

**SYNTHESE VON DENDRITISCHEN
REDOXVERBINDUNGEN UND DEREN EINSATZ IN DER
BIOANALYTIK**

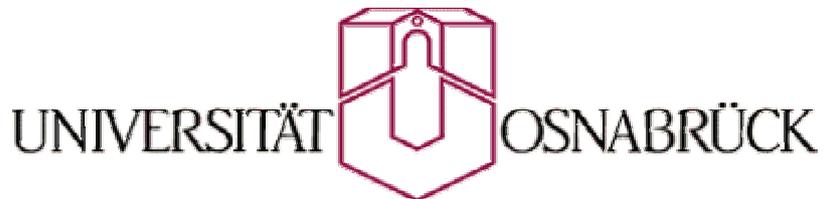
DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS
DER NATURWISSENSCHAFTEN
–DR. RER. NAT.–

VON

WOLFDIETRICH MEYER

AUS BAD SALZUFLEN-SCHÖTMAR



FACHBEREICH BIOLOGIE / CHEMIE INSTITUT FÜR CHEMIE

OSNABRÜCK 2005

Die experimentellen Arbeiten für diese Arbeit wurden von November 2000 bis Oktober 2004 im Institut für Chemie der Universität Osnabrück unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Walder durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. L. Walder, Universität Osnabrück
2. Gutachter: Prof. Dr. M. D. Lechner, Universität Osnabrück

Danksagung:

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. L. Walder für eine interessante Aufgabenstellung, die sehr gute Betreuung und dem guten Klima in seiner Arbeitsgruppe.

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. D. Lechner für die Übernahme des 2. Gutachtens.

Ich danke allen im und um das Labor, die in der einen oder anderen Form mit dem Gelingen dieser Arbeit zu tun hatten. Hier seien in alphabetischer Reihenfolge die wichtigsten genannt: Dorota Andrzejewska, Dr. Carmen Simona Asaftei, Dirk Bongard, Doris Brink, Dr. Alexandra, Siegfried & Birgit Budke, Tesfaye Degefa, meinen lieben Eltern, Marianne Gather, Dr. Christoph Hess alias chess, Andrea Hold, Marta Konkol, Nadin Kröning, Ralf & Elisabeth Michalek, Dr. Martin Moeller, Dr. Wolfgang Moll, Claudia Ratermann, dem Rechenzentrum, Arno Rodenbusch[†], PD Dr. Helmut Rosemeyer, Dr. Peter Schön (Schöntschitschie), Christine Schulz-Kölbel, Kris Siemieniewicz, Albert Takacs, Dr. Olga Vitavska, Simona Webersinn und Klaus-Peter Vogel.

1	EINFÜHRUNG	7
1.1	FUNKTIONALE KASKADEN-MOLEKÜLE: DENDRIMERE	9
1.2	PROTEINIMMOBILISIERUNG FÜR BIOSENSORISCHEN ELEKTRODEN	11
1.2.1	<i>Prinzip der Affinitätschromatographie</i>	12
1.2.2	<i>Modifizierte Grenzflächen als biosensorische Elektroden</i>	13
1.2.3	<i>NTA-modifizierte Grenzflächen</i>	13
1.3	ZIELSETZUNG.....	14
2	SYNTHESE VON VIOLOGEN-DENDRIMERN UND DENDRONEN	16
2.1	SYNTHESE EINES VIOLOGEN-DENDRIMERS.....	16
2.1.1	<i>Synthese der Zentrumsverbindung (Initiatoreinheit)</i>	16
2.1.2	<i>Synthese der Verzweigungseinheit (Crosslinker)</i>	17
2.1.3	<i>Synthese der Endgruppe mit benzylischem Viologen</i>	18
2.1.4	<i>Divergente Synthese des Dendrimers mit Bis(pyridin)ethan als Building Block (0. Generation)</i> . 19	
2.1.5	<i>Konvergente Reaktionsführung zum Dendrimer mit Viologenperipherie</i>	20
2.2	SYNTHESE DER VIOLOGEN-DENDRONEN	21
2.2.1	<i>Synthese der Fokaleinheit</i>	21
2.2.2	<i>Synthese der Viologen-Dendronen (0. und 1. Generation)</i>	22
3	SYNTHESE VON NITRILOTRIESSIGSÄURE (NTA) DERIVATEN ...	25
3.1	PYRROLDERIVATE:	25
3.1.1	<i>N-Pyrrolyl-triethylenglycol-Derivate</i>	26
3.2	MERCAPTODERIVATE	28
3.3	AB-NTA-VORLÄUFER MIT DERIVIERBAREN Γ -NH ₂ -GRUPPE	28
4	ERGEBNISSE	30
4.1	NEUES VIOLOGENDENDRIMER MIT BISPYRIDINETHANSPACER	30
4.1.1	<i>Elektrochemische Messungen am Viologendendrimer mit Bis(pyridin)ethan-Spacer</i>	31
4.1.2	<i>¹H und ¹³C-NMR Charakterisierung der Viologendendrone</i>	34
4.2	ELEKTROCHEMISCHE ANALYSE DER VIOLOGEN-DENDRONE UND DEREN EINSATZ ALS ELEKTRONENLABEL FÜR PROTEINE	36
4.2.1	<i>Einführung</i>	36
4.2.2	<i>Cyclovoltammetrie an Viologen-Dendronen der 1. und 2. Generation</i>	36
4.2.3	<i>Elektrochemie mit Viologendendronen-modifizierten Goldelektroden</i>	38
4.2.3.1	Chemische Verknüpfung der fokalen Carbonsäureeinheit mit einer oberflächengebunden Aminoverbindung.....	38
4.2.4	<i>Cyclovoltammetrie an mit Viologen-Dendronen funktionalisierten Goldelektroden</i>	39
4.2.5	<i>Fazit</i>	40
4.3	VIOLOGENDENDRONE ALS ELEKTRONENLABEL AN PROTEINEN	41

4.3.1	<i>Label-Protein Verknüpfungs-Chemie</i>	42
4.3.2	<i>36 K-Elektronenlabel-Konjugat</i>	42
4.3.3	<i>Cytochrome C-Elektronenlabel-Konjugat; Massenspektrometrische Analyse</i>	43
4.3.4	<i>Elektronentransfer an mit Cytochrome C modifizierten Elektronen</i>	45
4.3.4.1	Oberflächenströme einer Elektronenlabel-Konjugats modifizierten Elektrode	45
4.3.4.2	pH-Titration von Proteinschichten auf Elektrodenoberflächen zur Redoxindikation	47
4.3.5	<i>Fazit</i>	48
4.4	NEUE OBERFLÄCHENAKTIVE NTA DERIVATE	48
4.4.1	<i>Elektrochemisches Verhalten von NTA-Thiol modifizierten Goldelektroden</i>	52
4.4.1.1	Reduktive Desorption von t-Bu-Cystamin-NTA	52
4.4.1.2	pH-Abhängigkeit von Markerströmen einer tert.-Bu-Cys-NTA modifizierten Elektrode	54
4.4.2	<i>XPS- Charakterisierung der tert.-Bu-Cys-NTA bzw. tert.-Bu-Cys -Ni-NTA -modifizierten Goldoberfläche</i>	55
4.4.3	<i>Fazit</i>	57
4.5	ELEKTROPOLYMERISATION VON AKTIVIERBAREN PYRROLDERIVATEN	57
4.5.1.1	Amidknüpfung an oberflächengebundenes N-Propansäure-Polypyrrol.....	58
4.5.2	<i>CV-Ströme eines amidisch verknüpften Viologens an einer N-Propansäurepolypyrrol-Elektrode</i>	60
4.5.3	<i>Anodische Elektropolymerisation und NTA bzw. Ni-NTA Funktionalisierung</i>	60
4.5.3.1	Untersuchung der modifizierten Elektrode.....	61
4.5.3.2	Elektrochemischer Nachweis chelatgebundener Nickelionen	62
4.5.4	<i>Fazit</i>	63
4.6	PROTEIN-MODIFIZIERTE ELEKTRODEN.....	64
4.6.1	<i>DPV-Markerströme an mit KTrA modifizierten Goldelektrode</i>	64
4.6.2	<i>Fazit</i>	66
4.7	QCM UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEIN-PROTEIN INTERAKTION VON G-AKTIN UND C-ÜNTEREINHEIT	67
4.7.1	<i>Fazit</i>	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	EXPERIMENTELLER TEIL.....	74
6.1	ANALYSEGERÄTE	74
6.2	CHEMIKALIEN.....	74
6.3	SYNTHESEN	75
6.3.1	<i>Etablierte Standardmethoden zum Anionenaustausch von Viologensalzen</i>	75
6.3.2	<i>1-[3,5-bis(hydroxymethyl)benzyl]-4-(2-pyridin-4-ylethyl)pyridinium</i>	76
6.3.3	<i>N,N'-Bis(3,5-Di-(N-Bispiridinethanmethyl)-phenyl)4,4'-Bipyridinium hexafluorophosphat</i>	77
6.3.4	<i>Vorstufe zum Dendrimer der 0. Generation</i>	78
6.3.5	<i>3,5-Di-(N'-ethyl-4,4'-bipyridinium)methyl-hydroxymethyl-benzyl-bis(piridin)ethan</i>	79
6.3.6	<i>Dendrimer 0. Generation 14</i>	80
6.3.7	<i>3,5-Di-(N'-ethyl-4,4'-bipyridinium)methyl-hydroxymethyl-benzol-tetra(hexafluorophosphat)</i>	81
6.3.8	<i>4,4'-Bipyridinium-N-methylbenzyl-3,5-(Bis(ethyl-4,4'-pipyridinium)-hexafluorophosphat</i>	82

6.3.9	<i>Carboxybenzyl-3,5-(Bis(ethyl-4,4'-bipyridinium)-hexafluorophosphat</i>	84
6.3.10	<i>“6-Viologen-Dendron-ol” I2</i>	85
6.3.11	<i>“6-Viologen-Dendronsäure” I3</i>	87
6.4	SYNTHESE DER PYRROL-NTA-DERIVATE.....	88
6.4.1	<i>1-(3-Hydroxypropyl)pyrrol</i>	88
6.4.2	<i>3-(1H-pyrrol-1-yl)propyl 1H-imidazole-1-carboxylate</i>	89
6.4.3	<i>N²,N²-Dimethylcarboxy-N⁶-{2-(1H-pyrrol-1-yl)-propyloxy}-carbonyl}lysin</i>	90
6.4.4	<i>Triethylenglycol-tosylat und Triethylenglycol-di-tosylat</i>	90
6.4.5	<i>2-{2-[2-(1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethanol</i>	92
6.4.6	<i>2-{2-2-(1H-pyrrol-1-yl)ethoxy}ethyl 4-methylbenzolsulfonat</i>	93
6.4.7	<i>Pyrrol(TEG)-ABNTA</i>	94
6.5	MERCAPTO-NTA-DERIVATE	95
6.5.1	<i>2-[bis(carboxymethyl)amino]-4-(tert-butylthio)butanol Säure</i>	95
6.5.2	<i>Di-S,S’-[2-[Bis(carboxymethyl)amino]-4-mercaptobutanol Säure]</i>	96
6.6	ELEKTRODEN-MODIFIKATION	96
6.6.1	<i>Elektropolymerisation</i>	96
6.6.2	<i>Oberflächenreaktionen an Polypyrrolfilm-Elektroden</i>	97
6.6.2.1	Amidische Knüpfung eines Viologenderivats an einen N-(Propansäure)-polypyrrolfilm	97
6.6.2.2	Amidische Knüpfung von AB-NTA an einen N-(Propansäureperfluorphenylester)-polypyrrolfilm...	97
7	ABKÜRZUNGEN.....	98
8	LITERATUR.....	99
9	ANHANG.....	104
9.1	VERÖFFENTLICHUNGEN	104
9.2	CURRICULUM VITAE.....	104
9.3	ERKLÄRUNG	106

1 Einführung

Vor rund 20 Jahren entstand ein neuer Zweig der synthetischen Chemie: Die Dendrimerchemie: Erstmals wurden durch repetitive Synthesestrategien^[1] Kaskaden-Molekül synthetisiert und erste Anwendungen beschrieben^[2-4]. Als Vorlage dazu mag die Verästelung biologischer Systeme wie z.B. der Blutgefäße in Abbildung 1 und die damit einhergehende Erhöhung ihrer Effizienz, zur Verteilung des Sauerstoffes im Gewebe von Bedeutung gewesen sein. Inzwischen sind Dendrimere mit ganz unterschiedlichen Kernen, Verzweigungseinheiten und Endgruppen entstanden. Im einfachsten Fall addieren sich die identischen Funktionen der einzelnen repetitiven Einheiten zu einer amplifizierten Überfunktion im Dendrimer. Werden in den einzelnen Kaskadenschritten verschiedene Monomere mit unterschiedlichen Funktionen (elektroaktiv, photoaktiv, „molekular erkennend“) eingeführt, so können eventuell bisher unbekannte Überfunktionen im Dendrimer als komplette Einheit erreicht werden. Im einfachsten Fall kann das ein radialer Gradient von der Peripherie zum Kern sein. Das exponentielle Wachstum der peripheren Untereinheiten beim Aufbau von Dendrimeren bewirkt zudem eine „erzwungene sterische Proximität“ bestimmter funktioneller Gruppen an der Oberfläche der Dendrimere, bzw. eine sich daraus ableitende „Leere“ im Inneren dieser Strukturen. Beide Aspekte können wiederum für Anwendungen genutzt werden.

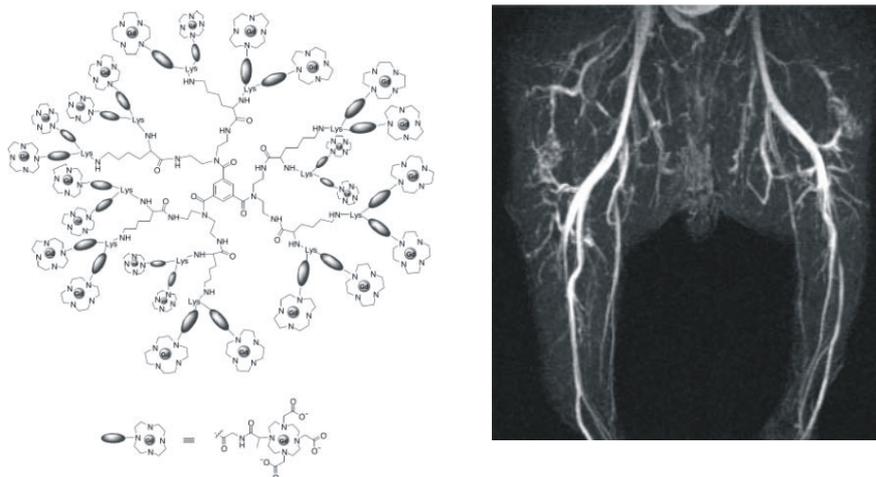


Abbildung 1: links: Aufbau des dendritischen Gd(III)-Komplexes Gadomer-17 zur Anwendung als Kontrastmittel in der MRI (hier 2. Generation). rechts: Kontrastverstärkte MRI-Abbildung (Blutgefäße einer Hundelunge) nach Injektion von Gadomer-17 (Dosis 50 μmol pro kg Körpergewicht)^[5].

Ein eindrucksvolles Beispiel für den Einsatz der Dendrimere als molekulare Werkzeuge, stellt das PAMAM-Dendrimer dar (siehe Abbildung 1), welches in der sechsten Generation 192

reaktive Amin-Endgruppen besitzt, die mit einem Gd(III)-Chelatkomplex (Gadomer 17) verknüpft wurden. Von *Wiener et al.* wurde dieses Dendrimer als Kontrastmittel im medizinischen Magnetresonanz-Imaging (MRI)-Verfahren eingesetzt^[6, 7]. Aufgrund der hohen Dichte des Kontrastmittels Gd(III) im Dendrimer und bedingt durch seine Größe bei gleichzeitiger Unterdrückung der Abdiffusion des Kontrastmittels in die extrazelluläre Matrix, konnte die Menge des Kontrastmittels erheblich gesenkt werden und gleichzeitig das Zeitfenster des Imaging erhöht werden. Dieses Beispiel zeigt eindrücklich, dass die Dendrimer-Architektur hervorragend geeignet ist, innovative Zielmoleküle zu designen.

Fréchet et al. haben gezeigt wie sich mit Hilfe der Dendrimer-Architektur aktive Zentren einschließen lassen und so das Kompartimentierungsprinzip der Natur in der Biomimetik verwirklicht werden kann: Ein vierbindiges Porphyrinaggregat wird als Zentrumseinheit mit großen Dendronen versehen, so dass ein sphärisches Molekül entsteht, in dem das Porphyrin im Dendrimer eingebettet ist und die Dendrimer-Seitenkette die Funktion des Aminosäurenketten simulieren^[8, 9].

Aber nicht allein bei der Nachahmung von natürlichen Molekülen, sondern auch zur Markierung von Proteinen haben sich dendritische Strukturen als hilfreich und z. T. sogar als überlegen gegenüber der Markierung mit monomeren „Labels“ erwiesen. *Giovannoni et al.* haben mit einer Serie von dendritischen Peptidderivaten Hochfluoreszenz-Label für ein Calcium bindendes Protein Calmodulin hergestellt und kovalent verknüpft^[10].

Die hochsymmetrische, sphärische Struktur der Kaskaden-Molekül ermöglicht definierte monomolekulare Oberflächenbeschichtungen durch unspezifische Adsorption, da die Funktion der Moleküle unabhängig von ihrer Orientierung ist.

Die Entwicklung neuer oberflächensensitiver Techniken wird durch die Dendrimerforschung ermöglicht und lässt neue Forschungsbereiche entstehen, welche die Chemie mit den Materialwissenschaften und der Biologie verbindet. Entsprechend dieses Trends, finden sich in den letzten 15 bis 20 Jahren zunehmend Arbeiten, die sich mit chemischen und bioanalytischen Fragen auf dem Gebiet der oberflächensensitiven Techniken befassen^[11]. Synthetische Moleküle ebenso wie Biomoleküle können in definierter Form oberflächenfixiert werden, so dass sie ihre chemischen Funktionen bzw. ihre biologischen Aktivitäten beibehalten und mit analytischen Methoden bis in atomare Bereiche untersucht werden können^[12-14].

1.1 Funktionale Kaskaden-Moleküle: Dendrimere

Kaskaden-Moleküle sind monodisperse, strukturell perfekte Moleküle. Der Ausdruck Kaskaden-Moleküle deutet an, dass solche Verbindungen auf stufenweise, synthetische Entwicklungen zurückzuführen sind. Ein Zentrumsatom oder -molekül wird von sich wiederholenden „Generationen“ von Zweigen umgeben, welche sich wieder und wieder in weitere identische Zweige aufspalten bis eine nahezu perfekte sphärische „Kugelverbindung“ entsteht^[15].

Wenn die Synthese der Kaskaden-Molekül oder Dendrimere, wie gerade beschrieben, vom Zentrum zur Peripherie stattfindet, wird von einer „divergenten Synthesestrategie“ gesprochen. Wenn die dendritischen „Äste“ zuerst synthetisiert und dann um einen Kern angeordnet werden, wird von der „konvergenten Synthese“ gesprochen^[4] (weitere Ausführungen siehe auch in Kapitel 2).

Die synthetischen Strategien geben die Designstruktur von funktionalen Dendrimeren vor: Um ein Dendrimergerüst, in Form von Chromophoren, Ionophoren, Rezeptoren, Katalysatoren oder molekularen Schaltern, zu funktionalisieren, können zwei allgemeine Wege besprochen werden (siehe Abbildung 2): Entweder wird a) eine funktionale Gruppe (Kreissymbol) mit dendritischen, keilförmige Segmenten ummantelt („Dendryl-Reste“ oder „dendritischen Substituenten“, siehe Nomenklaturvorschläge von *Vögtle* in ^[16]) oder b) ein dendritisches Gerüst an den peripheren Endgruppen (zumeist Amine, Halogenide oder Alkohole) mit funktionalen Einheiten verknüpft.

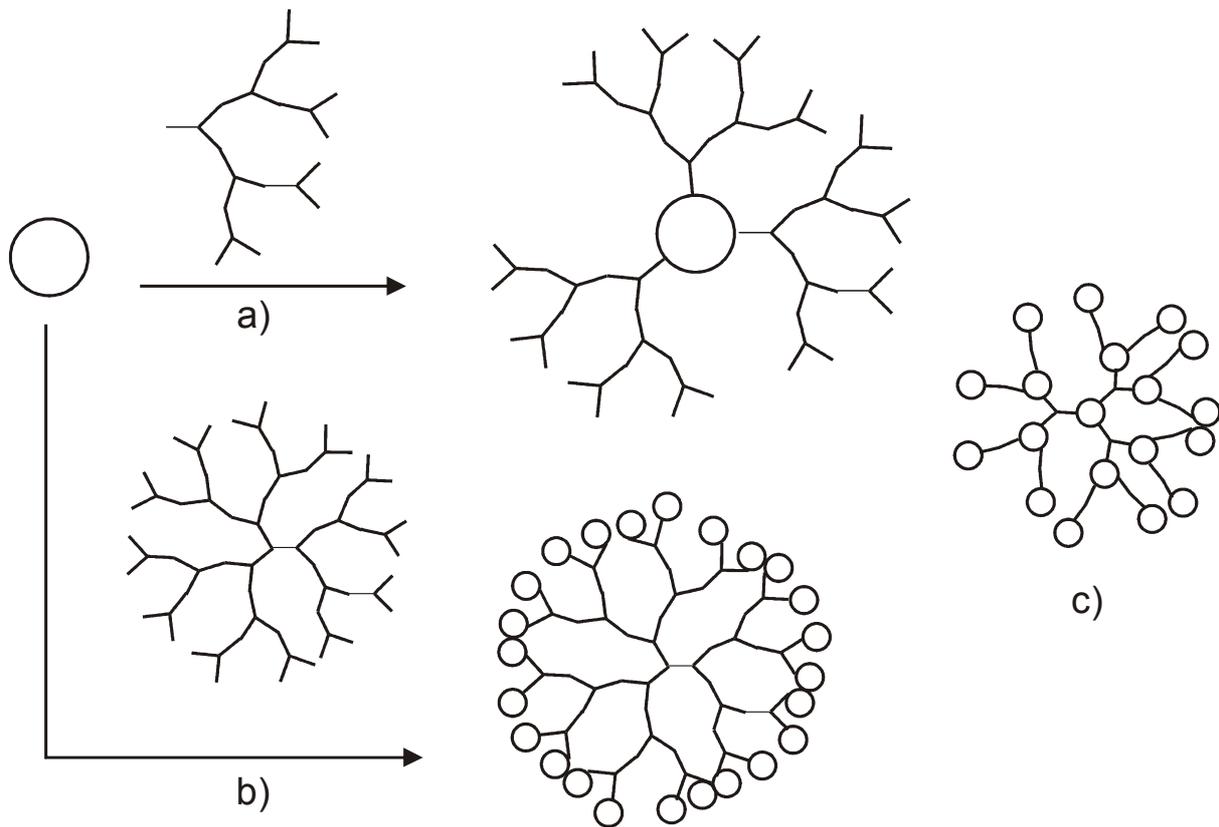


Abbildung 2: a) Funktionalisierung (Kreis) von Dendrimern durch Ummantelung des funktionalen Zentrums mit dendritischen Resten b) Knüpfung von funktionellen Gruppen an die Peripherie eines Dendrimers. c) vollständig funktionalisiertes Dendrimer.

Die Wege a) und b) sind die in der Literatur am häufigsten beschriebenen Synthesewege. Dies ist durch die Tatsache bedingt, dass PAMAM-Dendrimere und Dendrone kommerziell erhältlich sind^[17, 18]. Beispielsweise wurde ein dendritisch ummantelter Ruthenium-Bipyridin Komplex synthetisiert, welcher in diesem Fall durch die dendritische Hülle Schutz vor Lösemittelmolekülen und gelöstem Sauerstoff in Lösung erfährt und so längere Lebenszeiten im photoangeregten Zustand aufweist als ohne Ummantelung^[19, 20]. Ebenso wurde ein Metalloporphyrin von *Inoue et al.*^[21] dendritisch eingeschperrt, wobei die von *Fréchet* entwickelte Synthesestrategie eingesetzt wurde. Der angeregte Zustand des verpackten Porphyrins wird je nach Größe des Dendrimers verschieden schnell von denen in Lösung befindlichen Molekülen „gequencht“.

Ein photo-schaltbares Azobenzene-Dendrimer von *Vögtle* und *Balzani* sei als Vertreter des Dendrimertyps b) genannt. Die bis zu 32 peripheren Azobenzengruppen dieser Dendrimere (vierte Generation) unterliegen unter Lichteinwirkung einer Z/E Photoisomerisation. Trotz ihrer erzwungenen sterischen Nähe zueinander verhalten sich die Azobenzeneinheiten weitestgehend unabhängig^[22, 23].

Die funktionellen Dendrimere des Typs c) sind mit funktionellen Gruppen durch das ganze Dendrimergerüst versehen und stellen (in Anbetracht der hohen Anzahl an Publikationen zum

Thema der Dendrimere) die Ausnahme dar. *S. Heinen* aus unserem Arbeitskreis liefert zu diesem Typus Dendrimer große Vorarbeiten zu Viologendendrimeren mit hohen Elektronenschwammeigenschaften, die in der Lage sind, bis zu 90 Elektronen pro Molekül aufzunehmen bzw. abzugeben^[24]. Auch wurden generationsabhängige Potentialverschiebungen beobachtet.

1.2 Proteinimmobilisierung für biosensorischen Elektroden

In den letzten Jahren ist das Interesse an Biosensoren stark gewachsen. Diese Sensoren können in der medizinischen Diagnostik und in der Umweltkontrolle eingesetzt werden^[25].

Zum Nachweis von Proteinwechselwirkungen werden dazu häufig oberflächenfixierte Proteine eingesetzt. Die Signaltransduktion erfolgt dann amperometrisch, voltammetrisch oder optisch. Zur Herstellung solcher Oberflächen bedarf es der reproduzierbaren Immobilisierung von Proteinen auf dem gewünschten Träger. Es werden drei Methoden der Immobilisierung unterschieden (siehe Abbildung 3). Die schnellste und einfachste Art der Immobilisierung ist wohl die unspezifische adsorptive Methode, bei der die sensorische Oberfläche einfach einer Proteinlösung ausgesetzt wird. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Ausrichtung der Proteine statistisch verteilt ist und so nicht jedes Protein effektiv wirken kann. Zudem liegt die Proteinschicht in kondensierter Form vor und die Denaturierung empfindlicher Proteine kann die Folge sein.

Eine kovalente Immobilisierung (siehe Abbildung 3b) erfolgt über eine zuvor aktivierte Oberfläche. Oberflächenverknüpfte Spacer mit einer aktiven oder aktivierbaren Kopfgruppe reagieren mit den Amino-, Carboxy- oder Hydroxygruppen des Proteins. Die räumliche Ausrichtung der oberflächengebundenen Proteine kann teilweise gelenkt werden. Außerdem ist eine Konzentrationskontrolle durch Einsatz von inerten Co-Spacereinheiten möglich.

Die eleganteste Weise Proteine zu immobilisieren besteht in der Modifizierung einer Grenzfläche, die selektiv affin gegenüber Proteinen oder Proteingruppen ist (c) und deren Affinität ev. chemisch oder physikalisch geschaltet werden kann. Wie in b) wird zunächst eine Oberfläche modifiziert, welche spezifische Akzeptoreigenschaften gegenüber Protein-Tags besitzen.

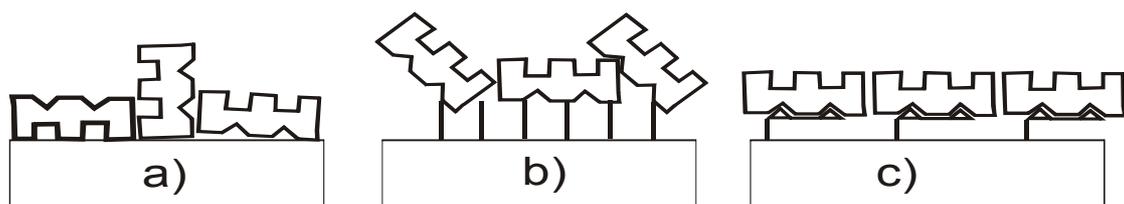


Abbildung 3: Immobilisierungsmöglichkeiten von Proteinen auf eine Oberfläche: a) adsorptiv, b) kovalent und c) affin.

Die zwei am häufigsten auftretenden Akzeptor-Donorsysteme in der Proteinaffinitätschromatographie sind: a) His-Tag / Metall-NTA-Chelator Verbindungen zum einen und b) Strep-Tag Protein / Avidin Fusionsproteine zum anderen.

1.2.1 Prinzip der Affinitätschromatographie

Zur Isolierung von Proteinen aus der Zelllösung werden die Proteine mit Affinitätspeptid-Anhängsel, den so genannten „tags“ (engl.: für Anhänger oder Marke) mittels gentechnischen Methoden versehen.

Die Tag-Proteine können in einem Schritt über eine chromatographische-Säule aus der Zelllösung isoliert werden: Die Chromatographiematrix ist mit einem für den Tag hochspezifischen Rezeptor versehen (siehe Tabelle 1), welcher das Protein im Falle der Metallchelatmatrix komplexiert bzw. fusioniert, wenn es sich um eine Avidin- oder Streptavidinmatrix handelt. Die gebundenen Proteine werden mittels Kompetitiven (Biotin verdrängt Strep-Tag-Proteine und Imidazol derivate His-Tag Proteine) eluiert^[26, 27].

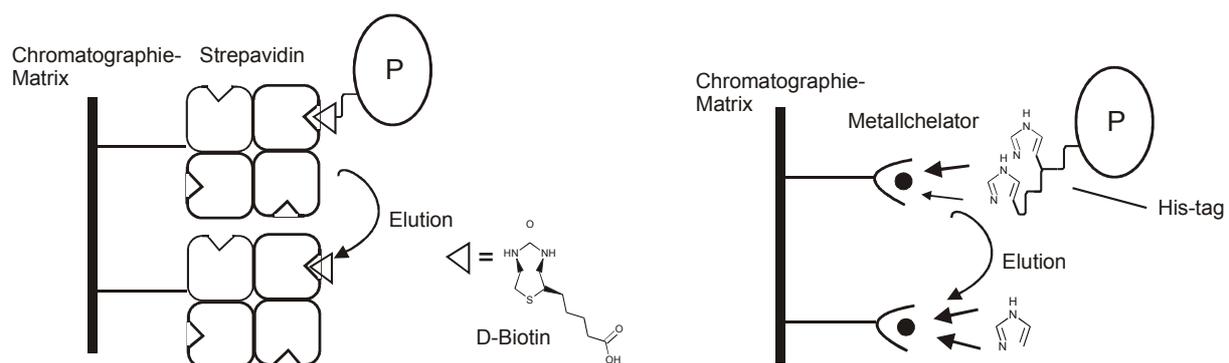


Abbildung 4: Prinzip der Affinitätschromatographie; links: Nach Fusion der Strepavidinmatrix mit Strep-Tag Protein (P). Die Elution verläuft kompetitiv mit Biotin-Derivaten. rechts: His-Tag Protein (P) koordiniert über Histidinreste des Tags an Ni-NTA-Matrix. Protein wird durch Imidazol verdrängt.

Tag-Bezeichnung / Peptidsequenz	K_a [M^{-1}]
His ₆ - oder His ₁₀ - Tag / ...-(His) ₆ oder ..-(His) ₁₀	[Ni-NTA / (His) ₆] = $3 \cdot 10^6$ aus ^[28]
Strep-Tag / ...-Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly-COOH	[Avidin / Biotin] = 10^{15} aus ^[29]
Strep-Tag II / ...-Asn-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-...	

Tabelle 1: Die gängigsten Affinitätstags für die Proteinreinigung und ihre Aminosäuresequenzen. Assoziationskonstanten wichtiger Bindungen.

Ein besonderer Vorteil beider Systeme liegt in der wieder verwendbaren Affinitätsmatrix beider Systeme, die durch die geringen unspezifischen Adsorptionen von Fremdproteinen zu erklären ist. Weiterhin sind die Elutionsverfahren in der Regel so schonend, dass quaternäre

wie tertiäre Strukturen der rekombinanten Proteine nicht beeinträchtigt werden^[30]. Die Affinitätschromatographie stellt daher die leistungsstärkste Isolationsmethode von Proteinen dar.

1.2.2 Modifizierte Grenzflächen als biosensorische Elektroden

Biosensorische Applikationen sind analytische Werkzeuge, welche (bio)chemische Erkennungen mit physikalischen Übersetzern, den Transducern, verbinden. Die biochemischen Komponenten können, Enzyme, Proteine, Peptide, DNS-Sequenzen, chemische Gruppen und sogar ganze Mikroorganismen sein. Dabei wird ihre natürliche Affinität oder katalytische Wirksamkeit gegenüber dem Analyten genutzt und geschickt in eine chemische oder physikalische Messgröße übersetzt (siehe schematischer Aufbau in Abbildung 5).

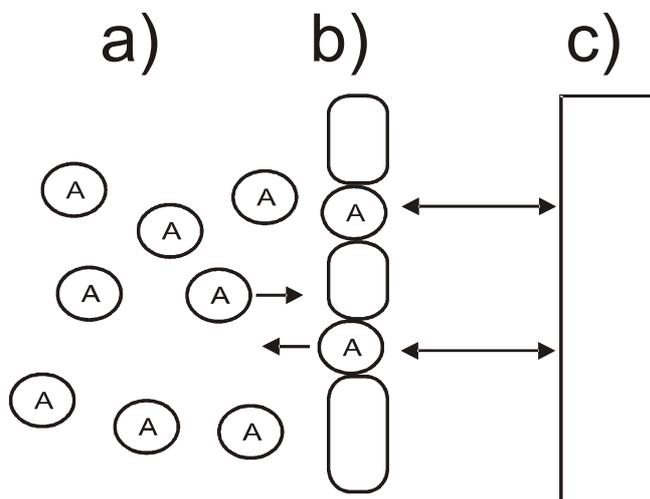


Abbildung 5: Prinzip eines Biosensors: a) Analyt in Matrix, b) biologische oder chemische Komponente über eine Oberfläche c) dem Transducer.

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Methoden handelt es sich um ampero-, potentio- und gravimetrische Messverfahren, bei denen die Messgröße ein elektrischer Strom, ein elektrochemisches Potential oder eine Frequenzänderung ist.

1.2.3 NTA-modifizierte Grenzflächen

Die in 1.2.1 vorgestellten affinitätschromatischen Prinzipien lassen sich auf sensorische Grenzflächen übertragen. Chelator-funktionalisierte Alkantiolen und Lipide wurden synthetisiert^[31-35] und während des Schreibens dieser Arbeit wurde die Synthese einer elektropolymerisierbaren NTA-Pyrrol-Verbindung von *Haddour* vorgestellt^[36]. Die Grenzflächen werden mit der affinen Gruppe (NTA), auf silanisierten Glaträgern oder polymermodifizierten (Gold)-Elektroden verknüpft^[37-41]. Nach einer derartigen Modifikation

wird die Chelatorgruppe mit einem Metallion (zumeist Ni^{2+}) beladen und His-Tag Proteine können reversibel immobilisiert werden.

An auf diese Weise immobilisierten His-Tag-Proteinen wurden Affinitätsstudien mit oberflächensensitiven Methoden durchgeführt^[42]. Es sind 2-D-Proteinkristallisationen^[43, 44] und kraftspektroskopische Einzelmolekülmessungen gelungen^[45, 46].

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es neue elektroaktive Dendrimere zu designen, deren redoxaktive Zentren und ihre ebenfalls redoxaktive Peripherie, sterisch, wie elektrisch voneinander isoliert sind. Auf diese Weise sollen Zielmoleküle entstehen, welche sich mittels elektrochemischer Methoden vermessen lassen und auf intra- und intermolekulare Elektronentransferphänomene untersucht werden können. Die Dendrimere sollen als biomimetische Verbindungen fungieren, die ähnlich wie katalytische Proteine redoxaktive Zentren mit einem Proteinmantel abschirmen, um selektive Reaktionsführungen im lebenden Organismus zu gewährleisten.

Die Poly-Redoxeeigenschaften der Dendrimere sollen außerdem dazu genutzt werden, um elektroaktive Proteine mit einem Multielektronenlabel zu versehen, um diese elektrochemischen Analysemethoden zugänglich zu machen.

Es sollen alle zur elektrochemischen und gravimetrischen Erfassung von Nanopartikel-Interaktionen notwendigen Bereiche erarbeitet werden (siehe Abbildung 6). Konkret sind dies die folgenden Gebiete:

Proteinsensitive Oberflächen von Elektroden- und Quarzoberflächen sollen entwickelt werden und das potentiometrische, voltammetrische oder gravimetrische Verhalten gegenüber Analyten untersucht werden.

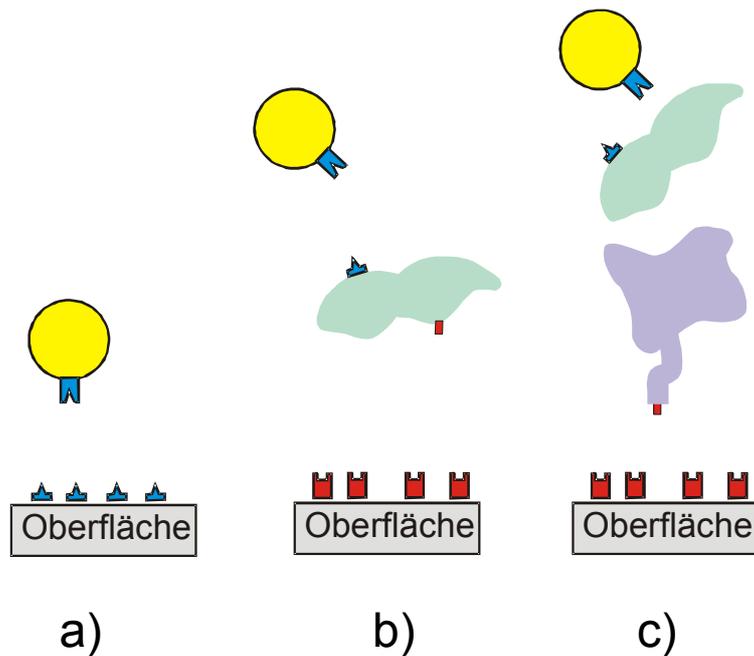


Abbildung 6: a) Reversible oder irreversible Label modifizierte Oberfläche; b) Modifizierte Oberfläche zur reversiblen Proteinbindung; c) wie b) um Protein-Protein-Komplex erweitertes System. Redoxlabel (gelb), Verknüpfungselemente (blau und rot).

Für Elektroden, die selektiv His-Tag-Proteine immobilisieren, sollen neue Nitrilotriessigsäure (NTA)-Derivate synthetisiert werden, die zum einen oberflächenaktiv sind und zum anderen den Elektronentransfer zur Elektrode gewähren. Oberflächengebundene Ni-NTA-Verbindungen haben sich in der Affinitätschromatographie bewährt, da Fusionsproteine mit His-Tag isoliert werden können^[47]. Dieses Prinzip ist von *Whitesides et al*^[48] bereits erfolgreich in Form von Thioalkyl-Ni-NTA Monolayern auf Goldgrenzflächen übertragen worden. Die eingesetzten Verbindungen eignen sich jedoch wenig für eine Elektrodenderivierung, da die langen Alkylreste der Monolayerschicht als elektrischer Isolator zwischen Elektrode und der Bulklösung wirken und einen Elektronentransfer zu Elektrode verhindern. In dieser Arbeit sollen also NTA-Kopfgruppen-Verbindungen mit kürzeren Spacern synthetisiert werden, so dass der heterogene Elektronentransfer garantiert ist. Auf derartig modifizierten Elektroden sollen immobilisierte His-Tag-Proteine mit elektrochemischen Methoden in Bezug auf Interaktionen mit potentiellen Fusionsproteinen und Co-Faktoren untersucht werden.

2 Synthese von Viologen-Dendrimern und Dendronen

In der Dendrimerchemie werden zwei fundamentalen Synthesemethoden unterschieden, die an dieser Stelle zur Begriffserläuterung aufgeführt werden: a) In der „divergente Synthese“ wird das dendritische Gerüst, ausgehend von einem zentralen Initiator-Kern, über alternierende Kopplungs- und Aktivierungsschritte hin zur makromolekularen Peripherie aufgebaut. Der erste Syntheseschritt besteht darin die Monomereinheit, die Verzweigungselement oder den Crosslinker, mit dem polyfunktionalen Initiator-Kern zu verknüpfen. Durch Wiederholung des Zweistufencyclus (Kopplungs- nach Aktivierungsschritt) entsteht eine neue Generation des Dendrimers^[2, 49-51]. b) Die Konvergente Synthese wurde von *Hawker* und *Fréchet*^[51] ebenfalls von *Miller* und *Neenan*^[52] entwickelt und beginnt mit der Synthese der peripheren Strukturelemente (den Dendronen), d.h. eine Synthese von außen nach innen. Es sind auch gemischte Formen^[53] dieser beiden Methoden angewandt worden und eine konvergente Arbeitsweise mit doppeltem exponentiellem Wachstum der Dendrone^[54].

2.1 Synthese eines Viologen-Dendrimers

2.1.1 Synthese der Zentrumsverbindung (Initiatoreinheit)

Abbildung 7 zeigt das Syntheschema des verwendeten Initiator-Kerns. Es fand bereits früher als Dendrimer-Kern in den von uns beschriebenen Viologendendrimern mit Elektronenfalleneigenschaften Verwendung^[55]. Bipyridin **1** wurde mit 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol zu N,N'-Bis-(2,4-Dinitro)phenyl-4,4'-bipyridinium Dichlorid **2** diaryliert und in einem anschließendem Schritt mit 3,5-Di(hydroxymethyl)anilin zu einem phenylischen Viologen dem Tetraalkohol **3** umgesetzt, welches wiederum durch Substitution mit HBr zum Tetrabromid überführt wurde.

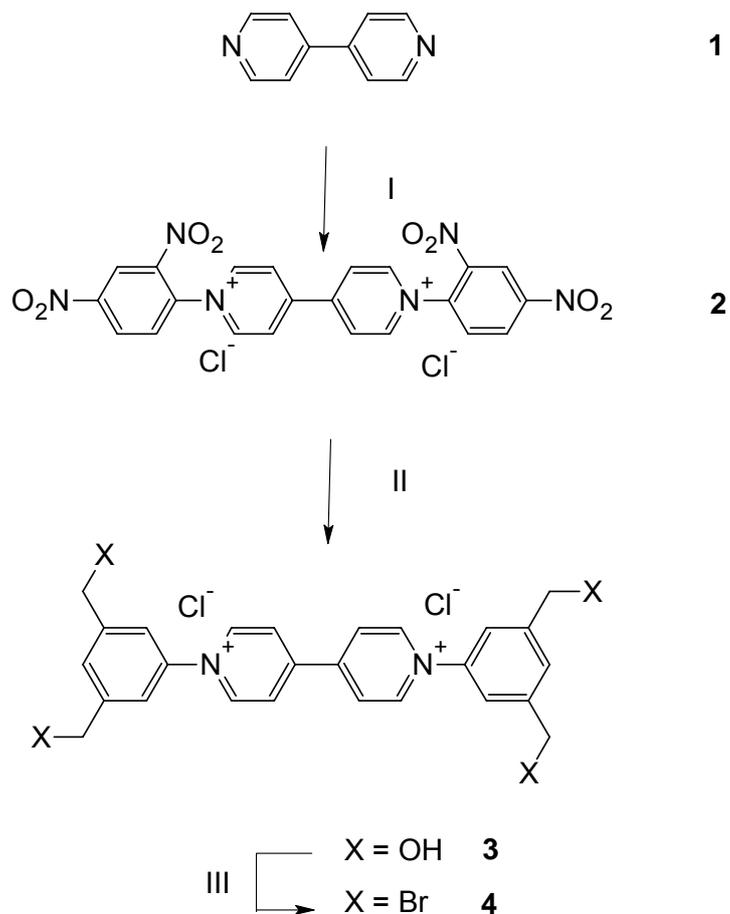


Abbildung 7: I 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol, MeCN; II Dihydroxymethylanilin, MeOH; HBr/AcOH

2.1.2 Synthese der Verzweigungseinheit (Crosslinker)

Der Crosslinker 1-[3,5-Bis(hydroxymethyl)benzyl]-4-(2-pyridin-4-ylethyl)pyridinium **5** wurde durch Umsetzung von 3,5-Di(hydroxymethyl)benzylbromid mit Bis(pyridin)ethan in trockenem THF erhalten wobei lediglich das monoalkylierte Produkt als Bromidsalz **5** in guter Ausbeute ausfiel. Diese Verbindung ließ sich leicht durch Anionenaustausch in **5a** überführen.

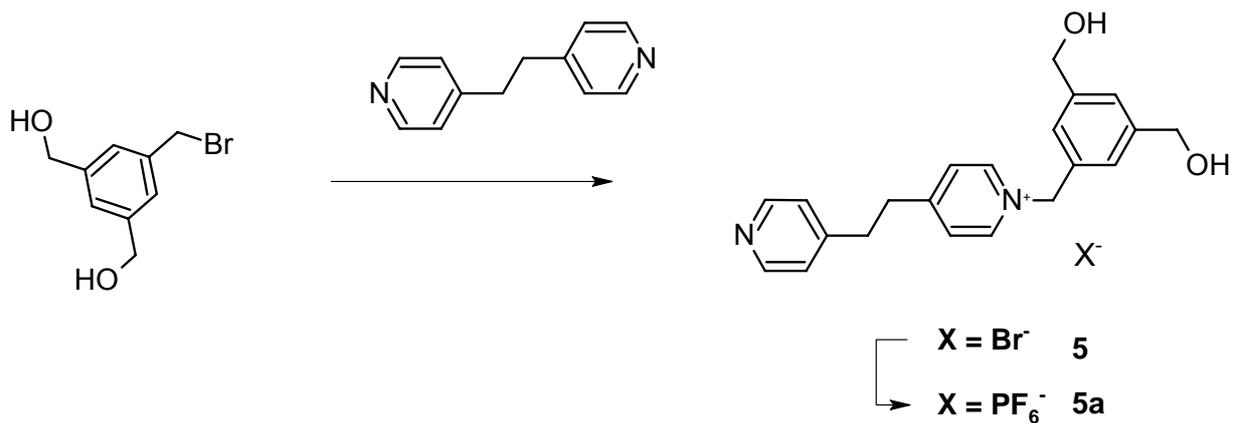


Abbildung 8: Synthese von 1-[3,5-bis(hydroxymethyl)benzyl]-4-(2-pyridin-4-ylethyl)pyridinium.

2.1.3 Synthese der Endgruppe mit benzylichem Viologen

Löslichkeitsprobleme bei der divergenten Synthese von Dendrimeren mit dem Bis(pyridin)ethan Baustein wurde durch eine konvergente Synthese umgangen. Es wurden Dendronen mit benzylichen Viologen in der Peripherie und einem Bis(pyridin)ethylrest, der repetitiven Einheit, als Fokaleinheit synthetisiert (Abbildung 9).

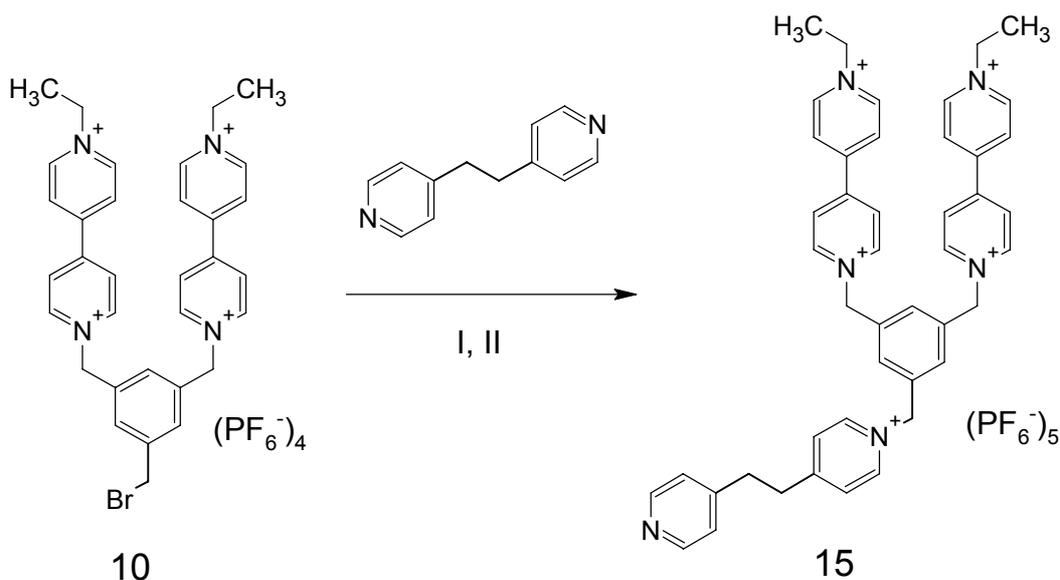


Abbildung 9: Konvergente Synthese zu **15**: I) Bis(pyridin)ethan, MeCN; II) TBABr/ MeCN; $\text{NH}_4\text{PF}_6/\text{H}_2\text{O}$.

Die Synthese von **10** wird in 2.2.2 beschrieben. Bis(pyridin)ethan greift nucleophil am benzylichen Bromid von **10** an und konnte nach doppeltem Anionenaustausch analysenrein erhalten werden. Der doppelte Anionenaustausch wurde notwendig, da das entstehende Produkt nicht ausfiel. Durch Zugabe von TBABr/ MeCN wurde das Dendron so von dem überschüssigen nicht ionischen Edukt getrennt und konnte in wasserlösliche Form nach weiterem Anionenaustausch als **15** erhalten werden.

2.1.4 Divergente Synthese des Dendrimers mit Bis(pyridin)ethan als Building Block (0. Generation)

Ausgehend von der Initiatorverbindung **4** (siehe Abbildung 10) wurde in Gegenwart von 5 Eq. Bis(pyridyl)ethan (25 % Überschuß) in heißem MeCN die 0. Generation der gewünschten Dendrimervorstufe **6** erhalten (siehe Abbildung 10), welche unter den gewählten Reaktionsbedingungen als gelbbraunlicher Feststoff in über 90 %iger Ausbeute ausfiel. Dieser Niederschlag löste sich leicht in Wasser und es wurde in 10 %ige wässriger NH_4PF_6 -Lösung das PF_6 -Salz **6a** erhalten. Der Anionenaustausch wurde notwendig, um die gewonnenen Pyridinium-Salze für Reaktionen in polare organische Lösungsmittel überführen zu können. Ein angenehmer Nebeneffekt des Anionenaustauschs war die gleichzeitige Aufreinigung des Salzes von Einschlussverbindungen.

6a wurde unter gleichen Bedingungen mit Di(hydroxymethyl)benzylbromid umgesetzt und auf diese Weise wurde Dendrimer **7** (siehe Abbildung 10) erhalten. Außerdem konnte das Dendrimer direkt aus der Initiatorverbindung **4** und dem monoalkylierten Pyridinium(pyridyl)ethan-Salz **5a** gewonnen werden. Die ausgefallenen Reaktionsprodukte waren allerdings schwerlöslich und ließen sich weder in Wasser noch polaren organischen Lösungsmittel (DMF, DMSO, Nitromethan) lösen.

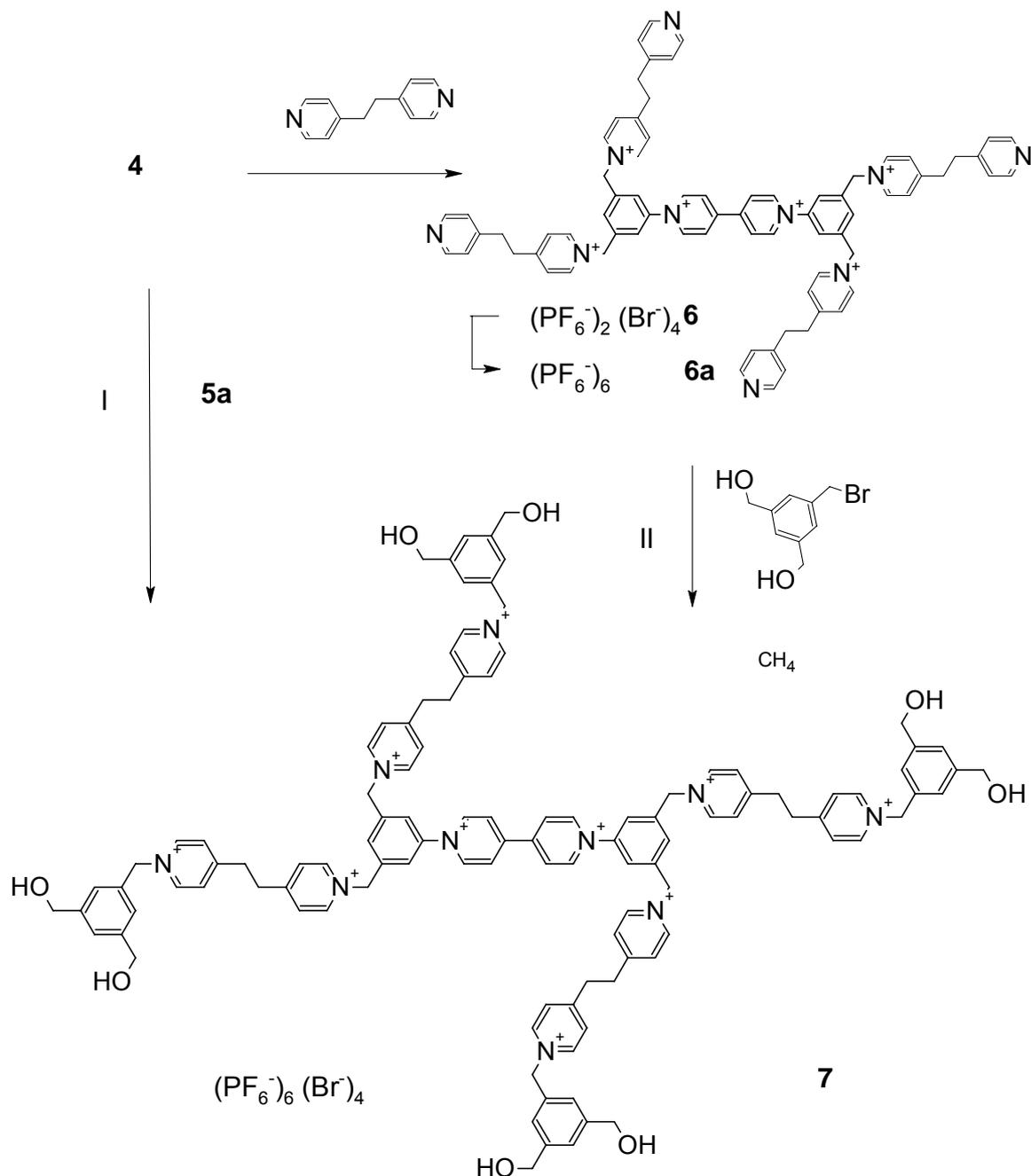


Abbildung 10: I) **5a**, MeCN, 70 °C; II) Di(hydroxy)methylbenzylbromid, MeCN, 70 °C.

2.1.5 Konvergente Reaktionsführung zum Dendrimer mit Viologenperipherie

Auf Grund der Schwerlöslichkeit der Verbindungen **6** und **7** (siehe 2.1.4) wurde der divergente Syntheseweg aufgegeben und es wurde versucht die Synthese über einen konvergenten Weg zu realisieren. Im Folgenden wurden die „fertig“ synthetisierten „Äste“ (die Dendronen), mit der Zentrumseinheit verknüpft. **11** (Synthese beschrieben in 2.2.2) ist ein solches Dendron, welches Viologene in der Peripherie enthält und eine monosubstituierte

Bis(pyridin)ethaneinheit als Fokaleinheit mit freien Elektronenpaar am Pyridinstickstoff hat, welches nucleophil an den benzylichen Benzylbromiden der Zentrumseinheit **4** angreift.

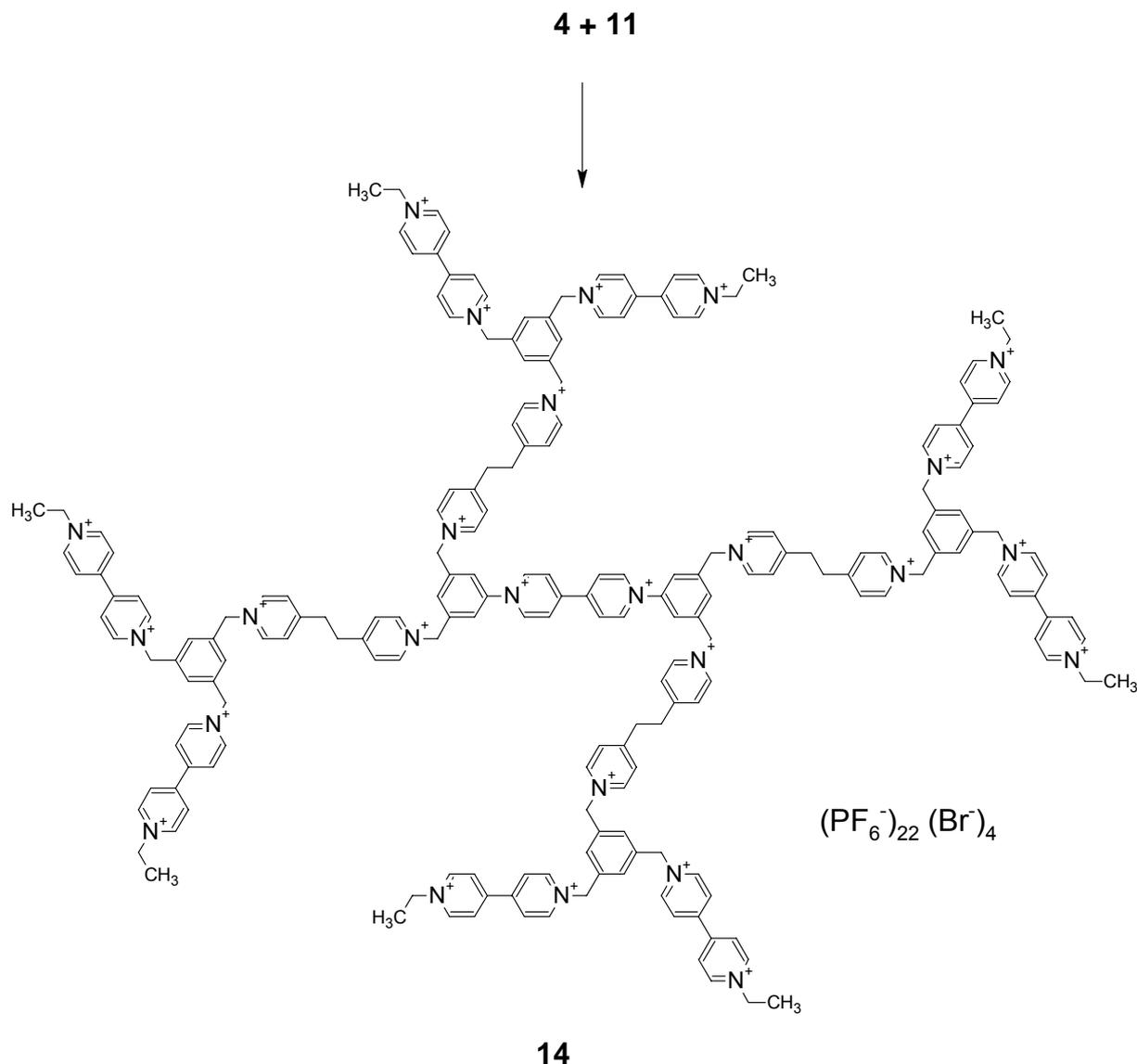


Abbildung 11: Synthese einer neuen Elektronenfalle.

2.2 Synthese der Viologen-Dendronen

2.2.1 Synthese der Fokaleinheit

Benzyliche Viologen-Dendrimere die die Fähigkeit haben als „Elektronenschwämme“ große Mengen an Elektronen zu binden, und von *S. Heinen* ausführlich beschrieben worden sind^[56], dienen als Vorlage zur Darstellung von Viologen-Dendronen mit ähnlichen Eigenschaften. Die Viologen-Dendronen eignen sich jedoch im Gegensatz zu den Dendrimern gezielt über

ihre aktive Fokalgruppe als Redoxlabel mit Analyten konjugiert zu werden. Dies erklärt die konvergente Synthesestrategie.

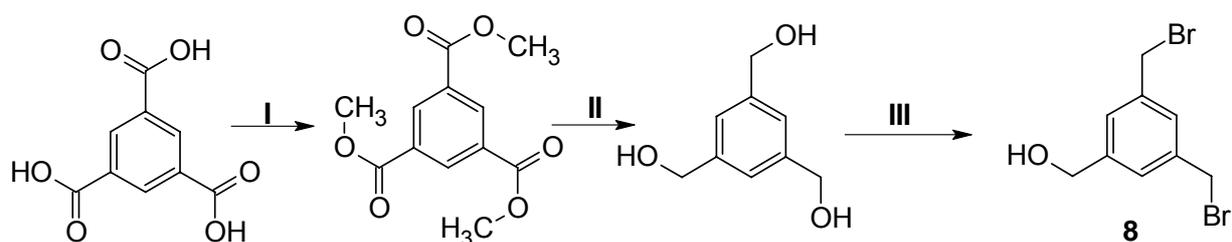


Abbildung 12: Drei Stufen Reaktion zum 3,5-Di(bromomethyl)benzylalkohol: I) MeOH/H₂SO₄; II) LiAlH₄/THF; III) CBr₄, P(C₆H₅), THF

Die Fokaleinheit besteht aus einem trifunktionalen Trimesinderivat dem 3,5-Di(bromomethyl)benzylalkohol von dem zwei Funktionen, gegenüber nukleophiler Substitution, aktiviert sind. Das Syntheschema ist in Abbildung 12 dargestellt und wurde in abgeänderter Form von *S. Heinen* übernommen und zur größeren Ausbeute von **8** optimiert. Das monobromierte Trimesinderivat (Crosslinker für divergente Synthese) entstand nur noch als Nebenprodukt (<15 %). Trimisinsäure wurde mit MeOH schwefelsauer verestert. Der Trimethylester wurde reduktiv mit LiAlH₄ umgesetzt und mittels kontinuierlicher Extraktion konnte 1,3,5-Tri(hydroxymethyl)benzol von Nebenprodukten getrennt werden. Die partielle Substitution des Zwischenproduktes zu **8** gelingt durch Umsetzung mit Triphenylphosphin und Tetrabrommethan in THF und wurde in relativ guten Ausbeuten (55 %) säulenchromatisch von Nebenprodukten isoliert.

2.2.2 Synthese der Viologen-Dendronen (0. und 1. Generation)

Das konvergente Syntheschema der Viologen-Dendronen ist in Abbildung 13 dargestellt. Es konnten Dendronen der 0. (oberer Zweig des Syntheschema) und der 1. Generation (unterer Zweig) dargestellt werden.

Das Dendron der 0-ten Generation wurde direkt aus der Umsetzung der Fokaleinheit **8** mit dem terminierenden monoalkylierten N-Ethyl-4,4'-bipyridinium-hexafluorophosphat als mischanionisches Salz erhalten. Dieses Salzes wurde:

- einem Anionenaustausch unterzogen und das PF₆-Salz **9** erhalten.
- nach Oxidation mit Schwefelchromsäure^[57] und nach Ausfällung zum PF₆-Salz **16** mit oxidierter Fokaleinheit dargestellt.
- in essigsaurer HBr Lösung die Alkoholgruppe substituiert und mit anschließendem Anionenaustausch die benzyliche Bromidverbindung **10** erzeugt.

10 reagierte mit 4,4'-Bipyridin in heißem Acetonitril und lag nach einem Anionenaustausch als Zwischenstufe **11** vor, die mit der Fokalverbindung **8** zum Dendron der zweiten Generation **12** verknüpft wurde. Die Alkoholfunktion von **12** ließ sich unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie im Falle des alkoholischen Dendron-ol der 0. Generation zur Säure **13** transformieren (siehe Abbildung 13).

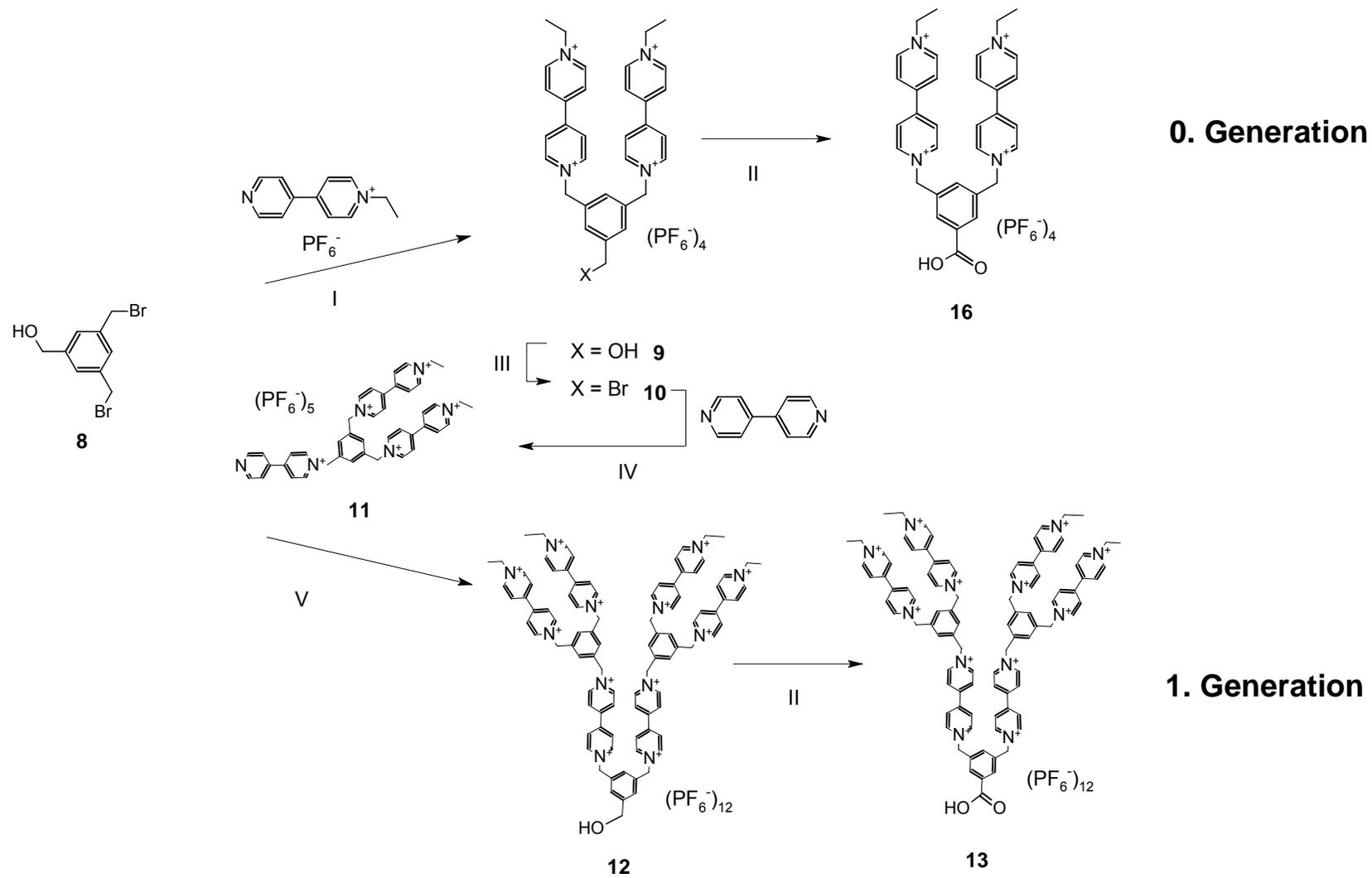


Abbildung 13: Konvergente Synthese von Benzylviologen-Dendronen: I) Ethyl-4,4'-bipyridin, MeCN, 70 °C; II) CrO₃/ 5 % H₂SO₄; III) HBr/AcOH; IV) 4,4'-Bipyridin, MeCN in, 70°C; V) **11**, MeCN, 70° C.

3 Synthese von Nitrilotriessigsäure (NTA) Derivaten

Im Folgenden werden die Synthesen zu oberflächenaktiven NTA-Verbindungen beschrieben. Es wurden Pyrrol- und Thiol-NTA-Derivate synthetisiert. Erstere sollen mittels Elektropolymerisation auf Elektroden fixiert werden, letztere bilden selbstassemblierende Schichten auf Goldelektroden.

3.1 Pyrrolderivate:

Abbildung 14 zeigt einen Syntheseweg zum AB-NTA funktionalisierten Pyrrolderivat. In einer Zweistufenreaktion wurde aus der Z-geschützten Aminosäure Lysin nach einer Vorschrift von Hochuli^[58] die freie Säure AB-NTA erhalten. Pyrrol wurde in einer Eintopfsynthese durch Deprotonierung am Stickstoff zu Kaliumpyrrolid überführt und mit 1-Brompropanol zum Alkohol umgesetzt. Der so eingefügte Alkoholspacer wurde terminal mit DCI zur Imidazolcarboxygruppe umfunktionalisiert und reagierte in basischem Milieu in einem Wasser / DMF Gemisch mit AB-NTA zum gewünschten Carbamat **20**. Aus dem sauren Reaktionsgemisch wurden nach Extraktion mit EtOAc geringe Mengen eines leicht gelbliches Pulver erhalten das sich massen- und NMR spektroskopisch untersuchen ließ.

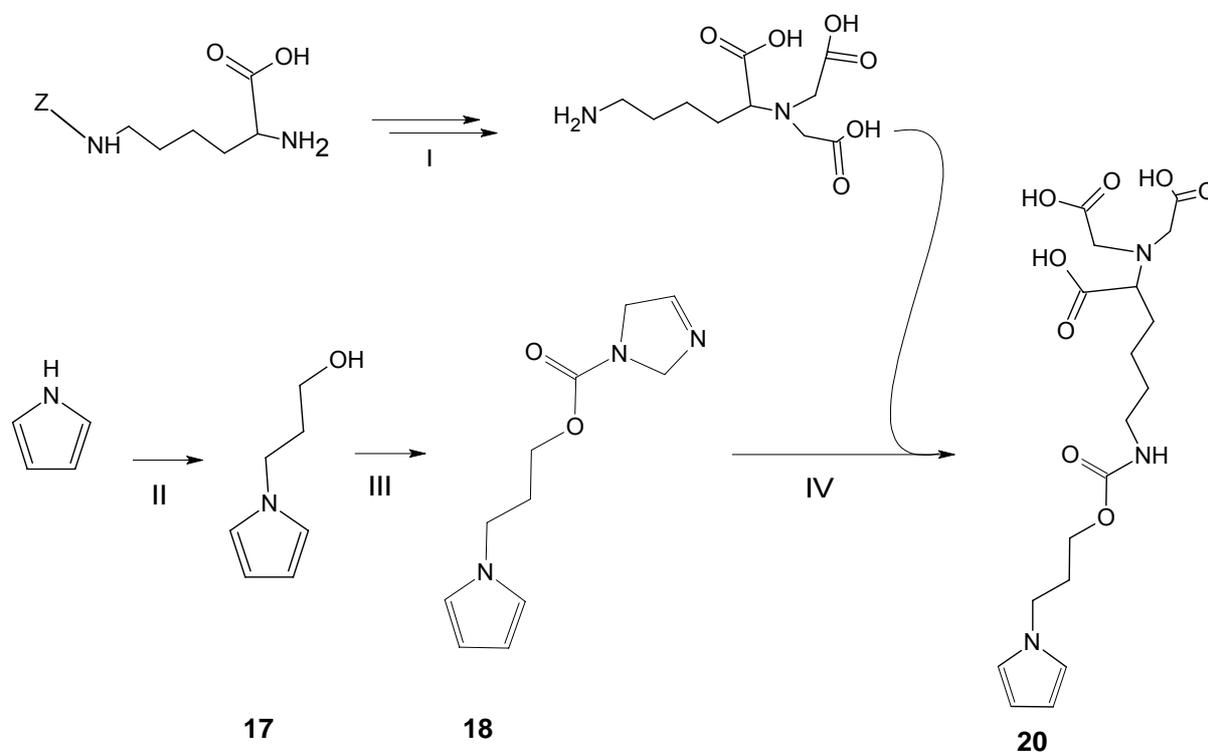


Abbildung 14: I) 1. Br-CH₂CO₂H, 4äq. NaOH; 2. H₂ / Kat.; II) 1. K /THF; 2. 0.5 äq Brompropanol; III) EDC
IV) AB-NTA aus I) pH=9.

Ein weiteres AB-NTA derivatisiertes Pyrrolderivat entstand durch Amidknüpfung (Abbildung 15) des aktivierten 3-(Pyrrol-1-yl)propansäureperfluorphenylester nach *Pickett*^[59] mit AB-NTA in basischem Wasser / DMF Gemisch zu **21**. Die extraktive Aufarbeitung des Ansatzes gelang in höheren Ausbeuten als im obigen Fall des Carbamatderivats. Jedoch zersetzte sich das isolierte Produkt in der isolierten Form in Stunden, was massenspektrometrisch verfolgt werden konnte. Die Hauptzersetzungsprodukte wiesen nicht zuordbare Massefragmente von 145 und 110 auf.

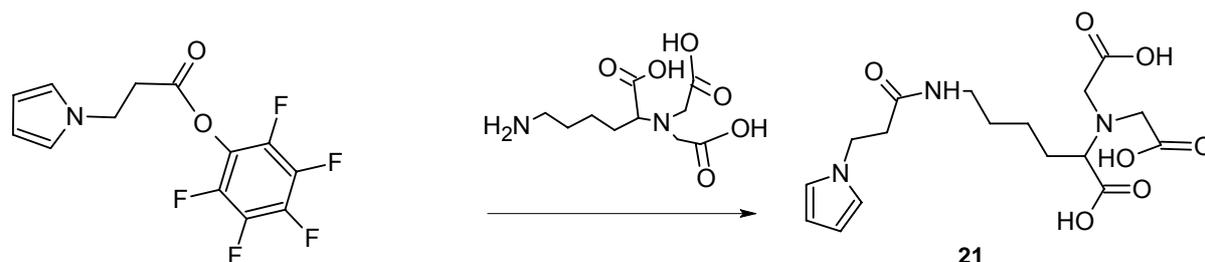


Abbildung 15: Syntheschema von 3-(Pyrrol-1-yl)propansäureamido-butyl-NTA.

Ein weiteres NTA Derivat mit Indolylrest, welcher bekannterweise ebenso wie Pyrrol polymerisierbar ist^[60-62], wurde durch Alkylierung mit Bromessigsäure am α -Stickstoff der Aminosäure Tryptophan erhalten.

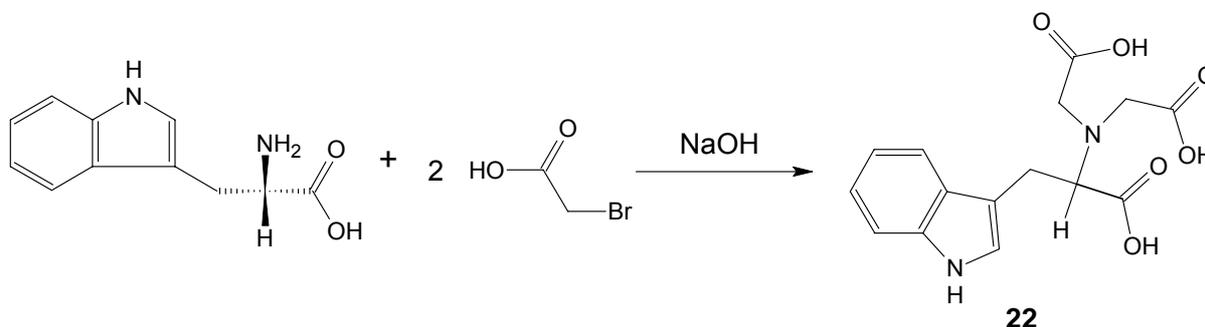


Abbildung 16: NTA funktionalisiertes Tryptophan (L-3-(Methyl-NTA)indol)

3.1.1 N-Pyrrolyl-triethylenglycol-Derivate

Die Pyrrol- und Tryptophan-NTA-Derivate **20**, **21** und **22** waren leider nicht elektropolymerisierbar. Daher wurden neue Pyrrolverbindungen mit längeren Spacereinheiten synthetisiert, da als Ursache für die Nicht-Polymerisierbarkeit^[46] die sterisch anspruchsvolle NTA-Gruppe verantwortlich gemacht wurde, die die polypyrrolbildende α -Position der Pyrrolgruppe abschirmt. Die Spacereinheit Triethylenglycol (TEG) wurde bewusst gewählt, da Monolayerformationen auf Gold mit terminierte TEG proteophobe Eigenschaften zeigen und so spezifische Bindung über den Chelator gewährleisten^[48].

Ausgehend vom TEG (siehe Abbildung 17) wurden die mono- und ditosylierte Vorläufer **23** und **24**, die sich säulenchromatographisch gut trennen ließen, hergestellt^[63, 64]. In getrennten Ansätzen wurden **23** (linker Zweig) und **24** (rechter Zweig) in einem ersten Reaktionsschritt mit Kaliumpyrrolid umgesetzt. Im Falle von **23** wurde N-Pyrrolyl-TEG **25** erhalten, dessen funktionelle Hydroxygruppe mit Diimidazolcarbonyl aktiviert wurde. Das so erhaltene Imidazolidderivat **26** ließ sich in wässrigem DMF bei pH=9 mit AB-NTA in geringer Ausbeute zu **27** umsetzen.

Die Umsetzung von Kaliumpyrrolid mit dem ditosylierten TEG **24** führte zu Verbindung **28**. Diese ihrerseits mit AB-NTA nur geringe Ausbeute erbrachte und nur im Bulk massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte. **29** wurde als bräunliches Öl mit bereits hohem Polymeranteil nach säulenchromatischer Aufreinigung erhalten.

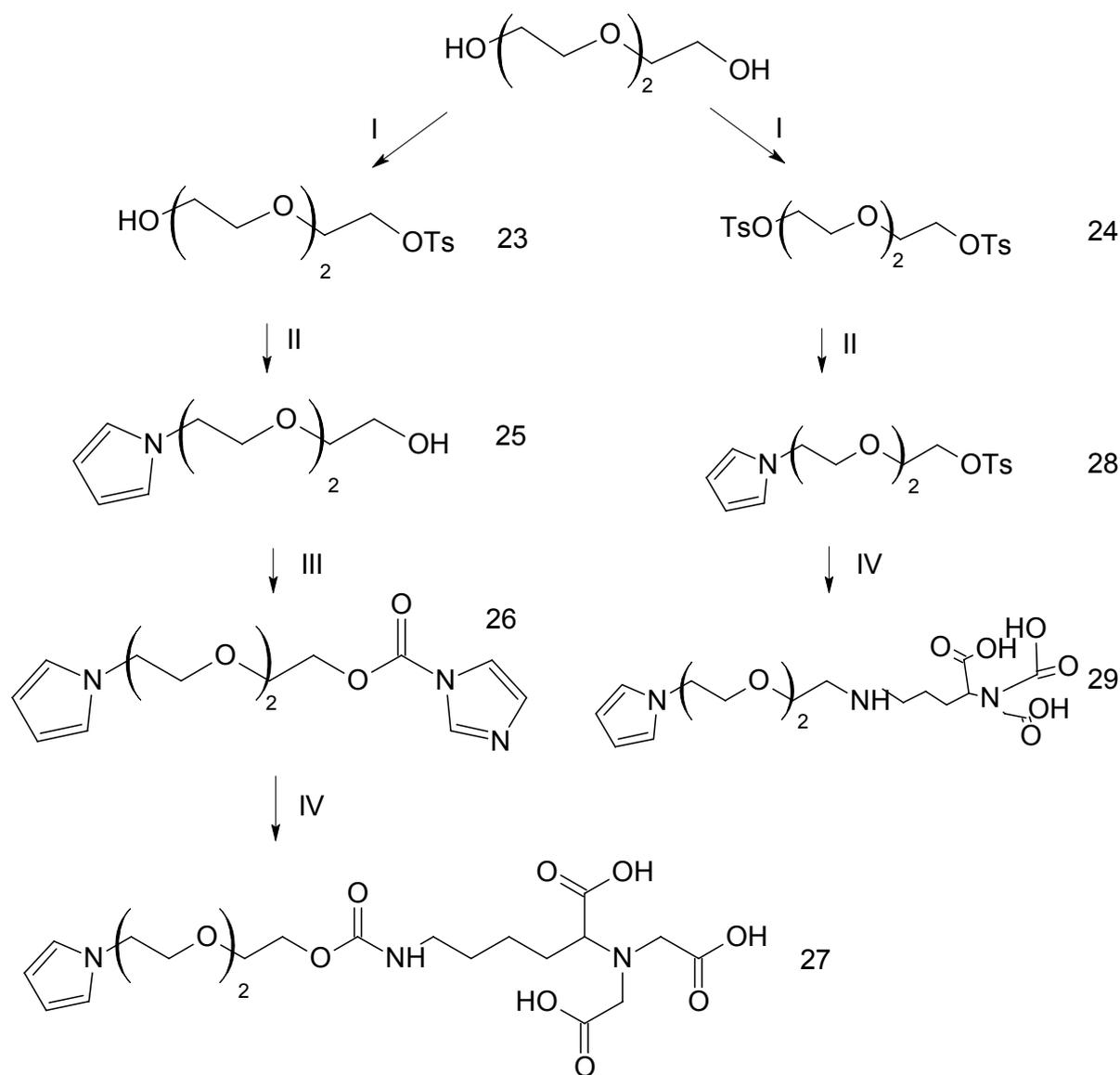


Abbildung 17: I) Tosylchlorid / 44 ° C; II) Kaliumpyrrolid / THF; III) DIC / THF; IV) AB-NTA, H₂O/ DMF (1:1), pH=9 .

3.2 Mercaptoderivate

Wie in 3.1 gezeigt wurde, können Aminosäuren (AS) im Falle des Lysins und des Tryptophans durch Alkylierung am α -Stickstoff mit Bromessigsäure leicht in Nitrilotriessigsäurederivat (NTA) überführt werden. Prinzipiell ist das mit jeder AS möglich. Daher wurde der Pool der AS nach weiteren AS mit oberflächenaktiven Resten durchsucht. Es wurden zwei disulfidische AS gefunden und in beschriebener Weise alkyliert. Thiolgruppen und Disulfide binden über den Schwefel kovalent an elementares Gold. Abbildung 18 zeigt die Alkylierung für die S-geschützten Verbindungen tert.-Butylcystein und Homocysteindisulfide zu den NTA-Verbindungen **30** (asymmetrisch) und **31** (symmetrisch).

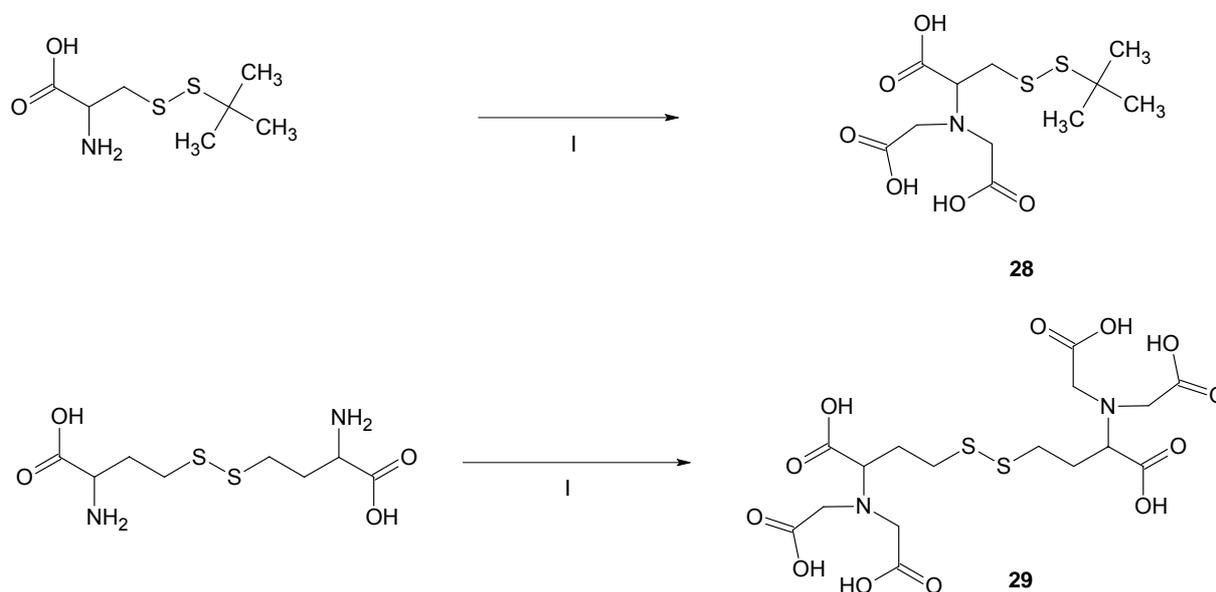


Abbildung 18: Alkylierung S-geschützter AS am α -Stickstoff mit Bromessigsäure zu oberflächenaktiven NTA-Derivaten. I) Bromessigsäure, NaOH.

3.3 AB-NTA-Vorläufer mit derivierbaren γ -NH₂-Gruppe

Um die γ -Aminogruppe des AB-NTA's in andere funktionelle Gruppen überführen zu können wurde AB-NTA mit 2,4,6-Triphenylpyryliumtetrafluoroborat zum entsprechenden Pyridiniumsalz **32** umgesetzt (Abbildung 19). Mit der entstandenen AB-NTA- γ -N-pyridiniumverbindung steht eine Substanz zur Verfügung die am γ -Kohlenstoff die Einführung weiterer funktioneller Gruppen ermöglicht. Es sind dies: R-COOR', R-OH, RONO₂, RN₃ und RX sind mit alkyischen, primären Aminen bereits verwirklicht worden^[65].

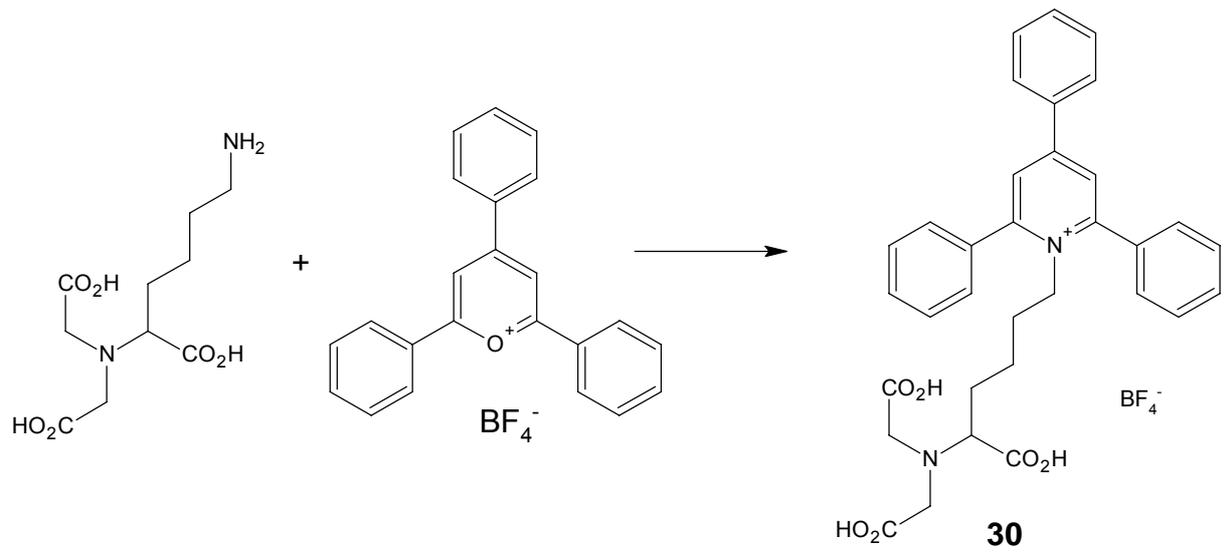


Abbildung 19: AB-NTA-Vorläufer mit derivierbarer Aminogruppe.

4 Ergebnisse

4.1 Neues Viologendendrimer mit Bispyridinethanspacer

Das neue Viologendendrimer mit phenylischer Viologen (pv)-Zentrumseinheit und benzylicher-Viologen (bv) Peripherie wird auf etwaige Elektronenfalleneigenschaften elektrochemisch untersucht.

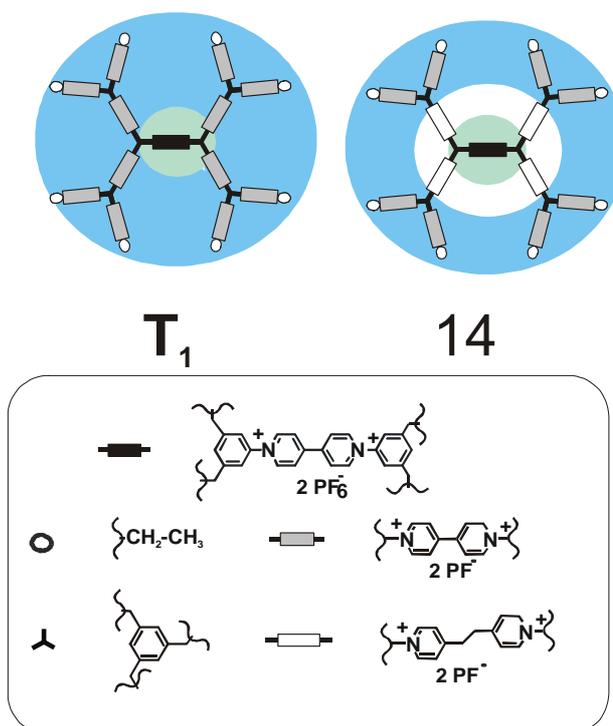


Abbildung 20: Neues Viologendendrimer mit Bis(pyridin)ethan-Spacer (14); 2. Generation einer Elektronenfallene (T₁) nach Heinen et. al.

Die Abbildung 20 verdeutlicht schematisch das neue Dendrimerdesign (14) im Vergleich zu dem bereits untersuchten Dendrimer mit Elektronenfalleneigenschaften (T₁)^[55]. Im Zentrum (grün) des Dimeren befindet sich ein phenylisch substituiertes Viologen mit positiv verschobenem Reduktionspotential ($\Delta E^\circ = \text{ca. } 200 \text{ mV}$), und die Peripherie benzylich substituierte Viologene (blau). Peripherie und Zentrum sind durch zwei Methylengruppen elektronisch entkoppelt. Diese Ethyleneinheit bewirkt, dass die peripheren, benzylichen Viologenen räumlich weiter von der Zentrumseinheit entfernt sind und so eine direkte Elektronenübertragung von einer Elektrode (oder von Reduktionsmolekülen) zum Zentrum erschwert wird.

Das Prinzip der molekularen Elektronenfallene an einer Elektrodenoberfläche ist in Abbildung 21 dargestellt: Die Zentrumseinheit (pv) kann trotz eines positiveren Potentials als das

benzylische Viologen (bv) an der Elektrode nicht oxidiert werden, da die Zentrumseinheit derart verpackt ist, dass ein Elektronentransfer zwischen dem Zentrum und der Elektrode nur über die Peripherie erfolgen kann. Elektronenfluss ist durch die gegebenen Potentiallagen hauptsächlich von außen nach innen, nicht aber von innen nach außen zu erwarten.

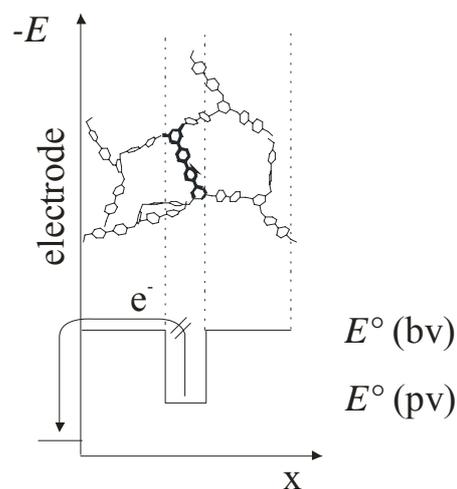


Abbildung 21: Prinzip der molekularen Elektronenfallung aus ^[55].

4.1.1 Elektrochemische Messungen am Viologendendrimer mit Bis(pyridin)ethan-Spacer

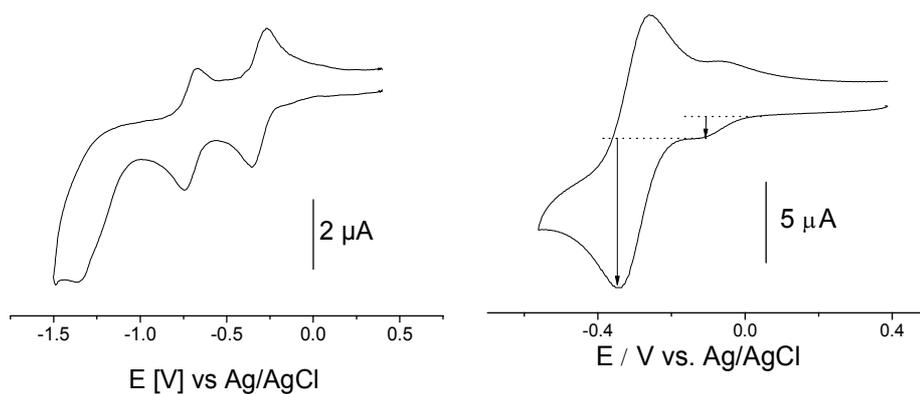


Abbildung 22: CVs des Viologendimmers mit Bispyridinethan-Spacer in 0.1 M TBAPF₆ / DMF bei einer Vorschubgeschwindigkeit von $v = 0.1$ V/s. Drei reversible Viologenwellen und eine irreversible Pyridylwelle (links). Stromverhältnisse von den Reduktionen des Zentrums und der Peripherie (rechts).

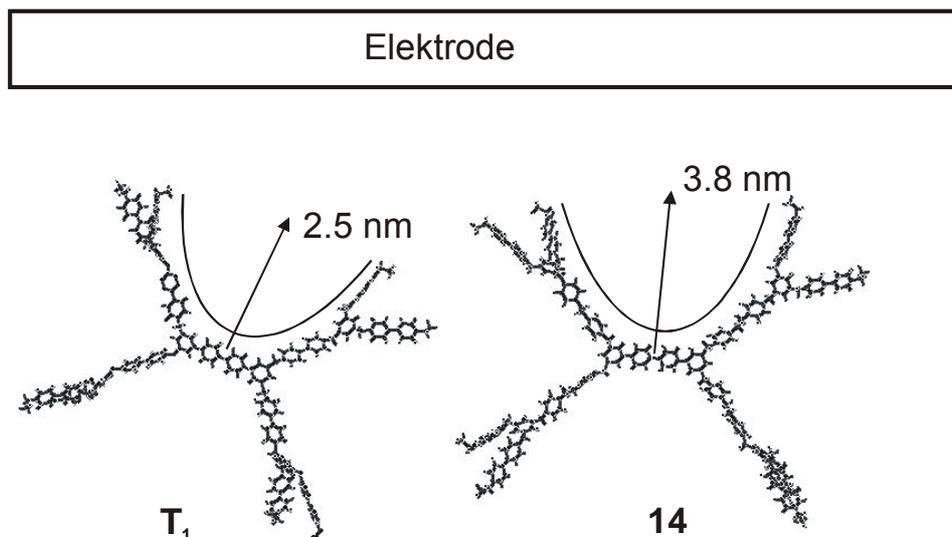
Die cyclovoltammographischen Untersuchungen des Viologendendrimers in Abbildung 22 (links) zeigen drei reversible Redoxwellen und eine irreversible Reduktionswelle bei -1.4 V. Die Peakpotentiale ($E_{1/2}$) und Reduktionsströme sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. Die reversible Welle bei -0.1V wird der ersten Reduktion des Zentrumsviologen zugeordnet, welches durch ein erweitertes aromatisches π -System elektropositiver reduziert wird. Die Redoxwellen bei -0.3 V und -0.7 V entsprechen dem Redoxsystem der peripheren benzyllischen Viologene ($\text{Vio}^{++} \Leftrightarrow \text{Vio}^{+} \Leftrightarrow \text{Vio}^0$). Die irreversible Reduktion bei -1.4 V wird der Reduktion des quaternisierten Pyridinethansrestes zugeordnet. Hierbei ist zu bemerken, dass die reduktive Zerstörung dieser Einheit keine elektrochemische Auswirkung auf das Dendrimer zeigt. Die Reversibilität der Viologene, und somit die Struktur des Dendrimers bleibt von diesem Vorgang verschont.

$E_{1/2} 1$ [V]	$E_{1/2} 2$ [V]	$E_{1/2} 3$ [V]	$E_{\text{red} 4}$ [V]	
-0.109	-0.311	-0.700	-1.350	
i_1 [μA]	i_2 [μA]	i_3 [μA]	i_4 [μA]	i_2 / i_1
1.0	9.2	7.3	-	9.2 (9) _{ther.}

Tabelle 2: Halbstufenpotentiale und Peakströme des Dendrimers bei $v = 0.1$ V/s. $E_1 \equiv \text{Vio}^{++} \Leftrightarrow \text{Vio}^{+}$ (pv); $E_2 \equiv \text{Vio}^{++} \Leftrightarrow \text{Vio}^{+}$ (bv) und $\text{Vio}^{+} \Leftrightarrow \text{Vio}^0$ (pv); $E_3 \equiv \text{Vio}^{+} \Leftrightarrow \text{Vio}^0$ (bv); E_4 red. des Pyridiniums.

Die Peakstromanalyse der Redoxwellen bei -0.1 und -0.3 V zeigt das reduktive Peakstromverhältnis $i_2 / i_1 = 9.2$ (Abbildung 22 rechts) mit hinreichender Genauigkeit. Dies sind die acht peripheren benzyllischen und der einen phenylischen Viologenuntereinheit. Das etwas zu große Verhältnis von 9 beruht auf der Tatsache, dass die Redoxwelle E2 nicht nur die erste Reduktion der acht benzyllischen Viologene (bv) zeigt, sondern auch die zweite Reduktion des phenylischen Viologen (pv), dessen Elektrodenpotential bei ca. -0.32 V liegt^[55], aber auf Grund der Überlappung nicht genau bestimmt werden kann.

a)



b)

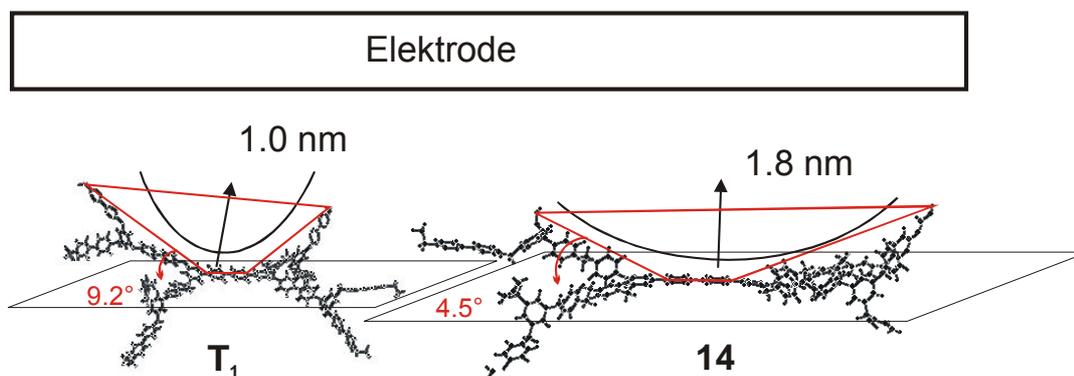


Abbildung 23: Simulierte Strukturen¹ von **T₁** und **14** im Vergleich: a) Annäherung des Dendrimers von der hohen Seite und b) von der flachen Seite des Ellipsoiden zur Elektrode. Minimalster Diederwinkel (rot) einer Ebene [N,N (pv), C,C(Et)].

MM⁺-Berechnungen zur Struktursimulation der Dendrimere **T₁** und **14** (Abbildung 23) zeigen, dass der theoretische Weg den ein Elektron vom phenylischen Zentrumsviologen zur Elektrode überwinden muß bei der neuen Elektronenfalle (**14**) 0.8 nm länger ist als bei der dendritischen Falle **T₁**. Berechnungen des minimalen Diederwinkels für die Orthogonalfläche des Ellipsoid (x, y) (mit den zwei N des phenylischen Viologens als horizontale Rotationsachse ebenfalls in der x, y-Fläche) und einer Fläche, die die Rotationsachse mit den zwei terminierenden C1-Atomen der Ethylengruppen einer Seite aufschlägt, zeigen jedoch, dass **14** mit 4.5° gegenüber 9.2° von **T₁** einen nur halb so großen Diederwinkel besitzt.

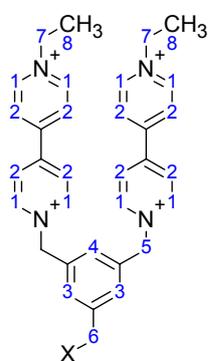
Die Eigenschaften von **14** als Elektronenfalle sind wenig bzw. gar nicht ausgeprägt. Eine Begründung dafür liegt wahrscheinlich in der insgesamt flacheren Struktur von **14** gegenüber

¹ Hyperchem 6.01 for Windows, © 2000Hypercube

von **T₁**. Abbildung 23b zeigt, dass **14** eher eine doppelte Schalenform (Jojo-Form) einnimmt und keine Ellipsoidform, so dass die – durch die zusätzlichen Ethylengruppe – flexibleren Äste (im Gegensatz zu **T₁**) entstehen, die bei Annäherung an eine Oberfläche (Elektrode) zurückweichen können und der Zentrumseinheit den direkten Weg zur Elektrode erleichtert. Elektronentransfer entlang der Seitenarme findet wegen der Aktivierungsbarriere nicht statt.

4.1.2 ¹H und ¹³C-NMR Charakterisierung der Viologendendrone

Die Strukturcharakterisierung der Dendrone wie auch die der entsprechenden Dendrimere **S_x**, **T_x** und **PS_x** erfolgt fast ausschließlich über NMR Methoden^[55, 56], da massespektrometrische Methoden mit Viologen Oligo- und Polymeren versagen. Daher wird im Folgenden ausführlich auf die NMR Charakterisierung der Dendrone eingegangen.



9 (X=OH)

10 (X=Br)

12 (X=(O)OH)

Die Zuordnung der ¹H-NMR-Signale von **9**, **10** und **12** fällt relativ einfach. Die aromatischen Viologenprotonen erscheinen bei Verschiebungen von über 8 ppm als zwei nicht weiter aufgelöste Multipletts. Die aromatischen Protonen (3, 4) konnten über die Integration (2H:1H) differenziert werden. Die Ethylengruppen (5, 6, 7) können über Aufspaltung, Verschiebung und Integration ebenfalls eindeutig zugeordnet werden (siehe Tabelle 3). Zu bemerken ist lediglich, dass die Ethylengruppe (6) das Quartett der Ethylengruppe (7) überlagert.

Bei der Transformation von **9** zu **10** treten im Protonen-NMR Spektrum keine Änderungen auf. Die chemischen Verschiebungen sind exakt die gleichen. Eine Reaktionskontrolle konnte nur über ¹³C-NMR-Spektroskopie erfolgen. Im ¹³C-Spektrum von **9** und **10** finden sich die gleichen Signale wieder. Jedoch kann die Transformation der Alkoholfunktion in ein Benzylbromid an der Verschiebung der Methylengruppe CH₂-X nachgewiesen werden. Das Signal bei δ = 62.9 verschwindet und ein neues Signal bei δ = 32.0 erscheint. Zudem können die Signale durch heteronukleare 2D-COSY Experimente zugeordnet werden (siehe Abbildung 24).

Verbindungen 9 und 10	^1H : δ (ppm) (Multiplizität, Integration)	^{13}C δ (ppm)	Zuordnung
1	8.96 (m, 8H)	151.0, 150.5, 146.2, 145.9	$^{\alpha}\text{CH}$ (Viologen)
2	8.43 (m, 8H)	140.8, 134.8, 129.4	$^{\beta}\text{CH}$ (Viologen)
3	7.60 (s, 2H)	127.9, 127.6	CH (Benzol)
4	7.54 (s, 1H)	130.6	CH (Benzol)
5	5.85 (s, 4H)	64.5	$\text{CH}_2\text{-N}^+$
6	4.63 (s, 2H)	62.9 (X=OH), 32.0 (X=Br)	$\text{CH}_2\text{-X}$
7	4.69 (q, 4H)	58.2	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$
8	1.65 (t, 6H)	16.0	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$

Tabelle 3: ^1H und ^{13}C -NMR-Signale für **9** und **10**.

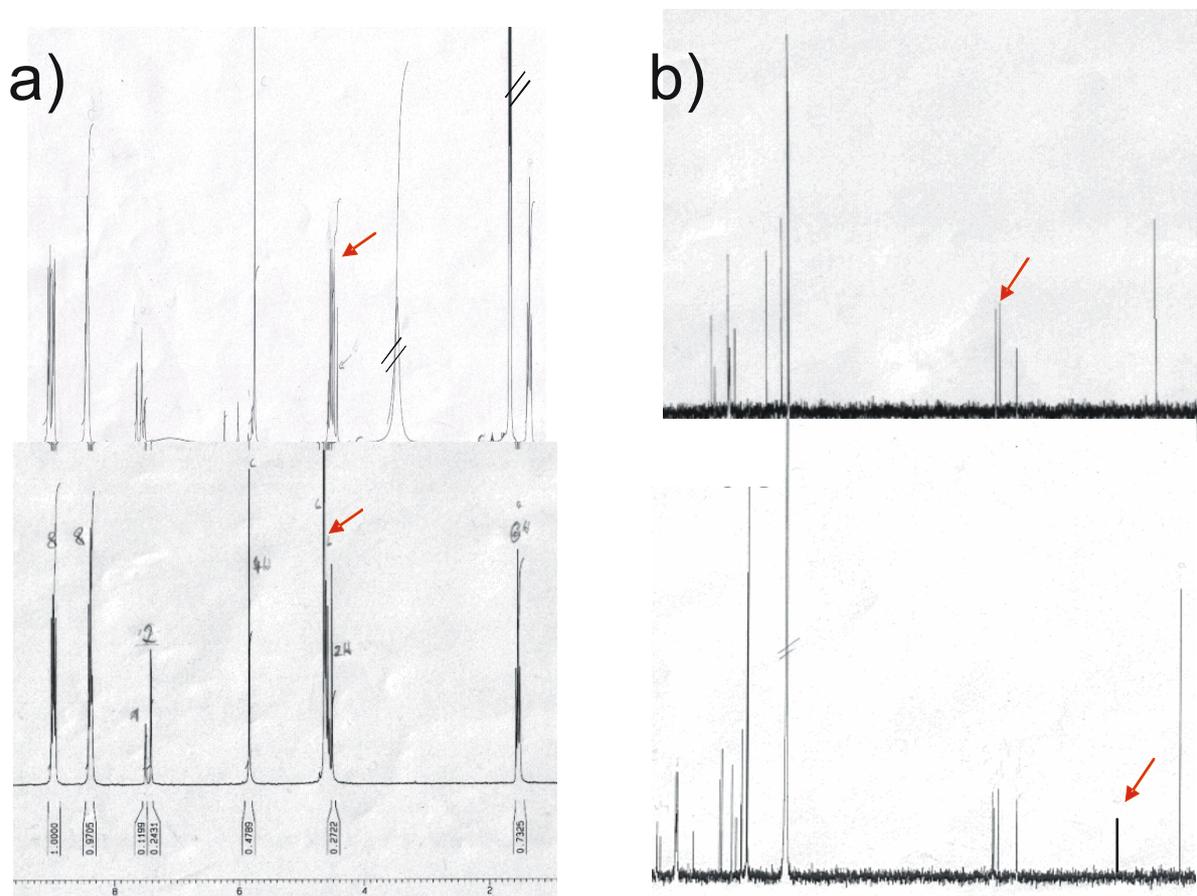
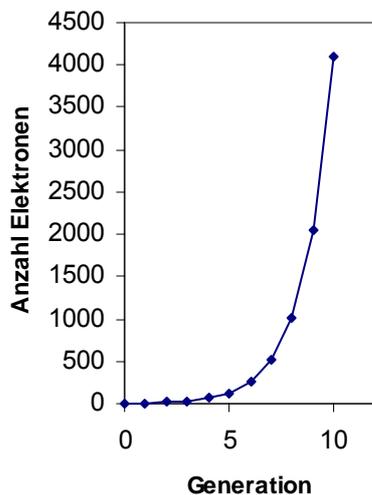


Abbildung 24: a) ^1H -NMR(250 MHz); Überlagerung der $\text{CH}_2\text{-Me}$ und $\text{CH}_2\text{-X}$ für X=OH, Br (Pfeil) b) ^{13}C -NMR(72 MHz) von **9** und **10**; Verschiebung des $\text{CH}_2\text{-X}$ Signals von X=OH zu X=Br.

4.2 Elektrochemische Analyse der Viologen-Dendrone und deren Einsatz als Elektronenlabel für Proteine

4.2.1 Einführung



Die oben beschriebenen Dendrone wachsen wie ihre größeren Geschwister die Dendrimere mit zunehmenden Generationen linear im Radius bzw. im Durchmesser, aber exponentiell in Masse und in der Anzahl ihrer peripheren Funktionen. Die repetitive Untereinheit der Dendrone, ein mit Viologen trisubstituiertes Benzol, ist reversibel reduzierbar und eignet sich so für den Einsatz als Elektronenlabel. Der Zusammenhang zwischen der Anzahl redoxaktiver Zentren in einem Dendron (den Viologeneinheiten) und dem Dendronenwachstum pro Generation (n) zeigt sich als exponentielle Zunahme mit

$2^{(n+2)}-2$ redoxaktiven Gruppen bei linearem Wachstum des Dendrons (Abbildung links). So kann bereits nach acht Generationen der Faktor 1000 an Intensität pro Label erreicht werden. Im Folgendem soll die elektrochemische Zugänglichkeit der synthetisierten Dendrone beschrieben werden und ebenso die Eigenschaften der Dendrone als Elektrolabel zur Markierung von Proteinen. Dafür werden die Dendrone und ihre Proteinaddukte in Lösung bzw. auf Elektrodenoberflächen untersucht. Außerdem werden massenspektrometrische wie gelchromatische Ergebnisse erörtert.

4.2.2 Cyclovoltammetrie an Viologen-Dendronen der 1. und 2. Generation

Abbildung 25 zeigt die CVs der Dendronen **9** und **10** bei gleicher Viologenuntereinheitenkonzentration und gleicher Vorschubgeschwindigkeit ($v = 0.1$ V/s). Peakströme und Peakpotentiale unterscheiden sich deutlich (siehe Tabelle 4). Die unterschiedlichen Peakströme werden mit der Größe der Dendrone und den daraus resultierenden Diffusionskoeffizienten erklärt. Ihr Durchmesser entspricht in etwa den Radien der homolog aufgebauten Dendrimere **S₁** und **S₂**^[56].

Dendron	E_1 [V]	E_2 [V]	i_1 [μ A]	i_2 [μ A]	k_d [cm^2/s]
9	-0.37	-0.77	11.8	10.0	1,34E-06
10	-0.30	-0.73	8.9	6.5	2,95E-06

Tabelle 4: Halbstufepotentiale (vs Ag/AgCl in 0.1 M TBAPF₆/DMF; $v=0.1$ V/s) von 9 und 10. Die k_d -Werte wurden an einer RDE erhalten ($v = 5$ mV/s); Auswertung nach Levich.

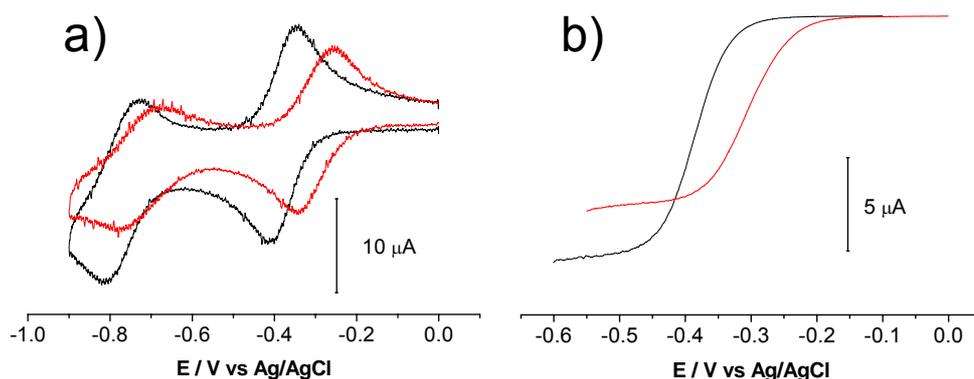


Abbildung 25: a) CV's von 9 (schwarz) und 10 (rot) mit $v = 0.1$ V/s in 0.1 M TBAPF₆/DMF bei gleicher Viologenuntereinheitenkonzentration (~ 0.25 mM). b) Unter gleichen Bedingungen RDE-Plot mit $v = 5$ mV/s bei 500 rpm.

Die Tatsache, dass das Elektrodenpotential bei höheren Generationen von Viologendendrimeren zu positiveren Werten verschoben ist, wurde bereits von *S. Heinen et. al.*^[24, 56] beschrieben und mit einer Coulombsche Destabilisierung erklärt. Dass das Phänomen bei den sterisch kleineren Dendronen nun deutlicher auftritt, ist bemerkenswert. Die Potentialwerte der Dendrone 9 und 10 sind insgesamt negativer als die der analogen Dendrimere **S**₁ und **S**₂; die generationsabhängige Verschiebung der Reduktionspotentiale ist erheblich. Die eintretende Pimerisierung während der Reduktion ist dafür verantwortlich und wirkt stabilisierend auf das entstehende Multi-Viologenradikal.

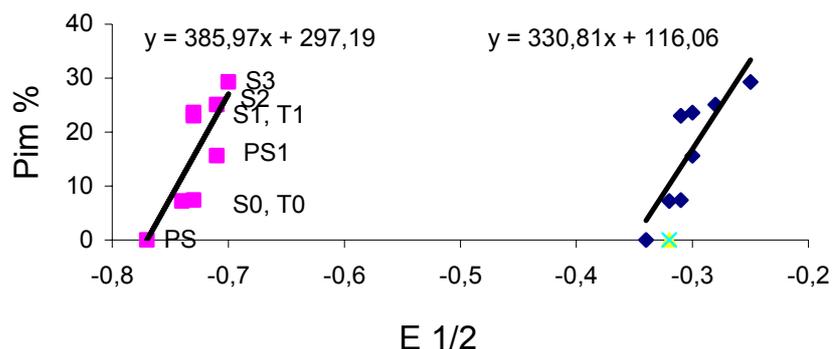


Abbildung 26: Auftragung von Pimerisierungsgrad [%] gegen Elektrodenpotential [V] (rot: 1. Redoxwelle; blau: 2. Redoxwelle) verschiedener Viologendendrimere. Alle Messwerte wurden in 0.1 M TBAPF₆ / DMF bei $v = 0.1$ V/s bestimmt. Referenzelektrode: Ag/AgCl.

Trägt man die aus der Literatur bekannten Pimerisierungswerte verschiedener Viologendendrimere gegen ihre Reduktionspotentialwerte gegeneinander auf, wird ein linearer Zusammenhang deutlich, der den Shift zu positiveren Elektrodenpotentialen mit zunehmender Pimerisierung erklärt. Danach macht 1 %-Punkt zunehmende Pimerisierung (Stabilisierung des Produktes) eine Erhöhung des Elektrodenpotentials von ca. 0.39 mV aus.

4.2.3 Elektrochemie mit Viologendendronen-modifizierten Goldelektroden

Um den Eingangs erwähnten Vorteil der Signalverstärkung der Multielektronenlabel zu verdeutlichen und die gleichzeitige Möglichkeit die Funktionalität der Fokaleinheit gezielt einzusetzen, werden die Dendrone **13** und **14** in einer Zweistufen-Oberflächenreaktion kovalent an eine Goldelektrode geknüpft und mittels Cyclovoltammetrie untersucht.

4.2.3.1 Chemische Verknüpfung der fokalen Carbonsäureeinheit mit einer oberflächengebunden Aminoverbindung

Alkanthiole eignen sich, um Goldoberflächen mit einem selbstassemblierenden Monolayer (SAM) zu derivatisieren, wobei sich die Thiolgruppe kovalent an Gold bindet und die Alkanreste eine 2-D-Kristallstruktur über dem Gold ausbildet. Daher eignen sich Thiolverbindungen hervorragend um Goldoberflächen (auch Silber, Kupfer und Quecksilber) zu funktionalisieren. Um eine Goldoberfläche mit den oben genannten Dendron-Carbonsäuren zu versehen, wird eine mit Piranahsäure gereinigte Goldelektrode mit dem symmetrischen Disulfid Cysteamin, durch einstündige Inkubation der Elektrode in eine 0.5 molaren wässrig, ethanolische Lösung behandelt. Es bildet sich ein alkyliertes SAM mit terminierenden Aminogruppen auf dem Gold aus. Die so hergestellte Oberfläche wird in eine

Lösung mit der Viologensäurederivat und einem Aktivatoragenz gebracht, so dass zwischen der aktivierten Säurefunktion des Viologenderivats und den Aminogruppen des SAM's eine amidische Bindung entsteht.

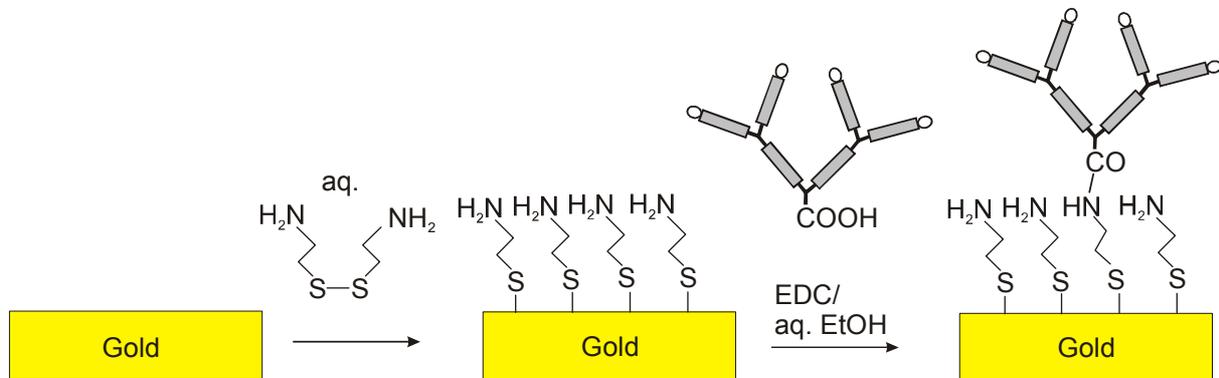


Abbildung 27: Eine Goldelektrode wird im ersten Schritt mit Amino-terminierten Thiolverbindung versehen und im zweiten Schritt mit der EDC aktivierten Carbonsäure des Elektronenlabels (hier exemplarisch mit **14**) amidisch verknüpft.

4.2.4 Cyclovoltammetrie an mit Viologen-Dendronen funktionalisierten Goldelektroden

Die so hergestellten Elektroden (siehe 4.2.3.1) werden elektrochemisch mittels CV untersucht. Charakteristische Oberflächenwellen für die 1. Welle ($\text{Vio}^{++} \leftrightarrow \text{Vio}^{+}$) können beobachtet werden. Zudem lassen sich die mit L_1 und L_2 -modifizierten Elektroden unterscheiden. Abbildung 28 zeigt die CV's der mit L_1 (blau) von L_2 (rot) modifizierte Goldelektroden. Charakteristische Oberflächenwellen mit hoher Symmetrie und niedrigen Potentialdifferenzen können beobachtet werden. Peakströme verhalten sich zur Vorschubgeschwindigkeit linear (siehe: rechts) was ebenfalls auf eine monomolekulare Bedeckung (SAM) der Elektrode hindeutet.

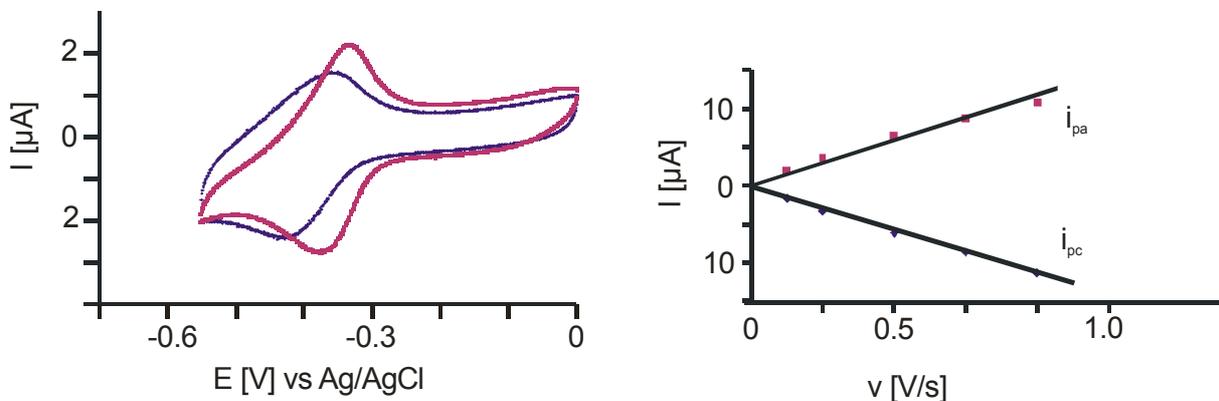


Abbildung 28: links: CV's der mit L_1 (blau)- und L_2 (rot) modifizierten Goldelektrode. Scangeschwindigkeit $v = 0.1 \text{ V/s}$ in $0.1 \text{ M LiClO}_4/\text{MeCN}$. $\Gamma(\text{L}_1) = 9.1 \cdot 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$; $4.8 \cdot 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$. rechts: anodische und kathodische Peakströme von L_2 gegen Vorschubgeschwindigkeit.

Die aus der Coulometrie berechnete Oberflächenkonzentrationen Γ^2 der Dendrone (**L**₁ (n=2) und **L**₂ (n=6)) befinden sich in den Bereichen ($4\text{-}9\cdot 10^{-11}$ mol/cm²), die für selbstassemblierende Monoschichten typisch sind, wobei die Belegung des kleineren Dendron **L**₁ fast doppelt so hoch ist wie die von **L**₂. Dennoch ist der Peakstrom im Falle von **L**₂ (1.61 μ A mit $v = 0.1$ V/s) um den Faktor 1.6-mal größer als bei **L**₁ (1.0 μ A).

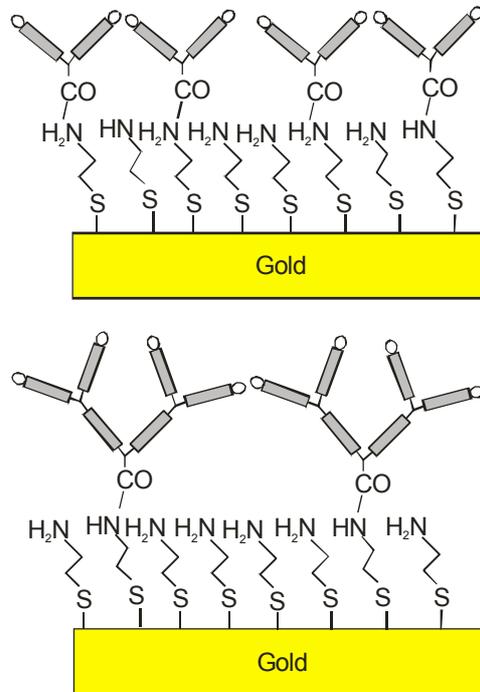


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Derivierung von Goldelektroden mit Viologendendronen **L**₁ und **L**₂. Auf eine Flächeneinheit passen 2 **L**₁-Label oder ein **L**₂-Label, aber ein Viologenverhältnis von 2:3 resultiert.

4.2.5 Fazit

Goldelektroden lassen sich mit den Carbonsäuren der Viologendendronen **L**₁ und **L**₂ über eine aminoterminal Thiolverbindung kovalent derivatisieren. Elektrochemische Messungen ergeben, dass das sterisch anspruchsvollere Dendron **L**₂ fast exakt doppelt soviel Oberfläche einnimmt wie das kleinere Analogon **L**₁. Dies entspricht der peripheren Anzahl benzylicher Viologene in den kegelförmigen Dendronen (4:2). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich das benutzte Dendronedesign in höheren Generationen dazu eignet, amperometrisch eine signalverstärkende Wirkung zu erzielen (1.6:1.0). Auch wenn mit jeder Generation der sterische Faktor verdoppelt wird und sich dementsprechend nur halb so viele Label pro

$$^2 \left(\Gamma = \frac{Q_{Peak}}{F \cdot n} \right) \text{ mit } \Gamma \text{ (Konz.) [mol/cm}^2\text{]; } Q \text{ (Ladung) [C]; } F \text{ (Faraday) [C/mol] und } n = \text{Anzahl der Redoxelektronen.}$$

Flächeneinheit Platz finden (siehe Tabelle 5 :) wächst die Anzahl der signalerzeugenden Viologene an.

	$E_{1/2}$ [V]	i_p [μ A]	Q_p [μ C]	n	Γ (L_x) [mol/cm^2]	$i_p(L_2)/i_p(L_1)$	$Q(L_2)/Q(L_1)$
L_1	-0.35	1.61	17.56	2	$9.1 \cdot 10^{-11}$		
L_2	-0.38	1.01	27.80	6	$4.8 \cdot 10^{-11}$	1.6	1.58

Tabelle 5 : Cyclovoltammetrie-Messdaten mit funktionalisierten Goldelektroden. $v = 0.1$ V/s in 0.1 M $\text{LiClO}_4/\text{MeCN}$; Ref.: Ag/AgCl.

4.3 Viologendendrone als Elektronenlabel an Proteinen

Multielektronenlabel entfalten erst ihre Eigenschaften, wenn sie nicht wie in 4.2.3 als Ensemble auf einer Oberfläche wirken, sondern z.B. 1:1 mit einer elektrochemisch inaktiven Substanz verknüpft werden, um diese für elektrochemische Nachweismethoden zugänglich zu machen. Erst dann zahlt sich die Multiplizität dermaßen aus, dass ein erkennbarer Nutzen zum synthetischen Aufwand, der mit der konvergenten Dendronchemie verbunden ist, gerechtfertigt erscheint.

Aus der Zusammenarbeit innerhalb des Graduierten Kollegs: *Molekulare Physiologie* wurden von mehreren Projekten Proteine bereitgestellt, um sie mit den oben vorgestellten Elektronenlabel zu verknüpfen und etwaige elektrochemische Messungen an den Proteinkonjugaten vorzunehmen und Protein-Protein oder Protein-Kofaktor Interaktionen zu untersuchen. Zunächst wurden aber massenspektrometrische und gelchromatographische Methoden verwendet, um die Existenz der nicht isolierbaren Proteinkonjugate nachzuweisen.

4.3.1 Label-Protein Verknüpfungs-Chemie

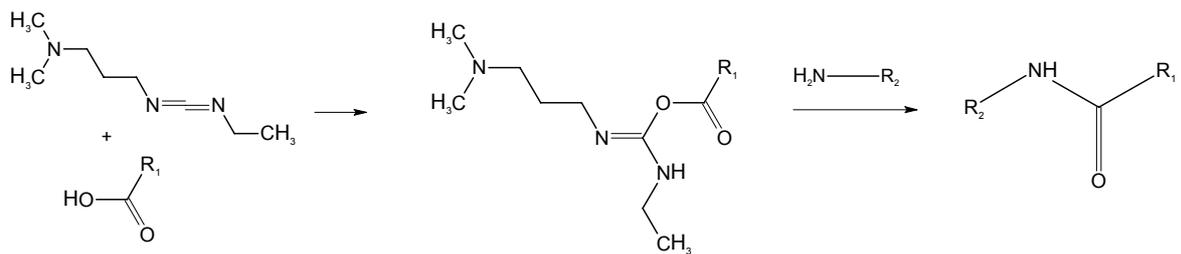


Abbildung 30: EDC als Peptidbindungsvermittelndes Agens: R₁: Dendronlabel; R₂: Protein.

Um Proteine oder Peptide mit den Dendronen zu verknüpfen wird die „naturnahe“ Peptidbindung gewählt. Das aus Aminosäuren (AS) bestehende Peptid fungiert mit seiner naturgegebenen terminalen Aminogruppe des Backbones der AS und den Aminogruppen besitzenden Seitenkettenresten Arginin, Asparagin, Glutamin und Lysin als Aminogruppen-Donor, der mit einer aktivierten Carbonsäure der Label L₁ bzw. L₂ insitu verknüpft wird. Als Verknüpfungsagens wird EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid) verwendet, welches bei 0 °C kurzlebige, aktivierte Säureester bildet.

Das Polyviologensalz wird in der wasserlöslichen Bromidform eingesetzt. Die Proteine werden in wässrigen Pufferlösungen ohne reduktive Zusätze erhalten. Das in Abbildung 30 dargestellte Reaktionsmuster wird auf die Proteinen K36 und Cytochrom C angewandt.

4.3.2 36 K-Elektronenlabel-Konjugat

Abbildung 31 zeigt schematisch, wie das Protein 36K mit dem Carbonsäurederivat des Labels L₂ verknüpft wird. Die frei zugänglichen Aminogruppen des Proteins gehen mit dem aktivierten EDC-Ester der Carbonsäure des Labels L₂ je eine Peptidbindung ein. Die Labelkomponente wird in großem Überschuss eingesetzt, so dass von einer vollständig Absättigung der frei zugänglichen Aminogruppen des Proteins ausgegangen werden kann. Die Reaktion wurde im μM-Maßstab durchgeführt.

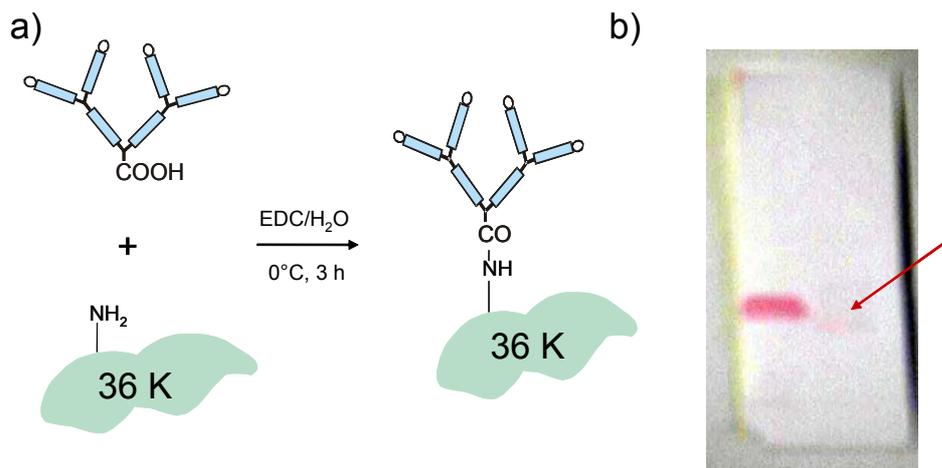


Abbildung 31: a) 36K-Protein wird mit dem Multielektronenlabel L_2 konjugiert. b) Elektrophorese von 36K (links) und Konjugat (rechts, mit Pfeil).

Zur Analyse des Reaktionsgemisches wurde Gelelektrophorese verwendet (Abbildung 31b)). Das Gel zeigt deutlich, dass das Protein vollständig umgesetzt wurde, wenn auch nur in geringen Ausbeuten (ca. 5-10 %). Der hohe Verlust ist durch Denaturierung und Ausfallen des pH-empfindlichen Proteins zu erklären.

4.3.3 Cytochrome C-Elektronenlabel-Konjugat; Massenspektrometrische Analyse

Abbildung 32 zeigt schematisch die Peptidknüpfung zwischen dem Elektronenlabel L_1 und dem Protein Cytochrome C. Die Reaktionsbedingungen sind analog zu denen in 4.3.2. Es konnte jedoch mit mM Konzentrationen gearbeitet werden.

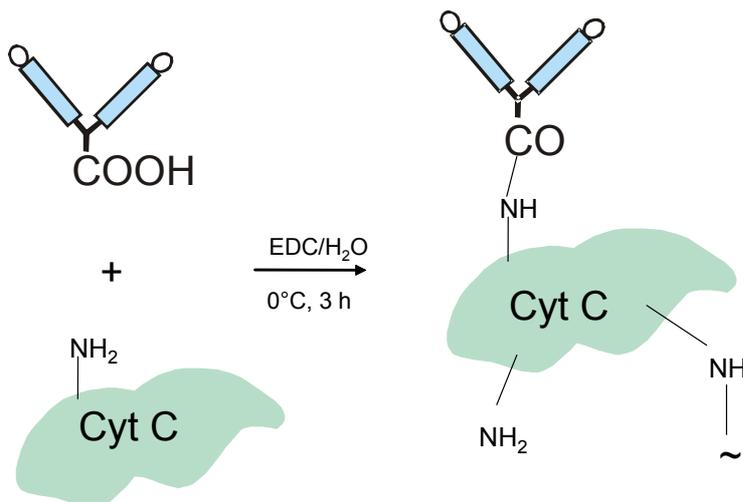


Abbildung 32: Konjugatsbildungsreaktion von Cytochrome C mit Elektronenlabel L_1 .

Die Analyse des Reaktionsgemisches wurde mittels MALDI-TOF vorgenommen, da eine Isolierung der Produkte mittels Säulenchromatographie nicht erfolgreich verlief und das

Elektrophoresegel lediglich die vollständige Abreaktion des eingesetzten Proteins bestätigen konnte.

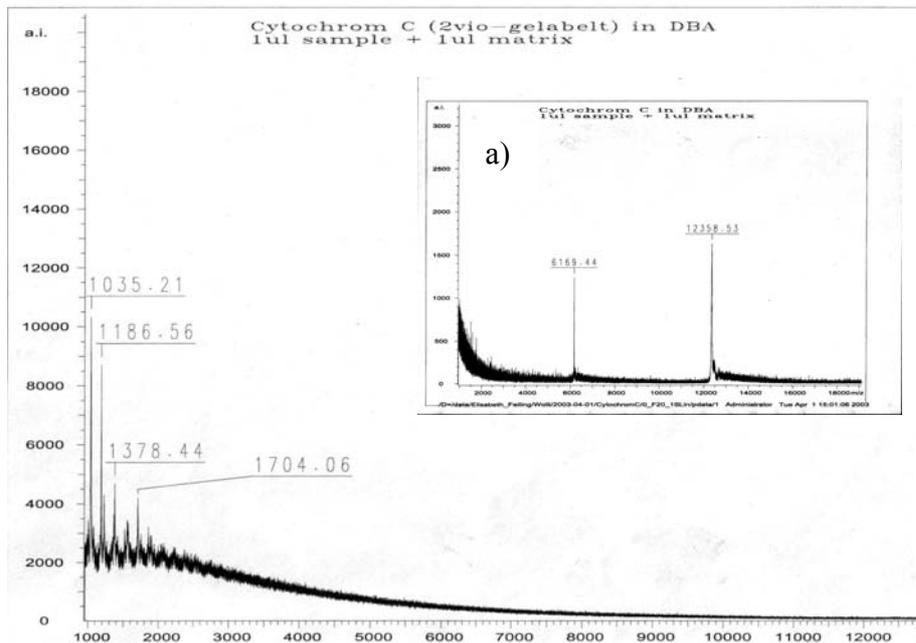


Abbildung 33: MALDI-TOF Spektrum von L_1 -gelabelten Cytochrom C in DBA-Matrix; a) MALDI-TOF Spektrum von Cytochrome C in DBA-Matrix.

Im Massenspektrum von Cytochrome C sind deutlich die Massepeaks bei 12384 und 6192 zu sehen (siehe Abbildung 33a), was den einfach und zweifach geladenen Molekülpeaks entspricht. Im Reaktionsgemisch sind diese Signale nicht mehr auszumachen, was auf eine vollständige Abreaktion des Proteins hindeutet. Es treten aber neue Signale im Massenbereich zwischen 1700 und 1000 auf (siehe Tabelle 6). Dies entspricht einer zwei- bzw. dreifachen Labelisierung des Proteins mit dem polykationischen Viologenderivat. Labelisierungsgrade größer drei sind ebenfalls denkbar, konnten mit dieser Methode, aufgrund der messtechnischen Ungenauigkeiten bei Massen kleiner als 1000 aber nicht nachgewiesen werden.

m gefunden	m theoretisch
12358	12384 (0; 1+)
6169	6192 (0; 2+)
1704	1673 (2; 8+)
1378	1338 (2; 10+)
1186	1157 (3; 12+)
1035	1068 (3;13+)

Tabelle 6: Massen von Cytochrome C und Label-Konjugaten. In Klammern ist der Substitutionsgrad n mit den entsprechenden Ladungen angegeben nach $m(\text{Cyt C} \cdot (\text{L})_n) = m(\text{Cyt C}) + (n \cdot m(\text{L})) - (n \cdot m(\text{H}_2\text{O}))$; jedes Konjugat trägt mindestens 4n Ladungen.

4.3.4 Elektronentransfer an mit Cytochrome C modifizierten Elektroden

Da die klassischen analytischen Untersuchungen des Cytochrome C-Konjugats lediglich Hinweise auf eine erfolgreiche Umsetzung der gewünschten Reaktion lieferten, wird eine elektrochemische Analysemethode zur Verifikation hinzugezogen. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass Proteine affin gegenüber Goldelektroden sind und auf deren Oberflächen absorbieren. Ein Protein, welches mit einem Redoxlabel modifiziert wurde, kann über die Oberflächenströme der so modifizierten Elektrode identifiziert werden. Eine weitere Eigenschaft der modifizierten Elektrode ist das amperometrische Verhalten gegenüber redoxaktiven Markerionen^[66]: Das absorbierte Protein trägt in Abhängigkeit des pH-Wertes eine positive (wenn pH stark sauer) bzw. negative Ladung (pH alkalisch). Ein geladenes Markerion kann auf Grund der Coulombschen Abstoßung oder Anziehung gegenüber der Protein-modifizierten Elektrodenoberfläche diese bei entgegengesetzten Ladungen passieren; bei Ladungen desselben Vorzeichen aber nicht und der Elektronentransfer wird verhindert. Es werden vergleichende Messungen von Protein-modifizierten und Konjugat-modifizierten Elektroden durchgeführt.

4.3.4.1 Oberflächenströme einer Elektronenlabel-Konjugats modifizierten Elektrode

Eine Goldelektrode wird eine Stunde in der Reaktionslösung des Konjugats (siehe Abbildung 32) behandelt. Unspezifische Adsorption findet statt. Danach wird gründlich gewaschen. Die zu beobachtenden Oberflächenströme der so behandelten Elektrode (siehe Abbildung 34) werden dem Redoxprozess der Viologen des Labels zugeordnet. Die Abbildung 34a zeigen die CV-Ströme einer mit Cyt C und einer mit dem Elektronenlabelkonjugats modifizierten

Elektrode (rot). Die erste Welle des Viologenredoxsystems ($\text{Vio}^{++} \leftrightarrow \text{Vio}^{+}$) bei -0.54 V rührt von dem absorbierten Konjugat her, das mit dem Redox- oder Elektronenlabel verknüpft wurde.

Ein Kontrollexperiment wird parallel durchgeführt: Eine Elektrode wurde mit den gleichen Komponenten ohne Aktivierungsgens (EDC) behandelt und es werden die gleichen Messungen durchgeführt, um Akkumulationsphänomene von Label und Protein auszuschließen (Abbildung 34b). Nach dem Waschen einer auf diese Weise modifizierten Elektrode ist kein Viologenstrom im CV oder im DPV nachweisbar. Eine höhere Kapazität - gegenüber der Cyt C Elektrode - wird beobachtet. Das wird mit den unterschiedlichen Elektrolytlösungen, die im Innern der Proteinschicht, als „gefrorenes Flüssigkeit“ eingesperrt sind, erklärt und sich mittels QCM-Methode nachweisen läßt^[67-69].

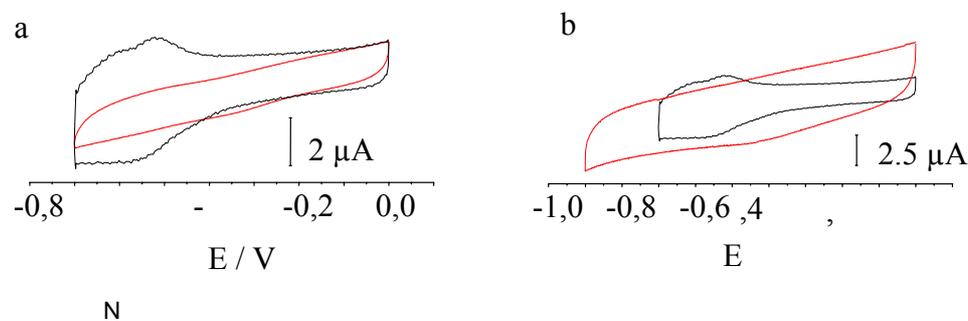


Abbildung 34: a) Mit Cytochrome C (rot) und mit Elektronenlabelkonjugat (schwarz) modifizierte Goldelektrode. b) Elektronenlabelkonjugat modifizierte Elektrode (schwarz) und Coadsorption von Cytochrome C und Label (rot). Alle Messungen in 0.1 M KCl bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 400 mV/s .

Abbildung 35 zeigt die CV-Ströme der mit dem Konjugat modifizierten Elektrode in Abhängigkeit der Vorschubgeschwindigkeit. Das lineare Verhalten und die kleine Peakseparation von kathodischen und anodischen Peakpotentials verdeutlichen gut den Oberflächencharakter des Elektronentransfers vom Elektronenlabel zur Elektrode.

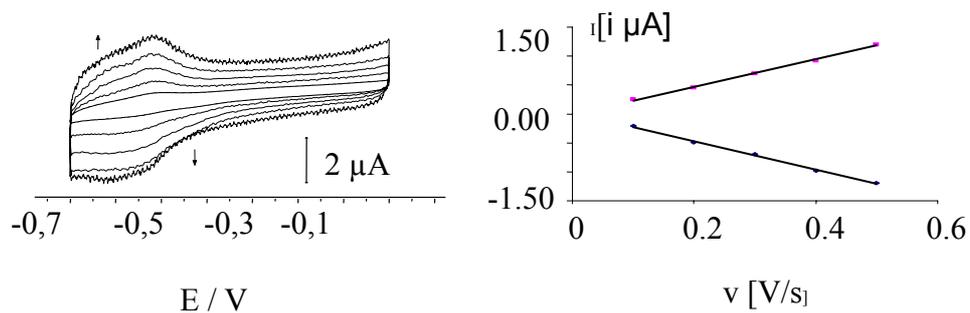


Abbildung 35: Elektronenlabelkonjugat modifizierte Goldelektrode bei 5 verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten v und Auftragung der Peakströme i_{pc} (blau) und i_{pa} (rot) gegen v .

Die Coulometrie der Welle ergab $Q = 5.1 \cdot 10^{-7}$ C. Das entspricht einer Label-Konzentration von $c(\mathbf{L}_1) = 3.7 \cdot 10^{-11}$ mol/cm² verglichen mit den in der Literatur angegebenen Oberflächenkonzentrationen von Cyt C an Goldoberflächen zwischen $1.4 \cdot 10^{-12}$ bis $1.6 \cdot 10^{-12}$ mol / cm² [70, 71] entspricht dies einer 2.3-2.6 fachen Substitution des Label \mathbf{L}_1 an Cytochrome C. Eine Goldelektrode, die nur einer Lösung der Carbonsäure des Elektronenlabels (\mathbf{L}_1) ausgesetzt war, zeigt dieses Verhalten nicht. Daraus wird gefolgert, dass der Label alleine nicht genügend Affinität zur Goldelektrode besitzt, um an ihr zu adsorbieren. Co-Adsorption kann daher ausgeschlossen werden.

4.3.4.2 pH-Titration von Proteinschichten auf Elektrodenoberflächen zur Redoxindikation

Die Identifikation des erfolgreichen Labels von Cytochrome C gelingt durch den Nachweis der inhärenten, pH-unabhängige positive Ladungen des Labels. Wie eingangs erwähnt, verhalten sich Proteinschichten als Elektronenschleusen gegenüber geladenen Markerionen. In Abhängig vom pH-Wert wird die Proteinschicht positiv durch Protonierung bzw. negativ durch Deprotonierung aufgeladen und blockiert (bzw. ermöglicht) den Elektronentransfer vom Markerion zur Elektrode. So verhält es sich auch mit einer Cytochrom C modifizierten Elektrode. Ein negativer Marker $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ erfährt im sauren pH-Bereich keine Abstoßung und der volle Diffusionsstrom wird gemessen. Der Verlauf in hohe pH-Bereiche verläuft sigmoidal bis auf ein Minimum. Dasselbe Experiment mit dem Konjugat bringt über den ganzen pH-Bereich einen maximalen Strom (Abbildung 36).

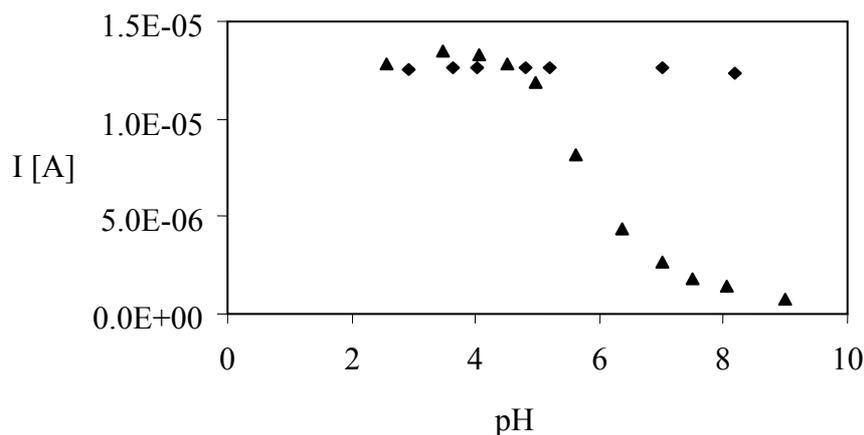


Abbildung 36: DPV-Redoxströme negative geladener Markerionen $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1mM in 0.1 M KCl) an Cyt C (▲) gelabeltes Konjugat (■) modifizierter Goldelektrode.

4.3.5 Fazit

Es wurde gezeigt, dass die neuen Elektronenlabel (L_1 und L_2) als Carbonsäure amidisch an Proteine geknüpft werden können. Obwohl eine Isolation der Produkte nicht gelang, wurde mittels Elektrophorese, Massenspektroskopie und elektrochemischen Methoden für das Konjugat des Cytochrom C's der Substitutionsgrad mit 2-3 bestimmt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein auf diese Weise gelabeltes Protein für elektrochemische Methoden zugänglich gemacht werden kann. Erstmals wurde ein elektroaktives Dendrimer zur Signalverstärkung in bioanalytischen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt.

Das Experiment spielte auch eine wichtige Rolle zur Klärung des Mechanismus des Ladungstransportes durch unspezifisch adsorbierte Proteine auf Gold. Es konnte damit gezeigt werden, dass die positive Ladung des Labels auf Cyt. C den Ladungsdurchtritt deutlicher beeinflusst als dies durch Protonierung / Deprotonierung der peripheren Aminosäuren des Proteins möglich ist. Diese Untersuchung wurde kürzlich im J. Amer. Chem. Soc. veröffentlicht^[72](im Anhang).

4.4 Neue oberflächenaktive NTA Derivate

Um Histag-Proteine³ entweder reversibel und/ oder richtungsorientiert auf einer Oberfläche zu binden werden Oberflächen mit einem terminalem NTA-Chelator versehen. Der NTA-Chelator bindet Ni^{2+} und stellt vier von sechs der Ligandenbindungen des oktaedrischen

Komplexes zur Verfügung (Abbildung 37). Die Poly-Histidin-Gruppe ^[58] und wurde bereits erfolgreich von Whitesides et al. ^[48] auf Gold in einer proteophoben 2-D-Matrix (um unspezifische Adsorption des Protein auf der Oberfläche zu unterdrücken) aus TEG-Alkyl-Thiolen⁴ auf Gold verwendet.

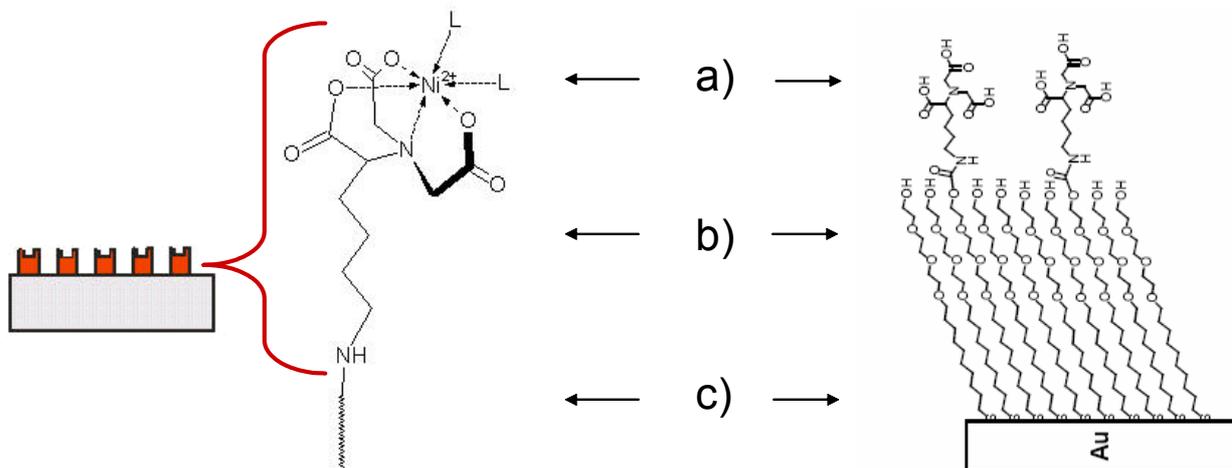


Abbildung 37: Oberflächenaktive NTA-Derivate mit a) NTA-Gruppe, b) Spacereinheit und c) oberflächenaktiver Gruppe. links: schematisch dargestellte funktionalisierte Elektrode. rechts: auf bekannter Oberfläche.

Vorteile einer solchen Oberfläche sind:

- + Einstellbare Oberflächenkonzentrationen
- + Reversibilität der Proteinbindung zu Elektrode
- + Definierte Ausrichtung des Proteins

Nachteile sind:

- der hohe synthetische Aufwand
- die Behinderung des Elektronentransfers zur Elektrode durch den alkyischen SAM.

Im Folgenden sollen neue Wege zur Erzeugung von mit NTA-modifizierten Elektroden vorgestellt werden, die elektrochemischen Messungen über Ni-NTA chelatgebundene Proteine ermöglichen. Dazu werden neue, potentiell oberflächenaktive Verbindungen synthetisiert. Es wurden zwei Gruppen von NTA-Verbindungen untersucht:

- NTA-Derivate mit Thio- bzw. Disulfid-Funktionalität
- NTA-Derivate mit Pyrrol als elektropolymerisierbare Gruppe

³ Protein mit biochemisch eingefügter C oder N terminaler Histag-Gruppe. Histag ist eine zumeist hexa- oder deca-Histidin gruppe.

⁴ TEG = Triethylenglycol

Diese zwei Strategien sollen durch eine kurze Spacergruppe, oder durch Bildung eines elektrisch leitenden Polymers auf der Elektrodenoberfläche die elektrochemische Kommunikation zwischen NTA und Elektroden ermöglichen. Abbildung 38 zeigt die im Folgenden auf Oberflächenaktivität untersuchten NTA-Derivate. An eine der Methylengruppen der NTA-Gruppe ist ein Alkylrest a) mit terminaler Thiolfunktion, die S-Alkyl geschützt als Disulfid vorliegt und b) mit terminaler Pyrrol bzw. Indolgruppe, die bekannt dafür sind, dass sie sich anodisch auf Elektroden polymerisieren lassen.

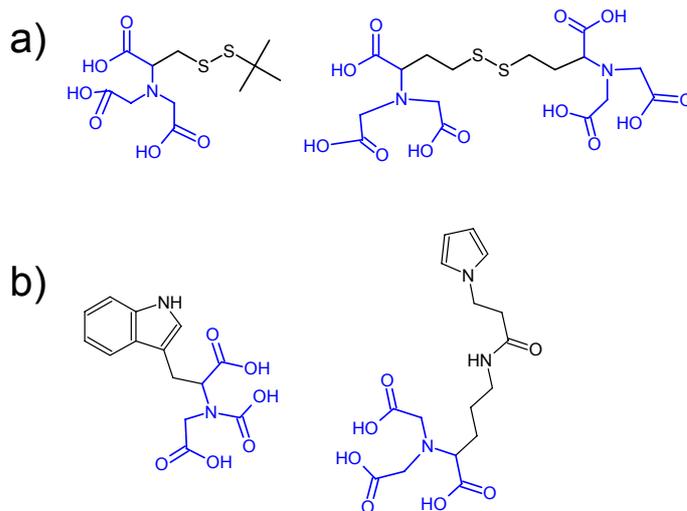
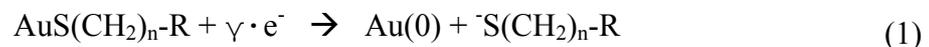


Abbildung 38: NTA-Derivate (NTA-Gruppe (blau); **30** und **31**: a) geschützte NTA-Thiole als Disulfide. b) NTA Pyrrol-Derivate; **28** und **28a**

Alkyllische Thiole aus ethanolischen Lösungen bilden auf Goldoberflächen selbstassemblierende Monolayerschichten^[11, 73]. Die kovalente S-Au-Bindung zwischen Alkylthiol und der Goldoberfläche kann reduktiv gespalten werden. Der Reduktionsprozess langkettiger Alkylthiole verläuft nach:



Der theoretische coulometrische Wert für alle Thiole beträgt 1F / mol bzw. 1 Elektron / Molekül. Deshalb liefert die Coulometrie des Desorptionspeaks die Oberflächenkonzentration^[74, 75]. Das Desorptionspotential nimmt Werte zwischen -0.9 V bis 1.6 Volt⁵ ein und hängt stark von der chemischen Beschaffenheit des Thiols und der SAM-Ordnung ab. Außerdem wird in fast allen Fällen eine Rückreaktion von (1) bei genügend hohen

⁵ in wässriger Natronlauge (pH=13); Referenzsystem: Ag/AgCl

Vorschubgeschwindigkeiten beobachtet, so dass ein mehrfaches Überscannen eines langsam abnehmenden Peaks möglich ist.

1979 entdeckte und beschrieb *Diaz* das erste Mal, dass Pyrrol auf Elektroden elektropolymerisiert. Er stellte auch einen Mechanismus vor, der durch theoretische Überlegungen und experimentellen Befunde, neben mindestens drei weiteren Vorschlägen^{6[76-78]} als der wahrscheinlichste gilt^[79]. Der *Diaz*-Mechanismus (siehe Abbildung 39) beginnt mit einer Elektronen Transfer Reaktion (E), gefolgt von einer chemischen Reaktion (C), welche die Rekombination zweier Kationradikale (Schritt II) zu einem Dimer beinhaltet und der in einem anschließenden Stabilisationsschritt, durch die Abspaltung zweier Protonen, ein aromatisches System bildet (Schritt 3). Im Folgenden wird das gebildete Dimer an der Elektrode zum Radikalkation oxidiert. Die Schritte wiederholen sich mit überschüssigem radikalkationischen Pyrrol zu den höheren Polymerstufen. Es handelt sich dabei um einen typischen E(CE)_n-Mechanismus^[80].

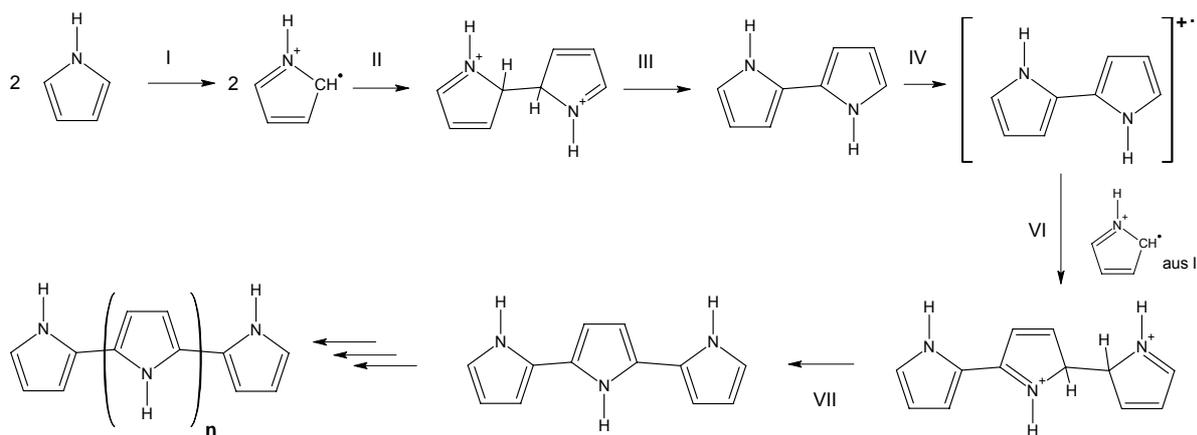


Abbildung 39: *Diaz*-Mechanismus der Elektropolymerisation von Pyrrol.

Die Leitfähigkeit des Polypyrrols ist nur bei kationischer Dotierung gegeben. Die Brutto-Reaktion berücksichtigt die ionische Zusammensetzung des Polymerfilms und kann wie folgt formuliert werden:

⁶ Kim's-, Pletcher's- und Reynolds Mechanismus

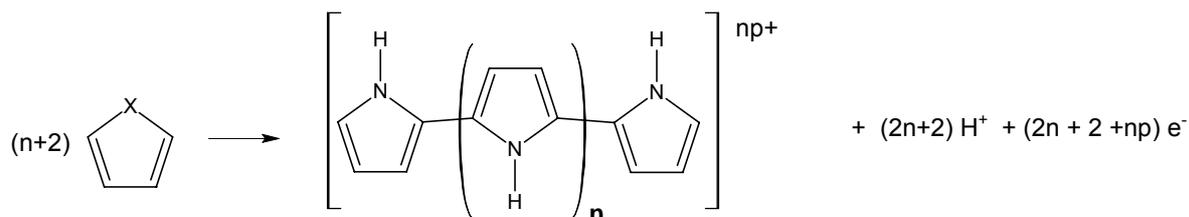


Abbildung 40: Brutto *Diaz* – Mechanismus mit X = NH, NR und NAr.

Der Film besteht aus 65 %-Gewichtsanteilen Polymer und 35 % Anionen. Stöchiometrische Bestimmungen des Elektronenverbrauchs ergeben Werte zwischen 2 und 2.7. Zwei Elektronen werden für die Filmbildung benötigt. Der Überschuss an gefundener Ladung ist bedingt durch die Oxidation des entstehenden Polymerfilms.

Die synthetisierten Verbindungen **28** und **28a** zeigten dieses Wachstumsverhalten nicht. Um dennoch eine mit Polypyrrol-NTA funktionalisierte Elektrode zu erhalten wurde ein anderer Weg eingeschlagen, der in 4.5.3 beschrieben wird.

4.4.1 Elektrochemisches Verhalten von NTA-Thiol modifizierten Goldelektroden

4.4.1.1 Reduktive Desorption von t-Bu-Cystamin-NTA

Es werden CV-Experimente zur Ermittlung der Existenz der Thiol-Gold-Bindung durchgeführt. Die Desorptionspotentiale und -ströme werden vermessen. Des Weiteren werden Vergleichsexperimente mit Referenzsystemen gemacht. Hierzu werden Goldelektroden mit den Mercapto-Eduktsstoffen, t-Bu-Cystamin-NTA und mit den Schutzgruppenthiole modifiziert.

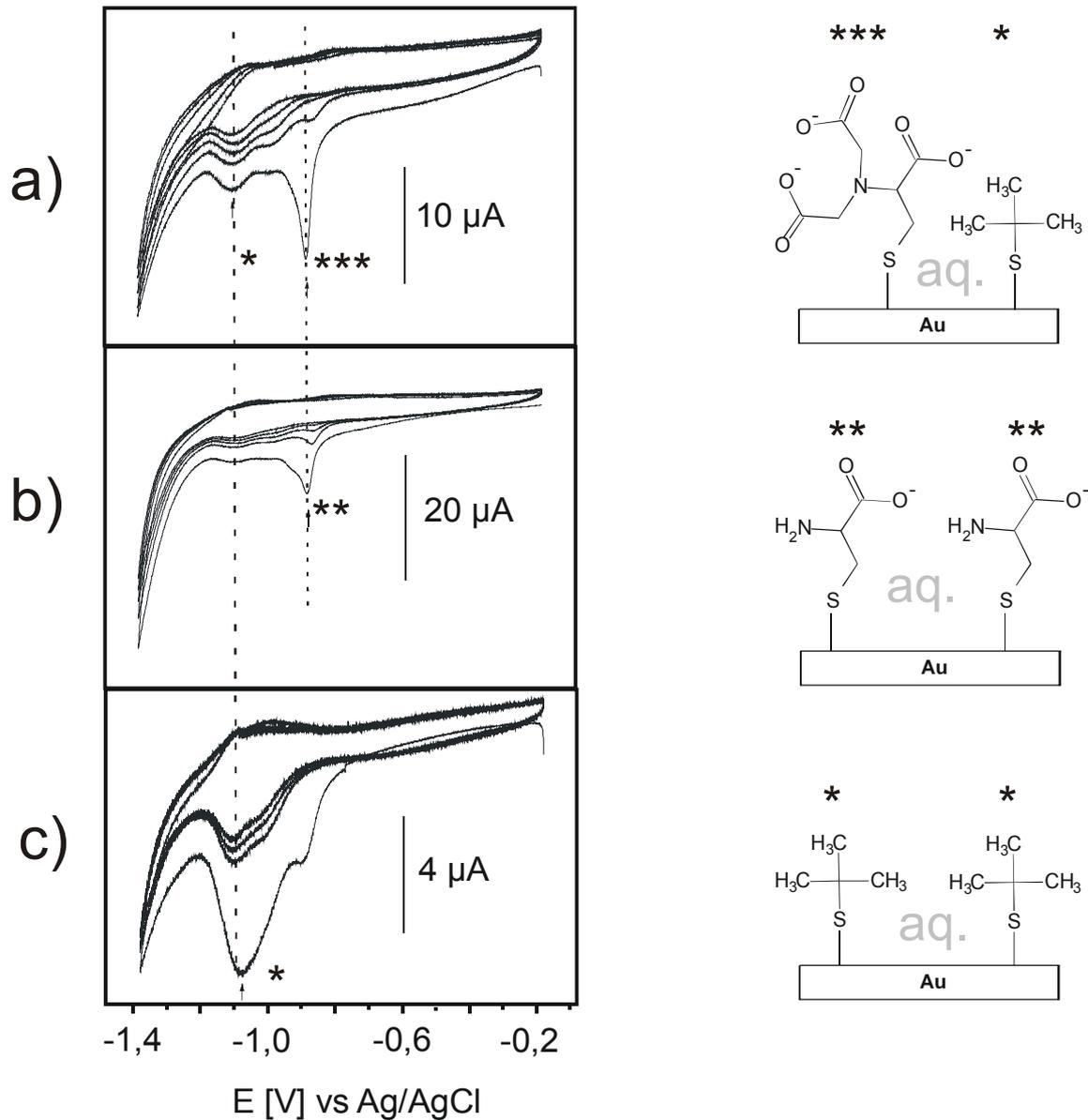


Abbildung 41: Alle Messungen in 0.5 M NaOH mit $v = 0.1 \text{ V/s}$. Modifikation der Goldelektroden mit 0.1 M Thiollösung (Ethanol/Wasser(9:1)) über 24 h. a) mit *t*-Bu-Cys-NTA b) nur Cys und c) nur *tert*-Butylthiol. *** = sehr hoher; ** = hoher; * = geringer Lösungsdruck.

Abbildung 41a zeigt das Cyclovoltamogramm einer mit 2-[Bis(Carboxymethyl)amino]-3-(*tert*-butyldithio)propansäure (*tert*-Bu-Cys-NTA) modifizierte Goldelektrode. Es sind zwei Desorptionspeaks bei -0.9 V und -1.12 V mit unterschiedlichen Größen der Peakflächen zu erkennen. Auffällig ist, dass der größere Desorptionspeak bei -0.90 V bei mehrmaligem Überscannen rasch verschwindet, während der Desorptionspeak bei -1.12 V nur bis auf ca. die Hälfte seiner vorherigen Größe abnimmt. Die Präsenz zweier Peaks deutet auf Konnektivität zweier unterschiedlicher Thiole auf der Goldelektrode hin. Da die Modifikation mit einem unsymmetrischen Disulfid erfolgte und die Disulfidbindung durch Reaktion an Gold homogen gespalten wird, setzt sich die derivatisierte Oberfläche offenbar aus Thiol-NTA und Thiol-*tert*-butyl Verbindungen zusammen. Die Frage, warum das Säuregruppenthio ca.

dreieinhalbmal so häufig (siehe Tabelle 7) an die Oberfläche bindet als das Tert.-butyl, konnte nicht vollständig geklärt werden.

	t-Bu-Cys-NTA		Cys	Homocys-NTA	t-Bu-Thiol
E_{Des} [V] ¹⁾	-0.90	-1.12	-0.89	-0.89	-1.10
Q [μ C] 1. scan	4.56	1.26	4.03	5.23	5.60
Q [μ C] 5. scan	₋₂₎	1.37	₋₂₎	₋₂₎	2.21
$\Gamma \cdot 10^{-10}$ [mol/cm ²] 1. scan	6.87	2.07	5.967	7.74	8.29
$\Gamma \cdot 10^{-10}$ [mol/cm ²] 5. scan	2.09	₋₂₎	₋₂₎	₋₂₎	1.07

Tabelle 7: 1) Daten aus CV gegen Ag/AgCl in 0.5 M NaOH; Vorschubgeschwindigkeit $v = 0.1$ V/s. 2) Unter der methodischen Nachweisgrenze.

Hinweise für die richtige Zuordnung der Peaks ergibt die Beobachtung, dass einer der Peaks schon nach dem 2. Scan vollständig verschwunden war, während der andere nur ca 10 % einbüßte. Da die Desorptionsexperimente in stark alkalischem Milieu stattfanden wird angenommen, dass das ionisch vorliegende Säurethiol einen geringeren „Lösungsdruck“ vom Elektrolyten erfährt als das allyphatische ungeladene Thiol. Um diese Annahme zu untermauern, werden zwei weitere Elektroden mit Cystein (Cys) (als ionische Thiolkomponente) und tert.-Butylthiol unter gleichen Bedingungen modifiziert und elektrochemisch vermessen (siehe Abbildung 41 b, c). Es ist gut zu erkennen, dass die jeweiligen Komponenten fast identische Desorptionspotentiale aufweisen und ähnliche Ablösekinetiken besitzen.

Die mit der symmetrischen Homocys-NTA-Verbindung modifizierte Elektrode zeigt vergleichbare Eigenschaften wie die mit Cys-modifizierte (siehe Tabelle 7).

4.4.1.2 pH-Abhängigkeit von Markerströmen einer tert.-Bu-Cys-NTA modifizierten Elektrode

Im Folgenden werden Markerströme in Abhängigkeit vom pH-Wert des Elektrolyten an einer neuen mit NTA-modifizierten Oberfläche gemessen, um diese weiter zu charakterisieren (siehe auch 4.3.4.1). Theoretisch wäre es so denkbar, die pK_s -Werte der drei Carbonsäuren der NTA-Gruppe auf der Oberfläche zu bestimmen. Mit zunehmendem pH-Wert bzw. abnehmendem Protonierungsgrad der NTA-Gruppe, wird die Oberfläche undurchlässiger für das negativ geladene Markerion ($[Fe(CN)_6]^{3-}$).

In Abbildung 42 sind die CV-Messungen an einer mit tert.-Bu-Cys-NTA modifizierten Elektrode aufgetragen. Bei kleinen pH-Werten ist der volle Redoxstrom des Markerion $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ bei 0.25 V erkennbar. Er unterscheidet sich nicht von einer unmodifizierten Elektrode. Mit zunehmenden pH-Werten nimmt dieser Strom ab und die Peak Separation nimmt Werte von 60 mV (reversibles Redoxsystem) bis über 200 mV (irreversibel Redoxsystem) an.

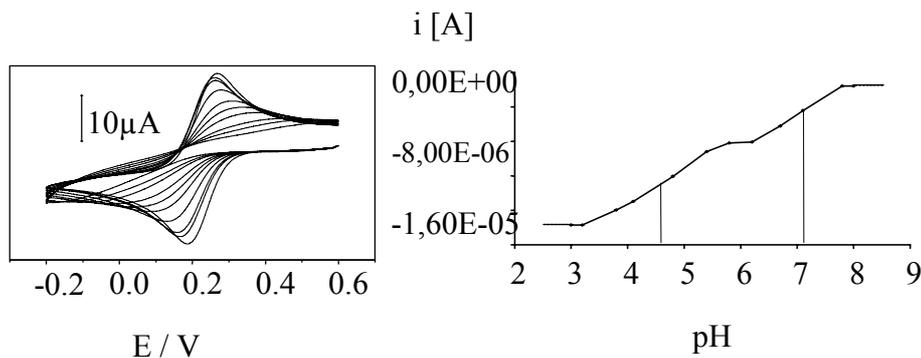


Abbildung 42: links: pH-Titration einer t-Bu-Cys-NTA modifizierten Goldelektrode; Marker: $1\text{mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ in 0.1 M KCl . rechts: Auftragung der kathodischen Peakströme gegen pH.

Die Auswertung der Peakströme ergibt eine zweistufige sigmoidale Titrationskurve (Abbildung 42 rechts). Der $\text{pK}_s(\text{H}_3\text{-NTA})$ -Wert kann mit ca. 4.5 und der $\text{pK}_s(\text{H}_2\text{-NTA})$ -Wert mit 7.2 angegeben werden. Die Ströme im stark Alkalischen können, auf Grund des Verschwindens des Peaks, nicht mehr ausgewertet werden und werden als Plateaubildung extrapoliert.

Da die Ströme im Alkalischen bis auf unter 5 % des möglichen Diffusionsstroms abnehmen, kann von einer guten Abdeckung (SAM-Bildung) der Thiol-NTA-Verbindungen ausgegangen werden.

4.4.2 XPS- Charakterisierung der tert.-Bu-Cys-NTA bzw. tert.-Bu-Cys -Ni-NTA -modifizierten Goldoberfläche

Die neue mit tert.-Bu-Cys-NTA modifizierte Elektrode wurde zusätzlich mittels XPS charakterisiert. Mit dieser Methode war es möglich, den Monolayer auf der Goldelektrode auf seine elementaren Bestandteile zu untersuchen. Mittels dieser qualitativen Elementaranalyse kann die Nickelaffinität der Elektrode überprüft werden. Weiterhin ermöglichen Detailspektren mit höherer Auflösung eine quantitative Analyse der einzelnen Spektrallinien. Das relative Verhältnis der Peakflächen zueinander spiegelt die Verhältnisse der oberflächengebundenen Elemente wieder.

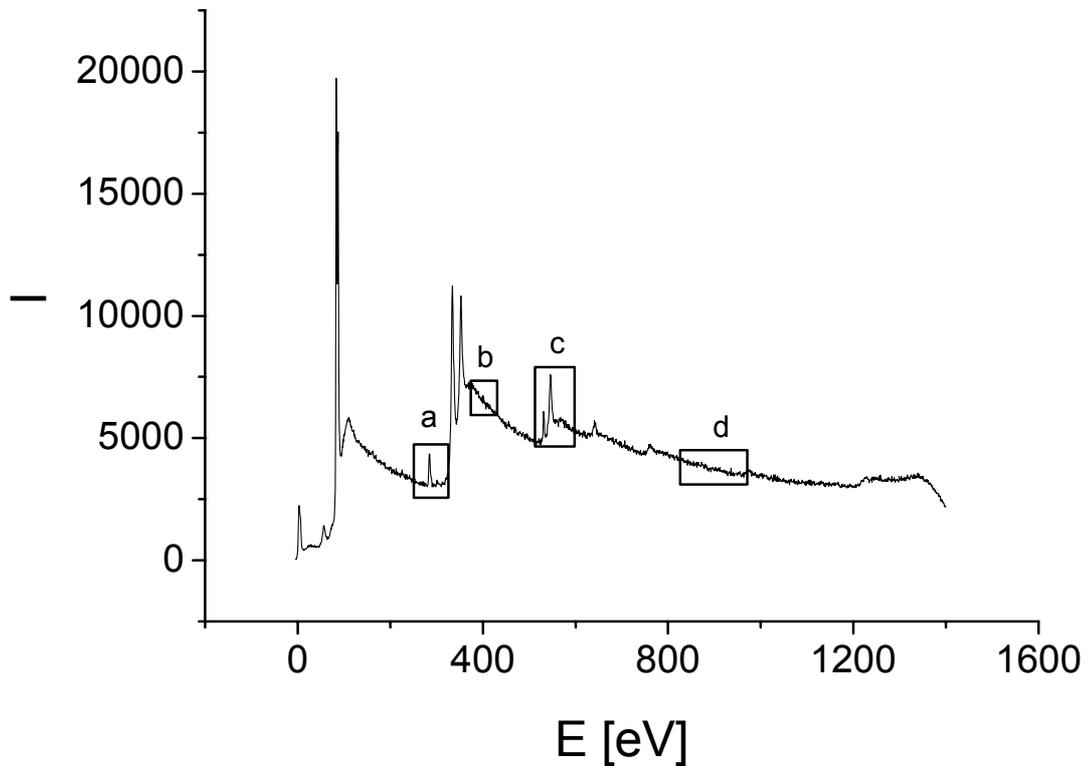


Abbildung 43: XPS von einer mit Homo-Cys-NTA modifizierten Goldelektrode nach Exposition in einer NiSO₄-Lösung.

Abbildung 43 zeigt das XPS-Übersichtsspektrum der mit tert.-Bu-Cys modifizierten Goldelektrode nach Behandlung mit einer Nickel(II)-Lösung. Qualitativ können die erwarteten Elemente Schwefel, Kohlenstoff, Stickstoff, Gold und Sauerstoff ausgemacht werden. Das Signal für Nickel bei 852 eV kann nicht detektiert werden.

	N	C(OO)	O	Au	Ni
E [eV] [*]	397	295	531	84	852
Peakfläche _{exp.} ^{**}	1	2.8	6.3	-	-
Peakfläche _{theor.} ^{**}	1	3	6	-	0

Tabelle 8: Integrationsauswertung der Peaks von N, C, O und Ni. *Zuordnung mit Hilfe von ^[81]. ** Alle Werte relativ zu N. Summenformel für tert.-Bu-NTA: C₁₁H₁₉NO₆

Die Detailspektren in Abbildung 44 für Kohlenstoff der Carboxygruppe, Sauerstoff und Stickstoff lassen die Zusammensetzung des Monolayers für diese drei Elemente erkennen und können auch quantitativ analysiert werden. Die gefundenen Verhältnisse für N, C(OO) und O entsprechen hinreichend genau den theoretischen Erwartungen (siehe Tabelle 8).

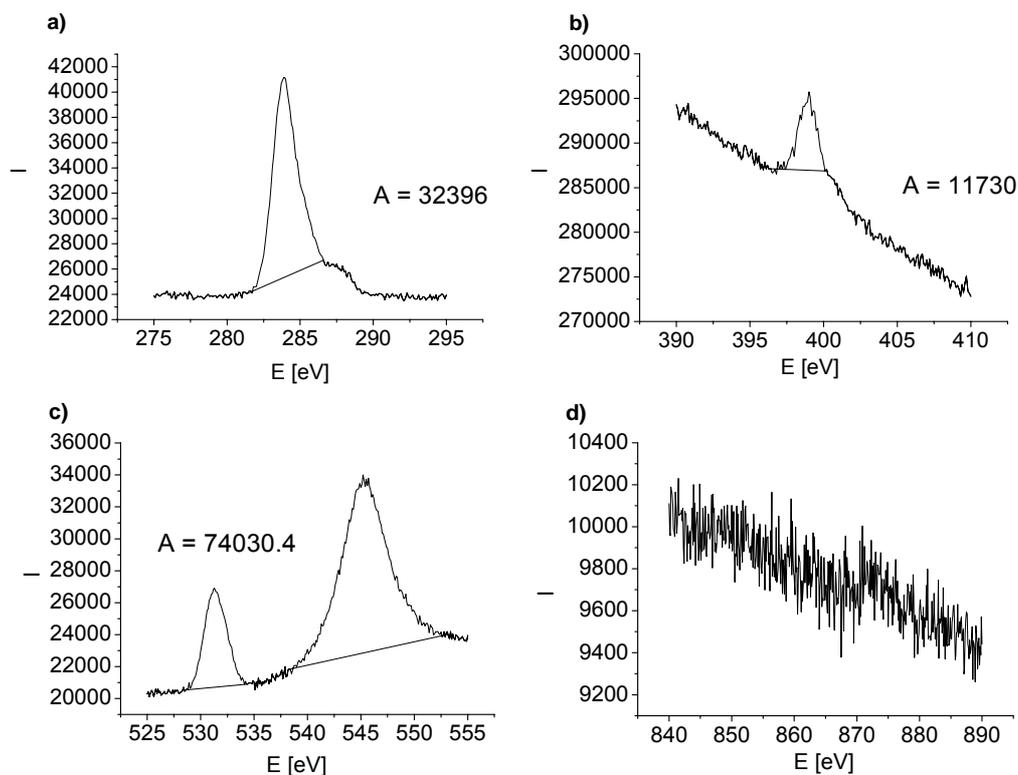


Abbildung 44: XPS-Detailspektren von C (Carboxy) (295 eV), N (397 eV), O (531 eV) und Ni (852 eV).

4.4.3 Fazit

Die neuen Thiol-NTA-Verbindungen **30** und **31** bilden auf Gold in typischer Weise selbstassemblierende Monolayerschichten aus und diese lassen sich mit unterschiedlichen elektrochemischen Methoden beschreiben. Oberflächenkonzentrationen, Desorptionspotentiale und ein pK_s -Wert der oberflächengebundenen NTA-Verbindung werden bestimmt. XPS-Messungen bestätigen die Zusammensetzung des Monolayers. Der Nachweis von Nickel kann nicht erbracht werden. Da die Atome der Chelatgruppe gut detektiert werden, ist davon auszugehen, dass Nickel nicht an die Gruppe koordiniert oder nach dem Waschen mit (leicht saurem) dest. Wasser wieder verloren geht.

4.5 Elektropolymerisation von aktivierbaren Pyrrolderivaten

Die neuen NTA-Pyrrol-Derivate (siehe Abbildung 38) sind auf Grund ihrer Instabilität nicht elektropolymerisierbar. Ursachen für die Instabilität mögen in der aciden NTA-Gruppe liegen, da Pyrrol chemisch empfindlich auf Säuren reagiert und polymerisiert. Da aber keine

typischen aromatischen Polymerisationsprodukte zu beobachten sind (das Verschwinden der aromatischen Signale im $^1\text{H-NMR}$ wurde über die Zeit beobachtet) wird von einer sterischen Hinderung der NTA-Gruppe ausgegangen, die die Rekombination zweier Pyrrol-NTA-Derivate im radikal-anionischen Zustand verhindert und eine Abreaktion mit dem Lösungsmittel oder Eliminationsreaktionen begünstigt^[79].

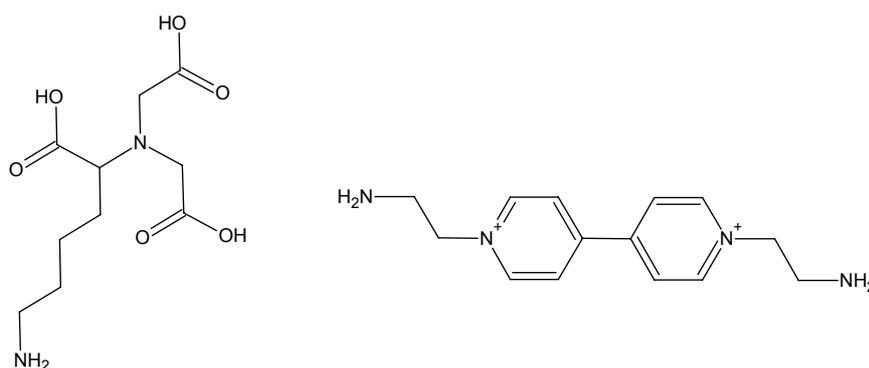


Abbildung 45: AB-NTA und N,N'-Di-(Aminoethyl)-4,4'-Bipyridinium

Die Instabilität und das Fehlen der Polymerisationseigenschaften dieser Verbindungen führen zu einem Strategiewechsel, um dennoch die gewünschte NTA-Polymerschicht auf Elektrodenoberflächen zu erhalten. Es wird N-Propansäurepyrrol anodisch polymerisiert^[82] und die Carbonsäurereste des Polymers werden aktiviert und amidisch mit der γ -Aminogruppe des AB-NTA (bzw. mit den Aminogruppen des N,N'-Di-(Aminoethyl)-4,4'-Bipyridinium) (siehe Abbildung 45) verknüpft. Dass die Carbonsäurereste des oberflächengebundenen Polymers für diese Art der Reaktion zugänglich sind, wird zunächst mit der symmetrischen N,N'-Di-(Aminoethyl)-4,4'-Bipyridinium-dibromid-Verbindung getestet, da eine erfolgreich verlaufende Reaktion leicht über das oberflächengebundene Redoxsystem überprüft werden kann. Die Reaktion mit AB-NTA kann nur indirekt über die eingeführte NTA-Gruppe elektrochemisch nachgewiesen werden, die Nickel (II) als Chelatkomplex an sich bindet und Nickel in stark alkalischen Lösungen elektrochemisch nachweisbar ist^[59].

4.5.1.1 Amidknüpfung an oberflächengebundenes N-Propansäure-Polypyrrol

N-Propansäurepyrrol^[59] und N-Propansäurpentafluorphenolesterpyrrol werden jeweils auf einer Graphitelektrode elektropolymerisiert. Wie in Abbildung 46 schematisch dargestellt, werden die Carbonsäurereste des Polymers in einem ersten Schritt (I) aktiviert, um sie im zweiten Schritt amidisch mit einer Aminokomponente zu verknüpfen, bzw. im Falle des

Polypyrrols mit den aktivierten Perfluorsäureresten direkt mit der jeweiligen Aminokomponente umzusetzen.

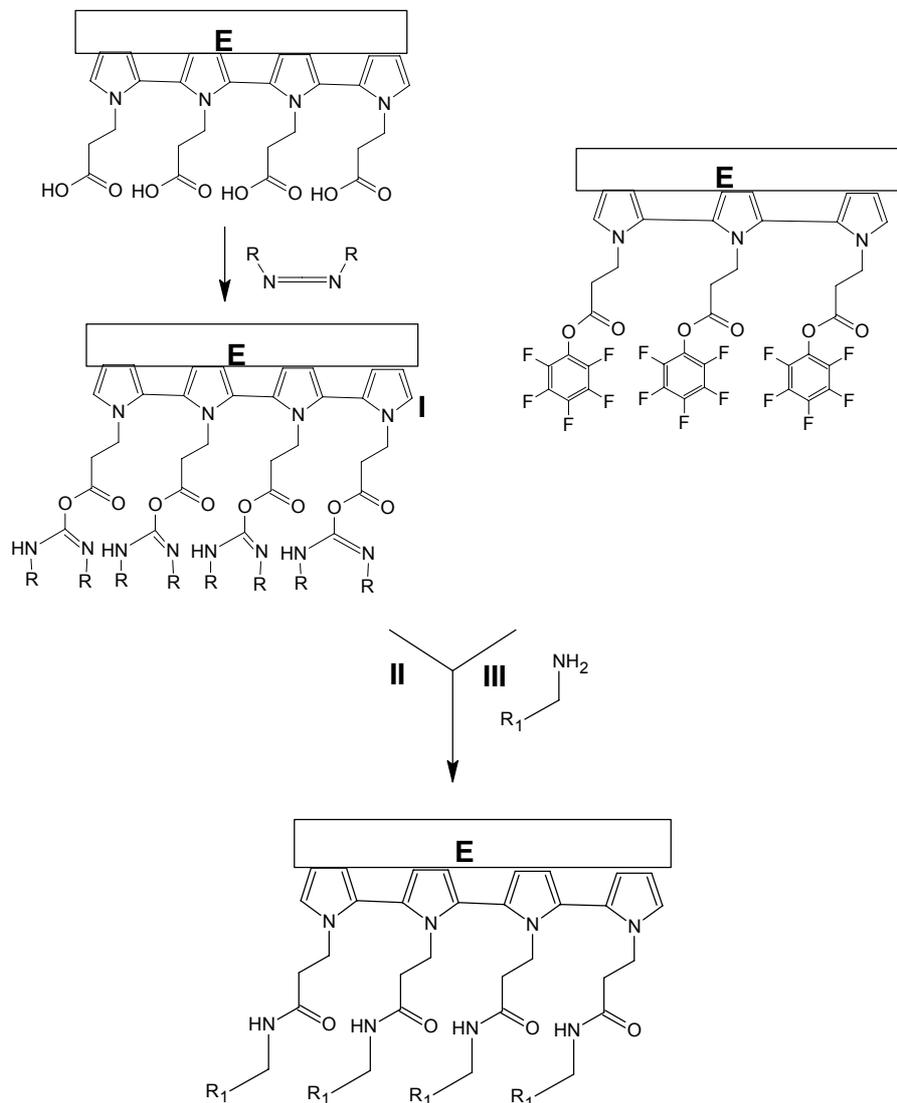


Abbildung 46: Oberflächenpolymer auf Elektrode (E) mit Carbonsäureresten (links) wird mit Carbodiimid-Derivat EDC⁷ aktiviert (I) und in Schritt II mit der Aminokomponente verknüpft.

Im Folgenden werden die so modifizierten Elektroden elektrochemisch vermessen und beschrieben. Als Aminokomponenten werden die oben beschriebenen AB-NTA-Verbindung (Abbildung 45) und das Bromidsalz des N,N'-Di-(Aminoethyl)-4,4'-Bipyridinium verwendet.

⁷ 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride

4.5.2 CV-Ströme eines amidisch verknüpften Viologens an einer N-Propansäurepolypyrrol-Elektrode

Um die nach *Glidle et al.*^[59] mit N-Propansäurepolypyrrol modifizierte Elektrode auf die Aktivierbarkeit der Carboxyreste zu überprüfen, wird die Elektrode zunächst in eine Lösung mit einem Aktivierungsgagens getaucht und dann wenige Stunden einer Lösung von N,N'-Di-(Aminoethyl)-4,4'-Bipyridinium-dibroimid ausgesetzt. Der erfolgreiche Umsatz kann direkt in wässriger Elektrolytlösung mittels CV nachgewiesen werden (siehe Abbildung 47).

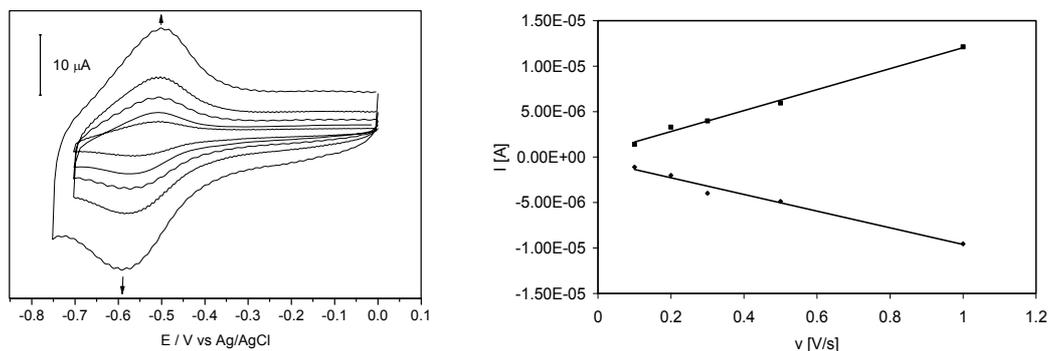


Abbildung 47: CV's der ersten Viologenwelle bei $v = 0,1, 0,2, 0,3, 0,5$ und 1 V (links). Anodische und katodische Peakströme in Abhängigkeit von der Vorschubgeschwindigkeit v .

Die symmetrischen Peaks bei $-0,53$ V sowie der lineare Zusammenhang zwischen Peakströmen und der Vorschubgeschwindigkeit zeigen eindrücklich die Konnektivität der Aminoviologenverbindung zur modifizierten Elektrode. Die Ergebnisse ließen sich auch noch nach 24 Stunden langem Waschen der Elektrode reproduzieren, so dass Adsorptionsphänomene ausgeschlossen werden können. Die Oberflächenkonzentrationen von Viologenen wird coulometrisch mit $1,2 \cdot 10^{-10}$ bestimmt.

4.5.3 Anodische Elektropolymerisation und NTA bzw. Ni-NTA Funktionalisierung

Für N-(Propansäureperfluorphenolester)-pyrrol (PFP-Ester) gilt es zu zeigen, das sich diese Verbindung wie N-(Propansäure)-pyrrol und andere Pyrrole anodisch elektropolymerisieren lässt (wie in Abbildung 39). Zudem soll untersucht werden, ob das gebildete Polypyrrol die folgende gewünschten Eigenschaften besitzt: Das gebildete Polymer soll elektrisch leitend sein und immer noch aktive Perfluorsäureestergruppen besitzen, was eine weitere Modifikation mit AB-NTA und anderen primären Aminen zulässt.

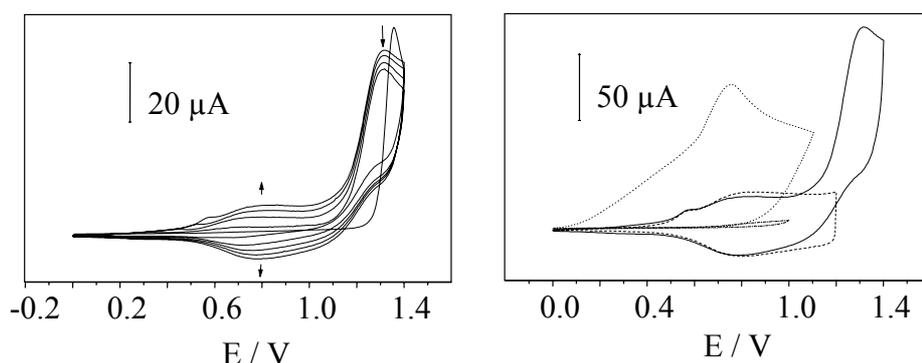


Abbildung 48: CV (links): 1-5 Scan in einer $5 \cdot 10^{-3}$ M PFP-Ester (0.05 M TBABF_4 / MeCN) Lösung mit $v = 0.05$ V/s und Ag/AgCl als Referenzsystem. CV (rechts): 5. scan wie links (Linie durchgehend); nach Polymerisation in reinem Elektrolyt (0.05 M TBABF_4 / MeCN) (Linie unterbrochen); erster (Linie gestrichelt) und zweiter (Punktstrich) Scan nach Reaktion mit AB-NTA

Abbildung 48 links zeigt die ersten fünf Scans im CV einer PFP-Ester-Lösung. Über einen Bereich von 0 V bis 1.2 V zeigt sich die Lösung inert. Bei 1.35 V zeigte sich ein irreversibler Oxidationspeak. In den weiteren Scans bildet sich ein wachsendes reversibles Redoxsystem bei 0.8 V aus und der irreversible Oxidationspeak verschiebt sich nach 1.31 V und nimmt mit der Anzahl der Scans ab. Dieses Verhalten zeigt die Polymerisation des PFP-Esters: Das gelöste Monomere wird bei hohem Potential zum Radikalkation oxidiert und kann nach dem Diaz-Mechanismus (siehe 4.4) mit weiterem monomeren Radikalkation rekombinieren werden und setzt sich als Polymer auf der Elektrodenoberfläche ab. Das gebildete Polymer selbst lässt sich wiederum reversibel oxidieren und ein wachsender, symmetrischer Redoxpeak entsteht bei 0.8 V. Da das Monomer in Elektrodennähe langsam verarmt und nicht mehr an der ursprünglichen Oberfläche, sondern an einer modifizierten Elektrode oxidiert wird, nehmen die Ströme bei 1.3 V mit der Anzahl Scans kontinuierlich ab.

4.5.3.1 Untersuchung der modifizierten Elektrode

In Abbildung 48 rechts werden die elektrischen Eigenschaften des gebildeten Polymers im CV dargestellt. In reiner Elektrolytlösung zeigt sich das bei der Polymerisation beobachtete Redoxsystem bei 0.8 V und ist mit dem des letzten Scans aus der Polymerisation nahezu deckungsgleich. Auswertung der Coulometrie und unter der Annahme das je eine Trimereinheit im Polymer mit einer Ladung dotiert wird, lässt sich eine Oberflächenkonzentration von $\Gamma(\text{PFP-Ester}) = 4.6 \cdot 10^{-9}$ mol/cm² bestimmen.

Zudem zeigen die ersten zwei Scans der modifizierten Elektrode nach der Reaktion mit AB-NTA, welches amidisch an das gebildete Polypyrrol wie in Abbildung 46 dargestellt,

verknüpft wurde. Im ersten Scan ist ein großer Oxidationspeak bei 0.75 V und einer Coulometrie von ca. $5 \cdot 10^{-4}$ C erkennbar. Im zweiten Scan verhält sich die Elektrode inert im selben Potentialbereich.

Die irreversible Oxidation wird der hohen Coulometrie freier Aminene im Polymerfilm zugeschrieben, welche trotz aufwändigem Waschen sich nicht entfernen lassen. Zudem verhält sich die neu modifizierte Elektrode in weiteren Scans wie ein überoxidiertes Polypyrrolfilm, der keine Ladungsdotierung mehr zulässt.

4.5.3.2 Elektrochemischer Nachweis chelatgebundener Nickelionen

Der Nachweis, dass die in 4.5.3.1 beschriebene neu modifizierte Elektrode, trotz der Oxidation von freien Aminen (AB-NTA) und des überoxidierten Pyrrolfilms, die gewünschte Funktion besitzt, gelingt durch die elektrochemische Oxidation-Reduktion von NTA-gebundenem Nickel in alkalischen Elektrolyten^[59]. Die Elektrode wird dazu einer Nickelsulfatlösung ausgesetzt und erneut vermessen.

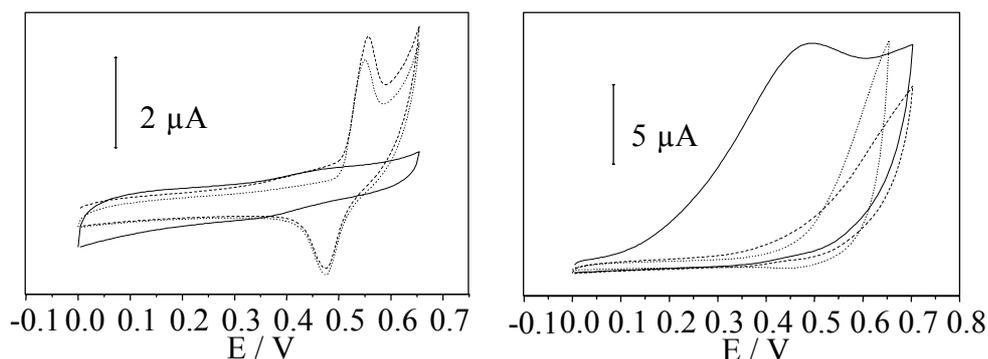


Abbildung 49 links: Nach Inkubation von NiSO_4 (Linie unterbrochen); Nach 1 h Behandlung mit Wasser pH = 6.5 (Linie durchgehend); Nach erneuter Inkubation mit Ni^{2+} (gestrichelt); alle Messungen in 0.1 M NaOH gegen Ag/AgCl mit $v = 0.1$ V/s. rechts: Erster und zweiter Scan nach der Reaktion der Poly-PFP-Ester Elektrode mit Propylamin in 0.05 TBABF₄/MeCN $v = 0.02$ V/s (Linie durchgehend und Linie gestrichelt); nach Inkubation in NiSO_4 -Lösung in 0.1 M NaOH (gepunktete Linie).

Abbildung 49 links zeigt die Cyclovoltammogramme einer mit AB-NTA modifizierten Polypyrrol Elektrode nach der Inkubation in einer Nickel(II)-Lösung, nach dem einstündigem Waschen in leicht saurer Lösung und nach der erneuten Nickel Exposition. Die scharfen Peaks bei 0.55 V (Oxidation) und 0.48 V (Reduktion) markieren die Oxidationsübergänge von Ni (II) zu Ni (III). Durch leicht saure Behandlung einer solchen Elektrodenoberfläche wird die Chelatbindung zum Nickel gebrochen und das Metall kann ausgewaschen werden (keine Peaks). Erneutes Inkubieren mit Nickellösung führt wieder zu einer Chelatverbindung.

Die Elektrode lässt sich je nach Wahl des Milieus mit Nickel be- bzw. entladen und wird dadurch schaltbar.

In Abbildung 49 rechts werden die CV's eines Kontrollperiments gezeigt. Um ausschließen zu können, dass die Nickelionen vom Polymerfilm in einer anderen Form als der gewünschten gebunden werden, wird eine Poly-PFP-Ester-Elektrode statt mit AB-NTA mit Aminopropyl umgesetzt. Auch hier werden nach der Reaktion hohe Oxidationsladungen gemessen, die in diesem Fall der Oxidation des freien Propylamin zuzuordnen sind. Nach der Exposition einer solchen Elektrode in einer NiSO₄-Lösung kann aber kein Nickel im CV nachgewiesen werden. Das heißt, dass allein die Einführung der NTA-Gruppe im ersten Fall für die Bindung an das Nickelion verantwortlich ist.

	$E_1(\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+})$ [V]	$E_2(\text{Ni}^{3+}/\text{Ni}^{2+})$ [V]	Q_1 [μC];	Γ_1 [mol/cm ²]	Q_2 [μC];	Γ_2 [mol/cm ²]
1.	0.552	0.479	4.69	$6.9 \cdot 10^{-10}$	3.47	$5.1 \cdot 10^{-10}$
2.	0.547	0.479	4.76	$7.0 \cdot 10^{-10}$	3.06	$4.5 \cdot 10^{-10}$

Tabelle 9: Oxidations- /Reduktionspotentiale und Ladungen der oberflächengebundene Nickelionen auf der neuen Polypyrrol-AB-NTA-Elektrode (GC-Elektrode). Ref.: Ag/AgCl; $v = 0.02$ V/s. 1. Nach der ersten Inkubation mit Ni. 2. Nach Säurebehandlung der Elektrode und Auswaschen des Nickels und erneuter Beladung mit Nickel.

Die ermittelten Nickeloberflächenkonzentrationen (Γ) entsprechen mit $5 \cdot 10^{-10}$ mol/cm² (siehe Tabelle 9) einer typischen Monoschicht, sie liegen um den Faktor 45 unter dem theoretischen Wert, welcher sich aus der coulometrischen erfassten Gesamtkonzentration an abgeschiedenem Pyrrol-NTA-Polymeren ergibt. Die Abweichung zeigt, dass das AB-NTA nur auf oberflächennahen Regionen des Polymerfilms gebunden wurde und nicht in tieferen Regionen eindringen kann, was durch die elektrostatische Abstossung des Dikations und des oxidierten Polypyrrols zu erklären ist.

4.5.4 Fazit

Es gelingt erstmals⁸ eine mit NTA bzw. Ni-NTA funktionalisierte Polypyrrolfilmelektrode herzustellen. Hierzu wird mittels Elektropolymerisation ein Polypyrrolfilm auf eine glasartige

⁸ Während des Schreibens dieser Arbeit wurde von Haddour et al.[36] N. Haddour, S. Cosnier, C. Gondran, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 5752.) eine elektropolymerisierbare Pyrrolverbindung mit NTA Chelator beschrieben und reversible Histag-Proteinbindung and eine derart modifizierte Elektrode mittels QCM Experimente gezeigt. Das dort verwendete Metallion war allerdings Cu²⁺.

Graphitelektrode aufgebracht, deren Seitenketten aktivierte Ester besitzen, an welche amidisch AB-NTA eingeführt wird. Die so erhaltene Elektrode lässt sich reversibel mit Nickelionen be- und entladen und elektrochemisch vermessen. *Glidle et al.* konnten bereits 2000 eine mit Polypyrrol derivatisierten Elektrode reversibel mit Nickel be- und entladen. Die Komplexierung des Metallions gelang über die Carboxysäuregruppen, des verwendeten N-Propansäurepyrrols^[59].

4.6 Protein-modifizierte Elektroden

Im Rahmen des Graduiertenkollegs *Molekulare Physiologie*⁹ wurden Proteininteraktionen mit Co-Faktoren und antagonistischen Proteinen mittels elektrochemischer und akustischer Methoden untersucht. Es gilt neue Methoden zu etablieren, die proteinogene Interaktionen auf einfache Weise auf ihre Kinetik, Thermodynamik und Stöchiometrie hin analysieren können. Dabei wird von der Überlegung ausgegangen, dass sich bei jeder proteinogenen Interaktion die globale Ladung (und damit der Makrionendurchtritt) und die Masse (damit die Frequenz der QCM) verändern soll. Zudem wird die Tatsache berücksichtigt, dass Proteine eine hohe Affinität zu Goldoberflächen besitzen und an diesen adsorbieren. Es werden ausschließlich Goldelektroden und mit Gold beschichteten Quarzkristallen verwendet. Auf diese wird das Protein unspezifisch adsorbiert. In wässrigem Elektrolyt erfolgt dann die elektrochemisch und gravimetrisch Vermessung.

4.6.1 DPV-Markerströme an mit KTrA modifizierten Goldelektrode

An einer mit KTrA modifizierten Goldelektrode werden im wässrigen Elektrolyt die DPV-Ströme gegen den pH-Wert gemessen. Als Markerion wird ein positiv geladener Ruthenium(III) Komplex verwendet. Eine sigmoidale Titrationskurve wird durch Auftragen der gemessenen Ströme gegen den pH-Wert erhalten. Maximale Ströme entstehen im basischen; minimale Ströme im sauren Bereich. Die Reproduzierbarkeit dieser Kurven ist nur innerhalb eines sehr großen Fehlerbereiches möglich. Die erhaltenen pK_s -Werte schwanken in einem pH Bereich von 3 bis 5. Abbildung 50 verdeutlicht die Schwierigkeiten der amperometrischen Messungen der mit KTrA-Proteine modifizierten Elektroden. Abbildung 50a zeigt die Titrationskurve einer modifizierten Elektrode von niedrigen zu hohen pH-Werten und zurück. Schon bei der Rücktitration werden insgesamt kleinere Ströme gemessen als beim ersten Scann. Die ausgewerteten pK_s -Werte unterschieden sich um ca. den Wert 1.

⁹ Graduate College 612, Universität Osnabrück.

Die Strommessungen bei konstantem pH-Werten über die Zeit zeigen ebenfalls eine Abnahme der Ströme. Abbildung 50b verdeutlicht dies eindrucksvoll. Die gemessenen Ströme fallen im Zeitraum von 750 Minuten um über 60 %. Dies entspricht etwa der Stromdifferenz von Hin- und Rücktitration im ersten Experiment bei $\text{pH} = 3.5$, das über einen Zeitraum von ca. 100 Minuten durchgeführt wurde.

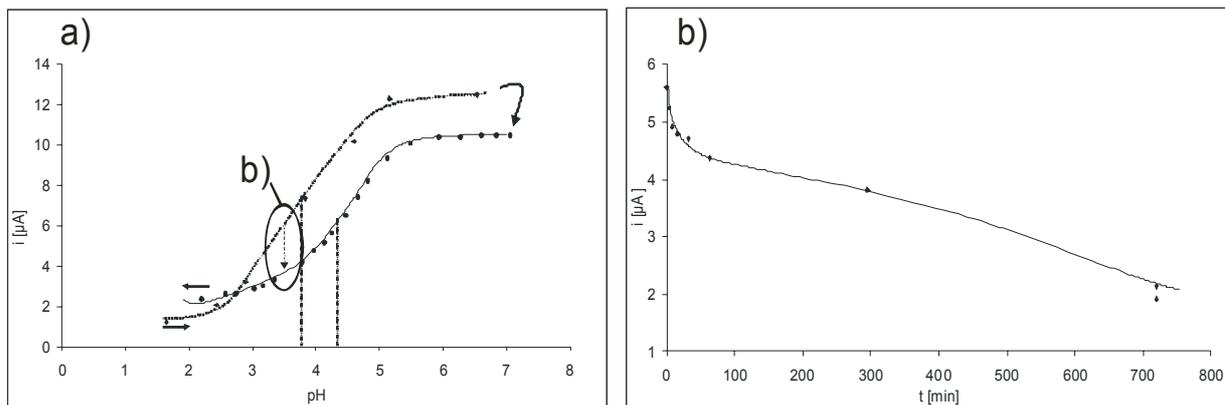


Abbildung 50: a) DPV-Ströme einer mit KTrA-Proteinen modifizierten Elektrode in Abhängigkeit des pH; Hin- und Rücktitration (in Richtung der Pfeile). b) Änderung des Stromes über die Zeit $[t]$ bei $\text{pH} = 3.5$.

Um die KTrA-Interaktion mit den Kofaktor ATP zu zeigen, werden ebenfalls modifizierte Elektroden in wässrigem Elektrolyt in Abhängigkeit von den ansteigenden ATP Konzentrationen bei konstantem pH-Wert amperometrisch vermessen. Abbildung 51 zeigt die Markerströme zweier Experimente, unter identischen Konditionen, die an frisch modifizierten Elektroden mit ansteigenden ATP Konzentrationen durchgeführt werden. Mit ansteigender ATP Konzentration sind verstärkte Ströme zu beobachten, die asymptotisch gegen einen Maximumwert laufen. Auch hier sind große Unterschiede in den Ergebnissen zu beobachten, obwohl (vermeidlich) identische Bedingungen vorliegen.

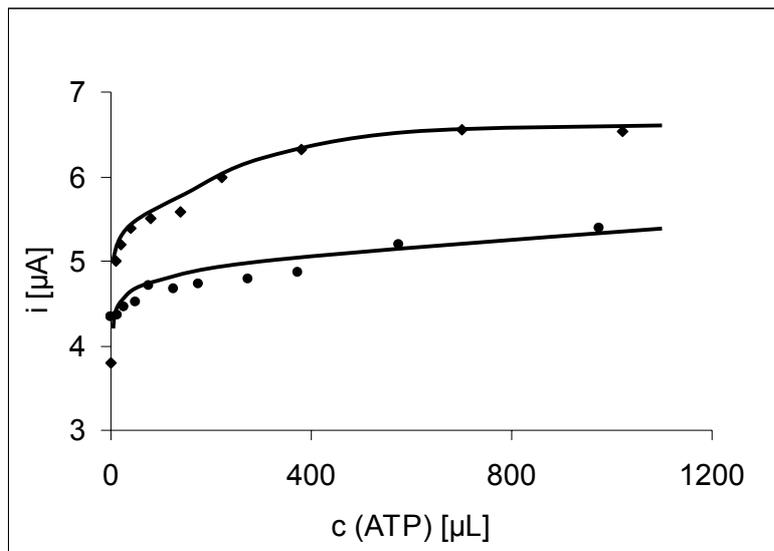


Abbildung 51: DPV-Ströme zweier mit KTrA modifizierten Goldelektroden bei pH = 3 in 10 ml einer 1mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ / 0.1 M KCl Lösung. Zugabe von ATP in μL .

Das Experiment zeigt aber, dass die zeitliche Abnahme der Ströme mit Zugabe von ATP überkompensiert werden kann und sogar ein Ansteigen der Markerströme beobachtet werden kann. Dies bedeutet, dass die Polarität der Elektrode umgepolt wird. Dies gelingt jedoch nur mit frisch hergestellten Elektroden und nur in qualitativer Weise. Reproduzierbarkeit definierter Ströme zu vorgegebenen Bedingungen ist nicht möglich.

Elektroden, die über längeren Zeitraum „gealtert“ sind, zeigen beschriebenes Verhalten nicht.

4.6.2 Fazit

Mit KTrA modifizierte Elektroden, die durch unspezifische Adsorption an Goldoberflächen erhalten werden, eignen sich nicht oder nur sehr bedingt zur qualitativen Analyse als sensorische Elektroden. Eine schnelle Alterung (Denaturierung) der Proteinschicht der verwendeten Proteine auf der Elektrodenoberfläche spielt hierbei eine große Rolle. Eine gealterte Elektrode zeigt zwar ein stabileres Verhalten, jedoch ist sie inert gegenüber Co-Faktoren, von denen bekannt ist, dass diese häufig nur mit nicht-denaturierten Proteinen reagieren. Ähnliche Ergebnisse werden auch mit dem Protein 36K erhalten (hier nicht näher aufgeführt).

4.7 QCM Untersuchungen zur Protein-Protein Interaktion von G-Aktin und C-Untereinheit

G-Aktin und C-Untereinheit (C^*) verhalten sich zueinander wie antagonistische Proteine, die im Aufbau von globulären Aktin, dem G-Aktin (monomere Einheit), zum Aktin im Filament (F-Aktin, polymere Form), eine Rolle spielen^[83]. Um die Interaktion genauer beschreiben zu können, wird nach einer Methode gesucht, welche diese Interaktionen auf Kinetik, Stöchiometrie und Thermodynamik hin analysieren kann. Da beide Reaktionspartner relativ große Massen besitzen (G-Aktin = 45kD und C^* = 42 kD) wird das System mittels einer Quarzkristallmikrowaage (QCM) vermessen. Es wird ein mit Gold beschichteter Quarz verwendet, um eine gute Affinität und eine definierte Oberfläche zu erreichen. Der Quarz ist in eine Kleinst-Volumen-Umflußzelle^[84] integriert, welche einen sachten Austausch von Protein-, Wasch-, und Co-Faktorenlösungen über der Kristalloberfläche ermöglicht.

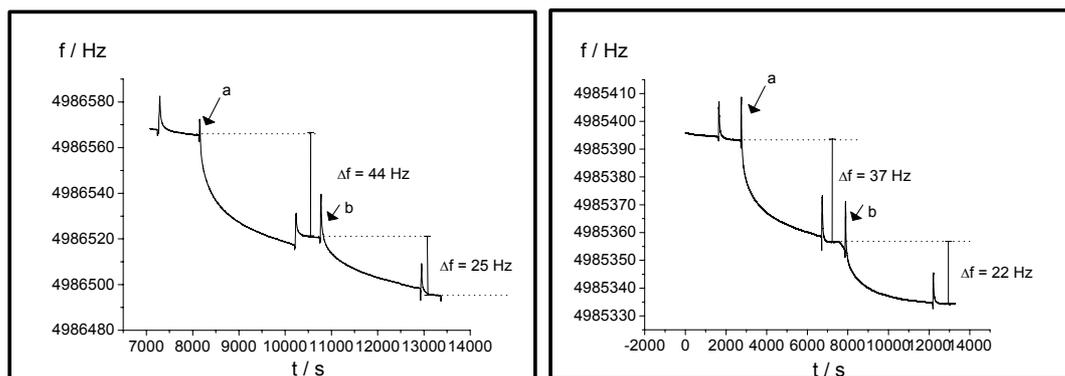


Abbildung 52: 5 MHz QCM-Frequenz-Zeit-Plott, links: a) Zugabe von $1\mu\text{M}$ G-Aktinlösung in 0.1 M KCl. b) Zugabe von $1\mu\text{M}$ C^* in 0.1 M KCl. rechts: a) Zugabe von $1\mu\text{M}$ C^* in 0.1 M KCl b) Zugabe von $1\mu\text{M}$ G-Aktinlösung in 0.1 M KCl. Alle weitere Peaks: Waschlösung mit 0.1 M KCl.

Aus biochemischen Untersuchungen ist die Interaktion der beiden oben genannten Proteine bereits bekannt^[83, 85]. Es ist aber nicht klar, ob eine Adsorption an der Elektrodenoberfläche diese Funktion beeinträchtigt. Die Frequenz-Zeitkurven in Abbildung 52 (links) zeigen die Adsorption des G-Aktins auf dem Schwingquarz. Die Frequenzänderung ist direkt proportional zur abgeschiedenen Masse und es lassen sich die abgeschiedenen Massedichten

nach der *Sauerbrey* Gleichung¹⁰ berechnen^[86, 87]. Durch die erste Adsorption, die des Proteins auf die Goldoberfläche (a), erfährt der Quarz eine Frequenzerniedrigung um ca. 40 Hz nach etwa 2000 Sekunden. Nach einer Spülung mit Elektrolytlösung wird der Quarz einer Lösung mit dem C*-Proteins ausgesetzt (b). Es setzt eine weitere schnelle Adsorption ein, welche eine Frequenzerniedrigung von über 20 Hz bewirkt. Abbildung 52 (rechts) zeigt die Adsorption des C*-Proteins auf Gold und nach einem Waschgang die Adsorptionsänderung nach exposition einer g-Aktin Lösung. Die Frequenzänderungen der Adsorptionen betragen 37 Hz und 22 Hz und liegen in etwa gleich mit denen aus dem ersten Experiment. Die Auswertung der Halbwertszeiten der ersten und der zweiten Adsorption ergeben in etwa 2-3-mal so hohe Zeiten für die Protein-Protein Adsorption wie für die Adsorption von Protein auf Gold.

m_{Abs.}(G-Aktin) [ng/cm²]	m_{Abs.}(C*) [ng/cm²]	Δf(G)/Δf(C*)	Δf(C*)/Δf(G)	t_{1/2}(Au-P)	t_{1/2}(P-P)	Reihenfolge
708	418	1.6	-	234	703	G / C*
424	354	1.2	-	222	722	G / C*
619	584	1.1	-	-	-	G / C*
778	477	1.6	-	-	-	G / C*
448	584	-	1.2	-	-	C* / G
619	247	-	1.6	510	540	C* / G

Tabelle 10: Werte aus QCM-Experimenten mit einem Gold beschichtetem 5 MHz Quarz in *P. Schön's* Kleinst-Volumen-Durchflußzelle^[84]. Alle Messungen in 0.1 M KCl-Lösung; G: 1μM G-Aktin/ 0.1 M KCl-Lösung; C*: 1μM C-Untereinheit/ 0.1 M KCl; mAbs. nach Sauerbreyformel (siehe ¹⁰ auf Seite 68).

Eine Weiterführung des Experimentes erfolgt nach der Behandlung des Quarzes mit G-Aktin und mit der C-Untereinheit wie in a) und der erneuten Aussetzung des Quarzes mit der G-Aktinlösung. Der Frequenzverlauf ist in Abbildung 53 zu sehen. Die Frequenzänderung bleibt unter 2 Hz (nach Waschvorgang kleiner 6Hz) praktisch unverändert, insbesondere, wenn ein

$$^{10} \Delta\Gamma_m = -c_s \cdot \Delta f = \frac{17.7 \text{ ng}}{\text{Hz} \cdot \text{cm}^2} \cdot \Delta f \quad \text{mit: } \Delta\Gamma: \text{Änderung der arealen Massendichte [ng/cm}^2\text{];}$$

Δf: Frequenzänderung [Hz]; c_s: Schichtwägeempfindlichkeit (5 MHz-Resonator) = [17.7 ng/cm²·Hz] nach *Sauerbrey*.

technisch bedingter Drift von $2 \text{ Hz/h}^{[84]}$ berücksichtigt wird. Der Quarz verhält sich nun gegenüber G-Aktin inert. Gleiches gilt für den umgekehrten Fall für eine C*-G-Aktin behandelten Quarz. Dieser verhält sich ebenso inert gegenüber einer Lösung von C*.

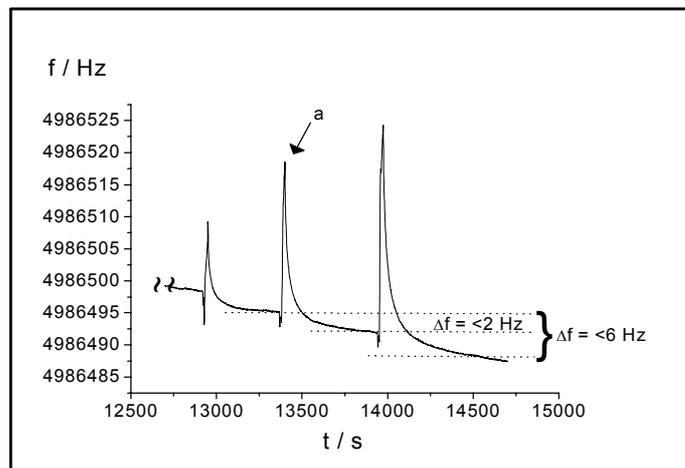


Abbildung 53: MHZ-QCM nach Behandlung des Goldquarzes mit G-Aktin und C* Weiterführung des Frequenzverlaufs aus Abbildung 52a) und erneuter Exposition von G-Aktin (a).

Die unspezifische Adsorption von G-Aktin (a,b) auf Gold zeigt eine so große Aktivität gegenüber dem C*-Protein (c,d), dass eine entsprechende Interaktion gravimetrisch nachgewiesen werden kann. Die Frequenzverhältnisse von der ersten und der zweiten Adsorptionen von G-Aktin und C* bzw. C* und G-Aktin sind immer kleiner 2. Zudem können keine mehrlagigen, alternierenden Proteinschichten der Form ABAB... durch wechselnde Exposition des Quarzes zu den benutzten Proteinen erhalten werden (f). Daher wird die Stöchiometrie $\text{G-Aktin} + \text{C}^* \rightarrow \text{GC}$ mit 1:1 angenommen. Abweichungen von diesem Verhalten können auf Grund von Multiproteinschichten durch unspezifische Anordnung von Proteinen gedeutet werden. Insgesamt ist das beobachtete Verhalten aber nur erklärbar, wenn man davon ausgeht, dass die spezifische Protein-Protein Interaktion zur vollständigen Absättigung der Erkennungsstellen führt.

4.7.1 Fazit

Es gelingt mittels QCM-Methode (schematisch dargestellt in Abbildung 54) die erst kürzlich bekannt gewordene Interaktion von C-Untereinheit mit G-Aktin zu untermauern^[83]. G-Aktin und C-Untereinheit Proteine lassen sich auf Gold beschichteten Quarzen adsorbieren und es lassen sich auf diese Weise QCM-sensorische Applikationen verwirklichen, die entweder G-Aktin oder C* sensitiv sind.

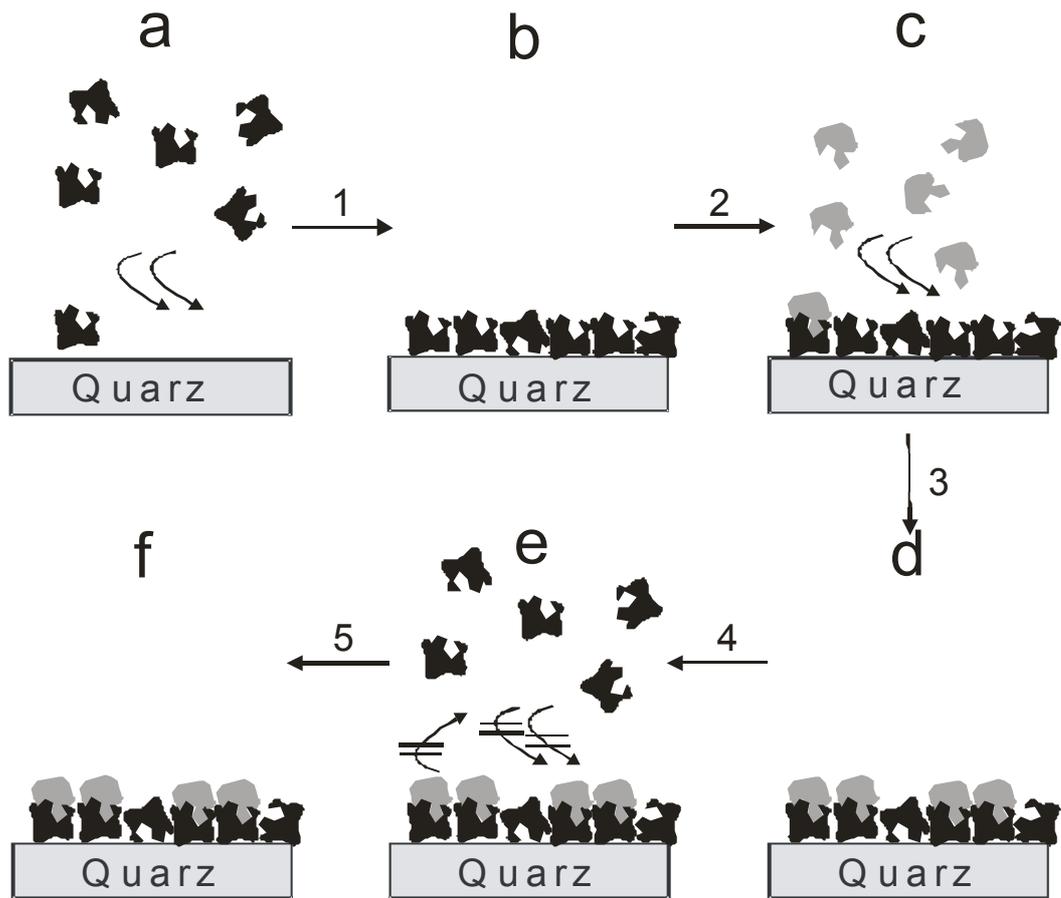


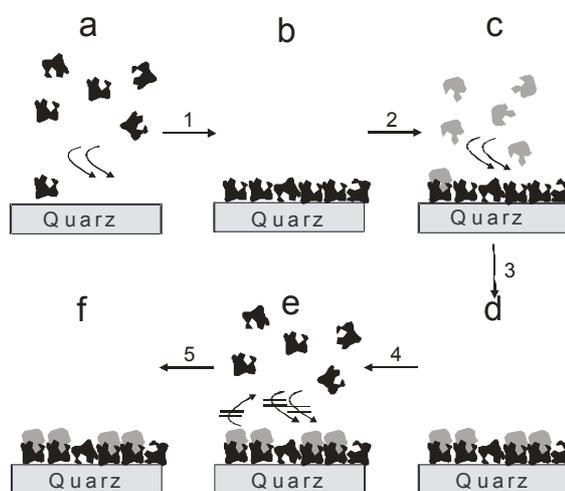
Abbildung 54: Schematische Darstellung der Protein-Protein Erkennung mittels QCM-Methoden. 1,3,5) Waschvorgang. 2,4) Zugaben der antagonistischen Proteine. Protein A: grau; Protein B: schwarz.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden in erster Linie bioanalytische Methoden basierend auf massenspezifischer oder elektrochemischer Signaltransduktion entwickelt. Diese oberflächenspezifischen Analysetechniken bedingen die Synthese von zwei Klassen organischer Verbindungen. Dabei handelt es sich einerseits um schaltbare Linker zwischen Sensoroberfläche und Biomolekülen, andererseits um elektroaktive Label in konischer Form bestehend aus einer Vielzahl von elektroaktiven Untereinheiten, welche an ihrem fokalem Punkt (der Kegelspitze) mit Biomolekülen konjugierbar sind. Die Synthese der Dendronen führt z. T. über Zwischenprodukte, die zudem den Aufbau eines ellipsoiden, zentrosymmetrischen Dendrimers mit Anwendungspotential in der molekularen Elektronik ermöglichen.

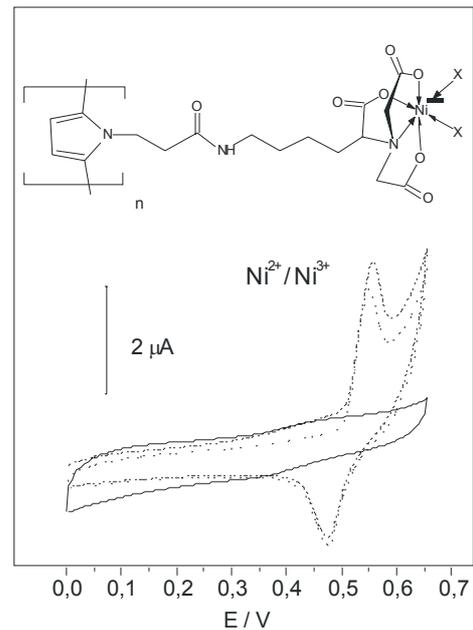
Massenspezifische Sensoren:

Mittels unspezifischer Adsorption von G-Aktin auf goldbeschichteten Quarzschwingern und Vermessung des modifizierten Quarzes in einer Lösung der C-Untereinheit (bzw. vice versa) gelang es, die Interaktion zwischen dem G-Aktin und der C-Untereinheit nachzuweisen. Es kann zudem die Spezifität der Reaktion über wohldefinierte Erkennungsregionen und (annähernd) die Stöchiometrie der Reaktion zwischen den beiden Proteinen geklärt werden.



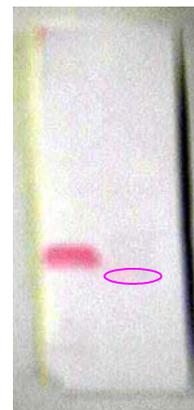
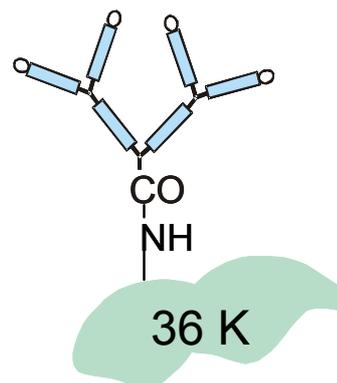
NTA-modifizierte Elektroden:

Ausgehend von Cystein wird ein Thiol-terminierter Linker bzw. ein entsprechendes Disulfid mit NTA-Funktionalität dargestellt und auf Goldelektroden adsorbiert. Die Goldoberflächenmodifikation gelingt anhand der beobachteten, pH-abhängigen Ionen-Markerströme und XPS-Experimenten. Eine Nickel-Koordination konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Erfolgreiche Metallierung gelang hingegen mit elektropolymerisiertem Pentafluorophenyl-3-(1H-pyrrol-1-yl)propanoat, das nachträglich mit AB-NTA umgesetzt wurde. Diese Elektroden zeigen elektrochemisch eine reversible, pH-induzierbare Nickel Aufnahme bzw. Abgabe. Die polymermodifizierten Elektroden sollen zudem die reversible Bindung von Proteinen mit His-Tag und eventuell auch die elektrochemische Schaltung dieser Bindung zulassen.



Elektroaktive Multielektronen- und Multiladungs-Label mit Biokonjugationsfunktion:

Es werden erfolgreich Viologen-Dendrone der ersten und zweiten Generation synthetisiert. Diese können als Multielektronenlabel mit Biomolekülen konjugiert werden, wobei dann pro Label 2·6 bzw. 2·2 Elektronen zur Verfügung stehen. Die Multielektronenlabel haben eine signalverstärkende Wirkung beim elektrochemischen Nachweis der entsprechend

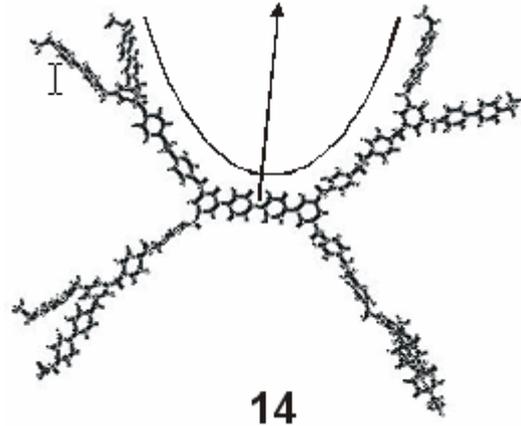


gelabelten Biomoleküle. Die Synthese erlaubt die Einführung verschiedenster Funktionen am Fokuspunkt des Labels (Hydroxy-, Bromo-, Carboxy- und Pyridyl) zur Biokonjugation. Der Label wird amidisch verknüpft und z.T. mehrfach an Cyt C und am 36 K-Protein angebracht. In einer grundlegenden Studie zum Mechanismus des Ladungstransportes von elektroaktiven Markerionen durch unspezifisch adsorbierte Monoschichten von Proteinen auf Gold wird die Tatsache genutzt, dass die Viologenlabel eine persistente, pH-unabhängige Ladung in der

Peripherie des modifizierten Proteins bewirken, welche den Ladungsbeitrag der titrierbaren Funktionen an der Peripherie des Proteins verschwinden lassen.

Ellipsoide Dendrimere mit radialem Redoxgradient und unterbrochener Konjugation.

Es wird ein neues, vierarmiges Viologendendrimer synthetisiert, welches eine phenylische 4,4'-Bipyridin-Zentrumseinheit und acht benzyliche Viologeneinheiten in der Peripherie besitzt. Zentrum und Peripherie sind durch (Bispyridinyl)ethan verbunden. Auf Grund der unterschiedlichen Reduktionspotentiale im Kern und der Peripherie liegt ein radialer Redoxgradient vor, der prinzipiell zur Unterstützung eines vektoriellen ET von außen nach innen genutzt werden könnte. Die vorläufigen elektrochemischen Ergebnisse zeigen allerdings keinen Diodeneffekt im Millisekunden-Zeitfenster.



6 Experimenteller Teil

6.1 Analysegeräte

Dünnschichtchromatographie: DC-Fertigfolien, Alugram, Macherey-Nagel (40·80 mm)

Schicht: 0.25 mm Kieselgel mit Fluoreszenzindikator
Viologenlaufmittel (Vio-LM): MeOH / H₂O / NH₄Cl_{ges.} (6:3:1).

Säulenchromatographie: Silicagel für Flash-Chromatographie 60, Baker (Korngröße: 30-60mm)

Massenspektrometer: HP 1100 mit HP Chemstation Software (MS Mod. 1946A)

¹H-NMR Spektroskopie: Bruker Avance250 (250 MHz); Die chemische Verschiebung δ in ppm bezieht sich auf das angegebene Lösungsmittel oder auf TMS als internen Standard. Die Kopplungskonstanten J sind in Hz angegeben. Multiplizität: s = singulett, d = dublett, dd = dublett von dubletts, t = triplett, dt = dublett von triplets q = quartett, qu = quintett, m = multipllett, brs = breites Signal

¹³C-NMR Spektroskopie: Bruker Avance 250 (63 MHz) Die Zuordnung wurde mit Hilfe von Dept 135-Spektren vorgenommen. Alle Spektren sind ¹H entkoppelt aufgenommen worden. Die Angaben zur Multiplizität entsprechen dem theoretischen ¹³C-¹H-Kopplungsmuster.

Schmelzpunkte: Apotec (Wena): Bestimmung in offenen Glaskapillaren, Mittelwert aus zwei Messungen

UV-VIS Spektroskopie: Hewlett Packard 8453 Diode Array Spektrophotometer die Wellenlängen der Absorptionsmaxima (λ_{max}) sind in nm angegeben die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ mit der Dimension (dm³ /mol·cm) sind als log ϵ angegeben.

Küvette: Quarzglas, d = 1 cm. Die Extinktion wurde nach Lambert-Beer berechnet:

6.2 Chemikalien

Kaliumchlorid	Fluka, p.A.
Natriumhydrogenphosphat	Fluka, p.A.
Trinatriumnaphthalintrisulfonat	Sigma
Schwefelsäure	Fluka, p.A. > 98 %
Wasserstoffperoxid	Fluka, p.A. > 30 %

Natriumsulfat wasserfrei	Fluka, puriss, p.a. > 99 %
Tetrabutylammonium BF ₄	Merck, p.A.

Lösungsmittel:

Acetonitril über Molsieb	Merck, p.a.
Chloroform Prac.	Destilliert
Diethylether Prac.	Destilliert
N,N-Dimethylformamid	Fluka, puriss, 99.5 %
Ethanol	Merck, p.a.
Petrolether Prac.	Destilliert
Ethylacetat Prac.	Destilliert über P ₂ O ₅
Isopropanol	Fluka, p.a.
Wasser	Bidestilliert

Proteine:

36K	AK Jeserich, FB Biologie; Universität Osnabrück
C-Untereinheit & G-Aktin	AK Wieczorek, FB Biologie; Universität Osnabrück
Cytochrome C (from horseheart)	Fluka
KTrA	AK Baker, FB Biologie, Universität Osnabrück

6.3 Synthesen

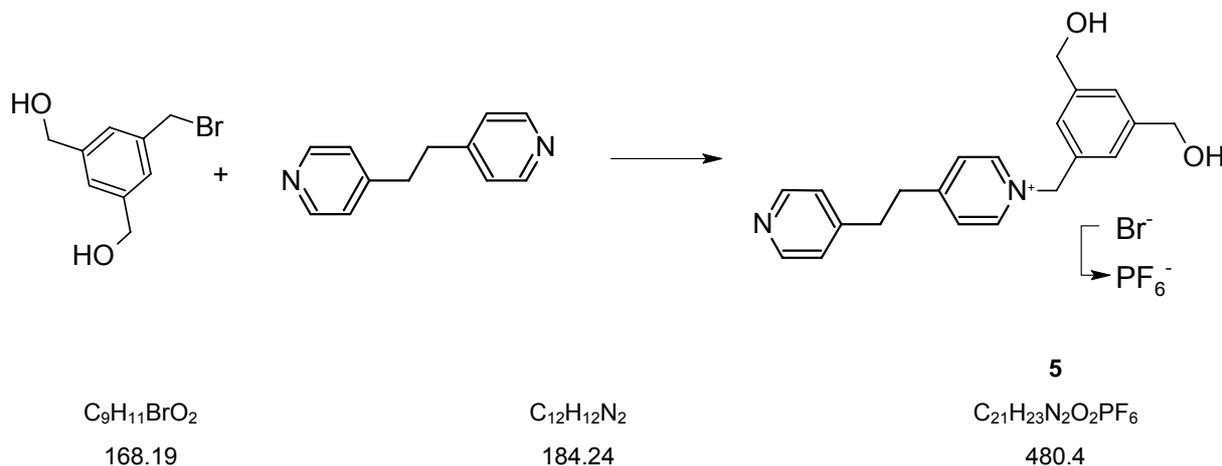
6.3.1 Etablierte Standardmethoden zum Anionenaustausch von Viologensalzen

Es wurden zwei Standardmethoden zum Anionenaustausch der Viologensalze eingeführt. Bei der Reaktionsführung wurde es immer wieder notwendig, die im organischen Lösungsmittel stattfindenden Reaktionen mit Viologen PF₆-Salzen und Derivaten benzyliischer Bromide und die dadurch resultierende Mischanion-Salze, umzufällen. Der einfachhaltalber wurde im Folgenden bei dem jeweiligen Schritt nur Standardmethode A oder B geschrieben:

Standardmethode A: Viologen-Bromid bzw. Viologen-Mischanion Precipitat-Salz der Art [Vio^{(m+n)+}] [Br⁻]_m[PF₆⁻]_n wurde mit der Menge Wasser gelöst, die gerade erforderlich war, um es zu lösen. 10 %ige NH₄PF₆-Lösung wurde tröpfchenweise hinzugefügt bis kein Salz mehr precipitierte. Danach wurde es abfiltriert und am HV getrocknet.

Standardmethode B: Viologen-hexafluorophosphat Salze wurden in der Menge Acetonitril, die erforderlich war, um es vollständig zu lösen versetzt und mit 5 %-iger TBABr-Lösung tröpfchenweise versetzt, bis kein Niederschlag mehr precipitierte. Das erhaltene Viologen-Bromid-Salz wurde abfiltriert und am HV getrocknet.

6.3.2 1-[3,5-bis(hydroxymethyl)benzyl]-4-(2-pyridin-4-ylethyl)pyridinium



0.311 g (1.35 mmol) 3,5-Di(hydroxymethyl)-benzylbromid¹¹ und 0.372 g (2.02 mmol) Bis(piridin)ethan¹² wurden in 50 ml trockenem THF bei 60 °C zur Reaktion gebracht. Nach kurzer Zeit fiel ein gelbes Salz aus. Nach insgesamt 12 h Reaktionszeit wurde auf RT abgekühlt, das Salz abfiltriert, in Wasser aufgenommen und nach Standardmethode ein Anionenaustausch zum PF₆-Salz **5** vollzogen. Dieses lag nach Trocknung am HV als beiges Pulver vor.

Aus beute: 56 %

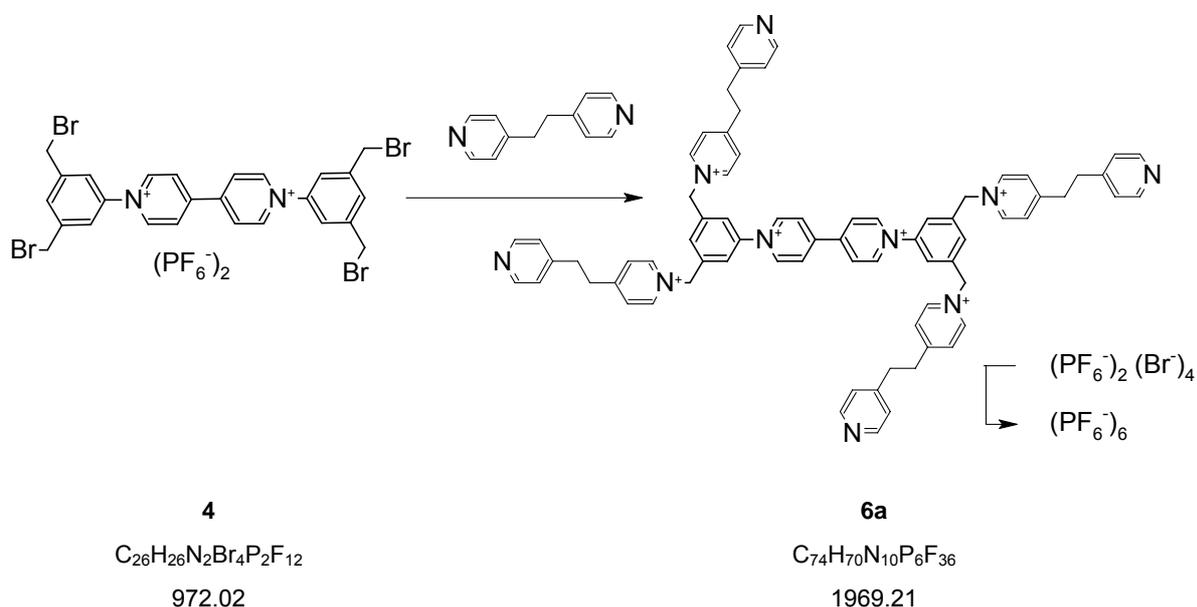
¹H-NMR(CD₃CN): δ(ppm) = 8.66 (d, ³J(H, H)=6.8 Hz; H_{arom}, 2H); 8.61 (d, ³J(H, H)=6.8 Hz; H_{arom}, 2H); 7.90 (d, ³J(H, H)=6.8 Hz; H_{arom}, 4H); 7.40 (s, H_{arom}, 1H); 7.32 (s, H_{arom}, 2H); 5.68 (s, CH₂, 2H); 4.62 (s, CH₂, 4H); 3.32 (t, ³J(H,H)=3.3 Hz; CH₂, 4H).

R_f(Vio-LM): 0.11

¹¹ [88] S. Heinen, Dissertation thesis, Universität Osnabrück 1999.

¹² Fluka

6.3.3 N,N'-Bis(3,5-Di-(N-Bispiridinethanmethyl)-phenyl)4,4'-Bipyridinium hexafluorophosphat



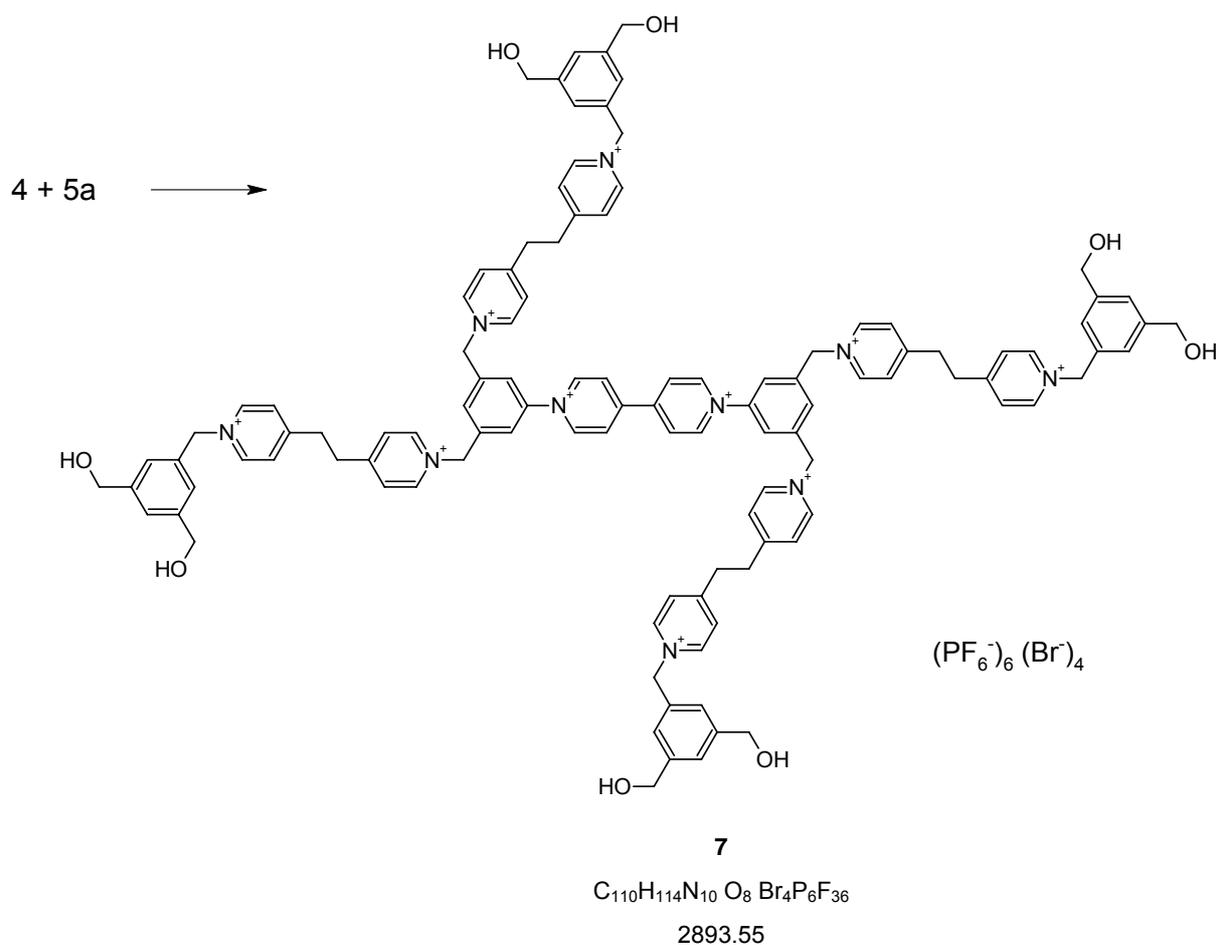
In einem 50 ml Zweihals Kolben wurde 1 g (5.4 mmol) 1,2-Bis(4-pyridyl)ethan in 25 ml MeCN gelöst. Über eine Kutscher-Streudel Anordnung wurden 200 mg (0.21 mmol) N,N-Bis-(3,5-Dibromomethylphenyl)-4,4'-bipyridinium hexafluorophosphat ^[55, 88] durch Lösen langsam hinzu gefügt. Das Reaktionsgemisch wurde drei Tage unter Rückfluss gekocht und nach Standard-Methode das Hexafluorophosphat **6a** gewonnen.

Ausbeute: 60 %

1H -NMR(CD_3CN ; 250 MHz): δ (ppm) = 9.14 (d, $^3J(H,H) = 6.9$ Hz; $CH_{arom}(bipy)$, 4H); 8.72 (d, $^3J(H,H) = 6.8$ Hz; CH_{arom} , 6H); 8.64 (d, $^3J(H,H) = 6.9$ Hz; CH_{arom} , 4H); 8.53 (d, $^3J(H,H) = 6.9$ Hz; CH_{arom} , 8H); 8.03 (d, $^3J(H,H) = 6.9$ Hz; CH_{arom} , 6H); 7.94 (s, CH_{arom} , 6H); 7.64 (d, $^3J(H,H) = 6.9$ Hz; CH_{arom} , 2H); 7.46 (d, $^3J(H,H) = 6.9$ Hz; CH_{arom} , 8H); 5.82 (s, CH_2 , 8H); 3.33 (t, CH_2 , 8H); 3.20 (t, CH_2 , 8H).

R_f (Vio-LM): 0.2

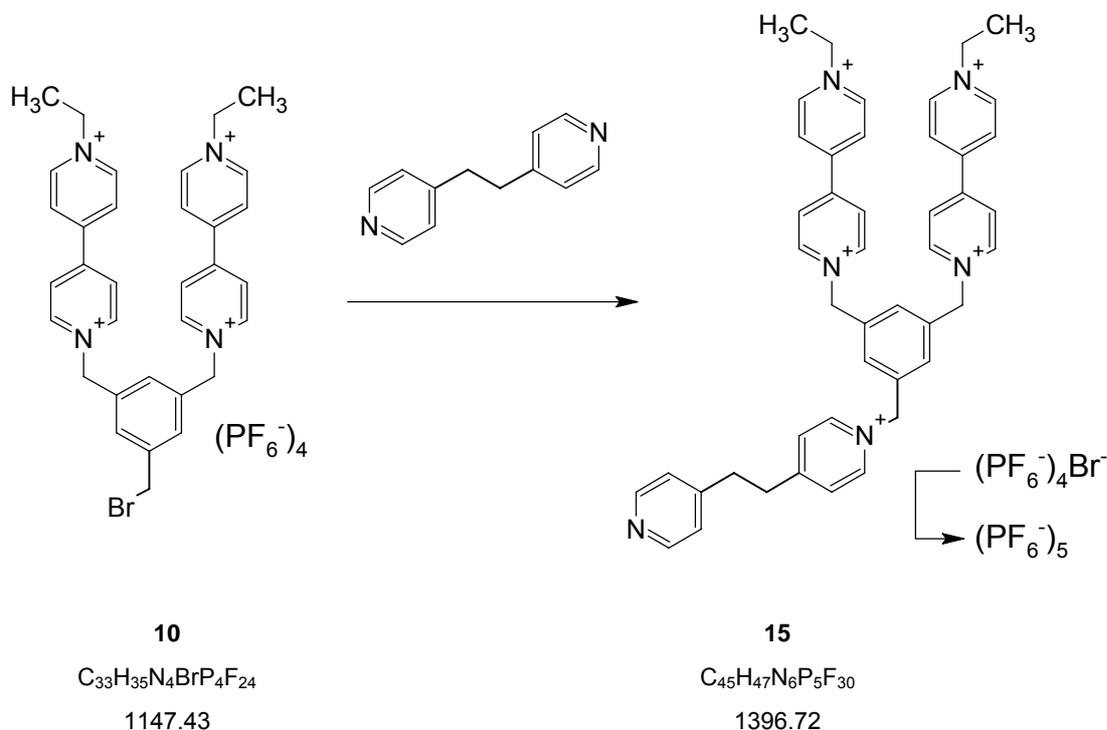
6.3.4 Vorstufe zum Dendrimer der 0. Generation



100 mg (0.1 mmol) **4** und 192 mg (0.4 mol) **5** wurden in 30 ml MeCN gelöst und bei 70 °C 72h gerührt. Es fiel ein dunkelbrauner FS aus. Der FS erwies sich als schwerlöslich und konnte mit gängigen LM nicht in Lösung (H₂O, DMF, MeCN, Nitromethan, Glykol wurden bei verschiedenen Temperaturen (RT bis Sdp.-Temperatur.) getestet) gebracht werden. Aus heißem CD₃CN und Ultraschallbehandlung wurden aus dem Produkt die löslichen Bestandteile NMR-spektroskopisch untersucht. Aus dem Signalverhältnis der phenylischen Viologensignale mit denen der aliphatischen Bis(pyridin)ethanyl Signale wurde ein 86 %-iger erfolgreichen Umsatz von **7** berechnet.

¹H-NMR(250 MHz, CD₃CN): δ (ppm) = 9.15 (d, ³J(H,H) = 7.2 Hz, H_{arom}, 4H); 8.68 (d, ³J(H,H) = 7.2 Hz, H_{arom}, 16H); 7.93 (m, CH_{arom}, 16H); 7.41 (s, CH_{arom}, 6H); 7.32 (s, CH_{arom}, 12H); 5.78 (s, CH_{arom}, 6H); 5.68 (s, CH_{arom}, 12H); 4,61 (s, CH₂, 16H); 3.33 (s, CH₂, 16H).

6.3.5 3,5-Di-(N'-ethyl-4,4'-bipyridinium)methyl)-hydroxymethyl)-benzyl-bis(piridin)ethan



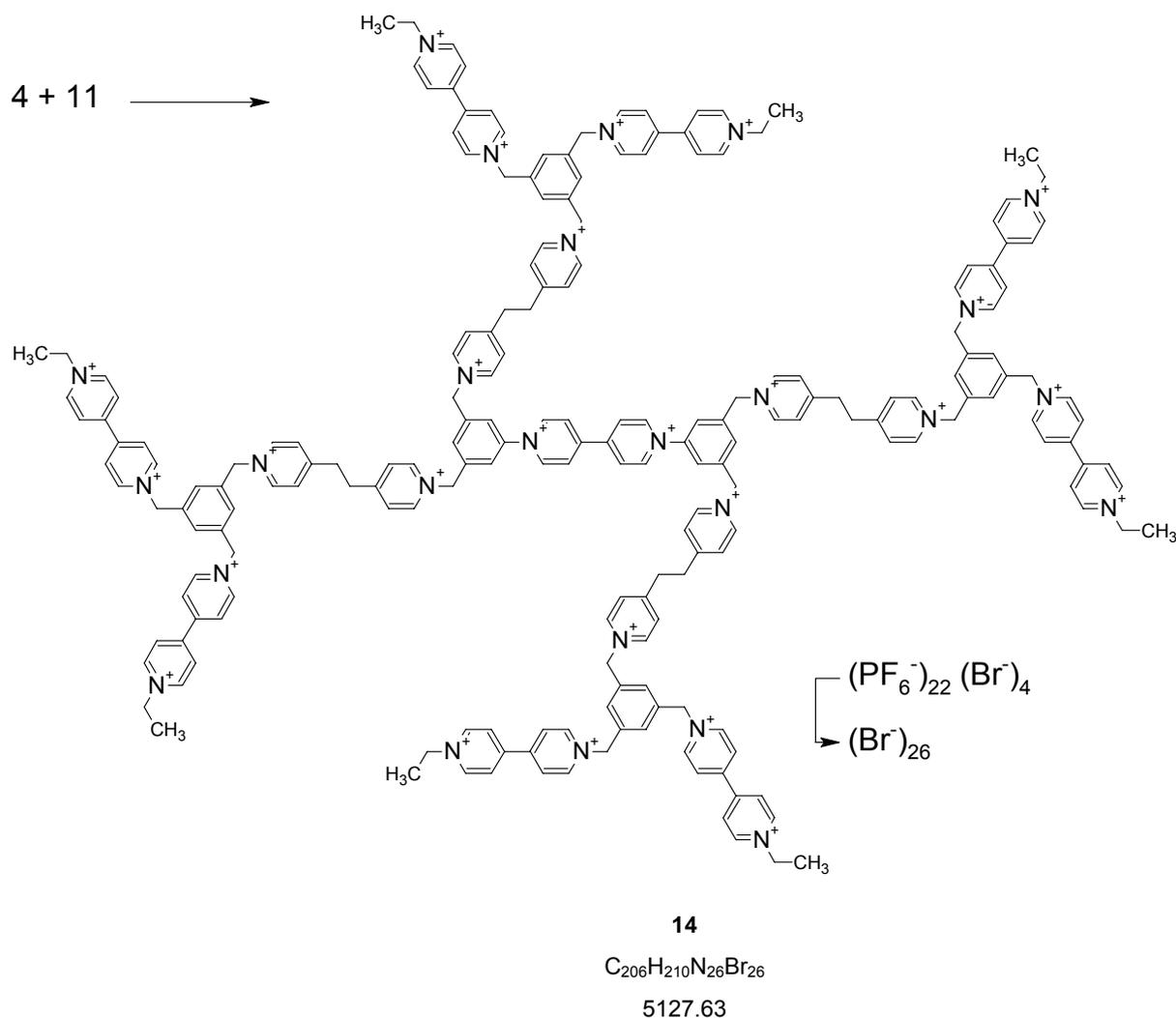
100 mg (87.1 μ mol) **10** und 23 mg (130 μ mol) 1,2-Bis(4-pyridyl)ethan wurden in 25 ml MeCN gelöst und bei 70 °C ca 12 h gerührt. Das Precipitat wurde nach Abkühlung auf RT abfiltriert und nach Standardmethode ins PF₆-Salz überführt. 90 mg eines bräunlichen Salzes **15** wurde erhalten.

Ausbeute: 73 %

¹H-NMR(250 MHz, CD₃CN): δ (ppm) = 8.94 (d, ³J = 6.7 Hz, CH_{arom}, 8H); 8.55-8.42 (brs, CH_{arom}, 10H); 7.89 (d, CH_{arom}, d, ³J (H,H) = 6.4 Hz, 4H); 7.66 (s, CH_{arom}, 1H); 7.59 (s, CH_{arom}, 2H); 7.36 (d, CH_{arom}, d, ³J (H,H) = 6.4 Hz, 2H); 5.84 (s, CH₂, 4H); 5.67 (s, CH₂, 2H); 4,71 (q, ³J (H,H) = 7.2 Hz, CH₂, 4H); 1,69 (t, ³J (H,H) = 7.2, CH₃, 6H).

R_f(Vio-LM): 0

6.3.6 Dendrimer 0. Generation **14**



0.236 g (0.24 mmol) **4** und 0.133 g (0.095 mmol) **15** wurden in 20 ml MeCN bei 70 °C 72 h gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde ein bräunlicher Rückstand abfiltriert und nach Anionenaustausch nach Standardmethode in das RG zurückgeführt. Weitere 48 h wurde bei 70 °C gerührt, dann auf RT gekühlt und mit TBABr / MeCN (5 %) versetzt. Das braune Precipitat wurde mit MeOH extrahiert und abfiltriert. Es wurden ca 30 mg (5.85 μ mol) von **14** erhalten.

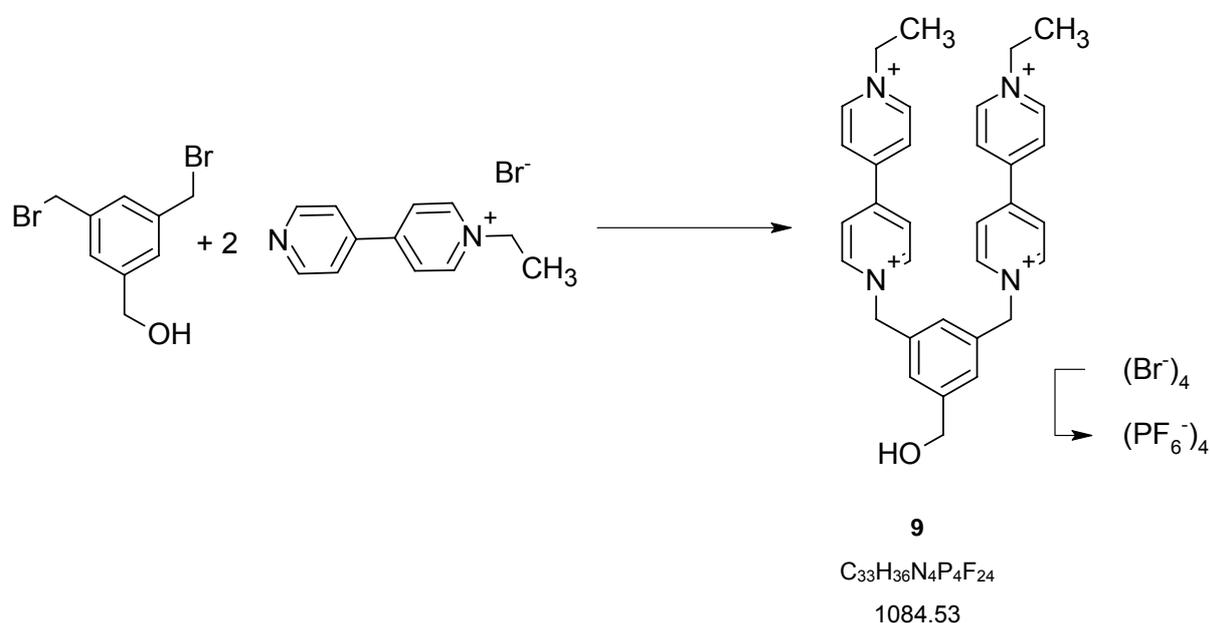
Das Filtrat wurde auf 2/3 eingengt filtriert und wie das obige Precipitat behandelt. Es wurden weitere 60 mg von **14** als MeCN lösliche Komponente erhalten.

Ausbeute: ca. 7.5 %

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O): 9.38 (brs, H_{arom} , 32H); 9.10-9.04 (brs, H_{arom} , 16H); 8.75-8.73 (brs, H_{arom} , 32H); 7.95-7.89 (brs, H_{arom} , 12H); 7.76-7.68 (brs, H_{arom} , 6H); 5.94 (s, CH_2 , 16H); 5.05^{13} (q, $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 7.0$ Hz, CH_2 , 8H) 5.79 (s, CH_2 , 32); 1.61 (t, $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 7.0$ Hz, 6H).

R_f (Vio-LM): 0

6.3.7 3,5-Di-(N'-ethyl-4,4'-bipyridinium)methyl-hydroxymethyl-benzol-tetra(hexafluorophosphat)



Analoger Ansatz nach ^[88, 89] zur Ausbeutenoptimierung wurde das Bromidsalz des monoalkylierten Viologens verwendet: 171 mg (0.6 mmol) 3,5-Di(bromomethyl)-hydroxymethylbenzol **8** und 355.6 mg (1.34 mmol) N-Ethyl-4,4'-bipyridinium bromid^[90] wurden in 70 °C heißem MeCN über Nacht gerührt. Es fiel ein dunkelgelber FS aus, dieser wurde abfiltriert, in Wasser gelöst, und nach Standardmethode ins PF_6^- -Salz überführt. 650 mg eines beigen Pulvers wurden erhalten.

Ausbeute: 99 %

¹³ nur bei 50 °C in D_2O sichtbar. Bei RT wird der Peak vom Wasserpeak bei $\delta = 4.7$ ppm vollständig überdeckt.

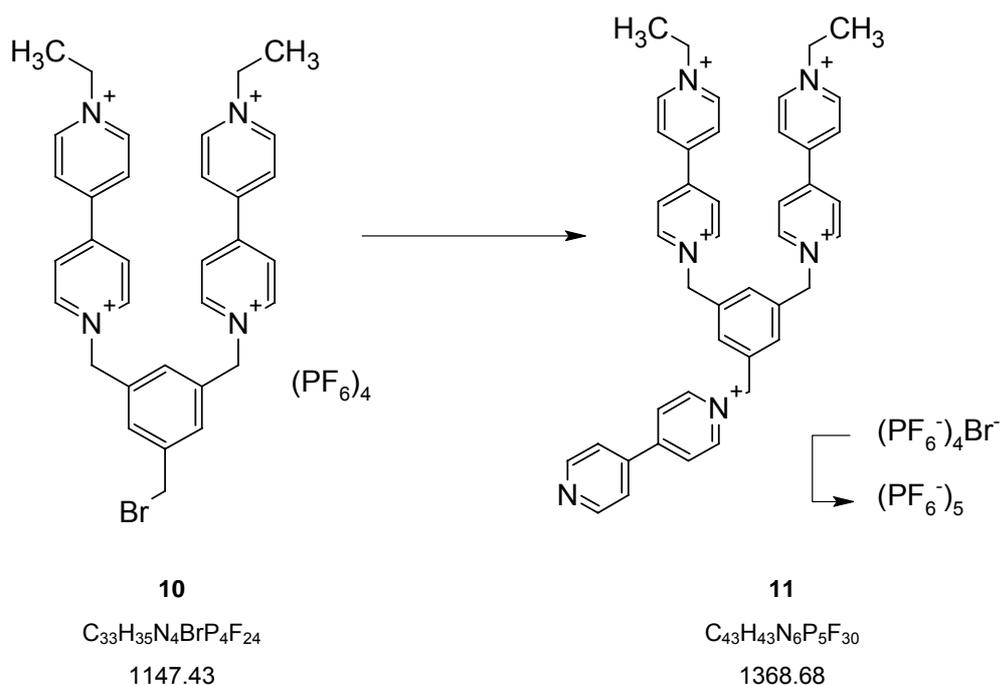
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3CN):

8.99 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 5.6$ Hz, 4 H), 8.95 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 5.8$ Hz, 4 H), 8.43 (b, 8 H), 7.59 (s, 2 H), 7.54 (s, 1 H), 5.86 (s, 4 H), 4.73-4.66 (m, 6 H), 1.69 (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3CN):

151.0 (CH), 150.1 (CH), 146.1 (CH), 145.9 (CH), 145.8 (CH), 134.2 (CH), 129.4 (CH), 129.1 (CH), 127.9 (CH), 127.6 (CH), 64.5 (CH_2), 62.9 (CH_2), 16.0 (CH_2), 16.0 (CH_3).

6.3.8 4,4'-Bipyridinium-N-methylbenzyl-3,5-(Bis(ethyl-4,4'-pipyridinium)-hexafluorophosphat



1 g (6.4 mmol) 4,4'-Bipyridin wurde in 40 ml MeCN gelöst und 300 mg (261 μmol) **10**¹⁴, gelöst in 20 ml MeCN, wurden langsam im Rückfluss dazu getropft. Das RG wurde weitere 12 h bei 70 °C gerührt und dann auf RT abgekühlt und einrotiert. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und nach Standardmethode als PF_6^- -Salz **11** als beiges Pulver erhalten

¹⁴ Nach [88] S. Heinen, Dissertation thesis, Universität Osnabrück 1999.

Das Pulver wurde dreimal in 50 ml Ether im Ultraschallbad extrahiert, um überschüssiges Bipyridin zu entfernen.

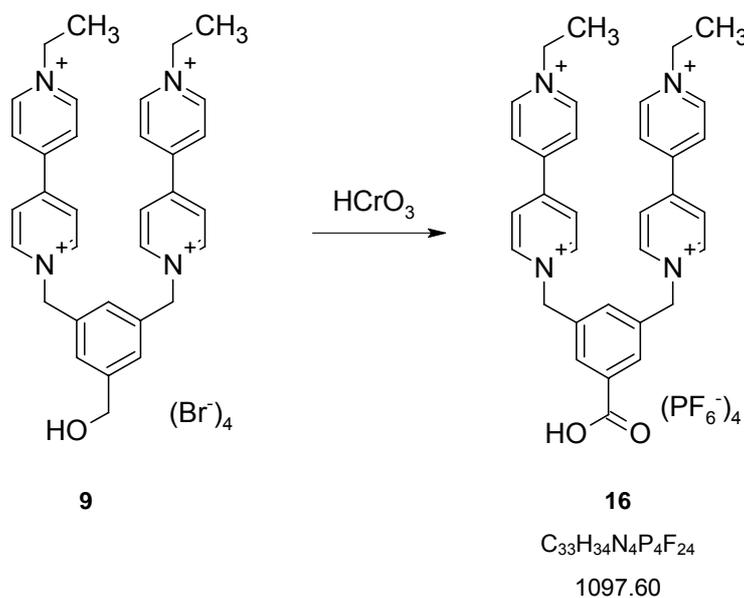
Ausbeute: 205 mg (149.8 mol, 57.3 %)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3CN): $\delta(\text{ppm}) = 8.95$ (d, $^3\text{J} = 6.7$ Hz, CH, 6H); 8.89 (d, $^3\text{J} = 1.5$ Hz, CH, 3H); 8.87 (d, $^3\text{J} = 1.5$ Hz, CH, 3H); 8.45 - 8.36 (m, CH, 10H); 7.87 (d, $^3\text{J} = 1.5$ Hz, CH, 2H); 7.69 (s, CH, 1H); 7.66 (s, CH, 2H); 5.87 (s, CH_2 , 4H); 5.81 (s, CH_2 , 2H); 4.71 (q, $^3\text{J} = 7.3$ CH_2 , 4H); 1.68 (t, $^3\text{J} = 7.3$, CH_3 , 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD_3CN): $\delta(\text{ppm}) = 154.9$ (Cq); 151.1 (CH); 146.2 (CH); 145.6 (CH); 142.2 (Cq); 135.7 (Cq); 135.3 (Cq); 132.1 (CH); 127.8 (CH); 127.6 (CH); 126.8 (CH); 122.6 (CH); 64.0 (CH_2); 63.5 (CH_2); 58.1 (CH_2); 16.0 (CH_3).

IR(KBr): $3134(\text{w})$; $1637(\text{m})$; $1456(\text{w})$; $1400(\text{w})$; $838(\text{s})$; $558(\text{m})$.

6.3.9 Carboxybenzyl-3,5-(Bis(ethyl-4,4'-bipyridinium))-hexafluorophosphat



400 mg (0.485 mmol) **9** gelöst in 12 ml 10 %iger Schwefelsäure und 120 mg (1.2 mmol) CrO_3 gelöst in 13 ml 10 %-ger Schwefelsäure, wurden tropfenweise vermengt und über Nacht bei RT gerührt. Nach Neutralisation mit 1 M NaOH auf pH=3 wurde nach Standardmethode A ein weißer FS ausgefällt und über einer Fritte filtriert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet.

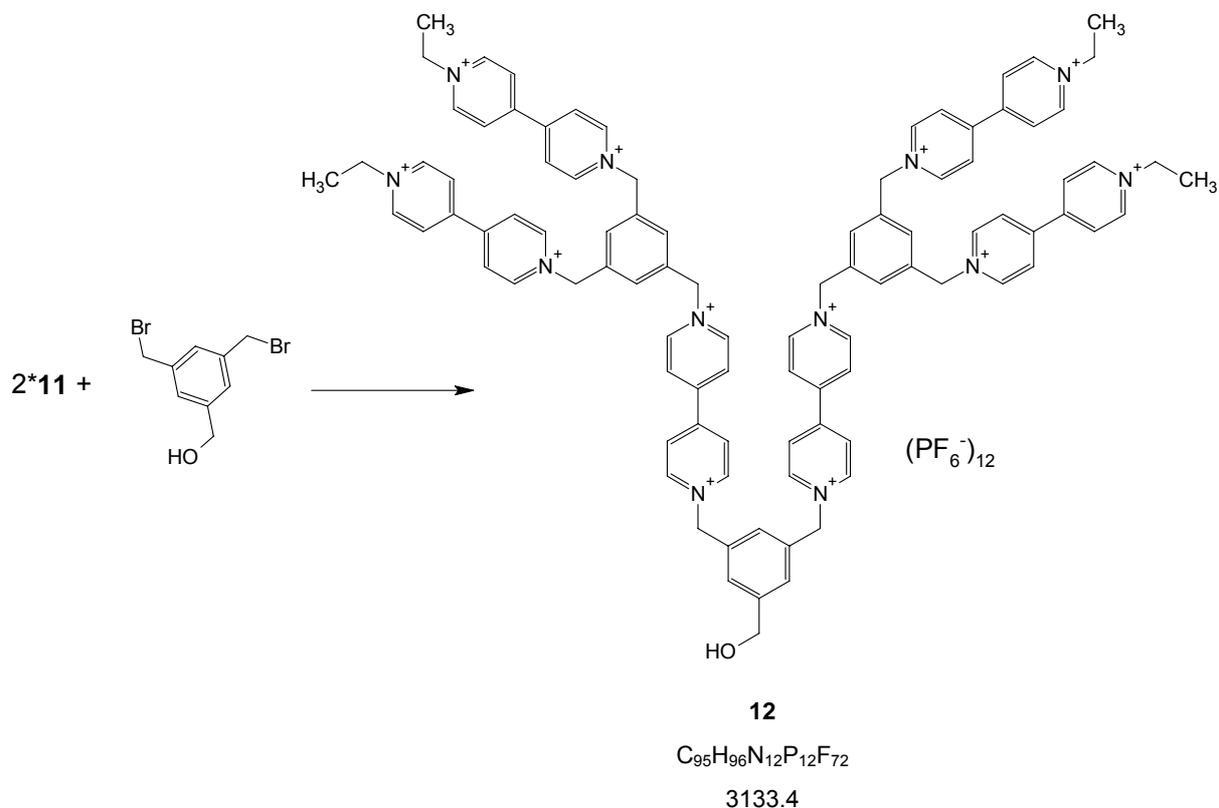
Ausbeute: 30 %

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3CN): $\delta(\text{ppm}) = 10.05$ (s, CO_2H , 1H); 9.01 (d, $^3J = 3.8$ Hz, CH_{arom} , 4H); 8.98 (d, $^3J = 7$ Hz, CH_{arom} , 4H); 8.45 (m, CH_{arom} , 8H); 8.27 (s, CH_{arom} , 1H); 8.10 (s, CH_{arom} , 1H); 7.88 (s, CH_{arom} , 1H); 5.91 (s, CH_2 , 4H); 4.71 (q, $^3J = 7.3$ Hz, 4H); 1.68 (t, CH_3 , 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, $\text{DMSO}(d_6)$): $\delta(\text{ppm}) = 150.0$ (Cq); 149.3 (Cq); 146.8 (CH_{arom}); 146.5 (CH_{arom}); 145.7 (Cq); 135.7 (Cq); 129.0 (CH_{arom}); 128.5 (CH_{arom}); 128.0 (CH_{arom}); 127.6 (CH_{arom}); 63.6 (CH_2); 62.9 (CH_2); 57.4 (CH_2); 17.2 (CH_3).

IR (KBr): 3134(w); 1711(w); 1641(w); 1455(w) 1172(w); 837(s); 559(m).

6.3.10 "6-Viologen-Dendron-ol" **12**



170 mg (148 μ mol) **11** und 218 mg (74 μ mol) 3,5-Di(brommethyl)hydroxymethylbenzol wurden in 5 ml MeCN gelöst und 24h bei 70 °C zur Reaktion gebracht. Der ausgefallene FS wurde durch Filtration dem Reaktionsgemische entnommen und analysiert. Der FS wurde in Wasser gelöst und in das PF₆-Salz überführt (siehe Standardmethode) und dem Reaktionsgemisch zurückgeführt. Nach weiteren 72 h wurde auf RT abgekühlt und durch Zugabe einer 5 %igen TBABr /MeCN Lösung das viologenische Produkt ausgefällt. Das Precipitat wurde abfiltriert und die Hälfte in Wasser gelöst und nach Standardmethode ins PF₆-Salz **12** überführt. Es wurden 104 mg eines beigen Pulvers erhalten.

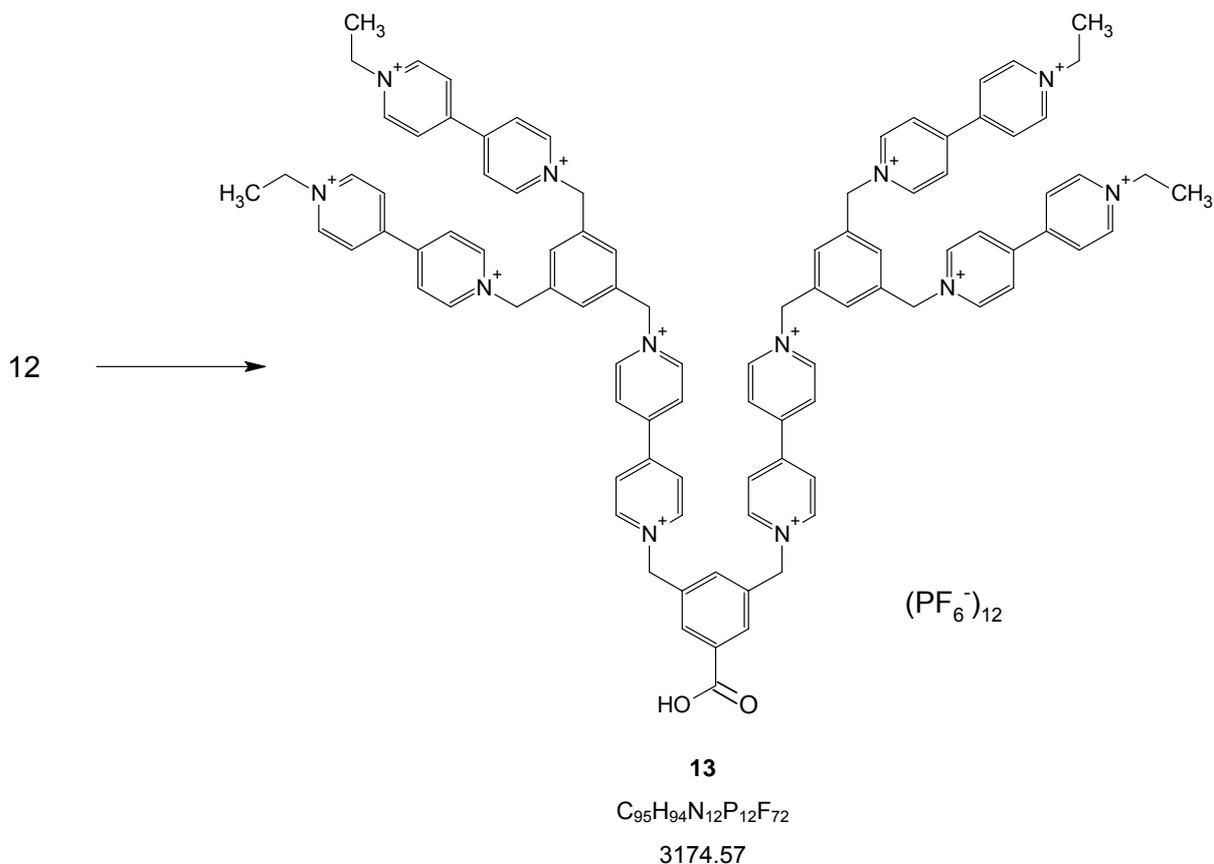
Ausbeute: 85 %

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CN): δ (ppm) = 8.95 (d, ³J = 6.2 Hz, CH_{arom}, 24H); 8.43 (d, ³J = 6.2 Hz, CH_{arom}, 24H); 7.69 (s, CH_{arom}, 9H); 5.86 (s, CH₂-N⁺, 16H); 4.71 (q, ³J = 7.3 Hz, CH₂, 8H); 4.61 (s, CH₂-OH, 2H); 1.68 (t, ³J = 7.3 Hz, 12H).

^{13}C -NMR (63 MHz, CD_3CN): $\delta(\text{ppm}) = 151.1$ (Cq); 146 (CH_{arom}); 135.3 (Cq); 132.2 + 127.9 + 127.8 + 127.6 (CH_{arom}); 64.0 + 58.2 + 32.5 (CH_2); 16.0 (CH_3).

IR(KBr): 3134(w); 1637(m); 1456(w); 1400(w); 838(s); 558(m).

6.3.11 "6-Viologen-Dendronsäure" **13**



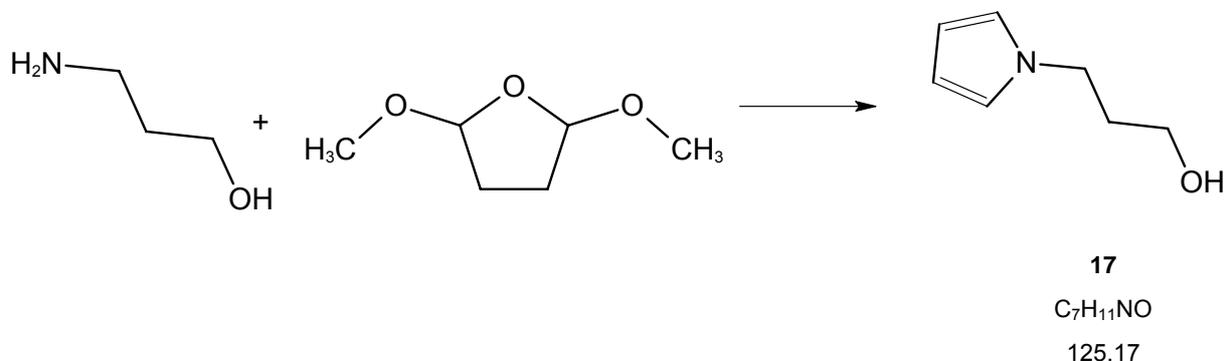
190 mg (80 μ mol) **12** gelöst in 6 ml 10 %iger Schwefelsäure, und 33 mg (0.33 mmol) CrO_3 gelöst in 10 ml 10 %-ger Schwefelsäure, wurden tropfenweise vermengt und über Nacht bei RT gerührt. Nach Neutralisation mit 1 M NaOH auf pH=3 wurde nach Standardmethode A ein weißer FS ausgefällt und über einer Fritte filtriert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet.

1H -NMR(250MHz, CD_3CN): δ (ppm): 9.08 (d, $^3J = 6$ Hz, CH_{arom} , 24H); 9.02 (d, $^3J = 6$ Hz, CH_{arom} , 24H); 7.73 (s, CH_{arom} , 9H); 5.93 (s, CH_2 , 16H); 4.71 (q, $^3J = 7$ Hz, CH_2 , 8H); 1.59(t, $^3J = 7$ Hz, CH_3).

IR (KBr): 3134(w); 1711(w); 1641(w); 1455(w) 1172(w); 837(s); 559(m).

6.4 Synthese der Pyrrol-NTA-Derivate

6.4.1 1-(3-Hydroxypropyl)pyrrol¹⁵



12 ml Eisessig wurden im gekühlten Kolben (mit Eis/Kochsalzgemisch) vorgelegt und 9.1 ml (120 mmol) 3-Aminopropanol langsam dazu getropft, so dass die Temperatur nicht über 40 °C anstieg. Anschließend wurden 5.18 ml (40 mmol) 1,5-Dimethoxytetrahydrofuran tropfenweise hinzugefügt. Über eine Destillationsapparatur wurden 5ml vom Reaktionsgemisch bei ca. 100 °C abdestilliert und der Rückstand wieder auf RT abgekühlt, mit 20 ml Wasser versetzt und dreimal mit 50ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die gesammelten org. Phasen wurden mit 30 ml ges. Na₂CO₃ – Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Am RV wurde der Ansatz eingengt und mit je 8 ml 20 %iger NaOH und MeOH versetzt, 1 h bei RT gerührt und wie oben nach Einengen am RV mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die org. Phasen wurden getrocknet und am RV eingengt und der Rückstand in einer Kugelrohrdestille bei 100 °C und 5.2 · 10⁻² bar destilliert. Es wurde 1,95 g eines farblosen Öls von **17** gewonnen.

Ausbeute: 40 %

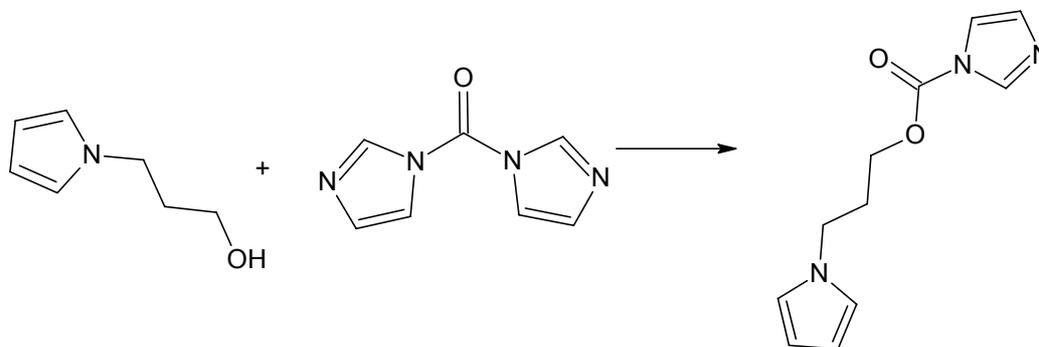
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 6.72 (s, 2H, Pyrrol); 6.20 (s, 2H, Pyrrol); 4.05 (t, ³J (H,H) = 6.8 Hz, 2H, CH₂); 3.62 (t, ³J (H,H) = 5.9 Hz, 2H, CH₂); 1.4 (s, 1H, OH); 2.04 (m, ³J (H,H) = 5.9 Hz, 6.5 Hz, 2H, CH₂).

¹⁵ Analog zu M. Maskus, [91]

M. Maskus, Dissertation thesis, Universität Osnabrück (Osnabrück), **1993**, S. 50.

^{13}C -NMR (63 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 121.1 + 108.5 (\text{CH}_{\text{arom}})$; $59.9 + 46.5 + 34.4 (\text{CH}_2)$.

6.4.2 3-(1*H*-pyrrol-1-yl)propyl 1*H*-imidazole-1-carboxylate¹⁶



18

$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$

219.24

Es wurden 1.3 g (10.5 mmol) 1-(3-Hydroxy)pyrrol in 30 ml CH_2Cl_2 gelöst, und mit 3.4 g (14.8 mmol) CDI versetzt und über Nacht (ca. 18 h) bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeeengt und auf eine Säule aufgebracht (250 g Silicagel 60, Laufmittel dest. Ethylacetat). Es wurde ein leicht gelbliches Öl von **18** erhalten, welches über Nacht am HV getrocknet wurde.

Ausbeute: 1.7 g (74 %)

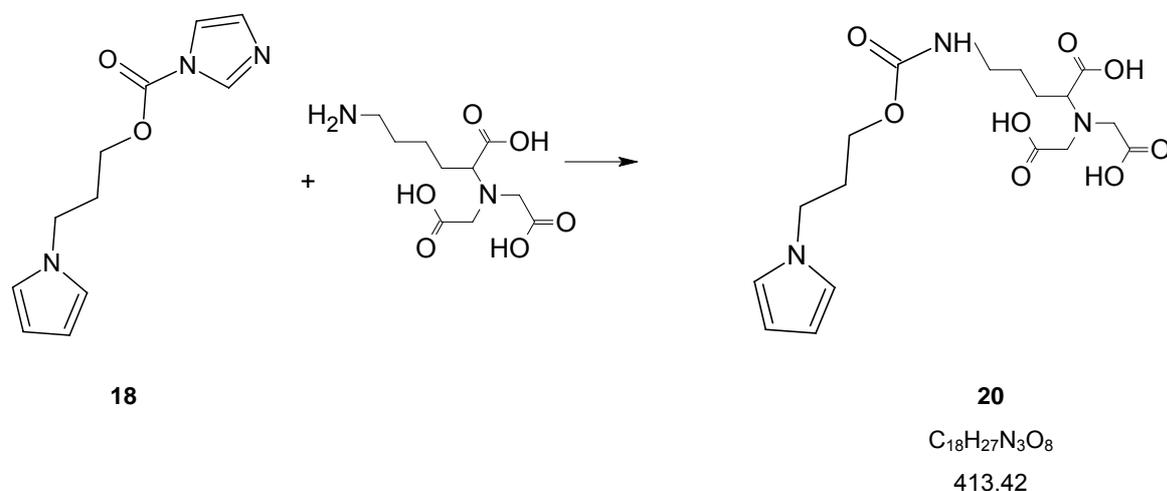
R_f (EtOAc): 0.46

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 8.17+7.44+7.14$ (s, CH_{arom} , 1H); $6.69+6.19$ (s, CH_{arom} , 2H); 4.42 (t, CH_2 , 2H); 4.01 (t, CH_2 , 2H); 2.29(m, CH_2 , 2H).

¹⁶ Analog nach [48] G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger, G. M. Whitesides, *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 490.

^{13}C -NMR (73 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 148.8 (\text{CH}_{\text{arom.}}); 138.0 (\text{Cq}); 130.8 (\text{CH}_{\text{arom.}}); 120.9 (\text{CH}_{\text{arom.}}); 117 (\text{CH}_{\text{arom.}}); 109.2 (\text{CH}_{\text{arom.}}); 66.0+46.4+30.8 (\text{CH}_2).$

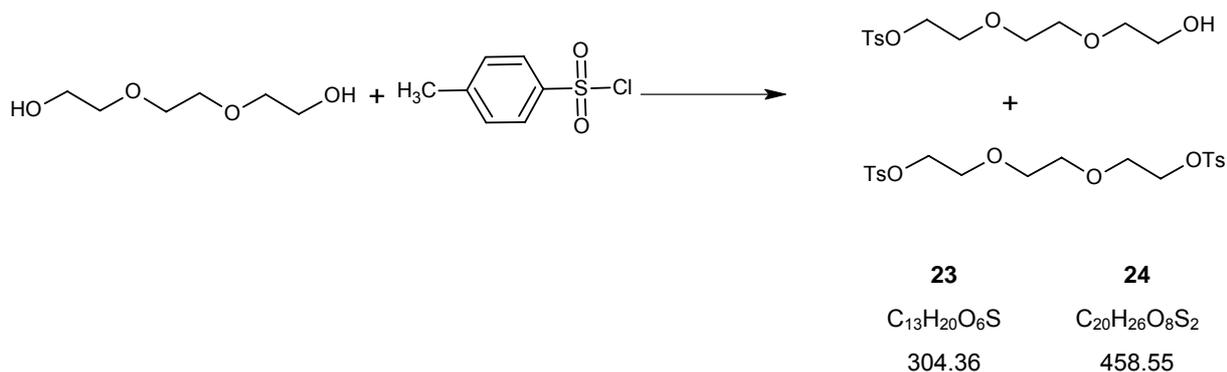
6.4.3 N^2, N^2 -Dimethylcarboxy- N^6 -{2-(1H-pyrrol-1-yl)-propyloxy]-carbonyl}lysin



0.372 g (1.7 mmol) des Carbamats **18** wurde mit 1.91 g (6.8 mmol) AB-NTA in 20 ml DMF/ H_2O vier Tage bei RT gerührt. Aus dem Reaktionsgemisch wurde das Produkt **20** massenspektrometrisch nachgewiesen. Eine säulenchromatographische Aufreinigung misslang.

MS(MeOH; CI (pos)): 414 (M^+H , 100)

6.4.4 Triethylenglycol-tosylat und Triethylenglycol-di-tosylat



In einem 100 ml Rundkolben wurden 14.25 g (75 mmol) p-Tolouensulfonylchlorid in 20.11 ml (150 mmol) Triethylenglycol suspendiert und unter Eiskühlung wurden 18.75 ml (135 mmol) Triethylamin hinzugegeben. Es wurde 1 h bei 0° C gerührt, dann 16 h bei RT. Das RG wurde mit 250 ml CH₂Cl₂ verdünnt und mit 200 ml 1M HCl gewaschen, dann mit 250 ml Wasser gewaschen. Die org. Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, am HV eingeeengt (15 g Rückstand). Über eine Silicagelsäule (EtOAc als LM) wurden zwei Fraktionen erhalten. Das monotosylierte Produkt **23** wurde als klares Öl isoliert und das ditosylierte als farbloser FS **24**.

Triethylenglycol-tosylat **23**:

Ausbeute: 8.6 g (38 %)

¹H-NMR (250MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 7.76 (d, CH_{arom}, 2H); 7.32 (d, CH_{arom}, 2H); 4.15-4.11 (m, CH₂, 2H); 3.69–3.53 (m, CH₂, 10H); 2.47 (s, CH₃, 3H); 1.22 (t, OH, 1H).

¹³C-NMR (63MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 145.3 + 133.26 (Cq); 130.3 + 128.3 (CH_{arom}); 72.9 + 71.1 + 70.8 + 70.6 + 69.0 + 63.9 (CH₂); 21.4 (CH₃).

R_f (EtOAc): 0.26

Triethylenglycol-di-tosylat **24**:

Ausbeute: 2.3 g (13 %)

¹H-NMR (250MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 7.82 (d, CH_{arom}, 4H); 7.37 (d, CH_{arom}, 4H); 4.16 (brs, CH₂, 4H); 3.68-3.55 (brs, CH₂, 8H); 2.47 (s, CH₃, 6H).

¹³C-NMR (63MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 145.3 + 133.4 (Cq); 130.3 + 128.4 (CH_{arom}); 71.1 + 69.7 + 69.2 (2·CH₂); 21.5 (2·CH₃).

R_f (EtOAc): 0.44

m. p.: 73-78 °C

6.4.5 2-{2-[2-(1*H*-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethanol



25

C₁₀H₁₇NO₃

199.25

0.86 g (12.79 mmol) Pyrrol in 20 ml trockenem THF wurden mit 0.5 g (12.79 mmol) Kalium im Rückfluss zum Kaliumpyrrolid umgesetzt. Danach wurden 2.23 g (6.4 mmol) Triethylenglycol-tosylat **23** tropfenweise in das siedene RG hinzugegeben. Es wurde noch 12 h bei RT gerührt und dann säulenchromatographisch (EtOAc, Silicagel) aufgearbeitet. Es wurden 400 mg eines bräunlichen, wachsartigen Produktes erhalten.

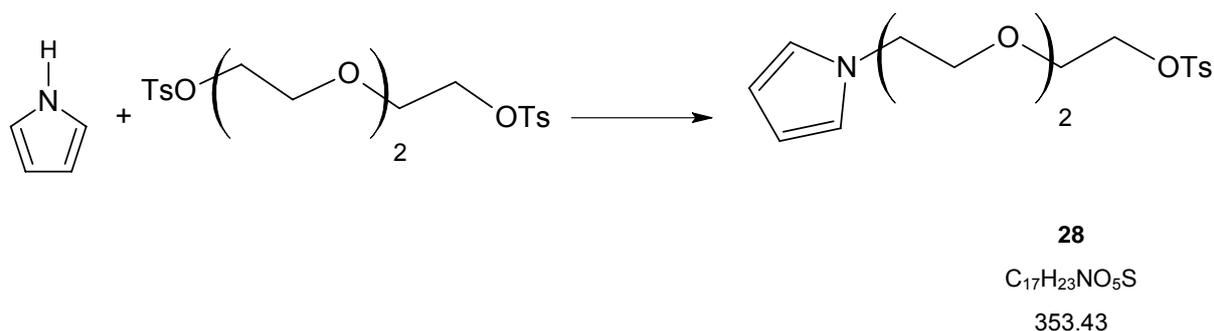
Ausbeute: 31 %

¹H-NMR(250 MHz, CDCl₃): 7.82 (d, ³J(H,H) = 6.2 Hz, CH_{arom}, 2H); 7.64 (d, ³J(H,H) = 6.2 Hz, CH_{arom}, 2H); 4.03 (t, ³J(H,H) = 6.6 Hz, CH₂, 2H); 3.71 (t, ³J(H,H) = 6.6 Hz, CH₂, 4H); 3.68 (t, ³J(H,H) = 6.6 Hz, CH₂, 4H); 4.47 (s, OH, 1H)

MS(MeOH; CI (pos)): 200 ([M+H]⁺, 100 %)

R_f(Diethylether): 0.33

6.4.6 2-{2-2-(1H-pyrrol-1-yl)ethoxy}ethyl 4-methylbenzolsulfonat



In 50 ml trockenem THF wurden 0.1 g (2.6 mmol) Kalium mit 0.34 ml (2.6 mmol) Pyrrol im Rückfluss zur Reaktion gebracht bis das Kalium vollständig in Lösung ging. Danach wurde 1.17 g (2.6 mmol) **24** in 10 ml THF langsam dazugetropft und bei RT 12 h gerührt. Das dunkle RG wurde eingengt in 10 ml EtOAc gelöst und säulenchromatisch (Silicagel, Diethylether) aufgearbeitet. Die vierte Fraktion wurde eingengt und am HV getrocknet. Es wurden 25 mg eines bräunlichen, wachsartigen FS isoliert.

Ausbeute: 27 %

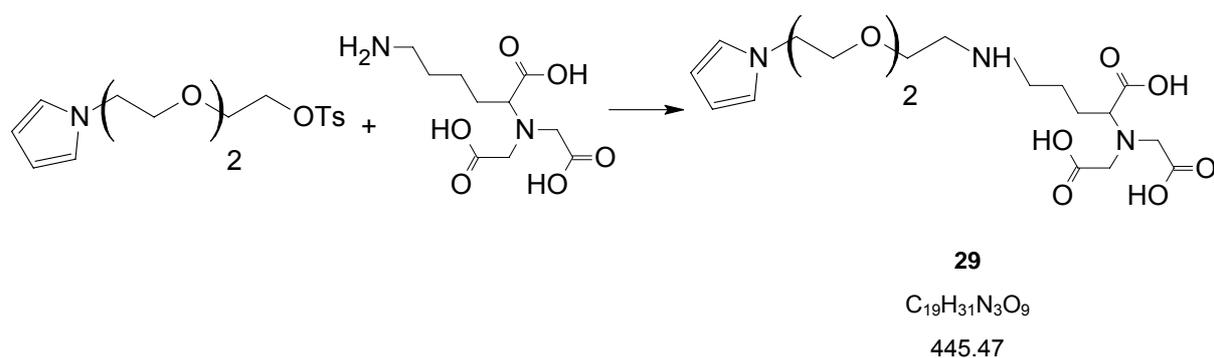
¹H-NMR(250 MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 7.72 (d, ³J(H,H) = 8.3 Hz, CH(Benzol), 2H); 7.25(d, ³J(H,H) = 8.3 Hz, CH(Benzol), 2H); 6.60 (s, CH(Pyrrol), 2H) 5.92 (s, CH(Pyrrol), 2H); 4.06 (t, ³J(H, H) = 4.8 Hz, CH₂, 2H); 3.94 (t, ³J(H, H) = 4.8 Hz, CH₂, 2H); 3.65-3.27(brs, CH₂,8H); 2.36 (s, CH₃; 3H).

¹³C-NMR (63MHz, CDCl₃): δ(ppm) = 144.6 (Cq); 134.7 (Cq); 130.2 (CH_{arom}, 4C); 121.4 (CH_{arom}); 109.0 (CH_{arom}); 71.8+71.1+71.0+70.0 +69.7+69.1 (CH₂, 6*C); 21.5 (CH₃).

MS(MeOH; CI (pos)): 354 ([M+H]⁺)

R_f(Diethylether): 0.44

6.4.7 Pyrrol(TEG)-ABNTA



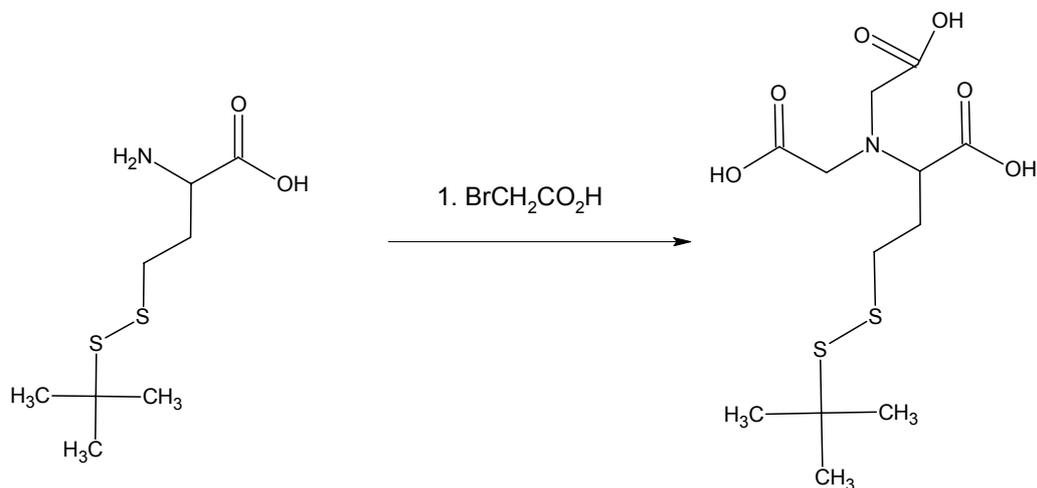
100 mg (0.38 mmol) AB-NTA¹⁷ und 170 mg (0.38 mmol) **28** wurden in 5 ml DMF/H₂O (1:1, pH=9) gelöst und 12 h bei 40 °C gerührt. Durch Extraktion des sauren RGs konnte kein Produkt isoliert werden. Der schwache Umsatz ermöglichte lediglich den massenspektrometrischen Nachweis von **29** aus dem RG.

MS (H₂O, ESI, pos): 444 ([M-H]⁺, 15 %); 221 ([444-H]⁺⁺, 10 %)

¹⁷ nach: [58] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *Journal of Chromatography* **1987**, 411, 177.

6.5 Mercapto-NTA-Derivate

6.5.1 2-[bis(carboxymethyl)amino]-4-(*tert*-butylthio)butanol Säure



30

C₁₂H₂₁NO₆S₂

339.43

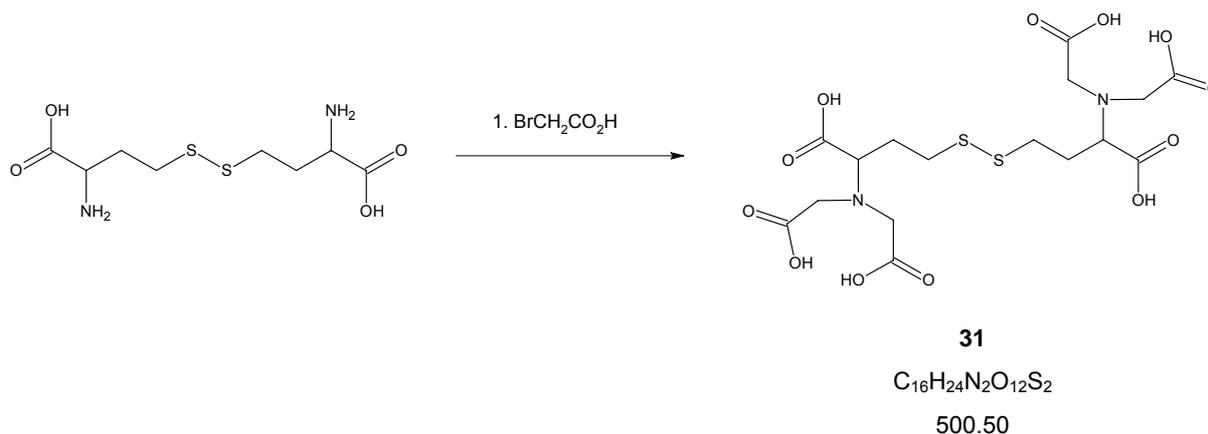
2 g (9.55 mmol) S-*tert*-Butylmercaptocystein und 2.655 g (19.11 mmol) Bromessigsäure wurden in je 20 ml 1M NaOH gelöst. Die Bromessigsäurelösung wurde tropfenweise zu der in Eis gekühlten AS-Lösung gegeben und 12 h bei RT gerührt. Mit 1M HCl wurde das Reaktionsgemisch auf pH = 2 eingestellt und sieben Tage bei 4 °C gekühlt. Der ausgefallene weiße FS wurde abfiltriert mit Eiswasser wenig gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 0.9 g eines weißen FS erhalten.

Ausbeute: 29 %

¹H-NMR (250MHz, D₂O): δ(ppm) = 4.12 (q, ³J = 6.3 Hz, ½H, C*H); 3.96 (q, ³J = 6.3 Hz, ½ C*H); 3.75 (s, CH₂, 2H); 3.60 (q, ³J = 27 Hz, 1H); 3.31-3.16 (m, 2H).

MS (H₂O, ESI, pos): 324 ([M-H]⁺, 100 %); 266 (324-C₂H₂O₂); 202 (324-C₄H₉S₂); 190 (324-C₅H₁₁S₂); 158 (202-CO₂); 114 (158-CO₂).

6.5.2 Di-S,S'-[2-[Bis(carboxymethyl)amino]-4-mercaptobutanol Säure]



1 g (3.7 mmol) Homocystein und 2.07 g (14.9 mmol) Bromessigsäure wurden in je 16.75 ml 1M NaOH gelöst. Zu der eisgekühlten Aminosäurelösung wurde unter starkem Rühren die Bromessigsäure über 1h hinzu getropft. Das Gemisch wurde bei RT über Nacht gerührt, mit 6M HCl auf pH 1 eingestellt und 24 h bei 4 °C gekühlt. Der ausgefallene FS wurde abfiltriert, mit wenig Eiswasser gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 0.8 g eines leicht rosa Pulvers erhalten.

Ausbeute: 43 %

MS(H₂O, (ES, neg.)): 499 ([M-H]⁻, 100 %).

R_f (MeOH): 0.2

6.6 Elektroden-Modifikation

6.6.1 Elektropolymerisation

In einem Dreielektrodensystem (Ref.: Ag/AgCl und GE: Platindraht) wurde eine Standard GC Elektrode (A = 0.07 cm²) als Arbeitselektrode verwendet und in eine 5 mM Lösung einer N-(Propansäure)-pyrrol (bzw. N-(Propansäureperfluorphenylester)-pyrrol) in 0.05 M TEABF₄/MeCN getaucht. Es wurden 3 bis 5 CV Scans zwischen 0 V und 1.4 V bei einer Vorschubgeschwindigkeit $v = 0.05$ V/s gefahren. Danach wurde die Arbeitselektrode gründlich mit MeCN gewaschen. Dem Waschgang folgte ein weiterer mit Wasser, wenn mit

der Elektrode in wässrigem EL weitergearbeitet wurde. Gelagert wurde die Elektrodenoberfläche im jeweils zuletzt verwendeten Waschmedium.

6.6.2 Oberflächenreaktionen an Polypyrrolfilm-Elektroden

6.6.2.1 Amidische Knüpfung eines Viologenderivats an einen N-(Propansäure)-polypyrrolfilm

Die in 6.6.1 mit N-(Propansäure)-pyrrol modifizierte Elektrode wurde einer eisgekühlten 10 mM EDC Lösung in 0.01 M HEPES Lösung (pH = 8.5) 10 min. unter rühren ausgesetzt und gleich nach kurzem Waschen einer eisgekühlten 3 mM N,N'-Di-(Aminoethyl)-4,4'-Bipyridintetrabromid-Lösung für 1h ausgesetzt. Es folgte gründliches Waschen in Wasser.

6.6.2.2 Amidische Knüpfung von AB-NTA an einen N-(Propansäureperfluorphenylester)-polypyrrolfilm

Die in 6.6.1 mit N-(Propansäureperfluorphenylester)-pyrrol modifizierte Elektrode wurde 1 h bei RT einer 0.1 M AB-NTA Lösung (mit 0.1 M NaOH auf pH = 9 eingestellt) ausgesetzt und anschließend gründlich in Wasser gewaschen.

7 Abkürzungen

AB-NTA	Aminobutyl-NTA
bzw.	beziehungsweise
CI	Chemische Ionisation
CV	Cyclovoltammographie od. Cyclovoltammogramm
d	Dublett
DPV	Differentielle Pulsvoltammetrie
EQCM	(Elektrochemische) Quarzkristallmikrowaage
ES	Elektronenspray
EtOH	Ethanol
h	Stunde
HV	Hochvacuum
MeOH	Methanol
MRI	Magnet-Resonanz-Imaging
MS	Massenspektroskopie
NTA	engl. für Nitrilotriessigsäure
PAMAM	Polyaminoamido-Dendrimer
p.a.	pro analysis
puriss.	purissimum
QCM	engl. für Quarzkristallmikrowaage
RT	Raumtemperatur
RV	Rotationsverdampfer
s	Sigulett
SAM	Selbstassemblierende Monoschicht
t	Tripplett

8 Literatur

- [1] G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendritic Molecules: Concepts, Syntheses, Perspectives*, VCH, Weinheim, **1996**.
- [2] G. R. Newkome, Z. Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50*, 2003.
- [3] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polymer Journal* **1985**, *17*, 117.
- [4] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vogtle, *Synthesis-Stuttgart* **1978**, 155.
- [5] S. E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 1385.
- [6] E. C. Wiener, M. W. Brechbiel, H. Brothers, R. L. Magin, O. A. Gansow, D. A. Tomalia, P. C. Lauterbur, *Magnetic Resonance in Medicine* **1994**, *31*, 1.
- [7] J. A. Peters, J. Huskens, D. J. Raber, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1996**, *28*, 283.
- [8] S. Hecht, J. M. J. Frechet, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 74.
- [9] S. Hecht, N. Vladimirov, J. M. J. Frechet, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 18.
- [10] L. Giovannoni, L. Lozzi, D. Neri, P. Neri, *Journal of Peptide Research* **2000**, *55*, 195.
- [11] A. Ulman, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 1533.
- [12] Y. Okahata, K. Niikura, H. Furusawa, H. Matsuno, *Analytical Sciences* **2000**, *16*, 1113.
- [13] V. M. Mirsky, M. Riepl, C. Krause, I. Novotny, M. Splonskowski, V. Rehacek, V. Tvarozek, H. Hummel, O. S. Wolfbeis, in *Trends and New Applications of Thin Films, Vol. 287-2*, TRANSTEC PUBLICATIONS LTD, Zurich-Uetikon, **1998**, pp. 423.
- [14] J. J. Ramsden, *Quarterly Reviews of Biophysics* **1994**, *27*, 41.
- [15] A. Archut, F. Vogtle, *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 233.
- [16] F. Vogtle, M. Plevoets, G. Nachtsheim, U. Worsdorfer, *Journal Fur Praktische Chemie-Chemiker-Zeitung* **1998**, *340*, 112.
- [17] <http://www.dsm.nl>.
- [18] <http://www.mmi.org>.
- [19] J. Issberner, F. Vogtle, L. DeCola, V. Balzani, *Chemistry-a European Journal* **1997**, *3*, 706.
- [20] R. Herrmann, F. Vogtle, H. P. Josel, DE, **1994**.

- [21] R. H. Jin, T. Aida, S. Inoue, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1993**, 1260.
- [22] A. Archut, G. C. Azzellini, V. Balzani, L. De Cola, F. Vogtle, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 12187.
- [23] A. Archut, F. Vogtle, L. De Cola, G. C. Azzellini, V. Balzani, P. S. Ramanujam, R. H. Berg, *Chemistry-a European Journal* **1998**, *4*, 699.
- [24] S. Heinen, Dissertation thesis, Universität Osnabrück **1999**.
- [25] I. R. Lauks, *Accounts of Chemical Research* **1998**, *31*, 317.
- [26] T. G. M. Schmidt, A. Skerra, *Journal of Chromatography A* **1994**, *676*, 337.
- [27] K. Terpe, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *60*, 523.
- [28] I. T. Dorn, K. R. Neumaier, R. Tampe, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 2753.
- [29] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Analytical Biochemistry* **1988**, *171*, 1.
- [30] A. Skerra, *Bio Spectrum* **2003**, *2*, 189.
- [31] J. G. Altin, F. A. J. White, C. J. Easton, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2001**, *1513*, 131.
- [32] D. Kroger, M. Liley, W. Schiweck, A. Skerra, H. Vogel, *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, *14*, 155.
- [33] C. Dietrich, O. Boscheinen, K. D. Scharf, L. Schmitt, R. Tampe, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1100.
- [34] D. R. Shnek, D. W. Pack, D. Y. Sasaki, F. H. Arnold, *Langmuir* **1994**, *10*, 2382.
- [35] U. Radler, J. Mack, N. Persike, G. Jung, R. Tampe, *Biophysical Journal* **2000**, *79*, 3144.
- [36] N. Haddour, S. Cosnier, C. Gondran, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 5752.
- [37] P. D. Gershon, S. Khilko, *Journal of Immunological Methods* **1995**, *183*, 65.
- [38] P. Rigler, W. P. Ulrich, P. Hoffmann, M. Mayer, H. Vogel, *Chemphyschem* **2003**, *4*, 268.
- [39] K. Adachi, R. Yasuda, H. Noji, H. Itoh, Y. Harada, M. Yoshida, K. Kinoshita, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 7243.
- [40] L. Nieba, S. E. NiebaAxmann, A. Persson, M. Hamalainen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson, A. Pluckthun, *Analytical Biochemistry* **1997**, *252*, 217.

- [41] E. L. Schmid, T. A. Keller, Z. Dienes, H. Vogel, *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 1979.
- [42] T. Stora, Z. Dienes, H. Vogel, C. Duschl, *Langmuir* **2000**, 16, 5471.
- [43] E. W. Kubalek, S. F. J. Legrice, P. O. Brown, *Journal of Structural Biology* **1994**, 113, 117.
- [44] I. T. Dorn, K. Pawlitschko, S. C. Pettinger, R. Tampe, *Biological Chemistry* **1998**, 379, 1151.
- [45] M. Conti, G. Falini, B. Samori, *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, 39, 215.
- [46] P. Yim, J. P. Santos, J. G. Forbes, *Biophysical Journal* **1998**, 74, A186.
- [47] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber, *Bio-Technology* **1988**, 6, 1321.
- [48] G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger, G. M. Whitesides, *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 490.
- [49] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Macromolecules* **1986**, 19, 2466.
- [50] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1990**, 29, 138.
- [51] C. Hawker, J. M. J. Frechet, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1990**, 1010.
- [52] T. M. Miller, T. X. Neenan, *Chemistry of Materials* **1990**, 2, 346.
- [53] Z. F. Xu, M. Kahr, K. L. Walker, C. L. Wilkins, J. S. Moore, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, 4537.
- [54] T. Kawaguchi, K. L. Walker, C. L. Wilkins, J. S. Moore, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 2159.
- [55] S. Heinen, W. Meyer, L. Walder, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, 498, 34.
- [56] S. Heinen, L. Walder, *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, 39, 806.
- [57] J. G. Millar, A. C. Oehlschlager, J. W. Wong, *Journal of Organic Chemistry* **1983**, 48, 4404.
- [58] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *Journal of Chromatography* **1987**, 411, 177.
- [59] A. Glidle, C. S. Hadyoon, A. E. G. Cass, J. M. Cooper, *Electrochimica Acta* **2000**, 45, 3823.
- [60] A. Kelaidopoulou, G. Kokkinidis, E. Coutouli-Argyropoulou, *Electrochimica Acta* **1998**, 43, 987.

- [61] J. G. Mackintosh, C. R. Redpath, A. C. Jones, P. R. R. Langridgesmith, D. Reed, A. R. Mount, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, 375, 163.
- [62] F. Garnier, G. Tourillon, M. Gazard, J. C. Dubois, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1983**, 148, 299.
- [63] D. B. Amabilino, P. R. Ashton, V. Balzani, C. L. Brown, A. Credi, J. M. J. Frechet, J. W. Leon, F. M. Raymo, N. Spencer, J. F. Stoddart, M. Venturi, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 12012.
- [64] R. Ballardini, V. Balzani, W. Dehaen, A. E. Dell'Erba, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, M. Venturi, *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 591.
- [65] A. R. Katritzky, C. M. Marson, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1984**, 23, 420.
- [66] P. Schön, in *Universität Osnabrück*, Universität Osnabrück, **2003**, p. 170.
- [67] F. Hook, M. Rodahl, P. Brzezinski, B. Kasemo, *Langmuir* **1998**, 14, 729.
- [68] M. Muratsugu, F. Ohta, Y. Miya, T. Hosokawa, S. Kurosawa, N. Kamo, H. Ikeda, *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 2933.
- [69] M. D. Ward, D. A. Buttry, *Science* **1990**, 249, 1000.
- [70] M. C. Leopold, E. F. Bowden, in *Langmuir*, Vol. 18, **2002**, pp. 2239.
- [71] T. Lötzbeyer, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt, *Sensors and Actuators B* **1996**, 33, 50.
- [72] P. Schön, H. T. Degefa, S. Asaftei, W. Meyer, L. Walder, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 11486.
- [73] A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, New York, **1991**.
- [74] M. M. Walczak, C. A. Alves, B. D. Lamp, M. D. Porter, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1995**, 396, 103.
- [75] D. Weissar, M. Walczak, M. Porter, *LANGMUIR* **1993**, 9, 323.
- [76] Y. J. Qiu, J. R. Reynolds, *Journal of Polym. Sci. Part A* **1992**, 30, 1315.
- [77] S. Asavapiriyant, G. A. Chandler, G. A. Gunawardena, D. Pletcher, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1984**, 177, 229.
- [78] K. J. Kim, S. Song, J. D. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.* **1988**, 9, 248.
- [79] S. Sadki, P. Schottland, N. Brodie, G. Sabouraud, *The Royal Society of Chemistry* **2000**, 29, 283.
- [80] M. E. G. Lyons, in *Advances in Chemical Physics, Polymeric Systems*, Vol. 94, John Wiley & Sons, New York, **1997**.

- [81] *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, Perkin Elmer Corporation, Minnessota, **1979**.
- [82] A. Glidle, M. J. Swann, N. Gadegaard, J. M. Cooper, *Physica B* **2000**, 276, 359.
- [83] O. Vitavska, H. Wiczorek, H. Merzendorfer, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 18499.
- [84] P. Schön, Dissertation thesis, Universität Osnabrück (Osnabrück), **2003**.
- [85] O. Vitavska, H. Merzendorfer, H. Wiczorek, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 1070.
- [86] G. Sauerbrey, *Angewandte Chemie-International Edition* **1957**, 69, 761.
- [87] G. Sauerbrey, *Zeitschrift Fur Physik* **1959**, 155, 206.
- [88] S. Heinen, Dissertation thesis, Universität Osnabrück **1999**.
- [89] J. Bruinink, C. G. A. Kregting, *Journal of the Electrochemical Society* **1978**, 125, 1397.
- [90] S. Heinen, Diplomarbeit thesis, Universität Osnabrück (Osnabrück), **1996**.
- [91] M. Maskus, Dissertation thesis, Universität Osnabrück (Osnabrück), **1993**.

9 Anhang

9.1 Veröffentlichungen

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Schriften bis dato veröffentlicht:

- S. Heinen, W. Meyer, L. Walder, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, 498, 34.
- L. Walder, W. Meyer, S. Heinen, in *Gesellschaft Deutscher Chemiker: Elektronenübertragung in Chemie und Biochemie, Vol. 23*, Frankfurt a. M., **2001**.
- P. Schön, H. T. Degefa, S. Asaftei, W. Meyer, L. Walder, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 11486.

9.2 Curriculum Vitae

Angaben zur Person

Geburtsdatum u. -ort	26.02.1971 in Bad Salzuflen
Familienstand	ledig, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

Juli 1992	Abitur am Ratsgymnasium Osnabrück
1993/94	Zivildienst im Krankenhaus Hollweide, Köln
Apr 1994	Aufnahme des Studiums Chemie (Dipl.) an der Universität zu Köln
Okt 2000	Abschluss zum Diplom Chemiker an der Universität zu Köln Titel der Diplomarbeit: „Synthese von redoxaktiven, dendritischen Porphyrinen mit Viologenperipherie - Nachweis eines radialen Redoxgradienten in Viologendendrimeren“

Beruflicher Werdegang

Okt. 2000	Promotionsstudium als DFG-Stipendiat im Graduiertenkolleg 612: "Molekulare Physiologie: Wechselwirkungen zwischen zellulären Nanostrukturen" an der Universität Osnabrück
Okt. 2003	Sonderforschungsbereich: "Membranproteine: Funktionelle Dynamik und Kopplung an Reaktionsketten"

Promotionsthema: „Synthese dendritischer Redoxverbindungen und deren Einsatz in der Bioanalytik“

Weiterbildungen

- 2001 Übungen zu molekulargenetischen Methoden (25.02.-01.02.)
- 2002 Übungen zur heterologen Expression und Aufreinigung von Proteinen (20.-22.03.)

Publikationen

- 2001 Heinen, S.; Meyer, W.; Walder, L.; *Charge Trapping in Dendrimers with a Viologen Skeleton and Radial Redox Gradient*, J. Electroanal. Chem. 498(1-2), 34-43 2001.
- 2001 Walder, L. Meyer, W.; Heinen, S.; 2001 *Dendrimere mit Viologengerüst – Elektronenschwämme und Elektronenfallen*, - In: Gesellschaft Deutscher Chemiker: Elektronenübertragung in Chemie und Biochemie. Bd. 23, Frankfurt a. M.
- 2005 P. Schön, H. T. Degefa, S. Asaftei, W. Meyer, L. Walder, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 11486.

Vorträge & Poster

- 2000 3. JungChemiker Workshop 2000 (GDCh / JFC) Hamburg "Redoxaktive Dendrimere" (Poster: P. Schön, W. Meyer) 20-22.10 2000
- 2001 Kiel Workshop on Dendrimers, *Charge Trapping in Dendrimers with a Viologen Skeleton*; Kiel, (Poster and Talk: W. Meyer) 21. - 23.01.2001
- 2001 GDCh-Jahrestagung Chemie 2001, *Dendrimere mit Viologengerüst – Elektronenschwämme und Elektronenfallen* Würzburg (L. Walder, W. Meyer), 23. - 29.09.2001
- 2002 Fifth International Symposium on Functional π -Electron Systems 2002, *Viologen based Dendrimers, Electron Sponges and Electron Traps*, (Poster: W. Meyer, L. Walder) 30.05-04.06.2002.

Auslandserfahrungen

1989/90

Austauschjahr in Juneau, Alaska, USA

Lehrtätigkeiten als **Teacher's Aid** in Gastineau School (Grundschule)

Skilehrer für körper- und geistigbehinderte Kinder und Jugendliche

9.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Diejenigen Stellen der Arbeit, die anderen Werken wörtlich oder sinngerecht entnommen wurden, sind in jedem einzelnen Fall unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Wolfdietrich Meyer