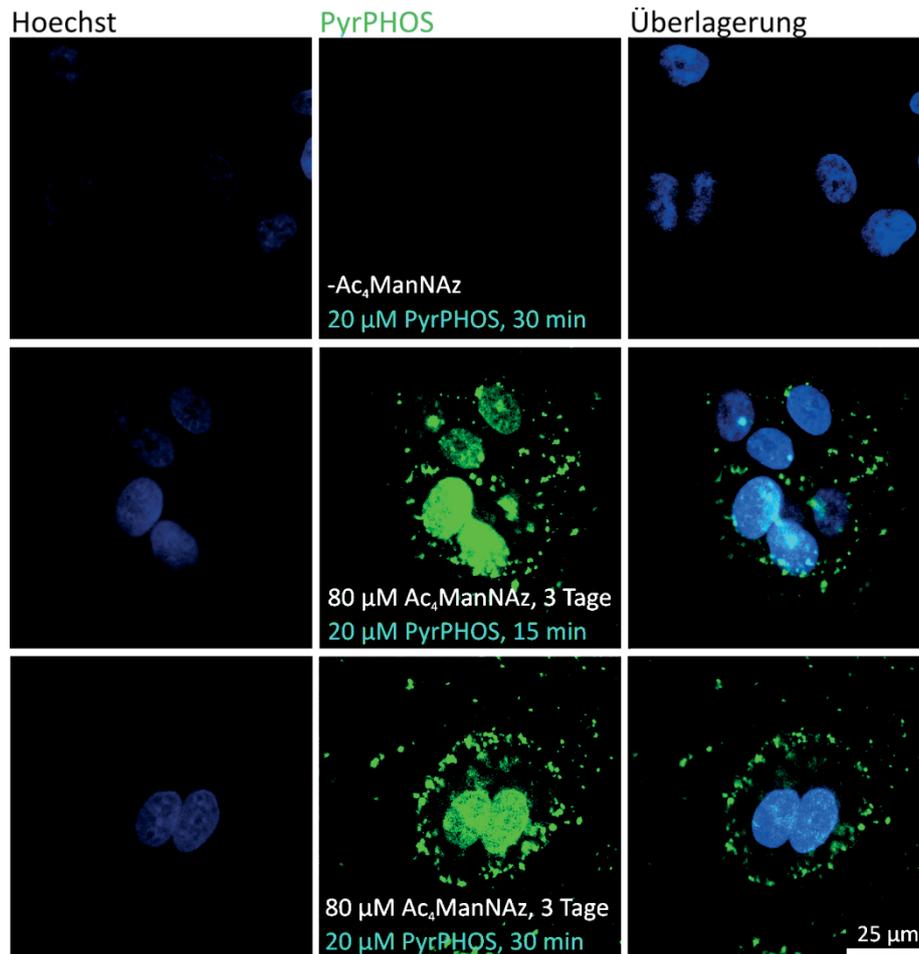
Obwohl bereits SPAAC zur Visualisierung von Glykanstrukturen eingesetzt werden, konnte beim PyrPHOS-Cu(I)-Komplex eine deutlich schnellere Reaktionskinetik beobachtet werden (Markierungszeit im Tier > 15 min). Besonders bei der Anwendung im Tiermodell ist eine schnelle Kinetik von Vorteil, da dadurch eventuell auftretende Nebenwirkungen bzw. toxische Effekte durch eine minimierte Exposition herabgesetzt werden können. Dabei wurde der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex nur 15 (Abbildung 4.3.2) bzw. 30 Minuten (Abbildung 4.3.3 und Abbildung 4.3.4) auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica SP5) beobachtet und analysiert. Die ersten konfokalen Aufnahmen wurden ohne Kernfärbung durchgeführt (Abbildung 4.3.2). Jedoch wurden für weitere Untersuchungen die Zellkerne mit 0,5 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) zur besseren Differenzierung angefärbt. Obwohl eine signifikante Markierung der Glykokalyx in den HeLa Zellen nicht beobachtet werden konnte, wurde dennoch eine eher punktuelle Färbung der Glykokalyx detektiert. Außerdem konnte während des ganzen Experimentes eine signifikante Fluoreszenz des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes beobachtet werden. Das Besondere an der CuAAC mit dem PyrPHOS-Cu(I)-Komplex war, dass in den Zellen, die nicht mit den modifizierten Azidozucker behandelt wurden, keine Fluoreszenz detektiert wurde. Demnach war der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex ein selektives Werkzeug, um Glykoproteine an der Zelloberfläche zu markieren. Des Weiteren zeigte der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex bei einer Erhöhung der Inkubationszeit von 15 auf 30 Minuten signifikante Unterschiede (Abbildung 4.3.4). Nach 30-minütiger Inkubation zeigte sich eine Verkapselung der Zellen. Das lag möglicherweise an der trialkylylierten Struktur des Cu(I)-Komplexes wodurch auch quervernetzende Click-Reaktionen mit anderen Aziden stattfinden könnten (Abbildung 4.3.4). Die dreidimensionale Aufnahme in z-Richtung bestätigte, dass es sich dabei tatsächlich um Markierungen der Glykane der Zelloberfläche handelte.



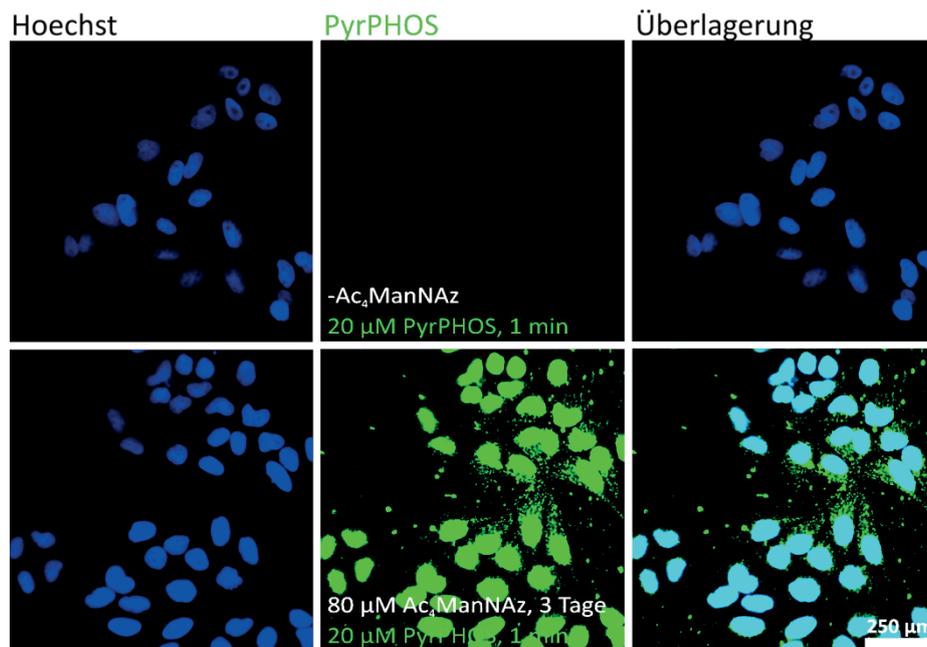
**Abbildung 4.3.2| Bioorthogonale CuAAC in HeLa Zellen ohne Kernfärbung.**  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden mit  $80 \mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  bzw.  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  3 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 15 Minuten mit  $40 \mu\text{M}$  PyrPHOS-Cu(I)-Komplex behandelt, um eine bioorthogonale CuAAC an der Plasmamembran durchführen zu können. Untersucht wurden die Zellen bei einer Anregungswellenlänge des UV-Lasers von circa  $488 \text{ nm}$  (Leica SP5, Inversmikroskop). Außerdem zeigte der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex ein breites Emissionsspektrum dessen Maximum bei  $550 \text{ nm}$  lag.



**Abbildung 4.3.3| Bioorthogonale CuAAC in HeLa Zellen.**  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden mit  $80 \mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  3 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 30 Minuten mit  $20 \mu\text{M}$  PyrPHOS-Cu(I)-Komplex behandelt, um eine bioorthogonale CuAAC an der Plasmamembran durchführen zu können. Schließlich wurden die Glykane mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Leica SP5) analysiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) zur besseren Differenzierung der Zellen angefärbt. Da das Emissionsspektrum des Hoechst Farbstoffes ( $460 \text{ nm}$ ) in das Emissionsspektrum des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes ( $480 \text{ nm}$ ) einstrahlte, wurde der UV-Laser bei einer zweiten Aufnahme des gleichen Bildausschnittes ausgeschaltet.



**Abbildung 4.3.4| Bioorthogonale CuAAC in HeLa Zellen.**  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden mit  $80 \mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  3 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 15 bzw. 30 Minuten mit  $20 \mu\text{M}$  PyrPHOS-Cu(I)-Komplex behandelt, um eine bioorthogonale CuAAC an der Plasmamembran durchführen zu können. Schließlich wurden die Glykane mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Leica SP5) analysiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) zur besseren Differenzierung der Zellen angefärbt. Da das Emissionsspektrum des Hoechst Farbstoffes ( $460 \text{ nm}$ ) in das Emissionsspektrum des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes ( $480 \text{ nm}$ ) einstrahlte, wurde der UV-Laser bei einer zweiten Aufnahme des gleichen Bildausschnittes ausgeschaltet.



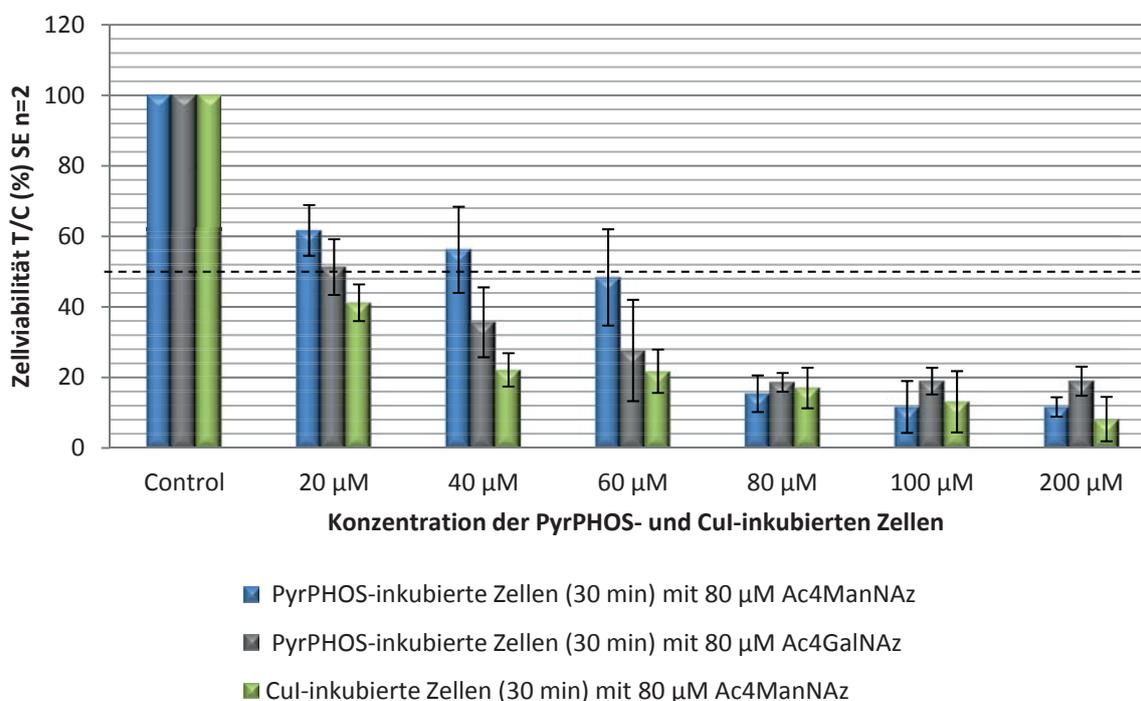
**Abbildung 4.3.5| Bioorthogonale CuAAC in HeLa Zellen.**  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden mit  $80 \mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  3 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 1 Minute mit  $20 \mu\text{M}$  PyrPHOS-Cu(I)-Komplex behandelt, um eine bioorthogonale CuAAC an der Plasmamembran durchführen zu können. Schließlich wurden die Glykane mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Leica SP5) analysiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (Invitrogen) zur besseren Differenzierung der Zellen angefärbt. Leider wurde hier der UV-Laser nicht ausgeschaltet, was die hellblauen Kerne der dritten Spalte von links verdeutlicht.

#### 4.3.1 Toxikologische Untersuchungen zur intramolekular-katalysierten CuAAC

Neben den Zelltests, die bereits beschrieben wurden, wurde auch ein Toxizitätstest in HeLa Zellen durchgeführt. Dabei sollte in erster Linie die Toxizität des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes auf die Zellen getestet werden. Es wurde über einen Farbstoff, dem MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), die Vitalität der Zellen über einen Zeitraum von 3 Tagen bestimmt. Dabei wurde das MTT-Reagenz von den Reduktionsäquivalenten der Zellen in den Mitochondrien zu Formazan (blaue Kristalle) umgewandelt. Es wurden nur HeLa Zellen ausgetestet. Dabei wurden  $5 \times 10^3$  HeLa Zellen auf eine 96-Well-ibidi-Platte (Ibitreat) ausplattiert und bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  Atmosphäre kultiviert. Danach wurden die Zellen mit  $80 \mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  bzw.  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  (gelöst in DMSO) für 3 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  Atmosphäre behandelt. Anschließend erfolgte nun die bioorthogonale CuAAC mit Hilfe unterschiedlichen Konzentrationen ( $20, 40, 60, 80, 100$  und  $200 \mu\text{M}$ ) des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes bzw. eines Cu(I)-Salzes (als Vergleichswert für die Toxizität von Cu(I) auf Zellen). Als Totkontrolle wurden die Zellen vor der Inkubation mit dem MTT-Reagenz (Promega) mit TritonX-100 behandelt. Als Negativkontrolle (100%ige Vitalität) wurden nur Zellen verwendet, die unbehandelt waren. Nach der Inkubation mit PyrPHOS-Cu(I)-Komplex für 24 Stunden konnte bereits beobachtet werden, dass mit zunehmender Konzentration des Cu(I)-Komplexes die Zellen einen  $\text{LD}_{50}$ -Wert  $> 20 \mu\text{M}$  zeigten. Außerdem konnte mit Hilfe des durchgeführten Zytotoxizitätstest (auch MTT-Test genannt) ein Unterschied zwischen den mit  $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$ -



behandelten und Ac<sub>4</sub>ManNAz-behandelten Zellen beobachtet werden. Die Zellen, die mit Ac<sub>4</sub>ManNAz behandelt wurden, zeigten einen Wert von LD<sub>50</sub>-Wert > 60 µM (Abbildung 4.3.6). Wohingegen die Zellen, die mit Ac<sub>4</sub>GalNAz behandelt wurden, schon bei einem Wert von LD<sub>50</sub>-Wert > 40 µM, einen zytotoxischeren Effekt zeigten. Dagegen konnte bei den Zellen, die mit CuI behandelt wurden, eine wesentlich toxischere Wirkung auf die Zellen beobachtet werden. Dieses Ergebnis entsprach auch den Erwartungen. Denn das Cu(I) des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes wird durch die sterischen, hoch polymeren Liganden so abgeschirmt, dass die Zytotoxizität eher geringer war, als die Behandlung mit CuI, bei der Cu(I)-Ionen frei gesetzt wurden. Diese freigesetzten Cu(I)-Ionen induzieren nun oxidativen Stress in der Zelle, was zu einem vermehrten Absterben der Zellen schon bei LD<sub>50</sub>-Wert > 20 µM Werten führte. Dabei entsprach 40 µM PyrPHOS-Cu(I)-Komplex einem Prozentanteil des Lösungsmittels (DMSO) von 2% v/v. Da alle verwendeten Reagenzien auch in DMSO gelöst wurden, könnten Verunreinigungen in der Ac<sub>4</sub>GalNAz-Präparation unter anderem auch der Grund für die geringere Zellviabilität gewesen sein.



**Abbildung 4.3.6] Zytotoxizitätstest von HeLa Zellen durch eine bioorthogonalen CuAAC.**  $5 \times 10^3$  HeLa Zellen wurden mit 80 µM Ac<sub>4</sub>GalNAz bzw. Ac<sub>4</sub>ManNAz, die in DMSO gelöst waren, 3 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden mit 20, 40, 60, 80, 100 bzw. 200 µM PyrPHOS-Cu(I)-Komplex (in DMSO gelöst) bzw. mit CuI (in DMSO gelöst) behandelt. Danach wurde 3-4 Stunden MTT-Reagenz (Promega) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Solubilization Solution/Stop Mix (Promega) für 2 Stunden lysiert. Die Absorption des Formazans wurde mit Hilfe eines Ultra Microplate Reader ELx808IU (BioTek Instruments) bei 595 nm gemessen. Die gestrichelte Linie markiert 50% der noch lebenden Zellen.

### 4.3.2 Intramolekular-katalysierte CuAAC im Zebrafischmodell

Neben der Anwendung des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes in HeLa Zellen wurde die bioorthogonale CuAAC Markierungsmethode im Zebrafischmodell angewendet. Um letztendlich Glykane im Zebrafisch Embryo zu markieren, wurden 24 hpf Zebrafisch

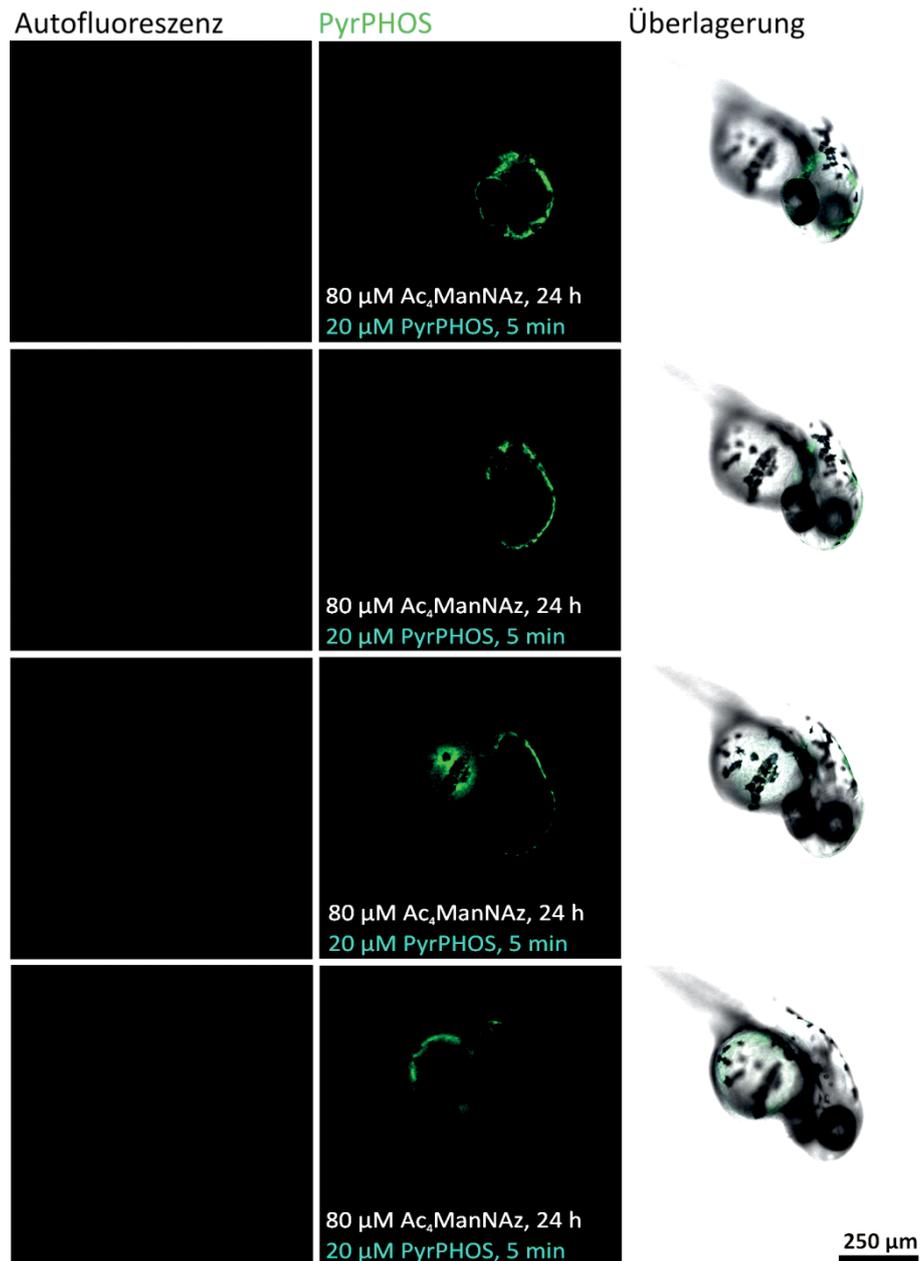


Embryonen mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  bzw.  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  (in DMSO gelöst) inkubiert, das in das Zebrafischmedium gegeben wurde. Danach wurden die 48 hpf Zebrafisch Embryonen gewaschen und in ein neues Zebrafischmedium überführt, das 20  $\mu\text{M}$  PyrPHOS-Cu(I)-Komplex (gelöst in DMSO) enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes wurden die Zebrafisch Embryonen gewaschen und in frisches Medium überführt. Danach wurde mit Hilfe des konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica SP5) der Zebrafisch Embryo analysiert (Abbildung 4.3.7). Um eine genauere Definition der Glykanmarkierung im Zebrafischmodell bestimmen zu können, wurde eine Reihe von Bildern in z-Richtung gemacht. Dadurch konnte eine signifikante Fluoreszenzmarkierung entlang des Notochords, des Kiemenbogens und des Dottersackes beobachtet werden. Die Fluoreszenz im Dottersack basiert auf Autofluoreszenz. Daher wird in vielen *in situ* Hybridisierungsversuchen der Dottersack aufgrund der starken Autofluoreszenz vor der Aufnahme am Mikroskop entfernt. Alle Zebrafisch Embryonen wurden natürlich befruchtet und im Zebrafischmedium aufgezogen. Erstaunlicherweise zeigte der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex während der Zebrafischentwicklung keine Toxizität oder Abnormalität. Um die Biokompatibilität des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes *in vivo* auszutesten, wurde die Fisch Viabilität durch einen simplen Test bestimmt. Somit wurden 8 hpf Zebrafisch Embryonen in ein Zebrafischmedium überführt, das mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  und 20, 40, 60, 80 oder 100  $\mu\text{M}$  PyrPHOS-Cu(I)-Komplex angereichert war. 24 Stunden nach der Befruchtung wurden die Zebrafische ausgezählt. Danach wurden die Zebrafisch Embryonen immer in einer Zeitspanne von 5 Stunden bis zu 48 Stunden gezählt (Abbildung 4.3.8). Im Vergleich zur Toxizität von Cu(I)-Ionen ( $\text{LD}_{50}$ -Wert < 500  $\mu\text{M}$  für maximal eine Stunde Inkubation) (Sletten and Bertozzi 2009b; Speers et al. 2003) zeigte der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex eine Gesamtoxizität von  $\text{LD}_{50}$ -Wert > 60  $\mu\text{M}$ . Das Besondere an dieser intramolekularen-katalysierten bioorthogonalen CuAAC mit Cu(I)-Komplex war, dass die Cu(I)-Ionen nicht freigesetzt werden konnten, da sie aufgrund der polymeren Liganden stark abgeschirmt wurden. Demnach konnte auch von einer starken kovalenten Bindung der Cu(I)-Ionen des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes ausgegangen werden.

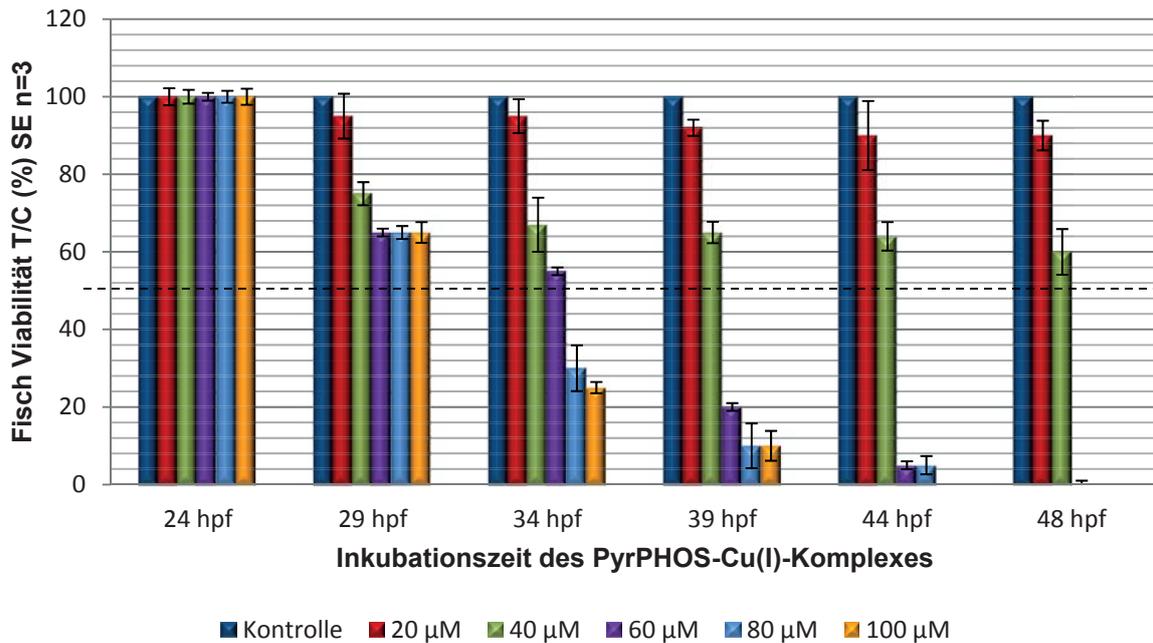
Diese Beobachtung war der Anlass zu weiteren Experimenten im Zebrafischmodell. Überraschenderweise konnte eine starke Lumineszenz in der Retina der Zebrafisch Embryonen beobachtet werden. Die Netzhaut (Retina) bildet die innerste Hautschicht eines Auges von Vertebraten, bestehend aus mehreren Schichten Nervengewebe, an deren Innenseite Fotorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) liegen, die das einfallende Licht in Nervenimpulse transferieren. Durch sie werden Nervenimpulse verfolgt und an das ZNS über Ganglienzellen weitergeleitet. Die innere Seite der Netzhaut ist dem Augapfel näher und somit dem Licht zugewandt. Als äußere Retina wird demzufolge die äußere Seite, die dem Licht abgewandt ist bezeichnet. So wird schließlich Licht vom Inneren der Netzhaut nach außen transportiert. Auf der äußeren Seite der Netzhaut liegt die Aderhaut (*Chorioidea*), die die äußere Netzhautschicht mit diffundierenden Nährstoffen versorgt. An der Innenseite der Netzhaut liegt der Glaskörper (*corpus vitreum*). In der Papille laufen schließlich alle Schichten der Netzhaut in den Sehnerv, der die Nervenfasern der Ganglienzellen besetzt. Von der Papille ausge-



hend stammen die großen Netzhautgefäße ab (*arteriola* und *venola centralis retinae*). Die Netzhautgefäße teilen sich noch in obere und untere Bündel, von denen nasale und schläfenseitige Äste abgehen. Diese Gefäßzweige umrunden nun bogenförmig ein gefäßarmes Gebiet, den gelben Fleck (*macula lutea*), erstmals von Soemmering 1779 entdeckt. Der gelbe Fleck besitzt ein Pigment, das Lutein (ein gelbes Xantophyll), das zu den Carotinoiden gehört. Als gelber Fleck wird die Stelle mit dem größten Sehvermögen im Auge bezeichnet, dass vor allem beim Autofahren oder Lesen benötigt wird. Die umgebende Netzhaut um den gelben Fleck ermöglicht peripheres Sehen (Umfeldwahrnehmung, Augenwinkel-erkennung). Die innere Grenzschicht der Retina besteht aus Kollagenfasern und Proteoglykosiden. Als Glykoside werden Zucker bezeichnet, die über eine O-Gruppe miteinander verknüpft sind. Sie bilden Vollacetale aus. R-O-X-Verknüpfungen werden Acetylglykoside genannt. Das Pannexin1 (Panx1) Gen wird sowohl im ZNS, als auch in der inneren und äußeren Retina exprimiert. Das Gen bildet dabei Membrankanäle mit großer Porentiefe, die vor allem durch Adenosintriphosphat (ATP) und Calcium aktiviert werden können. Die Netzhaut besitzt somit ein hoch komplexes Glykosilierungsmuster. Die Panx1-Kanäle können durch intrazelluläre Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), durch Depolarisierung der Plasmamembran oder durch Rezeptor-Aktivierung geöffnet werden. Denn ATP vermittelt seine Wirkung über sogenannte purinerge Rezeptoren (P2-Rezeptoren), die auf zahlreichen Zelloberflächen anzutreffen sind. (Kurtenbach et al. 2013) Für den polaren Aufbau des retinalen Pigmentepithels ist Lin7c verantwortlich. Lin7c wird im frühen Entwicklungsstadium von Zebrafischen im Auge exprimiert und bildet zudem das Neuralrohr, an das sich das ZNS anknüpft und letztendlich alle anderen Organe auch. Luz et al. verwendeten Gastrula Zellen (Zellen der Gastrulation, einer Form der Zellentwicklung) als Beispiel für nicht polarisierte Zellen und retinale Neuroepithelzellen als Beispiel für polarisierte Zellen. (Luz and Knust 2013) Durch die Anwendung der bioorthogonalen CuAAC mit dem PyrPHOS-Cu(I)-Komplex konnte die Netzhaut von Zebrafischen über mehrere Tage (3 Tage) *in vivo* visualisiert werden. Nach den 3 Tagen waren die meisten Zebrafische noch am Leben, was ein eindeutiges Merkmal dafür war, dass der verwendete Cu(I)-Komplex keine extreme Toxizität gegenüber den Zebrafischen aufwies.



**Abbildung 4.3.7| Bioorthogonalen CuAAC im Zebrafisch Embryo.** 24 hpf Zebrafisch Embryonen wurden mit 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  (in DMSO gelöst) 24 Stunden inkubiert, das in das Zebrafischmedium gegeben wurde. Danach wurden die 48 hpf Zebrafisch Embryonen mit 20  $\mu\text{M}$  PyrPHOS-Cu(I)-Komplex (gelöst in DMSO) für 5 Minuten behandelt. Danach wurde die Glykanmarkierung der 72 hpf Zebrafisch Embryonen mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica SP5) analysiert. Entlang des Notochords, des Kiemenbogens und des Dottersackes konnte eine deutliche Fluoreszenz detektiert werden.



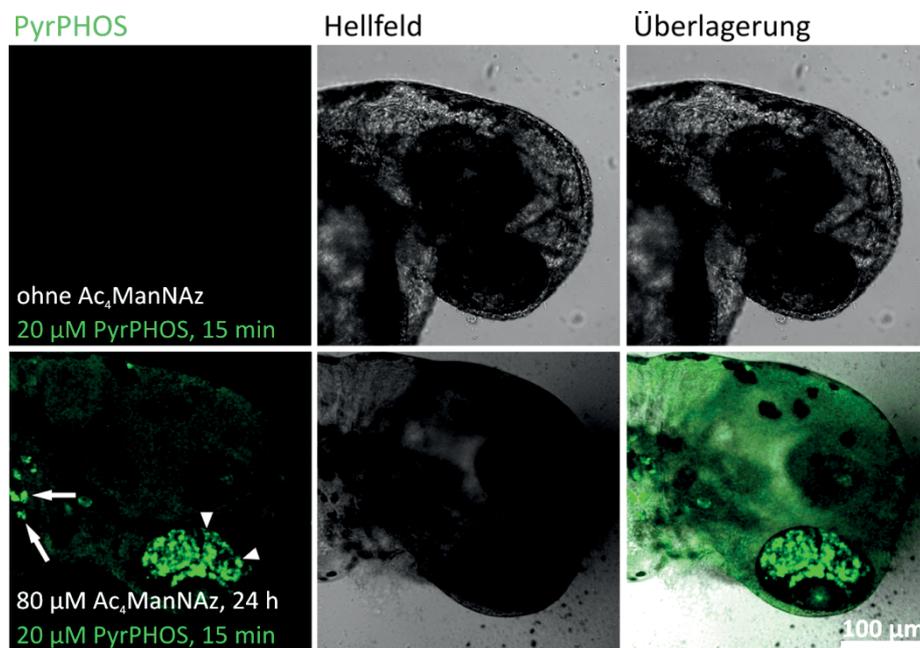
**Abbildung 4.3.8| Toxizität des PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes in Zebrafisch Embryonen.** Dabei wurden 8 hpf Zebrafisch Embryonen in einer Lösung bestehend aus 80 µM Ac<sub>4</sub>ManNAz und PyrPHOS-Cu(I)-Komplex (20, 40, 60, 80 und 100 µM) im 5 Stunden Rhythmus ausgezählt. Mehr als 60% der Zebrafisch Embryonen, die mit 20 und 40 µM PyrPHOS-Cu(I)-Komplex behandelt wurden, überlebten bis zu 120 hpf. Außerdem wurde kein toxischer Effekt bei einer 15-minütigen Inkubation gegenüber den Zebrafisch Embryonen beobachtet. Nach der Inkubation wurden die Zebrafisch Embryonen gewaschen und in Zebrafischmedium für weitere 72 Stunden überführt. Die gestrichelte Linie markiert 50% der lebenden Zebrafisch Embryonen.

#### 4.3.2.1 Die Fluoreszenzmarkierung retinaler Glykanstrukturen mit der CuAAC Reaktion

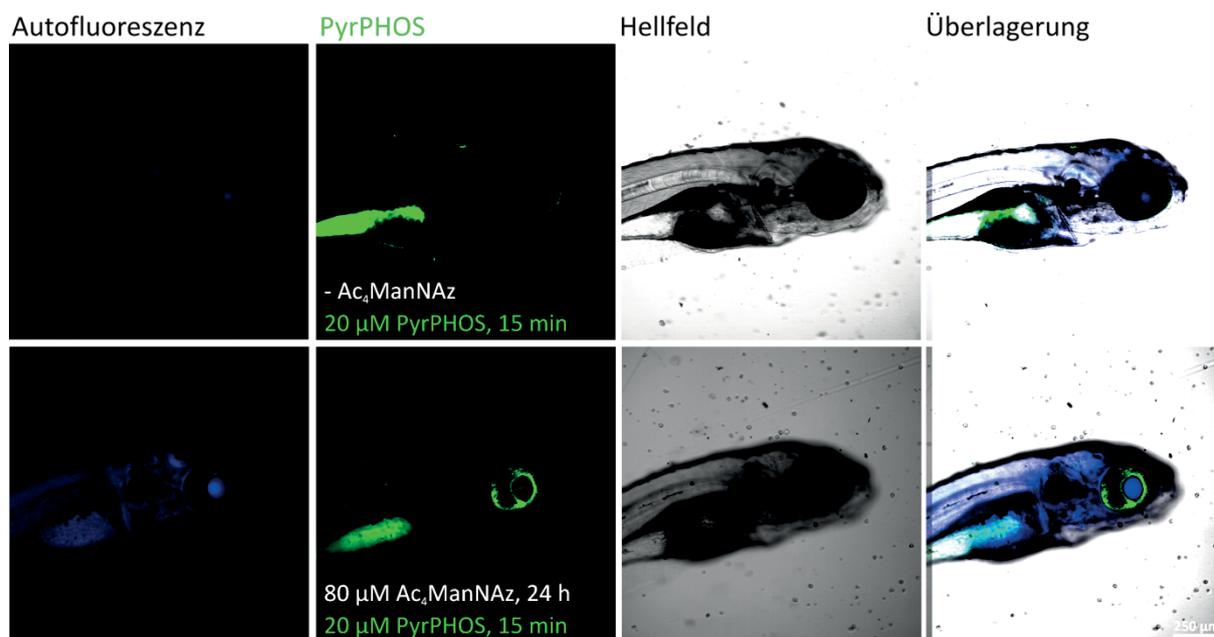
24 hpf Zebrafisch Embryonen wurden in 80 µM Ac<sub>4</sub>ManNAz 24 Stunden bei 28 °C gebadet. Um die eingebauten Azidozucker (Ac<sub>4</sub>ManNAz) zu markieren, wurden die Zebrafische mit 20 µM PyrPHOS-Cu(I)-Komplex 15 Minuten bei 28 °C behandelt. Detektiert wurde die bioorthogonale CuAAC mit Hilfe des konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica SP5). Die Analyse zeigte, dass eine starke Fluoreszenz in der Retina von 48 hpf Zebrafisch Embryonen beobachtet werden konnte (kleinen weißen Pfeile der Abbildung 4.3.9). Außerdem konnte auch eine Fluoreszenzmarkierung im Magen-Darm-Trakt in 48 hpf Zebrafisch Embryonen beobachtet werden (lange weiße Pfeile der Abbildung 4.3.9). Nach 15-minütiger PyrPHOS-Cu(I)-Inkubation wurden die Zebrafische gewaschen und in neues Medium überführt. Das ermöglichte weitere Beobachtungen bis zu 120 hpf alten Zebrafisch Embryonen (Abbildung 4.3.10), obwohl der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex nicht mehr im Medium vorhanden war. Während dieser Beobachtungszeit von 48-120 hpf blieb das starke Fluoreszenz-signal in der Retina enthalten. Die starke Fluoreszenz im Dickdarm-Bereich konnte in dieser Arbeit nicht genauer definiert werden. Was jedoch weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet notwendig macht. Des Weiteren konnten die Glykostrukturen, die zur Organselektiven Markierung in der Retina von 48 hpf Zebrafisch Embryonen führen, noch nicht eindeutig charakterisiert werden und sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.



gen. Denn die Retina besitzt zahlreiche Glykostrukturen und ist daher sehr komplex aufgebaut. Sollte die Markierung eine Retina-spezifische Markierung sein, so könnte der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex als sehr spezifisches Click-Reagenz bei der Erforschung von Glykanen des Auges eingesetzt werden. Mit Hilfe unterschiedlich chemisch modifizierter Vorläuferzucker (unnatürliche Azidozucker) und dem PyrPHOS-Cu(I)-Komplex konnten gezielte Glykanmarkierungen an der Zelloberfläche vorgenommen werden. Dadurch wurde ein neues biokompatibles Fluorophor (PyrPHOS-Cu(I)-Komplex) *in vivo* eingeführt. Neben dem homoleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplex wurden auch weitere hydrophobe und weniger hydrophobe heteroleptische PyrPHOS-Cu(I)-Komplexe ausgetestet, die von Manuela Wallesch (Ak Stefan Bräse) synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurden. Mit Hilfe dieser Komplexe sollten weitere Fluorophore mit anderen Emmissionsmaxima generiert werden, um eine sequenzielle Detektion von Azid-modifizierten Biomolekülen *in vivo* zu generieren.



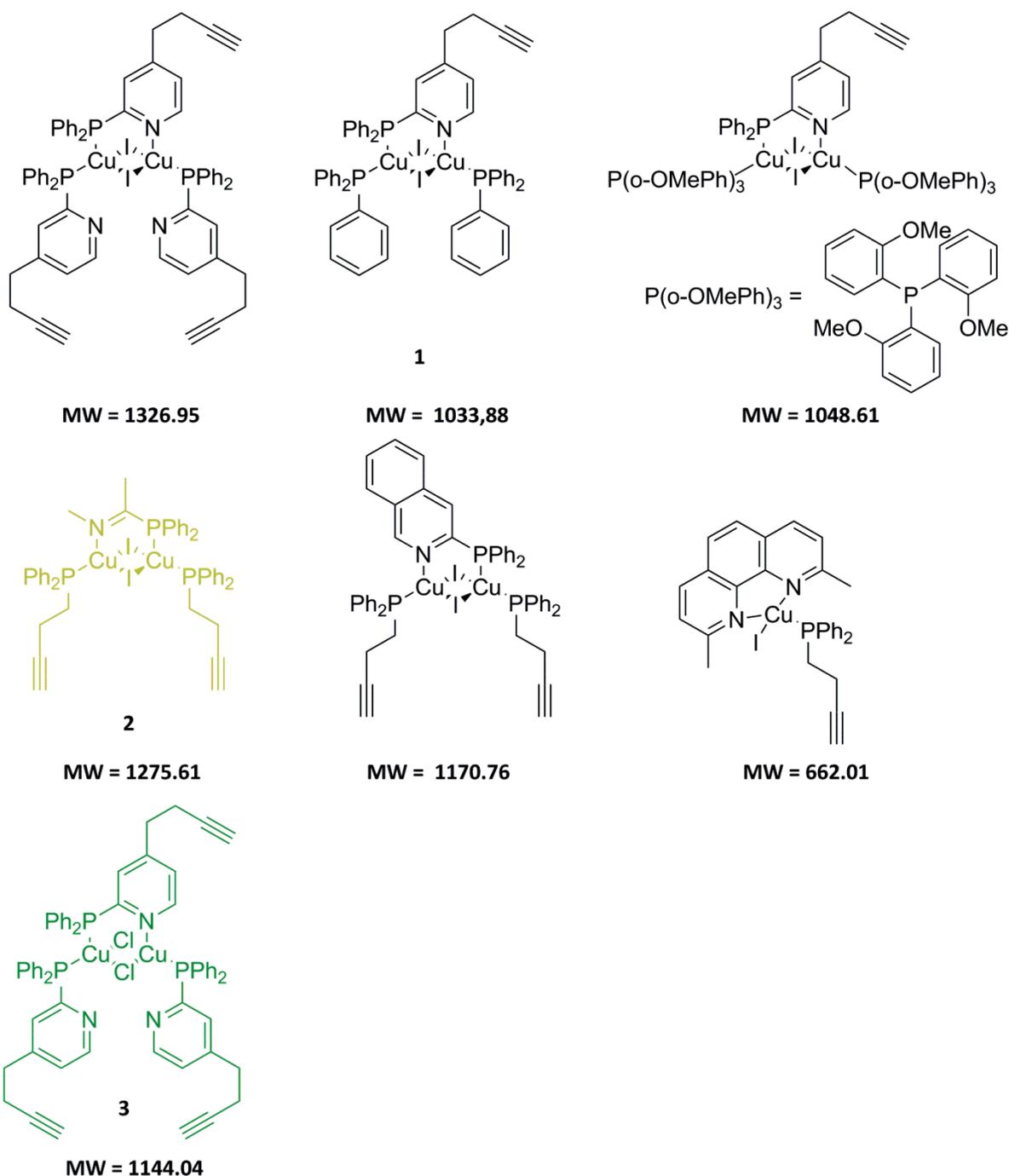
**Abbildung 4.3.9| Bioorthogonale CuAAC an der Zelloberfläche von 48 hpf Zebrafisch Embryonen.** Dabei reagiert ein peracetylierter *N*-Azidozucker ( $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$ ,  $80 \mu\text{M}$ , 24 Stunden) mit einem funktionalisierten Fluorophor (PyrPHOS-Cu(I)-Komplex,  $20 \mu\text{M}$ , 15 Minuten) in einer Click-Reaktion. Dadurch konnten Glykane der Zelloberfläche markiert werden. Der Azidozucker wurde als chemischer Reporter zunächst einen Tag inkubiert und über den „salvage pathway“ an die Zelloberfläche gebracht. Das komplementäre Biomolekül, der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex, clickte sehr schnell und bei Raumtemperatur an den Azidozucker an. Danach wurden die Zebrafisch Embryonen in frisches Zebrafischwasser überführt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica SP5) konnte eine intensive Fluoreszenz in der Retina in 48 hpf Zebrafisch Embryonen beobachtet werden (kleine weiße Pfeile). Außerdem wurde eine starke Fluoreszenz im Magen-Darm-Trakt beobachtet (lange weiße Pfeile).



**Abbildung 4.3.10| Bioorthogonale CuAAC an der Zelloberfläche von 120 hpf Zebrafisch Embryonen.** Dabei reagiert ein peracetylierter *N*-Azidozucker ( $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$ ,  $80 \mu\text{M}$ , 24 Stunden) mit einem funktionalisierten Fluorophor (PyrPHOS-Cu(I)-Komplex,  $20 \mu\text{M}$ , 15 Minuten) in einer Click-Reaktion. Dadurch konnten Glykane der Zelloberfläche markiert werden. Der Azidozucker wurde als chemischer Reporter zunächst einen Tag inkubiert und über den „*salvage pathway*“ an die Zelloberfläche gebracht. Das komplementäre Biomolekül, der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex, clickte sehr schnell und bei Raumtemperatur an den Azidozucker an. Danach wurden die Zebrafisch Embryonen in frisches Zebrafischwasser überführt. Mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica SP5) konnte eine intensive Fluoreszenz in der Retina in 120 hpf Zebrafisch Embryonen beobachtet werden.

### 4.3.3 PyrPHOS-Cu(I)-Komplexe mit heteroleptischen organischen Liganden

Bei homoleptischen Metallkomplexen gibt es keinen Unterschied der organischen Liganden, währenddessen heteroleptische Metallkomplexe sich aus verschiedenen Liganden zusammensetzen. Folgende hydrophobe, heteroleptische PyrPHOS-Cu(I)-Komplexe wurden in einer ersten Studie von Manuela Wallesch (Ak Stefan Bräse) synthetisiert (Abbildung 4.3.11). Leider zeigten mit Ausnahme des Komplexes **2** der Abbildung 4.3.11 alle hydrophoben Komplexe eine schlechtere bis gar keine Löslichkeit in DMSO im Vergleich zum homoleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplex. Daher wurden in den folgenden biologischen Tests nur der heteroleptische PyrPHOS-Cu(I)-Komplex **1** für MTT-Tests und anschließender FACS Analyse eingesetzt. Zunächst sollte der  $\text{LD}_{50}$ -Wert des heteroleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplex **1** in HeLa Zellen ermittelt werden (Abbildung 4.3.12). Im Vergleich zum homoleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplex **3**, bei dem in drei Tagen einen  $\text{LD}_{50}$ -Wert  $> 20 \mu\text{M}$  Wert beobachtet wurde, zeigte der heteroleptische PyrPHOS-Cu(I)-Komplex eine deutlich höhere Toxizität mit einem Wert von  $\text{LD}_{50}$ -Wert  $> 5 \mu\text{M}$ . Außerdem sollte die biologische Verträglichkeit des heteroleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes **1** mit Hilfe der FACS Analyse bestimmt werden. FACS steht für „*fluorescence activated cell sorting*“, auch Durchflusszytometrie genannt. Mit dieser analytischen Methode konnte der DNA-Gehalt von Zellen bestimmt werden. Schließlich wurden diese verschiedenen Zellzyklusphasen zugeordnet.

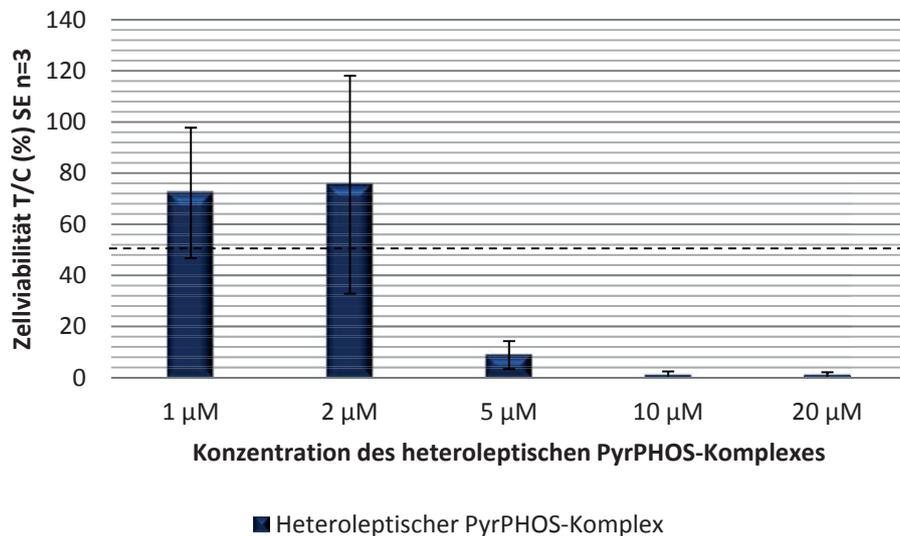


**Abbildung 4.3.11| Weitere Cu(I)-Komplexe zur Anwendung der bioorthogonalen CuAAC.** Neben dem homoleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplex (linkes, oberes Molekül und **3**), wurden weiter Cu(I)-Komplexe synthetisiert, deren Wasserlöslichkeit durch Veränderung der organischen Liganden verbessert werden sollte. Diese waren im Vergleich zu dem bereits bekannten homoleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplex nur teilweise bzw. äußerst schwer in DMSO löslich. MW = Molekulargewicht (engl. *molecular weight*).

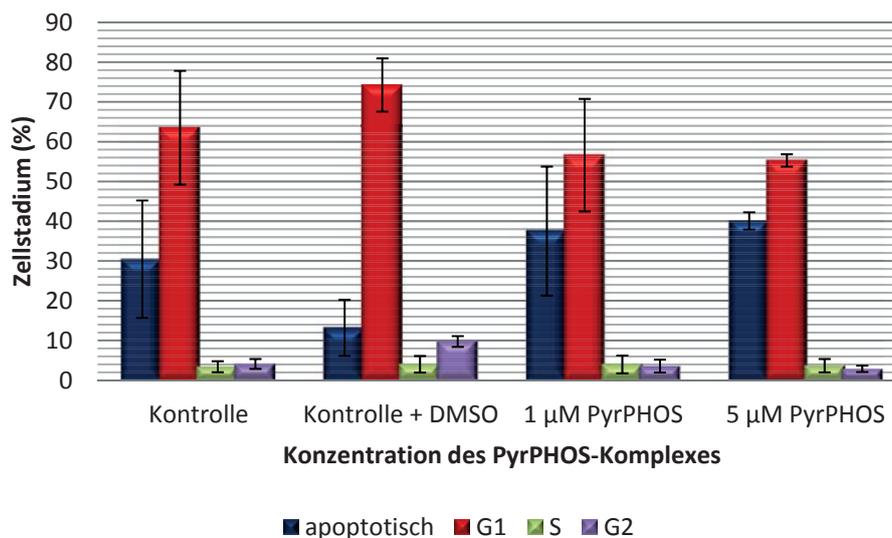
Das Ziel dieser Versuchsreihe war es herauszufinden, ob der heteroleptische PyrPHOS-Cu(I)-Komplex **1** einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung von HeLa Zellen hätte oder ob er Apoptose (Zelltod) induzieren könnte. Der Zellzyklus besteht aus der Interphase, die aus G1-, S- und G2-Phase zusammengesetzt ist und der Mitose-



phase. Die G1-Phase wird auch als Wachstumsphase bezeichnet bei der die Zelle auch in die G0-Phase gelangen kann. In der G0-Phase kann die Zelle differenzieren und bis zum Zelltod darin verweilen. Die G1-Phase ist die Synthesephase, in der DNA verdoppelt wird. Daran schließt sich die G2-Phase, die auch eine Wachstumsphase ist. In der G0-/G1-Phase besitzt die Zelle einen einfachen Chromosomensatz.



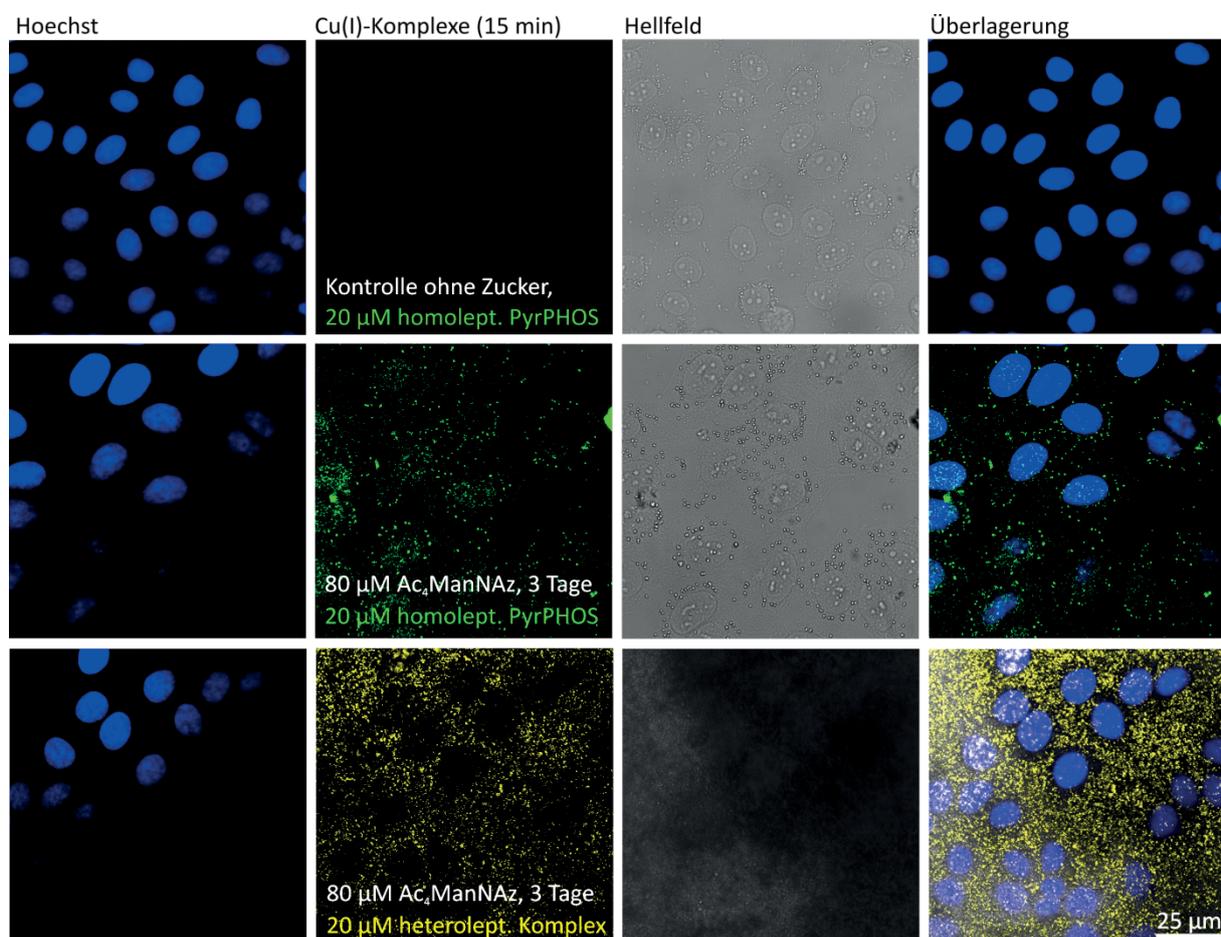
**Abbildung 4.3.12| Zytotoxizitätstest von HeLa Zellen durch einen heteroleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplex 1.**  $5 \times 10^3$  HeLa Zellen wurden mit 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 3 Tage mit 1, 2, 5 bzw. 10 µM des heteroleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes 1 (in DMSO gelöst) behandelt. Danach wurde 3-4 Stunden MTT-Reagenz (Promega) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Solubilization Solution/Stop Mix (Promega) für 2 Stunden lysiert. Die Absorption des Formazans wurde mit Hilfe eines Ultra Microplate Reader ELx808IU (BioTek Instruments) bei 595 nm gemessen. Die gestrichelte Linie verdeutlicht 50% der noch lebenden Zellen.



**Abbildung 4.3.13| Zellzyklusverteilung der HeLa Zellen in Abhängigkeit der Konzentration des heteroleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes 1.** Es wurden  $1 \times 10^6$  HeLa Zellen ausplattiert. Anschließend wurden sie mit 1 bzw. 5 µM des heteroleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes 1 72 Stunden behandelt, über Nacht in 70% EtOH fixiert und mit DRAQ5™ angefärbt. Mit Hilfe des FACScanDurchflusszytometers (BD Bioscience) wurden die Messungen durchgeführt.



In diesem Zyklus verweilt die Zelle die längste Zeit. Die Cycline geben der Zelle das Signal zum Weiterschreiten des Zellzyklus. Es tauchen immer wieder sogenannte Zellzykluskontrollpunkte auf. Diese Punkte regulieren den Zellzyklus und können diesen sogar zum Erliegen bringen. Die verschiedenen Zellzyklusphasen können mit Hilfe der FACS Analyse in verschiedenen Zellpopulationen dargestellt werden. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  HeLa Zellen 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Danach wurden die Zellen mit 1 bzw. 5 µM des heteroleptischen PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes **1** behandelt. Dabei wurden jeweils drei Proben angesetzt (eine mit 1 µM, die zweite mit 5 µM PyrPHOS-Cu(I)-Komplex **1** und die dritte ohne den PyrPHOS-Cu(I)-Komplex **1**). Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurden die Proben in PBS (+/+) gewaschen, trypsinisiert, in 5 ml DMEM resuspendiert und in 5 ml Röhrchen (Greiner Bio-One) überführt und anschließend mit 70% EtOH (Ethanol) fixiert.



**Abbildung 4.3.14| Bioorthogonale CuAAC in HeLa Zellen mit heteroleptischem PyrPHOS-Cu(I)-Komplex **2**.**  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden mit 80 µM Ac<sub>4</sub>ManNAz 3 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und 15 Minuten mit 20 µM des jeweiligen PyrPHOS-Cu(I)-Komplexes **2** bzw. **3** behandelt. Bei diesen Komplexen handelt es sich um diejenigen, die in der Abbildung 4.3.11 farblich markiert wurden. Die Farbe entsprach jeweils der Fluoreszenz des Cu(I)-Komplexes. Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Leica SP5) konnten die HeLa Zellen detektiert werden. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit 0,5 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) zur besseren Differenzierung der Zellen angefärbt. Da das Emissionsspektrum des Hoechst-Farbstoffes (460 nm) in das Emissionsspektrum der homo-/heteroleptischen Cu(I)-Komplexe (480 nm) einstrahlte, wurde der UV-Laser bei einer zweiten Aufnahme des gleichen Bildausschnittes ausgeschaltet. Im Vergleich zu dem grün-fluoreszierenden Cu(I)-Komplex **3** zeigte der gelb-fluoreszierende Cu(I)-Komplex **2** keine Färbung der Zelloberflächenglykane.



Zusätzlich wurde die DNA der Zellen zur Färbung der DNA mit 250  $\mu\text{l}$  DRAQ5<sup>TM</sup> (BioStatus) gefärbt. Die Proben wurden kurz vor der Messung 5-10 Minuten auf Eis gestellt. Schließlich wurden die Proben mit Hilfe des FACScan Durchflusszytometers (BD Bioscience) detektiert. Als Positivkontrollen apoptotischer Zellen diente 50 mM LiCl. Die Zellteilung erfolgt in 4 Schritten: i) die Mitose (M-Phase, bei der es sich um die eigentliche Zellteilung handelt), ii) die G1-Phase (einer Wachstumsphase), iii) der S-Phase (Verdopplung der Chromosomen) und iv) der G2-Phase (einer Wachstumsphase). Die FACS Analyse zeigte, dass der heteroleptische PyrPHOS-Cu(I)-Komplex **1** die Zellteilung in der G1-Phase zunächst nicht beeinflusste (Abbildung 4.3.13). Dennoch konnte in der S-Phase und der darauf folgenden G2-Phase nur sehr wenig Zellen detektiert werden (<10%). Es wurde jedoch ein konzentrationsabhängiger Anstieg der apoptotischen Zellen beobachtet (Abbildung 4.3.13). Parallel wurden die in Abbildung 4.3.11 gezeigten Cu-Komplexe **1**, **2** und **3** in HeLa Zellen ausgetestet. Dazu wurden  $1 \times 10^4$  Zellen mit 80  $\mu\text{M}$  Ac<sub>4</sub>ManNAz, wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben vorinkubiert und mit 20  $\mu\text{M}$  der verschiedenen PyrPHOS-Cu(I)-Komplexe **2** bzw. **3** behandelt. Tatsächlich zeigte der grün-markierte, homoleptische Cu(I)-Komplex **3** der Abbildung 4.3.11 eine deutliche Fluoreszenz auf der Zelloberfläche der HeLa Zellen (Abbildung 4.3.14). Im Vergleich zu dem Cu(I)-Komplex **3** zeigte der heteroleptische Cu(I)-Komplex **2** (gelb-markierter Cu(I)-Komplex der Abbildung 4.3.11) keine Färbung der Zelloberflächenglykane (Abbildung 4.3.14). Dennoch sind die Markierungen auch des grün-fluoreszierenden Komplexes **3** deutlich schlechter als die Markierungen mit dem homoleptischen Komplex. Die hier getesteten heteroleptischen Cu(I)-Komplexe sind daher für eine effiziente Anwendung *in vivo* eher ungeeignet. Neben den homo- und heteroleptischen Cu(I)-Komplexen wurden weitere Emittermaterialien aus OLEDs auf ihre Eignung als neuartige, bleichstabile Fluorophore für die Anwendung in Zellen und *in vivo* getestet. In erster Linie wurden die nachfolgenden Cu-Komplexe als Emittermaterial in OLEDs synthetisiert. Durch Veränderung der organischen Liganden, können diese Komplexe in allen möglichen Wellenlängenbereichen angeregt werden.

#### 4.4 Neue Cu-basierte Fluoreszenzfarbstoffe aus Emittermaterialien von OLEDs

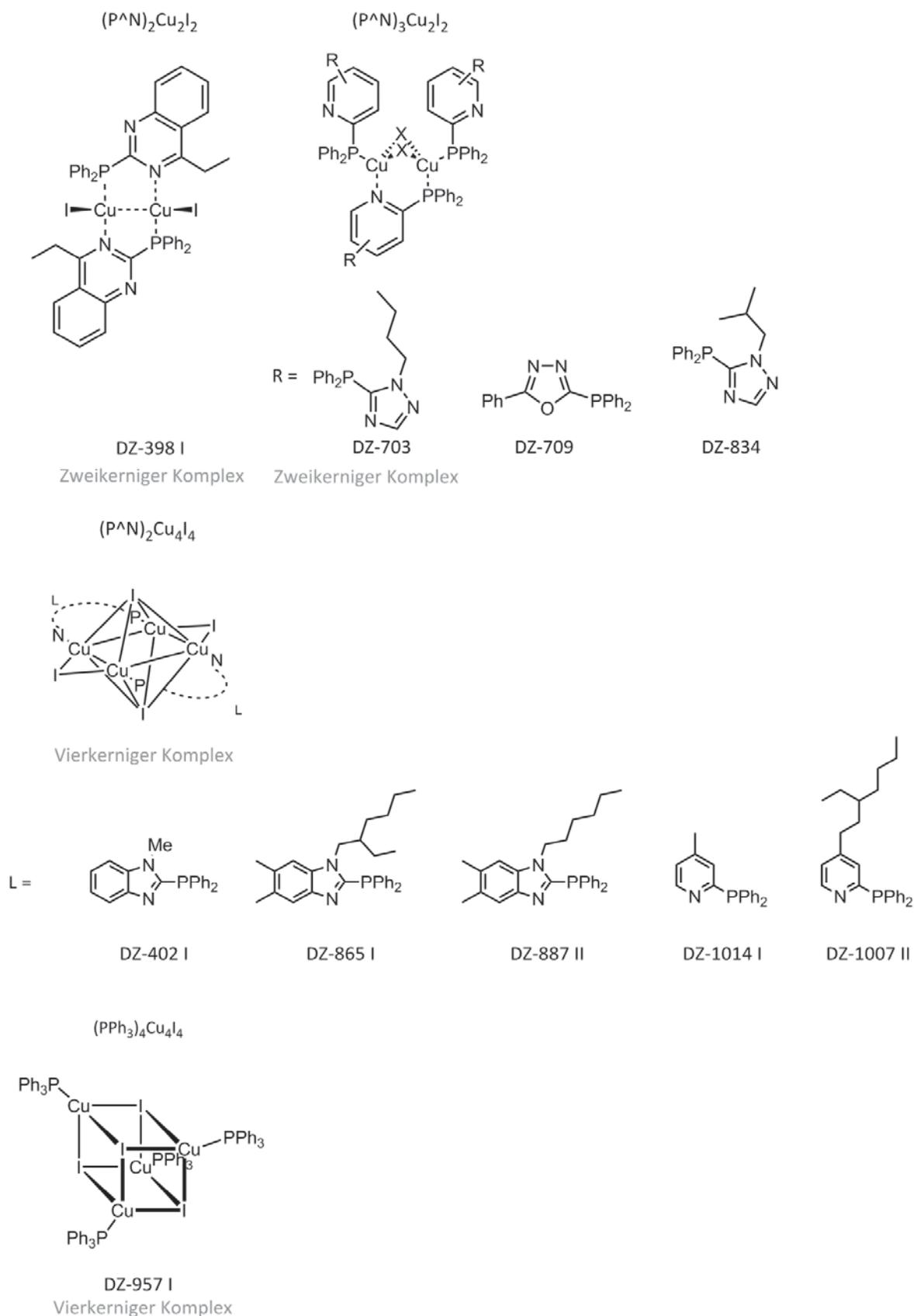
In dieser Versuchsreihe wurden  $1 \times 10^4$  HepG2 Zellen auf eine 8-Well-ibidi-Platte (Ibitreat) ausplattiert und mit 10  $\mu\text{M}$  den folgenden Cu-Komplexen (DZ-1014 I, DZ-897 II, DZ-398 I, DZ-1035 I, DZ-957 I, DZ-1052 II und DZ-709) für 1-48 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert (Abbildung 4.4.1). Da die Cu-Komplexe schlecht wasserlöslich waren, wurde jeweils eine 2 mM Stock-Lösung in DMSO (Roth) angesetzt. Die Verdünnungen wurden allerdings in DMEM (+10 % FCS, +1% P/S und +1% Myco-3) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica SP5, Leica Microsystems) mit dem Objektiv: HCX PL APO CS 63.0x1.2 WATER UV durchgeführt. Sieben weitere Cu-Komplexe (DZ-402, DZ-1007 II, DZ-865 I, DZ-873 I, DZ-874 II, DZ-834 und DZ-703) wurden unter den gleichen Bedingungen in  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen ausgetestet. Nach einer 1-stündigen Inkubation wurden die inkubierten Zellen mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenz-



mikroskopie beobachtet. Durch Verunreinigung einiger Cu-Komplexe mit Bakterienstämmen, die wahrscheinlich während der Synthese entstanden waren, zeigten einige Proben (DZ-709, DZ-1014 I) nach 24-stündiger Inkubation der Cu-Komplexe eine starke Bakterienkontamination. Unter anderem zeigten die Bakterien eine starke Fluoreszenz, wohingegen die Zellen keine Fluoreszenz zeigten. Außerdem bewegten sich diese Bakterien sehr schnell, wodurch sie auch als Bakterien identifiziert werden konnten. Nach weiteren 24 Stunden der Inkubation wurden die Zellen erneut mikroskopiert. Schließlich konnte zum einen nur noch eine schwache Fluoreszenz der Bakterien beobachtet werden und zum anderen zeigten diese eine sehr schwache Mobilität. Bei den detektierten Bakterien handelte es sich um Kokken. Diese Beobachtungen führten dazu, dass weitere gezielte Analysemethoden bezüglich des Verhaltens der Cu-Komplexe gegenüber Bakterienkontamination durchgeführt wurden. Aus dem Grund wurden gezielt gram-positive (Milchsäurebakterien aus einem Joghurt) und gram-negative Bakterien (*E.coli*, *Escheria coli*) mit den entsprechenden Cu-Komplexen inkubiert.

Die beiden Bakterienarten (gram-positive und gram-negative) unterscheiden sich nur im Aufbau der Zellmembran der Zellwand. Die Zellwand von gram-positiven Bakterien besteht aus Murein, das abwechselnd aus *N*-Acetyl-glukosaminen und *N*-Acetylmuraminsäuren aufgebaut ist. Durch Peptidketten sind diese Polysaccharide miteinander quervernetzt. Während gram-positive Bakterien ungefähr 40 Mureinschichten besitzen, besitzen gram-negative Bakterien dagegen nur ein oder zwei Schichten. Des Weiteren haben gram-positive Bakterien Teichonsäure in der Zellwand. Oberhalb dieser Zellmembran befindet sich in gram-negativen Bakterien zusätzlich noch eine Lipopolysaccharidschicht. (Cypionka 2010)

Für weitere Untersuchungen der antibakteriellen Wirkung der Cu-Komplexe gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien wurden  $1 \times 10^5$  HeLa Zellen mit unterschiedlichen Bakterienkulturen, *E.coli* (gram-negative Bakterien) und Milchsäurebakterien aus Joghurt (gram-positive Bakterien), inokuliert und anschließend mit  $40 \mu\text{M}$  der ausgewählten Cu-Komplexe (DZ-1014 I, DZ-1035 I, DZ-1052 II, DZ-957 I, DZ-402 und DZ-873 I) behandelt (Abbildung 4.4.1). Sowohl nach 24-stündiger als auch nach einer 48-stündigen Behandlung wurden die Kokulturen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Während bei den HeLa Zellen, die mit *E.coli* und Cu-Komplexen behandelt wurden, keine Unterschiede zu den Kontrollzellen beobachtet werden konnte, wurden bei den HeLa Zellen, die mit Milchsäurebakterien und Cu-Komplexen behandelt wurden, deutlich weniger Bakterien visualisiert (Abbildung 4.4.2). Bei der Abbildung 4.4.2 wurden zudem eine signifikante Reduktion der Bakterien detektiert. Nach 24-stündiger Behandlung mit den Milchsäurebakterien konnte in den Kontrollzellen ein noch wesentlich dichter Bakterienrasen beobachtet werden. Wohingegen in den Bakterien, die mit dem Cu-Komplex DZ-398 I behandelt wurden, eine klare Verringerung der Bakterienstämme zu erkennen war.

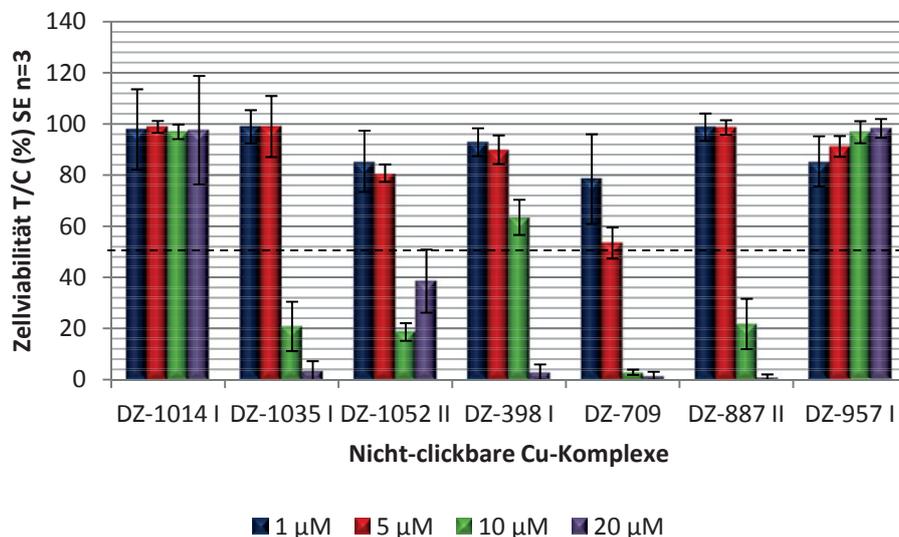


**Abbildung 4.4.1| Nicht-clickbare Cu-Komplexe.** Alle Cu-Komplexe wurden in erster Linie als Emittiermaterialien in OLEDs von Daniel Zink (Ak von Stefan Bräse) synthetisiert. DZ = Abkürzung für Daniel Zink.



**Abbildung 4.4.2| Infizierung von HeLa Zellen mit Milchsäurebakterien und einem nicht-clickbaren Cu-Komplex.** Die linke Abbildung zeigt HeLa Zellen, die mit Milchsäurebakterien infiziert wurden. In der rechten Abbildung ist eine deutliche Reduzierung der Milchsäurebakterien durch die Behandlung mit einem nicht-clickbaren Cu-Komplex (DZ-398 I) zu erkennen. Während in den Kontrollen ein richtiger Bakterienrasen zu erkennen war, waren in den Proben, die mit DZ-398 I behandelt wurden, nur einzelne Kokken sichtbar. Diese Kokken ordneten sich in Ketten an. Das deutet auf eine eventuelle antibiotische Wirkung des DZ-398 I gegenüber gram-positiven Bakterien hin.

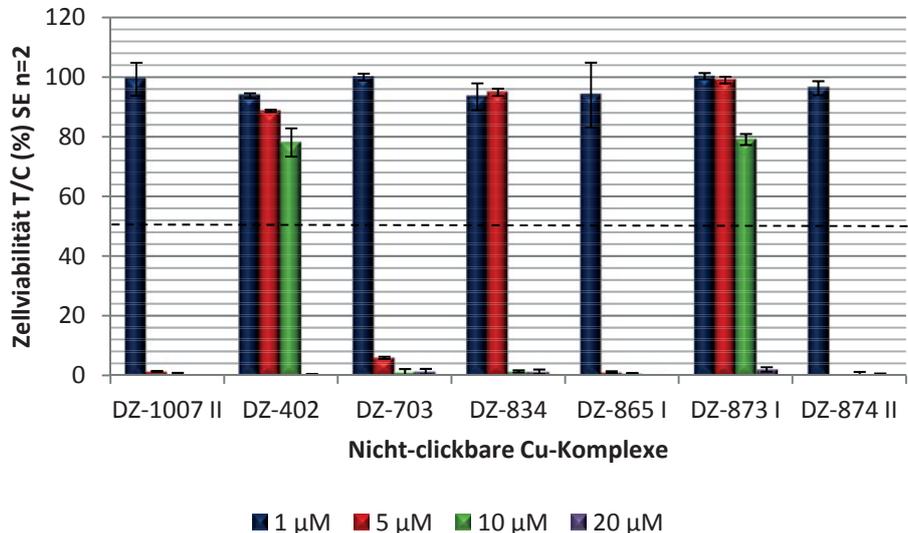
Die Kettenbildung der Milchsäurebakterien, die mit dem zweikernigen Cu-Komplex DZ-398 I behandelt wurden, kommt durch Nährstoffmangel der Bakterien zustande. Denn Bakterien zeigten lange Kokkenstränge nach 48 Stunden (Abbildung 4.4.2). Des Weiteren wurde festgestellt, dass bei den Proben, bei denen deutlich mehr Milchsäurebakterien hinzugefügt wurden, die Bakterienstämme bevorzugt nicht in den Bereichen des Zellrasens gewachsen waren. Es bildete sich daher ein Bakterienhof.



**Abbildung 4.4.3| Konzentrationsabhängiger MTT-Test von HepG2 Zellen und nicht-clickbaren Cu-Komplexen.**  $1 \times 10^4$  HepG2 Zellen wurden auf eine 96-Well Platte (Corning) ausplattiert und 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Danach wurden die Zellen mit den Cu-Komplexen, die von Daniel Zink (Ak Stefan Bräse) im Rahmen seiner Dissertation synthetisiert wurden, mit einer Konzentration von 1, 5, 10 bzw. 20 µM 72 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre behandelt. Anschließend wurden 15 µl MTT-Reagenz (Promega) hinzu pipettiert. Nach 2-3 stündiger Inkubationszeit des MTT-Reagenzes wurden 100 µl Solubilization Solution/Stop Mix (Promega) zugegeben. Nach weiteren 2 Stunden wurden die Platte mit Hilfe eines Ultra Microplate Reader ELx808IU (BioTek Instruments) bei 595 nm gemessen. Die gestrichelte Linie markiert 50% der noch lebenden Zellen.



Der Cu-Komplex DZ-398 I wurde daher als potentielles Antibiotikum zum Patent angemeldet. Eine Testreihe an weiteren gram-positiven Bakterien, wie z.B. MRSA (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*) ist bereits in einer Kollaboration mit Mikrobiologen der Uniklinik Bonn geplant.



**Abbildung 4.4.4| Konzentrationsabhängiger MTT-Test von HeLa Zellen und nicht-clickbaren Cu-Komplexen.**  $1 \times 10^4$  HeLa Zellen wurden auf eine 96-Well Platte (Corning) ausplattiert und 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Danach wurden die Zellen mit den Cu-Komplexen, die von Daniel Zink (Ak Stefan Bräse) im Rahmen seiner Dissertation synthetisiert wurden, mit einer Konzentration von 1, 5, 10 bzw. 20 µM 72 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre behandelt. Anschließend wurden 15 µl MTT-Reagenz (Promega) hinzu pipettiert. Nach 2-stündiger Inkubationszeit des MTT-Reagenzes wurden 100 µl Solubilization Solution/Stop Mix (Promega) zugegeben. Nach weiteren 2 Stunden wurden die Platte mit Hilfe eines Ultra Microplate Reader ELx808IU (BioTek Instruments) bei 595 nm gemessen. Die gestrichelte Linie markiert 50% der noch lebenden Zellen.

Zur Bestimmung der Toxizität der Cu-Komplexe auf HepG2/HeLa Zellen wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausplattiert und mit steigender Konzentration des jeweiligen Cu-Komplexes über einen Zeitraum von 3 Tagen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre behandelt. Während die meisten Cu-Komplexe (DZ-1007 II, DZ-703, DZ-865 I und DZ-874 II) einen LD<sub>50</sub> > 5 µM in eukaryotischen Zellen zeigten, konnte bei einigen Cu-Komplexen (DZ-1007 II, DZ-703, DZ-865 I und DZ-874 II) ein LD<sub>50</sub> > 10-20 µM beobachtet werden. (Abbildung 4.4.3 und Abbildung 4.4.4). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass einige der Cu-Komplexe, die in erster Linie als Emittermaterialien in OLEDs eingesetzt wurden, auf Zellen, die mit gram-positiven Bakterien (Milchsäurebakterien) kontaminiert waren, antibiotisch wirkten. Besonders die Cu-Komplexe DZ-709, DZ-873 I, DZ-398 I und DZ-1014 I (Abbildung 4.4.3) schienen diese antibakterielle Eigenschaften gegenüber Zellen zu besitzen, da sie das Zellwachstum der HepG2/HeLa Zellen nicht beeinträchtigten. Eine weitere wichtige Eigenschaft dieser Cu-Komplexe war deren Fluoreszenzstabilität. Die Bakterien metabolisierten die eingesetzten Cu-Komplexe und waren daher leicht über einen Zeitraum bis zu 72 Stunden mikroskopisch zu identifizieren. Demnach stellten die Cu-Komplexe DZ-709, DZ-873 I, DZ-398 I und DZ-1014 I eine völlig neue Form von Antibiotika dar.



## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 Tumor- und Primärzelllinien

Die Zellen wurden in einem Zell-spezifischen Medium (unter Zusatz von 10% FCS (Fötales Kälberserum), 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) + 1% Myco-3 (Ciprofloxacin)) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre bis zur Konfluenz adhärent kultiviert (Zellkulturflasche, Greiner bio-one). Danach wurden die Zellen je nach Bedarf passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit DPBS (-/-) (*Dulbeccos phosphate buffered saline*) gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,025% Trypsin, 0,01% EDTA) benetzt, um die Zellen vom Zellkulturflaschenboden zu lösen. Danach wurden die abgelösten Zellen mit mindestens einem Volumen serumhaltigen Medium abgestoppt und die Zellen je nach Bedarf auf die entsprechende Zellkulturschale/Ibidi 8-Well Platte/96-Well Platte/Zellkulturflasche ausgesät.

Hela (humane Gebärmutterhalskarzinomazellen), SHSY5Y (humane Neuroblastomzellen), Raw (Fibroblasten der Ratte), Hek293 (humane Nierenkarzinomazellen), HepG2 (humane Leberkarzinomazellen) und humane Fibroblasten benötigten DMEM-Medium (*Dulbeccos modified eagle medium*, #41966, Gibco®) mit einem Zusatz von 10% FCS (#15-151, PAA, the cell culture company), 1% Pen/Strep (#15140, Gibco®) und Myco-3 (Ciprofloxacin, #A5240.0020, AppliChem). A459 (humane Lungenepithelzellen) und MCF7 Zellen (humane Brustkrebszellen) benötigten RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute Medium, L-Glutaminbasis, #21875, Gibco®) mit einem Zusatz von 15% FCS und 1% Pen/Strep). HUVEC Zellen (*humane umbilical vein endothelial cells*, humane Nabelschnurendothelzellen) wurden in EBM-2 Medium (Lonza) kultiviert.

#### 5.1.2 Kryokonservierung von Zelllinien

Um die Kristallbildung in den Zellen zu verhindern, wurden die Zellen in Zell-spezifischen Kryoröhrchen (2,0 ml mit Rundboden, #430289, bestehend aus PP (Polypropylen), Corning, USA) in ihrem jeweiligen Medium unter Zusatz von 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) (#A994.2, Carl Roth) und 50% FCS in einem speziellen mit Isopropanol gefüllten Behälter bei -80 °C eingefroren. Der Behälter kühlte die Zellen in einer Minute um 1 °C schonend bis zur gewünschten Temperatur von -80 °C herunter. Nach zwei Stunden konnten die Zellen in einem Tank mit flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt werden, indem sie mehrere Jahre haltbar sein können. Die so konservierten Zellen wurden über einen langen Zeitraum in einer Kältestarre versetzt, in der nahezu alle Stoffwechselfvorgänge still gelegt waren. Zum Auftauen wurden die Zellen bei RT erwärmt und in leicht aufgetautem Zustand in frisches Medium überführt. Danach konnten die Zellen, wie bereits oben schon beschrieben, bis zur Konfluenz adhärent kultiviert werden. Für die Kryokonservierung eigneten sich Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Vor dem Einfrieren sollte au-



ßerdem noch darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht kontaminiert und Mykoplasmen-frei waren.

### 5.1.3 Verwendung von BG Matrigel™ bei SHSY5Y Zellen

Zuerst wurde eine sterile Kollagenlösung (50 µg/ml) in DMEM-freies Medium, das mit 0,2% Essigsäure versetzt war, angesetzt und für 4 Stunden bei RT stehen gelassen. Die weitere Lagerung erfolgte im 4 °C Kühlschrank. Nun wurde die noch gefrorene Stocklösung des Matrigels™ mit 9,6 mg/ml kurz aufgetaut und mit der sterilen Kollagenlösung auf 0,3 mg/ml verdünnt. Danach wurde diese Lösung nach kurzem Schwenken direkt auf die 96-Well-ibidi-Platte pipettiert. Pro Well wurden 100 µl Matrigel™ verwendet, sodass der Boden der 96-Well-ibidi-Platte vollständig bedeckt war. Danach wurde die Platte für mindestens eine halbe Stunde bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Bevor die Zellen nun auf das Matrigel™ gegeben werden konnten, sollte mindestens ein- bis zweimal mit je 100 ml PBS (-/-) gewaschen werden. Für ein dünnes Gel wurden 50 µl/cm<sup>2</sup> fertig angesetzter Matrigel™ Lösung verwendet.

## 5.2 Cu-freie Click-Reaktion mit ClickFITC- bzw. ClickCy5

Für die Markierung der Zuckerstrukturen wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro 8-Well Kammer (8-Kammer, IbiTreat, Ibidi) für konfokal mikroskopische Aufnahmen ausplattiert. Nachdem die Zellen auf dem Zellrasen angewachsen waren, wurden unter Zusatz von frischem Medium 80 µM des peracetylierten Zuckers, *N*-Azido-acetylgalaktosamin (Ac<sub>4</sub>GalNAz), *N*-Azido-acetylglukosamin (Ac<sub>4</sub>GlcNAz), *N*-Azido-acetylmannosamin (Ac<sub>4</sub>ManNAz) oder *N*-Acetyl-4-azido-4-desoxymannosamin (Ac<sub>3-4</sub>-Azido-ManNAc) drei Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach drei Tagen sollte der Zucker dann verstoffwechselt und in die Glykokalyx eingebaut sein. Danach wurden die Zellen dreimal mit DPBS (-/-) gewaschen. Die an dem Zucker verknüpfte Azido-Gruppe konnte mit sogenannten Click-Reagenzien, in einer Cu-freien Click-Reaktion visualisiert werden. Als Cu-freie Click-Reagenzien wurden zum einen ein FITC-gebundenes Cyclooctin (Fluorescein-Isothiocyanat, ClickFITC, Abbildung 4.5.1) und zum anderen ein Cy5-gebundenes Cyclooctin (ClickCy5, Abbildung 4.5.1) verwendet. Die Cu-freien Click-Reagenzien wurden zunächst in einer Konzentration von 20 µM (Stammlösung gelöst in 2:1 DMF/DPBS(-/-)) eingesetzt und über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte der mikroskopische Nachweis der eingebauten Strukturen. Es wurde zunächst bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Somit konnte die Verteilung der Zuckerstrukturen auf der Glykokalyx sichtbar gemacht werden. Vor der Messung mit einem Fluoreszenzmikroskop mussten die Zellen zwei- bis dreimal mit DPBS (-/-) gewaschen werden, um überschüssiges Medium, in dem das ClickFITC und ClickCy5 gelöst wurden, zu entfernen. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt.



### 5.3 Cu-katalysierte Click-Reaktion mit PyrPHOS-Cu(I)-Komplex

Für die Markierung der Zuckerstrukturen wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro 8-Well Kammer (8-Kammer, IbiTreat, IbiDi) für konfokal mikroskopische Aufnahmen ausplattiert. Nachdem die Zellen auf dem Boden der Zellkulturschale angewachsen waren, wurden sie unter Zusatz von  $80 \mu\text{M}$  des peracetylierten Zuckers, *N*-Azido-acetylgalaktosamin ( $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$ ) oder *N*-Azido-acetylmannosamin ( $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$ ) im frischen Medium drei Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit sollte der Zucker bereits verstoffwechselt und in die Glykokalyx eingebaut sein. Danach wurden die Zellen dreimal mit DPBS (-/-) gewaschen. Die an dem Zucker verknüpfte Azido-Gruppe konnte mit dem PyrPHOS-Cu(I)-Komplex in einer Cu-katalysierten Click-Reaktion visualisiert werden. Der Cu-katalysierte PyrPHOS-Cu(I)-Komplex wurde zunächst in einer Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  (Stammlösung gelöst in DMSO) eingesetzt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag wurde die mikroskopische Untersuchung durchgeführt. Es wurde zunächst bei einer Wellenlänge von  $488 \text{ nm}$  angeregt. Somit konnte die Verteilung der Zuckerstrukturen auf der Glykokalyx sichtbar gemacht werden. Vor der Messung mit einem Fluoreszenzmikroskop mussten die Zellen zwei- bis dreimal mit DPBS (-/-) gewaschen werden, um überschüssiges Medium, in dem der PyrPHOS-Cu(I)-Komplex gelöst wurde, zu entfernen. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt.

### 5.4 FACS Analyse

Für die FACS Analyse wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/Well ausgesät und 72 Stunden mit  $80 \mu\text{M}$  des entsprechenden Azidozuckers ( $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  bzw.  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$ ) und  $20 \mu\text{M}$  des heteroleptischen Cu(I)-Komplexes behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle wurde dagegen  $50 \text{ mM}$  LiCl eingesetzt. Dieses Reagenz markierte die apoptotischen Zellen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der 8-Well-Kammer wurde Trypsin verwendet. Anschließend wurden die Zellen 3 Minuten bei  $300 \text{ rpm}$  zentrifugiert, einmal mit DPBS (-/-) gewaschen und in  $200 \mu\text{l}$  DPBS (-/-) resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit  $5 \text{ ml}$  einer  $70\%$ igen EtOH Lösung über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 4 Minuten bei  $400 \text{ rpm}$  zentrifugiert, einmal mit  $5 \text{ ml}$  DPBS (-/-) gewaschen und in  $250 \mu\text{M}$  DRAQ5<sup>TM</sup> (1:250 Verdünnung in DPBS (-/-), Biostatus) aufgenommen. Nach 5-10-minütiger Inkubation auf Eis und unter Lichtausschluss konnten die Zellen nun via FACS Gerät (Becton, Dickinson FACScan) analysiert werden. Denn nach der Zellkernfärbung mit DRAQ5<sup>TM</sup> konnte der DNA Gehalt in der jeweiligen Zelle mit Hilfe des FACS untersucht werden. Dabei markierte DRAQ5<sup>TM</sup> die DNA und emittierte schon bei einer Wellenlänge von  $647 \text{ nm}$ . Angeregt wurde DRAQ5<sup>TM</sup> bei  $488 \text{ nm}$ . Bevor die zu messende Probe überhaupt vom FACS aufgenommen werden konnte, musste die Probe mit DPBS (-/-) soweit verdünnt werden, dass eine Zählrate von  $1000$  Zellen pro Sekunde im FACS erreicht werden konnte. Innerhalb des FACS Gerätes wurden die Zellen nun einzeln durch eine dünne Kapillare gespült, die seitlich mit einem Laser angeregt wurde. Der DNA-Gehalt in der Zelle war dem gemessenen



Signal proportional. Dagegen bedeutete eine gleich starke Fluoreszenzintensität gleiche Zellzyklusphasen. Pro Probe wurden 50000 Zellen ausgezählt und deren Zellzyklusverteilung bestimmt.

## 5.5 Zellkernfärbung mit Hoechst 33342

Für die Färbung der Zellkerne wurde ein an die DNA anlagernde, fluoreszierender Farbstoff Hoechst 33342 (Invitrogen) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml 15 Minuten auf den Zellen inkubiert. Nach dieser kurzen Inkubationszeit war der Farbstoff bereits mit der DNA soweit assoziiert, sodass die Zellkerne bei einer Anregungswellenlänge von etwa 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden konnten.

## 5.6 Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd

Da Cu(I)-Ionen sehr toxisch auf Zellen wirken, wurden die Zellen vor der Behandlung mit einem Cu-katalysierten Click-Reagenz mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Zunächst wurde das Zellmedium abgenommen. Danach wurden die Zellen 2-3mal mit DPBS (+/+) gewaschen und mit 4% PFA (in PBS (+/+)) 15 Minuten auf Eis fixiert. Nach einem weiteren Waschen mit kaltem PBS (+/+) wurden die Zellen mit 0,25% TritonX-100 (in PBS (+/+)) 15 Minuten auf Eis permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit kaltem PBS (+/+) wurden die Zellen mit 3% BSA (in PBS (+/+)) über Nacht blockiert.

## 5.7 MTT-Test

Der MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wurde zur Bestimmung der Zellvitalität eingesetzt. Dieser Test beruhte auf die Anzahl der Reduktionsäquivalente der Zelle, die durch die Zellatmung ( $\text{NADPH/NADH} + \text{H}^+$ ) gebildet wurden, d.h. je mehr Reduktionsäquivalente eine Zelle besaß, umso vitaler war sie. Denn je mehr Zellen diese Reduktionsäquivalente hatten, umso mehr MTT-Reagenz (ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff) wurde durch Reduktion in ein blaues, wasserunlösliches Formazan überführt (Abbildung 5.7). Die Reduktion kam durch die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase, einem Enzym, das in der Atmungskette der Mitochondrien eine Rolle spielt, zustande. Sie war nur in metabolisch aktiven Zellen aktiviert.

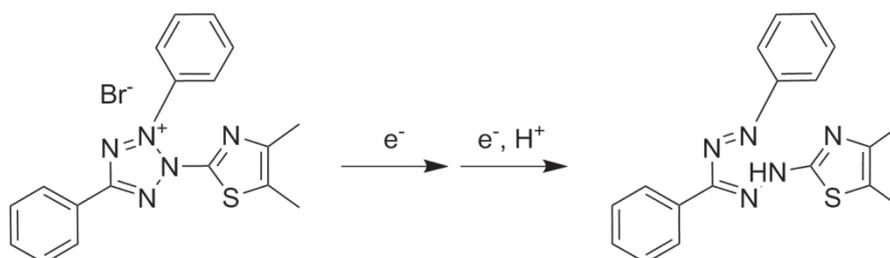


Abbildung 5.7| Reduktion von MTT (links) in Formazan (rechts).



Für die Durchführung des Tests wurden  $1 \times 10^3$  Zellen auf eine 96-Well Platte in 100  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Zellmediums (unter Zusatz von 10% FCS, 1% Pen/Strep und 1% Myco-3) bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre ausgesät. Die Toxizität wurde nach 72-stündiger Inkubationszeit mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Reagenzes gemessen. Die lebenden Zellen wurden *in vivo* mit dem Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz, behandelt, um den Anteil der lebenden Zellen bzw. deren Vitalität im Vergleich zu einer Kontrollprobe zu testen. Als Nullwert wurden tote Zellen gemessen. Dazu mussten 5  $\mu\text{l}$  einer 100%igen TritonX-100-Lösung 15 Minuten zu den Zellen hinzugegeben werden. Anschließend wurden pro Well 15  $\mu\text{l}$  MTT-Reagenz (#G4100, Promega, Cell Proliferation Assay) hinzupipettiert und 2-4 Stunden inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  Zelllysispuffer (Promega, Cell Proliferation Assay) 1 Stunde bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre lysiert, um das Formazan aus den Zellen zu lösen. Als letzter Schritt konnte der MTT-Test bei 570 nm mit einem Fluoreader (Bio-Tek Instruments) gemessen und mit Hilfe von Excel 2010 ausgewertet werden.

## 5.8 Statistische Auswertung

### 5.8.1 MTT Test

Zur Berechnung des Standardfehlers wurde die Standardabweichung durch die Wurzel der Versuchsanzahl geteilt. Um sigifikante Unterschiede zwischen den Werten zu einer Kontrollprobe zu überprüfen, wurde ein einseitiger T-Test für gepaarte Proben durchgeführt. Der prozentuale Wert war 1 minus den alpha-Wert. In den Abbildungen war die standardisierte Nomenklatur angegeben: \* bei  $p(\alpha) \leq 0,5$ , \*\* bei  $p \leq 0,1$  und \*\*\* bei  $p \leq 0,01$ .

### 5.8.2 Hochdurchsatzverfahren

Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden anhand der nachfolgenden Formel (Abbildung 5.8) bei diskreten Zufallsvariablen berechnet. Da die analysierte Pixelanzahl sehr schwankte, wurde keine feste Grenze verwendet. Stattdessen wurde die Pixelanzahl aus der Summe des Mittelwert der oberen Grenze und der dazugehörigen Standardabweichung festgelegt. Außerdem wurden auffallende Artefakte der aufgenommenen Bilder aus der Berechnung rausgenommen.

$$\mu = E(X) = \sum_i x_i f(x_i) \quad \sigma = \sqrt{\sum_i (x_i - \mu)^2 f(x_i)}$$

Abbildung 5.8| Formel zur Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung.



## 5.9 Behandlung der Zebrafisch Embryonen

### 5.9.1 Gewinnung der Zebrafisch Embryonen

Am Vorabend wurden die Zebrafische übereinandergesetzt, um die Paarung der Tiere zu ermöglichen. Dazu wurde in der Regel ein Männchen unten in das Ablachbecken und oben ein bis zwei Weibchen hineingesetzt. Die Tiere waren durch ein Gitter voneinander getrennt. Am nächsten Morgen wurden die Zebrafische dann zusammengeführt. Nun dauerte es ca. 1 Stunde bis die ersten Eier abgelegt werden konnten. Damit die Zebrafische ihre Eier nicht fressen konnten, wurde ein zusätzliches Netz in den Wasserbehälter eingeführt, sodass die abgelaichten Eier durch das Gitter auf den Boden des Wasserbeckens fielen. Eine unterschiedliche zeitliche Entwicklung der Eier innerhalb eines Geleges war zu berücksichtigen. Die Zebrafisch Embryonen konnten einen Altersunterschied von maximal  $\pm 20$  Minuten aufweisen. Diese unterschiedlichen Entwicklungsgeschwindigkeiten in schon sehr frühen Stadien waren von der Befruchtung der Eier und vom Ablachvorgang abhängig. Das Ablachen konnte sich bis zu einem Vorgang von einer Stunde oder sogar länger erstrecken. Unter dem Binokular ließ sich das Alter des jeweiligen Embryos gut beobachten. Da bei dieser Versuchsreihe das Alter der Zebrafisch Embryonen ca. 24 hpf (engl. *hours post fertilization*, Stunden nach der Befruchtung) betrug, war es wichtig, dass die befruchteten Eier immer auf 28,5 °C gehalten wurden, umso Entwicklungsverzögerungen zu vermeiden.

### 5.9.2 Haltung der Eier

Zum Aufbewahren der Zebrafischeier wurden Petrischalen verwendet, die mit E3 Medium vorgelegt waren. Bei 28,5 °C wurden sie anschließend im Brutschrank gelagert bis sie das gewünschte Versuchsalter erreicht hatten. Bevor die Zebrafisch Embryonen benutzt wurden, musste die Eihülle (Chorion) unter dem Binokular mit Hilfe von zwei Pinzetten vorsichtig entfernt werden. Nach dem Dechorionieren mussten die Embryonen zum Erholen für ca. 1 Stunde bei 28,5 °C in den Brutschrank zurück gestellt werden. Anschließend konnten diese entsprechend der angewandten Versuchsvorschrift injiziert werden.

### 5.9.3 Start der Zucker- und Click-Injektion

Bevor die erste Injektion an den Zebrafisch Embryonen durchgeführt werden konnte, mussten zuerst die Injektionsnadeln hergestellt und gefüllt werden. Die Injektionsnadeln wurden mit Hilfe eines „Pullers“ hergestellt. Dazu wurde eine Glaskapillare in einem „Puller“ zum Glühen gebracht und durch einen plötzlichen Ruck auseinandergezogen. Das Glühfilament bestand aus Platin und erzeugte so an den Kapillarenden eine rasch zulaufende Nadelspitze. Die zu füllende Flüssigkeit konnte nun vorsichtig in die Nadelspitze eingeführt werden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die zu füllende Flüssigkeit immer erst unmittelbar vor der Injektion gefüllt werden sollte. Anschließend wurde die Glaskapillare an den Kapillarenhalter des sogenannten



Transjektors angeschlossen. Dann wurde der Transjektor angeschaltet. Vor dem Gebrauch mussten noch folgende Werte eingestellt werden:

- Manueller Injektionsbetrieb (d.h. die Injektion wurde nur durch Drücken des Fußpedals ausgelöst)
- $P_i$ : ~1000 hPa (Injektionsdruck mit dem die Flüssigkeit durch die Glaskapillare gedrückt wurde)
- $P_c$ : 8-10 hPa (Kompensationsdruck; ständig anliegender Druck, der den Kapillarkräften der Injektionsnadel so entgegen wirkte, dass keine Fremdkörper von außen eingesaugt werden konnten)

Nun konnte mit der Zucker- oder Click-Injektion (Click-iT® AlexaFluor® DIBO 488 alkyne, 20 bzw. 40  $\mu$ M) begonnen werden. Dabei wurden die unterschiedlichen Substrate in den 4. Hirnventrikel der Zebrafischembryonen injiziert.

24 hpf Zebrafisch Embryonen wurden zuerst vorsichtig dechorioniert und anschließend ca. 2 Minuten mit 0,03% Tricaine anästhesiert. Danach wurden sie für die Injektion in 2% Agarosegel (ohne Methylenblau) richtig positioniert. Dazu wurden mit einer kleinen Pipettenspitze Löcher in das Agarosegel gemacht. Dann wurde das Gel mit 0,03% Tricaine überschichtet. Anschließend wurden die anästhesierten Embryonen mit dem Kopf nach oben in die Vertiefungen gebracht. Nun mussten diese Embryonen noch richtig positioniert werden, sodass von der kaudalen Position in den 4. Hirnventrikel injiziert werden konnte. Die vorgefertigten Spitzen wurden nun mit dem jeweiligen Zucker gefüllt: Ac<sub>4</sub>GlcNAz (500  $\mu$ M, Ac<sub>4</sub>ManNAz (50  $\mu$ M) und Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc (100, 250 und 500  $\mu$ M). Vorsichtig wurde mit Hilfe des Transjektors Zucker in den 4. Hirnventrikel injiziert. Nach der Injektion wurden die Embryonen in E3 Medium überführt und mit 0,3% PTU versetzt. Dann kamen die Embryonen über Nacht bei 28,5 °C in den Brutschrank. 24 Stunden nach der Zuckereinjektion wurden die Embryonen erneut für ca. 2 Minuten in 0,03% Tricaine anästhesiert und anschließend in eine Gelkammer einzeln positioniert, sodass der Embryo in dorsaler Richtung lagen und in den 4. Hirnventrikel injiziert werden konnten. Es wurden erneut vorgefertigte Spitzen mit dem Cu-freien Click-Reagenz (Click-iT® AlexaFluor® DIBO 488 alkyne) gefüllt. Mit dem Transjektor wurden dann die 48 hpf Embryonen mit 20 bzw. 40  $\mu$ M des Cu-freien Click-Reagenzes injiziert. Nach der Zuckereinjektion wurden die Zebrafisch Embryonen mit PTU behandelt und für 24 Stunden bei 28,5 °C in den Brutschrank gestellt. Nun konnten die Embryonen mit Hilfe des ApoToms (Zeiss, Jena) analysiert werden.

#### 5.9.4 Unterdrückung der Pigmentierung und Narkotisierung

Während der gesamten Arbeit mit den Zebrafischen wurde neben dem Wild-typ (*wt*) auch die sogenannte „golden“ (*gol*) Mutante verwendet, da diese eine wesentlich geringere Pigmentierung aufwies als die *wt* Zebrafische. Die Melanozyten eines 48 hpf „golden“ Embryos waren noch braun pigmentiert. Wohingegen der *wt* bei 48 hpf bereits schon eine schwarze Pigmentierung aufwies und somit schon lichtundurchlässig war. Damit die Pigmentierung sowohl im „golden“, als auch im *wt* Embryo



unterdrückt werden konnte, mussten die Embryonen mit 0,3% PTU (Phenylthioharnstoff) behandelt werden. Zur Narkotisierung der Embryonen wurde Tricaine (0,03%) verwendet. Dabei war zu beachten, dass die Zebrafisch Embryonen während der ganzen Behandlung in dem Narkotikum blieben. Bevor injiziert wurde, sollte darauf geachtet werden, dass die Embryonen ca. eine halbe Minute vorher betäubt wurden, um so die Motorik zu lähmen. Außerdem musste auch darauf geachtet werden, dass immer eine frische Lösung von Tricaine (<1/2 Jahr) hergestellt wurde.

### 5.9.5 Dechorionieren mit Pronase und Entdottern

Vor dem Entdottern mussten die Embryonen dechorioniert werden. Dazu wurden die Embryonen (24 hpf) in Gruppen zu 50 Stück in 1 mg/ml Pronase gegeben und 5-10 Minuten vorsichtig hin- und her geschwenkt. Um die Dechorionierung zu beenden, wurden die mit Pronase-behandelten Embryonen einzeln durch eine gelbe Pipettenspitze gezogen, dabei sollte sich der Chorion vollständig ablösen. Die dechorionierten Embryonen wurden nun dreimal in kalter Ringerlösung gewaschen. Danach wurden die Embryonen in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße umgefüllt und mit kalter Ringer Lösung, die EDTA, PMSF und *Complete Mini* enthielt, überschichtet. Nach diesem Vorgang ließ sich der Dotter des Embryos mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze entfernen. Nach dem Entdottern wurden die Embryonen in eine frisch angesetzte, kalte Ringer Lösung überführt und zweimal darin gewaschen. Dann wurden sie kurz bei 4 °C und 300 rgf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert. Nun konnten die Embryonen bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt werden.

### 5.9.6 Fixierung, Permeabilisierung und Färbung von Zebrafisch Embryonen

Mit der Pinzette wurden 24 hpf Zebrafisch Embryonen dechorioniert. Danach wurden die Embryonen 2 Minuten bei RT mit 0,03% Tricaine anästhesiert. Es wäre auch möglich gewesen die Embryonen auf Eis (0° C) zu betäuben. Die Zebrafisch Embryonen wurden während des gesamten Vorgangs in Netzen überführt. Dadurch wurde der Wechsel der Lösungen erleichtert. So konnten nämlich die Embryonen einfach aus einer Lösung herausgenommen und in die nächste überführt werden. Die Netze bestanden aus abgesägten blauen Pipettenspitzen, die direkt in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß passten. Am Ende dieser Rohre wurde ein Plastiknetz angeschweißt. Anschließend wurden die Embryonen in PFA in Phosphatpuffer für 4,5 Stunden bei 4 °C (auf einem Drehrad) fixiert. Nach dem Fixieren wurden sie dreimal jeweils 5 Minuten in Phosphatpuffer gewaschen. Optional konnten die fixierten Embryonen in 1x Phosphatpuffer mit 1/200 2% Thimerosal über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Nach dem Waschen wurden die Embryonen kurz, ca. 5 Sekunden, in ddH<sub>2</sub>O (doppelt destilliertes Wasser) gewaschen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Embryonen am Deckel haften blieben. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Embryonen in Aceton. Aceton permeabilisierte dabei durch das Lösen der Membranlipide. Die Aceton-Inkubation fand bei -20 °C statt, um so ein Schrumpfen der Embryonen durch Aceton-bedingte Dehydrierung zu



vermeiden. Bei dieser Versuchsreihe wurden 41-55 hpf Zebrafisch Embryonen verwendet, die 6 Minuten in Aceton permeabilisiert werden mussten. Dann erfolgte ein kurzes Spülen mit ddH<sub>2</sub>O. Danach wurden die Embryonen dreimal in Phosphatpuffer für jeweils 5 Minuten bei RT gewaschen. Dann wurden die Embryonen zweimal 5 Minuten bei RT in Natriumborhydrid-Lösung inkubiert. Dadurch wurden eventuell auftretende Doppelbindungen, die bei der Fixierung entstanden waren, reduziert. Somit wurde auch die Hintergrundfärbung vermieden. Außerdem musste die Natriumborhydrid-Lösung immer frisch angesetzt werden, da das Reaktionsmedium NaBH<sub>4</sub> (Natriumborhydrid) in Lösung spontan zerfällt (Konzentration ca. 1 µg/ml NaBH<sub>4</sub> in PBS). In einem kleinen Glasgefäß wurde ein Krümel NaBH<sub>4</sub> in PBS gelöst. Die Netze, in denen sich die Embryonen befanden, wurden in diese Lösung gestellt und 5 Minuten lang wiederholend mit einer Pasteurpipette von oben durchgespült. Dabei sollte die Blasenbildung zerstört werden. Dieser Schritt musste genau durchgeführt werden, bis keine Blasen mehr zu erkennen waren. Anschließend wurden die Netze 5 Minuten bei RT mit DPBS (-/-) mehrfach durchspült und so lange gewaschen, bis keine Blasenbildung mehr sichtbar war. Der ganze Waschvorgang mit DPBS (-/-) sollte drei- bis fünfmal wiederholt werden. Wenn keine Blasen mehr zu erkennen waren, mussten die Embryonen in PBS/BSA (1%) /DMSO (1%) überführt werden. Damit wurde erreicht, dass die Embryonen nicht an Pipettenspitzen oder Gefäßen kleben blieben. Nun wurden die Embryonen in eine 96-Well Platte überführt und in DyLight 488-phosphine (200 µM) über Nacht bei 28,5 °C im Dunkeln inkubiert.

### 5.9.7 Einbettung der fixierten Embryonen

Zur Einbettung der Embryonen wurde ein Deckglas mit einem schmalen Streifen Mowiol auf der unteren Hälfte beschichtet. Mit einer gekrümmten Nadel oder einer Pasteurpipette wurden die Embryonen nun aus dem Puffer genommen, in dem sie behandelt wurden, und nebeneinander auf dem Mowiol-Streifen aufgereiht. Dann wurden die Embryonen aus dem Streifen in Richtung Deckglasmitte gezogen und in gewünschter Lage (lateral oder ventral) positioniert. Das überflüssige Mowiol wurde abgesaugt bzw. mit einer glatten Fläche abgestreift. Anschließend wurden die eingebetteten Embryonen für ca. 15 Minuten an der Luft getrocknet. Nun waren sie fixiert. Zum endgültigen „Eindeckeln“ mussten die Deckgläser, auf denen sich die Embryonen befanden, mit einem „Spacer“ auf beiden Seiten bestückt werden. Hierfür wurden mit Hilfe eines Diamant-Schneiders schmale Streifen eines Deckglases abgeschnitten. Mit einem kleinen Tropfen Mowiol wurden diese „Spacer“ auf das Deckglas gebracht. Die Embryonen wurden dann mit Mowiol beschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass in den Embryonen, die mit Mowiol beschichtet wurden, keine Luftblasen entstanden. Schließlich mussten die in Mowiol-gebetteten Embryonen für mindestens 24 Stunden bei 4 °C aushärten. Dann erfolgte eine Beobachtung unterm ApoTome.2 (Zeiss).



### 5.9.8 Fixierung mit Methanol als Alternative zur PFA-Fixierung

Dechorionierte und anästhesierte Embryonen wurden in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Embryonen wurden 24 h zuvor mit dem jeweiligen Zucker in den 4. Hirnventrikel injiziert. Die Zebrafisch Embryonen wurden nun in Methanol (MeOH) fixiert. Dabei wurden sie zuerst in 25% MeOH in DPBS (-/-) für 10 Minuten bei RT überführt, dann erfolgte ein Übergang in 50% MeOH in DPBS (-/-) für ebenfalls 10 Minuten bei RT. Danach wurden sie in 75% MeOH in PBS (10 Minuten) gegeben und schließlich in 100% MeOH in DPBS (-/-) (10 Minuten) überführt. Anschließend konnten die Embryonen bei -20 °C einige Tage aufbewahrt werden. Nach der MeOH-Behandlung wurden die Embryonen drei- bis fünfmal in DPBS (-/-) gewaschen. Die gesamten Waschvorgänge wurden in Petrischalen auf einem Schüttler durchgeführt. Um die Anhaftung der Embryonen an der Gefäßwand zu vermeiden, wurden sie mit DPBS (-/-)/BSA (1%)/DMSO (1%) gewaschen. Dann wurden die fixierten Embryonen dreimal jeweils für 5 Minuten mit DPBS (-/-) gewaschen. Schließlich wurden die Embryonen in DyLight 488-phosphine (100 µM) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Zur Visualisierung der Zucker auf der Zelloberfläche wurden die Embryonen entweder in 1,5% „low-melting“ Agarose oder in Mowiol eingebettet und mit Hilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops beobachtet.

## 5.10 Western-Blot als Nachweis der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle

### 5.10.1 Probeaufbereitung und Verdau

24 hpf Embryonen wurden dechorioniert. Dann wurden jeweils 4 Embryonen in 100 µl HS<sub>C</sub>-Puffer (Homogenisationslösung mit *Complete Mini*) mit einem blauen Stempel ca. 1 Minute pro Probe homogenisiert. Dann wurden die homogenisierten Embryonen 10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der dadurch resultierende Überstand wurde abgenommen. Danach wurden die Pellets kurz trocken zentrifugiert, sodass die membrangebundenen Proteine unten im Eppendorfreaktionsgefäß haften blieben. Der restliche Überstand wurde abgenommen und verworfen. Nun wurde jedes Pellet in 10 µl EndoN-Verdaupuffer resuspendiert. Danach wurde 30 Minuten bei 37 °C verdaut. Im nächsten Schritt wurden die Pellets jeweils dreimal mit 5 µl SDS-Probepuffer in 15% β-Mercaptoethanol gebracht und erneut resuspendiert. Ab diesem Schritt konnten die Pellets gegebenenfalls über Nacht bei -80 °C eingefroren werden. Andernfalls wurden sie 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Anschließend kamen die Pellets auf Eis. Danach wurden sie 5-10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurde die gesamte Probe auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der Proteinauftrennung und der ungefähren Größenbestimmung wurde das Gel zusätzlich mit peqGold Protein Marker V geladen.

### 5.10.2 Gießen des Gels

Die hier angegebenen Volumina waren für die Herstellung von Slab-Gelen in einer vertikalen Miniatur Elektrophorese-Einheit mit einer Gesamtlänge von 7,3 x 8,3 cm und einer Gel Dicke von 0,75 mm berechnet worden.



### 5.10.3 Vorbereiten des Gel-Gießstandes

Für die Gel-Elektrophorese wurde zuerst eine Glasplatte, eine Aluminiumplatte, zwei Spacer und ein Kamm mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen, danach mit Ethanol (EtOH) nachgewaschen und mit einem Kleenex-Tuch trockengerieben. Die Platten durften nicht mit den Fingern berührt werden. Der Spacer wurde, bevor er zwischen die Glasplatte und Aluminiumplatte eingelegt werden konnte, leicht eingefettet. Dabei sollten die Unterkanten beider Platten und die Spacer auf der gleichen Ebene enden. Nun wurde das sogenannte „Sandwich“ in eine Klammer der Gelgießkammer eingespannt und die weißen Schrauben leicht angezogen. Schließlich wurde das gesamte „Sandwich“ in die Gelgießkammer eingespannt und mit den Exzenter-schrauben befestigt, sodass das Gelsandwich unten durch die Gummidichtung abgedichtet war.

### 5.10.4 Gießen des Trenngels

Bevor das Gel in die Kammer gegossen werden konnte, mussten 9,9 ml der 12%igen Trenngelmixtlösung mit 100  $\mu\text{l}$  10% APS (Radikalstarter) und 6  $\mu\text{L}$  TEMED (Katalysator) versetzt und gut durchmischt werden. Das Trenngel wurde so in die Kammer gegossen, dass es 0,5 cm unter die Unterkante des Kammes reichte (ggf. auf die Markierung an der Apparatur achten). Das flüssige Gel wurde dann mit  $\text{dH}_2\text{O}$  bis zur Oberkante der beiden Platten überschichtet. Damit sollte verhindert werden, dass das Gel austrocknete. Dann polymerisierte das Trenngel bei RT ca. 15 Minuten aus. Das überschichtete Wasser wurde schließlich mit einem Filterpapier entfernt.

### 5.10.5 Gießen des Sammelgels

5,9 ml der 1%igen Sammelgel-Lösung wurden mit 30  $\mu\text{l}$  10% APS und 7  $\mu\text{l}$  TEMED gemischt. Der Taschenkamm wurde nun eingesetzt. Die Lösung wurde nun seitlich langsam einlaufen gelassen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstanden. Danach musste das Sammelgel ebenfalls 15 Minuten bei RT auspolymerisieren. Das fertige Gel konnte nun ein bis zwei Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Dazu musste das Gel aus dem Gelgießstand genommen und in ein mit  $\text{dH}_2\text{O}$  getränktes Tuch und anschließend in Klarsichtfolie eingewickelt werden, sodass das Gel nicht austrocknen konnte. Der Kamm sollte dabei nicht aus dem Sammelgel gezogen werden.

### 5.10.6 Probenaufbereitung und Gelelektrophorese

Das fertige Gel wurde nun in den Gelelektrophorese-Ständer eingespannt. Dann wurde der Elektrophorese-Puffer 1x Laemmli zuerst in den Zwischenraum zwischen Gel und der Apparatur gegossen, dann wurden die unteren Kammern zur Hälfte mit dem Puffer gefüllt. Nun konnte der Kamm durch langsames und gleichmäßiges Hochziehen entfernt werden. Es wurde eine Schablone vor die Glasplatte gestellt, sodass erkennbar war, wo sich die Geltaschen befanden. Bevor die Probe nun aufgetragen werden konnte, mussten die Geltaschen jeweils mit einer Kanüle luftblasenfrei durchgespült werden. Jetzt konnte mit der Auftragung der Probe begonnen werden. Die Proben wurden jeweils mit einer Eppendorfspitze langsam in die Taschen



eingefüllt. Das ideale Probevolumen war 15 µl. Die beiden äußeren Spuren wurden mit einer Eichproteinmischung (peqGold Protein Marker V) geladen. Nach dem Auftragen sollte die Elektrophorese möglichst rasch gestartet werden. Dazu wurde der Deckel auf die Elektrophorese Kammer aufgesetzt, dabei musste auf die richtige Ladung geachtet werden. Die Elektrophorese startete bei konstanter Spannung von 50 Volt (V) ca. 15-20 Minuten (solange bis die Probe das Trenngel erreicht hatte). Dann wurde die Spannung auf konstante 180 V gestellt. Die Probe benötigte ungefähr 1 Stunde bis die unterste Front ca. 0,5 cm vor dem Gel-Ende angekommen war. Nach der Elektrophorese wurde der Puffer abgegossen und das Gel vorsichtig aus den Platten genommen. Dabei sollte das Gel auf der Aluminiumoxidplatte liegen bleiben. Zur Markierung wurde die rechte untere Ecke mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Gel wurde dann vorsichtig vom Laufende her von der Aluminiumplatte abgezogen und in 12,5% Blotpuffer ca. 5 Minuten äquilibriert.

### 5.10.7 Semi-Dry Blot

Der Elektrobplot erfolgte in der Semi-Dry Blot Apparatur (LBK Multiphor II mit Novablot Electrophoretic Transfer Kit). Zuerst wurden 6 Stücke Filterpapier und ein Stück PVDF-Membran zugeschnitten. Es musste darauf geachtet werden, dass die Filterpapiere dabei auf jeder Seite 1 cm und die PVDF-Membran 0,5 cm größer waren als das Gel selbst. Die Graphit-Elektroden des Elektrobplots wurden mit ddH<sub>2</sub>O angefeuchtet. Es wurden auch 3 Stück Filterpapier in Blotpuffer eingeweicht und blasenfrei auf die untere Platte der Apparatur übereinander geschichtet. Die PVDF-Membran wurde in 100% MeOH vollständig benetzt, kurz in Blotpuffer überführt und anschließend blasenfrei auf das Filterpapier gelegt. Dabei durfte die Membran nicht austrocknen. Nun wurde das in Blotpuffer-äquilibrierte Gel auf die PVDF-Membran gelegt. Danach wurden nun die 3 mit Blotpuffer-benetzten Stücke Filterpapier blasenfrei auf das Gel gelegt. Die obere Elektrodenplatte wurde noch mit ddH<sub>2</sub>O befeuchtet, auf das Blot-„Sandwich“ gelegt und schließlich die Blotkammer geschlossen. Der Semi-Dry Blot musste bei konstantem Stromfluss (1mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche) 1 Stunde laufen. Nach dem Ende des Blots wurde die Apparatur vorsichtig geöffnet und das Blot-„Sandwich“ auseinander genommen. Dabei sollte das Gel auf der Membran liegen bleiben. Dann wurden die Taschen mit einem feinen Bleistift markiert. Der Blot wurde sofort in ddH<sub>2</sub>O gelegt, um zu verhindern, dass die Membran austrocknete. Das Gel wurde nach dem Elektrobplot schüttelnd über Nacht bei RT direkt in Roti®-Blue inkubiert. Von dem Blot wurde nun eine Eichproteinspur abgeschnitten und 1-2 Minuten mit Amidoschwarz (0,1% Amidoschwarz, 45% MeOH, 10% Essigsäure) gefärbt. Danach wurde diese Spur kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und in Coomassie-Entfärber behandelt, um die Vollständigkeit des Proteintransfers zu überprüfen.

### 5.11 Immunnachweis

Um den Immunnachweis zu starten, musste der Blot bei RT kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen werden. Dann wurde er bei RT für 5 Minuten in PBS-T gelegt. Die gesamten Waschschriffe wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Anschließend kam der Blot



bei RT für 1 Stunde in die Blockierungslösung. Danach erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper in Blockierungslösung bei 4 °C über Nacht. Die Antikörper waren alle polyklonal, dazu zählen NCAM (*neuronal cell adhesion molecule*), NCAM 704, PCAM und OCAM. Sie lagen alle in einer 1:2 Verdünnung in Glycerin vor. Für diese Versuchsreihe wurde jeweils eine Verdünnung von 1:10000 verwendet. Nach der Antikörper-Inkubation wurde der Blot bei RT dreimal jeweils für 15 Minuten in PBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation über 2 Stunden bei RT mit dem Sekundärantikörper. Bei dem Sekundärantikörper handelte es sich um ein *donkey-anti-rabbit* HRP (horseradish peroxidase)-gekuppelter Antikörper. Nach dieser Inkubation folgte nun ein dreimaliges Waschen für 15 Minuten bei RT mit PBS-T. Danach wurde der Blot bei RT viermal jeweils für 10 Minuten in PBS gewaschen. Dann wurde der Blot auf einem Filterpapier kurz trocken geblottet und war so bereit für die Exposition auf Röntgenfilm. Dazu wurde der Blot bzw. die einzelnen Blot-Streifen in Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrat bei RT 5 Minuten gegeben. Danach wurde vom Blot die Flüssigkeit abgeschüttelt. Die Membran wurde zwischen eine Plastikfolie gelegt und schließlich in eine Auto-Radiografie-Kassette zum Entwickeln gelegt. Schließlich wurde mit der 1. Exposition des Blots auf Röntgenfilm begonnen. Dabei musste der Röntgenfilm ca. 2-5 Minuten auf dem Blot liegen bleiben. Danach wurde der Film 2 Minuten entwickelt, kurz gewässert, 2-5 Minuten fixiert, erneut gewässert und getrocknet. Der Western Blot war somit beendet.

### 5.12 Synthese von *N*-Acetyl-4-azido-4-desoxy-(1,3,6-*O*-acetyl)-mannosamin (**Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc**)

Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc wurde 1995 von Thomson und von Itzstein modifiziert. (Thomson and von Itzstein 1995a) Zuerst wurden 2,00 g (9,30 mmol) ManNAc in 20 ml trockenem Pyridin unter Argon Atmosphäre gelöst und in einem molekularen Sieb bei 4 Å vorgetrocknet. Dann wurde bei 0 °C eine Lösung von 3,50 g (18,36 mmol) TsCl in Pyridin tropfenweise zugegeben. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie (engl. *thin layer chromatography*, TLC) (Aceton) wurde die Reaktion beobachtet und TsCl solange hinzugefügt bis zur komplette Umwandlung der Lösung in kristallines ddH<sub>2</sub>O. Dabei wurde die Reaktion bei 0 °C mit MeOH gequenchet. Nach der Zugabe von Toluol (100 ml) verdampfte die Mischung bis zur Trocknung. Der dabei gebildete Überstand wurde in Aceton suspendiert und mit einer kleinen Menge Kieselgel gefiltert, um so die meisten Nebenprodukte zu entfernen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das viskose Öl in trockenem Ethanol gelöst, und DBU (ungefähr 3 ml) tropfenweise hinzugegeben. Danach wurde die Reaktion über Nacht bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der Überstand in 50 ml Wasser gelöst und mit EtOAc (3mal 100 ml) gewaschen. Das Rohprodukt wurde schließlich mit Hilfe der Säulenchromatographie (DCM, 1-10% MeOH) gereinigt. Dadurch ließ sich eine Ausbeute von 1,20 g (5,91 mmol, 62%) des reinen Produktes erzielen.



1,00 g (4,93 mmol) 2-Acetamido-1,6-anhydro-2-deoxy- $\beta$ -D-mannopyranose und 1,55 g (5,9 mmol)  $\text{PPh}_3$  wurden zusammen in THF gelöst und auf 0 °C heruntergekühlt. Diisopropylazodicarboxylat (DIAD, 1,20 ml, 5,9 mmol) wurde tropfenweise hinzugeführt. Die Reaktion wurde mittels TLC (DCM, 30% Aceton) beobachtet. Nach 30 Minuten wurde 200 mg (7,65 mmol)  $\text{PPh}_3$  dazugegeben. Danach wurde die Reaktion über Nacht bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel verdampft. Das dabei entstandene Produkt wurde mit der Säulenchromatographie (DCM, 0-10% MeOH) gereinigt. Das dabei entstandene Epoxid wurde als einziges Isomer, das 10-30 wt%  $\text{O=PPh}_3$  (ungefähr 1,20 g) enthielt, erhalten. Ohne Aufreinigung konnte dieses Epoxid in den nachfolgenden Reaktionsschritten eingesetzt werden. Das Epoxid (ungefähr 600 mg des Rohproduktes) wurde in DMF (3 ml) gelöst, 600 mg DOWEX 50  $\text{H}^+$  und 600 mg  $\text{NaN}_3$  wurden hinzugegeben und 20 Stunden bei 95 °C unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit 50 ml MeOH verdünnt und über Celite gefiltert. Nach der Trocknung wurde der Rückstand in  $\text{ddH}_2\text{O}$  überführt und über Baumwolle gefiltert. Dann wurde das Produkt mit der Säulenchromatographie ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc) gereinigt. Schließlich wurden 360 mg (1,58 mmol, 55%, zweiter Reaktionsschritt) einer 4-Azido-Verbindung erhalten, die weniger als 1%  $\text{O=PPh}_3$  enthielten.

Der Azidozucker (180 mg, 0,79 mmol) wurde anschließend in 2 ml  $\text{Ac}_2\text{O}$  unter inerter Atmosphäre gelöst und tropfenweise mit 250  $\mu\text{l}$  TMSOTf bei 0 °C behandelt. Die Reaktion wurde 1,5 Stunden gerührt und in wässrigem  $\text{NaHCO}_3$  20 Minuten gequenchet. Die Reaktionsmischung wurde danach mit EtOAc (4mal 50 ml) extrahiert. Die entstandene organische Fraktion wurde dann in gesättigter  $\text{NaHCO}_3$  gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt enthielt allerdings 30-50% Oxalidinon, ein unvermeidbares Nebenprodukt. Oxalidinon wurde in AcOH bei RT für 1-4 Stunden hydrolysiert (in Abhängigkeit der TLC Kontrolle). Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde die glykosidische Hydroxyl-Gruppe erneut mit  $\text{Ac}_2\text{O}$  in Pyridin 30 Minuten acetyliert. Danach wurde die Reaktionsmischung in Toluol gelöst, das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan, 15% iPrOH) mit einer Ausbeute des Reinproduktes von 223 mg (0,60 mmol, 76%) gewonnen, das sehr Anomeren-reich vorlag. Schließlich wurde das peracetylierte 4-Azido-ManNAc (46 mg, 1,23 mmol) in 6 M HCl (ungefähr 10 ml) bei 50 °C über Nacht hydrolysiert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde das entstandene Hydrochlorid in DCM/ $\text{Net}_3$  gelöst und mit einer Äquivalenten  $\text{Ac}_2\text{O}$  behandelt. Danach wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc, 1% MeOH, 0,25%  $\text{H}_2\text{O}$ ) gereinigt und eine Ausbeute von 86% (26 mg, 0,11 mmol) erzielt. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen Daten überein. (Thomson and von Itzstein 1995a) So konnte das entstandene Produkt  $\text{Ac}_3$ -4-Azido-ManNAc für die nachfolgenden enzymatischen, Zell- und Zebrafisch-Experimente angewandt werden. (Möller et al. 2012)



### 5.13 Metabolischer Einbau von Azidozuckern, Click-Reaktion und Analyse des Glykaneinbaus in Glykoproteine

Zunächst wurde Ac<sub>3</sub>-4-azido-ManNAc als geeignetes Substrat zur Markierung von Glykoproteine in Säugerzellen getestet und bestätigt. Dabei wurden  $1 \times 10^5$  GNE-defiziente und GNE-exprimierte Hek293 und MCF-7 Zellen auf eine 12-Well-Platte ausgesät und 2 Tage bis zur adhärennten Konfluenz bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Dann wurde das alte Zellmedium durch frisches ersetzt (1ml/well). Drei Tage wurden die Zellen mit den ManNac/ManNAz-Derivaten (100 mM in DMSO gelöst) inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal in eiskaltem DPBS (-/-) gewaschen. Schließlich wurden die eingebauten Azidozucker an Biotin oder AlexaFluor<sup>®</sup> 488 DIBO (Invitrogen) gekuppelt, indem die Zellpellets (ungefähr  $3 \times 10^6$  Zellen) 90 Minuten bei 37 °C in 50 µl Kupplungspuffer (Roche), der 0,4 mM Dithiothreitol (DTT), 50 mM Natriumacetat (pH 6,0), 1 mM CuSO<sub>4</sub>, 1% SDS (Roth), 10 µM Alkin-Derivate und Protease Inhibitor Cocktail (Roche) enthielt. Für den Sialinsäure-Einbau wurden Sialidasen von *Chlostridium perfringens* (Sigma) verwendet. Die Pellets eines Wells der konfluenten 12-Well-Platte (ungefähr  $3,5 \times 10^5$  Zellen) der Zucker-inkubierten Hek293 Zellen wurden danach gesplittet und 3 Stunden bei 37 °C in 30 µl Sialidase Verdaupuffer (10 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 6,0), 100 mM KCl, 0,03% (w/v) BSA) überführt. Damit die Immunpräzipitation isolierter Mucin1 durchgeführt werden konnte, wurden 1,0 ml Zellmedium 1-2 Stunden bei 4 °C mit 1,5 µl α-humanem LTF Antikörper (#MAB0745, Abnova, Taiwan), mit 1,5 µl α-humanem Mucin1 Antikörper (Vu-3C6, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) und 30 µl Protein G Sepharose Beads (GE Healthcare) inkubiert. Nach der Präzipitation wurde dreimal mit 1 ml eiskaltem Protein Komplex gewaschen. Die dabei entstandenen Alkin-Konjugate wurden schließlich mit Hilfe eines Western-Blots mit einem α-Biotin gekuppelten Antikörper (1:1000, Abnova) durchgeführt. Für die Protein-Fällung wurde ein α-humaner Mucin1 Antikörper mit dem entsprechenden Sekundärantikörper eingesetzt.





## 6 Materialverzeichnis

### 6.1 Zelllinien

**A549**] sind humane, adhärente Alveolarepithelzellen, Lungenkarzinomzellen (ATCC: CCL-185<sup>TM</sup>). Die Zellen wurden bereits 1972 aus einem Lungenkarzinom eines 58-jährigen Mannes isoliert. Das Besondere an den Zellen ist, dass sie viel Keratin besitzen, die mit Hilfe der Immunfärbung nachgewiesen werden kann. Kultiviert in: RPMI + 10% FCS + 1% Pen/Strep.

**Fibroblasten**] sind humane Bindegewebszellen, Primärzelllinie, die nur langsam wachsen. Kultiviert in: DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% Myco-3.

**Hela wt**] sind humane, adhärente Gebärmutterhalskarzinomazellen (ATCC: CCL-1<sup>TM</sup>). Die Zellen wurden zum ersten Mal aus dem malignen Karzinom einer 31-jährigen farbigen Frau isoliert. Das Besondere dieser Zelllinie ist, dass sie Sequenzen des humanen Papilloma Virus 18 (HPV-18) besitzen. Sie exprimieren geringfügig p53. Kultiviert in: DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% Myco-3.

**HCT wt**] sind humane Darmkrebszellen (CCL-247<sup>TM</sup>). Auf dem 13. Codon des ras-Protoonkogen ist diese Zelllinie mutiert. Auch die Wachstumsfaktoren TGF-β1 und TGF-β2 sind mutiert. Kultiviert in: DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% Myco-3.

**Hek293**] sind humane, embryonale, transformierte Nierenzellen aus einem gesunden, abgetriebenen Fötus. Die Zellmorphologie und Zellespression unterscheidet sich aufgrund der Transformation mit dem Adenovirus 5 (Leiden, Holland, 1970) von nicht transformierten Nierenzellen. Kultiviert in : DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% Myco-3.

**HepG2**] sind humane Leberkrebszellen. Sie reagieren nicht sensitiv auf TNF (Tumornekrosefaktor). Kultiviert in: DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 1% Myco-3.

**HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*)**] sind humane Nabelschnurblutendothelzellen. Die Primärzelllinie benötigt spezielle Wachstumsfaktoren. Kultiviert in: EBM-2 Medium + 1%Pen/Strep.

**MCF-7**] sind Brustkrebszellen. Die Abkürzung MCF-7 steht für *Michigan-Cancer-Foundation-7*. Die Zellen wurden 1970 aus einer 69-jährigen kaukasischen Frau isoliert. Kultiviert in : RPMI + 1% Pen/Strep + Glutamat (2 mM) + Puromycin (3 µg/ml, Sigma)

**SHSY5Y**] sind humane Neuroblastomzellen. Es sind klonierte Zellen aus der Zelllinie SHSY5Y, welche erstmals 1973 (Biedler et al. 1973) aus dem Knochenmark eines 4jährigen Mädchens isoliert. 1978 wurde sie zum ersten Mal genauer beschrieben.(Biedler et al. 1978) Kultiviert in: DMEM + 20 % FCS + 1% Pen/Strep + 2,5 µg/ml Fungizone.



## 6.2 Zellmedien

**DMEM (Gibco)** | *Dulbeccos modified eagle medium*- standardisiertes Nährmedium  
(alle Angaben in mg/l)

### Anorganische Salze

- $\text{CaCl}_2$  (wasserfrei) 200,00
- $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  0,10
- KCl 400,00
- $\text{MgSO}_4$  (wasserfrei) 97,67
- NaCl 6400,00
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  125,00

### Aminosäuren

- L-Arginin HCl 84,00
- L-Cystin \* 2 HCl 63,00
- L-Glutamin 30,00
- Glycin 30,00
- L-Histidin \* HCl \*  $\text{H}_2\text{O}$  42,00
- L-Isoleucin 105,00
- L-Leucin 105,00
- L-Lysin \* HCl 146,00
- L-Methionin 30,00
- L-Phenylalanin 66,00
- L-Serin 42,00
- L-Threonin 95,00
- L-Tryptophan 16,00
- L-Tyrosin \* 2 Na \* 2  $\text{H}_2\text{O}$  104,33
- L-Valin 94,00

### Vitamine

- D-Calciumpantothenat 4,00
- Cholinchlorid 4,00
- Folsäure 4,00
- Inositol 7,20
- Niacinamid 4,00
- Riboflavin 0,40
- Thiamin \* HCl 4,00

### Andere Komponenten

- D-Glukose (Dextrose) 4500,00
- Phenolrot 15,00
- Natriumpyruvat 110,00



**RPMI Medium (Gibco)** | *Roswell Park Memorial Institute* – standartisiertes Medium  
(alle Angaben in mg/l)

### **Anorganische Salze**

- Calciumnitrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) 100,00
- Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) 100,00
- Kaliumchlorid (KCl) 400,00
- Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) 2000,00
- Natriumchlorid (NaCl) 6000,00
- Natriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 800,00

### **Aminosäuren**

- Glycin 10,00
- L-Arginin Hydrochlorid 240,00
- L-Asparagin 50,00
- L-Asparaginsäure 20,00
- L-Cystin 50,00
- L-Glutamin 300,00
- L-Glutaminsäure 20,00
- L-Histidin 15,00
- L-Hydroxyprolin 20,00
- L-Isoleucin 50,00
- L-Leucin 50,00
- L-Lysin Hydrochlorid 40,00
- L-Methionin 15,00
- L-Phenylalanin 15,00
- L-Prolin 20,00
- L-Serin 30,00
- L-Threonin 20,00
- L-Tryptophan 5,00
- L-Tyrosin 20,00
- L-Valin 20,00

### **Vitamine**

- Biotin 0,20
- Cholinchlorid 3,00
- D-Calciumpantothenat 0,25
- Folsäure 1,00
- Niacinamid 1,00
- para-Aminobenzoessäure 1,00
- Pyridoxinhydrochlorid 1,00
- Riboflavin 0,20
- Thiaminhydrochlorid 1,00
- Vitamin B12 0,005



- Inositol 35,00

#### Andere Komponenten

- D-Glukose (Dextrose) 2000,00
- Glutathion (reduziert) 1,00
- Phenolrot 5,00

**F12 Medium (Gibco)** | DMEM Medium mit L-Glutaminzusatz

**EBM-2 Medium (Gibco)** | *Endothelial basal medium*; Medium für Primärzelllinien mit speziellen Wachstumsfaktoren.

### 6.3 Versuchstiere

**Zebrafisch (*Danio rerio*)** | Gattung: Danio  
 Art: Danio rerio  
 Familie: Cyprinidae (Karpfenfische)  
 Ordnung: Cypriniformes (Karpfenfischartig)  
 Stamm: Chordata (Chordatiere)  
 Klasse: Osteichthyes (Knochenfische)

### 6.4 Verbrauchsmaterialien

- C-Chip Neubauer *Improved* Einmal-Zählkammer (#84-DHCN-02, peqLab, Erlangen, Deutschland)
- Deckgläschen, 13 mm (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Einmal-Injektionskanüle, Sterican®, 0,40x20 mm, 27Gx3/4<sup>II</sup> (#X133.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Einmal-Injektionskanüle, Sterican®, 0,90x40 mm, 20Gx1 1/2<sup>II</sup> (#C721.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Einmalküvette, UVette 220-1600 nm, 50-2000 µl, 2/10 mm (#0030106.300, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Einmalküvette Plastibrand®, PS, 1,5-3,0 ml (#759015, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Einmalpipetten, Costar®, 5 ml (#4487), 10 ml (#4488) (Corning, USA)
- Gelgießsystem/Porzellan (Amersham, #80-6136-81), Glasplatten (#30-30-101, Biostep und Plastikämme)
- Gewebekulturschalen, mit Nocken, 60 x 15 mm, steril, (#628160, CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Glaspipetten 5, 10, 20 ml (Brand)
- Ibidi 8-Well Platte mit IbiTreat Oberfläche (#80826, Ibidi)
- Ibidi 96-Well Platte mit IbiTreat Oberfläche (#89626, Ibidi)
- 96-Well Platte, Costar® (#3596, Corning, USA)
- Injektionskanüle, 0,90x50 mm (Braun, Melsungen, Deutschland)



- Kryoröhrchen (2,0 ml mit Rundboden)(#430289, bestehend aus PP (Polypropylen), Corning, USA)
- Mehrkanalpipette, Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, variabel, 10–100 µL (#3122000035, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Mehrkanalpipette, Finnpipette 8-channel (#K94585, Labsystem)
- M-Slide 8-Well ibiTreat, steril (#80826, Ibidi, Martinsried)
- Neubauer Zählkammer (Brand)
- Objektträger mit Vertiefung, 76x26 mm (#1-6293, neoLab, Heidelberg, Deutschland)
- Pasteurpipette 1 ml, 150 mm, aus Glas, graduiert, unsteril (#747715, Braun, Deutschland)
- Petrischale, Costar®, 100x20 mm (#664160, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Pinzette „ion“, 110 mm Typ 3C, Spezialbeschichtung, Spitze kurz (#2-0215, neoLab, Heidelberg, Deutschland)
- Pipette, Eppendorf Easypet® 3, inkl. Netzteil, Wandhalter, Ablageständer, 2 Membranfilter 0,45 µm, 230 V/50 Hz (#4430000018, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipette, Biomaster® 4830, 1-20 µl (#4830000017, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipetten, Eppendorf Research® plus 3-Pack, Option 1: 0,5–10 µL, 10–100 µL, 100–1.000 µL (#3120000909, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipetten, Pipetman 2–20 µL (#F123600, Gilson, Middleton, USA)
- Pipetten, Pipetman 20–200 µL (#F123601, Gilson, Middleton, USA)
- Pipetten, Pipetman, 100–1000 µL (#F123602, Gilson, Middleton, USA)
- Pipettenspitzen 0,1-10 µl (#613-3544, VWR, Darmstadt, Deutschland)
- Pipettenspitzen 0,1-20 µl (#613-3552, VWR, Darmstadt, Deutschland)
- Pipettenspitzen 20 -300 µl (#613-3556, VWR, Darmstadt, Deutschland)
- Pipettenspitzen 50-1000 µl (#613-3557, VWR, Darmstadt, Deutschland)
- Pipettenspitzen 1–200 µL (#4785, Corning, Amsterdam, Niederlande)
- Pipettenspitzen 2–200 µL (#4785, Corning, Amsterdam, Niederlande)
- Pipettenspitzen 100–1000 µL (#4867, Corning, Amsterdam, Niederlande)
- Röhrchen, PP, konischer Boden, mit blauem Schraubverschluss, steril, 15 mL (#188271) und 50 ml (#227261, CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Reaktionsgefäß, 1,5 ml (#A1449060, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Reaktionsgefäß, 2,0 ml (#A143437J, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Reservoir für MTT-Test, 50 ml (#92042, VWR)
- Serologische Pipetten 1 mL (Graduierung 1/100; #604181, steril, einzeln verpackt, CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Spitzen, Injekt®, 2, 10 und 20 ml (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Spitze, Omnifix®, 5 ml (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Sterilfilter, 0,22 µm (#SEMO35107, Braun, Melsungen, Deutschland)



- Zelleinfriergefäß, 1,5 ml (#430289, Corning)
- Zellkulturflaschen, 250 mL, 75 m<sup>2</sup> (#658170, CELLSTAR<sup>®</sup>, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Zellkulturflaschen, 550 mL, 175 m<sup>2</sup> (#660175, CELLSTAR<sup>®</sup>, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Zellkultur Multiwellplatte, 96-Well, PS; F-Boden/Kaminform, glasklar, mit Abdeckplatte, steril (#655180, CELLSTAR<sup>®</sup>, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Zellschaber, Costar<sup>®</sup> (#3008, Cambridge, USA)
- Zellschaber, schwenkbar 24 cm, (#99002, TTP<sup>®</sup>, Schweiz)

## 6.5 Analytik

**FACS|** Alle FACS Daten wurden mit *Becton Dickinson FACScan* durchgeführt und mit Hilfe von Excel Tabellen (Open Office 2007) ausgewertet.

**HPLC|** Die Reinigung der Azidozucker und deren Reinheitsbestimmungen wurden mit Hilfe von *Äkta Purifier 100 UPC* (semipräparative HPLC). Für die Reinigung des Peptoids wurde ein *Äkta Purifier* mit den Modulen Pumpe P-900, Monitor UV-900, Monitor UPC-900, Ventil INV-907, Mixer M-925 und Ventil PV-908 verwendet. Die Flussrate betrug 1.50 ml/min. Es wurden folgende Laufmittel verwendet: Laufmittel A = 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in 5% Acetonitril (ACN); Laufmittel B = 0,1% TFA in 95% ACN. Eine Säule der Firma *Marcherey Nagel VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18ec* wurde eingesetzt.

**Lösungsmittel und Reagenzien|** Die käuflich erworbenen Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

**Massenspektrometrie (MS)|** Die Angabe der Molekülfragmente erfolgte als Verhältnis der Masse zu Ladung (m/z). Die Intensität der Signale wurde in Potenz in Relation zur Intensität des Basissignals (100%) angegeben. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF)*: Die MALDI-Massenspektrometrie wurde auf einem *Bruker Biflex IV* Spektrometer mit einem Neodym-Laser (YAG 3ns Laser, Yttrium-Aluminium-Granat Laser,  $\lambda = 355$  nm) und der Software FlexControl Version 1.1 und XMASS-XTOF Version 5.1.1 durchgeführt. Pro Spektrum wurden ca. 1000 Schuss mit 200 Hz pro Messung verwendet. Es wurden Applied Biosystems MALDI Probenplatten (Targets) aus Edelstahl 392 „spots“ verwendet. Als Matrix kam  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA) zum Einsatz, die in einer 1:1-ACN-Wasser-Mischung mit 0,1% TFA gelöst wurde.

**Mikroskopie|** Die Aufnahme der Mikroskopiebilder wurde an folgenden Mikroskopen durchgeführt:

***Leica SP5 (DMI6000 inverses Mikroskop)***

Objektive: HCX PL APO CS 63.0x1.20 WATER UV, HCX PL APO CS 20.0x0.70 DRY UV; Laser: Argon 488 nm (Visualisierung der Lysosomen),



DPSS 561 nm, UV 351 nm (Visualisierung der Zellkerne), UV 365 nm. Emissionsfilter: 417-468 nm, 499-552 nm, 593-696 nm; Software: Leica Application Suite (LAS AF, 2.2.1 build 4842).

### **ApoTome.2, Zeiss|**

Objektive: Plan-APOCHROMAT 63x/1.4, Plan-APOCHROMAT 20x/0,45, Plan-APOCHROMAT 10x/0,25.

### **Inverses Fluoreszenzmikroskop| Axiovert 200M Fluo, Zeiss.**

Es wurde immer die gesamte Zelle abgebildet. Im Vergleich zu einem konfokalen Mikroskop besitzt das Mikroskop keine Lochblende. Die Anregung erfolgt mit Hilfe eines Lasers. Software: Axiovision 4.7.

### **Weitfeldmikroskop (für Hochdurchsatzscreen)|**

*Olympus ScanR*-Mikroskop mit *ScanR* Software. Es genügt eine normale Dampfampe.

### **Andere präparative Analysegeräte|**

- Blotsystem (Nassblot) (biorad)
- Durchflusszytometer (Becton Dickinson)
- Tank mit flüssigem Stickstoff (-196 °C)(Isothermal LN<sub>2</sub> Gasphasen-Lagerbehälter, CBS (Custom BioGenic Systems), Labtec Services, Schweiz)
- Gefrierschrank -80 °C (New Brunswick Scientific)
- Hybridisierungsöfen mini (Appligene)
- KodakxOMat 2000 (Filmentwicklermaschine)
- Photometer, BioPhotometer (Eppendorf)
- Photometer SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD)
- Roboter Beckman Coulter™, Biomek® Stacker Carousel (USA)
- Sterilbank, Zellkultur (Clean Air)
- Semi-Dry Blot Apparatur (LBK Multiphor II mit Novablot Electrophoretic Transfer Kit)
- Thermocycler (Biorad und Applied Biosystems)
- Vortex Genie 2™ (#G-560E, Bender und Hobein, Zürich, Schweiz)
- Zentrifuge, Eppendorf 5810 R
- Zentrifuge, Biofuge pico (Heraeus)
- Zellinkubator 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre (Binder)

## **6.6 Chemikalien und Reagenzien**

### **Peracetylierte Azidozucker|**

- Ac<sub>4</sub>GalNAz (peracetyliertes *N*-Azido-acetylgalactosamin) synthetisiert von Danny Wagner (AK Prof. Dr. Stefan Bräse) in DMSO; MW: 430,37 g (-20 °C)
- Ac<sub>4</sub>GlcNAz (peracetyliertes *N*-Azido-acetylglucosamin) synthetisiert von Danny Wagner (AK Prof. Dr. Stefan Bräse) in DMSO; MW: 430,37 g (-20 °C)



- Ac<sub>4</sub>ManNAz (peracetyliertes *N*-Azido-acetylmannosamin) synthetisiert von Danny Wagner (AK Prof. Dr. Stefan Bräse) in DMSO; MW: 430,37 g (-20 °C)
- Ac<sub>3</sub>-4-Azido-ManNAc (*N*-Acetyl-(1,3,6-*O*-acetyl)-4-azido-4-desoxymannosamin)- Berliner Zucker

### Chemikalien und Reagenzien

- Agarose (2%) (#2267.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- AlexaFluor® 488 Alkin (#A10267, Invitrogen, Click-iT® System)
- AlexaFluor® 647 Alkin (#A10278, Invitrogen, Click-iT® System)
- AlexaFluor® 647 Azid (#A10277, Invitrogen, Click-iT® System)
- Amidoschwarz: 0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure
- APS (Ammoniumpersulfat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- α-Biotin Antikörper (#ABIN538037, Abnova, Aachen, Deutschland)
- α-humaner Mucin1 Antikörper (#ABD-8C11690.50, Biomol, Hamburg, Deutschland)
- BSA, Albumin aus Kälberserum (#A2153, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Blockierungslösung: 3% Skim Milk (#70166, Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz) in PBS-T
- ClickFITC Reagenz, ClickFITC-gekoppeltes Cyclooctin, Cu-freies Cyclooctin (gelöst in DMF/H<sub>2</sub>O 2:1); MW: 552,59 g/mol (4-8°C) synthetisiert von Tobias Hagendorn (AK Prof. Dr. Stefan Bräse)
- Click-iT® Puffersystem (#C10269, Invitrogen)
- Clostridium perfringens (#C8760, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- *Complete Mini* (7x Stammlösung), 1 Tablette/1,5 ml ddH<sub>2</sub>O (12 Wochen haltbar bei -20 °C bzw. 1-2 Wochen bei RT), (#12537000, Roche, Mannheim, Deutschland)
- Coomassie-Entfärber: 0,2% Serva Blue R, 50% Methanol, 10% Essigsäure
- ClickCy5 Reagenz, Cy5-gekoppeltes Cyclooctin, Cu-freies Cyclooctin (gelöst in DMSO); MW: 887,07 g/mol synthetisiert von Dr. Tobias Hagendorn (AK Prof. Dr. Stefan Bräse)
- Danieau (50x): 50 mM NaCl, 0,7 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5 mM HEPES
- DMEM (*Dulbeccos modified eagle medium*, Glukosebasis) (#41966, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% FCS (fetal calf serum) (#15-151, PAA the cell culture company) und 1% Penicillin/Streptomycin (#15140, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) (4-8 °C, vor Benutzung aufwärmen auf 37 °C)
- DMEM-Glutamax (für Stammzellen) (#31966, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% FCS (#150108, PAA), 1% Pen/Strep, 1% nicht essentielle Aminosäuren (#11140, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 0,2% β-Mercaptolösung (#879451, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1000U LIF
- DMF (Dimethylformamid) (#A6251.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (#A994.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- DNase (#04716728001, Roche, Mannheim, Deutschland)
- DPBS (Dulbeccoss phosphate-buffered saline (#14190-094 (-/-), #14190-09 (+/+), Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- DRAQ5™-Lösung (#DR51000, Biostatus)



- DyLight 488-Phosphine, Cu-haltiges Click-Reagenz (#88907, Thermo Scientific, Rockford, USA)
- EBM2-Medium (für Primärzellen) (#CC-3156, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- E3-Embryomedium mit Methylenblau (Haffter et al., 1996): 10 l (60x): 172 g NaCl, 7,6 g KCl, 29 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 49 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, Sterilfiltrieren; Stock-Lösung kann eingefroren werden. Für 500 ml Ansatz: 8,333 ml 60x E3 Medium, 0,02% Methylenblau
- E3-Embryonenmedium ohne Methylenblau: Analog zum E3-Embryomedium ohne Methylenblau
- EDTA, Stock-Lösung 10 mM, pH 7,0, vor der Anwendung 1 ml Stock/10 ml Ringer Lösung (Endkonzentration 1 mM EDTA)
- Einfriermedium mit 50% FCS, 25% DMSO und 1% Pen/Strep
- EndoN-Verdaupuffer: 20 mM Tris/HCl pH 6,8 (2M) (#4855-2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 20 mM NaCl (2M) (#71379, Fluka, Buchs, Schweiz), 1% Triton X-100 (10%) (#3051-2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 x Complete Mini (7x) x H<sub>2</sub>O
- Ethanol (#32205-1, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Fungizone (#15290026, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Glycin (#3908.3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Hoechst 33342, Trihydrochlorid Trihydrat 10 mg/ml (#911741, Invitrogen) (Lagerung bei 4-8°C)
- HS<sub>C</sub> (Homogenisationslösung mit *Complete Mini*): 10 mM Tris/HCl pH 7,4 (1 M), 1 x Complete Mini (7x), 1 mM PMSF (100 mM) (#P7626, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) x H<sub>2</sub>O
- KO-Medium (Knockoutmedium für Stammzellen) (#10828, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 10x Laemmlli: 30,2 g Tris (0,25 M), 144,2 g Glycin (1,92 M), 100 ml 10 % (w/v) SDS (1%); zuerst Tris und Glycin in H<sub>2</sub>O lösen, dann SDS dazugeben und pH 8,2 einstellen
- "Low-melting" Agarose (1,5%) (#35-2010, peQLab, Erlangen, Deutschland)
- 0,02% Methylenblau: Die Zugabe von 0,02% Methylenblau verhindert Pilz- und Bakterienbefall (#A514-1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Mowiol (Polyvinylalkohol (PVA), #81381-50G, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- MS-222 (Narkotisierungslösung), Ethyl-3-aminobenzoat-methansulfonat Salz, 0,03% w/v MS-222 (Tricaine) in deionisiertem H<sub>2</sub>O auflösen (#A5040-5G, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), Cell Proliferation Assay (#G4100, Promega)
- Myco-3, Cyprofloxacin (gegen Mycoplasmen) (#A5240.0020, AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- NaCl (#3957.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- PBS (Phosphate buffered saline) (#14190, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- PBS (1x): 200 mg/l KCl (#6781-1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 200 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8000 mg/l NaCl, 1150 mg/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (#L-18250, Fertigmischung von Dulbecco, Biochrom, Berlin, Deutschland)
- PBS-T: 0,05% Tween-20 in PBS
- PeqGOLD Protein Marker V (#27-2210, peqlab, Erlangen, Deutschland)



- PFA, Paraformaldehyd (#P6148, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Phenolrot (#P3532-5G, Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland)
- PMSF (#A099.0025, AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Polyacrylamid (#3029-2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Pronase: 5 mg/ml Pronase gelöst in 1 mg/ml Embryomedium (#109K1622V, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Puromycin (#P9620, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 0,3% PTU (Phenylthioharnstoff): Unterbindet die Pigmentierung. PTU ist allerdings sehr kanzerogen. Mit PTU behandelten Embryonen sind gesondert aufzubewahren bzw. müssen als Sondermüll entsorgt werden
- PyrPHOS-Cu(I)-Komplex, Cu-haltiger Click-Komplex (synthetisiert von Daniel Volz, cynora GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Rhodamin Phalloidin R415 (#A12381, Molecular-Probes®, Invitrogen)
- Ringer Lösung: 116 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 5,0 mM HEPES (#9105-3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 7,2
- Roti®-Blue Färbelösung (5x) (#A152,1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium, L-Glutaminbasis) (#21875, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10% FCS (fetal calf serum) (#15-151, PAA the cell culture company) und 1% Penicillin/Streptomycin (#15140, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) (4-8 °C, Aufwärmen auf 37 °C vor Benutzung)
- Sammelgel (1x): 2,05 ml H<sub>2</sub>O, 0,5 ml Acrylamid, 405 µL Sammelgelmix, 30 µL APS (10%), 3 (7) µL TEMED
- Sammelgelmix: 37,5 ml Tris/HCl pH 6,8 (1 M) (4,54 g/37,5 ml; pH einstellen mit HCl) 2 ml SDS (10%)
- SDS (Sodiumdodecylsulfat) (#4360.7, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- TEMED (#40677, BIO-RAD)
- Transferpuffer (0,18 M Glycin, 24 mM Tris Base, 10 mM CAPS (*N*-cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure) pH 11.0, 10% MeOH)
- Trenngel (12%): 3,3 ml H<sub>2</sub>O, 4 ml Polyacrylamid (#3029,2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 2,6 ml Trenngelmix, 100 µL APS (10%) (#17-1311-01, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), 4 (6) µL TEMED (#203-744-6, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Trenngelmix: 50 ml Tris/HCl pH 8,8 (1,5 M) (9,08 g/50 ml; pH einstellen mit HCl), 2 ml SDS (10%) (#4360-1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris (#4855.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Triton X-100 (#X100, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Trypsin (für Stammzellen: 0,05% Trypsin (Trypsin Typ XI; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 0,8% NaCl, 0,04%KCl, 0,1%Glukose, 0,0589% NaHCO<sub>3</sub>, 0,029% EDTA und dH<sub>2</sub>O; sterilfiltrieren und aliquotieren (40ml); Lagerung bei 20°C
- Trypsin/EDTA (#25200, Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- VU-2G7 (#sc-69644, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- WesternBlot-Laufpuffer (0,18 M Glycin, 24 mM Tris Base)
- Zelllysispuffer (159 mM NaCl, 50 mM Tris pH8, 5 mM EDTA pH8, 1% NP40)



## 7 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström ( $1 \text{ \AA} = 100 \text{ pm} = 0,1 \text{ nm} = 10^{-4} \mu\text{m} = 10^{-7} \text{ mm} = 10^{-10} \text{ m}$ )
Ac <sub>3</sub> -4-Azido-ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-4-azido-4-desoxymannosamin
Ac <sub>4</sub> GalNAc	Peracetyliertes <i>N</i> -Acetylgalaktosamin
Ac <sub>4</sub> GalNAz	Peracetyliertes <i>N</i> -Acetyl-azidogalaktosamin
Ac <sub>4</sub> GlcNAc	Peracetyliertes <i>N</i> -Acetylglukosamin
Ac <sub>4</sub> GlcNAz	Peracetyliertes <i>N</i> -Acetyl-azidoglukosamin
Ac <sub>4</sub> ManNAc	Peracetyliertes <i>N</i> -Acetylmannosamin
Ac <sub>4</sub> ManNAz	Peracetyliertes <i>N</i> -Acetyl-azidomannosamin
AGP	<i>α</i> -1-Acid glycoprotein
Ak	Arbeitskreis
Alexa Fluor ® 488	5-Carboxamido-(propargyl), Bis(triethylammonium)-Salz
Alexa Fluor ® 647	Triethylammonium-Salz
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i> (Kälberserum)
Ca	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CDG-Syndrom	<i>Congenital disorders of glycosylation</i>
CFP	Cyanoblau-fluoreszierendes Protein
ClickFITC	FITC-gebundenes Cyclooctin (ein Click Reagenz)
ClickCy5	Cyanin5-Farbstoff verknüpft mit einem disubstituierten Cyclooctin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid



COOH	Carboxylgruppe
Cu	Kupfer
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
CS	Chondroitin-Sulfat
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt-destilliertes Wasser
DIBO	Diisobenzocyclooctin
DIFO	Difluorcyclooctin
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dermatan-Sulfat
EBM-2	Endotheles Basalmedium (engl. <i>endothelial basal medium</i> )
ec-SOD	Extrazelluläre Superoxid Dismutase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESL	Endotheliale Oberflächenschicht (engl. <i>endothelial surface layer</i> )
evtl.	Eventuell
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. <i>extra cellular matrix</i> )
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FGF	Wachstumsfaktor für Fibroblasten (engl. <i>fibroblast growth factor</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum (Mediumzusatz, engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS)
FRAP	Fluoreszenzwiedererlangung nach Photobleichung (engl. <i>fluorescence recovery after photobleaching</i> )



FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergie
GAG-Seitenketten	Glykosaminoglykan-Seitenketten
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GalNAz	<i>N</i> -Azidogalaktosamin
GDP	Guanidindiphosphat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (engl. <i>green fluorescent protein</i> )
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
GlcNAz	<i>N</i> -Azidoglukosamin
GluA	Glukuronat
Gly	Glycin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HeLa	Menschliche Gebärmutterhalskrebszellen (engl. <i>human cervix carcinoma cells</i> )
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HOMO	Höchst-besetztes Molekülorbital (engl. <i>highest occupied molecular orbital</i> )
hpf	Stunden nach der Befruchtung (engl. <i>hours post fertilization</i> )
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HS	Heparin- und Heparan-Sulfat
<i>k</i>	Geschwindigkeitskonstante
$K_d$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton (Masseneinheit für Proteine; 1 Da = $1,66 \times 10^{-27}$ kg)
KS	Keratan-Sulfat
LSM	Lösungsmittel
LUMO	Niedrigste-besetzte Molekülorbital (engl. <i>lowest unoccupied molecular orbital</i> )



MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight</i>
Man	Mannose
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
ManNAz	<i>N</i> -Azidomannosamin
ManNProp	<i>N</i> -Propanoylmannosamin
Mg	Magnesium
MOE	Metabolisches Oligosaccharid-Engineering
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
Myc0-3	Antibiotika basierend auf Ciprofloxacin
NaBH <sub>4</sub>	Natriumborhydrid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAG	<i>N</i> -gebundene Glykane
NCAM	Neurales Zelladhesionsmolekül (engl. <i>neural cell-adhesion molecule</i> )
NeuNAc	Neuraminsäure
OLED	Organische licht-emittierende Leuchtdioden (engl. <i>organic light emitting diode</i> )
OH-	Hydroxyl-
Panx 1	Pannexin 1
PAS	<i>Periodic acid Schiff reaction</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 100 µg/ml)
PFA	Paraformaldehyd
PGs	Proteoglykane
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid



PSA	Polysialinsäure
PTU	Phenylthioharnstoff
RER	Raues endoplasmatische Retikulum
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein (engl. <i>red fluorescent protein</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( engl. <i>rounds per minute</i> )
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tert	tertiär
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Thr	Threonin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor (engl. <i>tumor-necrosis-factor alpha</i> )
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
VEGF	Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor
v/v	Volumen/Volumen mal 100
wt	Wild-typ
w/v	Masse/Volumen mal 100
Xyl	Xylose
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein (engl. <i>yellow fluorescent protein</i> )
ZNS	Zentrales Nervensystem





## 8 Literaturverzeichnis

- Agard NJ, Bertozzi CR (2009) Chemical Approaches To Perturb, Profile, and Perceive Glycans. *Accounts of Chemical Research* 42: 788-797. doi: 10.1021/ar800267j
- Agard NJ, Prescher JA, Bertozzi CR (2004) A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society* 126: 15046-15047. doi: 10.1021/ja044996f
- Almaraz RT, Aich U, Khanna HS, Tan E, Bhattacharya R, Shah S, Yarema KJ (2012) Metabolic oligosaccharide engineering with N-Acyl functionalized ManNAc analogs: Cytotoxicity, metabolic flux, and glycan-display considerations. *Biotechnology and Bioengineering* 109: 992-1006. doi: 10.1002/bit.24363
- Almeida Gd, Townsend LC, Bertozzi CR (2013) Synthesis and Reactivity of Dibenzoselenacycloheptynes. *Organic letters* 15: 3038-3041. doi: 10.1021/ol401225n
- Argüeso P (2013) Glycobiology of the ocular surface: mucins and lectins. *Japanese Journal of Ophthalmology* 57: 150-155. doi: 10.1007/s10384-012-0228-2
- Arnold RM, Locklin J (2013) Self-Sorting Click Reactions That Generate Spatially Controlled Chemical Functionality on Surfaces. *Langmuir* 29: 5920-5926. doi: 10.1021/la4012857
- Babu E, Singaravadivel S, Manojkumar P, Krishnasamy S, Gnana kumar G, Rajagopal S (2013) Aptamer-based label-free detection of PDGF using ruthenium(II) complex as luminescent probe. *Anal Bioanal Chem* 405: 6891-6895. doi: 10.1007/s00216-013-7118-4
- Baskin JM, Prescher JA, Laughlin ST, Agard NJ, Chang PV, Miller IA, Lo A, Codelli JA, Bertozzi CR (2007) Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 16793-16797. doi: 10.1073/pnas.0707090104
- Beeman SC, Georges JF, Bennett KM (2013) Toxicity, biodistribution, and ex vivo MRI detection of intravenously injected cationized ferritin. *Magnetic Resonance in Medicine* 69: 853-861. doi: 10.1002/mrm.24301
- Belardi B, de la Zerda A, Spiciarich DR, Maund SL, Peehl DM, Bertozzi CR (2013) Imaging the Glycosylation State of Cell Surface Glycoproteins by Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition* 52: 14045-14049. doi: 10.1002/anie.201307512
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007) *Stryer Biochemie*. Elsevier 6. Auflage.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer research* 33: 2643-2652.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer research* 38: 3751-3757.
- Bock VD, Hiemstra H, van Maarseveen JH (2006) CuI-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *European Journal of Organic Chemistry* 2006: 51-68. doi: 10.1002/ejoc.200500483
- Boyce M, Carrico IS, Ganguli AS, Yu S-H, Hangauer MJ, Hubbard SC, Kohler JJ, Bertozzi CR (2011) Metabolic cross-talk allows labeling of O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine-modified proteins via the N-acetylgalactosamine salvage



- pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 3141-3146. doi: 10.1073/pnas.1010045108
- Braese S, Bülle J, Hüttermann A (2008) *Organische und bioorganische Chemie: Das Basiswissen für Master- und Diplomprüfungen*. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA: 595-596.
- Campbell CT, Sampathkumar S-G, Yarema KJ (2007) Metabolic oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions. *Molecular BioSystems* 3: 187-194. doi: 10.1039/b614939c
- Chappell D, Jacob M, Becker BF, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M (2008) Expedition Glykokalyx. *Der Anaesthetist* 57: 959-969. doi: 10.1007/s00101-008-1445-4
- Chen H, Qi B, Moore T, Colvin DC, Crawford T, Gore JC, Alexis F, Mefford OT, Anker JN (2013) Synthesis of Brightly PEGylated Luminescent Magnetic Upconversion Nanophosphors for Deep Tissue and Dual MRI Imaging. *Small: n/a-n/a*. doi: 10.1002/smll.201300828
- Cruz-Chu Eduardo R, Malafeev A, Pajarskas T, Pivkin Igor V, Koumoutsakos P (2014) Structure and Response to Flow of the Glycocalyx Layer. *Biophysical journal* 106: 232-243. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.09.060>
- Cypionka H (2010) *Grundlagen der Mikrobiologie*. Springer Verlag Heidelberg 4. Edition.
- Dabelsteen E, Mandel U, Clausen H (1991) Cell Surface Carbohydrates Are Markers of Differentiation in Human Oral Epithelium. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2: 493-507. doi: 10.1177/10454411910020040301
- de Boer SY, Gloaguen Y, Reek JNH, Lutz M, van der Vlugt JI (2012) N-H bond activation by palladium(ii) and copper(i) complexes featuring a reactive bidentate PN-ligand. *Dalton Transactions* 41: 11276-11283. doi: 10.1039/c2dt31009k
- Debets MF, van Berkel SS, Dommerholt J, Dirks AT, Rutjes FP, van Delft FL (2011) Bioconjugation with strained alkenes and alkynes. *Acc Chem Res* 44: 805-15. doi: 10.1021/ar200059z
- Díaz DD, Punna S, Holzer P, McPherson AK, Sharpless KB, Fokin VV, Finn MG (2004) Click chemistry in materials synthesis. 1. Adhesive polymers from copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42: 4392-4403. doi: 10.1002/pola.20330
- Dorland L, van Halbeek H, Vleigenthart JF, Lis H, Sharon N (1981) Primary structure of the carbohydrate chain of soybean agglutinin. A reinvestigation by high resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* 256: 7708-11.
- Du J, Meledeo MA, Wang Z, Khanna HS, Paruchuri VDP, Yarema KJ (2009) Metabolic glycoengineering: Sialic acid and beyond. *Glycobiology* 19: 1382-1401. doi: 10.1093/glycob/cwp115
- Dudas B, Semeniken K (2012) Glycosaminoglycans and Neuroprotection. In: Lever R, Mulloy B, Page CP (eds) *Heparin – A Century of Progress*, vol 207. Springer Berlin Heidelberg, pp 325-343
- Durbec P, Cremer H (2001) Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system. *Molecular Neurobiology* 24: 53-64. doi: 10.1385/mn:24:1-3:053
- Ebong EE, Macaluso FP, Spray DC, Tarbell JM (2011) Imaging the Endothelial Glycocalyx In Vitro by Rapid Freezing/Freeze Substitution Transmission Electron Microscopy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31: 1908-1915. doi: 10.1161/atvbaha.111.225268



- Espinosa-Marzal Rosa M, Fontani G, Reusch Frieder B, Roba M, Spencer Nicholas D, Crockett R (2013) Sugars Communicate through Water: Oriented Glycans Induce Water Structuring. *Biophysical journal* 104: 2686-2694. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.017>
- Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D (2000) Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482: 157-171. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00153-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00153-9)
- Frati-Munari AC (2013) Medical significance of endothelial glycocalyx. *Arch Cardiol Mex.* 83: 303-312. doi: 10.1016/j.acmx.2013.04.015
- Fu BM, Tarbell JM (2013) Mechano-sensing and transduction by endothelial surface glycocalyx: composition, structure, and function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 5: 381-390. doi: 10.1002/wsbm.1211
- Gasimli L, Linhardt RJ, S. DJ (2012) Proteoglycans in stem cells. *Biotechnol Appl Biochem* 59: 65-76. doi: 10.1002/bab.1002
- Grabosch C, Kind M, Gies Y, Schweighofer F, Terfort A, Lindhorst TK (2013) A 'dual click' strategy for the fabrication of bioselective, glycosylated self-assembled monolayers as glycocalyx models. *Organic & Biomolecular Chemistry* 11: 4006-4015. doi: 10.1039/c3ob40386f
- Grobe K, Ledin J, Ringvall M, Holmborn K, Forsberg E, Esko JD, Kjellén L (2002) Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects* 1573: 209-215. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00386-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00386-0)
- Hacker U, Nybakken K, Perrimon N (2005) Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 530-541.
- Hagendorf T (2014) *Neue Wege zu (Hetero-)Cyclooctinen*. Logos Verlag Berlin.
- Han S, Collins BE, Bengtson P, Paulson JC (2005) Homomultimeric complexes of CD22 in B cells revealed by protein-glycan cross-linking. *Nat Chem Biol* 1: 93-97. doi: [http://www.nature.com/nchembio/journal/v1/n2/supinfo/nchembio713\\_S1.html](http://www.nature.com/nchembio/journal/v1/n2/supinfo/nchembio713_S1.html)
- Hang HC, Yu C, Kato DL, Bertozzi CR (2003) A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 14846-14851. doi: 10.1073/pnas.2335201100
- Hangauer MJ, Bertozzi CR (2008) A FRET-Based Fluorogenic Phosphine for Live-Cell Imaging with the Staudinger Ligation. *Angewandte Chemie International Edition* 47: 2394-2397. doi: 10.1002/anie.200704847
- Hanisch F-G, Müller S (2000) MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology* 10: 439-449. doi: 10.1093/glycob/10.5.439
- Haslam SM, North SJ, Dell A (2006) Mass spectrometric analysis of N- and O-glycosylation of tissues and cells. *Current Opinion in Structural Biology* 16: 584-591. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2006.08.006>
- Hein JE, Fokin VV (2010) Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chem Soc Rev.* 39: 1302-1315. doi: 10.1039/b904091a
- Hermanson GT (2008) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press: 1202.
- Hladik CM (1966) [A new structure of the surface of the intestinal epithelium: the membrane of the glycocalyx]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles* 263: 972-5.



- Honda T, Masuda T, Yoshida S, Arai M, Kaneko S, Yamashita M (2002) Synthesis and anti-influenza virus activity of 7-O-alkylated derivatives related to zanamivir. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 12: 1925-8.
- Hudak JE, Canham SM, Bertozzi CR (2014) Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion. *Nat Chem Biol* 10: 69-75. doi: 10.1038/nchembio.1388.  
<http://www.nature.com/nchembio/journal/v10/n1/abs/nchembio.1388.html#supplementary-information>
- Huisgen R (1963a) 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angewandte Chemie International Edition in English* 2: 565-598. doi: 10.1002/anie.196305651
- Huisgen R (1963b) Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angewandte Chemie International Edition in English* 2: 633-645. doi: 10.1002/anie.196306331
- Huisgen R (1984) 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry. Wiley International Edition Bd. 1: 1-176.
- Im K-B, Schmidt U, Kang M-S, Lee J-Y, Bestvater F, Wachsmuth M (2013) Diffusion and binding analyzed with combined point FRAP and FCS. *Cytometry Part A* 83: 876-889. doi: 10.1002/cyto.a.22316
- Iozzo RV (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annual review of biochemistry* 67: 609-52. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.609
- Jaeken J, Matthijs G (2007) Congenital Disorders of Glycosylation: A Rapidly Expanding Disease Family. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 8: 261-278. doi: doi:10.1146/annurev.genom.8.080706.092327
- Jewett JC, Bertozzi CR (2010) Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev.* 39: 1272-1279.
- Kaufmann L (2012) Untersuchung der Glykostrukturtopologie bei Tumor- und Primärzelllinien. Cuvillier Verlag Goettingen.
- Kayser H, Zeitler R, Kannicht C, Grunow D, Nuck R, Reutter W (1992) Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *Journal of Biological Chemistry* 267: 16934-8.
- Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 40: 2004-2021. doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::aid-anie2004>3.0.co;2-5
- Kondo A, Li W, Nakagawa T, Nakano M, Koyama N, Wang X, Gu J, Miyoshi E, Taniguchi N (2006) From glycomics to functional glycomics of sugar chains: Identification of target proteins with functional changes using gene targeting mice and knock down cells of FUT8 as examples. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics* 1764: 1881-1889. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.10.011>
- Kunz H, Hartmann S, Palitzsch B (2012) Glykopeptide: Impfung gegen Tumore? . *labor&more* 6.12: 16-25.
- Kurtenbach S, Prochnow N, Kurtenbach S, Klooster J, Zoidl C, Dermietzel R, Kamermans M, Zoidl G (2013) Pannexin1 Channel Proteins in the Zebrafish Retina Have Shared and Unique Properties. *PLoS ONE* 8: e77722. doi: 10.1371/journal.pone.0077722
- Lallana E, Riguera R, Fernandez-Megia E (2011) Reliable and efficient procedures for the conjugation of biomolecules through Huisgen azide-alkyne

- cycloadditions. *Angewandte Chemie* 50: 8794-804. doi: 10.1002/anie.201101019
- Lallana E, Sousa-Herves A, Fernandez-Trillo F, Riguera R, Fernandez-Megia E (2012) Click chemistry for drug delivery nanosystems. *Pharmaceutical Research* 29: 1-34. doi: 10.1007/s11095-011-0568-5
- Lange T, Samatov TR, Tonevitsky AG, Schumacher U Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells. *Carbohydrate Research*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2014.01.010>
- Laue T, Plagens A (1998) 1,3-Dipolare Cycloaddition. *Namen- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie*. Vieweg+Teubner Verlag, pp 83-87
- Laughlin ST, Agard NJ, Baskin JM, Carrico IS, Chang PV, Ganguli AS, Hangauer MJ, Lo A, Prescher JA, Bertozzi CR (2006) Metabolic Labeling of Glycans with Azido Sugars for Visualization and Glycoproteomics. In: Minoru F (ed) *Methods in Enzymology*, vol Volume 415. Academic Press, pp 230-250
- Laughlin ST, Baskin JM, Amacher SL, Bertozzi CR (2008) In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish. *Science* 320: 664-667. doi: 10.1126/science.1155106
- Le Droumaguet C, Wang C, Wang Q (2010) Fluorogenic click reaction. *Chemical Society reviews* 39: 1233-1239. doi: 10.1039/b901975h
- Lehle L, Strahl S, Tanner W (2006) Protein Glycosylation, Conserved from Yeast to Man: A Model Organism Helps Elucidate Congenital Human Diseases. *Angewandte Chemie International Edition* 45: 6802-6818. doi: 10.1002/anie.200601645
- Lemieux GA, de Graffenried CL, Bertozzi CR (2003) A Fluorogenic Dye Activated by the Staudinger Ligation. *Journal of the American Chemical Society* 125: 4708-4709. doi: 10.1021/ja029013y
- Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA (2008) Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol* 1: 183-197.
- Lipowsky H (2012) The Endothelial Glycocalyx as a Barrier to Leukocyte Adhesion and Its Mediation by Extracellular Proteases. *Annals of Biomedical Engineering* 40: 840-848. doi: 10.1007/s10439-011-0427-x
- Luft JH (1966) Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* 25: 1773-1783.
- Lutz JF (2008) Copper-free azide-alkyne cycloadditions: new insights and perspectives. *Angewandte Chemie* 47: 2182-4. doi: 10.1002/anie.200705365
- Luz M, Knust E (2013) Fluorescently tagged Lin7c is a dynamic marker for polarity maturation in the zebrafish retinal epithelium. *Biology Open* 2: 867-871. doi: 10.1242/bio.20135371
- Mahal LK, Charter NW, Angata K, Fukuda M, Koshland DE, Bertozzi CR, , (2001) A small-molecule modulator of poly-alpha 2,8-sialic acid expression on cultured neurons and tumor cells. *Science* 294: 380-1.
- Mahal LK, Yarema KJ, Bertozzi CR (1997) Engineering Chemical Reactivity on Cell Surfaces Through Oligosaccharide Biosynthesis. *Science* 276: 1125-1128. doi: 10.1126/science.276.5315.1125
- Marsh G, Waugh RE (2013) Quantifying the mechanical properties of the endothelial glycocalyx with atomic force microscopy. *J Vis Exp* 72. doi: 10.3791/50163
- Marti T, Schaller J, Rickli EE, Schmid K, Kamerling JP, Gerwig GJ, van Halbeek H, Vliegthart JFG (1988) The N- and O-linked carbohydrate chains of human, bovine and porcine plasminogen. *European Journal of Biochemistry* 173: 57-63. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13966.x



- Mauris J, Mantelli F, Woodward AM, Cao Z, Bertozzi CR, Panjwani N, Godula K, Argüeso P (2013) Modulation of Ocular Surface Glycocalyx Barrier Function by a Galectin-3 N-terminal Deletion Mutant and Membrane-Anchored Synthetic Glycopolymers. *PLOS one*. doi: 10.1371/journal.pone.0072304
- Megens R.T.A RS, Schiffers P.H.M., Hilgers R.H.P., De Mey J.G.R., Slaaf D.W., oude Egbrink M.G.A., van Zandvoort M.A.M.J. (2007) Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. *J Vasc Res* 44: 87-98.
- Meldal M, Tornøe CW (2008) Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chemical Reviews* 108: 2952-3015. doi: 10.1021/cr0783479
- Milles S, Tyagi S, Banterle N, Koehler C, VanDelinder V, Plass T, Neal AP, Lemke EA (2012) Click Strategies for Single-Molecule Protein Fluorescence. *Journal of the American Chemical Society* 134: 5187-5195. doi: 10.1021/ja210587q
- Möller H, Böhrsch V, Bentrop J, Bender J, Hinderlich S, Hackenberger CPR (2012) Glycan-Specific Metabolic Oligosaccharide Engineering of C7-Substituted Sialic Acids. *Angewandte Chemie International Edition* 51: 5986-5990. doi: 10.1002/anie.201108809
- Moller H, Bohrsch V, Lucka L, Hackenberger CPR, Hinderlich S (2011) Efficient metabolic oligosaccharide engineering of glycoproteins by UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) knock-down. *Molecular BioSystems* 7: 2245-2251. doi: 10.1039/c1mb05059a
- Moore CJ, Goh HT, Hewitt JE (2008) Genes required for functional glycosylation of dystroglycan are conserved in zebrafish. *Genomics* 92: 159-67. doi: 10.1016/j.ygeno.2008.05.008
- Morava É, Wosik H, Kárteszi J, Guillard M, Adamowicz M, Sykut-Cegielska J, Hadzsiev K, Wevers RA, Lefeber DJ (2008) Congenital disorder of glycosylation type Ix: Review of clinical spectrum and diagnostic steps. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 31: 450-456. doi: 10.1007/s10545-008-0822-0
- Nchimi-Nono K, Wegner KD, Linden S, Lecointre A, Ehret-Sabatier L, Shakir S, Hildebrandt N, Charbonniere LJ (2013) Activated phosphonated trifunctional chelates for highly sensitive lanthanide-based FRET immunoassays applied to total prostate specific antigen detection. *Organic & Biomolecular Chemistry* 11: 6493-6501. doi: 10.1039/c3ob40898a
- Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M (2008) Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock*. 30: 623-7. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181777da3
- Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stoes ES (2005) The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 16: 507-11.
- Nieuwdorp M, van Haeften TW, Gouverneur MCLG, Mooij HL, van Lieshout MHP, Levi M, Meijers JCM, Holleman F, Hoekstra JBL, Vink H, Kastelein JJP, Stoes ESG (2006) Loss of Endothelial Glycocalyx During Acute Hyperglycemia Coincides With Endothelial Dysfunction and Coagulation Activation In Vivo. *Diabetes* 55: 480-486. doi: 10.2337/diabetes.55.02.06.db05-1103
- Nüsslein-Volhard C (2012) The zebrafish issue of *Development*. *Development* 139: 4099-4103. doi: 10.1242/dev.085217
- Oetke C, Brossmer R, Mantey LR, Hinderlich S, Isecke R, Reutter W, Keppler OT, Pawlita M (2002) Versatile Biosynthetic Engineering of Sialic Acid in Living Cells Using Synthetic Sialic Acid Analogues. *Journal of Biological Chemistry* 277: 6688-6695. doi: 10.1074/jbc.M109973200



- Orner L, Kirmse W (1958) Umsetzung von Phenylacetalen mit Aziden und Diazoverbindungen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 614.
- Palte MJ, Raines RT (2012) Interaction of Nucleic Acids with the Glycocalyx. *Journal of the American Chemical Society* 134: 6218-6223. doi: 10.1021/ja2106477
- Prescher JA, Bertozzi CR (2006) Chemical Technologies for Probing Glycans. *Cell* 126: 851-854.
- Prescher JA, Dube DH, Bertozzi CR (2004) Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature* 430: 873-877.  
doi:[http://www.nature.com/nature/journal/v430/n7002/supinfo/nature02791\\_S1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v430/n7002/supinfo/nature02791_S1.html)
- Presolski SI, Hong V, Cho S-H, Finn MG (2010) Tailored Ligand Acceleration of the Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction: Practical and Mechanistic Implications. *Journal of the American Chemical Society* 132: 14570-14576. doi: 10.1021/ja105743g
- Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P (2000a) The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 440: 653-66.
- Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P (2000b) The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 440: 653-66.
- Prof. Dr. Horst Kunz SH, Björn Palitzsch (2012) Chemische Synthese von Vakzinen – Impfung gegen Tumore? *labor&more* 6: 16-25.
- Rajendran M, Yapici E, Miller LW (2013) Lanthanide-Based Imaging of Protein-Protein Interactions in Live Cells. *Inorganic Chemistry*. doi: 10.1021/ic4018739
- Rambourg A, Leblond CP (1967) Electron microscope observations on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *The Journal of cell biology* 32: 27-53.
- Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF (2007) Shedding of the Endothelial Glycocalyx in Patients Undergoing Major Vascular Surgery With Global and Regional Ischemia. *Circulation* 116: 1896-1906. doi: 10.1161/circulationaha.106.684852
- Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA (2007) The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Eur J Physiol* 454: 345-359. doi: 10.1007/s00424-007-0212-8
- Reitsma S. SDW, Vink H., van Zandvoort M.A.M.J., oude Egbrink M. G. A. (2007) The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Eur J Physiol* 454: 345-359.
- Rodionov VO, Fokin VV, Finn MG (2005) Mechanism of the Ligand-Free Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angewandte Chemie International Edition* 44: 2210-2215. doi: 10.1002/anie.200461496
- Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB (2002) A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* 41: 2596-2599. doi: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::aid-anie2596>3.0.co;2-4
- Rotman A, Heldman J (1980) Azidofluorescein diacetate — A novel intracellular photolabelling reagent. *FEBS Letters* 122: 215-218. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80441-8](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(80)80441-8)
- Rudat B, Birtalan E, Vollrath SBL, Fritz D, Kölmel DK, Nieger M, Schepers U, Müllen K, Eisler H-J, Lemmer U, Braese S (2011) Photophysical properties of fluorescently-labeled peptoids. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46: p. 4457-4465.



- Saladin KS (2011) *Anatomy and Physiology*. McGraw-Hill.
- Salic A, Mitchison TJ (2008) A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 2415-2420. doi: 10.1073/pnas.0712168105
- Sawa M, Hsu T-L, Itoh T, Sugiyama M, Hanson SR, Vogt PK, Wong C-H (2006) Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 12371-12376. doi: 10.1073/pnas.0605418103
- Saxon E, Bertozzi CR (2000a) Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* 287: 2007-2010.
- Saxon E, Bertozzi CR (2000b) Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* 287: 2007-2010. doi: 10.1126/science.287.5460.2007
- Schilling CI, Jung N, Biskup M, Schepers U, Brase S (2011) Bioconjugation via azide-Staudinger ligation: an overview. *Chemical Society reviews* 40: 4840-4871. doi: 10.1039/c0cs00123f
- Sinclair AM, Elliott S (2005) Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of pharmaceutical sciences* 94: 1626-1635. doi: 10.1002/jps.20319
- Singh R, Bandyopadhyay D (2007a) MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 6: 481-6.
- Singh R, Bandyopadhyay D (2007b) MUC1: A target molecule for cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy* 6: 481-486.
- Sletten EM, Bertozzi CR (2009a) Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angewandte Chemie* 48: 6974-98. doi: 10.1002/anie.200900942
- Sletten EM, Bertozzi CR (2009b) Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angewandte Chemie International Edition* 48: 6974-6998. doi: 10.1002/anie.200900942
- Sletten EM, Bertozzi CR (2011) From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Accounts of Chemical Research* 44: 666-676. doi: 10.1021/ar200148z
- Som P, Atkins HL, Bandyopadhyay D, Fowler JS, MacGregor RR, Matsui K, Oster ZH, Sacker DF, Shiue CY, Turner H, Wan C-N, Wolf AP, Zabinski SV (1980) A Fluorinated Glucose Analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): Nontoxic Tracer for Rapid Tumor Detection. *Journal of Nuclear Medicine* 21: 670-675.
- Speers AE, Adam GC, Cravatt BF (2003) Activity-Based Protein Profiling in Vivo Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* 125: 4686-4687. doi: 10.1021/ja034490h
- Springer GF (1984) *Science* 224.
- Taylor P, Gagan M (2002) *The molecular world: Alkenes and Aromatics*. The Open University: 71-73.
- Thomson R, von Itzstein M (1995a) *Carbohydrate Research* 274: 29-44.
- Thomson R, von Itzstein M (1995b) *Carbohydr. Res.* 274.
- Tornøe CW, Christensen C, Meldal M (2002) Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry* 67: 3057-3064. doi: 10.1021/jo011148j
- Tornøe CW, Meldal M (2001) Peptidotriazoles: Copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions on solid-phase, *Peptides* 2001, Proc. Am. Pept. Symp



- Trouillon R, Ewing AG (2013) Single Cell Amperometry Reveals Glycocalyx Hinders the Release of Neurotransmitters During Exocytosis. *Analytical chemistry* 85: 4822-4828. doi: 10.1021/ac4008682
- Uttamapinant C, Tangpeerachaikul A, Grecian S, Clarke ST, Singh U, Slade P, Gee KR, Ting AY (2012) Fast, Cell-Compatible Click Chemistry with Copper-Chelating Azides for Biomolecular Labeling. *Angewandte Chemie International Edition* 51: 5852-5856. doi: 10.1002/anie.201108181
- van Berkel SS, Dirks AJ, Meeuwissen SA, Pinggen DLL, Boerman OC, Laverman P, van Delft FL, Cornelissen JJLM, Rutjes FPJT (2008) Application of Metal-Free Triazole Formation in the Synthesis of Cyclic RGD-DTPA Conjugates. *ChemBioChem* 9: 1805-1815. doi: 10.1002/cbic.200800074
- van Berkel SS, van der Lee B, van Delft FL, Rutjes FPJT (2009) A macrocyclic coumarin-containing tripeptide via CuAAC chemistry. *Chemical communications*: 4272-4274. doi: 10.1039/b906762k
- van Golen RF, Reiniers MJ, Vrisekoop N, Zuurbier CJ, Olthof PB, van Rheenen J, Vangulik TM, Parsons BJ, and Heger M (2013) Antioxidants and Redox Signaling. Mary Ann Liebert, Inc. publishers. doi: 10.1089/ars.2013.5751
- van Haaren PMA, VanBavel E, Vink H, Spaan JAE (2003) Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 285: H2848-H2856. doi: 10.1152/ajpheart.00117.2003
- Vink H, Duling BR (1996) Identification of Distinct Luminal Domains for Macromolecules, Erythrocytes, and Leukocytes Within Mammalian Capillaries. *Circulation Research* 79: 581-589. doi: 10.1161/01.res.79.3.581
- Voet D, Voet JG (2004) *Biochemistry*. Wiley International Edition: 370-79.
- Volz D, Baumann T, Flugge H, Mydlak M, Grab T, Bachle M, Barner-Kowollik C, Braese S (2012) Auto-catalysed crosslinking for next-generation OLED-design. *Journal of Materials Chemistry* 22: 20786-20790. doi: 10.1039/c2jm33291d
- Volz D, Nieger M, Friedrichs J, Baumann T, Bräse S (2013) Small change, big red shift: syntheses, structure and photoluminescence of Cu<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>(Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>py<sub>2</sub> (py=pyridine, 4-vinylpyridine). *Inorganic Chemistry Communications* 37: 106-109. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.inoche.2013.09.023>
- Wang Q, Chan TR, Hilgraf R, Fokin VV, Sharpless KB, Finn MG (2003) Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* 125: 3192-3193. doi: 10.1021/ja021381e
- Wu P, Fokin VV (2007) Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. *Aldrichimica Acta* 40: 7-17.
- Yamada K KK (2011) Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use. *J Pharm Biomed Anal.* 55 (4): 702-27.
- Yang Y, Schmidt EP (2014) The endothelial glycocalyx: an important regulator of the pulmonary vascular barrier. *NIHPA* 1: 23494. doi: 10.4161/tisb.23494
- Yersin H, Rausch AF, Czerwieniec R, Hofbeck T, Fischer T (2011) The triplet state of organo-transition metal compounds. Triplet harvesting and singlet harvesting for efficient OLEDs. *Coord. Chem. Rev.* 255.
- Zeng Y, Ramya TN, Dirksen A, Dawson PE, Paulson JC (2009) High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells. *Nature methods* 6: 207-9. doi: 10.1038/nmeth.1305



- Zeng Y, Tarbell JM (2014) The Adaptive Remodeling of Endothelial Glycocalyx in Response to Fluid Shear Stress. PLoS One 9.  
doi: 10.1371/journal.pone.0086249
- Zhang Y, Zhao JH, Zhang XY, Guo HB, Liu F, L. CH (2004) Relations of the type and branch of surface N-glycans to cell adhesion, migration and integrin expressions. Mol Cell Biochem. 260 137-46.
- Zink DM, Bächle M, Baumann T, Nieger M, Kühn M, Wang C, Klopper W, Monkowius U, Hofbeck T, Yersin H, Bräse S (2012) Synthesis, Structure, and Characterization of Dinuclear Copper(I) Halide Complexes with P<sup>Λ</sup>N Ligands Featuring Exciting Photoluminescence Properties. Inorganic Chemistry 52: 2292-2305. doi: 10.1021/ic300979c
- Zink DM, Baumann T, Friedrichs J, Nieger M, Bräse S (2013) Copper(I) Complexes Based on Five-Membered P<sup>Λ</sup>N Heterocycles: Structural Diversity Linked to Exciting Luminescence Properties. Inorganic Chemistry 52: 13509-13520. doi: 10.1021/ic4019162
- Zink DM, Grab T, Baumann T, Nieger M, Barnes EC, Klopper W, Braese S (2011) Experimental and Theoretical Study of Novel Luminescent Di-, Tr-, and Tetranuclear Copper Triazole Complexes. Organometallics: 3275-3283.



## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Judith Esther Seltenreich, geborene Bender  
Geburtsdatum: 10.08.1983 in Mosbach  
Nationalität: deutsch

### Akademische Titel

- 2014** **Dr. rer. nat.**  
am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Toxikologie und Genetik (ITG), Deutschland.
- 2010** **Diplom-Chemikerin**  
am KIT, ITG, Deutschland,  
*„Polyamine und Peptide zur Kontrolle von oxidativem Stress“.*

### Ausbildung

- 2011 – 2014** **Promotion**  
am KIT, ITG, Deutschland.
- 2003 - 2010** **Studium der Chemie**  
am KIT, Hauptfach: Organische Chemie, Nebenfächer: Chemische Technik, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie.
- 2003** **Allgemeine Hochschulreife**  
Auguste-Pattberg-Gymnasium, Mosbach-Neckarelz, Deutschland.
- 1994 - 2003** **Weiterführende Schule**  
Auguste-Pattberg-Gymnasium, Mosbach-Neckarelz, Deutschland.
- 1992 - 1994** **Grundschule**, Schwarzach, Deutschland.  
**1990 - 1992** **Grundschule**, Mosbach-Lohrbach, Deutschland.

### Wissenschaftliche Laufbahn

- 11/2011 – 07/2014** **Doktorarbeit**  
am KIT, ITG, Deutschland, in der Gruppe von Priv.-Doz. Dr. Ute Schepers, *„In vivo* Markierung von Glykostrukturen mit Hilfe neuartiger, bioorthogonaler Azid-Alkin 1,3-dipolarer Cycloadditionen“.



- 03/2011 - 09/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
am KIT, Zoologisches Institut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie, „Chemoselektive Markierung des Glycoms im frühen Zebrafisch-Embryonenstadium mit Hilfe der Kupfer-freien Click-Chemie“.
- 2000 – 2006 Chemische Assistentin**  
Wildpark Apotheke, Hauptstraße 54, 74869 Schwarzach.

### Erfahrungen mit Lehre

- SS 2010, 2012  
2013 und 2014 Chemisch-biologisches F2-Praktikum für Biologie-Studenten**  
am KIT, ITG, Zeichnungskorrektur Priv.-Doz. Dr. Ute Schepers.

### Zusätzliche Qualifikationen

- 2012 - 2014 BiolInterfaces International Graduate School (BIF-IGS)**  
Programm für Doktoranden am KIT, Campus Nord.
- 09/2012 Softskillkurs: Literatur Management**  
über BIF-IGS, KIT, Campus Nord.
- 03/2012 Softskillkurs: Scientific Writing**  
über BIF-IGS, KIT, Campus Nord.
- 11/2012 Transdisziplinärer Kurs: Photoshop**  
über BIF-IGS, KIT, Campus Nord.
- 11/2012 Transdisziplinärer Kurs: Surface Analysis**  
über BIF-IGS, KIT, Campus Nord.
- 12/2013 Introductory Course BIF-IGS**  
über BIF-IGS, KIT, Campus Nord.
- 09/2012 und  
09/2013 Retreat der BiolInterfaces International Graduate School (BIF-IGS)**  
Schloss Gültstein, Bad Herrenalb, Deutschland.

### Publikationen

- H. Möller, V. Böhrsch, J. Bentrop, J. Bender, S. Hinderlich und C. P. R. Hackenberger, Glycan-spezifisches metabolisches Oligosaccharid-Engineering von C7-substituierten Sialinsäuren, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**.
- J. E. Seltenreich, D. K. Kölmel, S. Bräse and U. Schepers, Polyamines and peptoids to control oxidative stressed HeLa cells, *Org. Biomol. Chem.*, **2012** (in Revision).
- J. E. Seltenreich, M. Wallesch, D. Volz, D. Wagner, C. Bednarek, C. Grabher, T. Baumann, S. Bräse and U. Schepers, In vivo bioorthogonal labeling of the glycocalyx



using a luminescent, self-clickable copper complex in an intramolecular-catalyzed Click reaction, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014** (in Arbeit).

M. Enders, B. Görling, A. B. Braun, J. E. Seltenreich, L. F. Reichenbach, K. Rissanen, M. Nieger, B. Luy, U. Schepers and S. Bräse, Cytotoxicity and NMR Studies of Platinum Complexes with Cyclooctadiene Ligands, *Organometallics*, **2014** (in Arbeit).

### Poster

J. E. Seltenreich, M. Wallesch, D. Volz, D. Wagner, T. Sims, C. Grabher, C. Bednarek, S. Bräse and U. Schepers, In vivo labeling of the glycocalyx with a luminescent copper complex via intramolecular bioorthogonal click reaction, KIT, *Retreat der Bio-Interfaces International Graduate School auf Schloss Gültstein*, Bad Herrenalb, Deutschland.

### Folgende Bachelorarbeiten wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation unter meiner Betreuung angefertigt und bereits veröffentlicht:

R. V. Schneider, Emittermoleküle aus OLEDs als biokompatible, bleichstabile Fluorophore zur Anwendung im Zell- und Tiermodell, *Bachelorarbeit*, KIT, 2012.

A. B. Braun, Biologische Studien zu Platinkomplexen mit 1-funktionalisierten Cyclooctadien-Liganden, *Bachelorarbeit*, KIT, 2013.

J. W. Karcher, Visualisierung der Glykokalyx bei humanen Zelllinien, *Bachelorarbeit*, KIT, 2013.

### Fremdsprachen

**Englisch**, fließend in Wort und Schrift

**Französisch**, Grundkenntnisse

### EDV-Kenntnisse

MS Office, sehr gute Kenntnisse in Excel, PowerPoint, Outlook, Photoshop, Adobe, CorelDraw, Leica Software und Origin

### Interessen

Golf, Tango, Städtereisen und Musik





## 10 Danksagungen

Recht herzlich möchte ich mich bedanken bei PD Dr. Ute Schepers für die Unterstützung und Zusammenarbeit während meiner ganzen Doktorarbeit, die schönen Unterhaltungen, die wir zusammen hatten und die immer sehr ausgiebig und lustig waren. Es war eine schöne und erfahrungsreiche Zeit. Dankeschön für alles.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Prof. Dr. Stefan Bräse, der als einer meiner TAC-Mitglieder mich bei meiner Arbeit unter all den Biologen am Campus Nord sehr unterstützte. Ein großer Dank vor allem an seiner Arbeitsgruppe, die die meisten Zucker und Click-Reagenzien, die ich in meiner Arbeit verwendet habe, synthetisierten. Ein dickes Dankeschön. Ich wurde immer sehr herzlich am Institut empfangen. Danke an Dr. Thierry Müller, Dr. Christin Bednarek (vielen Dank für die emotionale Unterstützung gerade am Ende meiner Dissertation), Dr. Daniel Volz (dankeschön für die OLEDs, die du mir zur Verfügung gestellt hast), Dr. Daniel Zink (auch dir vielen Dank, dass du mir mehr als ein Dutzend deiner Cu-Komplexe zur Verfügung gestellt hast), Dr. Tobias Hagendorn, Danny Wagner, Mirja Enders, Sabilla Zhang. Danke auch Christiane Lampert für die netten und schönen Unterhaltungen während meines Aufenthaltes am Campus Süd.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Clemens Heske für die Annahme als Korreferent meiner Dissertation. Vielen Dank. Sie waren ein sehr netter Begutachter und eine hilfreiche Unterstützung als TAC-Mitglied während meiner Dissertation.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinem Mann, der mich in den ganzen Höhen und Tiefen, die unweigerlich während dem Schreiben auftauchten, in Allem unterstützt hat und mir immer wieder den Rücken gestärkt hat. Und ich weiß, dass ich in dieser Zeit emotional nicht immer leicht zu handhaben war. Ich danke dir für alles. Deine Art wie du mir Liebe, Geborgenheit, Ruhe, und Zeit schenkst. Ich liebe dich.

Danke auch an meinen kleinsten Schatz, Josia. Danke, dass du da warst und mich als Mama immer sehr zum Lachen bringst. Ich bin dir dankbar für die schönen „schreib-freien“ Stunden, die wir zusammen verbringen durften.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen Eltern, die immer für mich da waren, mich in Allem unterstützt haben. Meinen Vater, der mir immer wieder den Rücken gestärkt hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke, Papa, du bist der beste Papa, den man sich vorstellen kann. Meine Mama wäre bestimmt sehr stolz auf mich. Ich vermisse sie sehr.

Ein großes Dankeschön gilt auch meinen Geschwistern und meinen Schwagern/meiner Schwägerin. Danke, dass es euch gibt.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Schwester, Damaris Bender, meinem Mann, Jens Seltenreich, Darja Ivannikov, Carmen Seidl und Christin Bednarek für



das Korrekturlesen meiner Arbeit und die moralische Unterstützung während meiner Dissertation.

Ein Dankeschön auch an all meine Labor-Kollegen: Darja Ivannikov, Carmen Seidl, Franziska Rönicke, Manuela Wallesch, Bianka Grosshäuser, Bettina Olshausen, Teresa Bentele, Vanessa Kappings, Eva Zittel, Etienne Amrhein, Christoph Grün, Ilona Wehl, Johannes Karcher, Rebekka Schneider, Alexander Braun, Konstantin Demir, Jan Weckauf und Aylin Emmez. Dankeschön, für die schöne Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung bei allen Fragen rund ums Labor und „live-Style“.

Recht herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Joachim Bentrop und Prof. Dr. Martin Bastmayer bedanken. Besonders Joachim Bentrop möchte ich danken für die schöne Zeit und die hilfreiche Unterstützung während der Arbeit am Institut für Zoologie und Neurologie. Es war ein sehr schöner Arbeitskreis, in dem ich mich wohl gefühlt habe und in dem ich sehr viel lernen durfte. Danke dafür.

Danke auch an die cynora GmbH für die OLEDs, die ich als Cu-Komplexe in meiner Arbeit verwendete. Ein Dankeschön an Dr. Thomas Baumann, Dr. Tobias Grab, Dr. Daniel Zink und Dr. Daniel Volz.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Christian Hackenberger, Dr. Heinz Möller, Dr. Stephan Hinderlich, Verena Böhrsch der Beuth Hochschule für Technik in Berlin für das Zustandekommen unseres ersten „Papers“ in der Angewandten Chemie. Es hat sehr viel Spaß gemacht mit euch zusammen zuarbeiten.

**Polyamines and peptoids to control oxidative stressed HeLa cells,**

J. E. Seltenreich, D. K. Kölmel, S. Bräse and U. Schepers, *Org. Biomol. Chem.*, **2012** (in Revision).

**In vivo bioorthogonal labeling of the glycocalyx using a luminescent, self-clickable copper complex in an intramolecular-catalyzed Click reaction,**

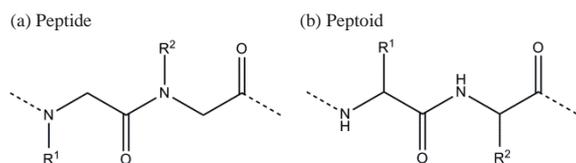
J. E. Seltenreich, M. Wallesch, D. Volz, D. Wagner, C. Bednarek, C. Grabher, T. Baumann, S. Bräse and U. Schepers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014** (in Arbeit).

**Cytotoxicity and NMR Studies of Platinum Complexes with Cyclooctadiene Ligands,**

M. Enders, B. Görling, A. B. Braun, J. E. Seltenreich, L. F. Reichenbach, K. Rissanen, M. Nieger, B. Luy, U. Schepers and S. Bräse, *Organometallics*, **2014** (in Arbeit).





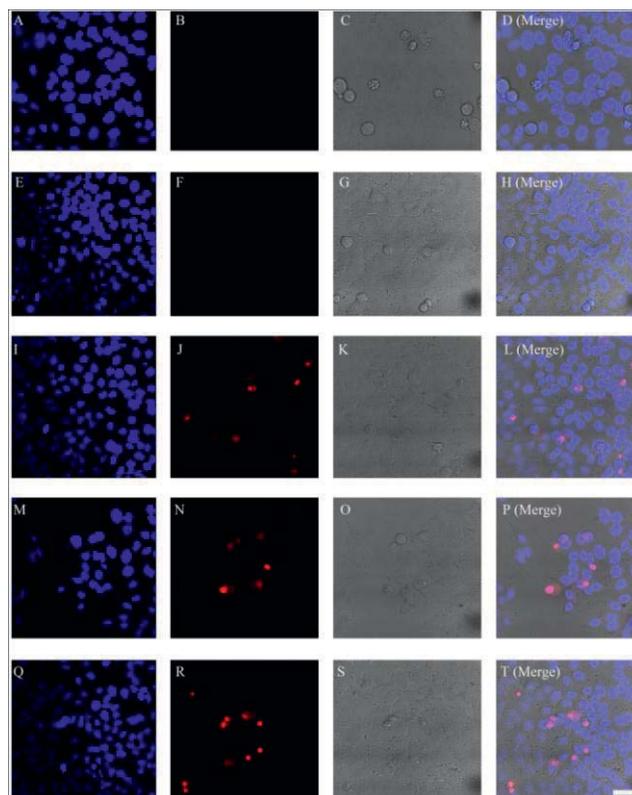


**Scheme 2** Peptide (a) compared to peptoid (b). As opposed to peptides, the side chains of peptoids are attached to the nitrogen instead of the carbon atom.

attached to the nitrogen instead of the carbon (Scheme 2).<sup>10</sup> These peptoids have been successfully used to mimic peptide hormones, antibiotics, and receptor ligands.<sup>9</sup>

Besides the studies about molecular transporters that already exist, the aim of this study was to depict the impact of both peptoid and polyamine conjugates on the production of reactive oxygen species (ROS). ROS can occur in organism owing to a variety of biological processes. They are specific built in the cells of innate immunity to perceive and eliminate pathogens. Thereby, ROS production is endogenously induced by inflammations, infections, hypertension, and diabetes.<sup>11, 12</sup> Besides, there are exogenous factors responsible for ROS formation (e.g. heavy metals, particulates, and mycotoxins). Here, it has become more and more important to know that ROS can manipulate signal transduction in the cells.<sup>13</sup> Thus, the regulation of gene expression (regulates the rate of apoptosis and proliferation) can be affect negatively. Especially, mitochondria are exposed by a rapid ROS production.<sup>14</sup> That's why the DNA of a mitochondrion can't repair anymore. Accordingly, decrease of energy resource causes a rapid ROS production, and ultimately cell death.<sup>15, 16</sup>

ROS are free radicals or very reactive non-radical compounds emerged from molecular oxygen via reduction of one electron.<sup>14</sup> Radicals of oxygen are generated in cells as a by-product of the respiratory chain. Main source of ROS is located in mitochondria.<sup>17</sup> Right there, oxygen is reduced to water. More and more very reactive and free radicals emerge by partial reduction. The majority of oxygen radicals are trapped by mitochondrial superoxide dismutase. The other part of the reactive radicals accomplishes the cytosol. Finally, ROS initiate a cascade of chain reaction, and determines an intense defect of cells. Nevertheless, ROS are not only detrimental metabolic products but also used for innate immunity to control the resistance of pathogens.<sup>18</sup> The main part of these oxygen radicals are scavenged by mitochondrial superoxide dismutase. Besides, ROS include hydrogen peroxide, superoxide anion, hydroxyl radicals, and hypochlorite anion interacting with biomolecules.<sup>19</sup> According to that, ROS can be established with the help of photodynamic therapy (PDT).<sup>4</sup> PDT represents a new approach to treat a variety of diseases that involves the activation of a photosensitive substance activated by light in the targeting tissue. The potential targets of PDT are plasma membrane, mitochondria, lysosomes, blood vessels, and nucleus tumour cells. Actually, this study enables to trial the effect of PDT on HeLa cells. Furthermore, the irradiation of target area leads to the initiation of a radical reaction and apoptosis that process is called PDT. PDT can be used to treat a variety of diseases, especially an increasing number of cancers. Accordingly, lipophilic porphyrins regularly improve the effect of PDT because they interact with



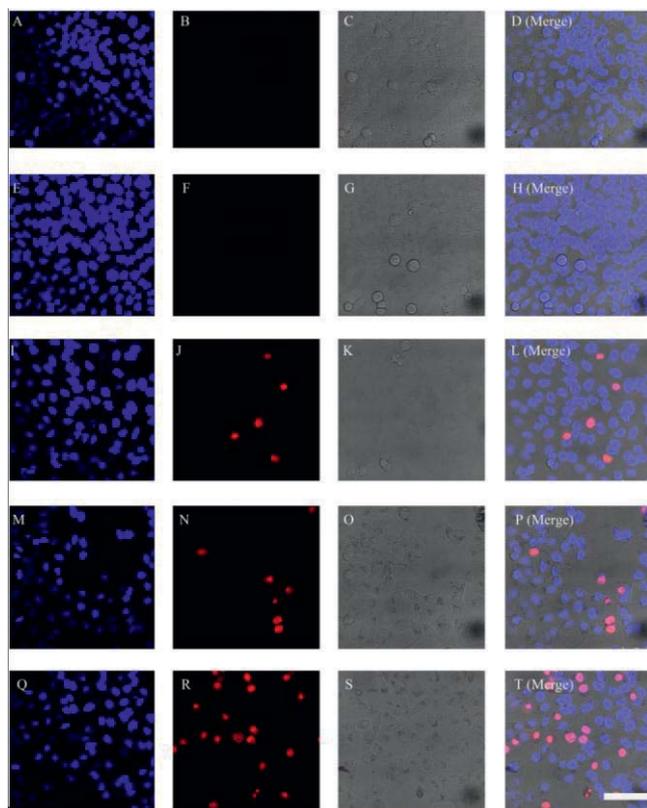
**Fig. 1** Fluorescence and confocal microscopy of cells after treatment with increasing concentrations of spermine-porphyrin. HeLa cells were incubated with spermine-porphyrin (1  $\mu$ M-10  $\mu$ M) for 15 h, washed and visualized under a confocal microscope. (A-D) Control cells. Scale bar 50  $\mu$ m. (E-H) Cells are incubated with 1  $\mu$ M spermine-porphyrin. (I-L) Cells are incubated with 2  $\mu$ M spermine-porphyrin. (M-P) Incubation with 5  $\mu$ M spermine-porphyrin. (Q-T) Visualize the incubation with 10  $\mu$ M spermine-porphyrin. The nucleus is stained with Hoechst 33342 (1  $\mu$ M, 20 min incubation at 37  $^{\circ}$ C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, first column from left). Second column from left, apoptotic cells are stained with propidium iodide (1  $\mu$ M, 20 min incubation at 37  $^{\circ}$ C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Third column from left, it is the bright field images of the cells. Fourth column from left, merge images.

hydrophobic chains of lipids in the cell membrane. However, targeting of the porphyrins to mitochondria can enhance the phototoxic effect of the cationic moieties.<sup>4, 20</sup>

For this reason, the aim of this study was to localize ROS in the cells *in vivo*, and to figure out how ROS production can be controlled. Besides, there are molecular transporters that quench ROS production. In this study, we have to focus on the shape of mitochondria both to produce ROS and to quench them spatiotemporal.

## Results and discussion

ROS are oxygen compounds with unpaired electrons as mentioned above deprived electrons from other molecules or atoms, and play a dual function. On the one hand, they can corrupt important macromolecules, for example, DNA, RNA, lipids or proteins. On the other hand they act as signalling molecules. ROS are generated in mitochondria in consequence of impaired mitochondrial trans-membrane potential. If they are not scavenged, they'll cause ageing, cell damages, and eventually cell death. We tested different kinds of transporters to check the

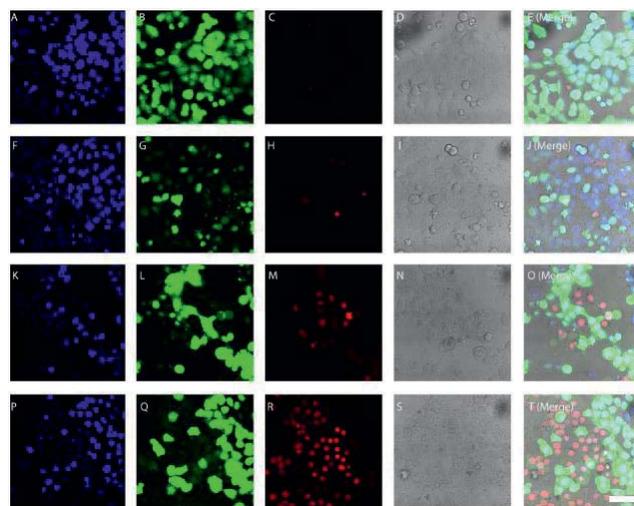


**Fig. 2** Fluorescence and confocal microscopy of cells after treatment with increasing concentrations of {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>. HeLa cells were incubated with {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> for 15 h, washed and visualized under a confocal microscope. (A-D) Control cells. Scale bar 50 μm. (E-H) Incubation with 1 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>. (I-L) Cells are incubated by 2 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>. (M-P) Incubation with 5 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>. (Q-T) Visualization of 10 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> treated cells. First column from left, the nucleus is stained with Hoechst 33342 (1 μM, 20 min incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Second column from left, apoptotic cells are stained with propidium iodide (1 μM, 10 min incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). Third column from left, the bright field images of the cells are visualized. Fourth column from left, merge images.

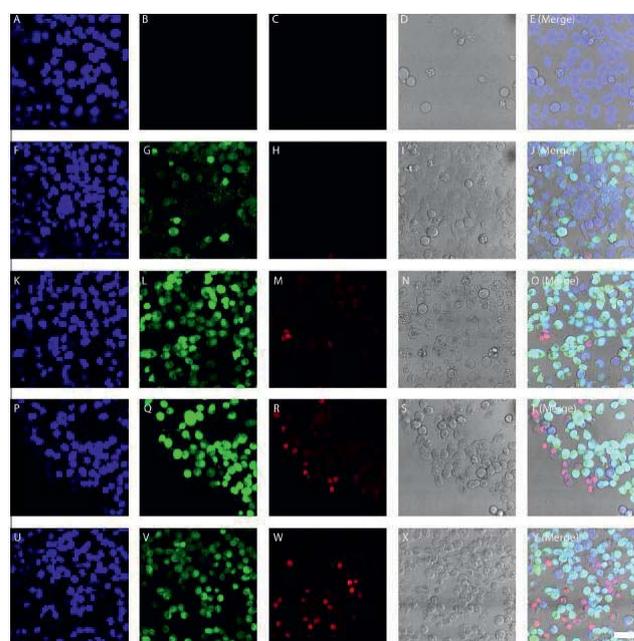
production of ROS in HeLa cells. Thereby, we can trigger the formation of ROS because transporters with a polyamine backbone (Fig. 1) or a peptoid backbone (Fig. 2) deliver into cells. To conclude, increasing concentration of molecular transporters causes an increasing damage of living cells because the transporters trigger the production of ROS. Finally, ROS initiate a cascade of radical reaction, damage the cell irreparably, and determine cell membrane destabilisation and ultimately cell death.

Proving ROS intracellular, HeLa cells are additionally treated with DCF-DA (2',7'-dichlorofluoresceine-diacetate). The application of DCF-DA facilitates the intracellular location of ROS. Increasing concentration of molecular transporters induces a growth in ROS production, and a decreasing of cell viability. Additionally, cells incubated with spermine-porphyrin (Fig. 3) depict more apoptotic cells opposed to {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> (Fig. 4). That's presumable the reason because spermine-porphyrin can be localized in mitochondria more easily.

As a result, more and more ROS are built because ROS initiate a cascade of chain reaction that deformed the shape of

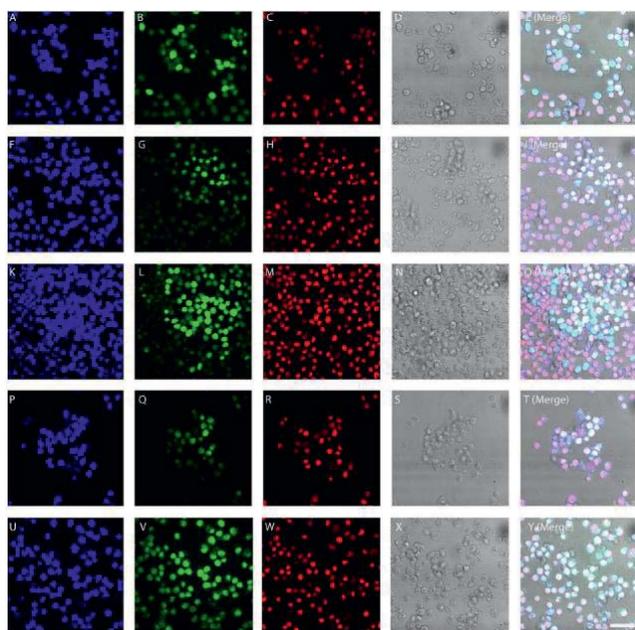


**Fig.3** Initiating of spermine-porphyrin as proof of ROS. HeLa cells are incubated with various dose of spermine-porphyrin for 24 h incubation time at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, washed and visualized via confocal microscopy. Second column from left, cells are additionally incubated with DCF-DA to visualize ROS inducing cells. (A-E) Incubation with 1 μM spermine-porphyrin. (F-J) Cells are incubated with 2 μM spermine-porphyrin. There are more and more cells where ROS were built (green fluorescence reveal ROS inducing cells). Besides, the shape of cell nuclei began gradually to deform. (K-O) 5 μM spermine-porphyrin incubated in HeLa cells. ROS inducing cells started to mortify (red fluorescence reveal apoptotic cells). (P-T) 10 μM spermine-porphyrin incubated into HeLa cells. Healthy cells are gradually substantial. ROS are built in most of the cells. First column from left, Hoechst 33342 staining of the cell nuclei. Fourth column from left, bright field images. Fifth column from left, merge images. Scale bar 50 μm.



**Fig. 4** With {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> incubated HeLa cells. Increasing concentrations of {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> cause more and more ROS in the cells. For that reason, the cells start ultimately cell death. (A-E) Control cells. Scale bar 50 μm. (F-J) 1 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>. Scattered ROS inducing cells are visualized. (K-O) 2 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>. More and more ROS are built by increasing concentration of the molecular transporter. (P-T) 5 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>. Plenty of cells are induced by ROS. (U-Y) 10 μM {Porph-Ahx}

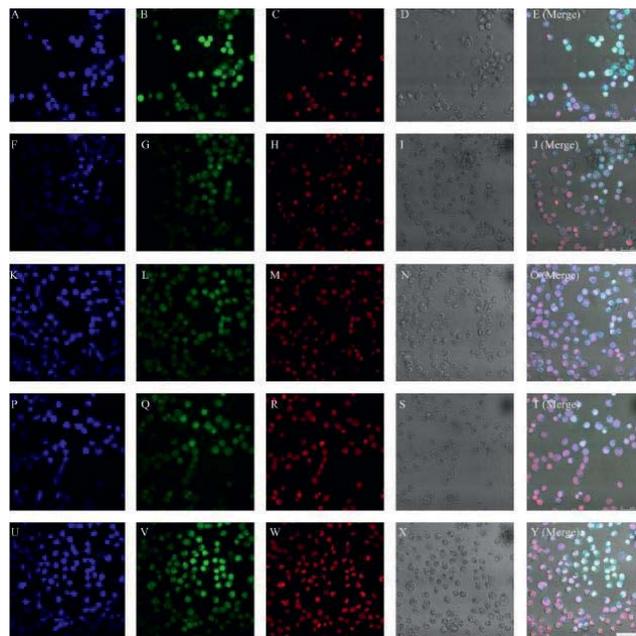
{Hex}<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>. ROS inducing cells started cell death. First column from left, Hoechst 33342 staining of cell nuclei. Second column from left, DCF-DA staining depicts ROS inducing cells. Third column from left, shows propidium iodide incubated cells. Red fluorescence visualize apoptotic cells. Fourth column from left, bright field images. Fifth column from left merge images.



**Fig. 5 Apoptosis because of incubation of spermine-porphyrin after 48 h.** Most of the cells are apoptotic. (A-E) 1  $\mu$ M spermine-porphyrin. Even such a small amount of molecular transporter causes more oxidative stressed cells, and apoptosis due to 24 h incubation with spermine-porphyrin. (A-E) 1  $\mu$ M spermine-porphyrin. (F-J) 2  $\mu$ M spermine-porphyrin. Most of the cells are death. (K-O) 5  $\mu$ M spermine-porphyrin. (P-T) 10  $\mu$ M spermine-porphyrin. (U-Y) 20  $\mu$ M spermine-porphyrin. Even the cell density decreased after treatment for so a long incubation time (48 h). First column from left, Hoechst 33342 staining of cells nuclei. Second column from left, DCF-DA staining of ROS inducing cells. Third column from left, propidium iodide staining of apoptotic cells. Fourth column from left, bright field images. Fifth column from left, merge images. Scale bar 50  $\mu$ m.

mitochondria.<sup>21</sup> So the cells are exhausted and start membrane blebbing, and cell death, apoptosis. We continued the study through elongation of incubation time of the molecular transporters. Thereby, most cells are apoptotic. Also the control cells show both ROS inducing cells and apoptotic cells (Fig. 5 and Fig. 6). The visualization of intracellular ROS is impeded by such a long incubation time of the molecular transporters. In according to that, cells are intense oxidative stressed by increasing concentration, and increasing incubation time of molecular transporters that the cells are irreparable damaged.

Spermine-porphyrin in protonated form is a carboxyporphyrin coupled polyamine with high solubility in polar alcohols (e.g. methanol or ethanol), polar solvents (e.g. DMF or DMSO), and even in water. Besides, the polyamine moiety is separated from porphyrin by C6-spacer enables the separation of the hydrophobic and the hydrophilic moieties of the molecule. In addition to applying PDT, spermine-porphyrin has to transport into mitochondria inducing a higher phototoxic effect, and apoptosis instead of necrosis. Seeing that spermine-porphyrin penetrates the membrane potential and accumulates in mitochondria because of its amphiphilic character. Moreover, spermine-porphyrin displays a minor toxicity against healthy tissues.



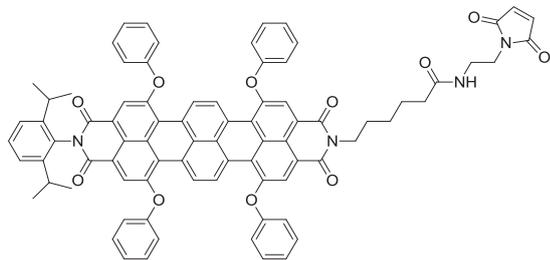
**Fig. 6 Formation of ROS and apoptosis after 48 h incubation with {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>.** Most of the cells are so oxidative stressed that the cell death is in progress. (A-E) 1  $\mu$ M {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>. Even a small amount of molecular transporter causes augmented producing ROS. (F-J) 2  $\mu$ M {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>. ROS cells are visualized. (K-O) 5  $\mu$ M {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>. Most of the {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>-inducing cells are apoptotic. (P-T) 10  $\mu$ M {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>. Increasing concentration of molecular transporter depicts no distinction because most of the cells are apoptotic. (U-Y) 20  $\mu$ M {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>. First column from left, Hoechst 33342 staining of cells nuclei. Second column from left, DCF-DA staining of ROS inducing cells. Third column from left, propidium iodide staining of apoptotic cells. Fourth column from left, bright field images. Fifth column from left, merge images. Scale bar 50  $\mu$ m.

Consequently, the cells are incubated with above-mentioned molecular transporters. We have to observe the intake into cells of these conjugates, and have to notice the position of their accumulation in the cells.

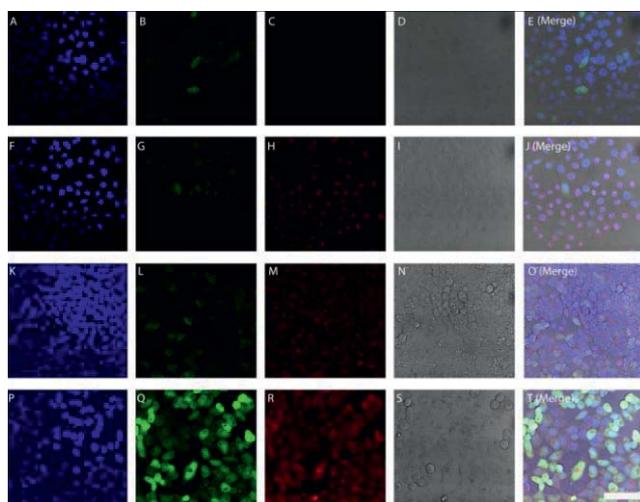
We noticed above that PDT is an important application in the treatment of an increasing number of diseases (e.g. a variety of cancer treatment). Photosensitizers are applied to initiate ROS intracellular. So the porphyrin is excited by light of a certain wavelength, and converted from triplet- into singlet oxygen. Incidentally, we know that singlet oxygen is highly reactive reacting with unsaturated biomolecules, such as DNA, RNA, aromatic amino acids, and especially fatty acids. Delivering ROS into the right cellular compartments, apoptosis can specifically induced cell death, apoptosis. In this case, highly lipophilic porphyrins are coupled to the polyamine or the peptoid penetrating deeply into the membrane in order to generate cytotoxic singlet oxygen that causes membrane destabilisation. Besides the knowledge about these molecular transporters, and the effect of PDT, it is important to initiate a transporter to quench ROS intracellular. The deactivation can be achieved by terylene diimide (Scheme 3). Terylene diimide applied scavenging ROS (Fig. 7) because the molecule is able to quench singlet oxygen and transform it into the less detrimental triplet oxygen.<sup>22</sup>

## Conclusions

In conclusion, both spermine porphyrin-conjugate and peptoid conjugated with carboxyporphyrin {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> can trigger the formation of ROS.

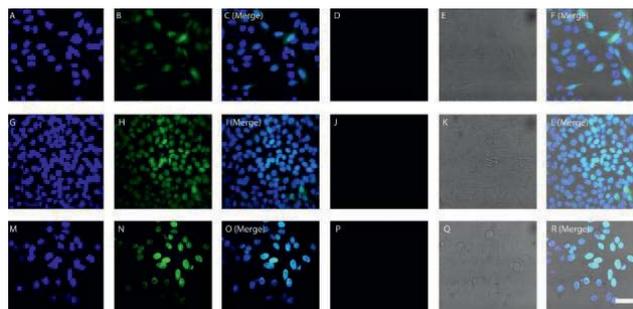


**Scheme 3** Radical scavenger terylene diimide, also called spermine-TDI, published by Dr. Frank Hahn, and kindly provided by the group of Prof. Dr. K. Müllen. The scavenger molecule is able to quench singlet oxygen and convert it into the less toxic triplet oxygen.

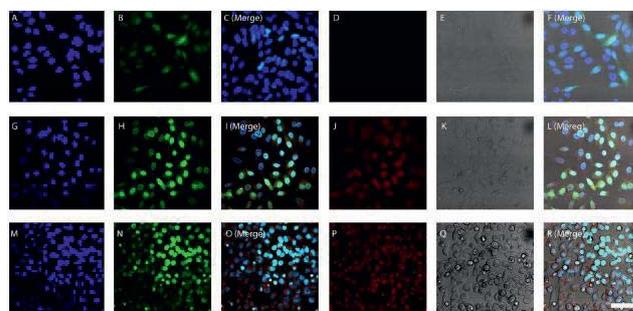


**Fig. 7** Localization of spermine-TDI (third column from left). HeLa cells were treated by increasing concentrations of {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>. Uptakes are shown after incubation with Hoechst 33342 (first column from left), and DCF-DA (second column from left) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and irradiation with visible light (10 min). (A-E) 1 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> and 10 μM spermine-TDI; red vesicles located to the nucleus are barely visible. (F-J) 2 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> and 10 μM spermine-TDI; more and more oxidative stressed cells are apparent. Besides, bold staining of spermine-TDI is perinuclear located. (K-O) 5 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> and 10 μM spermine-TDI; due to cells without treatment with spermine-TDI, just a few apoptotic cells are visible. Nevertheless, production of ROS increased. (P-T) 10 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> and 10 μM spermine-TDI; more and more ROS and apoptotic cells are observed. Thereby, ROS treated cells are conspicuously less than without spermine-TDI because spermine-TDI is able to quench ROS. Fourth column from left, bright field images. Fifth column from left, merge images. Scale bar 50 μm.

The radical scavenger, spermine-TDI, is able to quench the production of ROS intracellular. Besides, few ROS are generated, and accordingly few apoptotic cells are visualized due to cells without treatment with spermine-TDI. That's the first result via live cell imaging processes. According to that, spermine-TDI represses apoptosis. Nevertheless, apoptotic cells appear but they have lower concentrations. Finally, spermine-TDI can be visualized, and located perinuclear (see red dots around the cell nuclei in Fig. 7). Those vesicles are both from spermine-TDI and from {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>.



**Fig. 8** ROS-generated spermine-porphyrin and ROS quencher spermine-TDI. HeLa cells after 24 h treatment with spermine-porphyrin and with or without spermine-TDI. Uptakes are visualized after incubation with Hoechst 33342 (first column from left), and DCF-DA (second column from left). (A-F) Control cells. (G-L) 10 μM spermine-porphyrin and 10 μM spermine-TDI; no apoptotic cells are visible. (M-R) 10 μM spermine-porphyrin without incubation with spermine-TDI; the green fluorescence marked by ROS-generated cells increases. The more ROS are built, the stronger staining appears. Third and sixth columns from left, merge images. Fourth column from left, cells are additionally incubated by propidium iodide (indistinguishable). Scale bar 50 μm.



**Fig. 9** Localization of spermine-TDI and {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>. HeLa cells after 24 h treatment with {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> and with or without spermine-TDI. (A-F) Control cells. (G-L) 10 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> and 10 μM spermine-TDI. Transporters are located perinuclear. (M-R) 10 μM {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> without spermine-TDI. Exclusively no apoptotic cells are visualized. In addition to that, more and more oxidative cells are noticed. Uptakes are additionally incubated by Hoechst 33342 (first column from left) and by DCF-DA (second column from left). By the medium of {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub>, an increasing concentration of ROS are built localized perinuclear. Third and sixth columns from left, merge images. Fourth column from left, cells are additionally incubated with propidium iodide. Fifth column from left, bright field images. Scale bar 50 μm.

Spermine-porphyrin has an anti-apoptotic effect on cells *in vivo*. Moreover, production of ROS can be triggered by ROS generated molecules, such as {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> and spermine-porphyrin. According to that, singlet oxygen is increasingly built. This single oxygen can be scavenged by spermine-TDI because the radical scavenger, spermine-TDI, adjudges in the same cell organelles. Consequently, staining with DCF-DA depicts a reduced production of ROS. In contrast to that, increasing concentrations of {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> and spermine-porphyrin cause indeed ROS but no cell death (Fig. 8 and 9).

## Experimental section

### Confocal microscopy

To study the uptake, HeLa cells were plated (density of 1 x 10<sup>4</sup>) on ibidi 8 well chamber slides (M-Slide 8 well ibiTreat,

Martinsried, Germany) for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and treated with spermine-porphyrin or {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> (1 μM-10 μM) for other 24 h (48 h). The slides were prepared with different kind of organelle markers. In this study, the mitochondria, lysosomes, and cell nuclei were stained. The cells were prepared with Mitotracker<sup>®</sup> green LM (0,5 μM, 15 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere) to stain the mitochondria, with Lysosensor green DND-153 (1 μM, 1 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere) to stain the lysosomes, and with Hoechst 33342 (bisbenzimidazole) (1 μM, 20 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere) and propidium iodide (1 μM, 20 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere) to stain the nuclei. All markers are from Gibco<sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe). Finally, the cells were washed three times in PBS (-/-) and DMEM (10% FCS, 1%P/S, 1% Myco-3). The cells were analysed using a Leica SP5 (DMI6000) confocal laser scanning system on an inverse microscope, and using a Leica SP5 tandem (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany); objectives: HCX PL APO CS 63.0x1.20 WATER UV, HCX PL APO lambda blue 20.0x0.70 IMM UV. Green fluorescence was excited with 488 nm line Argon-Ion laser, and with 561 nm line DPSS laser. Blue fluorescence was excited with 351 nm UV. Red fluorescence was excited with 365 nm UV. All fluorescence were detected with emission band pass filters 417-468 nm, 499-552 nm, and 593-696 nm. The images were analyzed by using Leica Application Suite (LAS AF, 2.2.1 build 4842) software and processed for publication by using Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

### Cell lines

The HeLa cells (human cervix carcinoma cells) were cultured in DMEM (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The medium contains 10% fetal calf serum (FCS) supplemented with antibiotics Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 μg/mL (P/S), and 1% Myco-3. Before treatment with the molecular transporters, the cells were washed twice in PBS, trypsinized, resuspended in PBS.

### ROS measurement

ROS levels were determined after incubation with spermine-porphyrin or {Porph-Ahx}-{Hex}<sub>6A</sub>NH<sub>2</sub> incubating the cells in DMEM (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Karlsruhe, Germany; 10% FCS, 1%P/S, 1% Myco-3) for 24 h at 37 °C with 1 μM of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester H<sub>2</sub>DCF-DA (mixed isomers, molecular probes, Gibco<sup>®</sup> Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for 15 min. H<sub>2</sub>DCF-DA was metabolized by non-specific esterases to the non-fluorescent product, which was oxidized to the fluorescent product, DCF, by ROS. Then, the cells were washed three times in PBS (-/-) and moistened in DMEM. Immediately after that, the cells were treated with visible light (dependent on test series). Thereafter, the ROS incubated cells can be measured by confocal microscopy via Live Cell Imaging processes.

### Notes and references

1. Drin, G.; Cottin, S.; Blanc, E.; Rees, A. R.; Tamsamani, J., Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* **2003**, 278, (33), 31192-201.

2. Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D., Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* **2004**, 377, (Pt 1), 159-69.
3. Green, M.; Loewenstein, P. M., Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **1988**, 55, (6), 1179-88.
4. Hahn, F.; Schmitz, K.; Balaban, T. S.; Brase, S.; Schepers, U., Conjugation of spermine facilitates cellular uptake and enhances antitumor and antibiotic properties of highly lipophilic porphyrins. *ChemMedChem* **2008**, 3, (8), 1185-8.
5. Hahn, F.; Schepers, U., Versatile procedure for asymmetric and orthogonal protection of symmetric polyamines and its advantages for solid phase synthesis. *J Comb Chem* **2008**, 10, (2), 267-73.
6. Schroder, T.; Niemeier, N.; Afonin, S.; Ulrich, A. S.; Krug, H. F.; Brase, S., Peptidic amino- and guanidinium-carrier systems: targeted drug delivery into the cell cytosol or the nucleus. *J Med Chem* **2008**, 51, (3), 376-9.
7. Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E., Peptoid oligomers with alpha-chiral, aromatic side chains: effects of chain length on secondary structure. *J Am Chem Soc* **2001**, 123, (13), 2958-63.
8. Wu, C. W.; Kirshenbaum, K.; Sanborn, T. J.; Patch, J. A.; Huang, K.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E., Structural and spectroscopic studies of peptoid oligomers with alpha-chiral aliphatic side chains. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, (44), 13525-30.
9. Schroder, T.; Schmitz, K.; Niemeier, N.; Balaban, T. S.; Krug, H. F.; Schepers, U.; Brase, S., Solid-phase synthesis, bioconjugation, and toxicology of novel cationic oligopeptoids for cellular drug delivery. *Bioconjug Chem* **2007**, 18, (2), 342-54.
10. Zuckermann, R. N.; Kodadek, T., Peptoids as potential therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* **2009**, 11, (3), 299-307.
11. Duchon, M. R., Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* **2004**, 25, (4), 365-451.
12. Wallace, D. C., Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci Am* **1997**, 277, (2), 40-7.
13. Lin, M. T.; Beal, M. F., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **2006**, 443, (7113), 787-95.
14. Indo, H. P.; Davidson, M.; Yen, H. C.; Suenaga, S.; Tomita, K.; Nishii, T.; Higuchi, M.; Koga, Y.; Ozawa, T.; Majima, H. J., Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* **2007**, 7, (1-2), 106-18.
15. Kujoth, G. C.; Hiona, A.; Pugh, T. D.; Someya, S.; Panzer, K.; Wohlgemuth, S. E.; Hofer, T.; Seo, A. Y.; Sullivan, R.; Jobling, W. A.; Morrow, J. D.; Van Remmen, H.; Sedivy, J. M.; Yamasoba, T.; Tanokura, M.; Weindruch, R.; Leeuwenburgh, C.; Prolla, T. A., Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **2005**, 309, (5733), 481-4.
16. Norberg, E.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B., Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* **396**, (1), 95-100.
17. Birtalan, E., *Chemische Biologie von Molekularen Transportern auf Peptoid-Basis*. Logos Verlag Berlin ed.; Stefan Bräse: Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2009.
18. Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T., Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* **2005**, 120, (4), 483-495.

- 
19. Hosaka, S.; Obuki, M.; Nakajima, J.; Suzuki, M., Comparative study of antioxidants as quenchers or scavengers of reactive oxygen species based on quenching of MCLA-dependent chemiluminescence. *Luminescence* **2005**, 20, (6), 419-27.
- 5 20. Filip, A. G.; Clichici, S.; Daicoviciu, D.; Ion, R. M.; Tatomir, C.; Rogoan, L.; Opris, I.; Mocan, T.; Olteanu, D.; Muresan, A., Possible in vivo mechanisms involved in photodynamic therapy using tetrapyrrolic macrocycles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44, 53-61.
- 10 21. Aslan, J. E.; Thomas, G., Death by committee: organellar trafficking and communication in apoptosis. *Traffic* **2009**, 10, (10), 1390-404.
22. Hahn, F. Development of Methods for Solid Phase Synthesis of Polyamine Conjugates and Initial Biological Evaluation of Their Potential to Enhance Cellular Uptake. Dissertationsarbeit, Friedrich-Wilhelm-  
15 Universität, Bonn, 2008.
23. LeBel, C. P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S. C., Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **1992**, 5, (2), 227-31.





## Angewandte Chemie

### In vivo bioorthogonal labeling using a luminescent, self-clickable copper complex in an intramolecular-catalyzed Click reaction

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	201402105
<b>Article Type:</b>	Communication
<b>Corresponding Author:</b>	Ute Schepers Karlsruher Institut für Technologie KIT Karlsruhe, GERMANY
<b>Corresponding Author E-Mail:</b>	ute.schepers@kit.edu
<b>Other Authors:</b>	Judith Esther Seltenreich, Dipl. Chem. Manuela Wallesch, Dipl. Chem. Daniel Volz, Dipl. Chem. Danny Wagner Christin Bednarek, Dr. rer. nat. Clemens Grabher, Dr. rer. nat. Thomas Baumann, Dr. rer. nat. Stefan Bräse, Prof. Dr.
<b>Keywords:</b>	Intramolecular-catalyzed bioorthogonal Click reaction luminescent, self-clickable Cu(I)-complex CuAAC
<b>Manuscript Classifications:</b>	Alkynes; Azides; Biological activity; Click chemistry; Cycloaddition
<b>Suggested Reviewers:</b>	
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Abstract:</b>	Luminescent, self-clickable copper complexes exhibit highly favorable photophysical properties as emitter materials in organic light emitting diodes. Although these excellent photophysical properties are tunable these complexes have yet not been used in biological labeling reactions. Due to the complexed Cu(I) they are biocompatible and undergo fast, intramolecular-catalyzed bioorthogonal Click reactions (CuAAC) in biological systems allowing for site-specific labelling with a concentration of only 20 $\mu$ M copper complex. Here, the intramolecular-catalyzed bioorthogonal CuAAC is employed for imaging of cells and developing zebrafish.
<b>Author Comments:</b>	Dear Dr. Göltz,  enclosed you will find our manuscript "In vivo bioorthogonal labeling using a luminescent, self-clickable copper complex in an intramolecular-catalyzed Click reaction" by Seltenreich et al. The manuscript describes for the first time the application of self-clickable fluorescent Cu-complexes from in a biocompatible copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC). Here the copper is already tightly bound within the complex, making the reaction biocompatible even in living zebrafish without titrating the amount of copper as recently described in the Angewandte Chemie. Further, we describe for the first time the use of an emitter material from OLEDs as a fluorophore with excellent photophysical properties in live fish. This study can open the field of novel fluorophores, which can be nicely tuned in their colors, in living Systems. We hope that could consider our manuscript for publication  Best regards Ute Schepers
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation



Dedication	
Submitted solely to this journal?	Yes
Has there been a previous version?	No
If accepted, the corresponding author(s) and co-author(s) have the option of making their article open access through our OnlineOpen service. Please indicate here if you are likely to publish your article in an open-access format.	No / Don't know

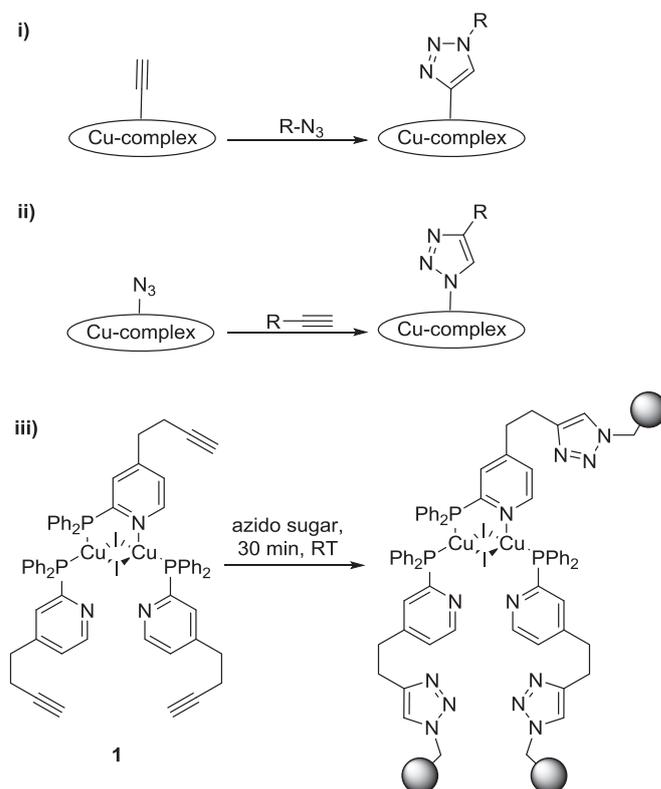
# In vivo labeling of the glycocalyx with a luminescent self-clickable copper complex via intramolecular-catalyzed, bioorthogonal Click reaction

Judith Esther Seltenreich, Manuela Wallesch, Daniel Volz, Danny Wagner, Christin Bednarek, Clemens Grabher, Thomas Baumann\*, Stefan Bräse\* and Ute Schepers\*

**Abstract:** Luminescent, self-clickable copper complexes exhibit highly favorable photophysical properties as emitter materials in organic light emitting diodes (OLEDs). Although these excellent photophysical properties are tunable these complexes have yet not been used in biological labeling reactions. Due to the complexed Cu(I) they are biocompatible and undergo fast, intramolecular-catalyzed, bioorthogonal Click reactions (CuAAC) in biological systems allowing for site-specific labeling with a concentration of only 20  $\mu\text{M}$  copper complex. Here, the intramolecular-catalyzed bioorthogonal CuAAC is employed for imaging of cells and developing zebrafish.

Luminescence labeling is a widely used tool to study fundamental processes in life sciences, such as high spatial resolution imaging of protein-protein interactions in living cells using Förster resonance energy-transfer (FRET)<sup>[1]</sup>, platelet-derived growth factor (PDGF)<sup>[2]</sup> and highly sensitive clinical diagnostics, e.g. total prostate specific antigen detection<sup>[3]</sup> or cell labeling and deep tissue imaging<sup>[4]</sup>. Therefore the labeling technique has to subject following conditions: The reaction has to be fast, specific and bioorthogonal to enable efficient bioconjugation and subsequent investigation by optical imaging techniques. Furthermore it is desirable to deploy luminescent dyes which exhibit high photoluminescent quantum yields to ensure good detectability, enable for discriminating excitation and emission light and are sufficiently stable under relevant conditions. Common luminescent dyes are organic dyes, quantum dots and transition metal complexes.<sup>[5]</sup> Click chemistry perfectly matches the mentioned limiters for the labeling reaction: Especially the cycloaddition of alkynes and azides have been widely used for bioconjugation.<sup>[6]</sup> Both reactive groups are stable in aqueous media as well as in biological environments and can be selectively functionalized. Consequently, alkynes and azides have

been incorporated into a broad range of target structures.<sup>[7]</sup> To obtain a satisfying reaction rate the Click reaction of alkynes and azides can either be catalyzed by copper(I) ions or strain-promoted in case of cyclooctynes (SPAAC). One drawback for an *in vivo* application of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)<sup>[6e, 8]</sup> is the toxicity of the reactive oxygen species generated by Cu(I).<sup>[9]</sup> However, CuAAC usually features higher reaction rates<sup>[10]</sup> - one key parameter for the labeling performance - thus motivating various research partners to overcome the toxicity problems. DNA-<sup>[11]</sup> and viral-alkyne<sup>[12]</sup> conjugates have been labeled with azidofluorescein<sup>[13]</sup> by use of Cu(I) catalysis.<sup>[14]</sup> Because of the aforementioned toxicity, CuAAC<sup>[15]</sup> has rarely been applied in living organisms like zebrafish embryos.<sup>[16]</sup>



**Scheme 1. Self-labeling Cu(I)-complexes.** Reaction of i) an alkyne-substituted Cu(I)-complexes with an azide or ii) vice versa is a feasible approach for functionalization. iii) A homoleptic, butynyl-substituted PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** was used as a luminescent, self-labeling fluorophore to label cells and zebrafish *in vivo*.

[\*] PD Dr. U. Schepers, J. E. Seltenreich, C. Grabher, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute of Toxicology and Genetics (ITG), Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany, E-Mail: [ute.schepers@kit.edu](mailto:ute.schepers@kit.edu)

Prof. Dr. S. Bräse, D. Volz, M. Wallesch, C. Bednarek, D. Wagner, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute of Organic Chemistry (IOC), Fritz-Haber-Weg 6, 76131 Karlsruhe, Germany, E-Mail: [stefan.braese@kit.edu](mailto:stefan.braese@kit.edu)

Dr. T. Baumann, D. Volz, cynora GmbH, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany, E-Mail: [baumann@cynora.com](mailto:baumann@cynora.com)

[\*\*] ((Acknowledgements))

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

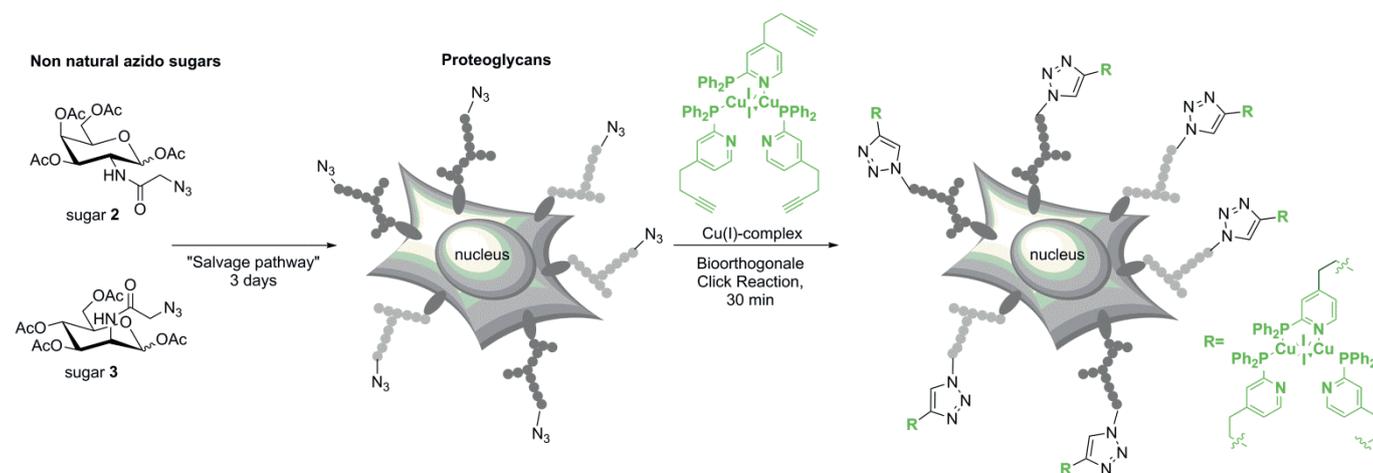


Herein we introduce a new strategy to overcome the shortcomings of the luminescence labeling via CuAAC and extend its possible field of application in biological systems by combining

the catalytic properties of Cu(I) with the desirable photophysical properties of a highly luminescent, alkyne-substituted copper-complex. Such complexes are able to link themselves to arbitrary molecules featuring azide moieties, thus allowing for subsequent investigation of their bright luminescence by fluorescent microscopy techniques. This reaction principle has been developed by our group and so far has been used to functionalize complexes with benzyl azide or azido-polymers to immobilize the luminescent self-clickable Cu(I)-complexes. We used this as an efficient crosslinking method in solution-processed organic light-emitting diodes.<sup>[17]</sup> This approach has also been used to functionalize non-luminescent azido-carbene CuCl-complexes with propargyl alcohol.<sup>[18]</sup> This variant of the CuAAC has three major advantages besides the luminescent copper complex, there are no additional reactants needed, minimizing any problems with biocompatibility of solvents and fluorescent labels. Further, the overall concentration of Cu(I) for the intramolecular-catalyzed, bioorthogonal CuAAC can be efficiently reduced *in vivo*, as the effective concentration of Cu(I) ions is only present at the reaction site and free Cu(I) ions are not released into the cells similar to the chelation-assisted CuAAC.<sup>[19]</sup> Additionally, Cu(I) is coordinated by the surrounding ligands, when employing the ready-made, luminescent, self-clickable Cu(I)-complexes in biological systems. Hence, fast reaction dynamics can be observed even if the overall concentration of Cu(I) is comparably low, due to the presumable intramolecular character of the reaction and a suppressed release of the Cu(I) from the complex.

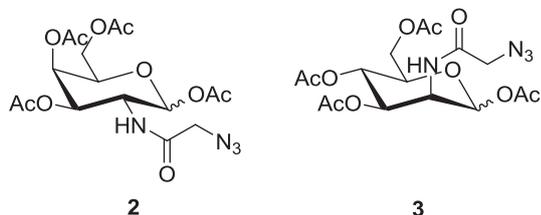
As today time lapse *in vivo* imaging of detailed cell structures or fast moving cellular objects often requires more elaborated microscopic and imaging techniques, there is a huge interest in fluorophores with huge quantum yields and low sensitivity upon photobleaching. To resemble such excellent luminescent and fluorescent properties we synthesized a highly luminescent, homoleptic PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** (Scheme 1).<sup>[20]</sup> Cu(I)-complex with PyrPHOS-ligands have not yet been employed in biological systems. The synthesis, spectroscopic features and photophysical properties are described in detail in Supporting Information. The basic structure of PyrPHOS-type complexes features a butterfly-shaped  $\text{Cu}_2\text{X}_2$ -core and three *N,P*-ligands coordinating in a bridging and monodentate manner. PyrPHOS-ligands can easily be modified and the corresponding complexes are synthesized in a one step process. By changing the LUMO-level of

the *N,P*-ligands, the luminescence color has been shifted from deep blue to red.<sup>[21]</sup> The PyrPHOS-example used herein has a broad emission band centered around 550 nm and shows particular favorable properties. Due to the thermally-activated delayed fluorescence mechanism,<sup>[21b, 22]</sup> PyrPHOS-Cu(I)-complexes **1** show neither oxygen, nor self-quenching unlike phosphorescent heavy metal complexes. The photoluminescence quantum yield is high ( $\Phi_{\text{PL}} = 0.66$ ), which enabled us to use a comparable low concentration of 20  $\mu\text{M}$  and less. Because of the M(L+X)CT-type emission, the Stokes shift is as large as 180 nm, allowing for easy discrimination of excitation and emission light.<sup>[17]</sup> To test the ability of the intramolecular-catalyzed, bioorthogonal CuAAC for *in vivo* luminescent labeling, we extended this method towards imaging of glycan structures in cells and developing zebrafish (Scheme 2). The zebrafish is well suited for imaging to the transparency of the embryos as already previously described for the imaging of mucin-type *O*-glycans, fucosylated glycans and the sialome by using the strain-promoted 1,3-dipolar cycloaddition (SPAAC).<sup>[23]</sup> All cells in vertebrates are decorated with glycoproteins and glycolipids that collectively comprise the glycocalyx.<sup>[24]</sup> Based on the large diversity of glycostructures the glycocalyx is involved in various cellular processes. It promotes the interplay with a lot of interaction partners such as growth factors, proteins, pathogens, drugs, small molecules, morphogens and even whole cells and has been shown to be very important in development, as the disruption of the *de novo* biosynthesis of various glycostructures causes embryonic lethality in mice.<sup>[25]</sup> Additionally, the glycocalyx enables and controls tissue formation from individual cell types during development and has therefore been subject to numerous studies, confirming that they are ultimately responsible for protein-targeting as well as cell-cell interactions. Although SPAAC has been proven to be a helpful tool for probing glycostructures in imaging approaches within living systems, there is still a great demand for fluorophores with the above described properties that comprise better reaction kinetics than the cyclooctynes. For many *in vivo* applications such as studying the role of saccharides in zebrafish development, rapid reaction kinetics are essential to enable the imaging of processes that occur on a fast time scale.



**Scheme 2. Intramolecular-catalyzed, bioorthogonal CuAAC to label cell surface glycostructures.** Scheme for visualizing cell surface glycans in cells and zebrafish embryos. Cells and zebrafish embryos are incubated in media/ water containing  $\text{Ac}_4\text{GalNAz}$  **2** or  $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  **3**, which provides metabolic labeling of cell surface glycostructures after cellular uptake, deacetylation, activation by UDP and incorporation in the nascent glycostructures. Eventually, the azido sugar residues facing the extracellular side of the plasma membrane are reacted with PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** in an intramolecular-catalyzed, bioorthogonal CuAAC providing a luminescent and fluorescent labeling of the glycostructures.

Consequently, methodologists for improving the bioorthogonal 1,3-dipolar cycloaddition increasingly focus on kinetic optimization. As azide-counterparts for our bioorthogonal labeling approach, we applied non-natural peracetylated *N*-azidogalactosamine (Ac<sub>4</sub>GalNAz, **2**) and peracetylated *N*-azidomannosamine (Ac<sub>4</sub>ManNAz, **3**) (Figure 1), which react with the alkyne appendages of the PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** (Scheme 2).



**Figure 1. Non-natural azido sugars.** Two non-natural monosaccharides were used as bioorthogonal reaction partners in this work: peracetylated *N*-azidogalactosamine, (Ac<sub>4</sub>GalNAz, **2**) as well as peracetylated *N*-azidomannosamine (Ac<sub>4</sub>ManNAz, **3**).

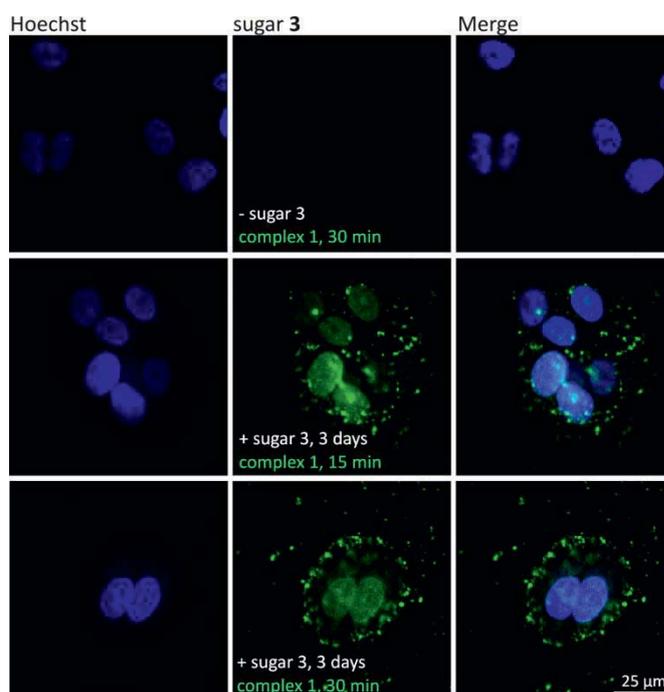
10<sup>4</sup> HeLa cells were treated with either 80 μM peracetylated *N*-azidogalactosamine (Ac<sub>4</sub>GalNAz, **2**) or peracetylated *N*-azidomannosamine (Ac<sub>4</sub>ManNAz, **3**), which metabolically label cell-surface glycoproteins with GalNAz residues and intracellular proteins with GlcNAz residues or cell-surface glycoproteins with ManNAz residues and sialic acids, respectively.<sup>[23c, 26]</sup> After conversion of the azido sugars the UDP-activated form, they were incorporated into the glycans of the glycocalyx. At the cell surface, the sugars were visualized by reactions with 20 μM of PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** for 15-30 minutes as indicated in the scheme 2.

Upon excitation with UV light, the emission of the luminescent complex **1** was monitored by fluorescence confocal microscopy. The luminescence could be detected over the whole time span of the experiment, providing evidence that the almost no photobleaching occurred. In absence of azido sugars no luminescence was detected, showing no cellular internalization of the PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** itself. This emphasized that the observed luminescence was indeed the result of covalent binding and no random precipitation. Interestingly, a punctate staining of the plasma membrane especially at cellular contact sides was detected, giving rise to a clustering and potential crosslinking between two to three azido sugars presented at the cell surface due to the three alkynes present in the PyrPHOS-Cu(I)-complex **1**. Likewise, small cell colonies were encapsulated by PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** making this complex an attracting candidate for future applications in encapsulation technologies (Figures 2 and 3).

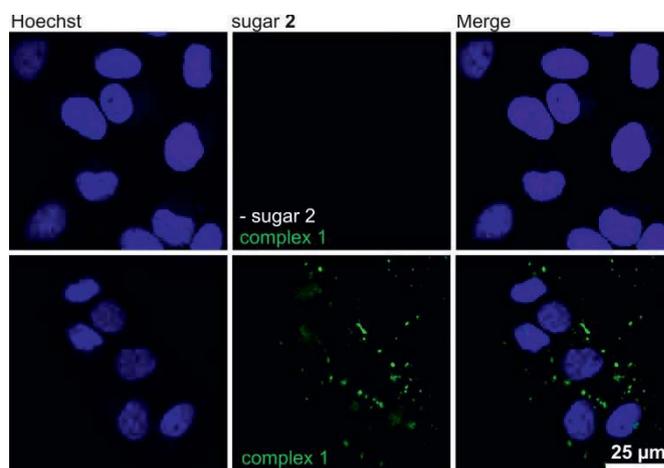
Apart from HeLa cells, we applied our labeling-approach in zebrafish. To label glycans in zebrafish up to 120 hpf (hours post fertilization), we incubated the embryos in 80 μM Ac<sub>4</sub>ManNAz in zebrafish water 24 hpf (Figures 2 and 3). At several stages of development, we added 20 μM of the PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** to the zebrafish water and imaged the embryos by confocal microscopy.

We observed a robust luminescence in the developing retina of the embryos from 48 hpf - 120 hpf (Figures 4 and 5) after treatment for 15 minutes and a weaker signal in the gastrointestinal tract. Importantly, we observed no background fluorescence in embryos incubated in absence of Ac<sub>4</sub>ManNAz, indicating that the observed PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** signal is specific to the intramolecular-catalyzed, bioorthogonal Click reaction with the azido sugar and

PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** treatment did not result in any toxicity or developmental abnormalities in the treated embryos (Figure 4).



**Figure 2. Intramolecular-catalyzed, bioorthogonal CuAAC in HeLa cells.** 10<sup>4</sup> HeLa cells were incubated with **3** (80 μM, at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). After three days, the cells were injected with **1** (20 μM, for 15 and 30 minutes) to label the incorporated azido sugars anchored in the glycocalyx. Fluorescence labeling was analyzed by a confocal microscope. First column shows Hoechst 33342 (0.5 μg/ml) staining of the nuclei.

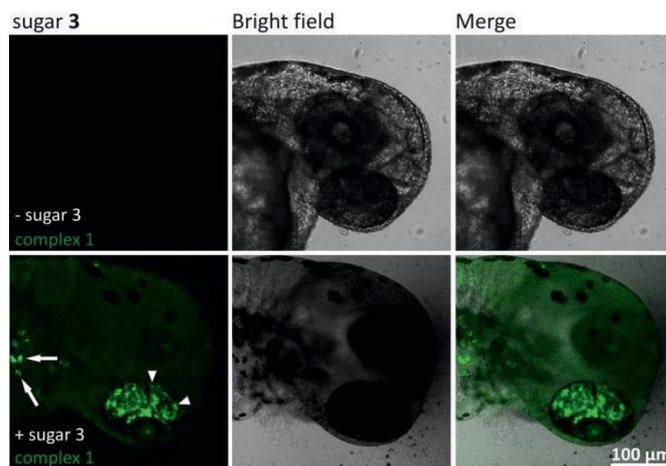


**Figure 3. Intramolecular-catalyzed, bioorthogonal CuAAC in HeLa cells.** 10<sup>4</sup> HeLa cells were incubated with **2** (80 μM, at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere). After three days, the cells were injected with **1** (20 μM, for 15 and 30 minutes) to label the incorporated azido sugars anchored in the glycocalyx. Fluorescence labeling was analyzed by a confocal microscope. First column shows Hoechst 33342 (0.5 μg/ml) staining of the nuclei.

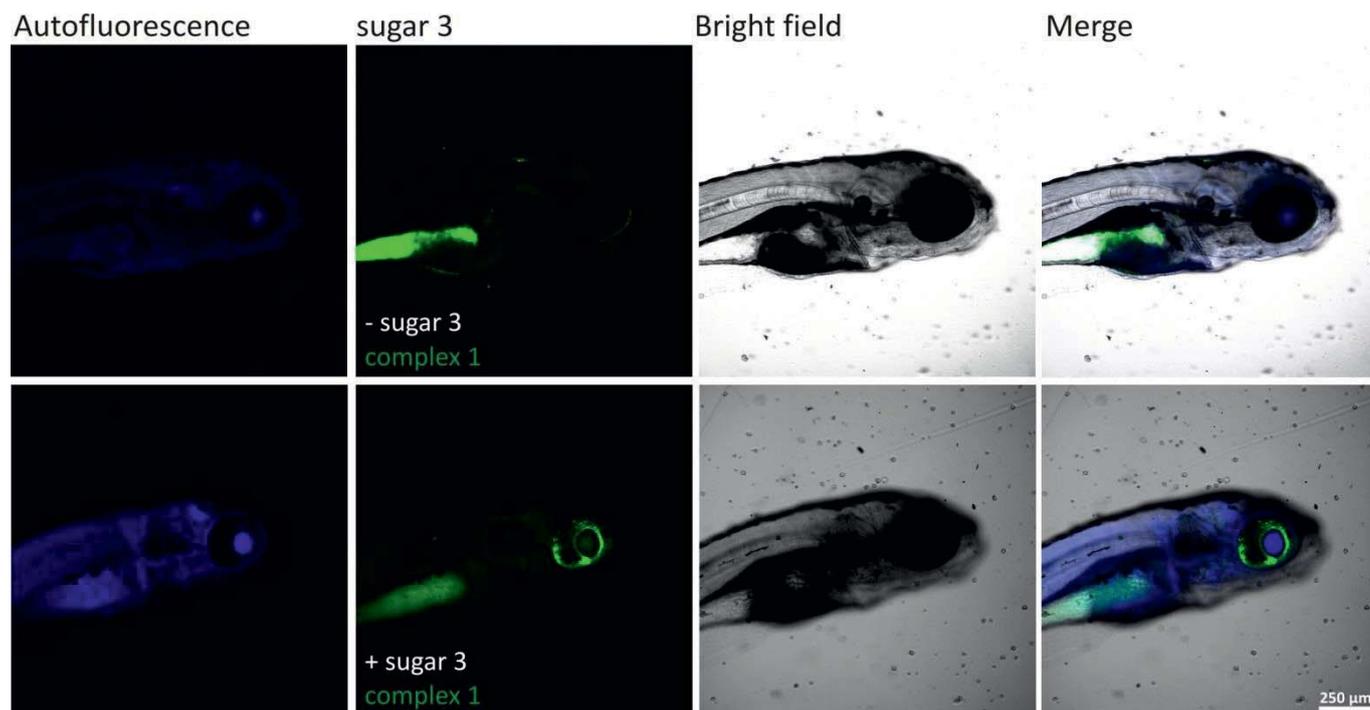
All zebrafish embryos hatched naturally. Even pigmentation was not disturbed by the bioorthogonal reactions. After 120 hpf the zebrafish embryos were unperturbed by the treatment. After 24 h bathing with the azido sugar and the 15 minutes treatment with

PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** the embryos were returned into fresh zebrafish water after washing them two to three times and allowed to further developing from 48 hpf to 120 hpf. During this time, the signal of the PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** resided in the retina and the gastrointestinal tract even though PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** was no longer present in the water (Figure 4 and 5). This suggests a labeling of the colon, which will be currently on going to analyse the distinct and strong labeling of the Ac<sub>4</sub>ManNAz precursor derived glycans in the retina cells by PyrPHOS-Cu(I)-complex **1**, making the complex a very special Click reaction for eye research. In order to improve the biocompatibility of the PyrPHOS-Cu(I)-complex **1**, we established the conditions for intramolecular CuAAC labeling procedure in cell culture and vertebrates. Compared to the previously described toxicity of Cu(I) ions (IC<sub>50</sub> of 500 μM of about 1 h of incubation)<sup>[27]</sup> the toxicological data revealed that the overall toxicity of the PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** with an IC<sub>50</sub> of > 60 μM is much lower as the effective concentration of Cu(I) is only present at the site of the intramolecular-catalyzed, bioorthogonal CuAAC and is not released into the cells (Figures SI2-SI3 and 6). This may be due to the strong, covalent binding of Cu(I) by the rather bulky PyrPHOS-ligands.

In conclusion, we introduce a new labeling approach which used the catalytic and luminescence features of Cu(I)-complexes. Due to an intramolecular-catalyzed, bioorthogonal, copper-catalyzed Click reaction, this highly luminescent molecule is able to tether itself to azide-containing molecules in cell culture and in zebrafish embryos. For this process, no further catalytic reagents or additives are necessary.



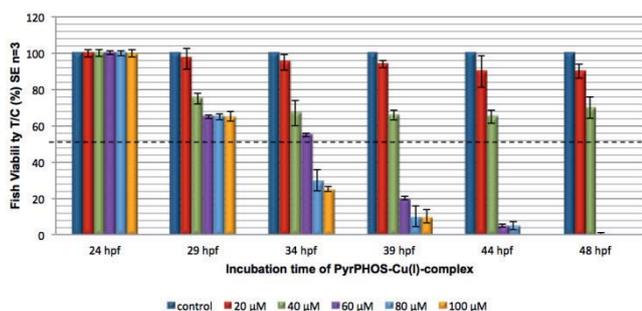
**Figure 4. Intramolecular-catalyzed, bioorthogonal CuAAC in zebrafish embryos.** Beginning at 24 hpf, zebrafish larvae were incubated in Ac<sub>4</sub>ManNAz **3** for 24 h and then treated with 20 μM of PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** fluorescence and corresponding bright field images of the head section of the embryos. Scale bar 100 μm. Strong fluorescence labeling of glycans in the retina (small arrows) and in the gut (large arrows) was observed (first column). hpf = hours post fertilization .



**Figure 5. Intramolecular-catalyzed, bioorthogonal CuAAC in 120 hpf zebrafish embryos.** Zebrafish embryos were treated as shown in figure 4. The fluorescence labeling was analyzed by confocal microscopy over a time course of 72 h (48 hpf to 120 hpf). Shown are Z projection images of PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** fluorescence and corresponding bright field images of the head and trunk section of the embryos at 120 hpf.

This variant of the CuAAC has two major advantages: besides the luminescent copper complex, there are no additional reactants needed, minimizing any problems with biocompatibility of solvents and fluorescent labels, while the toxicity of the copper catalyst is strongly reduced due to tight incorporation into the complex. It also provides faster reaction kinetics than the strain-promoted biocompatible Click reaction, making it suitable for the visualization

of processes of zebrafish development. Thus, our method expands the CuAAC for *in vivo* experiments. Currently, we are working on modified complexes with different emission wavelengths to enable temporally resolved imaging of the glycocalyx by means of two color labeling.



**Figure 6. Toxicology of the PyrPHOS-Cu(I)-complex 1 in zebrafish embryos.** After 8 hpf zebrafish embryos were incubated in a solution of 80  $\mu\text{M}$   $\text{Ac}_4\text{ManNAz}$  **3** and PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** (20, 40, 60, 80 and 100  $\mu\text{M}$ ) for different times as indicated. More than 60% of the zebrafish embryos treated with 20 and 40  $\mu\text{M}$  PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** survived to 120 hpf. No zebrafish embryo died after treatment with 100  $\mu\text{M}$  PyrPHOS-Cu(I)-complex **1** for 15 minutes and subsequent washing twice and incubation in zebrafish water for further 72 h. The dotted line indicates 50% vital zebrafish embryos.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online on ((will be filled in by the editorial staff))

**Keywords:** intramolecular-catalyzed, bioorthogonal Click reaction · luminescent, self-clickable Cu(I) complex · non-natural azido sugars · glycolocalyx

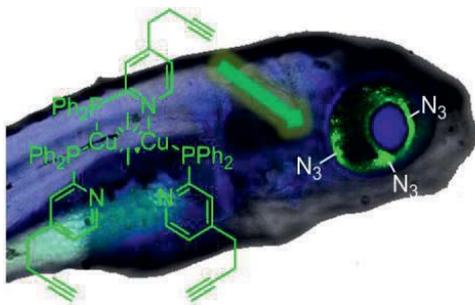
- [1] M. Rajendran, E. Yapici, L. W. Miller, *Inorganic Chemistry* **2013**.
- [2] E. Babu, S. Singaravavel, P. Manojkumar, S. Krishnasamy, G. Gnana kumar, S. Rajagopal, *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405*, 6891-6895.
- [3] K. Nchimi-Nono, K. D. Wegner, S. Linden, A. Lecointre, L. Ehret-Sabatier, S. Shakir, N. Hildebrandt, L. J. Charbonniere, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 6493-6501.
- [4] H. Chen, B. Qi, T. Moore, D. C. Colvin, T. Crawford, J. C. Gore, F. Alexis, O. T. Mefford, J. N. Anker, *Small* **2013**, n/a-n/a.
- [5] G. T. Hermanson, *Academic Press* **2008**, 1202.
- [6] aJ. F. Lutz, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 2182-2184; bC. Le Droumaguet, C. Wang, Q. Wang, *Chem Soc Rev* **2010**, *39*, 1233-1239; cE. Lallana, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 8794-8804; dE. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48*, 6974-6998; eE. Lallana, A. Sousa-Herves, F. Fernandez-Trillo, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *Pharm Res* **2012**, *29*, 1-34.
- [7] aS. Milles, S. Tyagi, N. Banterle, C. Koehler, V. VanDelinder, T. Plass, A. P. Neal, E. A. Lemke, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 5187-5195; bS. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664-667; cB. Rudat, E. Birtalan, S. B. L. Vollrath, D. Fritz, D. K. Kölmel, M. Nieger, U. Schepers, K. Müllen, H.-J. Eisler, U. Lemmer, S. Braese, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, p. 4457-4465.
- [8] E. Lallana, R. Riguera, E. Fernandez-Megia, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 8794-8804.
- [9] G. J. Brewer, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2008**, *11* (6), 727-732.
- [10] aS. I. Presolski, V. Hong, S. H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570-14576; bM. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. T. Dirks, F. P. Rutjes, F. L. van Delft, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805-815.
- [11] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 2415-2420.
- [12] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 3192-3193.
- [13] aR. M. Arnold, J. Locklin, *Langmuir* **2013**, *29*, 5920-5926; bA. Rotman, J. Heldman, *FEBS Letters* **1980**, *122*, 215-218.
- [14] P. Shieh, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 17428-17431.
- [15] aS. Y. de Boer, Y. Gloaguen, M. Lutz, J. I. van der Vlugt, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *380*, 336-342; bC. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**.
- [16] aD. Soriano Del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 16893-16899; bC. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 8051-8056.
- [17] D. Volz, T. Baumann, H. Flugge, M. Mydlak, T. Grab, M. Bachle, C. Barner-Kowollik, S. Braese, *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 20786-20790.
- [18] A. Hospital, C. Gibard, C. Gaulier, L. Nauton, V. Thery, M. El-Ghozzi, D. Avignat, F. Cisnetti, A. Gautier, *Dalton Transactions* **2012**, *41*, 6803-6812.
- [19] C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. T. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 5852-5856.
- [20] D. Volz, T. Baumann, H. Flugge, M. Mydlak, T. Grab, M. Bachle, C. Barner-Kowollik, S. Braese, *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 20786-20790.
- [21] aD. M. Zink, T. Baumann, J. Friedrichs, M. Nieger, S. Bräse, *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 13509-13520; bD. M. Zink, M. Bächle, T. Baumann, M. Nieger, M. Kühn, C. Wang, W. Klopper, U. Monkowius, T. Hofbeck, H. Yersin, S. Bräse, *Inorganic Chemistry* **2012**, *52*, 2292-2305; cD. M. Zink, T. Grab, T. Baumann, M. Nieger, E. C. Barnes, W. Klopper, S. Braese, *Organometallics* **2011**, 3275-3283.
- [22] H. Yersin, A. F. Rausch, R. Czerwieniec, T. Hofbeck, T. Fischer, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255.
- [23] aK. W. Dehnert, B. J. Beahm, T. T. Huynh, J. M. Baskin, S. T. Laughlin, W. Wang, P. Wu, S. L.



- Amacher, C. R. Bertozzi, *ACS Chem Biol* **2011**, *6*, 547-552; bK. W. Dehnert, J. M. Baskin, S. T. Laughlin, B. J. Beahm, N. N. Naidu, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2012**, *13*, 353-357; cP. V. Chang, X. Chen, C. Smyrniotis, A. Xenakis, T. Hu, C. R. Bertozzi, P. Wu, *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48*, 4030-4033; dP. V. Chang, D. H. Dube, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 9516-9518; eJ. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 16793-16797; fE. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [24] M. Cohen, A. Varki, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. Volume 308 (Ed.: W. J. Kwang), Academic Press, **2014**, pp. 75-125.
- [25] M. Schwarzkopf, K.-P. Knobloch, E. Rohde, S. Hinderlich, N. Wiechens, L. Lucka, I. Horak, W. Reutter, R. Horstkorte, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 5267-5270.
- [26] aS. J. Luchansky, H. C. Hang, E. Saxon, J. R. Grunwell, C. Yu, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Methods Enzymol* **2003**, *362*, 249-272; bS. J. Luchansky, S. Goon, C. R. Bertozzi, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2004**, *5*, 371-374; cS. J. Luchansky, S. Argade, B. K. Hayes, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2004**, *43*, 12358-12366; dS. J. Luchansky, C. R. Bertozzi, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2004**, *5*, 1706-1709.
- [27] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6974-6998.
-

### Catch Phrase

Luminescent, self-clickable copper complexes exhibit highly favorable photophysical properties as emitting materials in organic light-emitting diodes. Although these excellent photophysical properties are tunable these complexes have yet not been used in biological labeling reactions. Due to the complexed Cu(I) they are biocompatible and undergo fast, intramolecular-catalyzed, bioorthogonal Click reactions (CuAAC) for imaging of glycans of cells and zebrafish embryos.



*In vivo* bioorthogonal labeling using a luminescent, self-clickable copper complex in an intramolecular-catalyzed Click reaction





# 1 Cytotoxicity and NMR Studies of Platinum Complexes with 2 Cyclooctadiene Ligands

3 Mirja Enders,<sup>†</sup> Benjamin Görling,<sup>†</sup> Alexander B. Braun,<sup>†</sup> Judith E. Seltenreich,<sup>‡</sup> Linus F. Reichenbach,<sup>†,‡</sup>  
4 Kari Rissanen,<sup>§</sup> Martin Nieger,<sup>⊥</sup> Burkhard Luy,<sup>†,||</sup> Ute Schepers,<sup>‡</sup> and Stefan Bräse<sup>\*,†,||</sup>

5 <sup>†</sup>Institute of Organic Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Fritz-Haber-Weg 6, D-76131 Karlsruhe, Germany

6 <sup>‡</sup>Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, D-76344  
7 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

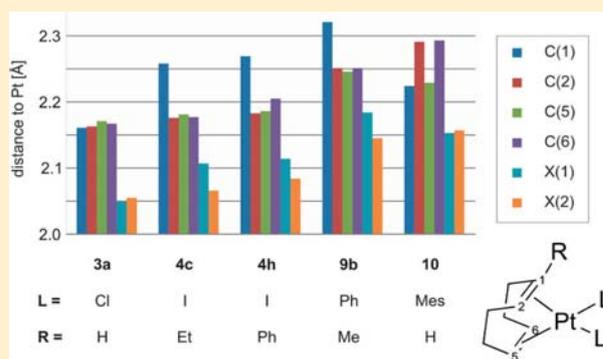
8 <sup>§</sup>Department of Chemistry, University of Jyväskylä, P.O. Box 35, 40014 Jyväskylä, Finland

9 <sup>⊥</sup>Laboratory of Inorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Helsinki, P.O. Box 55, A.I. Virtasen aukio 1, 00014  
10 University of Helsinki, Finland

11 <sup>||</sup>Institute for Biological Interfaces II, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, D-76344  
12 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

13 Supporting Information

14 **ABSTRACT:** The synthesis of a series of platinum complexes  
15 containing cyclooctadiene ligands with the general structure  
16 PtMeL(R-cod) (where L = Cl, I, nC<sub>3</sub>F<sub>7</sub>, iC<sub>3</sub>F<sub>7</sub>, nC<sub>8</sub>F<sub>17</sub>, Me, aryl,  
17 alkynyl and R = H, Me, Et, *i*Pr, *n*Bu, *i*Bu, *n*Hex, Ph) is presented.  
18 All complexes are remarkably stable and were obtained in  
19 excellent yields. Their structure in both solution and the solid  
20 state were explored by crystal structures and multinuclear (<sup>1</sup>H,  
21 <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F, <sup>195</sup>Pt) NMR spectroscopy. Cytotoxicity experiments with  
22 selected complexes in HeLa cells revealed higher toxicity in  
23 comparison to that of cisplatin for most of the structures.



## 24 ■ INTRODUCTION

25 Platinum(II) complexes containing unsubstituted 1,5-cyclo-  
26 octadiene (cod) ligands are well-known precursors for the  
27 synthesis of other mono- or polynuclear platinum(II)  
28 compounds.<sup>1–5</sup> Furthermore, they are widely used in both  
29 catalysis<sup>6–8</sup> and material sciences.<sup>9,10</sup> Recently, we presented  
30 the syntheses of platinum complexes containing substituted 1,5-  
31 cyclooctadiene (cod) ligands or perfluorinated chains and their  
32 use as precursors in metal organic vapor deposition  
33 (MOCVD)<sup>11,12</sup> and supercritical fluid reactive deposition  
34 (SFRD)<sup>13</sup> processes, respectively.

35 Since the discovery of cisplatin and its antiproliferative  
36 effects,<sup>14</sup> numerous other metal complexes have been tested  
37 and proven to be highly cytotoxic<sup>15–20</sup> against different cancer  
38 cell lines.<sup>21–25</sup> Deacon et al.<sup>26</sup> found evidence that organo-  
39 metallic platinum complexes generally perform better than their  
40 nonorganometallic derivatives. They also showed the prepara-  
41 tion of some cod platinum complexes with perfluorinated  
42 ligands and their cytotoxic activity against L1210 leukemia cells  
43 and the resistant cell line L1210/DDP.<sup>26</sup> In line with these  
44 findings, Klein et al. presented various studies on complexes  
45 containing the [Pt(cod)] fragment and different ligands,<sup>27–31</sup>  
46 such as alkyls, alkynyls, and nucleosides. Especially, the alkynyl  
47 complexes showed high cytotoxic activity against HT-29 colon

carcinoma and MCF-7 breast adenocarcinoma cell lines.<sup>29,31</sup> 48  
Deacon et al. also demonstrated the influence of different 49  
diene ligands, identifying cod complexes as promising 50  
anticancer drugs.<sup>26</sup> However, to the best of our knowledge, 51  
there have not been any comprehensive studies using 52  
monofunctionalized cod ligands so far.<sup>26,27,29,31–35</sup> 53

During the preparation of the complexes, we came across an 54  
obstacle. Until now, there is no reliable, precise, and at the same 55  
time fast method to prove the purity of a prepared complex if 56  
the resonances of the different species are spread over a wide 57  
range of frequencies. Conventional NMR experiments typically 58  
cannot acquire more than 50 kHz homogeneously excited 59  
bandwidth in a single experiment, and platinum has a chemical 60  
shift range of nearly 2 MHz at 14.1 T field strength. Therefore, 61  
we developed a reliable NMR method in order to detect 62  
impurities of our platinum complex samples covering a 63  
bandwidth of 500 kHz. Since there has been no structural 64  
study using monofunctionalized cod ligands to distinguish 65  
diastereomers, we also wanted to address this issue by NMR 66  
spectroscopy. 67

Received: May 23, 2014

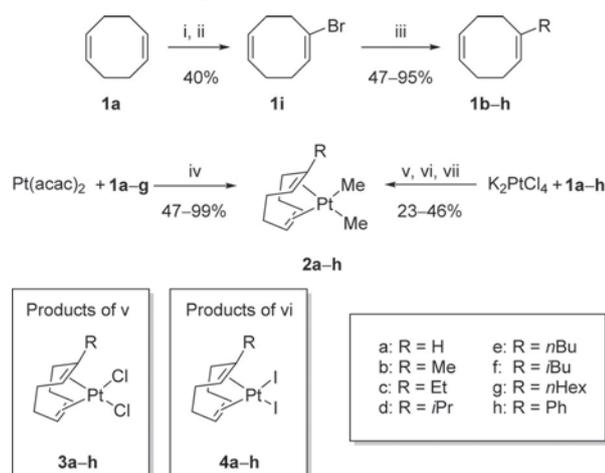


68 In this paper we describe the syntheses, NMR character-  
69 izations, and X-ray and toxicological studies of new platinum  
70 complexes having monosubstituted 1,5-cyclooctadiene plati-  
71 num complexes,  $[\text{PtL}_2(\text{R-cod})]$ <sup>36–46</sup> (for platinum complexes  
72 with 1,5-disubstituted cyclooctadiene ligands, see refs 47–53).

## 73 ■ RESULTS AND DISCUSSION

74 **Preparation.** Selective bromination of one COD double  
75 bond,<sup>54</sup> elimination,<sup>55</sup> and Kumada cross-coupling reactions<sup>56</sup>  
76 with various Grignard reagents gave the monofunctionalized  
77 cod ligands **1b–h** in good to excellent yields, as we have  
78 recently reported elsewhere.<sup>12</sup> Complexes with the general  
79 structure  $[\text{PtMe}_2(\text{R-cod})]$  (**2a–h**, where R = H, Me, Et, *i*Pr,  
80 *n*Bu, *i*Bu, *n*Hex, Ph) are accessible through either a direct  
81 method<sup>57</sup> or a three-step procedure,<sup>58</sup> both starting from cod  
82 itself (**1a**) or cod ligands **1b–h** and  $\text{Pt}(\text{acac})_2$  or  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ ,  
83 respectively. While the direct method is very fast and gives  
84 much better yields, the longer synthetic route gives interesting  
85 dichloro and diiodo intermediates **3a–h** and **4a–h** which can  
86 be used as precursors for the synthesis of other complexes (see  
87 Scheme 1).<sup>12</sup>

**Scheme 1. Synthesis of Functionalized cod Complexes 1b–h and Dimethyl Complexes 2a–h<sup>a</sup>**



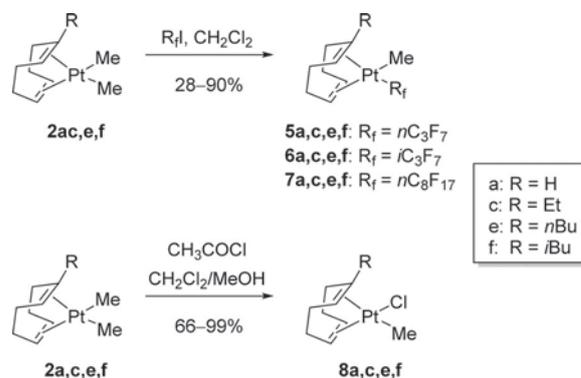
<sup>a</sup>Legend: (i)  $\text{Br}_2$ , hexane/*t*BuOH,  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min, 56%;<sup>54</sup> (ii) KO*t*Bu, THF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h, 72%;<sup>55</sup> (iii)  $\text{RMgX}$ ,  $\text{NiCl}_2(\text{dppp})$ , THF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$  to reflux, 4 h;<sup>56</sup> (iv)  $\text{AlMe}_3$ , toluene, room temperature, 24 h;<sup>57</sup> (v)  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}/n\text{PrOH}$ , room temperature, 2–6 days; (vi) NaI, acetone, room temperature, 3 h; (vii) MeLi,  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h.<sup>58</sup>

88 Dimethyl complexes **2a,c,e,f** were further functionalized by  
89 exchanging one methyl group. Insertion of perfluorinated alkyl  
90 chains using an excess of perfluorinated alkyl iodides  $\text{R}_f\text{I}$  gave  
91 the complexes  $[\text{PtMeR}_f(\text{R-cod})]$  (**5a,c,e,f–7a,c,e,f**, with  $\text{R}_f =$   
92  $n\text{C}_3\text{F}_7$ ,  $i\text{C}_3\text{F}_7$ ,  $n\text{C}_8\text{F}_{17}$ ) in good to excellent yields (see Scheme  
93 2).<sup>13</sup> All products were purified by column chromatography  
94 and are remarkably stable against water and oxygen. Following  
95 the procedure of Clark et al., we obtained the monochlorinated  
96 complexes  $[\text{PtMeCl}(\text{R-cod})]$  (**8a,c,e,f**; see Scheme 2).<sup>58</sup>

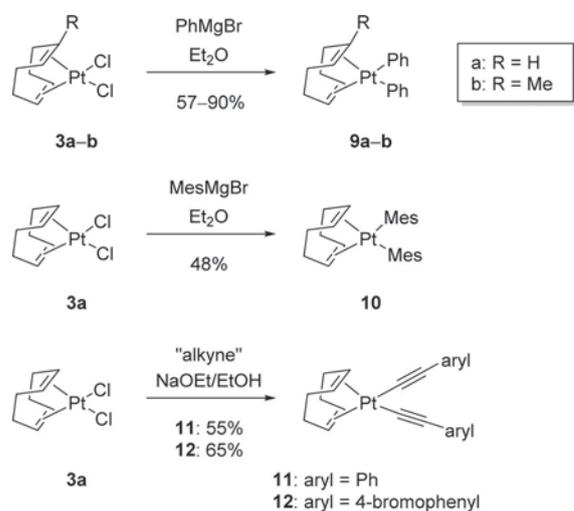
97 Chloro ligands are easily convertible into other ligands.  
98 Therefore, to widen the scope of complexes for our NMR  
99 investigations, dichloro complexes **3a–b** were further function-  
100 alized, using Grignard reagents<sup>59</sup> or alkynyls (see Scheme 3).<sup>60</sup>

101 **Crystal Structures.** Crystal structures of the following  
102 complexes were obtained: **3a**, **4c,h**, **9b**, and **10**. Please note that

**Scheme 2. Further Modifications of Dimethyl Complexes 2a,c,e,f**

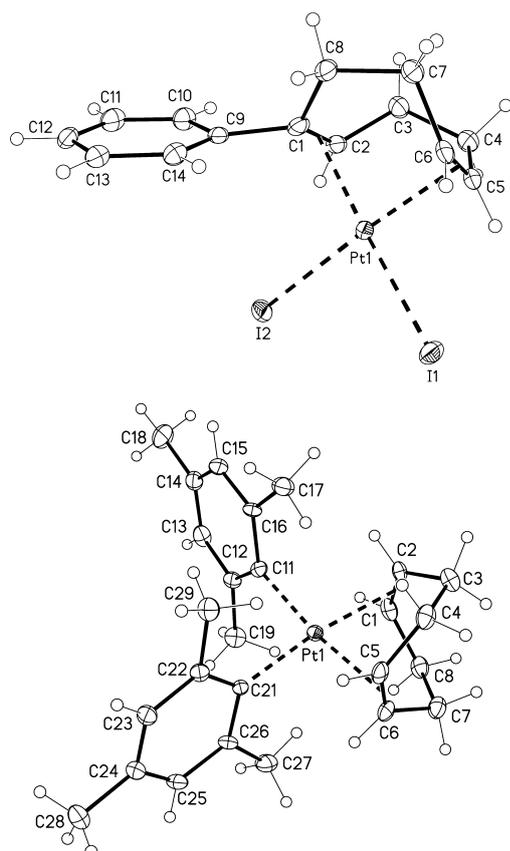


**Scheme 3. Further Modifications of Dichloro Complexes 3a,b**



**3a** is a redetermination of dichloro( $\eta^4$ -cycloocta-1,5-diene)-  
platinum(II) at 123 K. Selected molecular structures are  
presented in Figure 1.<sup>61–63</sup>

Due to the residue R at the cod ligand, the geometry of the  
complex is shifted. Distances from platinum to the carbon  
atoms of the double bond are given in Table 1. In the case of  
unsubstituted cod (**3a**), the bond length is similar for all carbon  
atoms and the two centroids. The centroids X(1) and X(2)  
represent the olefinic bond. In complex **10** with two space-  
consuming mesityl groups, the cod ligand is distorted and the  
bond length to two opposite carbon atoms (C(2) and C(6)) is  
longer while the distance to the others (C(1) and C(5)) is  
shorter. Therefore, the binding position X' of the platinum  
atom at the olefinic bond, which is defined by the square-planar  
geometry, is not identical with the centroids X and thus does  
not lie exactly in the center between the two carbon atoms.  
Still, the distances to the centroids are nearly equal. For the  
complexes with substituted cod ligands (**4c,h** and **9b**), the  
distance from platinum to C1 and therefore to X(1) is always  
longer in comparison to the distances from platinum to C(2),  
C(5), C(6), and X(2), as shown in Table 1. Accordingly, the  
two binding moieties of the cod ligand are not identical and  
exhibit different distances to the platinum atom.



**Figure 1.** Molecular structures of **4h** (top) and **10** (bottom). Displacement parameters are drawn at the 50% probability level.

dependent on the substituent *trans* to the olefinic bond. This so-called *trans* influence<sup>65</sup> can be used to determine which diastereomers of the differently substituted complexes (**5**–**8**) are formed during the reaction. For a strong ligand such as methyl in [PtMe<sub>2</sub>(cod)] (**2a**), the <sup>2</sup>J<sub>Pt,H</sub>(=CH, cod) coupling constant is approximately 38 Hz. This anti correlation of bond strength to <sup>2</sup>J<sub>Pt,H</sub> coupling constants seems to be a general rule that has been reported previously.<sup>31,65</sup> For weaker ligands such as chlorine in [PtCl<sub>2</sub>(cod)] (**3a**) the value is approximately 67 Hz. In the mixed complex [PtMeCl(cod)] (**5a**) there is a change in the binding situation. As shown in Table 3, the bond from chlorine to platinum is weakened (increased *trans* coupling) while the bond to the methyl group is strengthened (decreased *trans* coupling). For substituted cod ligands (**8c,e,f**), there is always one coupling with a coupling constant around 35 Hz and two between 70 and 77 Hz. This means that the methyl group is *trans* to the substituted side of the cod ligand. The group with the smaller van der Waals radius, in this case chlorine, seems to prefer the position next to the substituent R. Similar findings are made in the case of the unbranched, perfluorinated ligands (**5c,e,f** and **7c,e,f**). The bond to the methyl group is stronger (<sup>2</sup>J<sub>Pt,H</sub>(*trans*) = 33 Hz) than that to the other ligand (<sup>2</sup>J<sub>Pt,H</sub>(*trans*) = 43 Hz). However, this time there are two couplings *trans* to the methyl group and therefore the smaller methyl ligand is in direct proximity to the substituted side of the cod ligand. The perfluorinated isopropyl group appears to require space similar to the methyl group, because both diastereomers can be found. Nevertheless, the diastereomer with the methyl group in proximity to the substituent dominates and the ratios vary with the substituent (Table 4). The findings are confirmed by NOESY spectra of selected complexes.

**Toxicological Investigations.** In our studies we also want to apply these newly synthesized platinum(II) complexes *in vitro*. It is widely known that platinum(II) complexes play a key role in medicinal chemistry. They are applied as chemotherapeutic agents, in particular for cancer of the lung, testes, and ovaries.<sup>66–70</sup> In the class of platinum-based antitumor drugs cisplatin was the first member, discovered by Rosenberg et al. in 1965. It has been used for the treatment of breast, bowel, lung, pancreatic, and prostate gland tumors since 1978.<sup>71</sup> However, there are substantial drawbacks involved in the administration of cisplatin. One is the drug resistance of tumor cells, which is a grave issue in cisplatin treatment. Furthermore, the drug shows severe side effects, especially nephro- and neurotoxicity.<sup>72</sup> Therefore, newly synthesized platinum(II) complexes of the general formula [PtMeCl(R-cod)] were tested for *in vitro* cytotoxicity in HeLa cells. Several studies have shown high cytotoxicity of platinum complexes with organic ligands, such as perfluoro<sup>26</sup> or chloro ligands,<sup>73</sup> 192

**NMR Investigations.** Structural analysis of the new complexes was performed by multinuclear NMR spectroscopy. The results are summarized in Tables 2 and 3.

Platinum chemical shifts are in the expected range of Pt(II) complexes (–5500 to –1500 ppm)<sup>64</sup> and change slightly by 15–80 ppm (1–10 kHz at 600 MHz) due to the residue R at the cod ligand except for the phenyl group. The phenyl group has a larger influence on the platinum atom, probably due to its ring current, and therefore changes the chemical shift by 140–165 ppm (18–21 kHz at 600 MHz). While most complexes resonate in the range of approximately –3700 to –3000 ppm, it is notable that the diido complexes resonate at lower values (between –4300 and –4150 ppm). They are also more sensitive to the substituent at the cod ligand (45–90 ppm), probably due to the high electron density of the iodine atoms. As shown previously,<sup>27–31</sup> the <sup>2</sup>J<sub>Pt,H</sub>(=CH,cod) coupling constant to the olefinic protons of the cod ligand is strongly

**Table 1.** Selected Distances (Å) of the Complexes **3a**, **4c,h**, **9b**, and **10**<sup>a</sup>

	Pt–C(1)	Pt–C(2)	Pt–C(5)	Pt–C(6)	Pt–X(1) <sup>b</sup>	Pt–X(2) <sup>b</sup>	Pt–L(1) <sup>c</sup>	Pt–L(2) <sup>c</sup>
<b>3a</b>	2.161 (4)	2.163 (5)	2.171 (5)	2.167 (4)	2.049	2.055	2.300 (1)	2.309 (1)
<b>4c</b>	2.258 (4)	2.176 (4)	2.181 (5)	2.177 (6)	2.107	2.066	2.618 (4)	2.518 (4)
<b>4h</b>	2.269 (4)	2.183 (4)	2.186 (4)	2.205 (4)	2.114	2.084	2.608 (3)	2.617 (3)
<b>9b</b>	2.321 (4)	2.251 (5)	2.246 (5)	2.251 (5)	2.184	2.145	2.029 (3)	2.027 (4)
<b>10</b>	2.224 (4)	2.291 (4)	2.229 (3)	2.293 (4)	2.153	2.157	2.053 (3)	2.045 (4)

<sup>a</sup>Standard deviations are given in parentheses. <sup>b</sup>Centroids X(1) and X(2) are defined as the average olefinic bond between C(1) and C(2) and C(5) and C(6), respectively. <sup>c</sup>Ligands L(1) and L(2) are the ligands next to and opposite of the residue R at the cod ligand, respectively (e.g., L(1) = Me, L(2) = Cl for molecules **8a,c,e,f** in Scheme 2).

Table 2. Selected Chemical Shifts and Coupling Constants of the Complexes with Substituted cod Ligands and the General Formula [PtL(1)L(2)(R-cod)]<sup>a</sup>

	L(1) <sup>b</sup>	L(2) <sup>b</sup>	R	$\delta^{195\text{Pt}}$	$\Delta(\delta^{195\text{Pt}})$ (to R = H)	$\delta_{\text{H}}(\text{Me})$	$^2J_{\text{Pt,H}}(\text{Me})$	$\delta_{\text{H}}(=\text{CH}_2\text{cod}), ^2J_{\text{Pt,H}}(=\text{CH}_2\text{cod})$					
								<i>trans</i> L(1) <sup>b</sup>			<i>trans</i> L(2) <sup>b</sup>		
								<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
2b	Me	Me	Me	-3521	41	0.70	81	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
						0.71	82						
2c	Me	Me	Et	-3534	28	0.69	82	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
2d	Me	Me	iPr	-3527	35	0.69	81	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
						0.69	82						
2e	Me	Me	nBu	-3537	25	0.69	82	4.70	<i>c</i>	4.70	<i>c</i>	4.74	40
						0.70	82						
2f	Me	Me	iBu	-3523	39	0.65	81	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
						0.68	82						
2g	Me	Me	nHex	-3527	35	0.69	81	4.69	<i>c</i>	4.69	<i>c</i>	4.74	40
2h	Me	Me	Ph	-3401	160	0.74	83	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
3b	Cl	Cl	Me	-3298	32			5.56	<i>c</i>	5.61	66	5.48	67
3c	Cl	Cl	Et	-3315	15			<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
3d	Cl	Cl	iPr	-3307	23			5.53	<i>c</i>	5.53	<i>c</i>	5.35	<i>c</i>
3e	Cl	Cl	nBu	-3305	25			5.51 <sup>d</sup>	63 <sup>d</sup>	5.51 <sup>d</sup>	63 <sup>d</sup>	5.57	38 <sup>d</sup>
3f	Cl	Cl	iBu	-3287	43			5.51 <sup>d</sup>	64 <sup>d</sup>	5.51 <sup>d</sup>	64 <sup>d</sup>	5.60	70
3g	Cl	Cl	nHex	-3304	26			<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	5.58 <sup>d</sup>	26 <sup>d</sup>
3h	Cl	Cl	Ph	-3192	138			5.71	<i>c</i>	5.77	<i>c</i>	6.15	67
4b	I	I	Me	-4240	74			5.72 <sup>d</sup>	66 <sup>d</sup>	5.72 <sup>d</sup>	66 <sup>d</sup>	5.86	66
4c	I	I	Et	-4268	46			5.66	73 <sup>d</sup>	5.78	57 <sup>d</sup>	5.93	66
4d	I	I	iPr	-4239	75			<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
4e	I	I	nBu	-4257	57			5.68	73 <sup>d</sup>	5.76	62 <sup>d</sup>	5.92	66
4f	I	I	iBu	-4225	89			5.68	<i>c</i>	5.77	<i>c</i>	5.84	66
4g	I	I	nHex	-4248	66			5.65 <sup>d</sup>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	5.92	66
4h	I	I	Ph	-4149	165			<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
5c	Me	nC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	Et	-3748	42	0.86	79	5.29 <sup>d</sup>	<40 <sup>d</sup>	5.32 <sup>d</sup>	<30 <sup>d</sup>	4.95	43
5e	Me	nC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	nBu	-3748	42	0.85	79	5.30	30	5.30	30	4.94	42
5f	Me	nC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	iBu	-3723	67	0.84	79	5.22	<i>c</i>	5.40	36 <sup>d</sup>	4.88	44
6c	Me	iC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	Et	-3768	-4	0.82	76	5.38	40	5.55	44 <sup>d</sup>	4.80	49
		Me		-3743	21	0.83	76	4.63	39	4.94	58	5.48	35
6e	Me	iC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	nBu	-3750	14	0.74	76	5.39	40 <sup>d</sup>	5.52	<30 <sup>d</sup>	4.78	47
		Me		-3734	30	0.75	76	4.61	38	4.93	58	5.47	41 <sup>d</sup>
6f	Me	iC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	iBu	-3729	35	0.72	76	5.41	<35 <sup>d</sup>	5.53	<35 <sup>d</sup>	4.71	47
		Me		-3720	44	0.76	76	4.57	38	4.93	57	5.49	36 <sup>d</sup>
7c	Me	nC <sub>8</sub> F <sub>17</sub>	Et	-3766	24	0.87	79	5.07 <sup>d</sup>	<40 <sup>d</sup>	5.13 <sup>d</sup>	<40 <sup>d</sup>	4.95	43
7e	Me	nC <sub>8</sub> F <sub>17</sub>	nBu	-3763	27	0.86	78	5.31	<35 <sup>d</sup>	5.31	<35 <sup>d</sup>	4.94	39
7f	Me	nC <sub>8</sub> F <sub>17</sub>	iBu	-3740	50	0.85	78	5.24	<35 <sup>d</sup>	5.41	<35 <sup>d</sup>	4.88	39
8c	Cl	Me	Et	-3471	25	0.87	71	4.36	73 <sup>d</sup>	4.40	68 <sup>d</sup>	5.36	36
8e	Cl	Me	nBu	-3471	25	0.87	71	4.38	72	4.38	72	5.34	35
8f	Cl	Me	iBu	-3470	26	0.89	71	4.36	70	4.41	77	5.31	33
9b	Ph	Ph	Me	-3564	31			4.99 <sup>d</sup>	<i>c</i>	5.03 <sup>d</sup>	<i>c</i>	4.90	36 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Samples were measured in CDCl<sub>3</sub>. Chemical shifts are given in ppm and coupling constants in Hz (in italics). <sup>b</sup>Ligands L(1) and L(2) are the ligands next to and opposite of the residue R at the cod ligand, respectively (e.g., L(1) = Cl, L(2) = Me for molecules 8a,c,e,f in Scheme 2). <sup>c</sup>Not accessible due to strong overlap and coupling artifacts. <sup>d</sup>Tentative value due to overlap.

193 against different cell lines. It is known that cod-linked  
194 platinum(II) complexes exhibit an unusually high acute toxicity  
195 against HT-29 and MCF-7 cells.<sup>74</sup> Despite these findings, there  
196 have been, to the best of our knowledge, no further  
197 experiments with derivatized cod ligands until now.

198 To test the toxicity, 5 × 10<sup>3</sup> HeLa cells were plated on a 96-  
199 well ibidi plate and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere  
200 for 24 h. Then the cells were treated with various  
201 concentrations of different platinum(II) complexes (100, 250,  
202 500, 750 nM and 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, and 10 μM) at 37 °C and 5%  
203 CO<sub>2</sub> atmosphere. After 3 days of incubation 15 μL of MTT  
204 reagent was added. After 3 h of incubation 100 μL

solubilization solution/stop mix was added. Finally, the plates  
205 were measured by a microplate reader at 595 nm. 206

To our surprise, all of the tested complexes exhibited higher  
207 cytotoxicity in comparison to cisplatin (Table 5). However, 208  
209 IC<sub>50</sub> values varied strongly. To evaluate the influence of  
210 different ligands L and substituents R, one has to differentiate  
211 between complexes with perfluorinated ligands L (5–7) and  
212 complexes where L = Me (2), Cl (8). In general, complexes  
213 with perfluorinated ligands L (5–7) and where R = H were  
214 slightly more cytotoxic than other tested complexes. A reason  
215 for this behavior might be the lipophilic character of the ligands,  
216 which allows the compounds to pass through membranes more

**Table 3. Selected Chemical Shifts and Coupling Constants of the Complexes with an Unsubstituted cod Ligand and the General Formula [PtL(1)L(2)(cod)]<sup>a</sup>**

	L(1)	L(2)	$\delta_{\text{Pt}}^{\text{ppm}}$	$\delta_{\text{H}}(\text{Me})$	$^2J_{\text{Pt,H}}(\text{Me})$	$\delta_{\text{H}}(=\text{CH}_2\text{cod}), ^2J_{\text{Pt,H}}(=\text{CH}_2\text{cod})$			
						<i>trans</i> L(1)		<i>trans</i> L(2)	
2a	Me	Me	−3562	0.74	82	4.81	38	4.81	38
3a	Cl	Cl	−3330			5.61	67	5.61	67
4a	I	I	−4314			5.76	66	5.76	66
5a	Me	<i>n</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	−3790	0.88	78	5.37	33	5.14	43
6a	Me	<i>i</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	−3764	0.79	76	5.52	31	4.97	49
7a	Me	<i>n</i> C <sub>8</sub> F <sub>17</sub>	−3790	0.88	78	5.39	34	5.14	43
8a	Cl	Me	−3496	0.90	71	4.49	76	5.51	33
9a	Ph	Ph	−3595			5.12	38	5.12	38
12 <sup>b</sup>	alkynyl	alkynyl	−3935			5.62	41	5.62	41

<sup>a</sup>Samples were measured in CDCl<sub>3</sub> if not noted differently. Chemical shifts are in ppm and coupling constants in Hz (in italics). <sup>b</sup>Sample was measured in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

**Table 4. Ratios (%) of the Two Possible Diastereomers of the Mixed Complexes 5c,e,f–8c,e,f**

	5c	5e	5f	6c	6e	6f	7c	7e	7f	8c	8e	8f
L(1) = Me <sup>a</sup>	100	100	100	61	58	54	100	100	100	0	0	0
L(2) = Me <sup>a</sup>	0	0	0	39	42	46	0	0	0	100	100	100

<sup>a</sup>Ligands L(1) and L(2) are the ligands next to and opposite of the residue R at the cod, respectively (e.g., L(1) = Cl, L(2) = Me for molecules 8a,c,e,f in Scheme 2).

**Table 5. IC<sub>50</sub> Values of Selected Platinum(II) Complexes with the General Formula [PtMeL(R-cod)]**

compd	R	L	IC <sub>50</sub> (μM)
2a	H	Me	2.47 ± 0.28
2c	Et	Me	0.52 ± 1.62
2e	<i>n</i> Bu	Me	2.66 ± 0.13
2f	<i>i</i> Bu	Me	2.64 ± 0.30
5a	H	<i>n</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	1.60 ± 0.35
5c	Et	<i>n</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	1.96 ± 0.25
5e	<i>n</i> Bu	<i>n</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	3.21 ± 0.54
5f	<i>i</i> Bu	<i>n</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	1.98 ± 0.24
6a	H	<i>i</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	1.22 ± 0.09
6c	Et	<i>i</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	2.24 ± 0.75
6e	<i>n</i> Bu	<i>i</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	2.74 ± 0.40
6f	<i>i</i> Bu	<i>i</i> C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	2.95 ± 0.72
7a	H	<i>n</i> C <sub>8</sub> F <sub>17</sub>	1.44 ± 0.08
7c	Et	<i>n</i> C <sub>8</sub> F <sub>17</sub>	2.56 ± 0.68
7e	<i>n</i> Bu	<i>n</i> C <sub>8</sub> F <sub>17</sub>	3.67 ± 0.06
7f	<i>i</i> Bu	<i>n</i> C <sub>8</sub> F <sub>17</sub>	2.40 ± 0.51
8a	H	Cl	2.64 ± 0.21
8c	Et	Cl	1.79 ± 0.36
8e	<i>n</i> Bu	Cl	3.14 ± 0.16
8f	<i>i</i> Bu	Cl	2.88 ± 0.05
cisplatin			3.82 ± 0.52

## CONCLUSIONS

227

In this work, we have described the synthesis of new 228 organometallic complexes [PtMeL(R-cod)] (where L = Cl, I, 229 *i*C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>, *n*C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>, *n*C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>, Me, aryl, alkynyl and R = H, Me, Et, *i*Pr, 230 *n*Bu, *i*Bu, *n*Hex, Ph) in excellent yields. All complexes were 231 characterized in solution by multinuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F, <sup>195</sup>Pt) 232 NMR spectroscopy and some of them also in the solid state by 233 crystal structures. In addition to standard measurements, we 234 also used a new NMR method that was specifically developed 235 to measure complexes whose resonances are spread over a wide 236 range of frequencies. Using this method, we were able to 237 distinguish diastereomers derived from the monofunctionalized 238 cod ligands. Selected complexes were tested in cytotoxicity 239 experiments with HeLa cells and revealed highly promising 240 activities for most of the structures in comparison to cisplatin. 241 Taking all these results into account, we can attribute the 242 difference in biological activity mainly to differences in 243 solubility and lipophilicity depending on ligands L and 244 substituents R. If L is a perfluorinated ligand, substitution of 245 cod leads to reduced cytotoxicity, while for L = Me, Cl, 246 complexes with an ethyl chain (2c, 8c) are the most cytotoxic. 247 Future studies will focus on the underlying mechanism in vivo. 248

## EXPERIMENTAL SECTION

249

**General Procedures.** The starting materials, solvents, and 250 reagents were purchased from Acros, ABCR, Alfa Aesar, or Sigma- 251 Aldrich and used without further purification. All reactions involving 252 moisture-sensitive reactants were executed under an argon atmosphere 253 using oven-dried or flame-dried glassware. Dry tetrahydrofuran and 254 dry diethyl ether were distilled from sodium under argon using 255 benzophenone as indicator prior to use. Dry toluene was distilled from 256 sodium under argon prior to use. Dry dichloromethane was distilled 257 from calcium chloride under argon prior to use. TLC: ready-to-use 258 plates with silica gel 60 (F254). Column chromatography: silica gel 60 259 (0.04–0.063 mm). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 25 °C 260 on a 300 MHz (<sup>1</sup>H) and 75 MHz (<sup>13</sup>C)) and a 400 MHz 261 (400 MHz (<sup>1</sup>H), 100 MHz (<sup>13</sup>C)) spectrometer. All spectra are 262 referenced to tetramethylsilane as the internal standard (δ 0 ppm) by 263

217 easily. In this case, substitution of the cod ligand led to reduced 218 biological activity, perhaps due to the increased bulkiness of the 219 compounds.

220 A different behavior was observed for complexes 2 and 8, 221 both having smaller, less lipophilic ligands L. Compounds 2c and 222 8c with an ethyl-substituted cod ligand were the most cytotoxic 223 complexes of these two classes. Longer alkyl chains again led to 224 reduced activity. A reasonable explanation for this might be that 225 the ethyl substituent is a perfect compromise between increased 226 lipophilicity and bulkiness of the complex.

264 using the signals of the residual protons of  $\text{CHCl}_3$  (7.26 ppm ( $^1\text{H}$ ) or  
265 77.0 ppm ( $^{13}\text{C}$ )) in  $\text{CDCl}_3$  and of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.32 ppm ( $^1\text{H}$ ) or 54.0  
266 ppm ( $^{13}\text{C}$ )) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ . Multiplicities of signals are described using  
267 standard abbreviations or as follows: s d, singlet + doublet (of singlets)  
268 due to coupling with  $^{195}\text{Pt}$ ; dd, doublet of doublets; d d, doublet +  
269 doublet (of doublets) due to coupling with  $^{195}\text{Pt}$ ; dd d, doublet of  
270 doublets + doublet (of doublet of doublets) due to coupling with  
271  $^{195}\text{Pt}$ ; t d, triplet + doublet (of triplets) due to coupling with  $^{195}\text{Pt}$ ;  
272 quin d, quintet + doublet (of quintets) due to coupling with  $^{195}\text{Pt}$ ; m  
273 d, multiplet + doublet (of multiplets) due to coupling with  $^{195}\text{Pt}$ .  
274 Coupling constants ( $J$ ) are given in Hz. The assignments of the signal  
275 structure in  $^1\text{H}$  NMR were made by the multiplicity and for  $^{13}\text{C}$  NMR  
276 by DEPT 90 and DEPT 135 spectra (DEPT = distortionless  
277 enhancement by polarization transfer) and are described as follows:  
278 +, primary or tertiary C atom (positive DEPT signal); -, secondary C  
279 atom (negative DEPT signal);  $\text{C}_{\text{quart}}$  quaternary C atom (no DEPT  
280 signal).  $^{195}\text{Pt}$  NMR spectra were recorded at 300 K on a 600 MHz  
281 spectrometer using either an inversely detected double-resonance  $^1\text{H}$ -  
282 BB probe head or an inversely detected triple-resonance  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -BB  
283 probe head. Platinum frequencies were determined by 1D  $^{195}\text{Pt}$  spectra  
284 or an ultra-broad-band version of a gradient-selected  $^1\text{H}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ -HMBC.  
285 Due to the very large chemical shift range of platinum complexes  
286 (15000 ppm, 1.94 MHz @ 14.1 T), it is not possible to cover this  
287 range in one conventional experiment. Conventional experiments are  
288 acquired with hard pulses that can excite a bandwidth of about 50 kHz.  
289 Therefore, to cover the complete chemical shift range, nearly 40  
290 experiments would be needed. With new ultra-broad-band versions of  
291 conventional experiments that can acquire a bandwidth of 500 kHz,  
292 the number of needed spectra is decreased by a factor of 10. Although  
293 Pt(II) complexes only have a chemical shift range of 4000 ppm, three  
294 experiments would still be needed to determine the chemical shift of a  
295 complex reliably. With the new experiments, only one broad-band  
296 spectrum is needed. Broad-band spectra are achieved via application of  
297 broad-band saturation pulses on platinum,<sup>84</sup> which have been designed  
298 by optimal control derived optimizations.<sup>75–81</sup> IR (infrared spectroscopy)  
299 spectra were recorded on a FT-IR Bruker IFS 88 or a Bruker  
300 Alpha T spectrometer. IR spectra were recorded using the DRIFT  
301 technique (diffused reflectance infrared Fourier transform spectroscopy)  
302 or ATR Diamond (attenuated total reflection) for solids. IR  
303 spectra of oils were determined as KBr plates, prepared under an argon  
304 atmosphere. The absorption bands are given in wavenumbers  $\tilde{\nu}$  in  
305  $\text{cm}^{-1}$ .

306 **General Method for the Preparation of Functionalized cod**  
307 **Ligands 1b–h.**<sup>12,82</sup> For the R-cod ligands 1b–h, 1-bromo-1,5-  
308 cyclooctadiene (1i; 1.00 equiv) and  $\text{NiCl}_2(\text{dppp})$  (2.00 mol %) were  
309 dissolved in dry tetrahydrofuran. At 0 °C, the corresponding Grignard  
310 solution (2.00 equiv) in diethyl ether or tetrahydrofuran was added to  
311 the reaction mixture, which was then stirred for 30 min at this  
312 temperature. The mixture was warmed to room temperature and was  
313 stirred for another 1 h, at that temperature and was finally stirred for a  
314 further 2 h under reflux. After it was cooled to room temperature, the  
315 mixture was quenched with saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . The aqueous layer was  
316 extracted three times with diethyl ether, and the combined organic  
317 layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under  
318 reduced pressure, and the residue was purified by flash column  
319 chromatography (pentane) to give a colorless oil.

320 **General Method for the Preparation of Dichloro Complexes**  
321 **3a–h.**<sup>12,82</sup> For the  $[\text{PtCl}_2(\text{R-cod})]$  complexes 3a–h,  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  (1.00  
322 equiv) was dissolved in water and *n*-propanol and the R-cod ligands  
323 1a–h (6.90 equiv) and  $\text{SnCl}_2$  (3.00 mol %) were added sequentially.  
324 The mixture was stirred for 2–5 days at room temperature until  
325 complete decoloration of the solution was achieved. The resulting  
326 solid was filtered off, washed twice with water and once with ethanol,  
327 and dried in vacuo.

328 **General Method for the Preparation of Diiodo Complexes**  
329 **4a–h.**<sup>12,82</sup> For the  $[\text{PtI}_2(\text{R-cod})]$  complexes 4a–h, NaI (2.15 equiv)  
330 was added to a suspension of  $[\text{PtCl}_2(\text{R-cod})]$  (3a–h; 1.00 equiv) in  
331 acetone. The mixture turned yellow immediately and was stirred for 3  
332 h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue  
333 was dissolved in dichloromethane and water. The aqueous layer was

extracted with dichloromethane, and the combined organic layers were 334  
washed with water and brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was 335  
removed under reduced pressure, and  $[\text{PtI}_2(\text{R-cod})]$  complexes 4a–h 336  
were obtained as a solid or wax without further purification. 337

**General Method for the Preparation of Dimethyl Complexes**  
**2a–h (Method A).**<sup>12,82</sup> For the  $[\text{PtMe}_2(\text{R-cod})]$  complexes 2a–h, 338  
to a suspension of  $[\text{PtI}_2(\text{R-cod})]$  (4a–h; 1.00 equiv) in dry diethyl 339  
ether was added a solution of MeLi in pentane (1.6 M, 3.00 equiv) at 0 340  
°C. The mixture was stirred for 2 h at this temperature and was finally 342  
quenched with ice-cold saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution. The 343  
aqueous layer was extracted with diethyl ether three times, and the 344  
combined organic layers were washed with brine and dried over 345  
 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After addition of a small amount of charcoal, the solution was 346  
filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The 347  
residue was purified by flash column chromatography (cyclohexane, 348  
2%  $\text{NEt}_3$ ). 349

**General Method for the Preparation of Dimethyl Complexes**  
**2a–g (Method B).**<sup>12,82</sup> For the  $[\text{PtMe}_2(\text{R-cod})]$  complexes 2a–g, 350  
R-cod ligands 1a–g (1.10 equiv) and  $\text{Pt}(\text{acac})_2$  (1.00 equiv) were 351  
dissolved in dry toluene. Then,  $\text{AlMe}_3$  (2 M in toluene, 3.00 equiv) 352  
was slowly added and the mixture was stirred for 24 h at room 353  
temperature. The solution was quenched with saturated aqueous 355  
 $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution, and the aqueous layer was extracted with diethyl 356  
ether four times. The combined organic layers were washed three 357  
times with 1 M HCl and once with brine and were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . 358  
The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was 359  
purified by flash column chromatography (cyclohexane, 2%  $\text{NEt}_3$ ). 360

**General Method for the Preparation of Complexes with**  
 **$n\text{C}_3\text{F}_7$  Ligand 5a,c,e,f.**<sup>83</sup> For the  $[\text{PtMenC}_3\text{F}_7(\text{R-cod})]$  complexes 361  
5a,c,e,f, dimethyl complexes 2a,c,e,f (1.00 equiv) were dissolved in dry 362  
dichloromethane and treated with heptafluoro-1-iodopropane (10.0 363  
equiv) at room temperature. The mixture was stirred for 5 days at 35 365  
°C with exclusion of light. The volatiles were removed in vacuo, and 366  
the residue was purified by flash column chromatography (cyclo- 367  
hexane/ethyl acetate, 30/1). 368

**General Method for the Preparation of Complexes with**  
 **$i\text{C}_3\text{F}_7$  Ligand 6a,c,e,f.**<sup>83</sup> For the  $[\text{PtMeiC}_3\text{F}_7(\text{R-cod})]$  complexes 369  
6a,c,e,f, dimethyl complexes 2a,c,e,f (1.00 equiv) were dissolved in dry 370  
dichloromethane and treated with heptafluoro-2-iodopropane (15.0 371  
equiv) at room temperature. The mixture was stirred for 5 days at 35 372  
°C with exclusion of light. The volatiles were removed in vacuo, and 373  
the residue was purified by flash column chromatography (cyclo- 374  
hexane/ethyl acetate, 30/1). 375

**General Method for the Preparation of Complexes with**  
 **$n\text{C}_8\text{F}_{17}$  Ligand 7a–d.**<sup>83</sup> For the  $[\text{PtMenC}_8\text{F}_{17}(\text{R-cod})]$  complexes 376  
7a,c,e,f, dimethyl complexes 2a,c,e,f (1.00 equiv) were dissolved in dry 377  
dichloromethane and treated with heptafluoro-1-iodooctane (5.0 378  
equiv) at room temperature. The mixture was stirred for 5 days at 35 381  
°C with exclusion of light. The volatiles were removed in vacuo, and 382  
the residue was purified by flash column chromatography (cyclo- 383  
hexane/ethyl acetate, 30/1). 384

**General Method for the Preparation of Monochloro**  
**Complexes 8a,c,e,f.** For the  $[\text{PtMeCl}(\text{R-cod})]$  complexes 8a,c,e,f, 385  
dimethyl complexes 2a,c,e,f (1.00 equiv) were dissolved in dichloro- 386  
methane/methanol 3/2 and treated with acetyl chloride (1.00 equiv) 387  
at room temperature. The mixture was stirred for a further 10 min and 388  
then concentrated in vacuo. Solids were stored overnight at –20 °C 389  
and then filtered, washed twice with small portions of pentane, and 390  
finally dried in vacuo. Oils were further dried in vacuo. 391

**General Method for the Preparation of Diphenyl Complexes**  
**9a,b.**<sup>82</sup> For the  $[\text{PtPh}_2(\text{R-cod})]$  complexes 9a,b, dichloro complexes 392  
3a,b (1.00 equiv) were dissolved in dry diethyl ether and treated with 393  
phenylmagnesium bromide (2 M in tetrahydrofuran, 2.20 equiv) at 394  
room temperature. The mixture was stirred for 12 h at room 395  
temperature and finally treated with saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  396  
solution. The aqueous layer was extracted with dichloromethane 397  
three times. The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . 398  
The solvent was removed under reduced pressure, and the colorless 399  
residue was purified by recrystallization from dichloromethane and 400  
pentane. 401  
402  
403

404 **Further Functionalized Molecules 10–12.** [PtMes<sub>2</sub>(cod)] (10).  
 405 Dichloro complex **3a** (1.00 equiv) was dissolved in dry diethyl ether  
 406 and treated with mesitylmagnesium bromide (1 M in tetrahydrofuran,  
 407 2.02 equiv) at room temperature. The mixture was stirred for 12 h at  
 408 room temperature and finally treated with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl  
 409 solution. The aqueous layer was extracted with dichloromethane three  
 410 times. The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The  
 411 solvent was removed under reduced pressure, and the colorless residue  
 412 was purified by recrystallization from dichloromethane and pentane to  
 413 give a colorless solid. Yield: 141 mg (0.256 mmol, 48%).  
 414 [Pt(CCPH)<sub>2</sub>(cod)] (11). NaOEt (2.00 equiv., 21 wt % in ethanol) was  
 415 diluted with dry ethanol, and phenylacetylene (2.00 equiv) was added.  
 416 After it was stirred for 25 min, the mixture was cooled to 0 °C and a  
 417 suspension of dichloro complex **3a** (1.00 equiv) in dry ethanol was  
 418 added. The mixture was warmed to room temperature within 1 h. The  
 419 solvent was removed under reduced pressure, and the pale yellow  
 420 residue was extracted with dichloromethane several times. The  
 421 combined organic layers were concentrated and treated with *n*-hexane.  
 422 The obtained precipitate was filtered off and washed twice with *n*-  
 423 hexane to give a colorless solid. Yield: 72.0 mg (0.147 mmol, 55%).  
 424 [Pt(CCArBr)<sub>2</sub>(cod)] (12). Sodium (2.00 equiv) was dissolved in dry  
 425 ethanol and stirred for 20 min, and then 4-bromophenylacetylene (2.00  
 426 equiv) was added. After another 20 min, the solution was cooled to 0  
 427 °C and a suspension of dichloro complex **3a** (1.00 equiv) in dry  
 428 ethanol was added. The mixture was warmed to room temperature  
 429 within 1 h and was stirred for another 1 h at room temperature. The  
 430 solvent was removed under reduced pressure, and the pale brown  
 431 residue was extracted with dichloromethane several times. The  
 432 combined organic layers were concentrated and treated with *n*-hexane.  
 433 The obtained precipitate was filtered off and washed twice with *n*-  
 434 hexane to give a colorless solid. Yield: 288 mg (0.434 mmol, 65%).

## 435 ■ ASSOCIATED CONTENT

### 436 ● Supporting Information

437 Text, tables, figures, and CIF files giving characterization data  
 438 for all new compounds, toxicological measurements, and  
 439 crystallographic data for **3a**, **4c,h**, **9b** and **10**. This material is  
 440 available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## 441 ■ AUTHOR INFORMATION

### 442 Corresponding Author

443 \*S.B.: fax, (+49)721 608 42296; e-mail, [braese@kit.edu](mailto:braese@kit.edu).

### 444 Present Address

445 #Institute of Organic Chemistry, RWTH Aachen, Landoltweg  
 446 1, D-52074 Aachen, Germany.

### 447 Notes

448 The authors declare no competing financial interest.

## 449 ■ ACKNOWLEDGMENTS

450 Financial support by Joint Lab IP3, which is a cooperation of  
 451 KIT and BASF SE, and the Collaborative Research Centre  
 452 CRC/Transregio 88, “Cooperative effects in homo- and  
 453 heterometallic complexes (3MET)” (Project B2), is gratefully  
 454 acknowledged. B.L. thanks the Deutsche Forschungsgemein-  
 455 schaft (LU 835/6-2; Forschergruppe FOR 934 and DFG-  
 456 Gerätezentrum Pro<sup>2</sup>NMR), the Fonds der Chemischen  
 457 Industrie, and the HGF programme BioInterfaces.

## 458 ■ REFERENCES

459 (1) Annibale, G.; Brandolisio, M.; Pitteri, B. *Polyhedron* **1995**, *14*,  
 460 451.  
 461 (2) Ellis, J. W.; Harrison, K. N.; Hoye, P. A. T.; Orpen, A. G.; Pringle,  
 462 P. G.; Smith, M. B. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3026.  
 463 (3) Fallis, S.; Anderson, G. K.; Rath, N. P. *Organometallics* **1991**, *10*,  
 464 3180.

(4) Otsuka, S.; Yoshida, T.; Matsumoto, M.; Nakatsu, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5850. 465  
 466  
 (5) Stone, F. G. A. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 318. 467  
 (6) Iverson, C. N.; Smith, M. R. *Organometallics* **1997**, *16*, 2757. 468  
 (7) Lewis, L. N.; Lewis, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7228. 469  
 (8) Mann, G.; John, K. D.; Baker, R. T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2105. 470  
 (9) Cummings, S. D.; Eisenberg, R. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2007. 471  
 (10) Hierso, J.-C.; Serp, P.; Feurer, R.; Kalck, P. *Appl. Organomet. Chem.* **1998**, *12*, 161. 472  
 473  
 (11) Faust, M.; Enders, M.; Bruns, M.; Bräse, S.; Gao, K.; Seipenbusch, M. *Surf. Coat. Technol.* **2013**, *230*, 284. 474  
 (12) Faust, M.; Enders, M.; Gao, K.; Reichenbach, L.; Muller, T.; Gerlinger, W.; Sachweh, B.; Kasper, G.; Bruns, M.; Bräse, S.; Seipenbusch, M. *Chem. Vap. Deposition* **2013**, *19*, 274. 475  
 476  
 (13) Aggarwal, V.; Reichenbach, L. F.; Enders, M.; Muller, T.; Wolff, S.; Crone, M.; Türk, M.; Bräse, S. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 12794. 480  
 (14) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, *205*, 698. 481  
 (15) Chellan, P.; Land, K. M.; Shokar, A.; Au, A.; An, S. H.; Clavel, C. M.; Dyson, P. J.; Kock, C. d.; Smith, P. J.; Chibale, K.; Smith, G. S. *Organometallics* **2012**, *31*, 5791. 484  
 (16) Gianferrara, T.; Bratsos, I.; Alessio, E. *Dalton Trans.* **2009**, 7588. 485  
 (17) Hambley, T. W. *Dalton Trans.* **2007**, 4929. 486  
 (18) Ma, D.-L.; Shum, T. Y.-T.; Zhang, F.; Che, C.-M.; Yang, M. *Chem. Commun.* **2005**, 4675. 488  
 (19) Suryadi, J.; Bierbach, U. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 12926. 489  
 (20) Wang, P.; Leung, C.-H.; Ma, D.-L.; Sun, R. W.-Y.; Yan, S.-C.; Chen, Q.-S.; Che, C.-M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2554. 491  
 (21) Patra, M.; Gasser, G. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1232. 492  
 (22) Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. *J. Med. Chem.* **2010**, *54*, 3. 493  
 (23) Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 391. 494  
 (24) Hartinger, C. G.; Metzler-Nolte, N.; Dyson, P. J. *Organometallics* **2012**, *31*, 5677. 496  
 (25) Noffke, A. L.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 5219. 498  
 (26) Cullinane, C.; Deacon, G. B.; Drago, P. R.; Hambley, T. W.; Nelson, K. T.; Webster, L. K. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *89*, 293. 500  
 (27) Butsch, K.; Elmas, S.; Gupta, N. S.; Gust, R.; Heinrich, F.; Klein, A.; von Mering, Y.; Neugebauer, M.; Ott, I.; Schäfer, M.; Scherer, H.; Schurr, T. *Organometallics* **2009**, *28*, 3906. 503  
 (28) Klein, A.; Klinkhammer, K.-W.; Scheiring, T. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *592*, 128. 504  
 (29) Klein, A.; Lüning, A.; Ott, I.; Hamel, L.; Neugebauer, M.; Butsch, K.; Lingen, V.; Heinrich, F.; Elmas, S. *J. Organomet. Chem.* **2010**, *695*, 1898. 508  
 (30) Klein, A.; Schurr, T.; Scherer, H.; Gupta, N. S. *Organometallics* **2007**, *26*, 230. 510  
 (31) Lüning, A.; Schurr, T.; Hamel, L.; Ott, I.; Klein, A. *Organometallics* **2013**, *32*, 3662. 512  
 (32) Takesawa, M.; Morioka, H.; Shibai, H.; Tsuji, J.; Okutsu, M.; Meguro, T. (Ajinomoto Co., Inc.) Jpn. Patent JP61152625A, 1986. 514  
 (33) Khuzaie, R. F.; Rashaan, L. J.; Al-Allaf, T. A. K. *Orient. J. Chem.* **2002**, *18*, 1. 516  
 (34) Henderson, W.; Evans, C.; Nicholson, B. K.; Fawcett, J. *Dalton Trans.* **2003**, 2691. 518  
 (35) Dalla, V. L.; Santi, S.; Di, N. V.; Venzo, A.; Agostinelli, E.; Calcabrini, A.; Condello, M.; Toninello, A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 695. 521  
 (36) Vitagliano, A. *J. Organomet. Chem.* **1974**, *81*, 261. 522  
 (37) De, V. D. A.; Ol'sheev, V. A.; Spevak, V. N.; Skvortsov, N. K. *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, *71*, 1912. 524  
 (38) Fehn, A.; Achenbach, F. (Wacker-Chemie GmbH) Patent EP1077226A1, 2001. 526  
 (39) Thomson, J. (University Court of the University of Dundee) Patent WO2003106734A2, 2003. 527  
 (40) Zuev, V. V.; de Vekki, D. A.; Kuchaev, A. E.; Vorob'ev, M. V.; Skvortsov, N. K. *Russ. J. Gen. Chem.* **2004**, *74*, 1679. 530  
 (41) de Vekki, D. A.; Uvarov, V. M.; Skvortsov, N. K. *Russ. J. Gen. Chem.* **2005**, *75*, 321. 532



- 533 (42) Zuev, V. V.; de Vekki, D. A. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat.*  
534 *Elem.* **2005**, *180*, 2071.
- 535 (43) de, V. D. A.; Skvortsov, N. K. *Russ. J. Gen. Chem.* **2006**, *76*, 116.
- 536 (44) de Vekki, D. A.; Uvarov, V. M.; Bel'skii, V. K.; Skvortsov, N. K.  
537 *Russ. J. Gen. Chem.* **2006**, *76*, 1288.
- 538 (45) Zuev, V. V.; de Vekki, D. A. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat.*  
539 *Elem.* **2006**, *181*, 2063.
- 540 (46) de Vekki, D. A.; Skvortsov, N. K. *Russ. J. Gen. Chem.* **2009**, *79*,  
541 762.
- 542 (47) Miller, T. M.; Izumi, A. N.; Shih, Y. S.; Whitesides, G. M. *J. Am.*  
543 *Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3146.
- 544 (48) Sai, A.; Uchida, H.; Sato, M.; Ogi, K. (Mitsubishi Materials  
545 Corp.) Jpn. Patent JP08157490A, 1996.
- 546 (49) Hitoshi, A.; Sato, M.; Ogi, K. (Mitsubishi Materials Corp.) Jpn.  
547 Patent JP09157851A, 1997.
- 548 (50) Nari, A.; Sato, M.; Ogi, K. (Mitsubishi Materials Corp.) Jpn.  
549 Patent JP09235287A, 1997.
- 550 (51) Sai, A.; Sato, M.; Ogi, K. (Mitsubishi Materials Corp.) Jpn.  
551 Patent JP09287075A, 1997.
- 552 (52) Itsuki, A.; Sato, M.; Ogi, K. (Mitsubishi Materials Corp.) Jpn.  
553 Patent JP10018036A, 1998.
- 554 (53) Chang, Y.; Li, T. (Zhonghao Chenguang Research Institute of  
555 Chemical Industry) People's Republic of China Patent  
556 CN102167908A, 2011.
- 557 (54) Cotsaris, E.; Della, E. W. *Aust. J. Chem.* **1980**, *33*, 2561.
- 558 (55) Mayer, W.; Meier, H. *Chem. Ber.* **1989**, *122*, 509.
- 559 (56) Walkabayashi, K.; Aikawa, K.; Mikami, K. *Heterocycles* **2009**, *77*,  
560 927.
- 561 (57) Wen, F.; Bönnemann, H. *Appl. Organomet. Chem.* **2005**, *19*, 94.
- 562 (58) Clark, H. C.; Manzer, L. E. *J. Organomet. Chem.* **1973**, *59*, 411.
- 563 (59) Shekhar, S.; Hartwig, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13016.
- 564 (60) Herberhold, M.; Schmalz, T.; Milius, W.; Wrackmeyer, B. *J.*  
565 *Organomet. Chem.* **2002**, *641*, 173.
- 566 (61) Goel, A. B.; Goel, S.; Van Der Veer, D. *Inorg. Chim. Acta* **1982**,  
567 *65*, L205.
- 568 (62) Musitu, F. M.; Garcia-Blanco, S. *Acta Crystallogr., Sect. A* **1984**,  
569 *A40*, C101.
- 570 (63) Syed, A.; Stevens, E. D.; Cruz, S. G. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 3673.
- 571 (64) Still, B. M.; Kumar, P. G. A.; Aldrich-Wright, J. R.; Price, W. S.  
572 *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 665.
- 573 (65) Appleton, T. G.; Clark, H. C.; Manzer, L. E. *Coord. Chem. Rev.*  
574 **1973**, *10*, 335.
- 575 (66) Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467.
- 576 (67) Galanski, M.; Arion, V. B.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. *Curr.*  
577 *Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2078.
- 578 (68) Jung, Y.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1387.
- 579 (69) Lippert, B. VCH: Weinheim, Germany, 1999.
- 580 (70) Todd, R. C.; Lippard, S. J. *Metallomics* **2009**, *1*, 280.
- 581 (71) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H.  
582 *Nature* **1969**, *222*, 385.
- 583 (72) Wong, E.; Giandomenico, C. M. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2451.
- 584 (73) Klein, A.; Lüning, A.; Ott, I.; Hamel, L.; Neugebauer, M.;  
585 Butsch, K.; Lingen, V.; Heinrich, F.; Elmas, S. *J. Organomet. Chem.*  
586 **2010**, *695*, 1898.
- 587 (74) Mahamo, T.; Moss, J. R.; Mapolie, S. F.; Smith, G. S.; Slotweg,  
588 J. C.; Lammertsma, K. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 5546.
- 589 (75) Ehni, S.; Luy, B. *J. Magn. Reson.* **2013**, *232*, 7.
- 590 (76) Gershenzon, N. I.; Skinner, T. E.; Brutscher, B.; Khaneja, N.;  
591 Nimbalkar, M.; Luy, B.; Glaser, S. J. *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 235.
- 592 (77) Kobzar, K.; Ehni, S.; Skinner, T. E.; Glaser, S. J.; Luy, B. *J. Magn.*  
593 *Reson.* **2012**, *225*, 142.
- 594 (78) Kobzar, K.; Skinner, T. E.; Khaneja, N.; Glaser, S. J.; Luy, B. *J.*  
595 *Magn. Reson.* **2004**, *170*, 236.
- 596 (79) Kobzar, K.; Skinner, T. E.; Khaneja, N.; Glaser, S. J.; Luy, B. *J.*  
597 *Magn. Reson.* **2008**, *194*, 58.
- 598 (80) Skinner, T. E.; Reiss, T. O.; Luy, B.; Khaneja, N.; Glaser, S. J. *J.*  
599 *Magn. Reson.* **2003**, *163*, 8.
- 600 (81) Skinner, T. E.; Reiss, T. O.; Luy, B.; Khaneja, N.; Glaser, S. J. *J.*  
601 *Magn. Reson.* **2004**, *167*, 68.
- (82) Gerlinger, W.; Sachweh, B.; Braese, S.; Enders, M.; Mueller, T.; 602  
Kasper, G.; Seipenbusch, M.; Gao, K.; Faust, M.; Reichenbach, L. 603  
(Karlsruhe Institute of Technology KIT and BASF SE) US Patent 604  
US20140065060A1, 2014. 605
- (83) Aggarwal, V.; Reichenbach, L. F.; Enders, M.; Muller, T.; Wolff, 606  
S.; Crone, M.; Türk, M.; Bräse, S. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 12794. 607
- (84) Details of the ultra-broad-band pulses are not discussed in this 608  
article and will be published elsewhere. 609



