



Synthese und Charakterisierung von zylindrischen Bürsten mit polypept(o)idischen Seitenketten als nanopartikuläre Trägersysteme

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

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

Christian Hörtz

geboren in Darmstadt

Mainz, 2014

Dekan:

1. Gutachter :

2. Gutachter:

Prüfungstermin:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2011 bis September 2014 am Institut für [REDACTED] der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Betreuung von [REDACTED] angefertigt.

Ich versichere, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, 23.09.2014

***„An expert is a person who has made all the mistakes
that can be made in a very narrow field“***

- Niels Bohr -

für meine Familie

Zusammenfassung

Zylindrische Polymerbürsten mit pept(o)idischen Seitenketten sind auf Grund ihrer elongierten Topologie, Bioverträglichkeit und hohen Dichte an funktionellen Gruppen vielversprechende Kandidaten für Anwendungen im Bereich des kontrollierten Wirkstoff- bzw. Gentransportes.

In dieser Arbeit wurden Polylysin und Polysarkosin als Bestandteile der Seitenketten verwendet. Polylysin dient als positiv geladener Polypeptidblock für die Komplexierung von Polynukleotiden. Polysarkosin reduziert mit seinem „Stealth“-Effekt die Toxizität des Trägersystems und vermindert Wechselwirkungen mit dem Immunsystem. Über den „grafting from“-Ansatz und mit Hilfe der ringöffnenden NCA-Polymerisation konnten erstmals zylindrische Bürsten mit reinen Polysarkosin-Seitenketten sowie mit amphiphilen Seitenketten aus einem Polylysinkern und einer Polysarkosinschale hergestellt werden. Die Bürsten wurden mittels Lichtstreuung, GPC, CD-Spektroskopie und AFM charakterisiert. Die hohe Biokompatibilität beider Bürsten konnte durch Toxizitätstests und dynamische Lichtstreuung in humanem Blutserum nachgewiesen werden.

Die Polysarkosin-Bürsten konnten zusätzlich an den Seitenkettenenden mit Azidgruppen funktionalisiert werden, welche eine effektive Biokonjugation ermöglichen. Die zylindrischen Bürsten zeigten nach ihrer Modifikation keine unspezifische Aufnahme in dendritische Zellen und könnten somit als Ausgangssubstanzen für die Synthese polymerbasierter Antikörper-Antigen-Konjugate in der Krebsimmuntherapie verwendet werden.

Die Kern-Schale-Bürsten konnten erfolgreich mit siRNA komplexiert werden, ohne dass dabei eine Aggregation auftrat. In ersten Gen-Knockdown-Experimenten zeigten ihre Komplexe eine signifikante Verminderung der ApoB100-Proteinexpression in AML-12 Hepatozyten und könnten daher zukünftig als Transfektionsmittel in der Gentherapie ihren Einsatz finden.

Summary

Cylindrical polymer brushes with polypeptide- and polypeptoid-based side chains serve as promising nanocarriers for controlled drug and gene delivery due to their elongated topology, biocompatibility and high density of functional groups.

In this work polylysine and polysarcosine were used as components of the side chains. Polylysine is a positively charged polypeptide which can form complexes with polynucleotides. Polysarcosin reduces the toxicity of the carrier systems and minimizes interactions with the immune system by its stealth effect. Cylindrical polymer brushes with sheer polysarkosine side chains and with amphiphilic side chains consisting of a polylysine core and a polysarcosine shell were synthesized for the first time using the “grafting from” approach as well as the ring-opening polymerization of N-carboxy-anhydrides. The polymer brushes were characterized by light scattering, SEC, CD-spectroscopy and AFM. The low cell toxicity and dynamic light scattering studies in human blood serum revealed the high biocompatibility of both systems.

Polysarcosine brushes were additionally functionalized with azide groups on the ends of their side chains, which can be utilized for further bioconjugation. After modification the brush showed vanishingly low unspecific uptake in dendritic cells and could be used as base material for the synthesis of polymeric antibody-antigen conjugates in cancer immunotherapy.

The core-shell brushes were successfully loaded with siRNA without aggregation. First gene knockdown experiments on AML-12 hepatocytes showed a significant reduction of ApoB100 protein expression. Therefore the amphiphilic polymer brushes seem to be promising nanocarriers which are suitable for transfection.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Zielsetzung	3
2. Theoretische Grundlagen	4
2.1. Zylindrische Polymerbürsten	4
2.1.1. Synthesestrategien von zylindrischen Polymerbürsten	6
2.2. Polypeptide	9
2.2.1. Synthese von Polypeptiden	10
2.2.2. Ringöffnende NCA-Polymerisation	11
2.2.3. Kontrollierte NCA-Polymerisationen	13
2.2.4. Zylindrische Polypeptidbürsten	18
2.3. Polypeptide	20
2.3.1. Eigenschaften von α -Polypeptoiden	21
2.3.2. Herstellung von α -Polypeptoiden	21
2.3.3. Polysarkosin	24
2.4. Polymere als Transportsysteme für Wirkstoffe	25
2.4.1. Therapeutische Wirkstoffe in der Chemo- und Genterapie	25
2.4.2. Polymere Wirkstoffträger	27
2.4.3. Eigenschaften von polymeren Trägersystemen	28
2.4.4. Polypeptide als „Drug Delivery“-Systeme	32
2.4.5. Zylindrische Bürsten als „Drug Delivery“-Systeme	33

3. Analysemethoden	34
4. Synthese und Charakterisierung von zylindrischen Polypept(o)idbürsten.....	48
4.1. Makroinitiatoren	49
4.1.1. PAHMA.....	49
4.1.2. PLL.....	53
4.1.3. Zusammenfassung	55
4.2. N-Carboxy-Anhydride.....	56
4.3. Poly(Sarkosin)-Bürsten.....	59
4.3.1. PSar ^{PAHMA} -Bürste	59
4.3.2. PSar ^{PLL} -Bürste.....	64
4.3.3. Azidfunktionalisierung	67
4.3.4. Zusammenfassung	71
4.4. Poly(L-Lysin)-Bürsten	73
4.5. Synthese und Charakterisierung von Diblockbürsten.....	77
4.5.1. Bestimmung des Sarkosin- bzw. Lysingehalts.....	78
4.5.2. Diblockbürsten über Cobürsten-Precursor.....	83
4.5.3. Diblockbürsten über in-situ-Polymerisation	89
4.5.4. Zusammenfassung	105
5. Biokompatibilität.....	107
5.1. Zelltoxizität.....	107
5.1.1. PSar-Bürste	107
5.1.2. Diblockbürste.....	108

5.2.	Verhalten im Blutserum	109
5.2.1.	PSar-Bürste	110
5.2.2.	Diblockbürste.....	111
5.3.	Zusammenfassung	112
6.	<i>Anwendung in der Biotechnologie</i>	113
6.1.	PSar-Bürsten als polymere Impfstoffe.....	113
6.2.	Diblockbürsten als Transfektionsmittel.....	114
6.2.1.	Komplexierungseffizienz.....	115
6.2.2.	Gen-Knockdown	119
6.2.3.	Zusammenfassung.....	122
7.	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	123
8.	<i>Experimenteller Teil.....</i>	126
8.1.	Mono-N-Boc-1,6-diaminohexan.....	126
8.2.	N-Boc-N'-methacrylamid-1,6-diaminohexan	127
8.3.	Benzyl-2-hydroxyethyl-trithiocarbonat	128
8.4.	PAHMA-Makroinitiator (geschützt).....	129
8.5.	PAHMA-TFA-Makroinitiator (entschützt)	130
8.6.	PAHMA-Makroinitiator (deprotoniert)	131
8.7.	Sarkosin-NCA	132
8.8.	L-Lysin(Z)-NCA.....	133
8.9.	L-Lysin(TFA)-NCA.....	134
8.10.	Polypept(o)idbürsten	136

8.11.	Abspaltung der TFA-Schutzgruppe	139
8.12.	Abspaltung der Z-Schutzgruppe	140
8.13.	Azidfunktionalisierung	141
8.14.	Verwendete Chemikalien	142
8.15.	Verwendete Geräte und Methoden	144
9.	<i>Anhang</i>	146
10.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	152
11.	<i>Literaturverzeichnis</i>	156
12.	<i>Danksagung</i>	165

1. Einleitung

Polymere Trägersysteme können in der Chemo- bzw. Gentherapie eingesetzt werden, um die Effizienz des Wirkstofftransports zu erhöhen und somit eine gezielte Behandlung von Krebs oder Erbkrankheiten zu ermöglichen [1,2]. Das grundlegende Konzept der Polymer-Wirkstoff-Konjugate wurde bereits 1975 von Ringsdorf etabliert [3] und beruht auf der Anbindung von therapeutischen Molekülen an einen speziellen polymeren Träger, um die Löslichkeit, Pharmakokinetik, Biodistribution und Zirkulationszeit der Wirkstoffe zu verbessern [4]. Die verwendeten Polymere können den Anforderungen entsprechend in ihrer chemischen Komposition und Struktur angepasst werden und erlauben zudem die Anbringung von speziellen Zielerkennungssequenzen (z.B. Antikörper) für den kontrollierten Transport [5]. Hierfür eignen sich besonders Polypeptide, weil sie über eine große Auswahl an verschiedenen funktionellen Gruppen verfügen, hierarchische Strukturen ausbilden können und bioabbaubar sind [6].

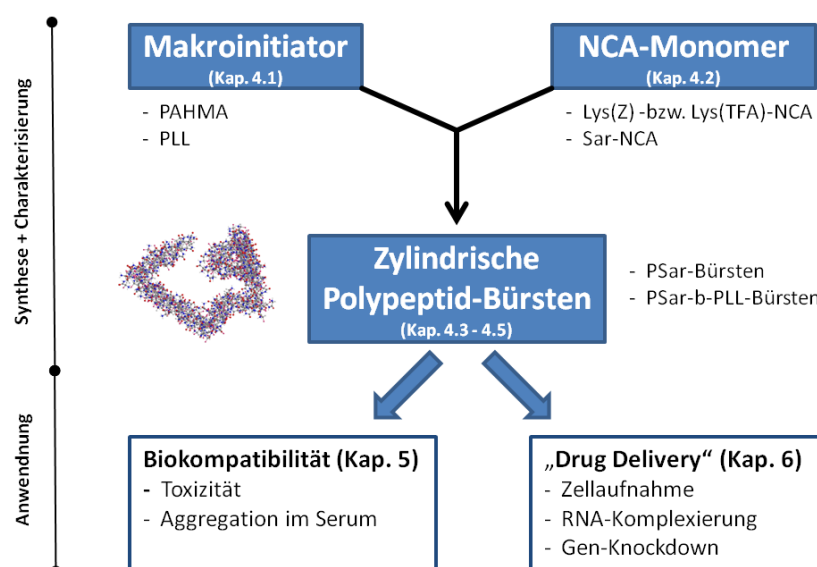
Des Weiteren hängt der Erfolg der Therapie auch stark von der Bioverträglichkeit des „Drug Delivery“-Systems ab. Forschungsarbeiten zeigen, dass durch die Inkorporation von hydrophilen Bestandteilen mit einem ausgeprägten „Stealth“-Effekt, wie beispielsweise Polyethylenglycol (PEG) oder Polysarkosin (PSar), die Biokompatibilität der Trägersysteme deutlich gesteigert werden kann [7,8]. Diese Polymere senken die Toxizität des Systems, unterdrücken Wechselwirkungen mit dem Immunsystem (Opsonisierung) und verhindern eine frühzeitige Ausscheidung im Körper. Gerade Polysarkosin erfährt eine immer größere Bedeutung, da es potentiell hydrolysierbar ist und aus der natürlich vorkommenden Aminosäure Sarkosin besteht [9].

Neben dem chemischen Charakter haben auch die Architektur und die Oberflächenbeschaffenheit des nanopartikulären Trägers einen erheblichen Einfluss auf seine Effektivität [10]. Mittlerweile stehen zahlreiche Polymere mit vielfältigen Strukturen zur Verfügung [11], wie z.B. Dendrimere, sternförmige Makromoleküle, Mizellen oder zylindrische Bürstenpolymere, wobei sich letztere durch ihre sehr hohe Dichte an funktionellen Gruppen und ihre stäbchenförmigen Konformation

auszeichnen [12]. Diese spezielle Topologie verhilft den Bürsten zu einer längeren Blutzirkulationszeit und zu einer verbesserten Aufnahme in malignes Tumorgewebe [13, 14]. In Kombination mit den Eigenschaften von Polypeptiden und Polypeptoiden stellen zylindrische Bürsten mit pept(o)idischen Seitenketten potentielle Kandidaten für den Wirkstofftransport in der Krebs- bzw. Gentherapie dar.

1.1. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Synthese und Charakterisierung zylindrischer Polymerbürsten mit Polypept(o)id-Seitenketten sowie deren Untersuchung als polymere, nanopartikuläre Trägersysteme für die Gen- bzw. Krebsimmuntherapie. Dazu werden aufbauend auf Vorarbeiten [15,16,17] Polysarkosinbürsten bzw. Diblockbürsten aus Polysarkosin und Polylysin mit Hilfe der „grafting from“-Methode und der ringöffnenden NCA-Polymerisation ausgehend von zwei verschiedenen Makroinitiatoren hergestellt. Die Polysarkosinbürsten sollen polymeranalog mit Azidgruppen funktionalisiert werden, um die Effizienz einer späteren Biokonjugation zu steigern. Zur Bestimmung der strukturchemischen Informationen werden die Bürsten mittels Lichtstreuung, AFM, GPC und CD-Spektroskopie charakterisiert. Zudem sollen alle Systeme durch Toxizitätstests und die Analyse des Aggregationsverhaltens in humanem Blutserum hinsichtlich ihrer Biokompatibilität untersucht werden, um den „Stealth“-Effekt von Polysarkosin zu verifizieren [7]. Ziel ist es ebenfalls, Polysarkosinbürsten hinsichtlich ihrer unselektiven Zellaufnahme zu evaluieren, um ihre Eignung als potentielle Trägersysteme in der Krebsimmuntherapie zu klären. Desweiteren werden die Komplexierungseigenschaften der Diblockbürstensysteme durch Zugabe von siRNA analysiert. Die Fähigkeit der Komplexe als Transfektionsmittel einen Gen-Knockdown zu induzieren, wird an zwei verschiedenen Zelltypen in Kooperation mit dem Institut der Translationalen Immunologie der Universitätsklinik Mainz überprüft.



2. Theoretische Grundlagen

2.1. Zylindrische Polymerbürsten

Eine besondere Architekturklasse in der Strukturvielfalt von Makromolekülen bilden die sogenannten Bürstenpolymere. Ähnlich wie ihre Namensvorbilder bestehen sie aus einem zentralen Rückgrat, von welchem kleinere Seitenketten wie Haare in alle Richtungen des Raumes entspringen. Dabei ist die chemische Konstitution der einzelnen Komponenten variabel und kann den entsprechenden Anforderungen angepasst werden. So können die molekularen Bürsten einen flexiblen oder starren Charakter besitzen, lose oder eher dicht gepfropft sein oder aus Homo- bzw. Copolymerblöcken bestehen [12] (Abb. 1).

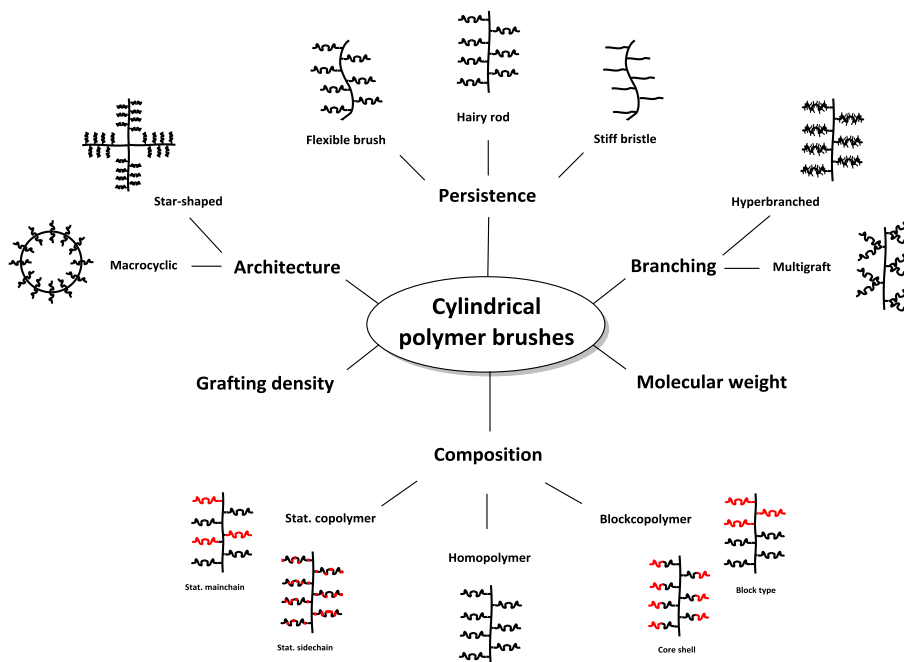


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der wichtigsten Merkmale von zylindrischen Polymerbürsten (abgeändert von [12])

Ob Bürstenpolymere eine eher sphärische oder zylindrische Konformation ausbilden, hängt in der Regel am stärksten von ihrer Pfropfungsdichte und ihrem Längenverhältnis von Seitenkette zu Hauptkette ab. Liegen genügend lange Seitenketten sehr dicht beieinander, erhöht sich ihre gegenseitige sterische Repulsion, wodurch ihre

Kettenenden nahe an der Oberfläche positioniert werden, wo sie für eine spätere Funktionalisierung besser erreichbar sind. Desweiteren bewirkt die massive Seitenkettenabstoßung auch eine starke Elongation des Rückgrats, welches seine flexible Gestalt verliert und in eine entropisch ungünstigere Koformation mit hoher Kettensteifheit gezwungen wird [12]. Bei ausreichend großem Längenunterschied zwischen Haupt- und Seitenkette erscheinen die Bürsten in AFM- oder TEM-Aufnahmen als längliche, wurmartige Gebilde [18], weswegen sie auch als zylindrische Flaschenbürsten bezeichnet werden [19]. Durch externe Stimuli wie z.B. Temperatur, Ionenstärke oder pH-Wert lässt sich die zylindrische Form mancher Bürsten auch in globuläre, helikale oder gekrümmte Strukturen umwandeln [20-22].

Die einzigartige Architektur, gekoppelt mit den unzähligen Variationsmöglichkeiten ihrer chemischen Bausteine und der hohen Dichte an funktionellen Gruppen machen die Bürstenpolymere für viele verschiedene Anwendungsmöglichkeiten interessant. So werden sie z.B. als Sensoren [23], „Drug Delivery“-Systeme in der Nanomedizin [24,25] oder als Template für Fe_2O_3 -, TiO_2 - und CdS -„Nanowires“ genutzt [26-28]. Selbst die Natur macht sich die besonderen Eigenschaften von bürstenähnlichen Makromolekülen in Form von Proteoglykanen zu Nutze [29] (Abb. 2). Diese setzen sich aus einem Proteinhauptgerüst und Kohlenhydratseitenketten (Glykosaminoglykane) zusammen und sind im menschlichen Körper an verschiedensten Aufgaben beteiligt, z.B. bei der Zellsignalübertragung, als Stabilisatoren von Zelloberflächen, bei der Reinigung der Bronchien oder als Schmiermittel der Gelenke [30-32].

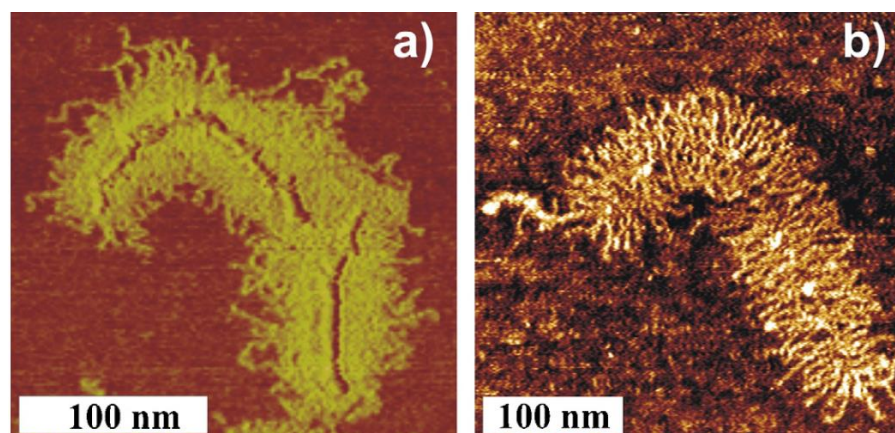


Abb. 2: AFM-Aufnahmen von **a)** molekularen zylindrischen Bürsten mit Poly(n-butylacrylat)-Seitenketten [33] und **b)** Proteoglykane mit Glykosaminoglykan-Seitenketten [34]

2.1.1. Synthesestrategien von zylindrischen Polymerbürsten

Im Allgemeinen sind makromolekulare Bürsten über drei verschiedene Syntheserouten zugänglich: a) „grafting through“, b) „grafting onto“ und c) „grafting from“ (Abb. 3). Dabei hilft jede Methode auf ihre eigene Art und Weise strukturelle und chemische Parameter wie Pfropfdichte, chemische Komposition oder den Polymerisationsgrad der Seiten- und Hauptketten zu kontrollieren. Die sich daraus ergebenden Vor- und Nachteile sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Allen Ansätzen stehen dabei eine Reihe von verschiedenen Polymerisationstechniken, wie z.B. freie bzw. kontrollierte radikalische Polymerisationen, ionische oder auch Ringöffnungspolymerisationen (ROP, ROMP) zur Verfügung, die in den folgenden Unterkapiteln im Bezug zur jeweiligen Strategie noch einmal genauer erläutert werden.

Tabelle 1: Vergleich der möglichen Strategien für die Herstellung von zylindrischen Bürsten. Die Symbole \uparrow (hoch), \downarrow (niedrig) und \updownarrow (hoch oder niedrig, abhängig von den verwendeten Polymerisationstechniken) klassifizieren die einzelnen Parameter

	„through“	„onto“	„from“
Polydispersität Seitenkette	\downarrow	\downarrow	$\downarrow\uparrow$
Polydispersität Hauptkette	\uparrow	\downarrow	\downarrow
Hauptkettenlänge	$\downarrow\uparrow$	\uparrow	\uparrow
Seitenkettenlänge	\downarrow	\downarrow	\uparrow
Pfropfdichte	\uparrow	\downarrow	$\downarrow\uparrow$

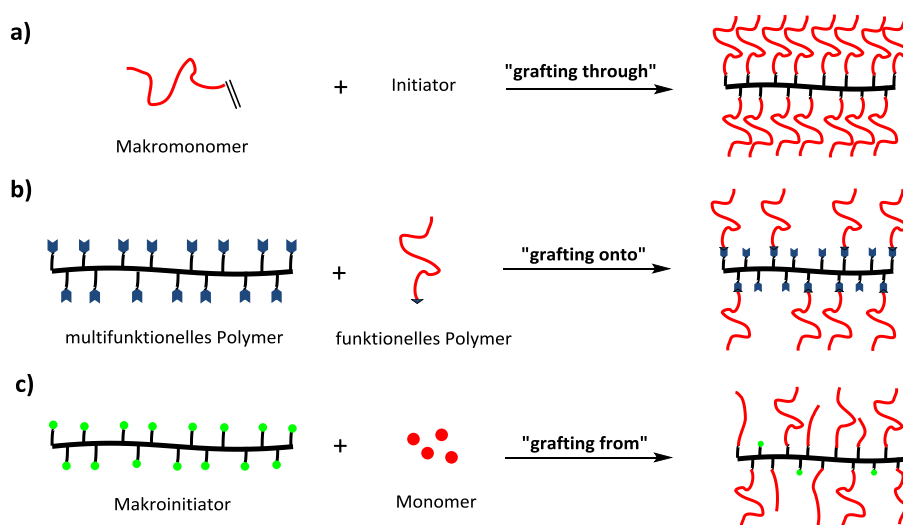


Abb. 3: Synthesestrategien zur Darstellung von zylindrischen Polymerbürsten: **a)** „grafting through“-Polymerisation, **b)** „grafting onto“-Verknüpfung und **c)** „grafting from“-Polymerisation

a) „Grafting through“

Der „grafting through“-Ansatz geht von einem Oligomer mit bekannter Molmasse und Polydispersität aus, welches eine polymerisierbare Gruppe (meist eine Vinylgruppe) trägt. Mit Hilfe eines Initiators wird dann das sogenannte Makromonomer zu einer Bürste mit 100%iger Pfropfungsdichte polymerisiert. Abhängig von der Oligomerlänge führen die geringe Konzentration an polymerisierbaren Gruppen sowie die starke sterische Behinderung am propagierenden Kettenende allerdings meist nur zu geringen Umsätzen und kleinen Hauptkettenpolymerisationsgraden [35]. So entstehen bei anionischen [36], kationischen [37] oder kontrolliert radikalischen Polymerisationstechniken wie ATRP [38-40] in vielen Fällen eher sphärische Strukturen. Um zylindrische Bürsten zu erhalten, bedient man sich daher häufig der freien Radikalik mit hohen Polymerkonzentrationen [19,41-43]. Zwar ist sie wesentlich schwerer zu kontrollieren und weist breite Verteilungen auf, doch wird die Lebensdauer der Radikale durch die hohe Viskosität um ein Vielfaches verlängert, was wiederum den Polymerisationsgrad des Rückgrats deutlich vergrößert. Auch mittels ringöffnender Metathese-Polymerisation (ROMP) lassen sich Makromonomere mit Norbornenylgruppen zu langen zylindrischen Strukturen polymerisieren [44]. Wegen des größeren Abstands der Seitenketten wird die sterische Repulsion vermindert und durch den zusätzlichen Abbau der Ringspannung die Polymerisation thermodynamisch begünstigt [45].

b) „Grafting onto“

Die „grafting onto“ Methode beruht auf der Verknüpfung zwischen separat synthetisierten Seiten- und Hauptketten über komplementäre, funktionelle Gruppen. Der Vorteil dieser Strategie liegt eindeutig in der vollständigen Charakterisierung der einzelnen Bürstenbestandteile. Allerdings werden abhängig von der Seitenkettenlänge häufig nur geringe Pfropfungsdichten erzielt [46]. Ein zunehmender Pfropfungsgrad erschwert zum einen die Ankopplung weiterer endgruppenaktiver Seitenketten durch die steigenden, sterischen Wechselwirkungen und zwingt das Rückgrat zum anderen zu einer Konformationsänderung in Richtung einer entropisch ungünstigeren, elongierten

Form. Daher eignen sich für die Synthese dicht gepfropfter Bürsten nur hocheffiziente Kupplungsreaktionen, wie z.B. manche nukleophile Substitutionen [47,48] oder "Klick-Reaktionen" zwischen Alkinen und Aziden [49,50] mit einem großen Überschuss an reaktiven Seitenketten, die aber später meist aufwendig wieder abgetrennt werden müssen. Neben der kovalenten Verknüpfung sind auch Bürsten über nicht kovalente Bindungen wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen [51,52] oder ionische Wechselwirkungen [53] möglich.

c) „Grafting from“

Die „grafting from“-Strategie besteht aus insgesamt zwei Schritten: Zuerst wird eine Hauptkette polymerisiert, die eine bestimmte Anzahl von Initiatorgruppen trägt oder Gruppen, die anschließend zu solchen modifiziert werden können. Als Polymerisationstechnik dienen meist ATRP, RAFT oder anionische Polymerisationen, die eine gute Kontrolle über Polydispersität, Molekulargewicht und die damit verbundene Gesamtzahl der Initiatorgruppen gewährleisten. Im zweiten Schritt können nun, ausgehend von dem sogenannten Makroinitiator, Seitenketten sukzessive durch Zugabe von geeigneten Monomeren aufgebaut werden [54]. Mit der Wahl von langen Makroinitiatoren sind zylindrische Molekülbürsten zugänglich, die durch einfache, sequentielle Zugabe unterschiedlicher Monomere auch Kern-Schale-Strukturen ausbilden können [55-57]. Allerdings ist die Kontrolle über Pfropfdichte und Seitenkettenlänge sowie deren Charakterisierung verglichen mit der „grafting through“-Strategie weitaus eingeschränkter. Eine Möglichkeit diesbezüglich an exakte Informationen zu gelangen sind z.B. spaltbare Linker zwischen Rückgrat und Seitenkette [55,58]. Abhängig von der Polymerisationstechnik und Effizienz der Initiatorgruppen können sehr dicht gegraftete Bürsten hergestellt werden, eine Pfropfungsdichte von 100% wird im Allgemeinen aber nicht erreicht. Werden anstelle von molekularen Makroinitiatoren funktionalisierte Oberflächen verwendet, lassen sich mit Hilfe des „grafting from“-Ansatzes auch leicht dichte, immobilisierte Bürsten herstellen, die z.B. als Antifoulingbeschichtung genutzt werden können [59].

2.2. Polypeptide

Polypeptide bestehen aus mehreren α -Aminosäuren, die in einer bestimmten Reihenfolge durch Peptidbindungen miteinander verbunden sind (Primärstruktur). Eine besondere Eigenschaft von Polypeptiden ist ihre intra- und intermolekulare Selbstorganisation zu verschiedenen Arten von Sekundärstrukturen über Wasserstoffbrückenbindungen [60]. Zu den bekanntesten Elementen gehören neben der α -Helix auch das parallele und antiparallele β -Faltblatt sowie β -Schleifen. Polypeptide aus der natürlichen ribosomalen Synthese eines Organismus werden als Proteine bezeichnet. Diese bestehen meist aus mehreren verschiedenen Sekundärstrukturelementen, die mit Hilfe von hydrophoben oder elektrostatischen Wechselwirkungen, Disulfidbrücken oder komplexierten Metallkationen komplexe Tertiär- oder Quartärstrukturen ausbilden können. Die aus der Faltung resultierende räumliche Gestalt verleiht den Proteinen spezielle Funktionen, die sie zu lebenswichtigen Aufgaben im Bereich des Transports, Stoffwechsels und der Signalübertragung in einem Organismus befähigen.

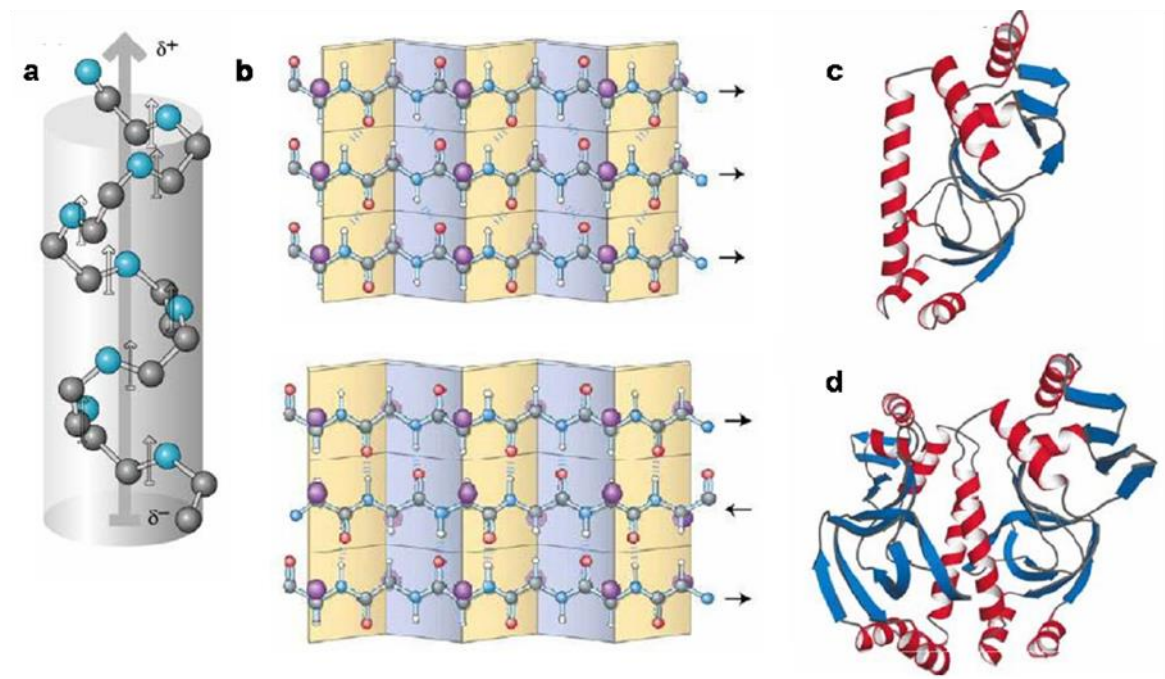


Abb. 4: Verschiedene Hierarchiestufen von Polypeptiden und Proteinen: **a)** α -Helix, **b)** paralleles (oben) und antiparalleles (unten) β -Faltblatt, **c)** Tertiärstruktur und **d)** Quartärstruktur, bestehend aus mehreren Tertiärstruktur-Untereinheiten [übernommen aus [60]]

2.2.1. Synthese von Polypeptiden

Für die künstliche Herstellung von Polypeptiden gibt es mehrere, verschiedene Möglichkeiten. Zum einen kann das Erbgut einzelliger Lebewesen, wie z.B. Bakterien oder Hefen, mittels rekombinanter Methoden gezielt manipuliert werden, sodass Proteine direkt in vivo exprimiert werden. Allerdings ist die Herstellung bis auf einige Ausnahmen auf natürliche Aminosäuren beschränkt und sehr aufwendig [61,62]. Kleinere Polypeptidsequenzen von bis zu 50 Aminosäuren lassen sich auch einfacher mit Hilfe der in den 1960 Jahren entwickelten Festphasensynthese von Merrifield realisieren [63]. Hierbei werden, ausgehend von einem festen Substrat, teils geschützte Aminosäuren durch wiederholende Kopplungs- und Entschützungs-schritte sukzessive aneinander gebunden. Nach gezielter Abspaltung vom Substrat können dadurch hochdefinierte Polypeptidstrukturen erhalten werden. Jedoch ist die Methode durch die große Anzahl von Einzelschritten aufwendig und in Bezug auf die mögliche Sequenzlänge sowie Ausbeute wegen der Unvollständigkeit von Entschützungs- und Kopplungsreaktionen stark limitiert [64].

Eine weitaus weniger aufwendige und billigere Möglichkeit als die zwei oben genannten Verfahren bietet die ringöffnende Polymerisation von N-Carboxy-Anhydriden (NCA). Diese Polymerisationsvariante wurde 1906 von Hermann Leuchs zufällig entdeckt [65] und in den folgenden Jahrzehnten exzessiv erforscht [66]. Mit ihr sind Polypeptide mit hohen Molekulargewichten unter Erhaltung ihrer stereochemischen Konfiguration synthetisierbar. Außerdem können auch N-Carboxy-Anhydride von N-substituierten Aminosäuren (NNCA) verwendet werden [67]. Zwar ist die Methode auf die Synthese einfacherer Homo- oder Blockcopolypeptide limitiert, die weder die spezifische Vielfalt von natürlichen Proteinen noch deren Monodispersität erreichen [68]. Trotzdem reichen solch reduzierte Architekturen in den meisten Fällen aus, um gewisse Eigenschaften von Biomaterialien zu imitieren und als biomimetische Polymere in der Forschung eingesetzt zu werden [6].

2.2.2. Ringöffnende NCA-Polymerisation

Für die ringöffnende NCA-Polymerisation werden N-Carboxy-Anhydride („Leuchs Anhydride“) als Monomere verwendet. Diese sind hochreaktiv und sollten deshalb bei tiefen Temperaturen gelagert und schnellstmöglich verbraucht werden [69]. Der 5-gliedrige Ring enthält zwei elektrophile Zentren an Position 2 und 5 sowie eine deprotonierbare Gruppe an Position 3, die alle mit entsprechenden Nucleophilen unter Öffnung des Rings angegriffen werden können (Abb. 5b). NCA-Monomere werden heutzutage weitestgehend über die Fuchs-Farthing-Methode hergestellt. Dabei wird die gewünschte Aminosäure direkt mit Phosgen oder einem Phosgenderivat, wie Di- [70] oder Triphosgen [71], zum ringförmigen Anhydrid umgesetzt (Abb. 5a). Bei der Reaktion entstehen viele Nebenprodukte wie Chlorwasserstoff, Chloroformyl-Aminosäurechloride oder Isocyanato-Säurechloride, die eine spätere Polymerisation stören und deswegen vollständig vom NCA abgetrennt werden müssen. Dies stellt mitunter eine der größten Herausforderungen bei der Synthese dar, da die Monomere auf Grund ihrer hohen Reaktivität bis auf wenige Ausnahmen nur über Umkristallisation aufgereinigt werden können [69].

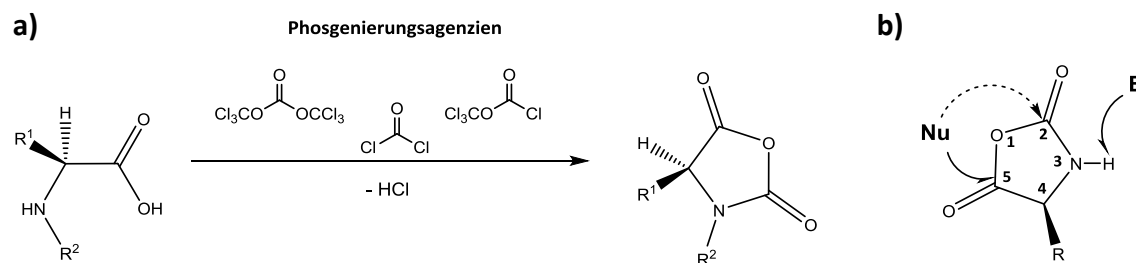


Abb. 5: a) Herstellung von NCA mit verschiedenen Phosgenierungsmitteln b) Angriffsmöglichkeiten der Nucleophilen (Nu) und Basen (B) am NCA-Monomer

Für die NCA-Polymerisation existieren zwei anerkannte Hauptmechanismen, die abhängig vom eingesetzten Initiator wirksam werden [69,72]. Der „normale Amin“-Mechanismus (NAM) wird durch nucleophile Initiatoren mit geringer Basizität (z.B. primäre Amine) aktiviert, die den Ring bevorzugt an Position 5 angreifen, da hier im Vergleich zu Position 2 keine elektronenschiebende Mesomerie mit dem benachbarten Stickstoff besteht [73]. Dadurch wird die Ringstruktur geöffnet und ein Carbamidsäuren-

Intermediat entsteht, welches sich nach einer anschließenden Decarboxylierung zu einem Dipeptid mit freier Aminendgruppe umwandelt. Dieses kann dann im nächsten Schritt ein weiteres NCA-Monomer addieren, sodass in einem Kettenwachstumsprozess ein Polypeptid entsteht, das den Initiator trägt und dessen Molekulargewicht von der eingesetzten Initiatorkonzentration abhängt [68] (Abb. 6). Allerdings sind hochmolekulare Polypeptide wegen diverser konkurrierender Kettenabbruch- oder Kettentransferreaktionen nur begrenzt synthetisierbar [74].

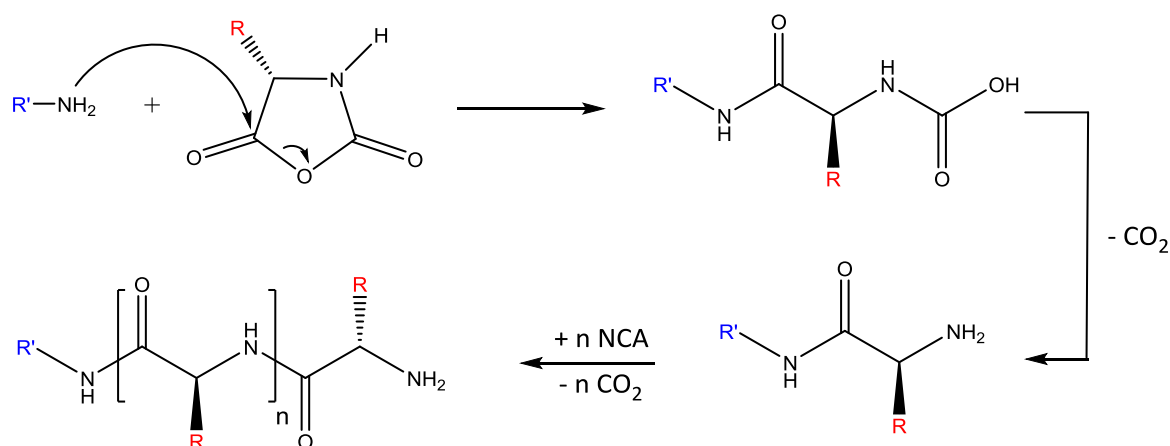


Abb. 6: Vorgeschlagener Mechanismus für die NCA-Polymerisation initiiert durch nukleophile Amine

Initiatoren mit einer geringeren Nukleophilie (tertiäre Amine) oder höheren Basizität (z.B. Hydroxide, Alkoholate) tendieren hingegen zur Deprotonierung des Stickstoffs an Position 3 anstelle eines nukleophilen Angriffs. Infolgedessen entsteht ein NCA-Anion, das selbst wiederum als Nukleophil agieren kann und unter Ringöffnung ein weiteres NCA-Molekül angreift, weswegen diese Reaktionsvariante als „aktivierter Monomer“-Mechanismus (AMM) bezeichnet wird (Abb. 7). Die deprotonierte Aminendgruppe des entstandenen Dimers ist basisch genug, um ein weiteres NCA-Molekül zu deprotonieren. Dadurch entstehen mit der Zeit mehrere unterschiedlich lange Oligopeptide mit reaktiven NCA-Endgruppen, die im Laufe der Reaktion zu hochmolekularen Ketten kondensieren können [68]. Allerdings besitzen solche Kondensationspolymerisationen entscheidende Nachteile: Sie können weder kontrolliert werden, noch kann der Initiator im Polypeptid als Endgruppe inkorporiert werden. Außerdem weisen die erhaltenen Polymere sehr breite Verteilungen auf, weswegen dieser Mechanismus für die Synthese definierter Strukturen ungeeignet ist.

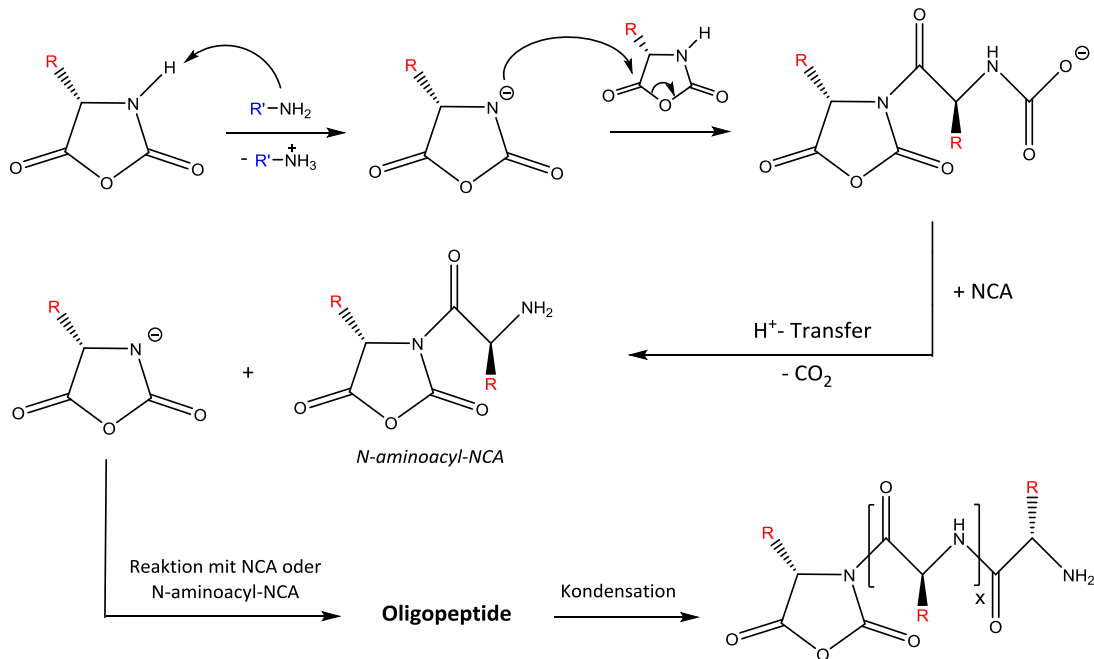


Abb. 7: Vorgeschlagener Mechanismus für die NCA-Polymerisation initiiert durch aktivierte Monomere

Da alle nukleophilen Moleküle auch gleichzeitig eine gewisse Basenstärke besitzen, stehen NAM und AMM immer in Konkurrenz zueinander und stellen jeweils eine Nebenreaktion des anderen dar. So kann das System während der Polymerisation häufig zwischen beiden Mechanismen hin und her wechseln. Für die Synthese von definierten Strukturen wird daher nach Wegen gesucht, den eher unerwünschten AM-Mechanismus zu unterdrücken (siehe Kapitel 2.2.3).

2.2.3. Kontrollierte NCA-Polymerisationen

Wie schon in Kapitel 2.2.2 erwähnt, führt nur der „normale Amin“-Mechanismus zu definierten und kontrollierbaren Polypeptidstrukturen. Zusätzlich wird die Kontrolle der Polymerisation durch die hohe Empfindlichkeit der NCA-Monomere erschwert. So können schon geringe Mengen an basischen oder nukleophilen Verunreinigungen selbst als Initiatoren fungieren oder die laufende Polymerisation abbrechen (Abb. 8). Als störend gelten z.B. HCl [69], Feuchtigkeit oder Dimethylamin, welches aus dem photochemischen und thermischen Zerfall des für die Reaktion verwendeten Lösungsmittels DMF entstehen kann [75]. Desweiteren kann auch die Bildung von β -Faltblatt-Strukturen die Löslichkeit und Reaktivität der wachsenden Polypeptidketten herabsetzen und somit zu weiteren Problemen führen [66,76].

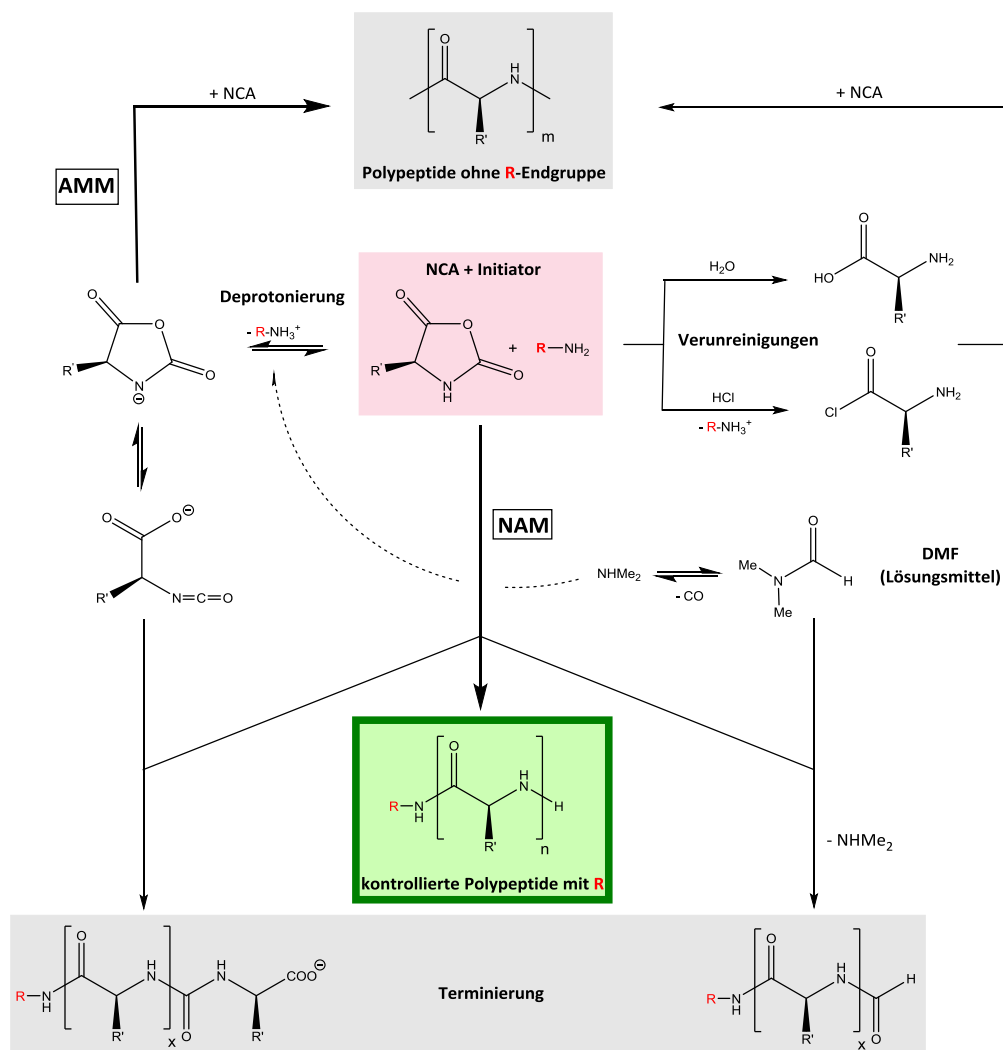


Abb. 8: Vereinfachte Darstellung vieler störender Einflüsse in der NCA-Polymerisation mit DMF als Lösungsmittel. Die gewünschten, definierten Polypeptide sind mit einem grünen Rahmen kenntlich gemacht. undefinierte Polypeptide oder Terminierungsreaktionen sind in grau unterlegt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die ringöffnende NCA-Polymerisation auf Grund der vielen möglichen Nebenreaktionen und der hohen Sensibilität schwer zu kontrollieren ist, auch wenn die Voraussetzungen für eine „pseudo-lebende“ Polymerisation durch den NA-Mechanismus gegeben sind. So verwundert es nicht, dass erst gut 90 Jahre nach ihrer Entdeckung und einem verbesserten Verständnis für den Mechanismus die ersten erfolgreichen Strategien zur Kontrolle der Polymerisation entwickelt werden konnten. Dabei lassen sich zwei verschiedene Herangehensweisen differenzieren: Die Erste versucht durch Optimierung der Reaktionsbedingungen, wie z.B. durch Absenken der Reaktionstemperatur auf 0°C [77,78], intensive Monomer- aufreinigung oder Hochvakuumtechniken [74,79], unerwünschte Nebenreaktionen zu

minimieren. Die Zweite greift hingegen durch Zugabe von Katalysatoren (Übergangsmetall-Katalyse) oder durch spezielle Modifizierung des Amininitiators (Protonierung, N-Trimethylsilylierung) direkt in den mechanistischen Ablauf der Polymerisation ein, um den AM-Mechanismus zu unterdrücken. Dies soll in den folgenden Unterkapiteln anhand der drei bekanntesten Beispiele näher erläutert werden.

a) Übergangsmetall-Katalyse

Mit der Verwendung von speziellen Nickel-, Cobalt- oder Eisen-Komplexen gelang es Deming et al. 1997 erstmals Nebenreaktionen vollständig zu eliminieren und die NCA-Addition während der Polymerisation zu steuern [80,81]. Hierfür wird zuerst das NCA über oxidative Addition an das Übergangsmetall gebunden (Abb. 9). Der entstandene metall-azyklische Komplex baut danach unter Abspaltung von CO_2 nacheinander ein zweites und drittes NCA-Molekül in seine Ringstruktur ein, sodass nach Protonmigration ein sechsgliedriger Amido-Alkyl-Metallacyclus mit gebundener Peptidkette entsteht.

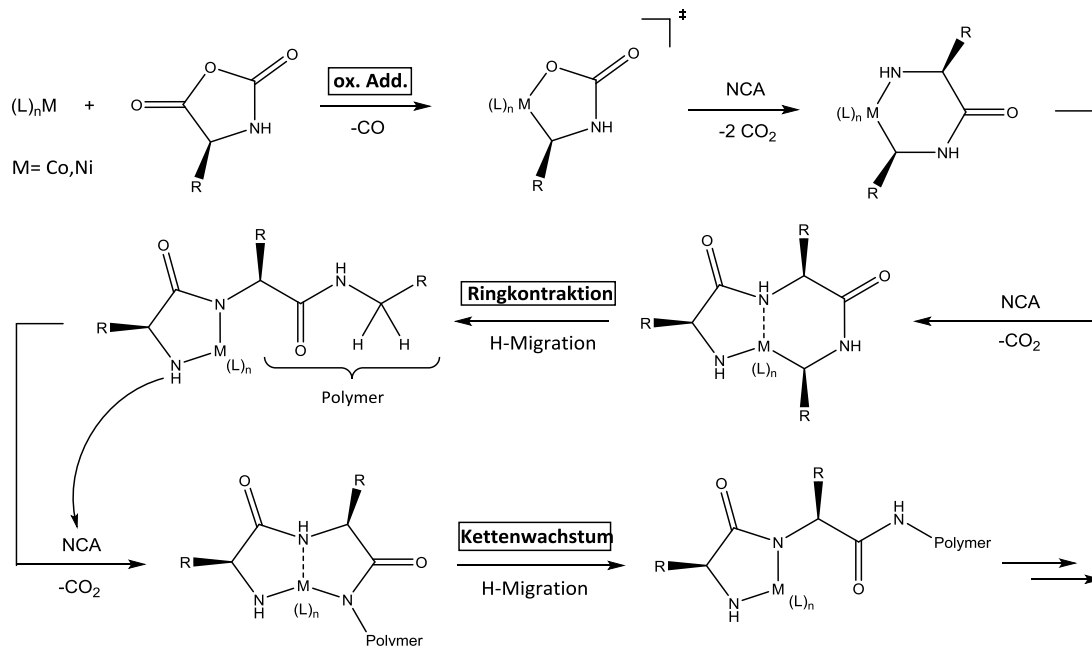


Abb. 9: Vermuteter Mechanismus für die Übergangsmetall-katalysierte NCA-Polymerisation mit den drei Schritten: 1. oxidative Addition, 2. Ringkontraktion und 3. Kettenwachstum

Durch weitere Addition von NCA-Monomeren sind somit monodisperse, hochmolekulare Homo- und Blockcopolypeptide zugänglich [82,83]. Jedoch eignet sich die

Übergangsmetall-Katalyse nicht für N-substituierte Aminosäuren, da diesen das für die oxidative Addition benötigte Proton fehlt [84]. Außerdem ist die Bildung von komplexeren Strukturen durch die Inkorporation von Endgruppen oder Polymerblöcken synthetisch sehr anspruchsvoll [85,86] und auch die vollständige Entfernung des Katalysators am Ende der Polymerisation kann Probleme bereiten.

b) Verwendung von Initiatorsalzen (Schlaad-Mechanismus)

Schlaad et al. entwickelte 2003 basierend auf den Arbeiten von Knobler [87,88] mit der Initiatorsalz-Initiierung einen weiteren Ansatz für kontrollierte NCA-Polymerisationen [89]. Hierbei wird ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zwischen einem Aminsalz, das selbst kaum Basizität und Nucleophilie besitzt, und seiner reaktiven Aminform ausgenutzt (Abb. 10). Dabei liegt das Gleichgewicht verstärkt auf Seiten der „schlafenden“ Spezies [68] und verringert somit die Lebenszeit des freien Amins und damit auch die Chance auf Nebenreaktionen durch die Bildung von Isocyanaten oder den AM-Mechanismus.

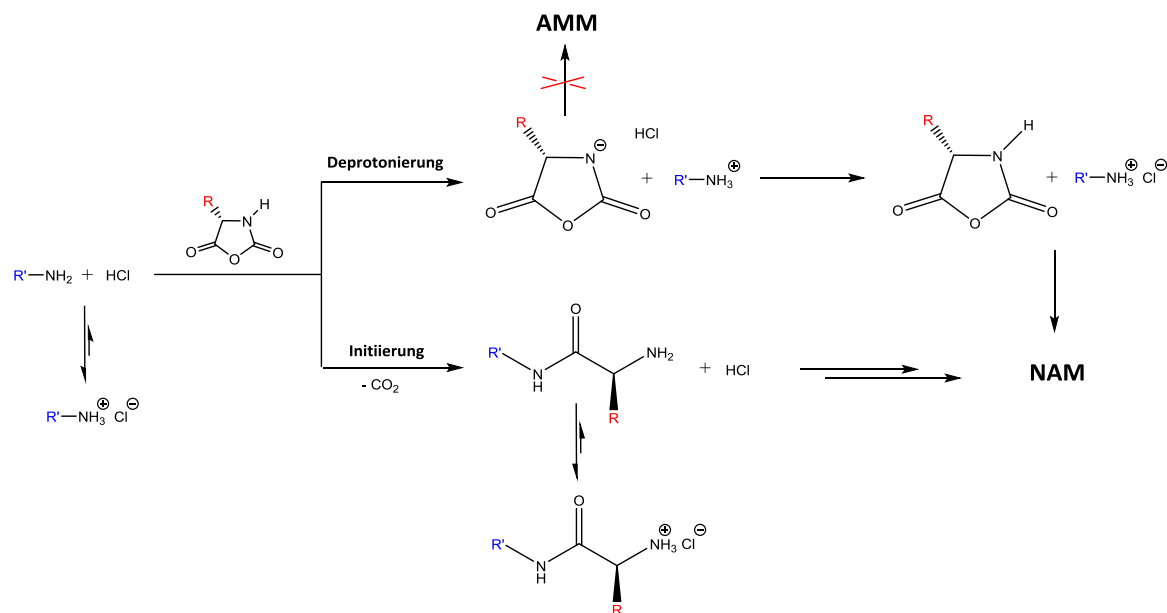


Abb. 10: Schlaad-Mechanismus am Beispiel eines primären Aminchlorids. Die Deprotonierung des NCA-Monomers und der damit einhergehende AM-Mechanismus werden durch HCl inhibiert

Das Prinzip ist dabei vergleichbar mit dem „Persistent Radical Effect“, der in fast allen kontrollierten, radikalischen Polymerisationen zum Einsatz kommt [90]. Allerdings ist die Reaktionsgeschwindigkeit selbst bei Temperaturen von 40-80°C noch relativ langsam [87], was dann zu Problemen führt, wenn die Gegenionen (z.B. Chlorid) oder vorhandene Verunreinigungen eine Polymerisation initiieren können.

c) N-TMS-vermittelte NCA-Polymerisation

Im Jahr 2007 wurden Hexamethyldisilazane (HDMS) und später auch andere N-Trimethylsilylamine (N-TMS) als geeignete Initiatoren für die Herstellung von definierter und engverteilter Polypeptide entdeckt [91,92]. Dabei ähnelt der mechanistische Ablauf in gewisser Weise einer Gruppen-Transfer-Polymerisation (GTP) von Acrylmonomeren [93] und ist nicht mit der regulären NCA-Polymerisation einfacher sekundärer Amine zu vergleichen [94]. Die TMS-Gruppe des Amins wird zuerst auf das NCA transferiert, welches gleichzeitig am Stickstoff deprotoniert wird (Abb. 11). Das zyklische Intermediat wird dann sofort von dem gebildeten Amin unter der Öffnung des Rings an Position 5 nukleophil angegriffen. Nun kann das entstandene TMS-Carbamat durch TMS-Transfer weitere NCA-Monomere einbinden und eine Polypeptidkette aufbauen. Jedoch können bei dieser Reaktion keine N-substituierten NCA verwendet werden, da ihnen das für den Mechanismus benötigte Proton am Stickstoff fehlt.

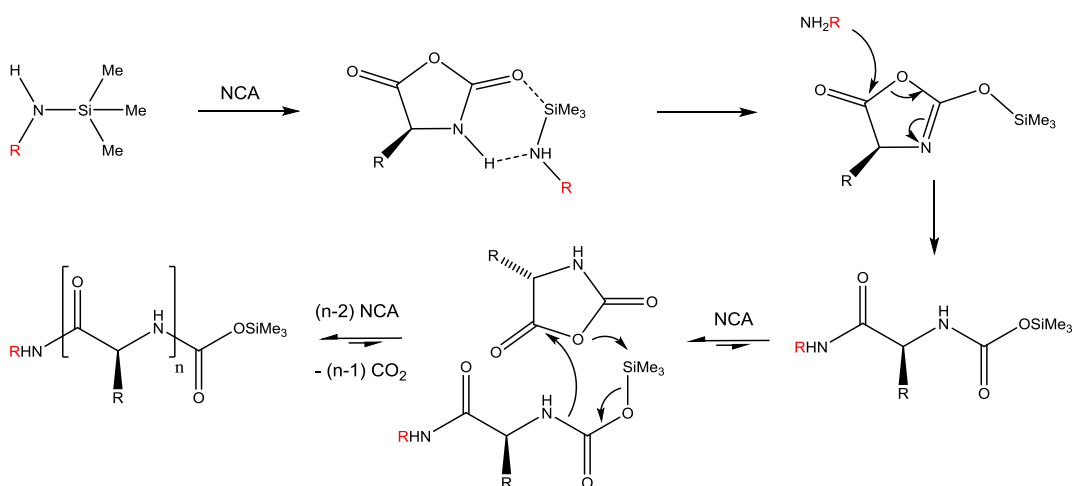


Abb. 11: Vermuteter Mechanismus der N-TMS-vermittelten NCA-Polymerisation

2.2.4. Zylindrische Polypeptidbürsten

Obwohl gerade Polypeptide wegen ihrer hierarchischen Strukturbildung und der Einsatzmöglichkeit als bioverträgliche Systeme in der Nanomedizin sehr interessant sind, gibt es nur relativ wenige Arbeiten zur Synthese von zylindrischen Bürsten mit Polypeptidseitenketten. Dies ist höchstwahrscheinlich der Komplexität der NCA-Polymerisation gepaart mit der anspruchsvollen Synthese zylindrischer Strukturen mit hohen Pfropfungsgraden geschuldet. Die meisten Forschungsarbeiten verwenden vorwiegend „grafting from“- und „grafting through“-Techniken. Die wichtigsten gewonnenen Ergebnisse sollen in den folgenden zwei Unterkapiteln kurz zusammengefasst werden.

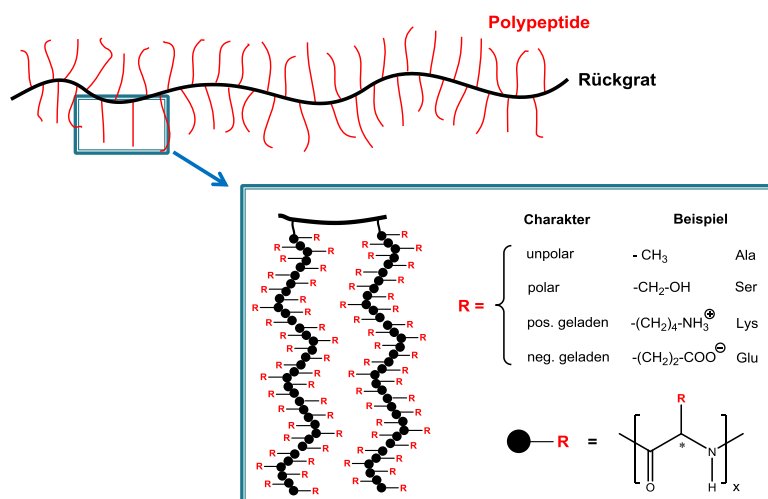


Abb. 12: Allgemeine Darstellung einer zylindrischen Bürste mit Polypeptidseitenketten

a) Zylindrische Polypeptidbürsten über „grafting from“

Die Anfänge der Polypeptidbürstensynthese gehen auf M. Sela zurück, der 1955 mittels „grafting-from“ die ersten „Polypeptid Multiketten“ herstellte [95]. Ausgehend von einem linearen PLL-Makroinitiator versuchte er mit Hilfe der NCA-Polymerisation neben Alanin- und Sarkosin- auch geschützte Lysin-, Glutaminsäure- sowie Ornithin-Seitenketten auf das PLL-Rückgrat zu pflanzen. Da sich PLL aber nur sehr schlecht in organischen Lösungsmitteln löst, benutzte er ein Dioxan/Wasser-Gemisch, das jedoch selbst NCA initiierte und neben der Bildung von linearen Verunreinigungen auch die Seitenkettenlänge stark limitierte. Desweiteren war der benutzte PLL-Makroinitiator mit

einem Polymerisationsgrad von 36 sehr klein, sodass hier keine zylindrischen, sondern eher globuläre Bürstenstrukturen zu erwarten waren.

In der Folgezeit gab es weitere Versuche, mit anderen Makroinitiatoren über die NCA-Polymerisation in reinen, organischen Lösungsmitteln zylindrische Bürsten zu erzeugen [96-98]. Allerdings gelang erst [REDACTED] aus der Gruppe von [REDACTED] im Jahr 2004 der erste eindeutige Beweis, dass solche Strukturen mit dieser Technik überhaupt möglich sind [15]. Hierfür wurde ein Makroinitiator aus N-(3-Aminopropyl)methacrylamid-Einheiten mit Lys(Z)-NCA in DMF umgesetzt. Die erhaltenen Bürsten waren zwar nach der Aufarbeitung nur schwer wieder in Lösung zu bringen und zeigten ein starkes Aggregationsverhalten in allen geläufigen Lösungsmitteln, was ihre nähere Untersuchung mittels Lichtstreuung oder chromatographische Analysemethoden fast unmöglich machte. Jedoch konnten zylindrische Bürstenkonformationen mit Konturlänge von ca. 300 nm mit Hilfe von AFM sichtbar gemacht werden. Mittels SDS-Komplexierung konnten in den Seitenketten sogar Faltblattstrukturen induziert werden, was zu einer helikalen Konformation des Rückgrats führte [99,100]. [REDACTED] gelang es in der nachfolgenden Arbeit zwei gut lösliche zylindrische PLL-Bürsten, die über die Initiatorsalz-initiierte NCA-Polymerisation eines Poly-N-(6-aminohexyl)methacrylamid Makroinitiators synthetisiert wurden, tiefergehend zu untersuchen. Dabei konnte er mittels CD Spektroskopie zeigen, dass die PLL-Seitenketten durch Natriumperchlorat- oder Methanolzugabe von einer ungeordneten in eine helikale Struktur übergehen konnten, ohne die Hauptkettenkonformation dabei zu beeinflussen [16,17].

2009 wurden kontrollierte Polypeptidbürsten durch eine Kombination aus ROMP von Norbornen-Derivaten und TMS-vermittelter NCA-Polymerisation aus vorwiegend Glutaminsäure-NCA gewonnen [101]. Im Jahre 2012 veröffentlichte Deming zudem die ersten Polypeptidbürsten, die über eine Tandem-metallkatalysierte NCA-Polymerisation hergestellt werden konnten. Dafür wurde in einer „One-Pot“ Reaktion zuerst ein mit N ϵ -(alloc-L-methionyl) geschütztes Lysin-NCA zum Rückgrat polymerisiert. Die Schutzgruppe am ϵ -Ende ist dabei gegen den ersten verwendeten Metallkatalysator noch inert. Mit Hilfe eines weiteren Metallkatalysators konnte diese im nächsten Schritt demaskiert und

aktiviert werden, sodass nach Zugabe von NCA definierte Glutaminsäure-Seitenketten angebracht werden konnten [86]. Bei beiden steht jedoch der Beweis aus, ob es sich wirklich um zylindrische Strukturen handelt.

b) Zylindrische Polypeptidbürsten über „grafting through“

Auch durch „Grafting through“-Techniken sind in der Vergangenheit Polypeptidbürsten realisiert worden. Häufig werden dabei die zuvor hergestellte Oligopeptidsequenzen mit einer Vinylgruppe versehen, um diese anschließend radikalisch polymerisieren zu können. Während Bin Zhang mit seinen Z-geschützten PLL-Makromonomern nur sehr geringe Polymerisationsgrade erzielen konnte [15], war die Polymerisation eines aus 16 L-Prolineinheiten bestehenden Makromonomers von Afang Zhang wesentlich erfolgreicher [102]. Ebenfalls gelang Desiree Weller und Francisco Fernandez-Trillo die Polymerisation von zylindrischen Bürsten mit langen elastinähnlichen Polypeptidseitenketten [103,104]. Eine etwas andere Art der Polymerisation benutzte Nolte et. al., der Dipeptide mit Isocyanid-Endgruppen mit Hilfe eines Nickel(II)-Katalysators zu länglichen, steifen Bürstenpolymeren verknüpfte [105].

2.3. Polypeptide

α -Polypeptide bestehen aus N-substituierten Glycinbausteinen und gehören wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit neben Poly(2-Oxazolin) und N-substituierten Polyacrylamiden zu der Gruppe der „Pseudopolypeptide“ (Abb. 13). Während sie lange Zeit nur als Modellsubstanzen zum besseren Verständnis für den Mechanismus der NCA-Polymerisation dienten [69], rücken sie heutzutage als supramolekulare Bestandteile von biomimetischen Materialien immer mehr in den Fokus von biotechnologischen Anwendungen [106].

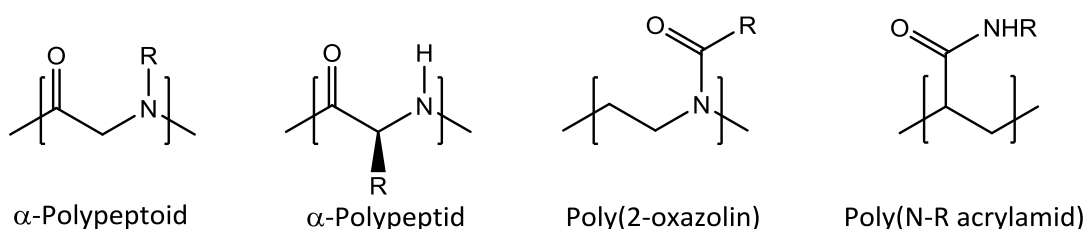


Abb. 13: Chemische Struktur von pseudopeptidischen Polymeren

2.3.1. Eigenschaften von α -Polypeptoiden

Die physikalischen Eigenschaften der Polypeptide sind stark von dem am Stickstoff gebundenen Substituenten abhängig. Während Polypeptide mit längeren, aliphatischen oder aromatischen Substituenten in polaren Medien unlöslich sind, lösen sich Polypeptide mit kurzkettigen Methyl- oder Ethylgruppen zum Beispiel sehr gut in Wasser. Die hohe Wasserlöslichkeit im Vergleich zu dem chemisch verwandten Polyglycin ist auf die geringen intra- und intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Peptideinheiten zurückzuführen: Auf Grund des fehlenden Stickstoffprotons können keine intra- bzw. intermolekularen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden und die Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffakzeptoren des Polypeptoids und dem polaren Lösungsmittel dominieren [67]. Obwohl die Struktur von Poly(N-methylglycin) (auch Polysarkosin genannt) und Poly(N-ethylglycin) starke Ähnlichkeiten zu Poly(2-oxazolin) und PNIPAM aufweisen, zeigen sie bei Temperatur von unter 100°C kein thermoresponsives Verhalten in Wasser. Erst bei Polypeptoiden mit C3-Substituenten, wie beispielsweise Propyl-, Isopropyl- und Allylgruppen [107] oder bei Copolymeren mit verschiedenen Verhältnissen von Ethyl- und Butyl-Substituenten [108] kann ein solches Verhalten beobachtet werden. Da Polypeptide in ihrem Rückgrat kein stereochemisches Zentrum aufweisen, ist auch ihre Konformation in Lösung stark von den sterischen und elektrischen Eigenschaften des Substituenten abhängig. Bei achiralen und kleinen Gruppen liegen sie meist in einer Knäulkonformation vor [9]. Tragen die Polypeptide hingegen sterisch anspruchsvolle oder optisch aktive Substituenten, können sie auch definierte Sekundärstrukturen, wie z.B. Helices ausbilden [109-111].

2.3.2. Herstellung von α -Polypeptoiden

a) Ringöffnende NNCA-Polymerisation

α -Polypeptide mit kurzen N-substituierten Gruppen (Me, Et, Pr, Bu, iBu) lassen sich vor allem leicht über die ringöffnende Polymerisation von N-substituierten NCA (NNCA) mit primären Aminen synthetisieren [67]. Da die N-Carboxy-Anhydride in dieser Form nicht am Stickstoff deprotoniert werden können, folgen sie grundsätzlich nur dem NA-Mechanismus (siehe Kapitel 2.2.2). Unter geeigneten Bedingungen erhält man somit

eine „pseudo-lebende“-Polymerisation, die Homo- und Blockcopolymeren mit kontrolliertem Molekulargewicht und Poisson-Verteilung möglich macht [67].

Weil bei der Verwendung von NNCA immer ein sekundäres Amin als propagierende Endgruppe entsteht, hat der Substituent am Stickstoff einen entscheidenden Einfluss auf die Polymerisation. Ist dieser zu sperrig, wird die Polymerisationsgeschwindigkeit stark herabgesetzt und Nebenreaktionen dominieren, sodass nur Oligomere entstehen können [112,113]. In diesem Fall ist die NHC-vermittelte Polymerisation zu bevorzugen [106,114]. Hierbei wird anstelle eines primärenamins ein stabilisiertes N-heterozyklisches Carben (NHC) als Initiator verwendet, welcher durch NNCA-Addition ein wachsendes Polypeptoid mit zwitterionischem Charakter erzeugt (Abb. 14). Die unterschiedlich geladenen Enden lagern sich in unpolaren Lösungsmitteln via attraktiver Coulomb-Wechselwirkungen zu einer ringähnlichen Struktur aneinander. Dadurch werden von dem Carbamatende ausgehende Nebenreaktionen verhindert und ein „pseudo lebender“-Charakter erhalten [106]. Benutzt man dagegen Lösungsmittel mit hoher Dielektrizitätskonstante wie DMF oder DMSO, liegen beide Enden frei dissoziiert vor, sodass wegen vermehrter Abbruchreaktionen nur niedermolekulare Polymere erhalten werden können. Durch elektrophile Terminierungsagenzien (beispielsweise Acetylchlorid, Methyltriflat) können mit der NHC-vermittelten Polymerisation lineare Polypeptide hergestellt werden. Verwendet man stattdessen $\text{NaN}(\text{TMS})_2$ sind auch ringförmige Architekturen möglich [115].

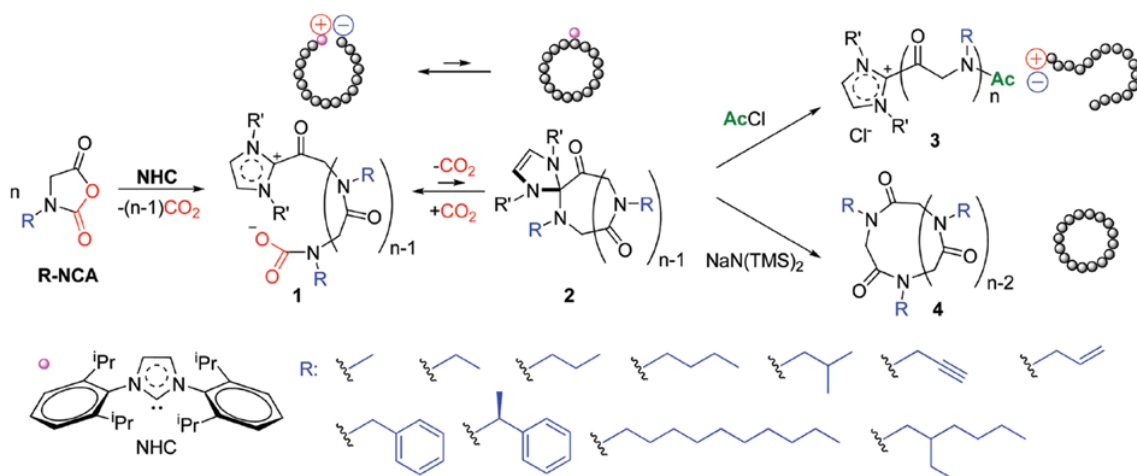


Abb. 14: Vermuteter Mechanismus der NHC-vermittelten NNCA-Polymerisation (übernommen aus [106])

b) Metall-vermittelte Polymerisation

Polypeptide können auch ausgehend von Iminen und Kohlenmonoxid mit Hilfe von kobaltbasierenden Katalysatoren hergestellt werden (Abb. 15). Die Polymerisation besitzt einen lebenden Charakter und toleriert auch sperrige Substituenten [106]. Blockcopolymerer konnten aber bislang noch nicht realisiert werden, da das aktive Kettenende nach vollständigem Monomerverbrauch zerfällt [116].

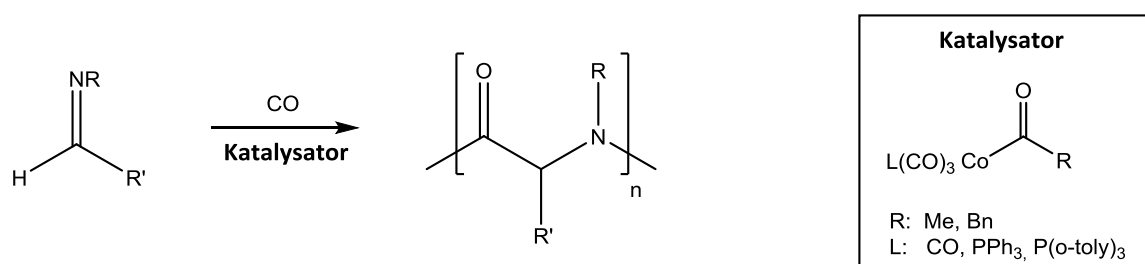


Abb. 15: Reaktionsschema der Metall-vermittelten Polymerisation für α -Polypeptide

c) Submonomer-Synthese

Werden hochdefinierte Polypeptide mit Sequenzkontrolle benötigt, kann auf die Submonomer-Technik („Solid-phase submonomer synthesis“) zurückgegriffen werden, die ähnlich wie die Festkörpersynthese von Polypeptiden funktioniert [117]. In abwechselnden Schritten werden Bromessigsäure und primäre Amine an einen festen Träger gekoppelt und anschließend das fertige Polypeptoid abgetrennt [118] (Abb. 16). Im Gegensatz zur Merrifield-Synthese müssen hierbei aber keine Entschützungsreaktionen vorgenommen werden. Trotzdem ist die Methode aufwendig und auf Polymerisationsgrade < 50 limitiert [9].

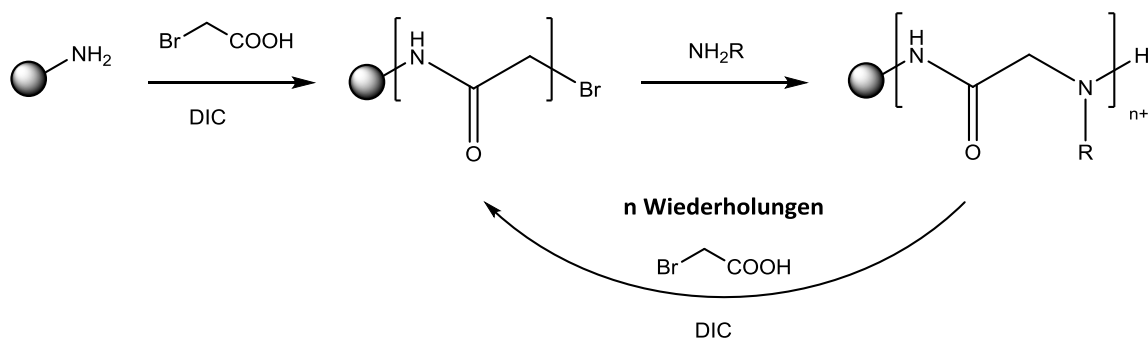


Abb. 16: Schematische Darstellung der Submonomer-Synthese für α -Polypeptide an einem festen Träger [modifiziert übernommen aus [9]]

2.3.3. Polysarkosin

Polysarkosin (PSar) ist das einfachste α -Polypeptoid mit einer am Stickstoff gebundenen Methylgruppe und liegt in Wasser in einer „Random Coil“-Konformation vor. Das Rückgrat ist im Gegensatz zu dem eines Polypeptids mit einer statistischen Segmentlänge (Kuhn Länge) von 4,8 Å [119] sehr flexibel und kann leicht zwischen cis- und trans-Konformationen wechseln [120]. Wie schon vorher erwähnt, ist es zudem trotz elektrischer Neutralität auch sehr gut in Wasser löslich.

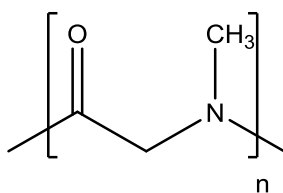


Abb. 17: Chemische Struktur von Polysarkosin (PSar)

Auf Grund seiner Eigenschaften wird Polysarkosin in den letzten Jahren vermehrt für biotechnologische Anwendungen als Bestandteil von polymerbasierten „Drug Delivery“-Systemen [121-124] oder Antifoulingbeschichtungen [125] verwendet und gilt mittlerweile als potentielle Alternative für Polyethylenglycol [7]. Die ersten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Polysarkosin nicht toxisch wirkt [108] und die ausgeprägte Fähigkeit besitzt, Wechselwirkungen jeglicher Art mit Proteinen und anderen Blutbestandteilen im Körper zu unterdrücken („Stealth“-Effekt) [8]. Die ausgeprägte Hydrophilie des Polysarkosins führt zu einer eng gebundenen Hydrathülle, die eine Proteinadsorption an der Oberfläche erschwert [126,127]. Zum anderen erzeugt die hochflexible Polymerkette eine „Konformationswolke“ [128], die auf sterischem Wege die Annäherung von Proteinen unterbindet [8,129,130]. Da die meisten Proteine positiv oder negativ geladen sind, verhindert die elektrische Neutralität des Sarkosins außerdem ladungsinduzierte Wechselwirkungen und verhindert damit eine Aggregation [131]. Aus den geringen Wechselwirkungen des Polymers mit dem Körper resultiert gleichzeitig eine stark herabgesetzte Immunogenität und Antigenität des Polysarkosins [132-134], falls es nicht zu einer Epitop-Wirkung kommt. Es ist daher für das Immunsystem nahezu „unsichtbar“ und entgeht weitestgehend der Opsonisierung und der damit verbundenen

Beseitigung durch das retikuloendotheliale System (RES). Dadurch verlängert sich die Zirkulationszeit polysarkosinhaltiger Therapeutika im Blut um ein Vielfaches [121,122] und erhöht die Chance auf eine effektive Behandlung.

Gleichzeitig besitzt Polysarkosin auf Grund seiner tertiären Amidbindungen eine erhöhte Resistenz gegenüber der enzymatischen Spaltung (Proteolyse) [135,136], sodass der Schutzeffekt so lange im Körper anhält, bis das System am Zielort angekommen ist. Die Frage nach der langfristigen Abbaubarkeit im Körper ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sicher geklärt. Allerdings gilt das Polysarkosinrückgrat als potentiell hydrolysiert [9,137] und die dabei freigesetzten Abbauprodukte wären für den Körper nicht schädlich, da Sarkosin selbst als natürliche Aminosäure im Körper vorkommt und im Metabolismus mit Hilfe von Sarkosin-Dehydrogenase weiter zu Glycin umgewandelt werden kann [138]. Außerdem deuten Experimente darauf hin, dass Polysarkosin im Zellmetabolismus mittels ROS („reactive oxygen species“) [139] auch oxidativ am Rückgrat gespalten werden könnte [140].

2.4. Polymere als Transportsysteme für Wirkstoffe

2.4.1. Therapeutische Wirkstoffe in der Chemo- und Genterapie

Für die Behandlung von erkranktem oder von Krebs befallenem Gewebe existieren mittlerweile spezielle Therapien, bei denen besondere Wirkstoffe zum Einsatz kommen. In der Chemotherapie werden mitunter Zytostatika (z.B. Interkalantien, Taxane, Antimetabolite) verwendet, die das Wachstum der Krebszellen hemmen oder zerstören sollen. In der Genterapie werden therapeutische Poly- und Oligonukleotide wie z.B. DNA oder siRNA („small interfering RNA“) in die befallenen Zellen transfektiert, um dort in die Proteinexpression einzugreifen und somit Erbkrankheiten oder Krebs zu bekämpfen. Während die DNA im Zellkern der befallenen Zellen direkt fehlende oder defekte Gene ersetzen soll [141], unterdrückt die siRNA gezielt die Translation pathogener Proteine im Cytosol (Gen-Knockdown) [1]. Dazu wird, wie in Abb. 18 gezeigt, die doppelsträngige siRNA zuerst von einem „RNA-induced silencing“-Komplex (RISC) inkorporiert und der „passenger“-Strang mittels eines Argonaut Proteins (AGO)

abgespalten. Der nun aktivierte Komplex bindet dann an die komplementäre Ziel-mRNA und zerstört diese mit seinem AGO-Protein, sodass sie nicht mehr abgelesen werden kann [142,143].

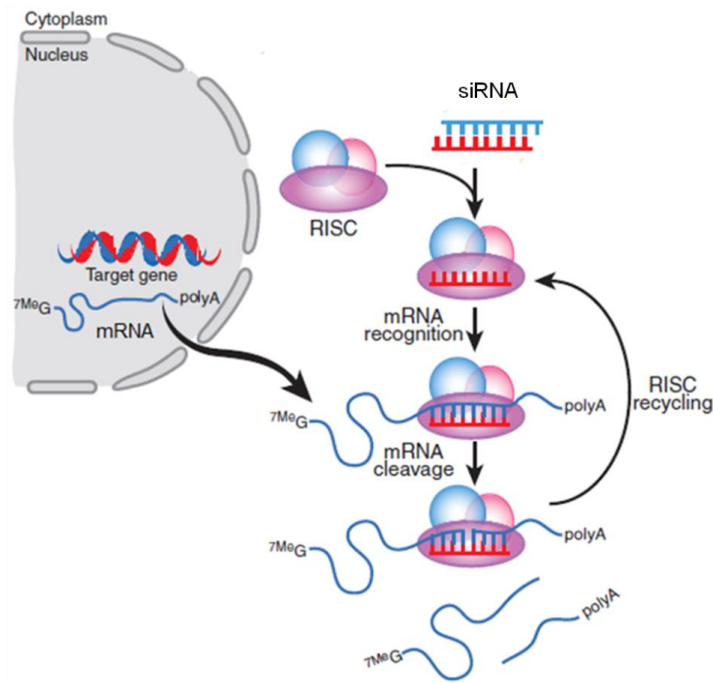


Abb. 18: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von siRNA bei einem Gen-Knockdown: siRNA wird von dem Proteinkomplex RISC aufgenommen und aktiviert. Komplementäre mRNA kann nun gebunden und mit Hilfe des AGO-Proteins zerschnitten werden, sodass keine Translation des codierten Proteins mehr erfolgen kann (modifiziert übernommen aus [1])

Die alleinige Verabreichung solcher Wirkstoffmoleküle hat jedoch auf Grund ihrer meist geringen Molmassen und hydrodynamischen Radien zwei große Nachteile: Sie werden sehr schnell renal ausgeschieden (glomeruläre Filtration) und verteilen sich unspezifisch auf den gesamten Körper [144]. Außerdem können sie im Blutkreislauf durch Enzyme (z.B. Nukleasen) und Teile des Immunsystems inaktiviert und abgebaut werden, bevor sie ihren eigentlichen Bestimmungsort erreichen [145]. In der Gentherapie stellt zusätzlich die negativ geladene Zellmembran für die gleichgeladenen Polynukleotide eine schwer überwindbare Barriere dar und erschwert wegen den repulsiven Wechselwirkungen den Eintritt ins Zellinnere. Insgesamt wird dadurch die Zirkulationszeit der Wirkstoffe und somit ihre Effizienz um ein Vielfaches verringert, sodass höhere Dosen nötig sind, von denen aber stärkere Nebenwirkungen und eine höhere Toxizität ausgehen.

Eine Möglichkeit, die effektive Konzentration von therapeutischen Molekülen in den pathogenen Zellen zu erhöhen, liegt in der Verwendung von Trägersystemen. Im Falle der Gentransfektion bieten sich z.B. hocheffiziente virale Vektoren an. Allerdings wird ihre klinische Anwendung durch das erhöhte Risiko einer Immunantwort [146] oder Mutagenese [147], die Kostenintensivität und die limitierte Ladungskapazität erschwert [148]. Polymerbasierte „Drug Delivery“-Systeme erhalten deshalb immer mehr Aufmerksamkeit [149]. Zwar besitzen sie im Vergleich zu viralen Vektoren eine geringere Effizienz, allerdings sind sie durch gezielte Anpassungen besser verträglich und verfügen über höhere Ladungskapazitäten [150,151]. Ihre Eigenschaften und Funktionsweisen sollen im nächsten Kapitel näher erläutert werden.

2.4.2. Polymere Wirkstoffträger

Das Konzept der Polymer-Wirkstoff-Konjugate wurde schon 1975 von Ringsdorf entwickelt [3]. Die Grundidee besteht darin, den Wirkstoff nicht alleine, sondern an ein wasserlösliches Polymer gekoppelt, zu verabreichen. Dieses dient als Trägermolekül, welches den Wirkstoff sicher und spezifisch zu den pathogenen Zellen bringen soll („Drug Delivery“). Mittlerweile haben sich mehrere verschiedene Arten von polymeren Therapeutika entwickelt, die man in vier Klassen einteilen kann (Abb. 19):

- a) **Protein-Polymer-Konjugate:** Anbindung eines therapeutischen Proteins an „Stealth“-Polymere über feste oder labile Bindungen
- b) **Polymer-Wirkstoff-Konjugate:** Polymerer Träger mit gebundenen Wirkstoffmolekülen, die am Zielort durch Spaltung der Bindung freigesetzt werden können
- c) **Polyplexe:** Multivalent geladene Polymere, die über elektrostatische Wechselwirkungen mit ionischen Wirkstoffmolekülen (z.B. Polynukleotiden) komplexiert sind und mit Hilfe zusätzlicher hydrophiler Gruppen das gebildete Kolloid in Lösung halten
- d) **Polymermizellen oder Polymersomen:** Selbstorganisierte, amphiphile Blockcopolymere, die im Inneren mit hydrophilem bzw. hydrophobem Cargo beladen werden können

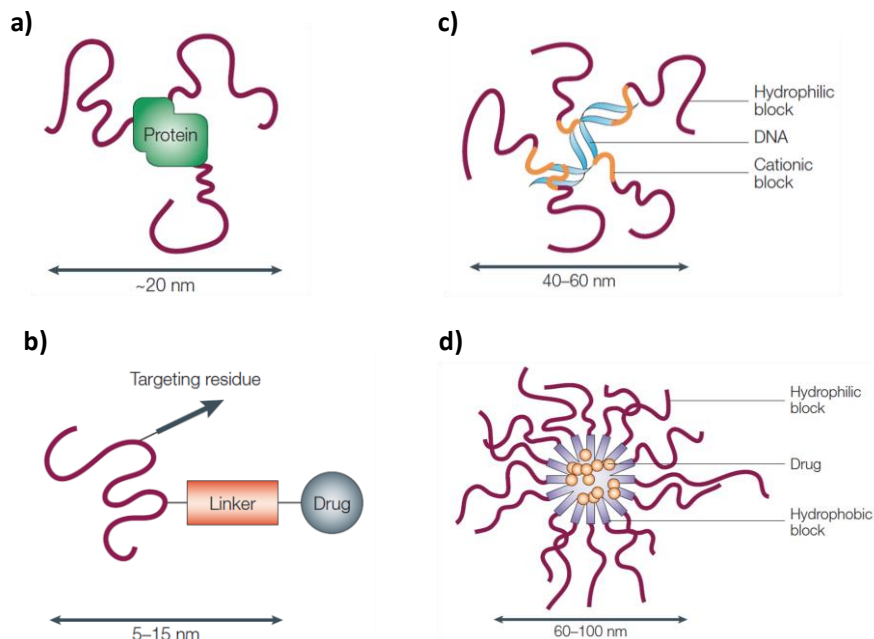


Abb. 19: Schematische Darstellung der vier Klassen von polymeren Therapeutika: **a)** Protein-Polymer-Konjugate, **b)** Polymer-Wirkstoff-Konjugate, **c)** Polyplexe und **d)** beladene Polymernizellen (modifiziert übernommen aus [4])

2.4.3. Eigenschaften von polymeren Trägersystemen

„Drug Delivery“-Systeme können von der Inkorporation der Polymerkomponente profitieren, die durch ihre Eigenschaften und Funktionen die Pharmakokinetik des Wirkstoffes verbessert:

a) Erhöhung der Zirkulationszeit

Durch die Anbindung eines Wirkstoffes an ein längeres Polymer wird gleichzeitig dessen Molmasse und hydrodynamischer Radius deutlich erhöht. Dadurch passt das Konjugat nicht mehr durch die Glomerulusmembran im Nierenkörperchen und entgeht somit der renalen Ausscheidung [152]. Der Wirkstoff verbleibt wesentlich länger im Blutkreislauf, was die Chancen für eine Zellaufnahme erhöht.

b) EPR-Effekt („enhanced permeability and retention“)

Wirkstoff-Polymer-Konjugate sind aufgrund ihrer Größe nicht fähig durch die Blutkapillarwände von gesundem Gewebe zu diffundieren (Porengröße 5-10nm) [153]. Da der Tumor wegen seines schnellen Wachstums dagegen eine stark fenestrierte und

poröse Endothelzellenschicht [154,155] und nur eine mangelhafte Lymphdrainage besitzt, können selbst große Partikel mit einem Durchmesser von 60-80 nm leicht mittels Diffusion in sein Gewebe eindringen, ohne vom lymphatischen System eliminiert zu werden [156] (Abb. 20). Infolge der langen Zirkulationszeit der Konjugate, auf Grund ihres hohen hydrodynamischen Radius, reichern sich immer mehr Wirkstoffmoleküle im malignen Gewebe an (EPR-Effekt) [157,158]. Dabei scheint diese Art des passiven Targeting nicht nur auf Tumorgewebe limitiert zu sein, sondern kann zu gewissen Teilen ebenfalls bei infiziertem oder entzündetem Gewebe angewendet werden [159].

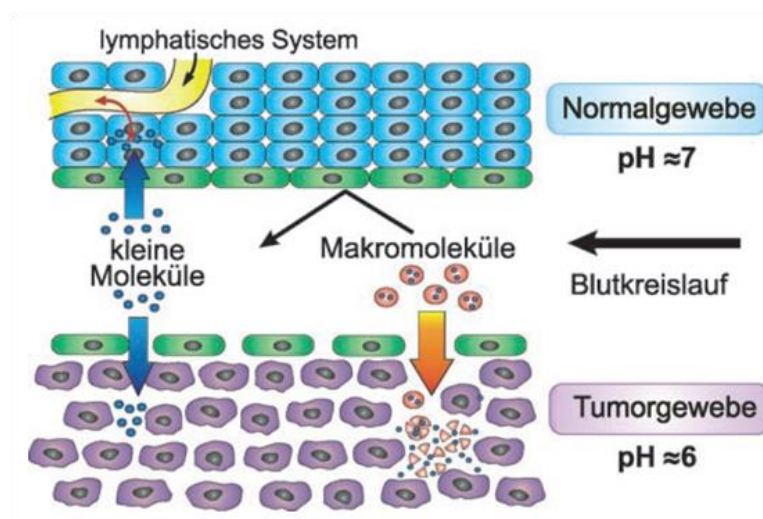


Abb. 20: Schematische Darstellung der anatomischen und physiologischen Charakteristika von Normal- und Tumorgewebe in Bezug auf ihre vaskuläre Permeabilität und die Retention von kleinen und großen Molekülen (EPR-Effekt) (übernommen aus [160])

c) Spezifisches Targeting

Abgesehen von dem passiven, größenabhängigen Targeting über den EPR-Effekt, können Polymere auch für zellspezifisches Targeting verwendet werden, wenn sie mit erkenntnispezifischen Gruppen wie z.B. Antikörpern oder bestimmten Oligosaccharid- oder Peptidsequenzen ausgestattet werden [5,161].

d) Maskierung, Schutzwirkung und Erhöhung der Löslichkeit

Polymere, die sich durch einen „Stealth“-Effekt auszeichnen (z.B. PEG, PSar, POx), können als Bestandteil eines „Drug Delivery“-Systems die transportierten Wirkstoffe vor Opsonisierung oder enzymatischem Abbau schützen und gegebenenfalls restliche

Ladungen maskieren [8]. Dadurch wird nicht nur die Lebenszeit, sondern auch die Löslichkeit der Wirkstoffe stark erhöht [162]. Im Falle von Polynukleotiden ist die Maskierung der Ladung ein wichtiger Schlüsselschritt für ihre Transfektion.

e) Gezielte Freisetzung („Release“)

Nanopartikel werden häufig über Endozytose in die Zelle aufgenommen [163]. Dabei werden die Partikel von einem doppelmembranigen Endosom ins Innere der Zelle transportiert. Das Vesikel durchläuft nun verschiedene Reifegrade, bei denen sich auch der pH-Wert im Endosominneren verändert. Mittels ATP-betriebenen Protonenpumpen wird er von pH= 7,4 auf pH= 5 abgesenkt, um das Cargo von den Membranrezeptoren zu lösen. In einem letzten Schritt fusioniert dann das sogenannte späte Endosom mit einem Lysosom, welches mit Hilfe von Enzymen die aufgenommenen Partikel zersetzen kann [164]. Dies kann auf der einen Seite für die Freisetzung von Wirkstoffen ausgenutzt werden, wenn diese mit pH-labilen oder enzymatisch spaltbaren Peptidketten an das Polymer gebunden sind [160]. Auf der anderen Seite führt dies zu Problemen, wenn das Polymer mit DNA oder RNA beladen ist, da sie durch Nukleasen gespalten werden, bevor sie ihren eigentlichen intrazellulären Zielort erreichen. Eine frühzeitige Flucht („Escape“) aus dem Endosom ist daher notwendig und kann durch zweierlei Strategien erfolgen: Zum einen können spezielle Proteine und Peptidsequenzen an das System angebracht werden, die durch Fusion oder Porenformation die endosomale Membran destabilisieren [165]. Zum anderen kann der so genannte „Proton sponge“-Effekt ausgenutzt werden, für den im pH-Bereich von 6-7 stark pufferende Bestandteile (z.B. Poly-L-Histidin, Polyethylenimin) benötigt werden (Abb. 21). Der Puffer wirkt bei der Reifung des Endosoms wie ein Protonenschwamm, der durch die Aufnahme der Protonen einen exzessiven Zufluss von Gegenionen und Wasser induziert und damit gleichzeitig so lange den Druck im Endosominneren erhöht, bis die Membran platzt und das Cargo freigesetzt wird („Release“) [166].

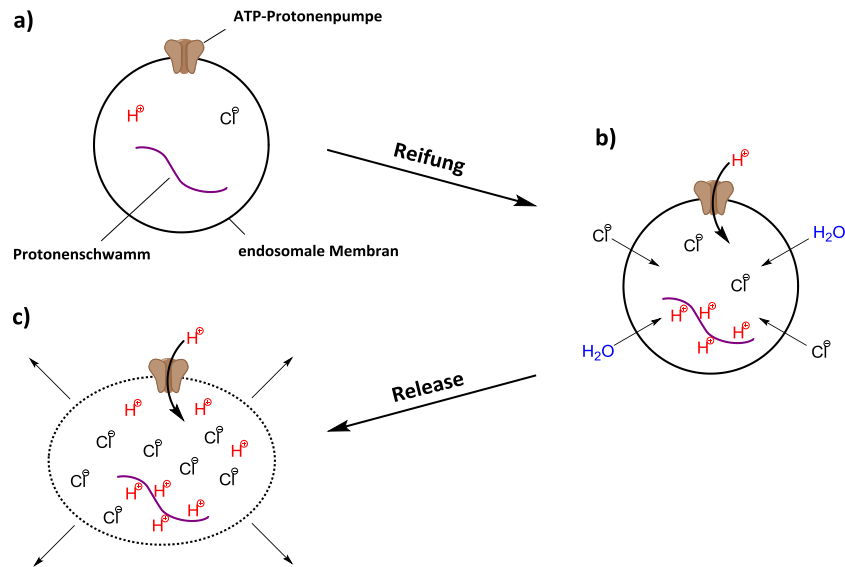


Abb. 21: Schematische Darstellung des „Protonen sponge“-Effekts: **a)** Polymer mit Pufferbestandteil wird in Zelle durch Endozytose aufgenommen und ist dadurch im Endosom gefangen. **b)** Während der Reifung des Endosoms werden mittels ATP-Protonenpumpen Protonen ins Innere verlagert. Der polymere Puffer wirkt der Ansäuerung entgegen. Immer mehr Protonen werden hineingepumpt, was wiederum den weiteren Zufluss an Gegenionen und Wasser bewirkt. **c)** Der osmotische Druck steigt so stark an, dass die endosomale Membran platzt und das Polymer ins Zytosol freigesetzt wird (modifiziert übernommen aus [167])

f) Anforderungen

Zusammenfassend werden für eine schonende und effiziente Therapie folgende Anforderungen an den Polymerträger gestellt [2,168]. So sollte dieser:

- eine ausreichend große Zahl an funktionellen Gruppen tragen, um eine hohe Beladung von Wirkstoffmolekülen zu ermöglichen (**Beladungsdichte**)
- den zielgerichteten Transport zu den kranken Zellen unterstützen und eine vollständige Freisetzung des beladenen Wirkstoffes in das Zellinnere gewährleisten (**Targeting + Release**)
- vom Immunsystem unerkant bleiben, nicht toxisch wirken und nicht mit Blutbestandteilen aggregieren (**Biokompatibilität**)
- einen hydrodynamischen Radius besitzen, der eine renale Ausscheidung verhindert, jedoch nicht zu groß ist, da sonst die Effizienz der Tumoraufnahme sinkt (**Größe**)

- während des Transports vor enzymatischem Abbau resistent sein, allerdings langfristig im Körper abgebaut werden können, um eine Akkumulation in den Zellen zu verhindern. Bei sehr stabilen Polymeren können dafür z.B. bioabbaubare Segmente eingefügt werden, die zumindest eine Spaltung in kleinere Fragmente erlauben [169-171] (**Stabilität + Bioabbaubarkeit**)

2.4.4. Polypeptide als „Drug Delivery“-Systeme

Polypeptide besitzen zahlreiche Eigenschaften, die sie als Nanocarrier interessant machen. Sie sind biokompatibel und bioabbaubar (sofern sie natürliche Aminosäuren enthalten) und fähig, hierarchische Strukturen auszubilden (siehe Kapitel 2.2). Außerdem gibt es eine große Bandbreite verschiedener Aminosäuren, deren Vielfalt an funktionellen Gruppen nicht nur ionische oder kovalente Anbindungen von Wirkstoffmolekülen zulassen, sondern auch spezielle Modifikationen ermöglichen. So zeigen z.B. Poly(hydroxyethyl-L-asparagin) (PHEA) und Poly(hydroxyethyl-L-glutamin) (PHEG) [172] oder mit Ethylenglycol modifizierte Polyglutaminsäure [6] längere Zirkulationszeiten, wobei nur letztere die Fähigkeit zur Ausbildung von sekundären Strukturen behält [6]. Wirkstoff-Konjugate basierend auf Polyglutaminsäure (PGA) und verschiedener Zytostatika, wie z.B. Anthracycline, Antimetabolite oder Taxane, wurden bisher erfolgreich im Körper getestet [7], wobei PGA-Paclitaxel-Konjugate (OPAXIO) schon die klinische Phase III erreichen konnten [173]. Polylysin-basierte Systeme werden häufig als Polyplexe für Gentransfektionen verwendet [174-176]. Polyhistidin eignet sich in „Drug Delivery“-Systemen als Protonenschwamm, der die endosomale Flucht erleichtert (siehe Kapitel 2.4.3e). Allerdings können Polypeptide bei in-vivo Anwendungen das Komplementsystem aktivieren, vor allem wenn sie aus mehr als drei verschiedenen Aminosäuren bestehen [177]. Reines PLL wirkt sogar sehr toxisch [220]. Deswegen werden Polypeptide häufig an Polymerblöcke wie z.B. PEG oder PSar gekoppelt [7,8], die mit ihrem „Stealth“-Effekt die Zirkulationszeit erhöhen und die Toxizität absenken [175]. Des Weiteren kann durch einen amphiphilen Charakter mizellare Strukturen erzeugt werden, die eine Einkapselung der Wirkstoffe für den Transport möglich machen [178].

2.4.5. Zylindrische Bürsten als „Drug Delivery“-Systeme

Zylindrische Bürsten vereinen wegen ihrer einzigartigen Struktur mehrere Eigenschaften, die für „Drug Delivery“-Systeme besonders geeignet sind. Zum einen besitzen sie an ihren dicht gepackten Seitenketten eine große Anzahl von funktionellen Gruppen, die für Biokonjugationen sowie Modifikationen genutzt werden können und eine hohe Beladungsdichte ermöglichen. Zum anderen können durch Blockcopolymerseitenketten, ähnlich wie bei Polymermizellen oder Polymersomen, Wirkstoffe in ihrem Inneren eingekapselt werden. Dabei unterliegen die Bürsten keiner kritischen Aggregations- bzw. Bildungskonzentration, da alle Seitenketten fest am Rückgrat gebunden sind (unimolekulare Mizelle), und lösen sich somit auch bei starker Verdünnung im Blut nicht auf. Darüber hinaus scheinen beim Wirkstofftransport zylindrische Formen gegenüber sphärischen Strukturen in ihrer Effizienz im Vorteil zu sein [10]. So verhilft die starre Stäbchenform den Bürstenpolymeren zu einer stärkeren Zellpenetration bei der Diffusion in malignes Gewebe wegen der geringeren Verschlaufungstendenz mit der extrazellulären Matrix [13]. Zugleich wird durch die wenig gekrümmte Oberfläche eine Aufnahme in Phagozyten erschwert, sodass zylindrische Partikel länger im Blutstrom zirkulieren können [14,179]. Trotzdem wurden bisher nur wenige Bürstensysteme als Nanocarrier für biotechnologische Anwendungen untersucht [104,180-182].

3. Analysemethoden

3.1. Infrarot (IR)-Spektroskopie

Die IR-Spektroskopie basiert auf der Anregung von Molekülschwingungen durch elektromagnetische Wellen im infraroten Spektralbereich von 10.000 cm^{-1} bis 10 cm^{-1} [183]. Dabei ist die von den Molekülen absorbierte Anregungsenergie von der Masse und Anordnung der enthaltenen Atome sowie von deren Bindungsstärke zueinander abhängig und kann deshalb zur Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung einer Probe genutzt werden. Idealerweise werden Schwingungen in Molekülen durch einen harmonischen Oszillator beschrieben. Moleküle befinden sich bei Raumtemperatur allgemein im Grundschwingungszustand $\nu = 0$ und können unter Beachtung der Auswahlregel $\Delta\nu = \pm 1$ in höhere, äquidistante Niveaus angeregt werden (Abb. 22a). Reale Moleküle verhalten sich hingegen disharmonisch auf Grund der Repulsion der Atomhüllen bei ihrer Annäherung und können mit Hilfe des Morse-Potentials beschrieben werden. Die erhaltenen Abstände zwischen den einzelnen Schwingungsniveaus sind nun nicht mehr äquidistant, sondern nehmen mit wachsender Schwingungsenergie ab (Konvergenz), bis sie bei höheren Energien eine Dissoziationsgrenze erreichen (Abb. 22b). Außerdem bewirkt die Anharmonizität eine Änderung der Auswahlregeln zu $\Delta\nu = \pm 1, \pm 2, \pm 3$, wobei die Intensitäten der Oberton-Schwingungen mit steigendem $\Delta\nu$ sehr schnell abschwächen.

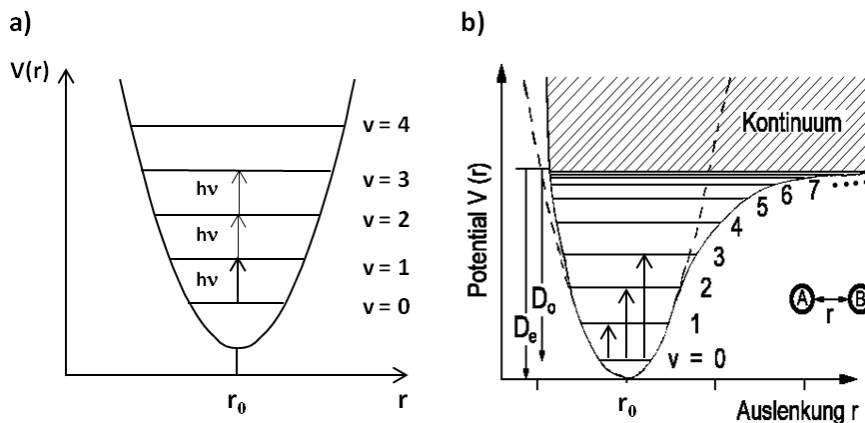


Abb. 22: a) Potential eines harmonischen Oszillators b) Potential eines anharmonischen Oszillators

Die Zahl der Normalschwingungen ergibt sich aus der Anzahl der Schwingungsfreiheitsgrade des Moleküls und kann für ein Molekül mit N Atomen wie folgt berechnet werden:

$$3N - 6 \quad \text{bzw.} \quad 3N - 5 \quad (\text{für lineare Moleküle}) \quad (1)$$

Normalschwingungen können in Valenz- (Änderung der Bindungslänge) und Deformationsschwingungen (Änderung des Bindungswinkels) unterteilt werden. Zudem existieren auch Kombinationsschwingungen aus zwei oder mehreren Normalschwingungen. Jedoch können nicht alle Schwingungen in der IR-Spektroskopie beobachtet werden. Nur wenn sich das Dipolmoment μ des Moleküls während der Schwingung ändert, ist die Schwingung IR-aktiv:

$$\frac{d\mu}{dr} \neq 0 \quad (2)$$

In einem IR-Spektrum wird die erhaltene Transmission T bzw. Absorption A gegen die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ des eingestrahnten, elektromagnetischen Lichts aufgetragen. Die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ ist eine reziproke Wellenlänge λ und steht über die Konstanten der Lichtgeschwindigkeit c und des Planck'schen Wirkungsquantums h in direktem Bezug zur eingespeisten Energie E :

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{E}{h \cdot c} \quad (3)$$

Da ein Schwingungszustand mehrere Rotationszustände besitzt, werden die angeregten Übergänge nicht als Linienspektrum, sondern als Bandenspektrum aufgezeichnet, deren Form sich aus der Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Rotationsübergänge ergibt.

Die IR-Spektroskopie gilt als eine schnelle, nicht-invasive und hochempfindliche Analysemethode. Eine spezielle Variante stellt die FT-IR (ATR)-Spektroskopie („Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance“) dar, bei der die Probe dicht auf die Oberfläche eines Reflexionselements (IRE) positioniert wird, welches Mehrfachreflexionen zulässt (z.B. Prisma oder ATR-Kristall). Wird nun ein fokussierter Infrarotstrahl in das IRE gestrahlt, wird dieser entlang des Elements totalreflektiert und durchdringt die Probe mit evaneszenten Wellen an der Phasengrenze (Abb. 23). Dabei

werden alle Molekülschwingungen auf einmal angeregt, sodass die detektierte Intensität zuerst über eine Fouriertransformation von der Zeitabhängigkeit in eine Frequenzabhängigkeit transformiert werden muss.

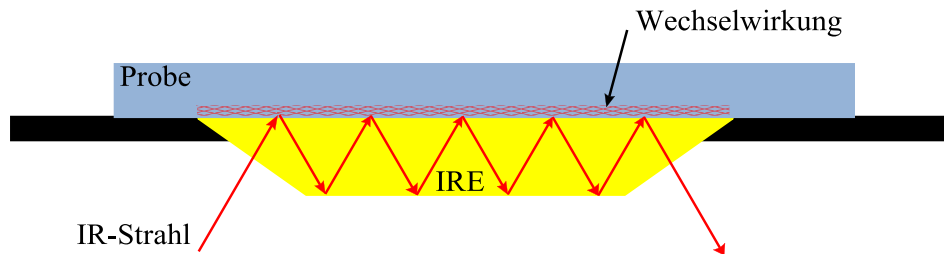


Abb. 23: Funktionsweise der FT-IR (ATR)-Spektroskopie

3.2. Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM = „atomic force microscopy“) ist eine weitverbreitete Methode zur Abbildung von Oberflächen [184]. Im Gegensatz zur Rastertunnelmikroskopie (STM) können mit ihr auch nicht leitende Oberflächen charakterisiert werden. Dabei wird mit der feinen Spitze eines Federbalkens (Cantilever) die zu untersuchende Probe abgefahren und durch das Messen der Wechselwirkung zwischen Spitze und Probenoberfläche ein topographisches Bild der Probe erzeugt. Die Messung der Auslenkung des Federbalkens erfolgt über das Lichtzeigerprinzip, bei dem ein Laserstrahl auf die Spitze des Cantilevers fokussiert wird, welcher von dort auf eine Viersegment-Photodiode reflektiert wird. Für die Positionierung der Probe während des Rastervorgangs verwendet man einen x-y-z-Piezokristall, der die Probe durch Anlegen einer elektrischen Spannung in alle drei Raumrichtungen unterhalb des festinstallierten Cantilevers verschiebt.

Zu den zwei häufigsten Betriebsarten der Rasterkraftmikroskopie gehören der statische „Contact-Mode“ und der dynamische „Tapping Mode“. Im „Contact-Mode“ steht die Spitze in ständigem Kontakt mit der Probenoberfläche. Topographische Informationen werden über die Federbalken-Auslenkung (bei konstant gehaltenem Abstand zwischen Probe und Oberfläche) bzw. das z-Signal des Piezokristalls (bei konstant gehaltener Cantilever-Kraft auf die Oberfläche) gewonnen. Allerdings kann durch die dauerhafte Berührung die Oberfläche beschädigt werden, sodass sich dieser Modus eher für die

Untersuchung von harten Proben eignet. Mit der Verwendung des sogenannten „Tapping-Mode“ lassen sich indessen auch „weiche“ Proben (z.B. Polymere) zerstörungsfrei charakterisieren. Hierbei wird der Federbalken durch ein Piezoelement zu einer Oszillation mit konstanter Amplitude nahe seiner Resonanzfrequenz gebracht, sodass die Spitze nicht mehr im Dauerkontakt mit der Oberfläche steht. Die verschiedenen Wechselwirkungen der Spitze mit der Probe führen zu einer Änderung der Amplitude und Phase der Oszillation. Aus der Amplitudenveränderung erhält man eine topographische Karte der Oberfläche (analog zum „Contact-Mode“), während aus der Phasenverschiebung Aussagen über die Materialeigenschaften der Probe getroffen werden können. In dieser Arbeit werden alle AFM-Aufnahmen im „Tapping-Mode“ aufgezeichnet.

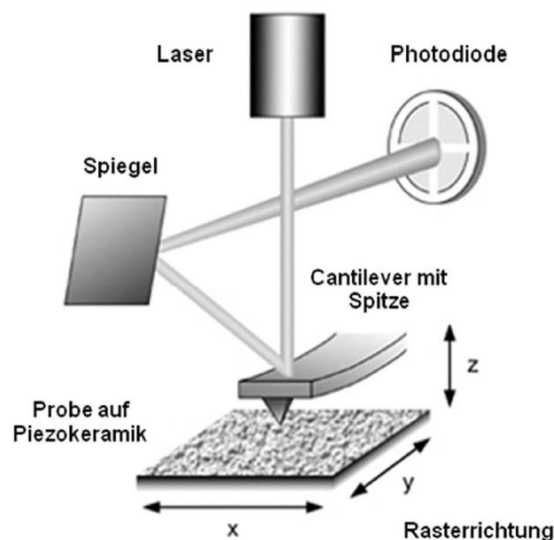


Abb. 24: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskopes [185]

3.3. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die GPC (Gelpermeationschromatographie), ist eine spezielle Form der Flüssigkeitschromatographie, die mit Hilfe des Größenausschlussprinzips die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts sowie der Verteilung einer polymeren Probe ermöglicht [186]. Hierzu wird die Probe in einem Eluenten gelöst (mobile Phase) und durch eine Serie von Säulen mit porösem Füllmaterial (stationäre Phase) geleitet (Abb. 25). Bei dem Füllmaterial handelt es sich meist um hochvernetztes Polystyrol mit definierten Poren,

deren Größe von dem Vernetzungsgrad und dem verwendeten Eluenten abhängig ist. Das hydrodynamische Volumen V_h der Polymere, welches wiederum von ihrer Molmasse abhängig ist, steuert die Permeation in die Poren der stationären Phase.

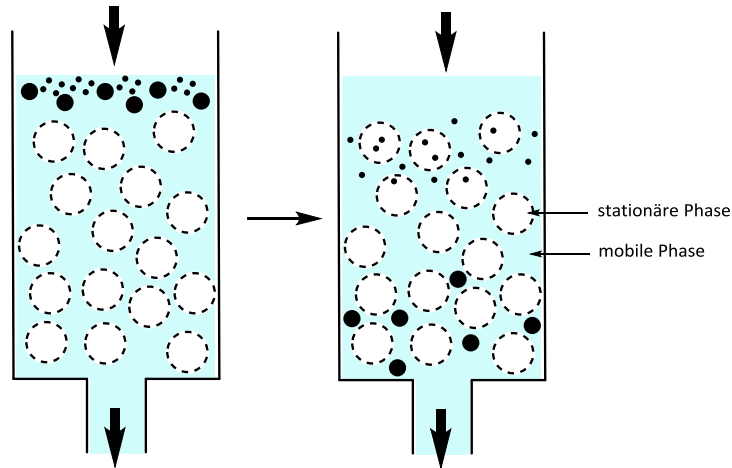


Abb. 25: Schematische Darstellung des Trennprinzips einer GPC-Säule

Makromoleküle, deren hydrodynamisches Volumen das der Poren übersteigt, passieren ungehindert die Säule und eluieren am Volumen der reinen mobilen Phase V_0 ($k = 0$; obere Ausschlussgrenze). Sehr kleine Moleküle hingegen können leicht in das gesamte Porenvolumen V_p diffundieren und verweilen somit in einem größeren Elutionsvolumen V_e auf der Säule ($k = 1$; untere Ausschlussgrenze). Eine gute Auftrennung erfolgt daher nur bei einem hydrodynamischen Radius der zwischen beiden Extremen liegt ($k = 0-1$):

$$V_e = V_0 + k \cdot V_p \quad \text{mit} \quad V_h > V_p \rightarrow k = 0 \quad V_h \ll V_p \rightarrow k = 1 \quad (4)$$

Wechselwirkungen zwischen der Probe und der stationären Phase sind unerwünscht, stellen jedoch ein häufiges Problem bei Polyelektrolyten auf Grund ihrer Ladung dar. Die Detektion erfolgt meist parallel über einen Brechungsindexdetektor (RI) und einen UV-Detektor, bei dem das Signal in einer proportionalen Beziehung zur Massenkonzentration der Probe steht. Um von dem relativen Elutionsvolumen V_e auf die Molmasse M schließen zu können, benötigt man für das verwendete System eine Kalibrierungskurve aus monodispersen Standards, deren Molmassen durch absolute Messmethoden (z.B. SLS, MALDI) bekannt sind (Abb. 26):

$$V_e = C_1 - C_2 \cdot \log(M) \quad (5)$$

C_1, C_2 : Konstanten

Durch die Verwendung von chemisch verwandten Standards mit ähnlicher Architektur im Bezug auf die zu vermessende Probe kann die Aussagekraft der erhaltenen Molmasse und Polydispersität verbessert werden.

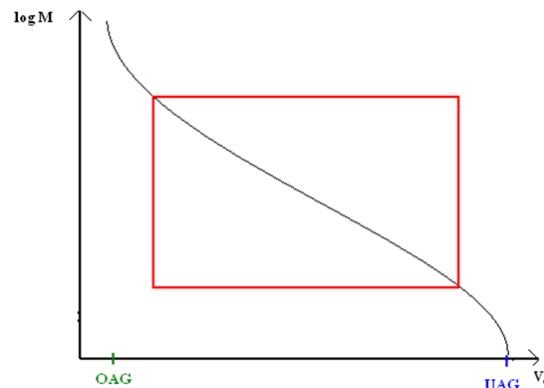


Abb. 26: Sigmoidale Kalibrierungskurve: Zwischen der oberen (OAG) und unteren Ausschussgrenze (UAG) liegt der Auftrennungsbereich (rot gerahmt), für den die Kalibrierung gültig ist

3.4. CD-Spektroskopie

In der CD-Spektroskopie wird die ungleiche Absorption A zwischen links- bzw. rechtszirkular polarisiertem Licht von chiralen Verbindungen auf Grund der unterschiedlich stark ausgeprägten molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_L \neq \epsilon_R$) ausgenutzt, um die Struktur von Proteinen oder anderen chiralen Molekülen zu untersuchen [187,188]. Dieses Verhalten wird als Zirkulardichroismus ΔA bezeichnet und kann unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bei bekannter Konzentration c und Schichtdicke d der Küvette beschrieben werden mit:

$$\Delta A = A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d \quad (6)$$

Wird linear polarisiertes Licht in eine optisch aktive Probe eingestrahlt, verlässt es wegen der unterschiedlichen Absorption der rechts- bzw. linkszirkular polarisierten Komponente das Medium mit einer elliptischen Polarisation, die mit der Elliptizität θ beschrieben werden kann (siehe Abb. **27a,b**):

$$\theta = \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \approx 33^\circ \cdot \Delta A \quad [\text{Grad}] \quad (7)$$

Für die Messung wird mittels UV-Licht einer Xenonlampe und einem Monochromator monochromatisches Licht erzeugt, welches mit Hilfe eines Polarisationsfilters linear polarisiert wird. Anschließend wird das Licht durch eine Pockels-Zelle in rechts- bzw. linkszirkular polarisiertes Licht umgewandelt, in das Probenmedium eingestrahlt und danach die Absorptionsdifferenz mit einem hochsensitiven Detektor vermessen (Abb. 28). Durch Auftragen der Elliptizität θ gegen die Wellenlänge λ erhält man im fernen UV-Bereich (160 nm bis 250 nm) Informationen über die Sekundärstruktur der Probenmoleküle (z.B. „Random Coil“, α -Helix oder β -Faltblatt). Dazu analysiert man das Bandenprofil des starken $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs und des schwächeren $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs der Peptidbindungen (Abb. 27c). Im nahen UV-Bereich (250 nm bis 300 nm) ermöglichen die Absorption der Disulfidbindungen und aromatischen Seitenketten Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur und Faltung der Proteine.

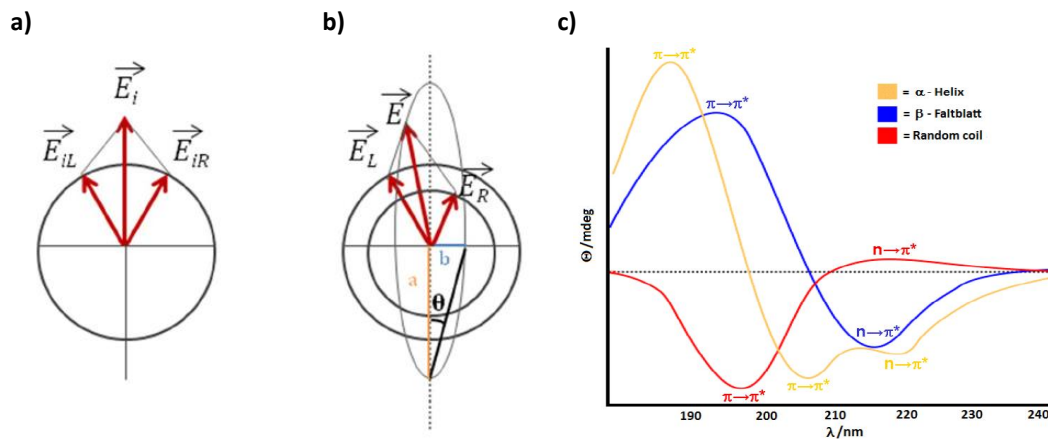


Abb. 27: Der elektrische Feldvektor der rechts- und linkszirkular polarisierten Komponente \vec{E}_L bzw. \vec{E}_R für das **a)** einfallende, linear polarisierte Licht und **b)** ausfallende, elliptische Licht [187] **c)** Basisspektren eines Polypeptids mit „Random Coil“- , α -Helix- und β -Faltblatt-Struktur

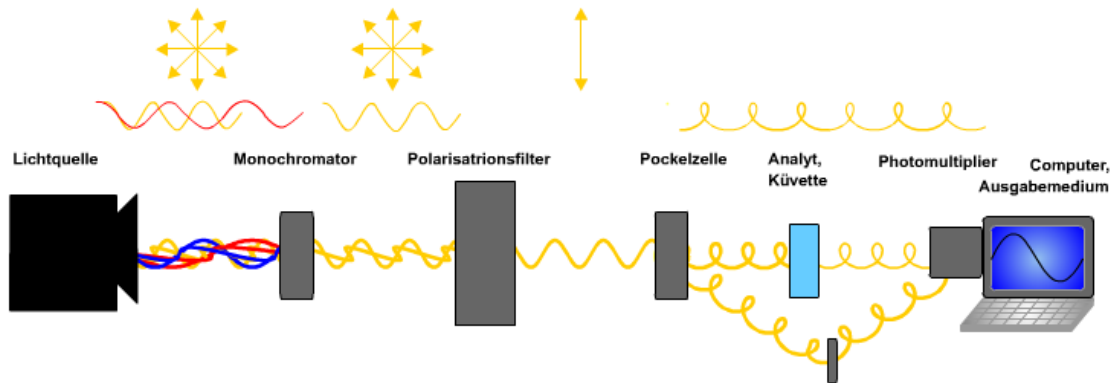


Abb. 28: Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers. Oberhalb der Bauteile sind die verschiedenen Polarisationsstadien des eingestrahnten Lichts eingezeichnet [189]

3.5. Lichtstreuung

Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein polarisierbares Teilchen, werden dessen Elektronen angeregt und erzeugen so oszillierende Dipole, welche Streuwellen mit derselben Frequenz und Phase der eingestrahnten Welle senkrecht zum Dipolmoment \vec{m} emittieren (elastische Streuung). Die Größe des Dipolmoments ist dabei proportional zur Polarisierbarkeit α der Dipole. Wird das gestreute Licht winkelahängig detektiert und analysiert, können absolute Informationen über die Größe, Form sowie das Molekulargewicht des gelösten Teilchens erhalten werden (Absolutmethode). Man unterscheidet zwei verschiedene Messverfahren: In der statischen Lichtstreuung wird die gemittelte Intensität, bei der dynamischen Lichtstreuung die zeitaufgelöste Intensitätsfluktuation ausgewertet.

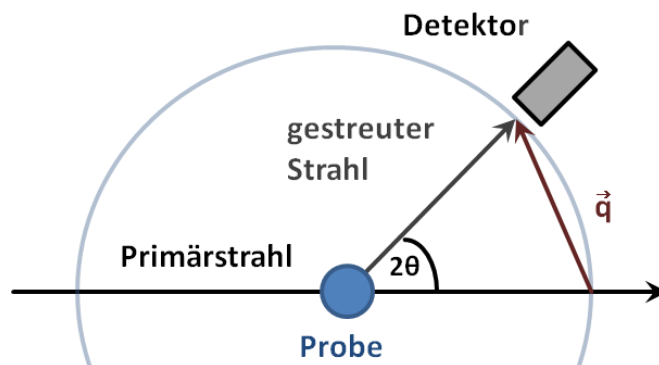


Abb. 29: Schematischer Aufbau einer Lichtstreuungsanlage mit dem Streuwinkel θ und dem Streuvektor \vec{q}

3.5.1. Statische Lichtstreuung

Basierend auf der Entdeckung der Induktion von Dipolmomenten in Gasmolekülen durch Lichteinstrahlung von Lord Rayleigh [190], entwickelten Einstein [191], Debye [192] und Smoluchowski [193] die Fluktuationstheorie, mit der die Streuung von Flüssigkeiten und gelösten Partikeln beschrieben werden kann. Dabei tritt nur dann Lichtstreuung auf, wenn die Dichte bzw. Konzentration der Moleküle auf Grund von Brown'scher Bewegung im betrachteten Streuvolumen fluktuiert:

$$R(\theta) = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \cdot \left[\underbrace{\rho n_0^2 \left(\frac{dn}{d\rho}\right)^2 RT \beta}_{\text{Dichtefluktuation}} + \underbrace{n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 RT \frac{M_0}{\rho_0} \frac{c}{\left(-\frac{d\Delta\mu}{dc}\right)}}_{\text{Konzentrationsfluktuation}} \right] \quad (8)$$

$R(\theta)$:	Rayleigh-Verhältnis
λ_0 :	Wellenlänge des Primärstrahls
N_A :	Avogadro Konstante
M_0 :	Molare Masse des Lösungsmittels
ρ, ρ_0 :	Dichte von Lösung und Lösungsmittel
n, n_0 :	Brechungsindex von Lösung und Lösungsmittel
R :	Universelle Gaskonstante
T :	Temperatur
β :	Isothermes Kompressionsmodul
c :	Konzentration der Probe
$\Delta\mu$:	Differenz der chemischen Potentiale von Lösung und Lösungsmittel
$\left(\frac{dn}{dc}\right), \left(\frac{dn}{d\rho}\right)$:	Änderung des Brechungsindex durch Konzentration bzw. Dichte

Bei kleinen Teilchen ($< \lambda/20$) liegen die Streuzentren so nahe beieinander, dass nur konstruktive Interferenz auftritt (Punktstreuer) und somit ihre Streuintensität vom Streuwinkel unabhängig ist. Für verdünnte Lösungen kann zudem angenommen werden, dass sich der Beitrag der Dichtefluktuation von reinem Lösungsmittel (LM) und der Probenlösung (Lsg.) nicht unterscheiden. So erhält man für das Rayleigh-Verhältnis von kleinen Teilchen:

$$R(\theta) = R(\theta)_{Lsg.} - R(\theta)_{LM} = \underbrace{\frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}_{\text{Kontrastfaktor } K} \cdot RT \frac{M_0}{\rho_0} \left(-\frac{d\Delta\mu}{dc}\right) \quad (9)$$

Die konzentrationsabhängige Änderung des chemischen Potentials kann als Änderung des osmotischen Drucks mit der Konzentration verstanden werden. Unter zusätzlicher Verwendung des van't Hoff'schen Gesetzes für reale Lösungen erhält man:

$$\left(-\frac{d\Delta\mu}{dc}\right) = \frac{M_0}{\rho_0} \left(\frac{d\pi}{dc}\right) = RT \frac{M_0}{\rho_0} \left(\frac{1}{M} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots\right) \quad (10)$$

- A_2, A_3 : 2. bzw. 3. Virialkoeffizient des Osmotischen Drucks
 M : Molare Masse der gelösten Substanz
 π : Osmotischer Druck

Für hoch verdünnte Lösungen kann die Reihe nach dem 2. Virialkoeffizienten abgebrochen werden. Nach Einsetzen in Formel (9) ergibt sich die Gleichung für die Streuung von kleinen, gelösten Teilchen mit dem Kontrastfaktor K :

$$\frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} + 2A_2c \quad (11)$$

Da der Absolutwert der Intensität auch von dem Abstand zwischen Detektor und Probe, der Größe des Streuvolumens und der Wellenlänge bzw. Intensität des Laserprimärstrahls abhängt, wird die gemessene Probenintensität im Experiment mit einem bekannten Standard (Std) und dem Lösungsmittel (LM) kalibriert:

$$R(\theta) = (I_{Lsg} - I_{LM}) \frac{R_{Std,abs.}}{I_{Std}} \quad (12)$$

Sind die Partikel größer ($> \lambda/20$), treten zwischen den Streuzentren neben konstruktiver auch destruktive Interferenzen auf, deren Ausprägung von der Geometrie des Partikels abhängen. Diese werden durch einen Formfaktor $P(q)$ berücksichtigt, der die Winkelabhängigkeit der Streuintensität beschreibt:

$$\frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{1}{M \cdot P(q)} + 2A_2c \quad (13)$$

Die allgemeine Definition des Formfaktors kann weiter umgewandelt werden, indem zuerst über alle Raumkoordinaten und alle Abstände gemittelt und danach eine Taylorreihe entwickelt wird, die für kleine q nach dem 2. Glied abgebrochen werden darf:

$$P(q) = \frac{1}{Z^2} \sum_{i=1}^Z \sum_{j=1}^Z \langle \exp(-iqr_{ij}) \rangle = 1 - \frac{q^2}{3!Z^2} \sum_{i=1}^Z \sum_{j=1}^Z \langle r_{ij}^2 \rangle = 1 - \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle \quad (14)$$

$r_{ij} = r_i - r_j$: Betrag des Abstandsvektors zwischen Streuzentren i und j

Z : Anzahl der Streuzentren

$\langle R_g^2 \rangle$: mittleres Trägheitsradienquadrat des Partikels

q : Betrag des Streuvektors

Dabei ist der Betrag des Streuvektors \vec{q} definiert als:

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (15)$$

Für polydisperse Proben lässt sich zeigen, dass mit der statischen Lichtstreuung das z-Mittel des Trägheitsradienquadrats $\langle R_g^2 \rangle_z$ und das Gewichtsmittel der Molmasse M_w erhalten werden:

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (16)$$

$$\langle R_g^2 \rangle_z = \frac{\sum_i N_i M_i^2 \langle R_g^2 \rangle_i}{\sum_i N_i M_i^2} \quad (17)$$

Setzt man den umgeformten Formfaktor aus Gleichung (14) in Formel (13) ein, erhält man mit der Vereinfachung: $1 - x = \frac{1}{1+x}$ die Zimm-Gleichung:

$$\frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z \right) + 2A_2 c \quad (18)$$

Diese kann zur Darstellung eines Zimplots verwendet werden, bei dem $\frac{K \cdot c}{R(\theta)}$ gegen $q^2 + kc$ aufgetragen ($k = \text{Spreizfaktor}$) und gegen $c \rightarrow 0$ und $q \rightarrow 0$ extrapoliert wird. Aus den Steigungen erhält man das z-Mittel des Trägheitsradienquadrats sowie den

2. Virialkoeffizienten und aus den Achsenabschnitten kann das reziproke Gewichtsmittel der Molmasse ausgelesen werden (Abb. 30).

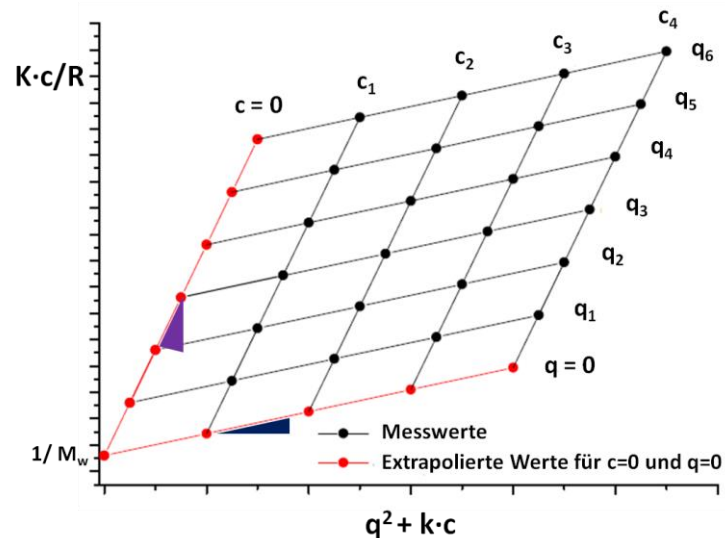


Abb. 30: Exemplarischer Zimm-Plot mit gemessenen Werten (schwarze Punkte) und extrapolierten Werten (rote Punkte) für die Bestimmung des 2. Virialkoeffizienten, der reziproken Molmasse und des Trägheitsradienquadrats aus den Steigungen bzw. Achsenabschnitten

3.5.2. Dynamische Lichtstreuung

Im Gegensatz zur statischen Lichtstreuung wird bei der dynamischen Lichtstreuung nicht die gemittelte Streuintensität gemessen, sondern ihre zeitliche Fluktuation erfasst, die durch Brown'sche Bewegung der Partikel im Streuvolumen verursacht wird. Nach dem Wiener-Khintchine-Theorem [194,195] existiert zu jedem Intensitätsspektrum im Frequenzraum eine fouriertransformierte Funktion im Zeitraum, die sogenannte Intensitätskorrelationsfunktion $g_2(q, \tau)$ [196]. Diese wird experimentell ermittelt, indem die Intensität zum Zeitpunkt t mit der Intensität zum Zeitpunkt $(t + \tau)$ für verschiedene Werte von τ und deren Vielfache multipliziert und über die gesamte Messzeit T gemittelt wird:

$$g_2(q, \tau) = \langle I(q, t) \cdot I(q, t + \tau) \rangle_T \quad (19)$$

Dadurch wird eine abnehmende Exponentialfunktion erhalten, die typischerweise vom Mittelwert der quadratischen Intensität $\langle I(q, t)^2 \rangle$ auf die quadrierte mittlere

Streuintensität abklingt $\langle I(q, t) \rangle^2$ (Basislinie), da im Laufe der Zeit die Teilchen voneinander wegdiffundieren und damit ihre Wechselbeziehung (Korrelation) abnimmt.

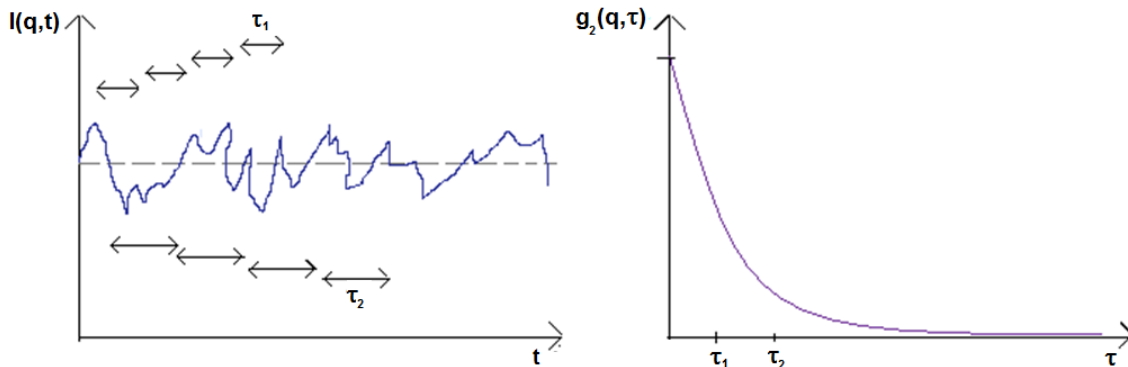


Abb. 31: Fluktuation der Streuintensität $I(q, t)$ mit der Zeit bei einem festen Winkel und die sich daraus ergebende Intensitätskorrelationsfunktion $g_2(q, \tau)$

Über die Siegert Relation kann die Intensitätskorrelationsfunktion $g_2(q, \tau)$ in die Amplitudenkorrelationsfunktion $g_1(q, \tau)$ überführt werden, mit der der Diffusionskoeffizient für kleine monodisperse Teilchen bestimmt werden kann:

$$g_1(q, \tau) = \sqrt{\frac{g_2(q, \tau) - A}{A}} = B \cdot \exp(-Dq^2\tau) \quad (20)$$

B : Signal-Rausch-Verhältnis (abhängig vom experimentellen Aufbau)

A : Experimentell bestimmte Basislinie

D : translatorischer Diffusionskoeffizient

Für größere, polydisperse Proben besteht $g_1(q, \tau)$ jedoch aus einer Überlagerung verschiedener Exponentialfunktionen, die mit dem Formfaktor $P_i(q)$ der Partikel gewichtet werden. Da dieser winkelabhängig ist, werden aus der Anfangssteigung der Korrelationsfunktion nur apparente Diffusionskoeffizienten für jeden einzelnen Winkel erhalten. Erst mit der Extrapolation auf $q^2 \rightarrow 0$ ($P_{q=0} \rightarrow 1$), kann man das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten bestimmen:

$$D_{app}(q) = \frac{\sum_i N_i M_i^2 P_i(q) D_i}{\sum_i N_i M_i^2 P_i(q)} = \langle D \rangle_z (1 + C \langle R_g \rangle_z q^2 \dots) \quad (21)$$

C : dimensionslose Größe, die von der Molekülstruktur abhängig ist

Weil der Diffusionskoeffizient zusätzlich von der Konzentration der Probe abhängen kann, müssen die für $q \rightarrow 0$ extrapolierten Diffusionskoeffizienten bei verschiedenen Konzentrationen gemessen und auf $c \rightarrow 0$ extrapoliert werden. Unter Verwendung der Stokes-Einstein-Beziehung kann aus dem z-Mittel des Selbstdiffusionskoeffizienten $\langle D \rangle_z$ der kugeläquivalente hydrodynamische Radius R_h als inverses z-Mittel berechnet werden:

$$\frac{kT}{6\pi\eta_0\langle D \rangle_z} = \left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1} = R_h \quad (22)$$

k : Boltzmann-Konstante

T : Temperatur

η_0 : Viskosität des Lösungsmittels

Kombiniert man die Resultate aus statischer und dynamischer Lichtstreuung, können mit dem Verhältnis von Trägheitsradius zu hydrodynamischem Radius Auskünfte über die Topologie der untersuchten Probe gewonnen werden. Diese sind besonders hilfreich bei Partikeln mit einer Größe < 100 nm, da ihr Partikelformfaktor durch Lichtstreuexperimente auf Grund des limitierten q -Bereichs nur unzureichend analysiert werden kann.

$$\rho = \frac{R_g}{R_h} = \frac{\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}}{\left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1}} \quad (23)$$

Tabelle 2: ρ -Verhältnisse verschiedener Partikeltopologien [197]

Topologie	ρ
Homogene Kugel	0,775
Hohlkugel	1
Ellipsoid	0,775 - 4
Zufallsknäul	1,505
Zylinder mit Länge L und Dicke D	$\frac{1}{\sqrt{3}} \ln\left(\frac{L}{D} - 0,5\right)$

4. Synthese und Charakterisierung von zylindrischen Polypept(o)idbürsten

Um zylindrische Bürsten zu erhalten, wird eine Synthesestrategie benötigt, die hohe Pfropfdichten an einem relativ langen Bürstenrückgrat ermöglicht (siehe Kapitel 2.1). Deswegen wird für die Synthese der Polypept(o)idbürsten die „grafting from“-Methode gewählt, bei der zuerst ein hochmolekularer Makroinitiator hergestellt und charakterisiert wird, an dem dann über eine ringöffnende NCA-Polymerisation die pept(o)idischen Seitenketten sukzessive aufgebaut werden. Für die Kontrolle der NCA-Polymerisation dient der in Kapitel 2.2.3b vorgestellte Schlad-Mechanismus, bei dem die Verwendung eines Initiatorsalzes Nebenreaktionen verhindern soll.

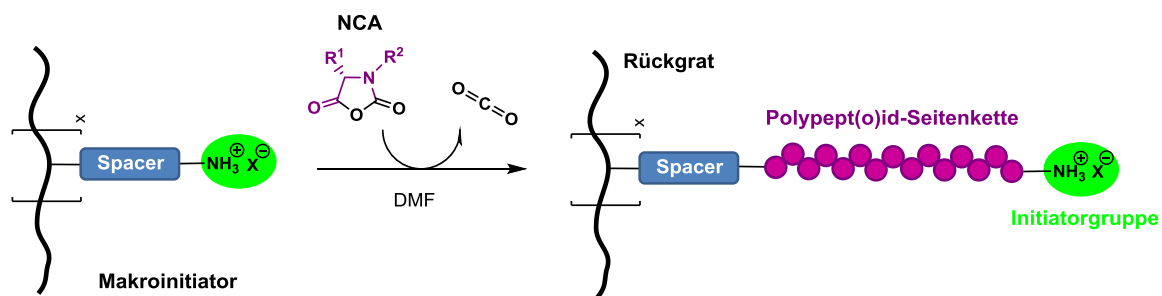


Abb. 32: Schematische Darstellung der Synthese von Bürsten mit Polypept(o)idseitenketten über den „grafting from“-Ansatz und der Verwendung der ringöffnenden NCA-Polymerisation

In Kapitel 4.1 wird die Darstellung und Charakterisierung der verwendeten Makroinitiatoren PAHMA und PLL beschrieben. Kapitel 4.2 gibt die Synthese und Analyse der NCA-Monomere aus Lysin und Sarkosin wieder und die Kapitel 4.3 bis 4.5 beschäftigen sich mit der Synthese und Charakterisierung der erhaltenen zylindrischen Bürsten aus reinen Sarkosinblöcken, reinen Lysinblöcken und Sarkosin/Lysin-Diblocken. Dabei wird auf folgende Nomenklatur zurückgegriffen: Der Verlauf vom äußeren zum inneren Seitenkettenblock erfolgt von links nach rechts und die enthaltene Hauptkette wird rechts hochgestellt, was am Beispiel einer Diblockbürste demonstriert werden soll:



4.1. Makroinitiatoren

Für die spätere Ringöffnungspolymerisation der N-Carboxy-Anhydride werden nukleophile Gruppen am Makroinitiator benötigt. Vor allem primäre Amingruppen liefern gute Ausbeuten und folgen bevorzugt dem NA-Mechanismus, der eine Art von „pseudo-lebender“ Polymerisation darstellt, bei der der Initiator auch mit dem entstehenden Polypeptid verknüpft ist. In ihrer Salzform scheinen die primären Amin-Initiatoren eine gute Kontrolle über die NCA-Polymerisation zu gewährleisten (Schlaad-Mechanismus). Als Makroinitiatoren werden deshalb zum einen das synthetische Poly[N-(6-aminohexyl)methacrylamid] (PAHMA) mit TFA als Gegenion und zum anderen das kommerziell erhältliche Poly-L-Lysin Hydrobromid verwendet, welches im Körper später wieder enzymatisch gespalten werden kann [95]. Da die Beschaffenheit des Makroinitiators erheblich das Aussehen der späteren Bürste beeinflusst, müssen Länge und Polydispersität von Beginn an so eingestellt werden, dass sie für eine spätere Anwendung ausreichend sind. So sind z.B. Bürsten mit monodisperser Verteilung und zylindrischer Form im Bereich des Wirkstofftransports von Vorteil: Die zylindrische Form garantiert eine erhöhte Zirkulationszeit auf Grund der schlechteren Aufnahme durch Makrophagen [10]. Eine schmale Molmassenverteilung ist wichtig für eine eindeutige Aussage über die Wirkungsweise der Bürste, da Biodistribution und Zellaufnahme stark von der Molmasse abhängen [7].

4.1.1. PAHMA

Poly[N-(6-aminohexyl)methacrylamid] wird über mehrere Stufen hergestellt, die zur Veranschaulichung in Abb. 33 zusammengefasst sind. Die genauen Vorschriften der einzelnen Schritte können im experimentellen Teil nachgelesen werden. Für die Herstellung des Monomers wird nach einer Vorschrift von Stahl et. al. [198] zuerst 1,6-Diaminohexan mit Hilfe von Di-tert-butyldicarbonat an einem Aminende mit einer Boc-Schutzgruppe versehen und das entstandene Mono-N-Boc-1,6-diaminohexan über Destillation isoliert. Die verbliebene Amingruppe wird in einem zweiten Schritt mit Methacryloylchlorid zum Methacrylamid umgesetzt, um eine polymerisierbare Vinylgruppe einzufügen.

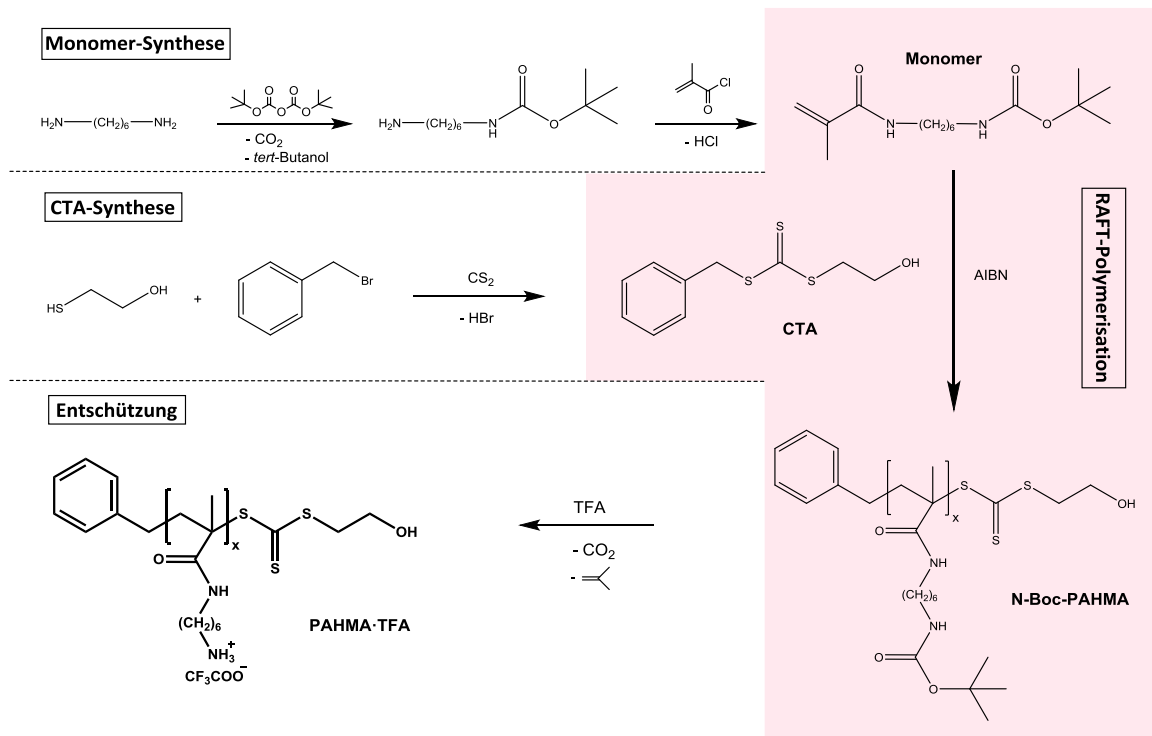


Abb. 33: Veranschaulichung der Herstellung des PAHMA-TFA-Makroinitiators mit den einzelnen Reaktionsschritten: Monomer-Synthese, CTA-Synthese, RAFT-Polymerisation und Entschützung

Nach der Aufreinigung des Monomers mittels Flashchromatographie können im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die neu entstandenen Signale durch die Protonen der Doppelbindung (5,3 und 5,7 ppm) und der Methylgruppe (1,9 ppm) beobachtet werden (Abb. 34).

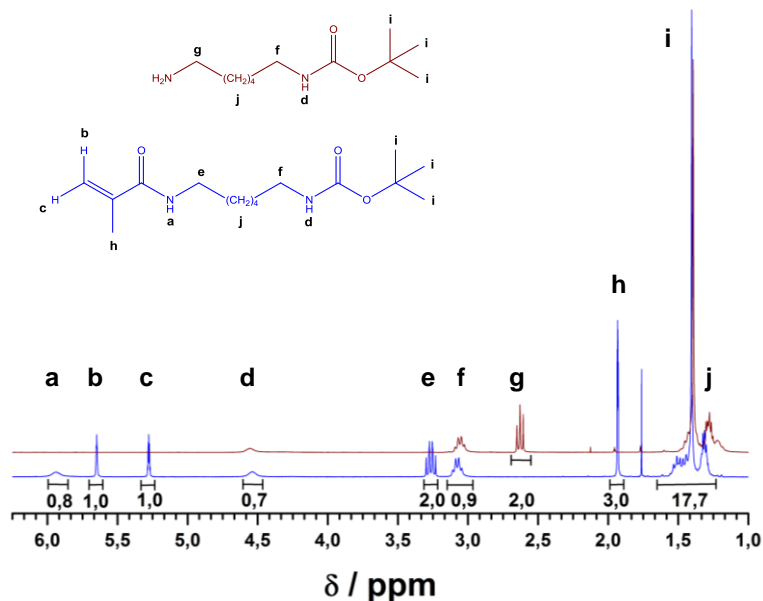


Abb. 34: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Mono-N-Boc-1,6-diaminohexan (rot) und N-Boc-N'-methacrylamid-1,6-diaminohexan (blau) in CDCl_3 (300 MHz, 293 K)

Für die Synthese des Makroinitiators wird die RAFT-Polymerisation („Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer“) verwendet. Diese ermöglicht über einen reversiblen Transfermechanismus, der durch ein Kettentransferagens (CTA) gesteuert wird, eine gute Kontrolle über das Molekulargewicht und die Verteilung des Polymers [199,200]. Als Kettentransferagens wird Benzyl-2-Hydroxyethyl-trithiocarbonat eingesetzt, welches nach einer Vorschrift von Skye et. al. [201] synthetisiert wird (siehe Kapitel 8.3). Das Monomer wird in einem Verhältnis von 700 : 1 : 0,15 (Monomer : CTA : AIBN) drei Tage bei 90°C in Anisol polymerisiert und dann mittels mehrfacher Fällung in Diethylether von nicht umgesetztem Monomer befreit. Das Gelpermeationschromatogramm des geschützten Makroinitiators in DMF (Abb. 35) zeigt eine monomodale Verteilung mit einem hohen Molekulargewicht von $M_w = 210.000$ g/mol und einer apparenten Polydispersität von $PDI = 1,64$ (Polystyrol-Kalibrierung).

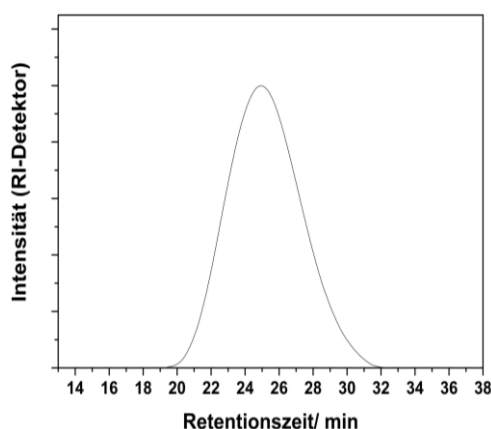


Abb. 35: GPC-Messung des geschützten PAHMA-Makroinitiators in DMF (PS-Kalibrierung, Polymersäule)

Im letzten Schritt werden die Boc-Schutzgruppen des geschützten Makroinitiators in einer Trifluoressigsäure/Dichlormethan-Mischung über Nacht entfernt und das als Gel ausgefallene PAHMA mit Hilfe der Amicon-Zentrifugation in Wasser (Ausschlussgrenze $M = 50$ kDa) von allen Abspaltungsprodukten befreit. Die vollständige Entschützung lässt sich durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nachweisen, bei der das intensive Signal der Boc-Protonen gänzlich verschwunden ist (Abb. 36). Die entschützten Amingruppen liegen nun in einer protonierten Form mit TFA als Gegenion vor und können somit eine spätere NCA-Polymerisation über den Schlaad-Mechanismus initiieren.

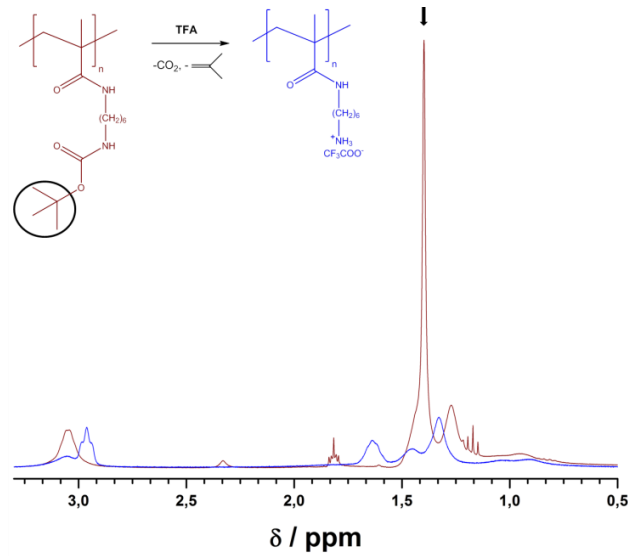


Abb. 36: ^1H -NMR-Spektren von Boc-geschütztem PAHMA (rot) in CDCl_3 und entschütztem PAHMA-TFA (blau) in D_2O (beide 300 MHz, 293 K)

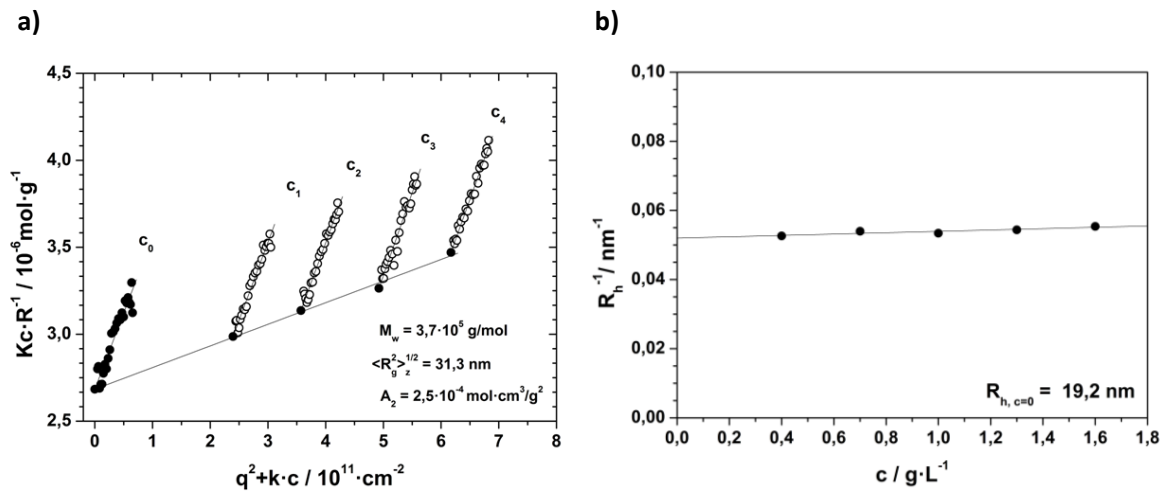


Abb. 37: Charakterisierung von entschütztem PAHMA in PBS-Puffer mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung bei 20°C : **a)** Zimm-Plot im Bereich von 30° und 150° (5° -Schritte) mit $c_1 = 0,60\text{ g/L}$, $c_2 = 0,89\text{ g/L}$, $c_3 = 1,23\text{ g/L}$, $c_4 = 1,54\text{ g/L}$ und $dn/dc = 0,1362\text{ cm}^3/\text{g}$ **b)** Bestimmung von $R_{h,c=0}$ durch Extrapolation der reziproken hydrodynamischen Radien verschiedener Konzentrationen in PBS

Zur Bestimmung der Größe des entschützten Makroinitiators wird dieser in PBS-Puffer mittels dynamischer und statischer Lichtstreuung vermessen (Abb. 37). Der hydrodynamische Radius beträgt bei unendlicher Verdünnung $R_{h,c=0} = 19,2\text{ nm}$, der mittlere Trägheitsradius entspricht $R_g = 31,3\text{ nm}$. Aus dem erhaltenen Molekulargewicht von $M_w = 370.000\text{ g/mol}$ kann ein mittlerer Polymerisationsgrad von $P_w = 1240$ berechnet werden, was gleichzeitig auch der mittleren Anzahl der Initiatorgruppen entspricht. Die relativ hohe Molmasse und die Polydispersität von 1,64 sind ein

Anzeichen dafür, dass die Polymerisation nicht ausschließlich über den RAFT-Mechanismus verlaufen ist.

4.1.2. PLL

Poly-L-Lysin (PLL) besitzt ebenfalls an jeder Wiederholungseinheit ein freies Amin. Die Amingruppen sind jedoch nicht ganz so dicht am Rückgrat verteilt wie bei PAHMA, da sie sich auf Grund der Peptidbindungen nur an jeder dritten anstatt jeder zweiten Position der Hauptkette befinden. Allerdings kann PLL im Körper enzymatisch in kleinere Fragmente bis hin zu den einzelnen Aminosäuren zerlegt und somit wieder leicht aus der Zelle transportiert werden.

Lange PLL-Ketten mit hohem Molekulargewicht von $M > 300.000 \text{ g/mol}$ (Viskositätsbestimmung [202]) sind als Hydrobromidsalze bei Sigma Aldrich kommerziell erhältlich und bieten damit die Möglichkeit, zylindrische Vollpeptidbürsten zu synthetisieren. Da solch große Molmassen nicht mehr über den NA-Mechanismus erreicht werden können [74], wird das PLL durch eine Kondensationspolymerisation über den AM-Mechanismus gewonnen und besitzt daher eine sehr breite Verteilung. Zur Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile wird das Polymer deswegen vor der Verwendung mehrere Tage gegen MilliQ-Wasser dialysiert (Ausschlussgrenze $M = 300 \text{ kDa}$). Die Bestimmung der Polydispersität des hochmolekularen PLL·HBr mittels GPC erweist sich dabei als sehr schwierig, da es in organischen Lösungsmitteln nur schwer löslich ist und wegen seiner hohen, kationischen Ladungsdichte stark mit dem Säulenmaterial wechselwirkt (Adsorption). So erhält man in der HFIP-GPC eine stark „verschmierte“ Verteilung mit geringer Intensität und einer Polydispersität von ca. 2,3 (Abb. 38). Für die Analyse mit einer wässrigen GPC fehlen monodisperse Kalibrierungsstandards im Bereich hoher Molekulargewichte. Dennoch kann auf Grund der Herstellung des Polylysins trotz Aufreinigung von einer Polydispersität $> 2,0$ ausgegangen werden. Damit ist die Verteilung deutlich höher als für den selbst hergestellten PAHMA-Initiator. Trotzdem kann der Makroinitiator exemplarisch als Ausgangssubstanz für die Herstellung von Bürsten mit bioabbaubarem Rückgrat verwendet werden („proof of concept“).

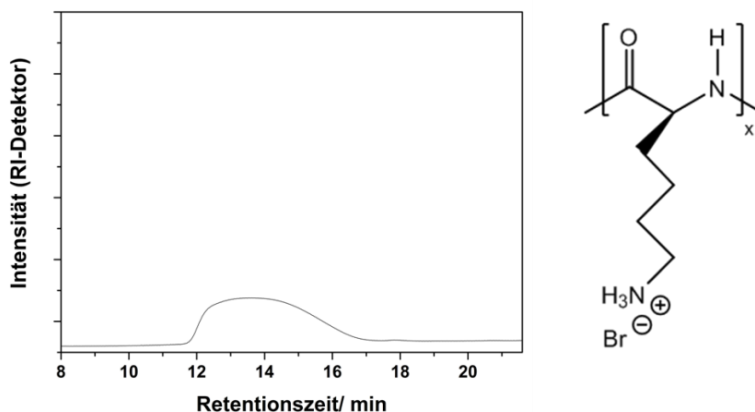


Abb. 38: GPC-Messung von PLL-HBr in HFIP. Rechts ist die Strukturformel des Polymers abgebildet (PMMA-Kalibrierung)

Zur Bestimmung der Größe des PLL-Makroinitiators wird dieser in PBS-Puffer mittels dynamischer und statischer Lichtstreuung vermessen (Abb. 39). Der hydrodynamische Radius beträgt bei unendlicher Verdünnung $R_{h,c=0} = 38,6$ nm. Aus der Statik erhält man den mittleren Trägheitsradius $R_g = 57,6$ nm und eine Molmasse von $M_w = 590.000$ g/mol, was einem mittleren Polymerisationsgrad von $P_w = 2812$ entspricht, der damit mehr als doppelt so groß ist wie der von PAHMA-TFA.

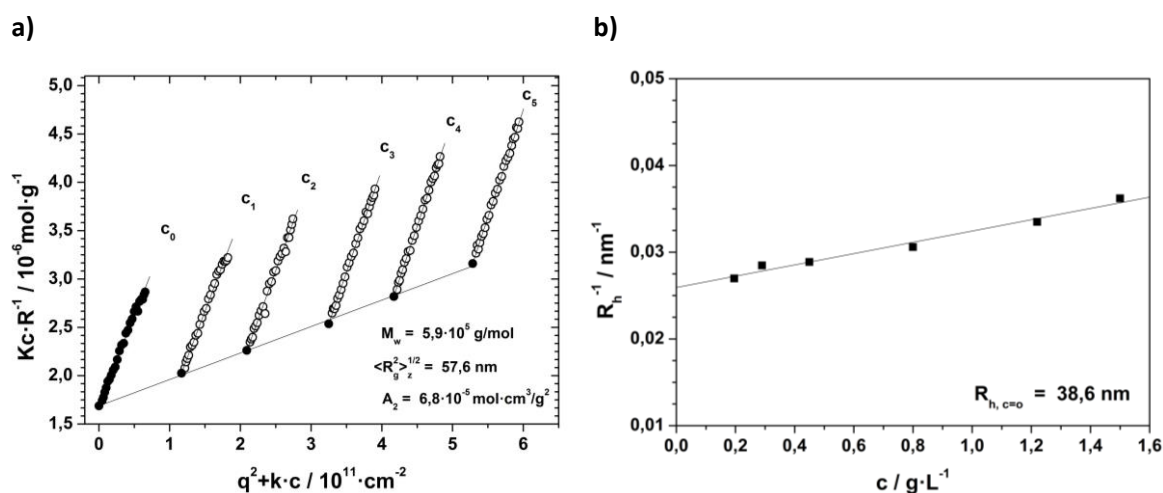


Abb. 39: Charakterisierung von PLL-HBr in PBS-Puffer mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung bei 20°C: **a)** Zimm-Plot im Bereich von 30° und 150° (5°-Schritte) mit $c_1 = 0,2$ g/L, $c_2 = 0,42$ g/L, $c_3 = 0,65$ g/L, $c_4 = 0,83$ g/L, $c_5 = 1,06$ g/L und $dn/dc = 0,176$ cm³/g **b)** Bestimmung von $R_{h,c=0}$ durch Extrapolation der reziproken hydrodynamischen Radien verschiedener Konzentrationen in PBS

Das CD-Spektrum des chiralen Makroinitiators in Wasser (Abb. 40) zeigt die erwartete „Random Coil“-Struktur auf Grund der gegenseitigen Abstoßung der positiven Ladungen [203].

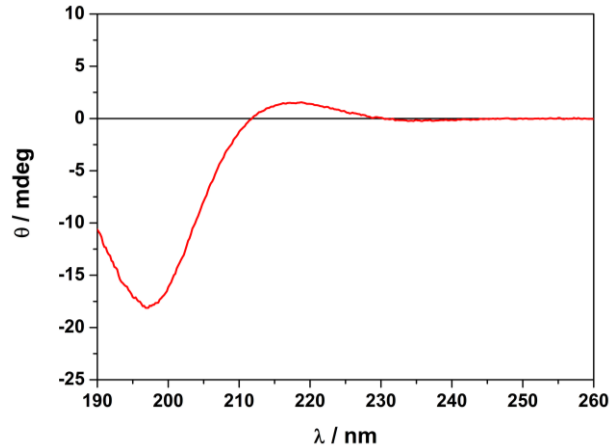


Abb. 40: CD-Spektrum von PLL-HBr in Wasser mit $c = 0,13 \text{ g/L}$ bei 20°C

4.1.3. Zusammenfassung

Es können zwei verschiedene Makroinitiatoren hergestellt und charakterisiert werden, deren Polymerisationsgrad hoch genug ist, um später Bürsten mit zylindrischen Strukturen zu erzeugen. PAHMA-TFA wird mittels RAFT-Polymerisation synthetisiert und besitzt mit $\text{PDI} = 1,64$ eine akzeptable Polydispersität für seine Molmasse von $M_w = 370.000 \text{ g/mol}$. Das bioabbaubare PLL-Hydrobromid wird kommerziell erworben und besitzt mit einem Polymerisationsgrad von ca. $P_w = 2812$ fast doppelt so viele Endgruppen wie PAHMA. Allerdings kann die breite Polymerverteilung bei späteren biologischen Anwendungen zu Problemen führen. Die Charakteristika beider Makroinitiatoren sind noch einmal in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Charakteristika der beiden hergestellten Makroinitiatoren

Makroinitiator	R_h / nm	R_g / nm	M_w / $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	P_w	R_g/R_h	A_2 / $\text{mol}\cdot\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-2}$	PDI
PAHMA-TFA	19,2	31,3	$3,7\cdot 10^5$	1240	1,63	$2,5\cdot 10^{-4}$	1,64
PLL-HBr	38,6	57,6	$5,9\cdot 10^5$	2812	1,49	$6,8\cdot 10^{-5}$	(2,30)

4.2. N-Carboxy-Anhydride

Für die Herstellung der Polypep(o)tid-Seitenketten der Bürste werden N-Carboxy-Anhydride benötigt. Diese lassen sich gut mittels der Fuchs-Farthing-Methode darstellen, bei der über Phosgen der Ringschluss einer Aminosäure erfolgt. In dieser Arbeit wird jedoch auf die Verwendung des gasförmigen und hochgefährlichen Phosgens verzichtet und stattdessen auf leichter handhabbares Di- oder Triphosgen zurückgegriffen [70,71], welches erst durch Thermolyse im Reaktionsgefäß zu den entsprechenden Äquivalenten an Phosgen zerfällt (Abb. 41).

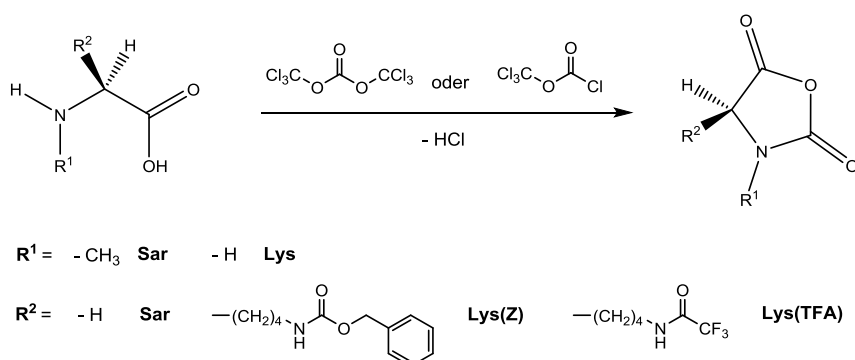


Abb. 41: Reaktionsschema für die Herstellung der N-Carboxy-Anhydride

Mit Hilfe von Lysinen lassen sich Polypeptide generieren, die später positive Ladungen enthalten. Da die ϵ -Amin-Gruppen des Lysins auch mit Phosgen reagieren oder gar selbst eine Polymerisation initiieren können, müssen diese während der Reaktion im geschützten Zustand vorliegen. Deswegen wird in dieser Arbeit kommerziell erhältliches Z- (Benzyloxycarbonyl) und TFA- (Trifluoracetyl) geschütztes Lysin zum jeweiligen NCA umgesetzt. Für die Polymerisation eines hydrophilen Blocks mit der Fähigkeit zum „Stealth“-Effekt dient Sarkosin-NCA (siehe Kapitel 2.3.3). Da bei der Reaktion zahlreiche Nebenprodukte entstehen, die eine spätere Polymerisation stark stören (siehe Kapitel 2.2.3), ist eine intensive Aufreinigung der NCA-Monomere unumgänglich. Wegen ihrer hohen Sensitivität gegenüber Feuchtigkeit, Wärme und Nukleophilen ist eine Aufreinigung über Säulenchromatographie aber nur schwer möglich [204]. Lysin-NCA wird daher mehrmals aus einem trockenen Hexan/Ethylacetat-Gemisch umkristallisiert. Sarkosin-NCA bietet den großen Vorteil, dass es über Sublimation in einer hochreinen Form erhalten werden kann.

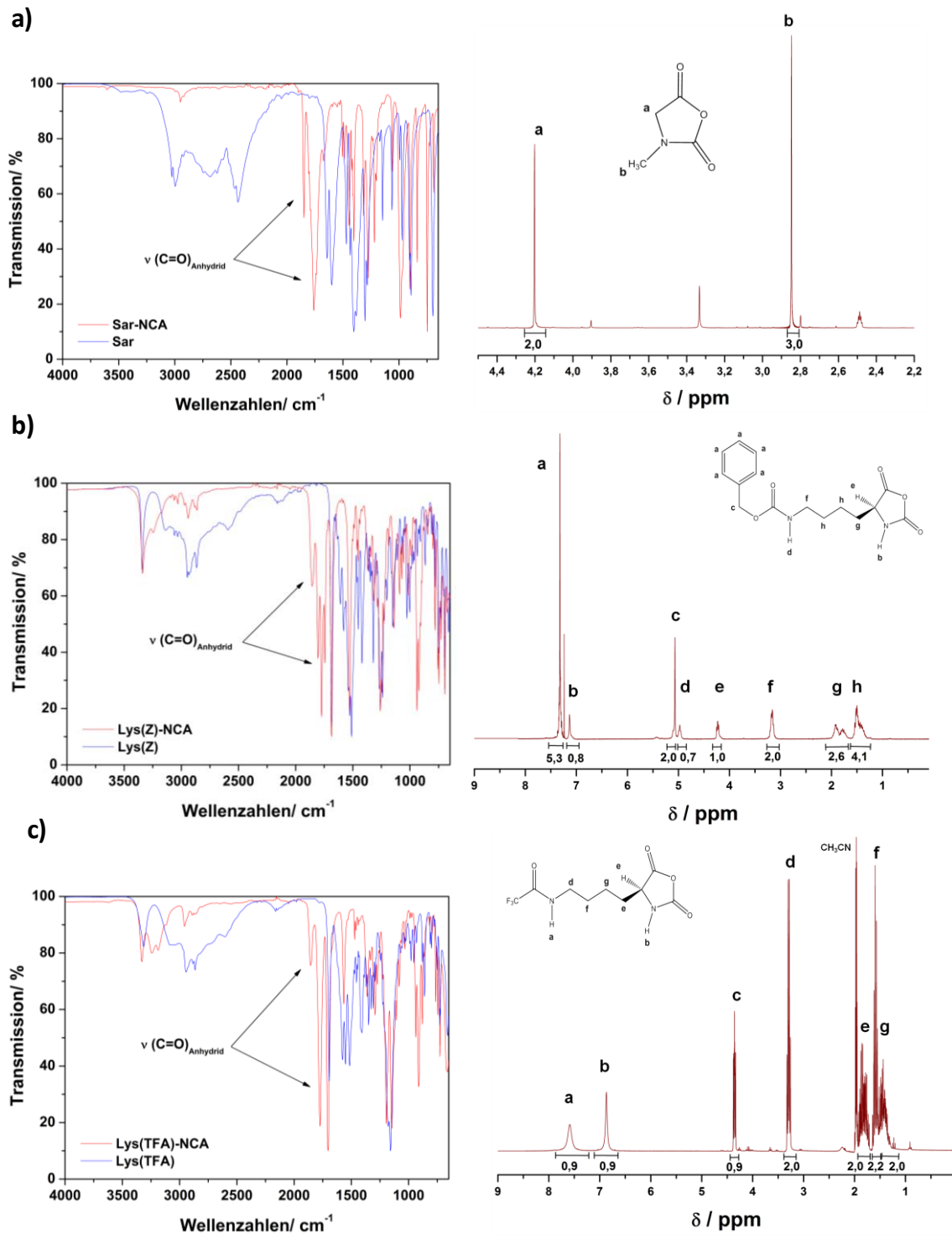


Abb. 42: a) FT-IR-Spektrum und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (DMSO-d_6 , 300 MHz, 293 K) von Sar-NCA b) FT-IR-Spektrum und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3 , 300 MHz, 293 K) von Lys(Z)-NCA c) FT-IR-Spektrum und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CD_3CN , 300 MHz, 293 K) von Lys(TFA)-NCA

Die erfolgreiche Synthese aller drei NCA lässt sich über IR- und NMR-Spektroskopie belegen (Abb. **42**). Vergleicht man die IR-Spektren der N-Carboxy-Anhydride mit den korrespondierenden Aminosäuren, tauchen bei ungefähr 1850 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} zwei neue Banden auf, die charakteristisch für zyklische Anhydride sind (asymmetrische + symmetrische Carbonyl-Streckschwingung). Im ^1H -NMR-Spektrum ist vor allem das Signal des Ringprotons im Bereich von 4,2 bis 4,5 ppm ein eindeutiges Zeichen für einen erfolgreichen Ringschluss. Zum Teil sind unbekannte Signale mit niedriger Intensität in den Spektren zu erkennen. Diese müssen nicht von Verunreinigungen im Monomer stammen, sondern lassen sich auch durch die Reaktion von NCA mit geringen Spuren an Wasser im deuterierten Lösungsmittel erklären.

4.3. Poly(Sarkosin)-Bürsten

Polysarkosin gilt, wie schon zuvor in Kapitel 2.3.3 beschrieben, als potentielle Alternative für Polyethylenglycol (PEG), da es über einen ausgeprägten „Stealth“-Effekt verfügt und somit Proteinwechselwirkungen im Körper minimieren kann. Bisher wurde eine Reihe von Nanocarriern mit Polysarkosin als Bestandteil veröffentlicht [121-124]. Jedoch existieren bislang noch keine Arbeiten über molekulare, zylindrische Sarkosinbürsten, obwohl die längliche Form gepaart mit der guten Verträglichkeit durch den „Stealth“-Effekt und der hohen Dichte an funktionellen Gruppen die Polymere sehr interessant für die Verwendung als „Drug Delivery“-Systeme machen (siehe Kapitel 2.4.5). Die nächsten Unterkapitel beschäftigen sich deshalb mit der „grafting from“-Synthese solcher Strukturen über den PAHMA- bzw. PLL-Makroinitiator, sowie deren Charakterisierung und anschließender Azidfunktionalisierung.

4.3.1. PSar^{PAHMA}-Bürste

Für die Synthese der Polysarkosinbürste wird der PAHMA-Makroinitiator in reinem DMF gelöst und mit Sarkosin-NCA bei 45°C unter Argon-Atmosphäre umgesetzt. Der Polymerisationsgrad der Seitenkette wird unter der Annahme einer vollständigen Umsetzung aller Initiatorgruppen durch das Monomer-Initiator-Verhältnis $[M]/[I] = 53$ eingestellt.

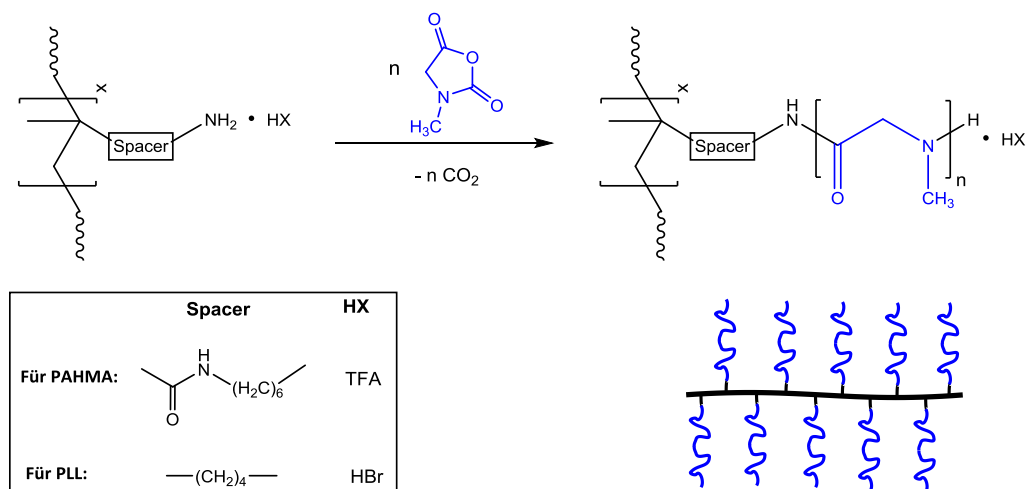


Abb. 43: Reaktionsgleichung der Polysarkosinbürste basierend auf den PAHMA- bzw. PLL-Makroinitiator

Nach drei Tagen wird die DMF-Reaktionslösung mittels DMF-GPC analysiert (Abb. 44a). Dabei zeigt sich durch die Integration des RI-Signals (siehe Kapitel 4.5.1.1), dass das Sarkosin-NCA fast vollständig in den Makroinitiator eingebaut wurde und nur ca. 5% lineare Verunreinigungen mit einer Molmasse von $M_w = 2200$ g/mol entstanden sind. Diese können z.B. durch den Zerfall von DMF zu Dimethylamin während der Reaktion initiiert worden sein oder von minimalen Mengen an unverbrauchtem NCA stammen, welches während des GPC-Säulendurchgangs durch dort befindliche Nukleophile polymerisiert wurde. Der AM-Mechanismus kann auf Grund des methylierten Stickstoffs ausgeschlossen werden. Die apparente Polydispersität des Bürstensignals beträgt $PDI = 1,72$ (Polystyrolkalibrierung). Nach der Fällung in Diethylether ist die Sarkosinbürste sehr gut in Methanol, HFIP und Wasser löslich.

Tabelle 4: Eingestellter und aus der GPC erhaltener, mittlerer Polymerisationsgrad der $PSar^{PAHMA}$ -Bürste sowie ihr Löslichkeitsverhalten

Bürste	P_{Sar} (theo.)	σ_{Sar} (GPC)	P_{Sar} (GPC)	Löslichkeit
$PSar^{PAHMA}$	53	95%	50	MeOH, H ₂ O, DMF, HFIP

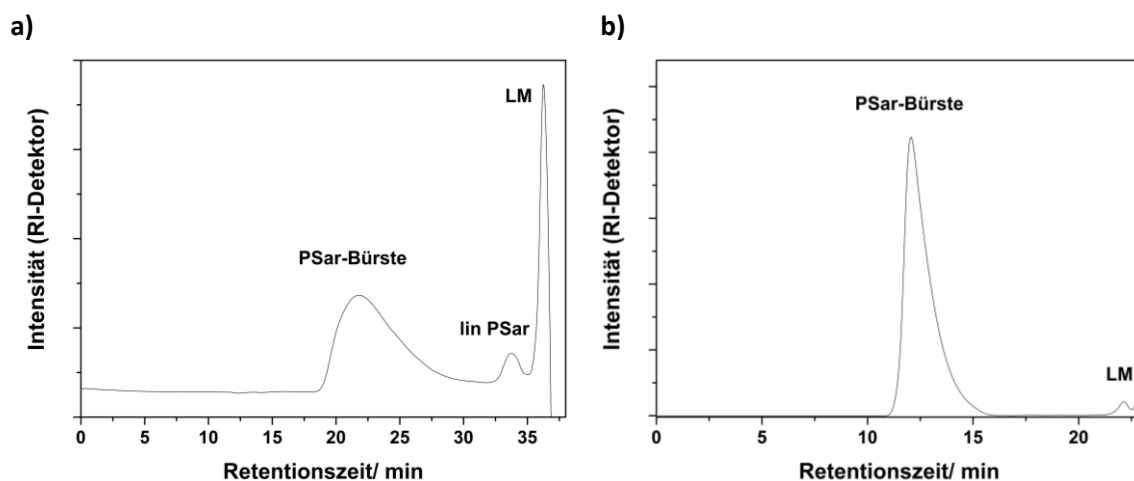


Abb. 44: GPC-Elutionsdiagramm von **a)** der $PSar^{PAHMA}$ -Reaktionslösung in DMF (PS-Kalibrierung, Polymersäule) und **b)** der aufgereinigten $PSar^{PAHMA}$ -Bürste in HFIP (PMMA-Kalibrierung). LM = Lösungsmittel

Um die kleinen, linearen Bestandteile abzutrennen, wird die Bürste über Amicon-Zentrifugation (Ausschlussgrenze $M = 50$ kDa) in Wasser aufgereinigt. Dabei entsteht ein Ausbeuteverlust von fast 50% durch attraktive Wechselwirkungen der leicht positiv

geladenen Sarkosinbürste mit der Amicon-Membran. Dafür kann aber der niedermolekulare Rest erfolgreich abgetrennt werden, wie in der HFIP-GPC zu sehen ist (Abb. 44b). Die apparente Polydispersität der Bürste beträgt $PDI = 1,68$ (PMMA-Kalibrierung) und ähnelt der Verteilung des eingesetzten PAHMA-Makroinitiators.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt zwei breite Signale der Methylen- und Methylgruppen der Polysarkosin-Seitenketten im Verhältnis von 2:3 (Abb. 45). Protonen des Rückgrats sind wegen ihrer geringen Zahl im Vergleich zu den Sarkosin-Wiederholungseinheiten nicht zu erkennen, sodass mit $^1\text{H-NMR}$ keine Aussage über den mittleren Polymerisationsgrad durch Integration der Signale möglich ist.

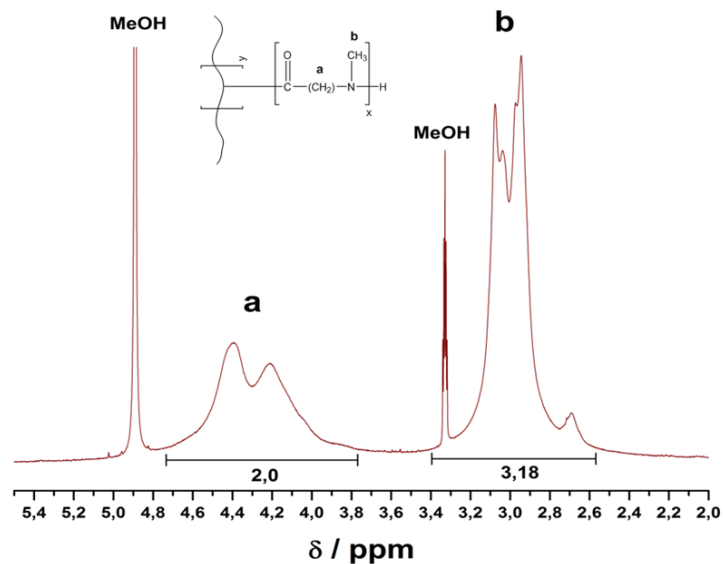


Abb. 45: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{PSar}^{\text{PAHMA}}$ in MeOD (300 MHz, 293 K)

Als Nachweis für die Entstehung zylindrischer Strukturen dient die Rasterkraftmikroskopie (Abb. 46a). Die in Wasser durch Spin Casting aufgetragene Probe zeigt längliche, wurmartige Polymere und beweist somit die erfolgreiche Synthese von zylindrischen Polysarkosinbürsten. Wegen der erhöhten Polydispersität des Makroinitiators sind auch kleinere Bürstenstrukturen erkennbar. Das Ausmessen von ungefähr 200 Bürsten liefert eine mittlere Konturlänge von $L_n = 118,6 \text{ nm}$ und $L_w = 178,2 \text{ nm}$.

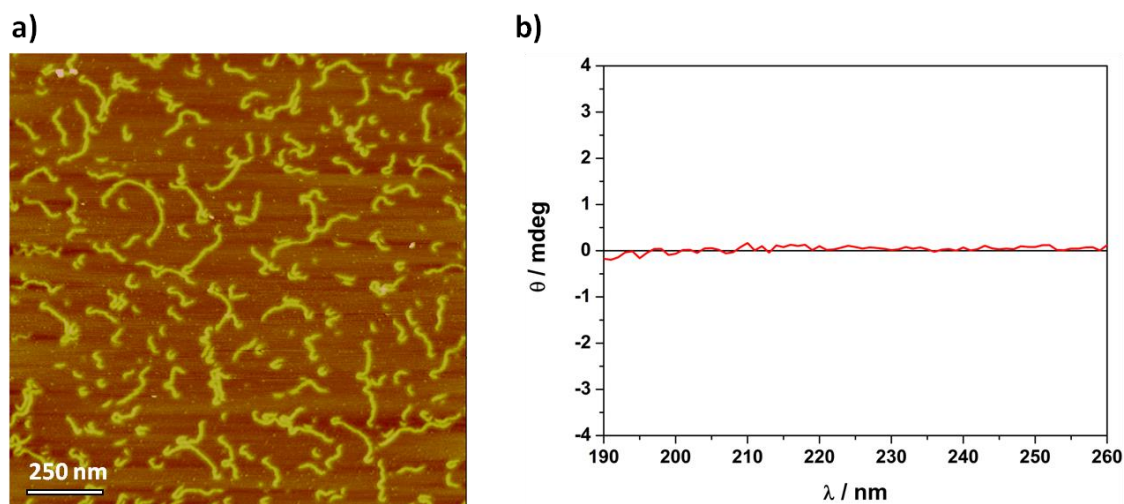


Abb. 46: a) AFM-Aufnahme (Höhenbild) der PSar^{PAHMA}-Bürste auf Mica (Spin Casting mit $c = 0,005$ g/L in MeOH) b) CD-Spektrum von PSar^{PAHMA} in Wasser mit $c = 0,1$ g/L bei 20°C

Die Polysarkosinbürste wird weiter in der dynamischen und statischen Lichtstreuung charakterisiert (Abb. 47). Der Verlauf des hydrodynamischen Radius der Bürste ist kaum konzentrationsabhängig und beträgt in MeOH (5 mM LiBr) bei unendlicher Verdünnung $R_{h,c=0} = 40,4$ nm. Die statische Lichtstreuung ermittelt einen Trägheitsradius von $R_g = 64$ nm bei einer Molmasse von $M_w = 4,92 \cdot 10^6$ g/mol. Der zweite Virialkoeffizient A_2 ist schwach positiv. Sowohl der hydrodynamische Radius als auch der Trägheitsradius haben sich im Vergleich zum reinen Makroinitiator nahezu verdoppelt und zeigen, dass sich die Topologie von Knäuel zu Stäbchen stark verändert hat.

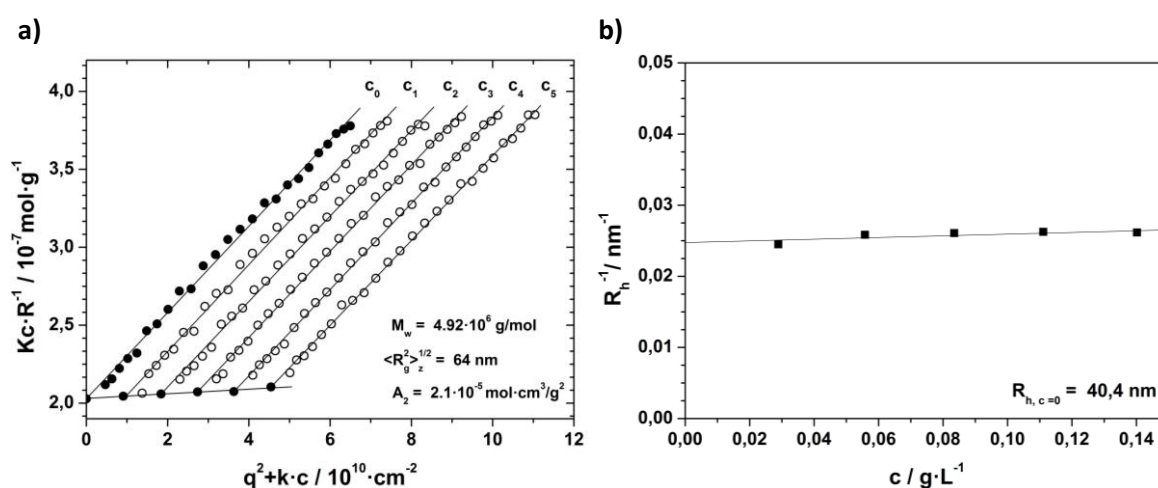


Abb. 47: Charakterisierung von PSar^{PAHMA} in MeOH (5 mM LiBr) mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung bei 20°C: a) Zimm-Plot im Bereich von 30° und 150° (5°-Schritte) mit $c_1 = 0,061$ g/L, $c_2 = 0,091$ g/L, $c_3 = 0,121$ g/L, $c_4 = 0,151$ g/L und $dn/dc = 0,1915$ cm³/g b) Bestimmung von $R_{h,c=0}$ durch Extrapolation der reziproken hydrodynam. Radien verschiedener Konzentrationen in MeOH (5 mM LiBr)

Da das Molekulargewicht des Makroinitiators aus Kapitel 4.1.1 bekannt ist, kann das theoretisch erwartete Molekulargewicht der Bürste mit dem experimentell ermittelten verglichen werden. Die theoretische Molmasse M_w^B der Bürste setzt sich dabei zusammen aus dem Gewichtsmassenmittel der Hauptkette M_w^{Hk} und dem Gewichtsmassenmittel aller Seitenketten, welches durch Multiplikation der Molmasse einer Seitenkette M_n^{Sk} mit der Zahl aller vorhandenen Initiatorgruppen in der Bürste errechnet werden kann. Die Gesamtzahl der Initiatorgruppen ist dabei gegeben durch das Gewichtsmittel des Polymerisationsgrades der zu Grunde liegenden Hauptkette P_w^{Hk} :

$$M_w^B = M_n^{Sk} \cdot P_w^{Hk} + M_w^{Hk} \quad (24)$$

Das Gewichtszahlenmittel einer Seitenkette errechnet sich aus dem realen, mittleren Polymerisationsgrad P_n^{Sk} , der durch die Betrachtung des GPC-Flächenanteils der Bürste σ mit dem eingestellten Monomer-zu-Initiator-Verhältnisses ermittelt werden kann, multipliziert mit der Molmasse der Wiederholungseinheit der eingebauten Aminosäure M_{Sk}^{Wdh} :

$$M_w^{Sk} = P_n^{Sk} \cdot M_{Sk}^{Wdh} = \frac{[NCA]}{[I]} \cdot \sigma \cdot M_{Sk}^{Wdh} \quad (25)$$

Eingesetzt in Formel (24) erhält man:

$$M_w^B = \frac{[NCA]}{[I]} \cdot \sigma \cdot M_{Sk}^{Wdh} \cdot P_w^{Hk} + M_w^{Hk} \quad (26)$$

Mit $M_{Sk}^{Wdh} = 71,08$ g/mol für die Sarkosin-Wiederholungseinheit, $P_w^{Hk} = 1240$ sowie $M_w^{Hk} = 370.000$ g/mol als Parameter für den PAHMA-Makroinitiator und unter Berücksichtigung, dass laut GPC 95% des eingesetzten Sarkosin-NCA eingebaut wurde ($\sigma = 0,95$), kann mit Formel (26) ein theoretisches Gewichtsmassenmittel der Sarkosinbürste von $M_w^B = 4,83 \cdot 10^6$ g/mol berechnet werden. Dieser stimmt sehr gut mit dem experimentell ermittelten Wert von $M_w = 4,92 \cdot 10^6$ g/mol aus der statischen Lichtstreuung überein.

Zum Schluss wird die Bürste noch in einer wässrigen Lösung mittels CD-Spektroskopie analysiert (Abb. 46b). Wie zu erwarten zeigt die Polysarkosinbürste auf Grund des

Fehlens von chiralen Gruppen keine Absorptionsdifferenz zwischen links- und rechtszirkular polarisiertem Licht. Dies kann später dazu genutzt werden, um bei Diblockbürsten mittels CD-Spektroskopie den Lysingehalt zu bestimmen (siehe Kapitel 4.5.1.2).

4.3.2. PSar^{PLL}-Bürste

Die Synthese der Polysarkosinbürste wird mit dem PLL-HBr-Makroinitiator wiederholt. Allerdings ist die Verwendung von entschütztem Polylysin komplexer, da es sich zwar sehr gut in Wasser, aber nur schwer in den meisten organischen Lösungsmitteln löst. Eine Ausnahme bildet DMSO, sofern PLL mehrere Tage darin gelöst wird. DMSO ist zwar als aprotisches Lösungsmittel im Allgemeinen für die NCA-Polymerisation geeignet, jedoch löst sich die PSar^{PAHMA}-Bürste aus Kapitel 4.3.1 nicht darin. Damit es zu keiner ungewollten Ausfällung der Bürste während der Reaktion kommt, wird zu der PLL-DMSO-Lösung trockenes DMF getropft, bis ein Volumenverhältnis (DMSO/DMF) von 1:3 erreicht ist. Da DMF ein schlechtes Lösungsmittel für PLL-HBr darstellt, muss die DMF-Zugabe sehr langsam erfolgen, um es in Lösung zu halten. Danach wird Sarkosin-NCA zugegeben und drei Tage unter Argon-Atmosphäre bei 45°C polymerisiert. Der Polymerisationsgrad wird unter der Annahme, dass eine 100%ige Initiierung stattfindet, auf $P_{\text{Sar}} = 52$ eingestellt.

Das Gelpermeationschromatogramm der Reaktionslösung in DMF zeigt, dass keine linearen Verunreinigungen entstanden sind (Abb. **48a**). Analysiert man hingegen die gefällte Bürste in der besser aufgelösten HFIP-GPC, erkennt man, dass ein kleiner Teil des Makroinitiators nicht oder nur wenig mit NCA reagiert hat (Abb. **48b**). Ursache hierfür ist wahrscheinlich das partielle oder vollständige Ausfallen einiger PLL-Ketten in dem schlechteren Lösungsmittel DMF trotz langsamer Transferierung. Betrachtet man das Flächenverhältnis im RI-Signal, fallen 91,6% der Fläche auf die Sarkosinbürste. Die apparente Polydispersität der Bürste liegt ohne Berücksichtigung des niedermolekularen Signals bei $PDI = 1,73$ (PMMA-Kalibrierung). Allerdings wird die Verteilung wegen der Bürstenelution nahe der oberen Ausschlussgrenze und durch das Abschneiden des niedermolekularen Peaks verfälscht. Die unverbrauchten Makroinitiatorreste sind so

groß, dass sie auch durch anschließende Amicon-Zentrifugation mit einer Ausschlussgrenze von $M = 100$ kDa nicht abgetrennt werden können.

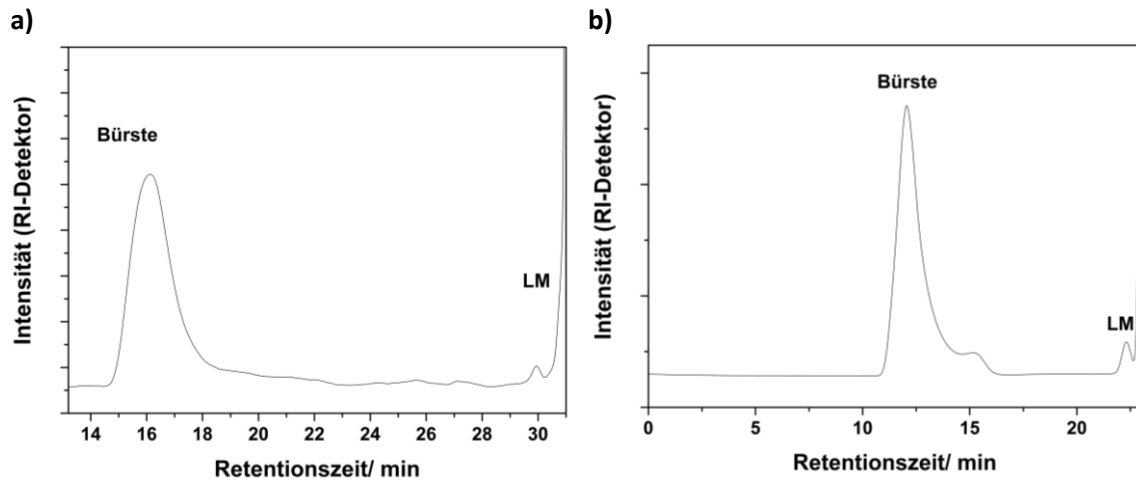


Abb. 48: GPC-Elutionsdiagramm von **a)** der PSar^{PLL} -Reaktionslösung in DMF (PS-Kalibrierung, Oligomersäule) und **b)** der gefällten PSar^{PLL} -Bürste in HFIP (PMMA-Kalibrierung). LM = Lösungsmittel

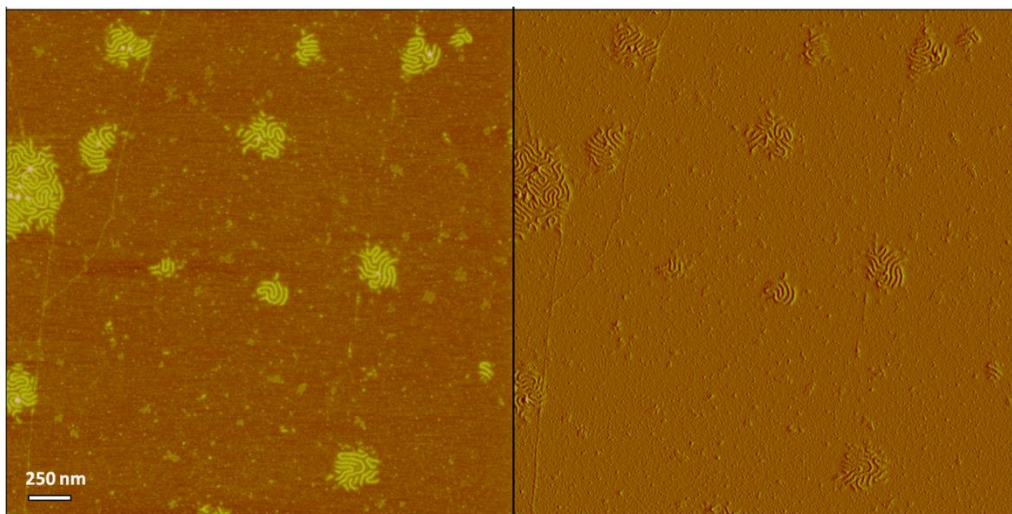


Abb. 49: AFM-Aufnahme der PSar^{PLL} -Bürste auf Mica (Spin Casting mit $c = 0,01$ g/L in H_2O). Links: Höhenbild; Rechts: Amplitudenbild

Auch PSar^{PLL} besitzt eine zylindrische Konformation, wie sich in der AFM-Aufnahme in **Abb. 49** erkennen lässt. Unter den langen, wurmartigen Bürstenpolymeren sieht man aber auch zahlreiche kleinere Strukturen, die mitunter von den nur gering umgesetzten Makroinitiatorketten stammen können. Dieser Versuch zeigt dennoch, dass aus hochmolekularem PLL unter geeigneten Bedingungen zylindrische Bürsten erzeugt werden können („proof of concept“). Im Vergleich zu der Aufnahme von $\text{PSar}^{\text{PAHMA}}$

erscheint PSar^{PLL} trotz des doppelt so großen Polymerisationsgrades im AFM nicht wesentlich größer. Eventuell liegt die Bürste nicht vollends gestreckt vor, da sie eine geringere Pfropfungsdichte besitzt. Allerdings widerspricht der gemessene hydrodynamische Radius der Bürste von $R_{h,c=0} = 63,5$ nm dieser Annahme (Abb. 50b). Im Vergleich zum reinen PLL-Makroinitiator ist der hydrodynamische Radius um das 1,6-fache gestiegen und weist eindeutig eine stark elongierte Konformation auf.

Für die statische Lichtstreuung in PBS-Puffer wird die eingewogene Massenkonzentration auf den tatsächlichen Anteil der hochmolekularen Bürste korrigiert (91,6% laut HFIP-GPC). Außerdem wird für die Messung in PBS das in MeOH ermittelte Brechungsinkrement von PSar^{PAHMA} verwendet, da sich der Brechungsindex von Wasser und Methanol bei 20°C kaum unterscheiden ($n_{MeOH} = 1,329$; $n_{H_2O} = 1,330$) und die Einflüsse der unterschiedlichen Makroinitiatoren auf das Brechungsinkrement wegen des hohen Sarkosinanteils vernachlässigbar sind. Man erhält nach Korrektur ein Molekulargewicht von $M_w = 10,4 \cdot 10^6$ g/mol sowie einen Trägheitsradius von $R_g = 97,7$ nm (Abb. 50a). Der zweite Virialkoeffizient A_2 ist schwach negativ.

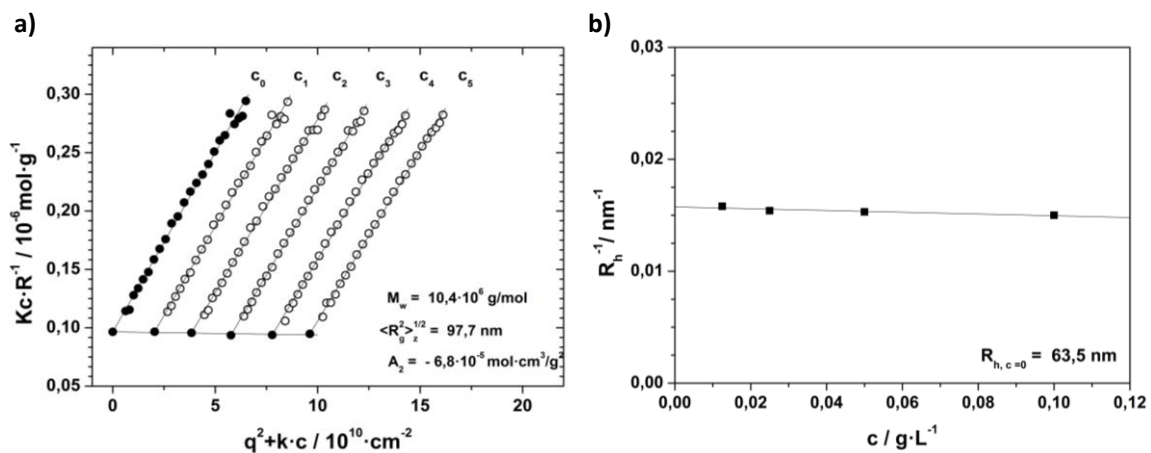


Abb. 50: Charakterisierung von PSar^{PLL} in PBS-Puffer mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung bei 20°C: **a)** Zimm-Plot im Bereich von 30° und 150° (5°-Schritte) mit $c_1 = 4$, mg/L, $c_2 = 7,7$ mg/L, $c_3 = 11,5$ mg/L, $c_4 = 15,6$ mg/L, $c_5 = 19,2$ mg/L und $dn/dc = 0,1915 \text{ cm}^3/\text{g}$ **b)** Bestimmung von $R_{h,c=0}$ durch Extrapolation der reziproken hydrodynamischen Radien verschiedener Konzentrationen in PBS

Das theoretisch erwartete Massengewichtsmittel der PSar^{PLL}-Bürste lässt sich auch hier wieder mit Formel (26) berechnen, wenn man die Werte für den PLL-Makroinitiator $P_w^{Hk} = 2812$ und $M_w^{Hk} = 590.000 \text{ g/mol}$ und den eingestellten, mittleren

Polymerisationsgrad der Polysarkosin-Seitenketten $P^{Sk} = 52$ einsetzt. Man erhält für das theoretische Massengewichtsmittel der Bürste den Wert $M_w^B = 11,0 \cdot 10^6$ g/mol, der nur ungefähr 5,5% von dem experimentell ermittelten Wert aus der statischen Lichtstreuung abweicht.

Auf Grund der optischen Aktivität des PLL-Makroinitiators wird die PSar^{PLL}-Bürste mittels CD-Spektroskopie in wässriger Lösung untersucht (Abb. 51). Wegen des geringen PLL-Bestandteils ist die erhaltene Elliptizität nur schwach ausgeprägt. Trotzdem kann man einen Verlauf erkennen, der für Helixstrukturen charakteristisch ist.

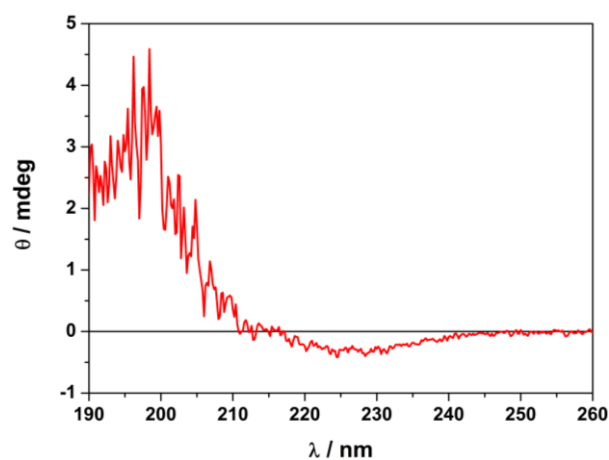


Abb. 51: CD-Spektrum von PSar^{PLL} in Wasser mit $c = 0,15$ g/L bei 20°C

4.3.3. Azidfunktionalisierung

Sollen die Sarkosinbürsten später als medizinische „Drug Delivery“-Systeme, z.B. in der Krebsimmuntherapie verwendet werden, müssen neben Farbstoffen für das Monitoring auch bioaktive Substanzen wie Antikörper, Antigene oder CpG an die Bürste angebracht werden. Die freien Aminendgruppen der Polysarkosin-Seitenketten eignen sich

besonders gut für die Aktivesterkonjugation, beispielsweise mit NHS-Estern [205]. Die Konjugation mittels NHS wird in wasserfreien Lösungsmitteln durchgeführt, weil der Umsatzverlust in Wasser durch die schnelle Hydrolyse der Aktivester hoch ist. Da aber die meisten Proteinstrukturen in organischen Lösungsmitteln ihre Bioaktivität durch irreversible Umfaltungen verlieren [206], ist ihre Umsetzung nur in Wasser unter Einsatz großer Überschüsse des meist kostspieligen NHS-Esters möglich. Eine andere, vielversprechende Biokonjugationsvariante stellt die Klickchemie von Aziden mit Alkinen dar. Die 1,3-dipolare Cycloaddition kann auch ohne die biologisch schädlichen Cu(I)-Katalysatoren [207] bei Raumtemperatur durchgeführt werden, indem die Ringspannung cyclischer Oktinverbindungen ausgenutzt wird [208,209]. Die Reaktion ist hochspezifisch und liefert auch in Wasser hohe Umsätze. Deswegen werden die hergestellten Polysarkosinbürsten $\text{PSar}^{\text{PAHMA}}$ und PSar^{PLL} für eine spätere, effiziente und verträgliche Biokonjugation mit Azidgruppen funktionalisiert. Hierfür eignet sich besonders die Carbonyldiimidazol-unterstützte Reaktion der Aminogruppen mit Azidoessigsäure. Dabei wird in einer „One pot“-Synthese zuerst Azidoessigsäure mit CDI zu einem aktivierten Acylimidazol-Derivat umgesetzt, welches dann in einem zweiten Schritt mit den Aminendgruppen der Bürste reagiert [210].

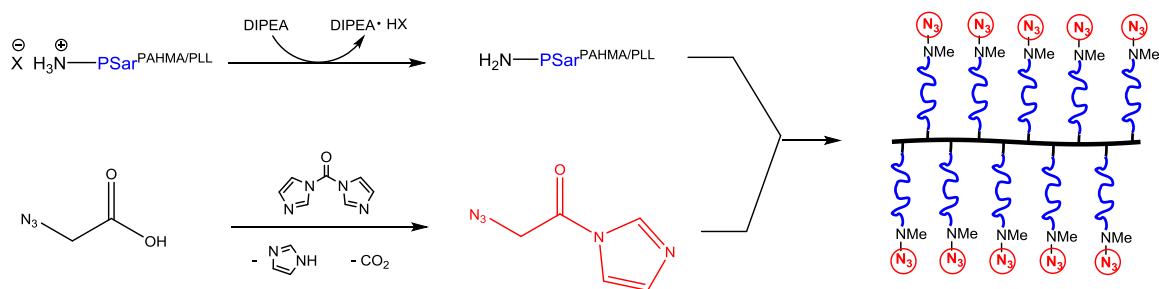


Abb. 52: Reaktionsschema für die Azidfunktionalisierung der auf PAHMA- bzw. PLL- basierenden Polysarkosinbürsten

Im letzten Schritt bewährt sich die Zugabe einer äquivalenten Menge von Diisopropylethylamin (DIPEA), welche die Ammoniumendgruppen der Seitenketten deprotoniert und somit für den nukleophilen Angriff an das Acylimidazol-Derivat aktiviert.

Die Reaktion wird in wasserfreiem DMF durchgeführt, sodass eine Hydrolyse der reaktiven Substanzen vermieden wird. Alle verwendeten Edukte sind kostengünstig und können in einem großen Überschuss eingesetzt werden, um die Kopplungswahrscheinlichkeit zu erhöhen. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass im Verhältnis mehr Azidoessigsäure als CDI vorgelegt wird, um die Reaktion zwischen nicht umgesetztem CDI und der Bürste und einer damit einhergehenden Verbrückung zu verhindern. Überschüssige niedermolekulare Edukte und Nebenprodukte können nach der Reaktion mit Hilfe der Amicon-Zentrifugation (Ausschlussgrenze $M = 50$ kDa) in Wasser leicht von der Bürste abgetrennt werden. Im IR-Spektrum der aufgereinigten, azidfunktionalisierten Bürsten lässt sich bei 2100 cm^{-1} die typische Azidschwingungsbande erkennen (Abb. 53). Die Verwendung von DIPEA ist der Schlüsselschritt für eine hohe Azidfunktionalisierung.

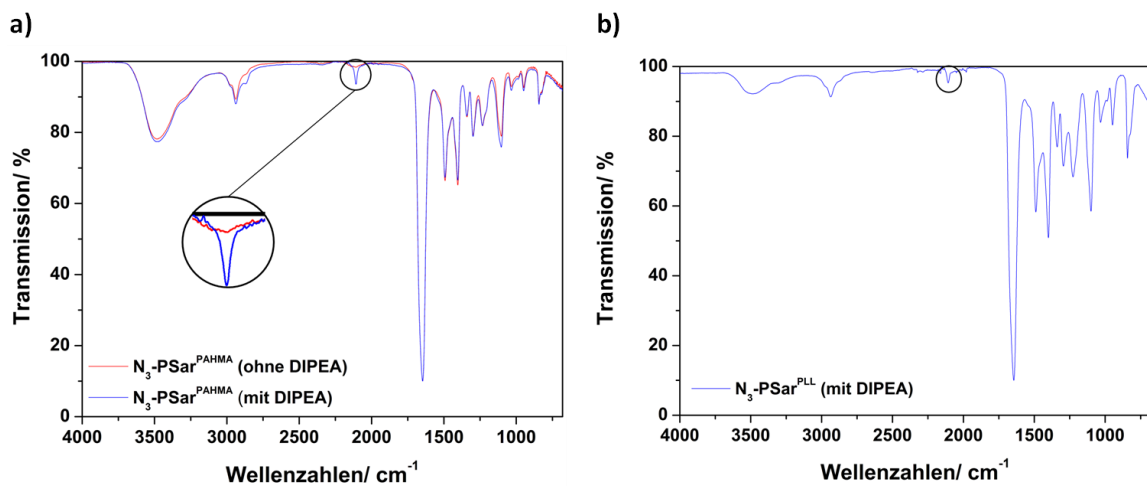


Abb. 53: a) FT-IR-Spektrum der aufgereinigten N_3 -PSar^{PAHMA}-Bürste nach der Azidfunktionalisierung mit (blau) und ohne (rot) DIPEA-Zusatz b) FT-IR-Spektrum der aufgereinigten N_3 -PSar^{PLL}-Bürste nach der Azidfunktionalisierung mit DIPEA-Zusatz

Um die maximale Zahl aller erreichbaren Azidgruppen zu ermitteln, werden in der Diplomarbeit von [REDACTED] die funktionalisierten Polysarkosinbürsten N_3 -PSar^{PAHMA} und N_3 -PSar^{PLL} mit einem Überschuss an Alexa Fluor 488 DIBO-Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe der kupferfreien Klickchemie markiert. Unter der Berücksichtigung der auftretenden Fluoreszenzquenching-Effekte kann über

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) eine mittlere Anzahl von 275 Farbstoffen pro Polymerbürste für PSar^{PAHMA} und 86 Farbstoffe für PSar^{PLL} detektiert werden, was bei einem 100%igen Farbstoffumsatz 275 bzw. 86 Azidgruppen pro Polymer entspricht. Für die Bestimmung des prozentualen Azidgehalts in der Bürste, wird die Anzahl aller Seitenketten in der Bürste benötigt. Unter Annahme einer 100%igen Pfropfdichte entspricht diese dem Zahlenmittel des Polymerisationsgrades der Hauptkette P_n^{Hk} , welcher wiederum über das Gewichtsmittel des Polymerisationsgrads P_w des zu Grunde liegenden Makroinitiators (Ini.) und dessen Polydispersität bestimmt werden kann:

$$P_n^{Hk}(Bürste) = P_n(Ini) = \frac{P_w(Ini)}{PDI(Ini.)} \quad (27)$$

Man erhält für PSar^{PAHMA} ungefähr eine Azidgruppe an jeder 3. Seitenkette (36%) und für PSar^{PLL} ca. eine Azidgruppe an jeder 14. Seitenkette (7%). Hierbei ist zu beachten, dass der PDI des PLL-Makroinitiators nicht genau bekannt ist und auf 2,3 angenommen wurde. Für Bürsten, die durch „grafting from“ erhalten werden, ist die Annahme einer 50%igen Pfropfungsdichte meist wesentlich realistischer. Demzufolge verdoppelt sich der Grad der Azidfunktionalisierung für PSar^{PAHMA} auf 72% und für PSar^{PLL} auf 14%. Es bleibt ungeklärt, warum die PSar^{PLL}-Bürsten weitaus weniger effizient funktionalisiert werden können. Allerdings reicht die erhaltene Anzahl der Azidgruppen in der Regel für eine effektive Biokonjugation mit Antikörpern, Antigenen usw. aus.

Wie in Tabelle 5 ersichtlich, unterscheidet sich der hydrodynamische Radius der N₃-PSar^{PAHMA}-Bürste aus der aufgereinigten, wässrigen Lösung zunächst nicht von dem der reinen Bürste. Trotz Anbringung hydrophober Azid-Reste tritt also keine Aggregation ein. Erst nachdem die Bürstenlösung gefriergetrocknet wurde, kann eine leichte Aggregation nach dem Wiederauflösen in Wasser detektiert werden. Der hydrodynamische Radius steigt um 12 nm an, d.h. die Autokorrelationsfunktion verschiebt sich in Richtung größerer Aggregate. Die Küvette wird insgesamt 10 Tage stehen gelassen und immer wieder vermessen. Wie man in Abb. 54 erkennt, lösen sich mit der Zeit die Aggregate langsam wieder auf und die Autokorrelationsfunktion nähert sich stetig an die der nicht gefriergetrockneten Probe an.

Tabelle 5: Der ermittelte hydrodynamische Radius R_h der azidfunktionalisierten N_3 -PSar^{PAHMA}-Bürste nach verschiedenen Behandlungsstadien (direkt nach der Aufreinigung oder nach Gefriertrocknung mit verschiedenen Lösungszeiten) im Vergleich zur reinen, gefriergetrockneten PSar^{PAHMA}-Bürste. Die vorgelegte Konzentration beträgt bei allen Messungen 0,02 g/L in PBS-Puffer

Bürste	Behandlung	Lösungszeit/ h	R_h / nm
PSar ^{PAHMA}	Nach Gefriertrocknung	2h	40,4
N_3 -PSar ^{PAHMA}	Nach Aufreinigung	-	39,5
N_3 -PSar ^{PAHMA}	Nach Gefriertrocknung	2h	51,9
N_3 -PSar ^{PAHMA}	Nach Gefriertrocknung	24h	48,2
N_3 -PSar ^{PAHMA}	Nach Gefriertrocknung	48h	45,4
N_3 -PSar ^{PAHMA}	Nach Gefriertrocknung	240h	40,8

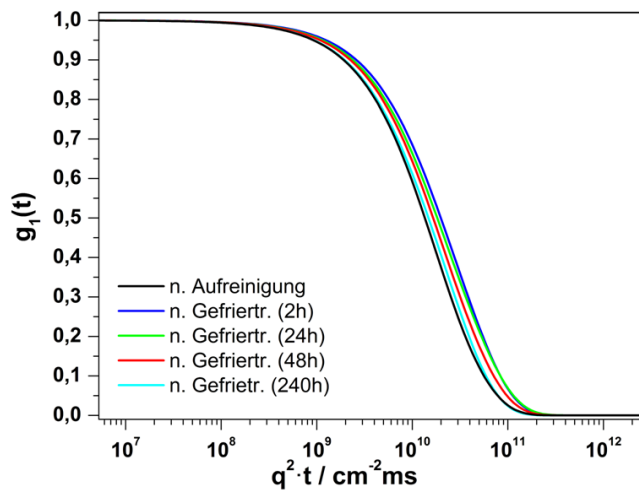


Abb. 54: Biexponentielle Fit-Funktionen der Autokorrelationsfunktionen der aufgereinigten N_3 -PSar^{PAHMA}-Bürste vor und nach der Gefriertrocknung mit verschiedenen Lösungszeiten in PBS-Puffer ($c = 0,02$ g/L) bei 30°

4.3.4. Zusammenfassung

Polysarkosinbürsten können mit Hilfe der ringöffnenden NCA-Polymerisation ausgehend von einem PAHMA- bzw. PLL-Makroinitiator in hohen Ausbeuten und mit guter Kontrolle über den Polymerisationsgrad hergestellt werden. Sie folgen dabei wegen ihres methylierten Stickstoffs ausschließlich dem NA-Mechanismus. Dabei muss bei der

PSar^{PLL}-Bürste auf ein sehr vorsichtiges Transferieren des PLL-Makroinitiators von DMSO in DMF geachtet werden, um nicht schwer abtrennbare, unverbrauchte Makroinitiatorketten beizubehalten. Beide Bürsten zeigen unter dem Rasterkraftmikroskop zylindrische Strukturen. Die PSar^{PLL}-Bürste besitzt infolge des längeren PLL-Makroinitiators eine fast doppelt so hohe Molmasse M_w und ist in ihren Radien $R_{h,c=0}$ und R_g um das ca. 1,5-fache größer als die PSar^{PAHMA}-Bürste (siehe Tabelle 6). Die Polydispersität beider Bürsten ist auf Grund ihrer Elution an der oberen Ausschlussgrenze schwer einzuschätzen. Sie liegt aber bei beiden in einem höheren Bereich. Mit einer anschließenden Umsetzung über eine aktivierte Azidoessigsäure können den Bürsten eine große Zahl von Azidgruppen zugefügt werden, die für eine effiziente Biokonjugation verwendet werden können. Hierbei zeigt die Bürste trotz Kopplung mit den hydrophoben Azidgruppen nur ein geringes, reversibles Aggregationsverhalten.

Tabelle 6: Charakteristika der beiden hergestellten Polysarkosinbürsten

Bürste	R_h / nm	R_g / nm	M_w / g·mol ⁻¹	P_{Sar} (GPC)	R_g/R_h	A_2 / mol·cm ³ ·g ⁻²	PDI (GPC)
PSar ^{PAHMA}	40,4	64,0	$4,9 \cdot 10^6$	50	1,58	$2,1 \cdot 10^{-5}$	1,72
PSar ^{PLL}	63,5	97,6	$10,4 \cdot 10^6$	52	1,54	$-6,8 \cdot 10^{-5}$	1,74

4.4. Poly(L-Lysin)-Bürsten

Die ersten zylindrischen Polylysinbürsten wurden von Bin Zhang in der Arbeitsgruppe Schmidt im Jahre 2004 hergestellt [15]. Zwar konnten die Bürsten mittels AFM und CD-Spektroskopie charakterisiert werden, zeigten aber im geschützten und entschützten Zustand eine unerklärte Aggregatbildung, die bis zur vollständigen Unlöslichkeit der Polymere reichte. In der darauffolgenden Arbeit gelang es [redacted] zwei PLL(Z)-Bürsten mit unterschiedlich langen Seitenketten zu synthetisieren und aggregatsfrei zu charakterisieren [16].

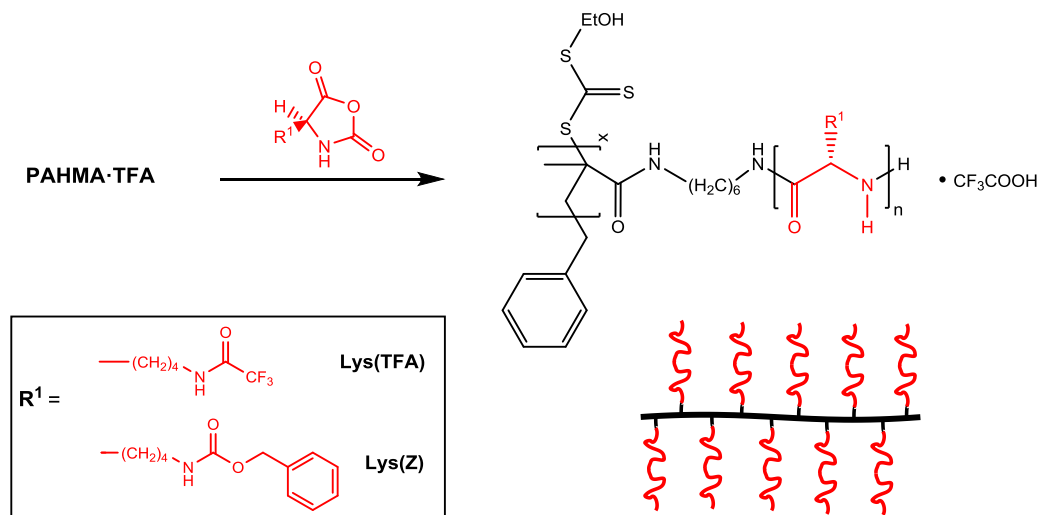


Abb. 55: Reaktionsgleichung der PLL(TFA)- bzw. PLL(Z)-Bürsten am Beispiel des PAHMA-Makroinitiators

Für die Reproduktion dieser PLL-Bürsten wird der in Kapitel 4.1.1 hergestellte PAHMA-Makroinitiator in reinem DMF gelöst und mit Lys(Z)-NCA oder Lys(TFA)-NCA bei 45°C unter Argon-Atmosphäre umgesetzt. Nach drei Tagen sind die typischen NCA-Schwingungsbanden bei 1856 cm^{-1} und 1737 cm^{-1} im IR Spektrum verschwunden und die Polymerisationslösung wird mittels DMF-GPC vermessen (Abb. 56). Das Ammoniumsalz soll den AM-Mechanismus unterdrücken (siehe Kapitel 2.2.3b), trotzdem zeigt das GPC-Elutionsdiagramm der DMF-Reaktionslösungen, im Gegensatz zu der Sarkosinbürsten-Synthese, eine erhebliche Menge an linearer Verunreinigungen (40-60%, ermittelt durch die Fläche des RI-Signals). Während Sarkosin-NCA in einer hochreinen Form über Sublimation erhalten werden kann, ist die vollständige Abtrennung aller Verunreinigungen von Lysin-NCA durch mehrmalige Umkristallisation weitaus

schwieriger. Schon geringe Spuren von Verunreinigungen (wie z.B. HCl) reichen aus, um lineare Polypeptide zu erzeugen (siehe Kapitel 2.2.3). Auf Grund der relativ langsamen Reaktionszeit des Makroinitiators und der erhöhten Temperatur kann auch der thermische Zerfall von DMF zu Dimethylamin für die Entstehung linearer Verunreinigung in Betracht gezogen werden.

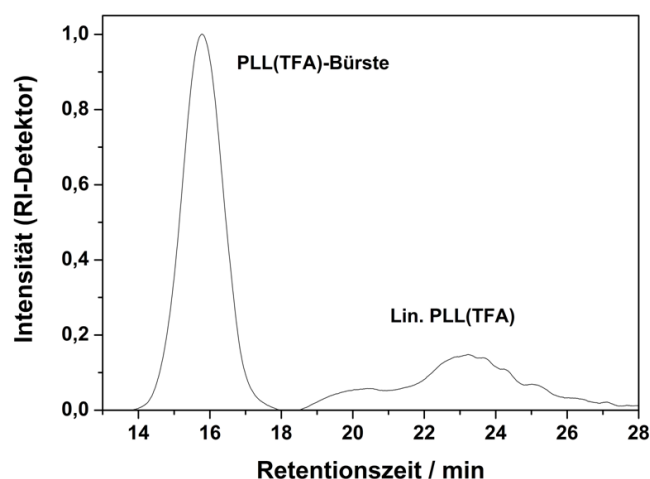


Abb. 56: GPC-Elutionsdiagramm der Reaktionslösung einer PLL-Bürste am Beispiel der PLL(TFA)^{PAHMA}-Bürste aus Reihe 5 der Tabelle 7 in DMF (PS-Kalibrierung, Oligomersäule)

Weitaus problematischer ist jedoch das Verhalten der geschützten PLL-Bürsten in höheren Konzentrationen oder nach der Fällung in Diethylether. Bei einer NCA-Konzentration von $c > 0,2$ g/L geliert die Bürste im Reaktionsmedium und kann auch durch anschließende Verdünnung in DMF nicht mehr gelöst werden (Organogelbildung). Wird die Monomerkonzentration bei der Reaktion unter dem kritischen Wert gehalten, bleibt die Bürste während der Reaktion in Lösung und kann auch durch einen 450 nm Spritzenfilter ohne Ausbildung eines Gegendrucks filtriert werden. Wird die Bürste danach allerdings in Diethylether gefällt und getrocknet, lässt sich ihr Niederschlag auch nach langen Lösungszeiten in keinem gängigen Lösungsmittel (HFIP, TFA, DMF, MeOH, DMSO) mehr lösen. Dieses Verhalten ähnelt dem Verhalten der PLL-Bürsten von Bin Zhang und ist unabhängig von der eingesetzten Schutzgruppe (Z oder TFA), der Art des Makroinitiators (PAHMA oder PLL) oder des eingestellten Polymerisationsgrades (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Hergestellte PLL-Bürsten mit Angabe des verwendeten NCA und Makroinitiators sowie des eingestellten Polymerisationsgrades der Lysinseitenkette und dem Einbauverhältnis des NCA in die Bürste σ_{Lys} (ermittelt über GPC, siehe Kapitel 4.5.1.1). Die beiden rechten Spalten beschreiben das Auftreten einer Gelbildung während der Reaktion sowie das Löslichkeitsverhalten der Bürsten nach der Fällung

NCA	Makroini.	c (NCA) / g·ml ⁻¹	P _{Lys} (theo.)	σ_{Lys} (GPC)	Gel	Löslichkeit
L-Lys(Z)	PAHMA	0,30	54	-	✓	✗
L-Lys(Z)	PAHMA	0,30	26	-	✓	✗
L-Lys(Z)	PAHMA	0,17	53	57%	-	✗
L-Lys(Z)	PAHMA	0,07	56	56%	-	✗
L-Lys(TFA)	PAHMA	0,24	31	-	✓	✗
L-Lys(TFA)	PAHMA	0,06	28	67%	-	✗
L-Lys(TFA)	PLL	0,10	26	-	-	✗

Als mögliche Ursache werden intra- und intermolekulare Wechselwirkungen der Bürste diskutiert. Aggregation und Gelbildung sind bei manchen Polypeptiden bekannt, wenn diese durch Wasserstoffbrückenbindungen sekundäre Strukturen, wie z.B. α -Helices oder β -Sheets, ausbilden [211]. So konnte an PEO-b-PLL(Z) gezeigt werden, dass die Tendenz zur Organogelbildung von Knäulstrukturen über α -Helices zu β -Sheets zunimmt [212]. Bei einer hohen Ppropfdichte liegen die Seitenketten der Bürste sehr nahe beieinander, sodass eventuell Faltblattstrukturen zwischen benachbarten Seitenketten möglich werden. Auch denkbar ist ein Interdigitieren (Verzahnen) von Seitenketten unterschiedlicher Bürsten durch Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen (Abb. 57). Gerade beim Trocknungsvorgang dominieren solche Polymer-Polymer-Wechselwirkungen, die bei hohen Ppropfungsdichten der Bürste durch die großen Kontaktflächen sehr stark ausgeprägt sind und beim Lösungsvorgang durch die Lösungsmittelmoleküle nur noch schwer wieder aufgebrochen werden können. Polysarkosinbürsten hingegen sind sehr hydrophil und können inter- und intramolekular keine Wasserstoffbrücken ausbilden. Sie bleiben damit auch nach dem Trocknen wieder leicht löslich in polaren Lösungsmitteln, wie Wasser, Methanol oder HFIP.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass Polymerisationen mit Lysin-NCA am besten mit einer NCA-Konzentration von ca. $c = 0,1 \text{ g/mL}$ durchgeführt werden sollten, um eine Gelbildung zu vermeiden. Als Ursache für die Bildung von linearen Verunreinigungen wird die Existenz geringer Verunreinigungen im NCA vermutet, die bei den höheren Temperaturen des Schlaad-Mechanismus einen Großteil an Monomer konsumieren. Außerdem eignen sich die reinen PLL-Bürsten nach ihrer Isolation nicht mehr für weitere Reaktionen, da sie auf Grund von inneren Wechselwirkungen unlöslich werden oder große Aggregate ausbilden.

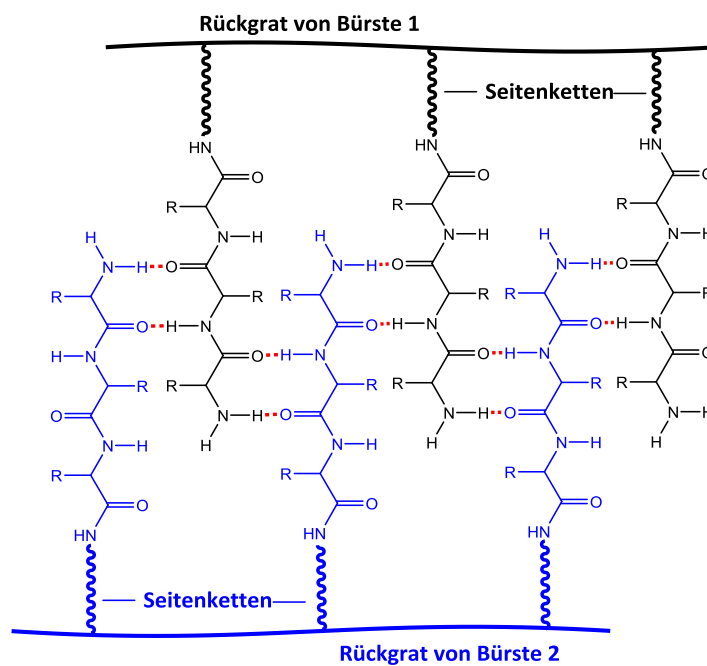


Abb. 57: Mögliche Wechselwirkung bei der Interdigitation der Seitenketten zweier Bürsten

4.5. Synthese und Charakterisierung von Diblockbürsten

Kern-Schale-Bürsten besitzen interessante Eigenschaften, die von dem jeweiligen chemischen Charakter des inneren Kerns und der äußeren Schale geprägt werden. Anders als bei polymeren Mizellen sind die amphiphilen Polymerseitenketten chemisch am Rückgrat gebunden. Somit kann die Bürste weder invertieren noch bei hoher Verdünnung aufgelöst werden. Im Fall der Gentransfektion, bei der Erbmaterial in Zellen eingeführt wird, können Diblockstrukturen benutzt werden, um DNA oder RNA im Inneren der Bürste vor äußeren Einflüssen (wie z.B. Nukleasen) zu schützen und ihren Eintritt in die Zelle durch die Abschirmung ihrer negativen Ladung zu ermöglichen. Für die Komplexierung der Polynukleotide eignet sich ein innerer, positiv geladener Polylysinblock. Ein äußerer, hydrophiler Sarkosinblock maskiert mit seinem „Stealth“-Effekt die durch „Mismatch“ verbliebenen Ladungen, reduziert die Immunogenität und schützt das Polylysin und die komplexierten Moleküle vor dem enzymatischen Abbau. Dadurch kann die Transfektionseffizienz des Trägersystems gesteigert werden.

Als Synthesestrategie muss in einem ersten Schritt der Makroinitiator mit Lysin-NCA umgesetzt werden, um dann im zweiten Schritt Sarkosin-NCA als äußeren Block anzubringen. Allerdings entstehen bei der ringöffnenden Polymerisation mit Lysin-NCA viele lineare Verunreinigungen, die eine weitere Polymerisation erheblich stören. Eine Entfernung dieser Verunreinigungen ist jedoch nicht möglich, da sich keine aufgereinigten, geschützten PLL-Bürsten isolieren lassen (siehe Kapitel 4.4). Daher muss ein Konzept erarbeitet werden, welches die Problematik der Unlöslichkeit der isolierten Polylysinbürsten umgeht. Hierfür soll in Kapitel 4.5.2 auf chemischem Wege die Löslichkeit des ersten Blocks verbessert werden, indem anstatt eines reinen Lysinblocks ein Coblock aus Lysin und Sarkosin verwendet wird. Die erhaltene Precursorbürste kann dann vor der weiteren Sarkosinumsetzung aufgereinigt werden. Kapitel 4.5.3 befasst sich mit der Synthese von Diblockbürsten durch eine direkte, in-situ durchgeführte Polymerisation und versucht mit einer Modifizierung des Makroinitiators die Mengen an linearen Verunreinigungen einzugrenzen. Zuvor sollen aber im Kapitel 4.5.1 drei Analysemethoden vorgestellt werden, die eine Bestimmung des Sarkosin- bzw. Lysingehalts in einer fertigen Diblockbürste zulassen.

4.5.1. Bestimmung des Sarkosin- bzw. Lysingehalts

Eine große Herausforderung liegt in der Bestimmung des tatsächlichen Polymerisationsgrades der einzelnen Blöcke oder deren Verhältnis zueinander, wenn Bürsten über den „grafting from“-Ansatz synthetisiert werden. Da in dieser Arbeit keine abspaltbaren Spacer zwischen dem Rückgrat und den Seitenketten verwendet werden, ist weder die Charakterisierung der einzelnen Seitenkette noch die Bestimmung der Pfropfungsdichte möglich. In diesem Kapitel sollen drei verschiedene Charakterisierungsmethoden vorgestellt werden, die unter der Annahme einer 100%igen Initiierung eine ungefähre Kalkulation des mittleren Aminosäuregehalts erlauben.

Allgemein lässt sich eine Bürste mit Diblockseitenketten, bestehend aus Aminosäure 1 und 2, als ein reines Zweikomponentensystem auffassen, wenn die Masse ihrer Hauptkette vernachlässigt werden kann. Für das molare Zahlenverhältnis Γ_{ij} und den Zahlenanteil X_i ihrer Aminosäuren gilt dann:

$$\Gamma_{12} = \frac{n_1}{n_2} \quad (28)$$

$$X_1 = \frac{n_1}{n_1 + n_2} = \frac{\Gamma_{12}}{1 + \Gamma_{12}} \quad (29)$$

$$X_1 = 1 - X_2 \quad (30)$$

Wobei n_i die gesamte Anzahl aller Wiederholungseinheiten der Aminosäure i in der Bürste widerspiegelt. Dasselbe gilt auch für das Massenverhältnis Ψ_{ij} und den Massenanteil W_i der Aminosäuren, wobei hier statt der Teilchenzahl die Gesamtmasse m_i der Aminosäuren entscheidend ist:

$$\Psi_{12} = \frac{m_1}{m_2} \quad (31)$$

$$W_1 = \frac{m_1}{m_1 + m_2} = \frac{\Psi_{12}}{1 + \Psi_{12}} \quad (32)$$

$$W_1 = 1 - W_2 \quad (33)$$

Der molare Zahlen- und Massenanteil (bzw. das Verhältnis) der Aminosäuren stehen über das Molmassenverhältnis ihrer Wiederholungseinheiten in einer direkten Beziehung zueinander und können ineinander überführt werden:

$$\Gamma_{12} = \frac{M_2}{M_1} \Psi_{12} \quad (34)$$

$$\frac{1}{X_1} = 1 + \left(\frac{1}{W_1} - 1 \right) \frac{M_1}{M_2} \quad (35)$$

4.5.1.1. Bestimmung über konzentrationsäquivalente GPC

Das RI-Signal in der Gelpermeationschromatographie ist abhängig von der Massenkonzentration und dem Brechungsincrement der vermessenen Substanz i:

$$RI_i \sim c_i \cdot \left(\frac{dn}{dc} \right)_i \quad (36)$$

Die Fläche unter dem Signal eines bestimmten Elutionsvolumens ist hierbei direkt proportional zu der dort eluierten Gesamtmasse m_i der Substanz:

$$F_i = m_i \cdot \left(\frac{dn}{dc} \right)_i \quad (37)$$

Dieses Gesetz gilt allgemein als additiv und kann deswegen in einem reinen Zweiblocksystem zur Bestimmung der eingebauten Masse von Block 1 und Block 2 benutzt werden, sofern die Konzentration der Initiatorgruppen im System während der Erst- und Zweitblocksynthese unverändert bleibt (= konzentrationsäquivalent):

$$F_{12} = F_1 + F_2 \sim m_1 \left(\frac{dn}{dc} \right)_1 + m_2 \left(\frac{dn}{dc} \right)_2 \quad (38)$$

Die Masse des vorgelegten Makroinitiators ist im Vergleich zu der des angepfropften 1. Polypeptidblocks vernachlässigbar gering, sodass die im Elugramm erhaltene Fläche F_1 nach der Erstblocksynthese direkt proportional zur eingebauten Masse des 1. Blocks steht. Für den Einbau der Masse des 2. Polypeptidblocks muss hingegen erst die Fläche

F_2 durch Subtraktion der Fläche des Diblocks F_{12} von der Fläche des ersten Blocks F_1 ermittelt werden:

$$F_2 = F_{12} - F_1 \sim m_{12} - m_1 \quad (39)$$

Da bei der NCA-Polymerisation nicht die gesamte Menge an Monomer in die Bürste eingebaut wird, sondern auch lineare Polypeptide entstehen können, kann nach der jeweiligen Monomerzugabe durch die Betrachtung der Fläche der linearen Verunreinigungen F_{Lin} sowie der Bürste F_B das tatsächliche Masseneinbauverhältnis $\sigma_{i,B}$ des betrachteten Monomers in die Bürste bestimmt werden :

$$\sigma_{1,B} = \frac{F_{1,B}}{F_{1,B} + F_{1,Lin}} \quad (40)$$

$$\sigma_{2,B} = \frac{(F_{12,B} - F_{1,B})}{(F_{12,B} - F_{1,B}) + (F_{12,Lin} - F_{1,Lin})} \quad (41)$$

$$\sigma_{i,B} + \sigma_{i,Lin} = 1 \quad (42)$$

Da die Einwaage des Makroinitiators $m(I)$ und der Monomere $m_i(NCA)$ bekannt ist, kann mit dem Masseneinbauverhältnis $\sigma_{i,B}$ von Monomer 1 und Monomer 2 in die Bürste sowie der Molmasse ihrer Wiederholungseinheit M_i der reale, mittlere Polymerisationsgrad P_i des Polypeptidblocks i berechnet werden:

$$P_i = \frac{[NCA]}{[I]} = \frac{\sigma_{i,B} \cdot m_i(NCA)}{M_i(NCA)} \cdot \frac{M(I)}{m(I)} \quad (43)$$

Dieser gilt nur unter der Annahme, dass auch alle Initiatorgruppen die Polymerisation einer Seitenkette initiieren und somit eine 100%ige Pfropfungsdichte in der Bürste erreicht wird.

Das Massenverhältnis der Aminosäuren in der Bürste erhält man dann durch:

$$\Psi_{12} = \frac{\sigma_{1,B} \cdot m_1(NCA) \cdot M_2(NCA) \cdot M_1}{\sigma_{2,B} \cdot m_2(NCA) \cdot M_1(NCA) \cdot M_2} \quad (44)$$

Bei der GPC-Analyse wird vorausgesetzt, dass jede Initiatorgruppe eine Seitenkette aufbaut und jedes Monomer zu einer in der GPC sichtbaren, polymeren Struktur

reagiert. Zudem sollte der Polymerisationsgrad der Seitenketten so groß sein, dass die Masse des Rückgrats vernachlässigt werden kann. Um auch kleine gebildete, lineare Peptidstrukturen zu erkennen, werden die Proben in der GPC meist mit einer Oligomersäule aufgetrennt. Auch die Auswertung selbst kann fehlerbehaftet sein, da die Basislinie für die Integration nicht immer exakt angefitet werden kann und die Flächen der Signale manuell eingegrenzt werden. Trotzdem liefert die Methode gerade für die Bestimmung des Polymerisationsgrads des ersten Blocks einen ungefähren Richtwert.

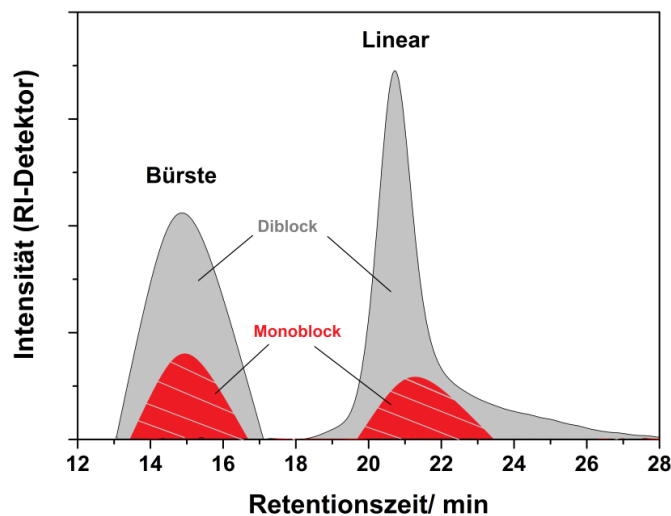


Abb. 58: Skizzenhafte Darstellung der Flächenverteilung einer Diblockbürste mit linearen Verunreinigungen im Vergleich zur ursprünglichen Monoblockbürste in der konzentrationsäquivalenten GPC (RI-Signal)

4.5.1.2. Bestimmung über CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie detektiert nur die optisch aktiven Komponenten einer Probe. Polysarkosin ist demzufolge unsichtbar und nur der Polylysinblock steuert einen Beitrag zur Elliptizität bei. Entschütztes PLL zeigt im CD-Spektrum auf Grund der repulsiven Wechselwirkung der positiv geladenen Reste einen „Random Coil“-Verlauf, der bei ca. $\lambda = 197$ nm ein negatives Maximum besitzt ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang). Die Elliptizität ist dabei linear abhängig von der molaren Konzentration der enthaltenen Lysingruppen in der Probe. Durch die Messung verschiedener Konzentrationen von kommerziell erhaltenem PLL·HBr (M= 10-14 kDa) kann somit eine Kalibrierungsgerade aufgezeichnet werden, bei der die Elliptizität bei $\lambda = 197$ nm gegen die molare Konzentration der Lysin-Wiederholungseinheiten c_{Lys} aufgetragen wird (Abb. 59a). Diese kann nun benutzt

werden, um auf den Lysingehalt w_{Lys}^{ent} einer unbekannt, entschützten Diblockbürste zurückzuschließen. Hierzu muss die durch die Kalibrierung erhaltene Konzentration c_{Lys} mit der Molmasse der entschützten Lysin-Wiederholungseinheit M_{Lys}^{ent} multipliziert und in Bezug zu der eingesetzten Massenkonzentration der Bürste c_B gesetzt werden:

$$w_{Lys}^{ent} = \frac{m_{Lys}^{ent}}{m_B} = \frac{c_{Lys} \cdot M_{Lys}^{ent}}{c_B} \quad (45)$$

$$w_{Sar}^{ent} = 1 - w_{Lys}^{ent} \quad (46)$$

Da das Rückgrat genauso wie das Polysarkosin keine stereochemische Information besitzt, findet sich seine Masse bei der Auswertung in der Sarkosinmasse wieder. Bei größeren Polymerisationsgraden der Seitenkette ist sie im Verhältnis allerdings so gering, dass sie das Ergebnis nur minimal verfälscht. Ein größeres Problem kann eine unvollständige Entschützung der Lysingruppen bereiten, da diese im geschützten Zustand wahrscheinlich nicht in einer knäueelförmigen Konformation vorliegen und somit einen anderen Beitrag im CD-Spektrum leisten. Außerdem wird angenommen, dass die für die Kalibrierung verwendeten linearen Polylysine einen ähnlichen Beitrag zur Elliptizität liefern wie die Polylysin-Seitenketten der Bürste.

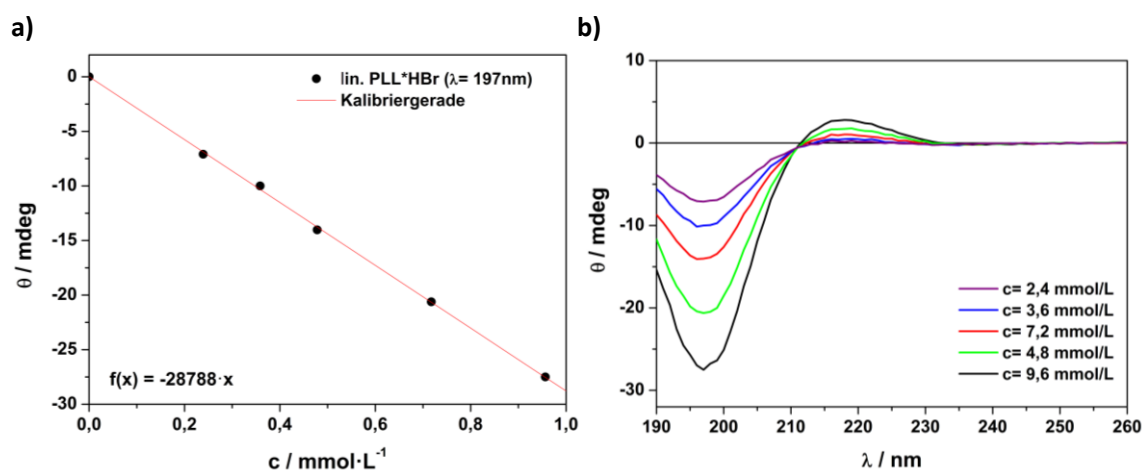


Abb. 59: a) Auftragung der Elliptizität von PLL-HBr ($M = 4\text{-}15 \text{ kDa}$) bei $\lambda = 197 \text{ nm}$ gegen die Molkonzentration der Lysineinheiten zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden b) dazugehörige CD-Spektren verschiedener Konzentrationen in H_2O bei 20°C

4.5.1.3. Bestimmung über Aminosäureanalyse

Einen Weg zur direkten Bestimmung des Lysin- bzw. Sarkosingehalts bietet die Aminosäureanalyse (AAA), die für diese Arbeit bei der Firma Genaxxon in Auftrag gegeben wurde. Hierbei wird eine wässrige Lösung der entschützten Diblockbürste mit 6N HCl versetzt und bei 110°C hydrolysiert. Dadurch werden alle polypept(o)idischen Seitenketten in ihre einzelnen Monomere aufgeschlossen. Diese werden anschließend über einen Aminosäureanalysator aufgetrennt, mit Ninhydrin derivatisiert und bei 570 nm photometrisch detektiert. Über eine Kalibrierung mit einem Standard können den Signalflächen von Sarkosin und Lysin ihre zu Grunde liegenden molaren Konzentrationen zugeordnet und somit die Zusammensetzung der Bürste ermittelt werden. Auch hier wird wieder die Masse der Hauptkette vernachlässigt.

4.5.2. Diblockbürsten über Cobürsten-Precursor

4.5.2.1. Cobürsten

Um die Löslichkeitseigenschaften des ersten Blocks zu verbessern, wird statt einem reinen Polylysinblock ein statistischer Coblock aus Lysin- und Sarkosineinheiten verwendet. Dabei soll das achirale Sarkosin die Tendenz zur Ausbildung von sekundären Strukturen und Wasserstoffbrücken herabsetzen und zusätzlich mit seiner hohen Hydrophilie eine bessere Löslichkeit vermitteln. Für die Polymerisation von $[\text{PSar-co-PLL}(\text{Z})]^{PAHMA}$ und $[\text{PSar-co-PLL}(\text{TFA})]^{PAHMA}$ wird der PAHMA-TFA-Makroinitiator mit einer Mischung aus Sarkosin-NCA und Lysin-NCA im Verhältnis von ungefähr 1:1 in DMF bei 45°C für drei Tage umgesetzt. Die Gesamt-NCA-Konzentration wird auf $c(\text{NCA})_{\text{ges}} = 0,1 \text{ g/mL}$ eingestellt, um eine Gelbildung zu vermeiden. Wie in Tabelle 8 zu sehen ist, entstehen bei beiden Bürsten ca. 30-40% lineare Verunreinigungen (GPC siehe Anhang: Abb. 92). Da den eingebauten NCA-Monomeren in einer Mischung keine spezifischen Flächen mehr zugeordnet werden können, ist es unmöglich, den tatsächlichen Polymerisationsgrad der jeweiligen Komponente zu bestimmen. Auch eine Aussage, ob beide NCA tatsächlich statistisch eingebaut werden, ist nicht möglich.

Tabelle 8: Hergestellte Coblockbürsten mit Angabe über den eingestellten Polymerisationsgrad, das Einbauverhältnis des NCA in die Bürste $\sigma_{\text{Lys+Sar}}$ (ermittelt über konzentrationsäquivalente GPC) sowie das Löslichkeitsverhalten der Bürsten nach der Fällung

Bürste	P_{Lys} (theo.)	P_{Sar} (theo.)	$\sigma_{\text{Lys+Sar}}$ (GPC)	Löslichkeit
$[\text{PSar-co-PLL(Z)}]^{\text{PAHMA}}$	19	20	76%	✓
$[\text{PSar-co-PLL(TFA)}]^{\text{PAHMA}}$	22	22	62%	✗

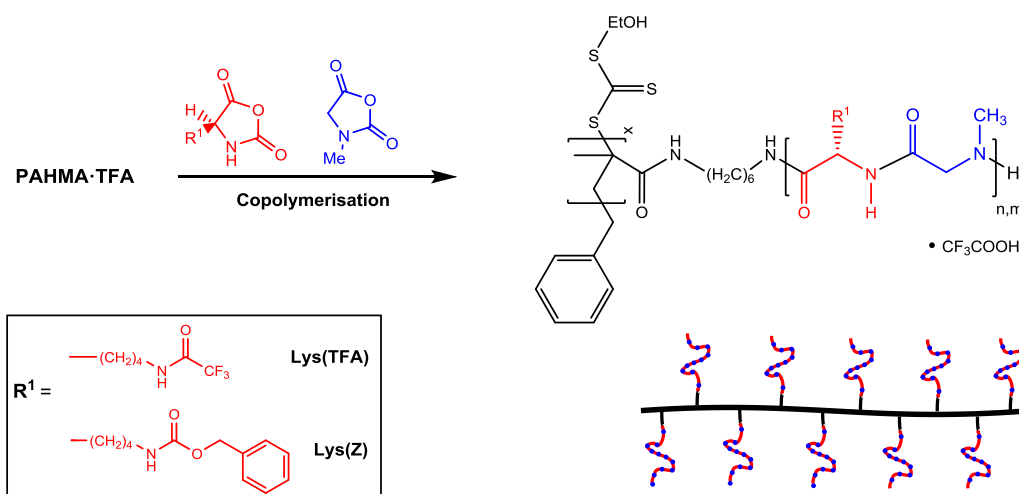


Abb. 60: Reaktionsschema für die Herstellung der Cobürsten

Nach der Fällung der Bürsten in Diethylether kann $[\text{PSar-co-PLL(Z)}]^{\text{PAHMA}}$ auch nach dem Trocknen gut in DMF oder sogar in Methanol gelöst werden, während $[\text{PSar-co-PLL(TFA)}]^{\text{PAHMA}}$ unlöslich verbleibt. Als Ursache für das unterschiedliche Verhalten beider Bürsten werden zwei Ideen diskutiert: Zum einen könnte die Reaktivität von Lysin(TFA)-NCA im Vergleich zu Sarkosin-NCA so gering sein, dass es vermehrt im äußeren Bereich eingebaut wird, wo es als hydrophober Block mit Tendenz zur Wasserstoffbrückenbindung leichter mit anderen Bürsten aggregieren kann. Zum anderen könnte Lys(TFA)-NCA eine größere Menge an initiiierenden Verunreinigungen besitzen, die schnell einen Großteil des hochreaktiven Sarkosin-NCA verbrauchen, bevor es in die Bürste als Löslichkeitsvermittler eingebaut werden kann.

4.5.2.2. Geschützte Diblockbürsten über Cobürsten-Precursor

Mit $[\text{PSar-co-PLL}(\text{Z})]^{\text{PAHMA}}$ steht nun eine Bürste zur Verfügung, die aufgereinigt werden kann und als Precursor für die Anbringung einer äußeren Sarkosinschale dient. Um die linearen Verunreinigungen abzutrennen, wird die Cobürste in Methanol gelöst und mit Hilfe der Amicon-Zentrifugation (Ausschlussgrenze $M = 50 \text{ kDa}$) aufgereinigt. Nachdem das Methanol in einer Kälte-destillation entfernt wurde, kann die Bürste in HFIP gelöst und gefriergetrocknet werden. Die Bürste dient nun als Precursor für die weitere Diblocksynthese. Hierfür wird die Cobürste in DMF gelöst und mit Sarkosin-NCA bei 45°C für drei Tage unter Argon umgesetzt.

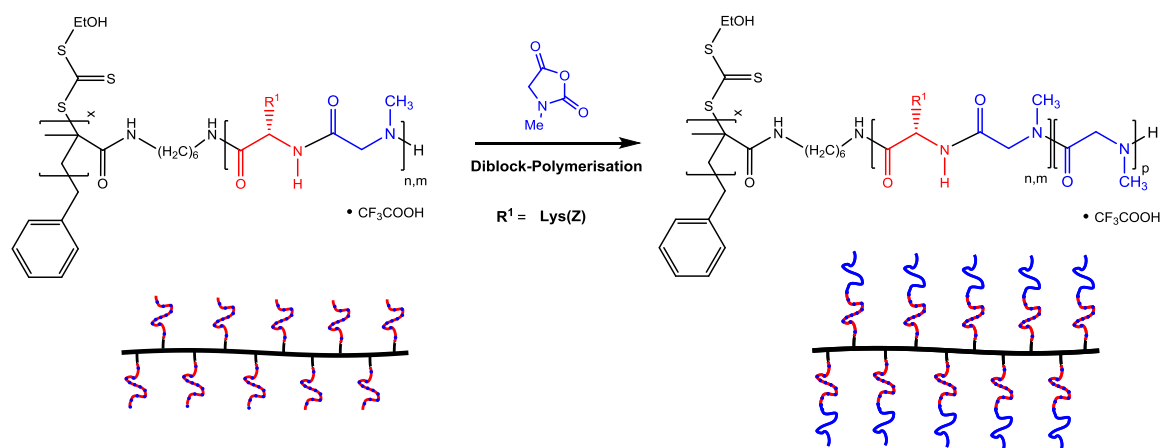


Abb. 61: Reaktionsschema für die Herstellung der PSar-b-Coblock^{PAHMA}-Bürste

Weil die enthaltene Menge an Makroinitiator in der Cobürste nach der Aufreinigung nicht mehr bekannt ist, kann nur noch das Massenverhältnis zwischen dem eingesetzten Precursor und dem neu angebrachten Sarkosinblock über konzentrationsäquivalente GPC bestimmt werden (Abb. 62). Trotz entstandener, linearer Verunreinigungen ist ein großer Teil des Sarkosins in die Bürste eingebaut worden. Nach der Analyse der Flächen kann der neu angepfropfte Sarkosin-Massenanteil auf $W_{\text{Sar}} = 61\%$ berechnet werden (siehe Tabelle 9). Da aber auch der Precursor eine signifikante Menge an Sarkosin enthält, ist der tatsächliche Massenanteil von Sarkosin wesentlich größer. Insgesamt reicht die eingebaute Menge an Sarkosin aus, um die geschützte Diblockbürste PSar-b-Coblock^{PAHMA} sogar in Wasser zu lösen. Realistische Polydispersitäten können auf

Grund der Elution an der oberen Ausschlussgrenze weder für den Precursor noch für die Diblockbürste erhalten werden.

Tabelle 9: Hergestellte Diblockbürste (geschützt) mit Angabe über die Einwaage m des eingesetzten Precursors bzw. Sar-NCA-Monomers, die Flächenverteilung σ in der konzentrationsäquivalenten GPC sowie das errechnete Massenverhältnis Ψ bzw. den Massenanteil W vom eingebauten Sarkosin-Block

Bürste	m (Cobürste)	m (Sar-NCA)	$\sigma_{\text{Co,B}}$ (GPC)	$\sigma_{\text{Sar,B}}$ (GPC)	$\Psi_{\text{Sar,Co}}$ (GPC)	W_{Sar} (GPC)
PSar-b-Coblock ^{PAHMA}	25 mg	109 mg	100%	57%	1,57	61%

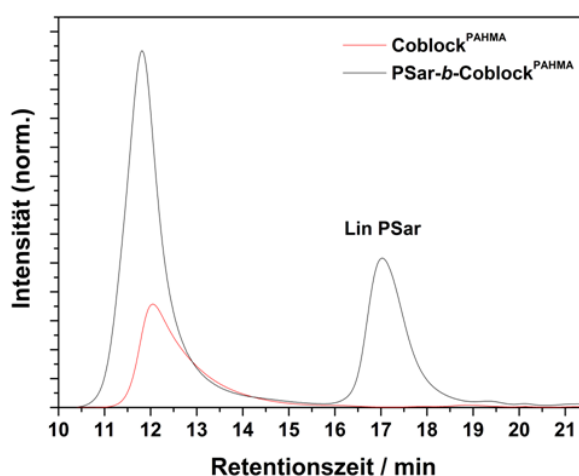


Abb. 62: Konzentrationsäquivalente GPC des vorgelegten Cobürsten-Precursors [PSar-co-PLL(Z)]^{PAHMA} und der Reaktionslösung der korrespondierenden Diblockbürste PSar-b-Coblock^{PAHMA} in DMF zur Bestimmung des Sarkosineinbaus (PS-Kalibrierung; Oligomersäule)

Der Lysinanteil ist insgesamt so gering, dass in der CD-Spektroskopie fast keine Elliptizität beobachtet werden kann (Abb. 63a). Vermisst man die geschützte Diblockbürste in DMF mittels dynamischen Lichtstreuung, erhält man für den hydrodynamischen Radius einen Wert von $R_h = 63,0$ nm (Abb. 63b).

Vermischt man die Precursorbürste mit der korrespondierenden Diblockbürste in HFIP und untersucht die Mischung mittels AFM, können beide Fraktionen deutlich als zylindrische Bürsten wahrgenommen und sogar unterschieden werden (Abb. 64). Die Diblockbürste liegt in einer elongierteren Konformation vor und besitzt eine breite Korona, die wahrscheinlich von der weniger dicht gefropten Sarkosinschale stammt.

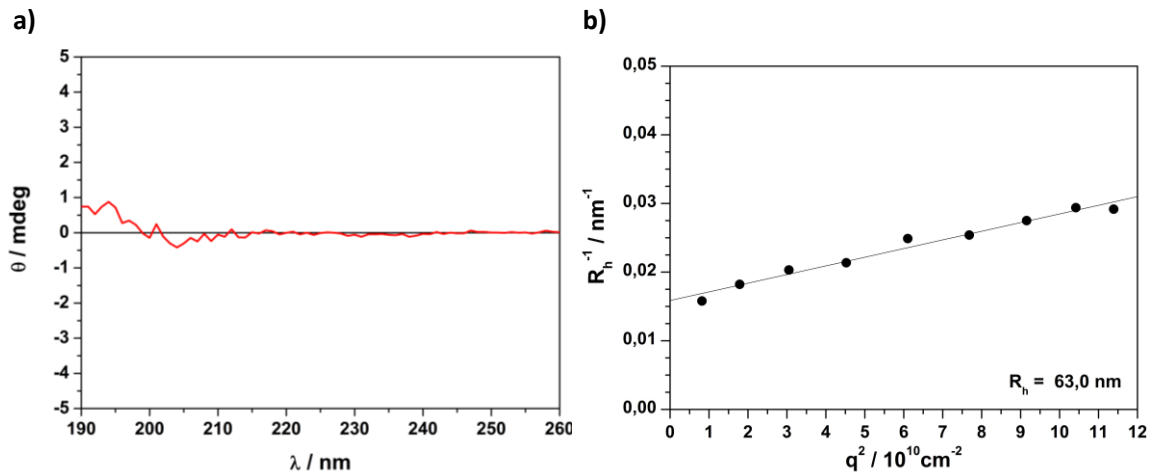


Abb. 63: a) CD-Spektrum von PSar-b-Coblock^{PAHMA} mit $c = 0,13$ g/L in H₂O bei 20°C b) DLS von PSar-b-Coblock^{PAHMA} in DMF (10 mM LiBr) mit $c = 0,2$ g/L (Filter: LCR 0,45 μ m)

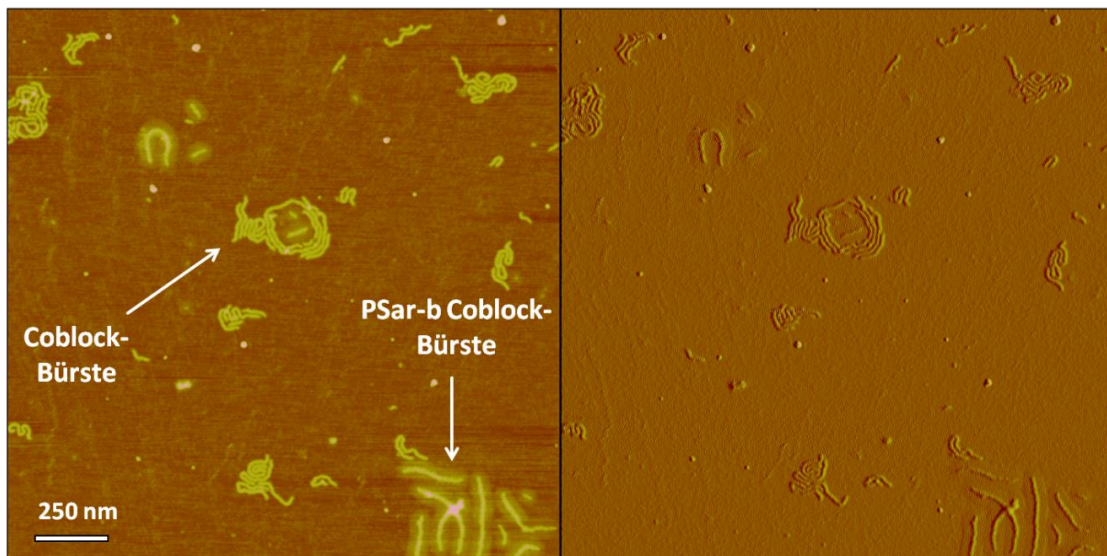


Abb. 64: AFM-Aufnahme einer Mischung aus dem Precursor [PSar-co-PLL(Z)]^{PAHMA} und der korrespondierenden Diblockbürste PSar-b-Coblock^{PAHMA} im Verhältnis von 2:1 auf Mica (Spin Casting mit $c = 0,05$ g/L in HFIP). Links: Höhenbild; Rechts: Amplitudenbild

4.5.2.3. Entschützungsreaktion der Cobürsten

Die synthetisierte, Z-geschützte Diblockbürste PSar-b-Coblock^{PAHMA} wird in Wasser mittels Amicon-Zentrifugation (Ausschlussgrenze $M = 50$ kDa) vollständig von ihren linearen Verunreinigungen befreit und danach mit 3 Äq. Bromwasserstoffsäure in DMF für 24 Stunden entschützt. Vergleicht man die Reaktionslösung vor und nach der Entschätzung über konzentrationsäquivalente GPC, erkennt man, dass durch die Entschätzungsbedingungen fast 60% niedermolekulare Fragmente entstanden sind (Abb.

65a). Da reine PLL-Bürsten bei solchen Bedingungen stabil bleiben [17], kann das Polysarkosin offenbar selbst von geringen Mengen starker Säure gespalten werden. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch die Entschützung von linearem PLys(Z)-b-PSar in der Diplomarbeit von [213]. Zwar existieren noch andere, nicht säureabhängige Entschützungsreaktionen für die Z-Schutzgruppe, wie z.B. die Hydrierung mit Hilfe eines Pd-Katalysators [214]. Jedoch zeigt die Arbeit von [213], dass für die Entschützung eines linearen PLL-b-PSar-Polymers ein anderes Katalysatorsystem gefunden werden muss, um die Effizienz der Abspaltung zu erhöhen [213].

Um die Hydrolyseempfindlichkeit des Sarkosinblocks noch einmal zu verifizieren, wird die in Kapitel 4.3.1 hergestellte Polysarkosinbürste $\text{PSar}^{\text{PAHMA}}$ für jeweils 24 Stunden den Entschützungsbedingungen für Z- und TFA-Schutzgruppen ausgesetzt (3 Äq. HBr in TFA bzw. 50 Äq. Hydrazin in MeOH). In der konzentrationsäquivalenten HFIP-GPC in Abb. **65b** ist unter den sauren Bedingungen eine fast vollständige Fragmentierung der Polysarkosin-Seitenketten eingetreten, während sich bei der hochäquimolaren Hydrazinzugabe zwar die Verteilung der Bürste etwas verbreitert hat, aber weniger als 5% niedermolekulare Abspaltungsprodukte entstanden sind.

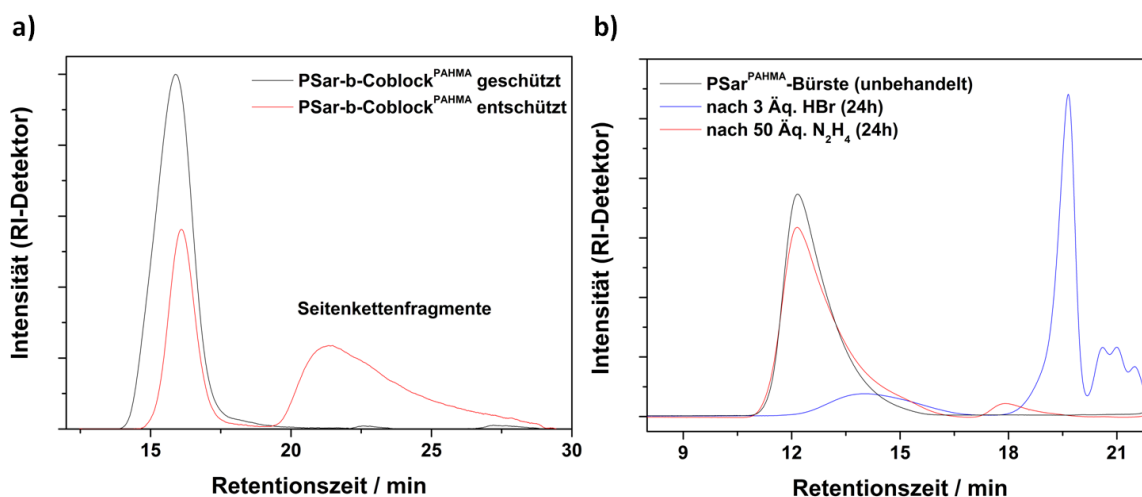


Abb. 65: **a)** Konzentrationsäquivalente HFIP-GPC der Reaktionslösung der aufgereinigten $\text{PSar-Coblock}^{\text{PAHMA}}$ -Bürste vor (schwarz) und nach der Entschützung mit 3 Äq. HBr für 24 Stunden (rot)
b) Konzentrationsäquivalente HFIP-GPC der aufgereinigten $\text{PSar}^{\text{PAHMA}}$ -Bürste vor (schwarz) und nach der Behandlung mit 3 Äq. HBr (blau) bzw. 50 Äq. Hydrazin (rot) für 24 Stunden

4.5.3. Diblockbürsten über in-situ-Polymerisation

4.5.3.1. In-situ-Polymerisation mit protoniertem Makroinitiator

Im Gegensatz zur Z-Schutzgruppe kann die TFA-Schutzgruppe abgespalten werden, ohne dass eine Fragmentierung des Polysarkosins eintritt. Allerdings sind keine Lysin(TFA)-haltigen Cobürsten realisierbar (siehe Kapitel 4.5.2), sodass auf eine in-situ-Polymerisation zurückgegriffen werden muss. Hierbei wird zuerst der protonierte PAHMA-TFA-Makroinitiator mit Lys(TFA)-NCA bei 45°C für 3 Tage zu einer PLL(TFA)-Bürste umgesetzt und direkt im Anschluss, ohne Isolation der Monoblockbürste, das Sarkosin-NCA für die Polymerisation der äußeren Schale zugegeben („One-pot“-Reaktion).

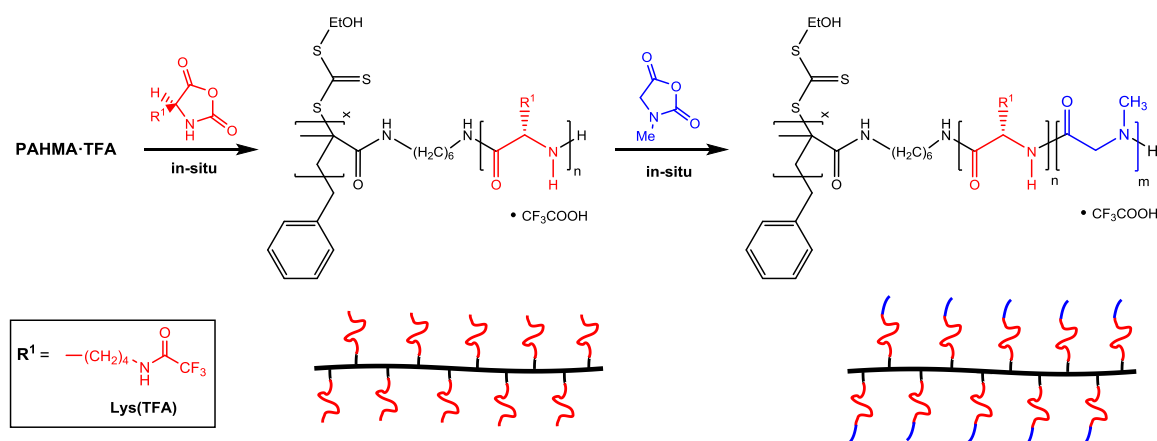


Abb. 66: Reaktionsschema für die Herstellung der PSar-b-PLL(TFA)^{PAHMA}-Bürste über ein in-situ-Verfahren

Der Vorteil gegenüber der Coblocksynthese ist hier die Möglichkeit zur Bestimmung des realen Polymerisationsgrades von Lysin und Sarkosin durch die konzentrations-äquivalente GPC (siehe Kapitel 4.5.1.1). Allerdings entstehen bei der Synthese des Polylysinblocks 10% bis 50% lineare Verunreinigungen (siehe Tabelle **10**). Diese können nicht aus der Reaktionslösung des Monoblocks entfernt werden, da keine DMF-stabile Dialysemembran existiert, die eine direkte Aufreinigung ohne zusätzlichen Trocknungsschritt der PLL-Monoblockbürste gestatten würde. Die verbleibenden Verunreinigungen stören bei der Polymerisation des zweiten Blocks erheblich, weil sie schnell sehr viel Sarkosin-NCA verbrauchen, bevor es mit dem Monoblockprecursor reagieren kann. Das mittlere Einbauverhältnis $\sigma_{Sar,B}$ von Sarkosin in die Bürste ist deswegen sehr niedrig und erlaubt nur die Herstellung einer Sarkosinschale mit geringer

Pfropfdichte. Der erhaltene Polymerisationsgrad für Sarkosin kann auf Grund des geringen Bürstenmassenzuwachses im Verhältnis zur großen Fläche der linearen Verunreinigungen fehlerbehaftet sein. Das Löslichkeitsverhalten der Diblockbürsten nach ihrer Isolierung korreliert mit dem eingesetzten molaren Verhältnis von Sarkosin-NCA zu Lysin-NCA $\Gamma_{\text{Sar,Lys}}$. Erst bei Zugabe eines großen Sarkosin-NCA-Überschusses von $\Gamma_{\text{Sar,Lys}} > 4,6$ erhält man eine äußere Sarkosinschale, die die Bürste vor einer irreversiblen Aggregation beim Trocknen schützt, sodass sie nach der Isolierung wieder gelöst werden kann. Trotzdem kann man davon ausgehen, dass die Größe der Sarkosinschale noch nicht ausreicht, um später als intakte Schutzkorona für das Transfektionsagens zu wirken. Deswegen wird die gut lösliche Diblockbürste aus Versuch 6 in Kapitel 4.5.3.2 noch einmal als Precursor für eine weitere Sarkosinumsetzung verwendet.

Tabelle 10: Hergestellte Diblockbürsten mittels in-situ-Polymerisation mit Angabe über das eingestellte molare Sar/Lys-Verhältnis Γ , das Einbauverhältnis σ der jeweiligen NCA-Monomere in die Bürste (ermittelt über konzentrationsäquivalente GPC, siehe Kapitel 4.5.1.1) und den daraus berechneten realen Polymerisationsgrad P . Die letzte Spalte beurteilt das Löslichkeitsverhalten der Bürsten nach dem Trocknen mit einem X (für schlecht) und einem Haken (für gut). Die zugehörigen GPC-Elugramme sind im Anhang in **Abb. 93** einzusehen

Versuche	$\Gamma_{\text{Sar,Lys}}$ (theo.)	$\sigma_{\text{Lys,B}}$ (GPC)	$\sigma_{\text{Sar,B}}$ (GPC)	P_{Lys} (GPC)	P_{Sar} (GPC)	$\Gamma_{\text{Sar,Lys}}$ (GPC)	Löslichkeit
1	1,0	55%	5,0%	24	2	0,08	xx
2	2,4	65%	7,1%	17	5	0,29	xx
3	3,3	63%	9,2%	18	9	0,50	x
4	3,8	91%	8,6%	28	10	0,36	x
5	4,6	66%	8,1%	22	13	0,59	✓
6	7,1	73%	?	17	?	?	✓✓

4.5.3.2. Diblockbürsten über Diblockbürsten-Precursor (DB_{V6}^{PAHMA})

Bevor die PSar-b-PLL(TFA)^{PAHMA}-Bürste aus V6 in DMF für 3 Tage bei 45°C mit weiterem Sarkosin-NCA umgesetzt wird, wird sie zunächst mittels Amicon-Zentrifugation (Ausschlussgrenze $M = 50$ kDa) in Methanol aufgereinigt und in HFIP gefriergetrocknet.

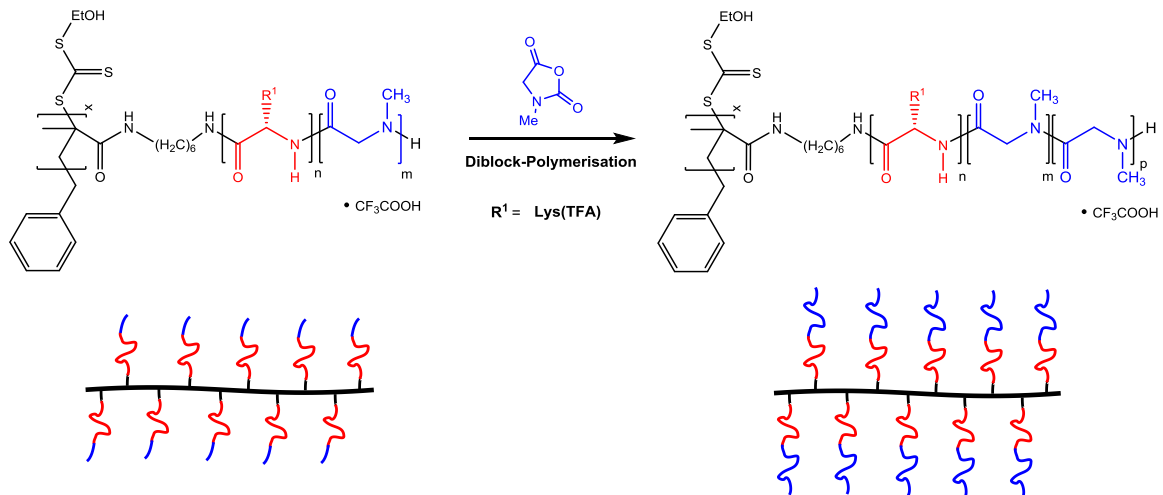


Abb. 67: Reaktionsschema für die Herstellung der $\text{PSar-b-DB}_{V6}^{\text{PAHMA}}$ -Bürste

Durch konzentrationsäquivalente GPC der Reaktionslösung vor und nach der Umsetzung erkennt man, dass der Precursor immer noch 25% lineare Bestandteile enthält (Abb. 68). Diese sind höchstwahrscheinlich auch dafür verantwortlich, dass der Sarkosineinbau für den neuen Bürstenblock nur bei 18% liegt. Obwohl von dem Precursor nur der Polymerisationsgrad des Lysins bekannt ist, kann dennoch über die Berechnung aus Kapitel 4.5.1.1 wenigstens der Gewichtsanteil des neu angepfropften Sarkosinblocks im Bezug auf die geschützte $\text{PSar-b-DB}_{V6}^{\text{PAHMA}}$ -Bürste auf $W_{\text{Sar}} = 34\%$ abgeschätzt werden (siehe Tabelle 11). Geht man davon aus, dass der Precursor aus reinem Lysin(TFA) besteht, würde sich das Gewichtsmittel von Sarkosin nach der Entschützung auf $W_{\text{Sar}}^{\text{ent}} = 52\%$ erhöhen, was auch gleichzeitig dem realistischen Mindestgewichtsanteil von Sarkosin in der entschützten Bürste entspricht. Dieser erscheint hoch genug, um die Bürste später mit einem „Stealth“-Effekt schützen zu können.

Tabelle 11: Hergestellte Diblockbürste (geschützt) mit Angabe über die Einwaage m des eingesetzten Precursors bzw. Sar-NCA-Monomers, die Flächenverteilung σ in der konzentrationsäquivalenten GPC sowie den errechneten, neu eingebauten Sarkosin-Massenanteil im geschützten W bzw. entschützten Zustand W^{ent} der Bürste (unter der Annahme, dass der Precursor aus 100% Lysin besteht)

Bürste	m (DB_{V6})	m (Sar-NCA)	$\sigma_{\text{DBV6,B}}$ (GPC)	$\sigma_{\text{Sar,B}}$ (GPC)	W_{Sar} (GPC)	$W_{\text{Sar}}^{\text{ent}}$ (GPC)
$\text{PSar-b-DB}_{V6}^{\text{PAHMA}}$	18,4 mg	83 mg	0,75	0,18	34%	52%

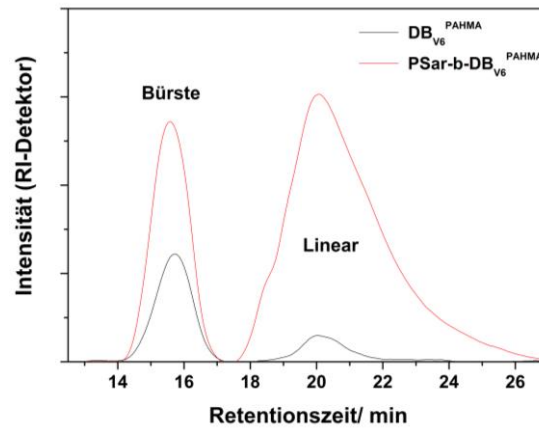


Abb. 68: Konzentrationsäquivalente GPC des vorgelegten, aufgereinigten Diblock-Precursors DB_{V6}^{PAHMA} und der Reaktionslösung der korrespondierenden $PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}$ -Bürste in DMF zur Bestimmung des Sarkosineinbaus (PS-Kalibrierung; Oligomersäule)

Zur Entschützung wird die $PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}$ -Bürste in Methanol gelöst und über Nacht mit 50 Äq. Hydrazin behandelt. Das entstandene wasserlösliche Polymer wird mittels Amicon-Zentrifugation (Ausschlussgrenze $M = 50$ kDa) in Wasser von den Abspaltungsprodukten und den linearen Verunreinigungen abgetrennt und gefriergetrocknet.

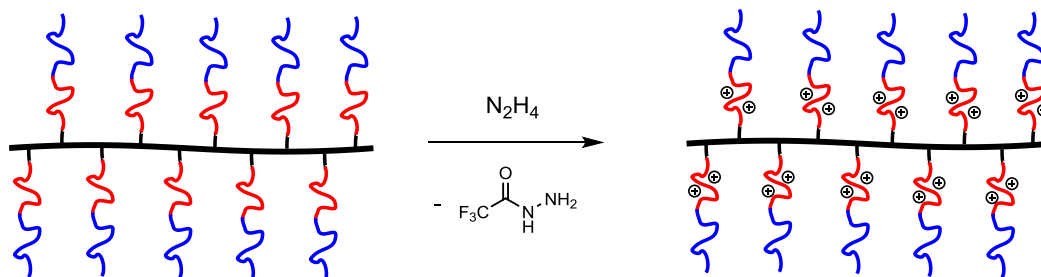


Abb. 69: Reaktionsschema für die Entschützung der $PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}$ -Bürste. Die positiven Ladungen im inneren PLL-Block (rot) entstehen, wenn das Polymer in Wasser gelöst wird

Die Vollständigkeit der Entschützung wird über FT-IR-Spektroskopie überprüft (Abb. 70). Im Spektrum ist nach der Entschützung der Bürste die Carbonylschwingungsbande der TFA-Schutzgruppe bei 1715 cm^{-1} und ihre charakteristische Valenzschwingungsbande der C-F Bindung bei ca. 1180 cm^{-1} weitestgehend verschwunden, sodass von einer fast vollständigen Entschützung ausgegangen werden kann. Gleichzeitig lassen sich im Spektrum auch die für Peptide typische Amid A-Bande bei ca. 3300 cm^{-1} (Streckschwingung N-H), Amid B-Bande bei 3100 cm^{-1} (Oberschwingung von Amid II-Bande), Amid I-Bande bei ca. 1640 cm^{-1} ($\approx 80\%$ Streckschwingung C=O) und Amid II-Bande bei 1550 cm^{-1} ($\approx 60\%$ Deformationsschwingung N-H) erkennen.

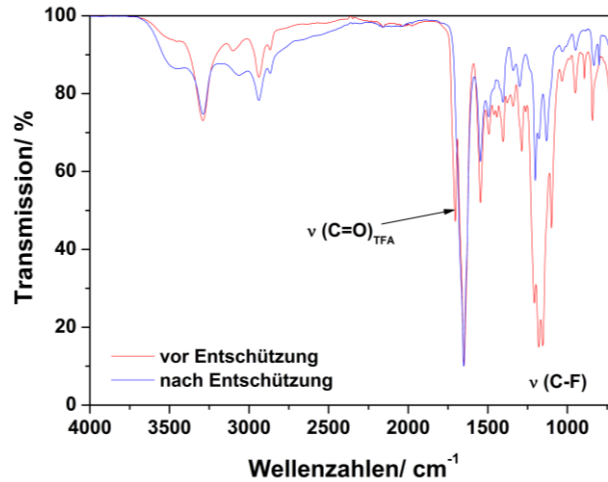


Abb. 70: FT-IR-Spektrum der aufgereinigten PSar-b-DB₆^{PAHMA}-Bürste vor (rot) und nach der Entschützung (blau)

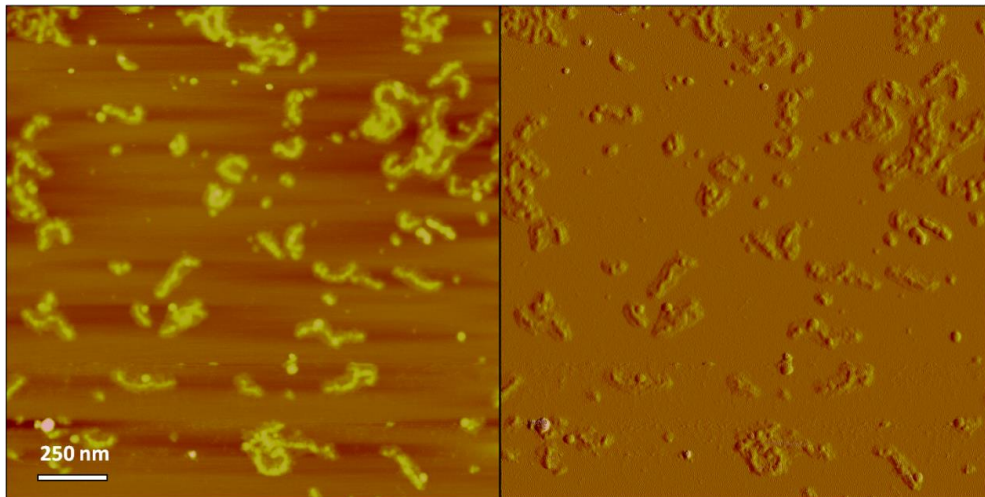


Abb. 71: AFM-Aufnahme der entschützten PSar-b-DB₆^{PAHMA}-Bürste auf Mica (Spin Casting mit $c = 0,1$ g/L in H₂O). Links: Höhenbild; Rechts: Amplitudenbild

Die entschützte Diblockbürste ist nur noch wasserlöslich, in einer HFIP- oder MeOH-GPC kann sie also nicht mehr vermessen werden. Auch eine wässrige GPC der Probe kann auf Grund der attraktiven Wechselwirkung zwischen dem hoch geladenen Polymer und dem Säulenmaterial nicht durchgeführt werden. Unter dem AFM (Abb. 71) sind zylindrische, wurmartige Bürstenpolymere zu erkennen, die wieder eine leichte Korona zeigen, welche aber nicht so stark ausgeprägt ist wie bei der geschützten PSar-b-Coblock^{PAHMA}-Bürste aus Kapitel 4.5.2.2. Auffällig ist die unregelmäßige Dicke der Bürste im Vergleich zu den anderen hergestellten Bürsten, was auf einen ungleichmäßigen Einbau der NCA-

Monomere schließen lässt, der durch dominierende Abbruchreaktionen an den initiierenden Seitenketten erklärt werden kann.

Wird die entschützte Diblockbürste gefriergetrocknet, löst sie sich im Gegensatz zur reinen Sarkosinbürste oder der geschützten PSar-b-Coblock^{PAHMA}-Bürste nicht sofort wieder in Wasser und enthält auch nach mehreren Lösungstagen immer noch feine, ungelöste Partikel. Es muss davon ausgegangen werden, dass der Gefriertrocknungsvorgang zu einer Aggregation oder Interdigitierung der Bürsten führt, die selbst nach längeren Lösungszeiten nicht mehr vollständig aufgelöst werden kann. Warum jedoch entschütztes Polylysin, welches normalerweise in einer „Random Coil“-Struktur vorliegt und sich eigentlich durch repulsive Wechselwirkungen abstoßen sollte, zu solch einem Verhalten in der Bürste neigt, bleibt ungeklärt. Allerdings tritt in der Publikation von Müllen et. al. hinsichtlich der Synthese von amphiphilen Polyelektrolytbürsten mit Polylysin-Seitenketten ein ähnliches Verhalten auf [215].

Das Aggregationsverhalten der entschützten PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste kann auch mittels dynamischer Lichtstreuung sichtbar gemacht werden (Abb. 72). Wird die gefriergetrocknete Bürste zwei Tage in PBS gelöst, besitzt sie einen hydrodynamischen Radius von ungefähr $R_h = 85$ nm. Wird die Lösungszeit auf zwei Wochen verlängert, sinkt der Radius auf $R_h = 70$ nm ab (siehe Anhang: Abb. 95). Dieser erscheint aber für das System immer noch zu groß, wenn man berücksichtigt, dass der hydrodynamische Radius der geschützten PSar-b-Coblock^{PAHMA}-Bürste mit einem viel größeren Sarkosinblock bei $R_h = 63$ nm liegt. Eventuell könnte die Aggregationsrate durch Ausdehnung der Lösungszeit auf mehrere Wochen noch weiter gesenkt werden, was in dieser Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt wurde. Die AFM-Aufnahmen der gelösten Diblockbürste in wässriger Lösung zeigen ebenfalls die Tendenz zur leichten Aneinanderlagerung der einzelnen Polymere (Abb. 73).

Auch wenn die Bürsten bei pH=3 gefriergetrocknet werden, bleibt das Aggregationsproblem erhalten. Eine Beschleunigung der Auflösung der Aggregate über Ultraschall ist ebenfalls nicht zu empfehlen, da dies zu Brüchen in der steifen Hauptkette führt (siehe Anhang: Abb. 97 und Abb. 98). Ein solches Verhalten ist für zylindrische

Bürsten auf Grund der großen Hauptkettenspannung nicht ungewöhnlich. In manchen Fällen tritt eine Hauptkettenfragmentierung auch während der Rasterkraftmikroskopie auf, wenn zwischen Oberfläche und Seitenketten hochattraktive Wechselwirkungen vorherrschen [216,217]. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die entschützten Diblocksysteme nicht gefriergetrocknet werden, um das Aggregationsproblem direkt zu umgehen.

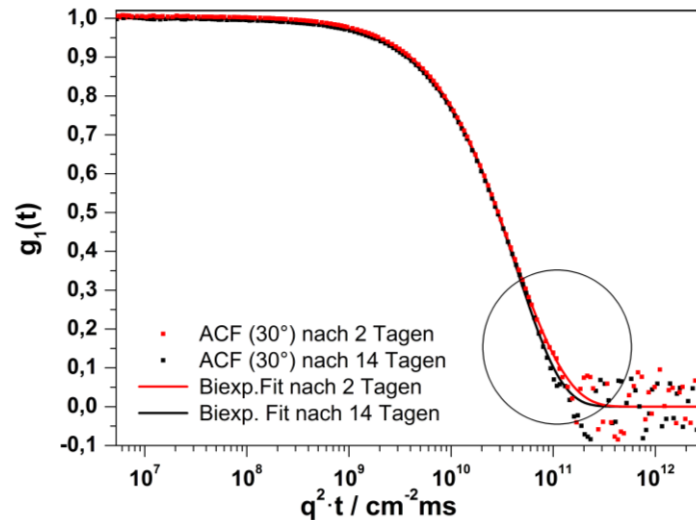


Abb. 72: Darstellung der Autokorrelationsfunktionen (ACF) und der zugehörigen biexponentiellen Fits der entschützten PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste bei 30° in PBS-Puffer ($c = 0,02 \text{ g/L}$) nach 2 (rot) bzw. 14 Lösungstagen (schwarz). Der Rückgang der Aggregate ist mit einem schwarzen Kreis verdeutlicht

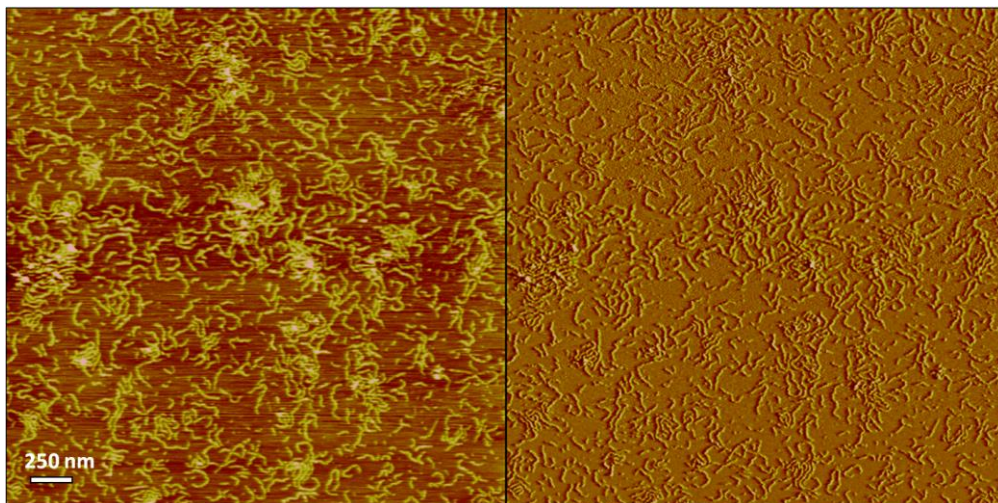


Abb. 73: AFM-Aufnahme der entschützten PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste in PBS-Lösung ($c = 0,05 \text{ g/L}$). Die Sarkosinkorona ist wahrscheinlich wegen der hohen Beweglichkeit der Bürsten in Lösung nicht zu sehen. Links: Höhenbild; Rechts: Amplitudenbild

Da über konzentrationsäquivalente GPC die Bestimmung des tatsächlichen Sarkosingehalts nicht möglich ist, wird die entschützte, filtrierte Bürstenlösung bei der Firma Genaxxon mittels Aminosäureanalyse (AAA) charakterisiert. Diese Methode liefert mit Hilfe einer Kalibrierung und unter Vernachlässigung der Masse des Rückgrats den realen Zahlenanteil sowie Massenanteil des eingebauten Sarkosins bzw. Lysins (siehe Kapitel 4.5.1.3). Laut AAA besteht der Sarkosinanteil aus $X_{\text{Sar}}^{\text{ent}} = 85\%$ bzw. $W_{\text{Sar}}^{\text{ent}} = 76\%$ (detaillierte Analyseergebnisse siehe Anhang). Außerdem kann über die AAA auch die tatsächlich enthaltene Massenkonzentration der Bürste durch Addition der einzelnen Aminosäurekonzentrationen berechnet werden und beträgt $c_B = 0,7 \text{ g/L}$, was 30% unter der mittels Einwaage bestimmten Massenkonzentration der Bürste liegt. Dieser Unterschied kann durch die Abtrennung der verbliebenen Aggregate bei der Filtration der Lösung erklärt werden.

Weil der Polymerisationsgrad von Lysin durch die GPC-Analyse des Precursors bekannt ist, kann mit dem aus der AAA erhaltenen Zahlenmittel der mittlere Polymerisationsgrad für Sarkosin auf $P_{\text{Sar}} = 96$ berechnet werden. Der Massenanteil W_{Sar} von Sarkosin lässt sich unter Verwendung der korrigierten Bürstenkonzentration aus der AAA, wie in Kapitel 4.5.1.2 beschrieben, über CD-Spektroskopie überprüfen (CD-Spektrum siehe Anhang: Abb. 96). Der erhaltene Wert von $W_{\text{Sar}} = 78\%$ stimmt dabei gut mit dem Wert aus der AAA ($W_{\text{Sar}} = 76\%$) überein (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Aufstellung aller Informationen zur Beschreibung des Sarkosin- bzw. Lysinanteils in der entschützten Diblockbürste

Bürste (entschützt)	AAA				GPC	GPC+AAA	CD
	c_B^{Einwaage}	$W_{\text{Sar}}^{\text{ent}}$	$X_{\text{Sar}}^{\text{ent}}$	c_B^{AAA}	P_{Lys}	P_{Sar}	$W_{\text{Sar}}^{\text{ent}}$
PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}	1,0 g/L	76%	85%	0,7 g/L	17	96	78%

Die Molmasse der Bürste kann wegen starker Filtrationsverluste durch die Aggregatbildung nicht in der statischen Lichtstreuung vermessen werden. Mit den mittleren Polymerisationsgraden $P_{\text{Lys}} = 17$ und $P_{\text{Sar}} = 96$ aus der GPC/AAA kann aber zumindest das theoretische Gewichtsmittel der Molmasse errechnet werden:

$$M_w^B = P_w^{Hk} \cdot (P_{Sar}^{Sk} \cdot M_{Sar}^{Wdh} + P_{Lys}^{Sk} \cdot M_{Lys}^{Wdh}) + M_w^{Hk} \quad (47)$$

Man erhält für die entschützte PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste eine theoretische Molmasse von ca. $M_w^B = 11,54 \cdot 10^6$ g/mol. Für den Erhalt des Zahlenmittels muss der Wert noch einmal mit der Polydispersität des PAHMA-Makroinitiators (PDI = 1,63) dividiert werden:

$$M_n^B = \frac{M_w^B}{PDI^{Hk}} = \frac{P_w^{Hk}}{PDI^{Hk}} \cdot (P_{Sar}^{Sk} \cdot M_{Sar}^{Wdh} + P_{Lys}^{Sk} \cdot M_{Lys}^{Wdh}) + \frac{M_w^{Hk}}{PDI^{Hk}} \quad (48)$$

Die errechnete Molmasse von $M_n^B = 7,07 \cdot 10^6$ g/mol wird später noch einmal in Kapitel 6.2.1 benötigt.

4.5.3.3. In-situ-Polymerisation mit deprotoniertem Makroinitiator

Die protonierten Amingruppen des Makroinitiators sollen über den Schlaad-Mechanismus für eine bessere Kontrolle der NCA-Polymerisation sorgen. Dafür benötigt aber ihre Reaktion viel Zeit und höhere Temperaturen. Befinden sich jedoch geringe Mengen an Verunreinigungen im NCA oder zerfällt DMF durch Thermolyse zu reaktiven Dimethylamin während der Reaktion, können diese Moleküle als schnelle Konkurrenzreaktionen lineare Polypeptide erzeugen. So wird der größte Teil der Monomere verbraucht, bevor sie in den trägeren Makroinitiator eingebaut werden können. Wird der Makroinitiator hingegen in seiner deprotonierten Form verwendet, reagiert er auch bei niedrigen Temperaturen deutlich schneller und vermindert so die Chance auf eine Fremdinitiierung. Jedoch riskiert man mit den freien Aminen den Ablauf der Polymerisation über den ungewollten AM-Mechanismus, welcher wiederum zu linearen Polypeptiden führen kann (siehe Kapitel 2.2.3).

Für die Deprotonierung von PAHMA·TFA wird dieser zuerst mit NaOH-Lösung (pH = 12) versetzt und mehrmals über einen Amiconfilter zentrifugiert (Ausschlussgrenze $M = 30$ kDa), um das TFA-Gegenion gegen ein Hydroxid-Gegenion auszutauschen. Durch die Verwendung von MilliQ-Wasser wird anschließend überschüssige Natronlauge abgetrennt und der deprotonierte Makroinitiator (PAHMA*) durch Gefriertrocknung isoliert. Im FT-IR-Spektrum erkennt man das Verschwinden der für das Trifluoracetat typischen Banden bei ca. 1715 cm^{-1} und 1180 cm^{-1} , sodass auch von einer vollständigen

Deprotonierung ausgegangen werden kann (Abb. 74). Allerdings lässt sich der modifizierte Makroinitiator nur noch in Wasser, aber nicht mehr in einem aprotischen Lösungsmittel lösen und kann somit auch nicht für die NCA-Polymerisation verwendet werden.

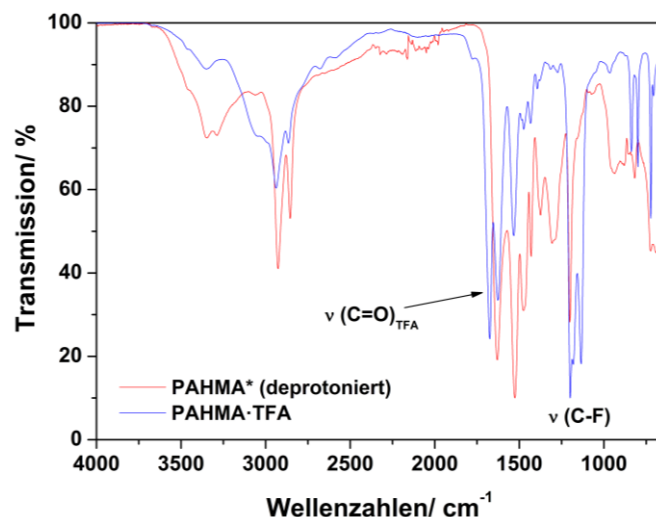


Abb. 74: FT-IR-Spektrum des PAHMA-Makroinitiators im protonierten Zustand mit TFA-Gegenionen (blau) und deprotonierten Zustand (rot)

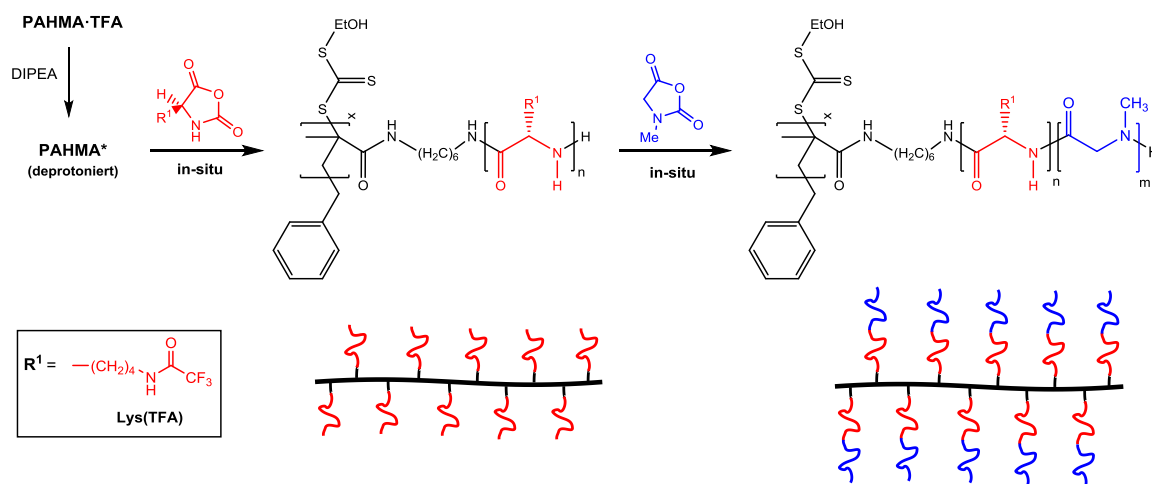


Abb. 75: Reaktionsschema für die Herstellung der PSAr-b-PLL(TFA)^{PAHMA*}-Bürste über ein in-situ-Verfahren unter Verwendung des deprotonierten PAHMA-Makroinitiators (PAHMA*)

Deshalb wird der protonierte PAHMA-Makroinitiator zuerst in DMF gelöst und mit genau einem Äquivalent der Base Diisopropylethylamin (DIPEA) versetzt. Die äquimolare Zugabe im Bezug auf die Seitenkettenenden soll verhindern, dass die sterisch anspruchsvolle Base während der NCA-Polymerisation zu Teilen noch frei vorliegt und in

den Mechanismus eingreifen kann. Dann werden beide Blöcke bei Raumtemperatur und Argon-Atmosphäre nacheinander an den Makroinitiator polymerisiert. Dabei wird das Monomer schon nach jeweils einem Tag vollständig konsumiert. Nach der Zugabe des Sarkosin-NCA ist eine deutliche Erhöhung der Viskosität erkennbar, was ein Indiz für einen besseren Einbau in die Bürste ist. Die Analyse durch die konzentrationsäquivalente GPC (Abb. 76a) stützt diese Aussage: Lysin-NCA wird mit dem deprotonierten Makroinitiator zu 90% in die Bürste eingebaut und auch die Sarkosinumsetzung kann auf 46% gesteigert werden (siehe Tabelle 13). Die basenkatalysierte „One-pot“-Reaktion führt also direkt zu Diblockbürsten, bei denen hohe Sarkosinanteile möglich sind.

Tabelle 13: Hergestellte Diblockbürste (geschützt) mit Angabe über den eingestellten Polymerisationsgrad $P(\text{theo})$ der jeweiligen Aminosäure, das Einbauverhältnis σ in die Bürste (ermittelt durch konzentrationsäquivalente GPC, siehe Kapitel 4.5.1.1) sowie die daraus errechneten, realen mittleren Polymerisationsgrade $P(\text{GPC})$ bzw. den Sarkosin-Massenanteil $W_{\text{Sar}}^{\text{ent}}$ für den entschützten Zustand

Bürste	P_{Lys} (theo.)	P_{Sar} (theo.)	$\sigma_{\text{Lys,B}}$ (GPC)	$\sigma_{\text{Sar,B}}$ (GPC)	P_{Lys} (GPC)	P_{Sar} (GPC)	$W_{\text{Sar}}^{\text{ent}}$ (GPC)
PSar-b-PLL(TFA) ^{PAHMA*}	34	208	90%	46%	31	96	63%

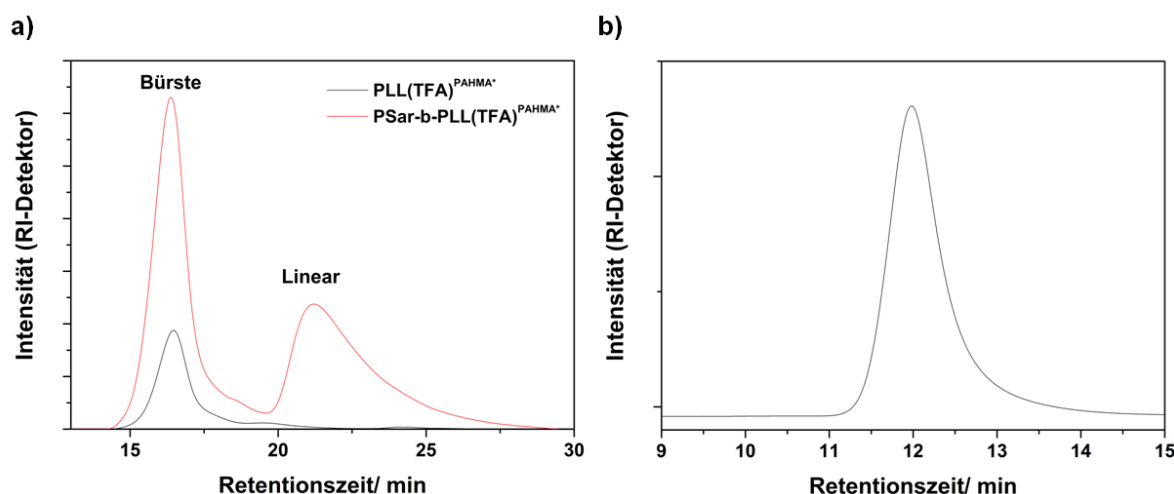


Abb. 76: a) Konzentrationsäquivalente GPC der Reaktionslösung der PLL(TFA)^{PAHMA*}-Bürste (Monoblock) und der korrespondierenden PSar-b-PLL(TFA)^{PAHMA*}-Bürste (Diblock) in DMF zur Bestimmung des Lysin bzw. Sarkosineinbaus (PS-Kalibrierung, Oligomersäule) b) HFIP-GPC der aufgereinigten PSar-b-PLL(TFA)^{PAHMA*}-Bürste (PMMA-Kalibrierung)

Wegen ihrer hohen Molmasse eluiert die Bürste in der HFIP-GPC sehr nahe an der oberen Ausschlussgrenze, sodass die erhaltene, apparente Polydispersität von $PDI = 1,43$ (PMMA-Kalibrierung) fehlerbehaftet ist (Abb. 76b). In der dynamischen Lichtstreuung

lässt sich der Zuwachs des zweiten Sarkosinblocks durch die Messung der hydrodynamischen Radien der Reaktionslösungen verfolgen (Abb. 78): Der Radius steigt nach der Zugabe des Sarkosin-NCA von $R_h = 55$ nm (Monoblockbürste) auf $R_h = 59$ nm (Diblockbürste) leicht an (Tabelle 14). Auch nach Fällung und Gefriertrocknung lässt sich die geschützte PSar-b-PLL(TFA)^{PAHMA*}-Bürste wieder in DMF lösen, ohne dass Aggregate entstehen ($R_h = 63$ nm).

Die Entschützungsreaktion erfolgt durch die direkte Zugabe von 50 Äq. Hydrazin in die Reaktionslösung der Diblockbürste. Nach mehreren Tagen werden über Amicon-Zentrifugation (Ausschlussgrenze $M = 50$ kDa) alle linearen Verunreinigungen und Abspaltungsprodukte der Schutzgruppe von der Bürste abgetrennt. Das FT-IR-Spektrum der entschützten Bürste beweist die vollständige Abspaltung aller TFA-Schutzgruppen (Abb. 77).

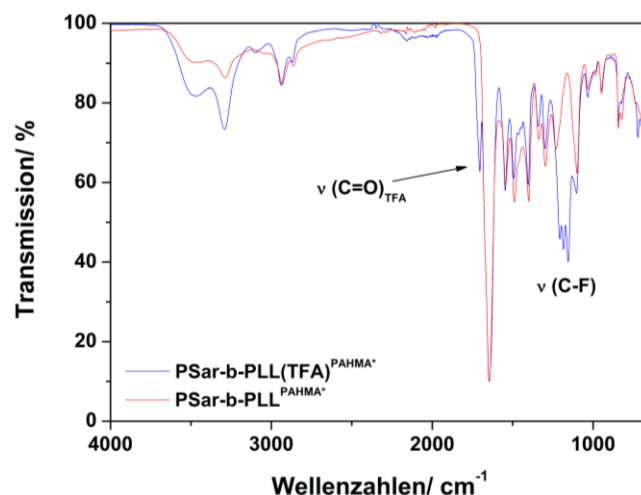


Abb. 77: FT-IR-Spektrum der Diblockbürste im geschützten (blau) und entschützten Zustand (rot)

Der hydrodynamische Radius verbleibt nach der Entschützungsreaktion bei $R_h = 60$ nm. Erst nach der Gefriertrocknung zeigt die Bürste dasselbe Aggregationsverhalten wie die entschützte PSar-DB_{v6}^{PAHMA*}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.2. Ihr hydrodynamischer Radius sinkt auch nach mehrtägigem Lösen nicht unter $R_h = 75$ nm. Um diese Aggregation zu verhindern, wird die wässrige Lösung der aufgereinigten Bürste nicht vollständig gefriergetrocknet. Für die Bestimmung der Massenkonzentration wird nur ein kleiner Teil entnommen, lyophilisiert und ausgewogen.

Tabelle 14: Darstellung aller gemessenen hydrodynamischen Radien in den einzelnen Reaktions- bzw. Behandlungsstadien während der Synthese der PSar-b-PLL^{PAHMA*}-Bürste (# = bezogen auf den beinhalteten Makroinitiator)

Bürste	Anmerkung	LM	c / g·L ⁻¹	R _h / nm
PLL(TFA)-Monoblock	Rkt.Lsg.	DMF (10 mM LiBr)	0,02 [#]	54,6
Diblock (geschützt)	Rkt.Lsg.	DMF (10 mM LiBr)	0,02 [#]	59,0
Diblock (geschützt)	nach Gefriertr.	DMF (10 mM LiBr)	0,1	62,1
Diblock (entschützt)	vor Gefriertr.	PBS-Puffer	0,1	60,5
Diblock (entschützt)	nach Gefriertr.	PBS-Puffer	0,1	74,6

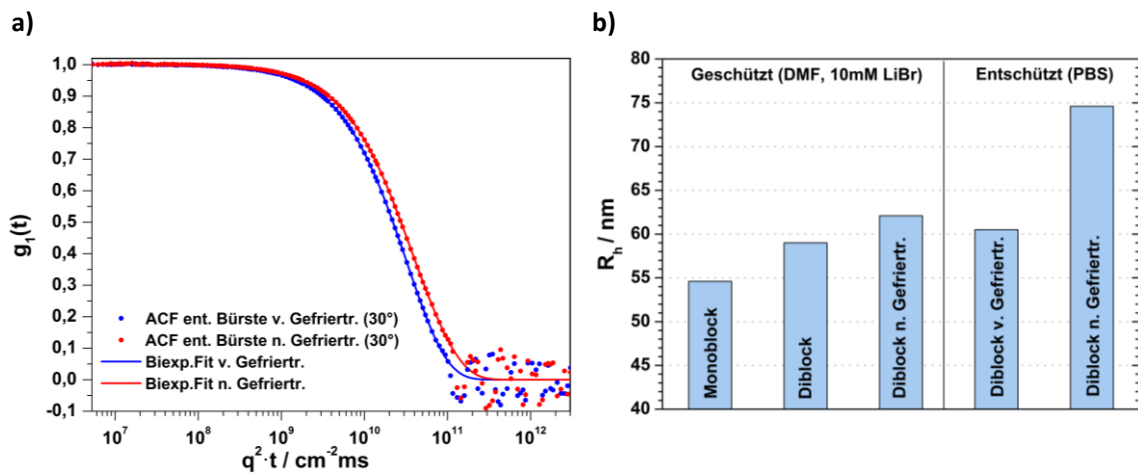


Abb. 78: a) Darstellung der Autokorrelationsfunktionen (ACF) der entschützten PSar-b-PLL^{PAHMA*}-Bürste bei 30° in PBS-Puffer (c = 0,1 g/L) und der korrespondierenden, biexponentiellen Fitfunktionen vor (blau) und nach Gefriertrocknung der aufgereinigten Bürstenlösung (rot) b) Graphische Darstellung der Änderung des hydrodynamischen Radius der Bürste während den verschiedenen Stadien der Synthese

AFM-Aufnahmen der Bürste (Abb. 79) zeigen zylindrische Strukturen, die wesentlich regelmäßiger aufgebaut sind als die der entschützten PSar-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste. Allerdings ist bei ihnen keine Corona zu erkennen (vergleiche Abb. 71). Entweder ist ihre Sarkosinblocklänge zu gering oder aber der Sarkosinblock ist mit einer ähnlich hohen Pflropfdichte wie der Lysin-Monoblock polymerisiert worden, sodass zwischen beiden Blöcken kein sichtbarer Unterschied im AFM besteht. Dies könnte auf eine wesentlich bessere Initiierung durch den deprotonierten Makroinitiator zurückzuführen sein.

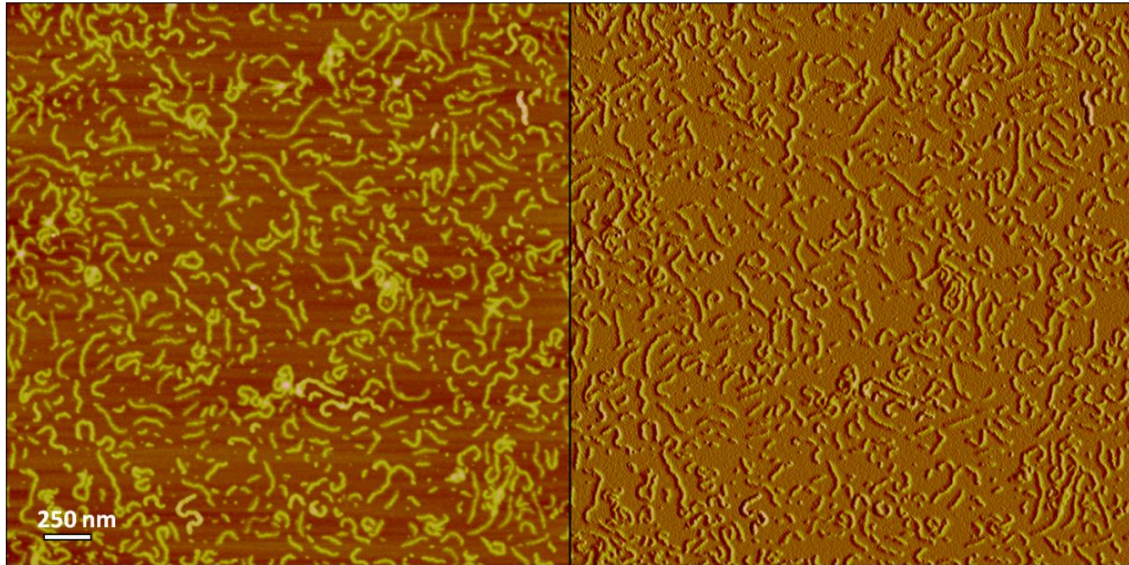


Abb. 79: AFM-Aufnahme der entschützten PSar-b-PLL^{PAHMA*}-Bürste auf Mica (Spin Casting mit $c = 0,1$ g/L in H₂O). Links: Höhenbild; Rechts: Amplitudenbild

Die entschützte Diblockbürste PSar-PLL^{PAHMA*} wird mittels Aminosäureanalyse (AAA) und CD-Spektroskopie weiter auf ihre Zusammensetzung hin untersucht (siehe Tabelle 15). Für die CD-Spektroskopie-Analyse (siehe Messung in reinem Wasser: Abb. 80b) wird wie in Kapitel 4.5.3.2 die korrigierte Konzentration aus der AAA verwendet, die um ca. 13% niedriger liegt, als durch die Gefriertrocknungsmethode bestimmt wurde. Vergleicht man alle drei angewendeten Methoden für die Analyse des Sarkosingewichtsanteils $W_{\text{Sar}}^{\text{ent}}$ in der entschützten Diblockbürste, liegen die erhaltenen Werte von 52% (CD), 58% (AAA) und 63% (GPC) nahe beieinander. Eine Aussage über den realen durchschnittlichen Polymerisationsgrad der Blöcke (bei 100%iger Pfropfdichte) kann aber nur die konzentrationsäquivalente GPC liefern. Jedoch ist die Auswertung von P_{Sar} wegen der Integration und Subtraktion der sehr großen Signalflächen fehlerbehaftet, sodass es sich empfiehlt, diesen aus dem erhaltenen Zahlenmittel der AAA ($X_{\text{Sar}}^{\text{ent}} = 71\%$) und dem weniger fehlerbehafteten Lysin-Polymerisationsgrad aus der GPC ($P_{\text{Lys}} = 31$) zu berechnen. Man erhält für den Polymerisationsgrad von Sarkosin $P_{\text{Sar}} = 77$, welcher um ca. 20% niedriger liegt, als von der konzentrationsäquivalenten GPC ermittelt wurde.

Tabelle 15: Aufstellung aller Informationen zur Beschreibung des Sarkosin- bzw. Lysinanteils in der entschützten PSar-b-PLL^{PAHMA*}-Bürste

Bürste (entschützt)	AAA				GPC			GPC+AAA	CD
	c _B ^{Einwaage}	W _{Sar} ^{ent}	X _{Sar} ^{ent}	c _B ^{AAA}	P _{Lys}	P _{Sar}	W _{Sar} ^{ent}	P _{Sar}	W _{Sar} ^{ent}
PSar-b-PLL ^{PAHMA*}	6,42 g/L	58%	71%	5,6 g/L	31	96	63%	77	52%

Mit den erhaltenen, mittleren Polymerisationsgraden von $P_{Lys} = 31$ und $P_{Sar} = 77$ kann nun unter Beachtung des Fehlens der TFA-Gegenionen an den Seitenkettenenden das theoretische Gewichtsmittel der Molmasse M_w für die entschützte Diblockbürste berechnet werden:

$$M_w^B = P_w^{Hk} \cdot (P_{Sar}^{Sk} \cdot M_{Sar}^{Wdh} + P_{Lys}^{Sk} \cdot M_{Lys}^{Wdh} - M_{TFA}) + M_w^{Hk} \quad (49)$$

Man erhält nach Einsetzen aller Parameter $M_w^B = 12 \cdot 10^6$ g/mol. Eine statische Lichtstreuung kann nur an der nicht gefriergetrockneten Bürstenlösung gemessen werden, da sonst große Filtrationsverluste eintreten, die das Ergebnis verfälschen. Die vermessenen Konzentrationen werden mit dem Faktor $c_B^{AAA} / c_B^{Einwaage}$ korrigiert. Das Brechungssinkrement der entschützten Bürste wird ermittelt, indem die jeweiligen Gewichtsanteile der Aminosäuren aus der AAA ($W_{Sar}^{ent} = 58\%$ bzw. $W_{Lys}^{ent} = 42\%$) mit den jeweiligen Brechungssinkrementen der reinen Sarkosinbürste ($dn/dc = 0,1915$ mL/g) bzw. der reinen PLL-Bürste ($dn/dc = 0,164$ mL/g) [16] multipliziert werden:

$$\left(\frac{dn}{dc}\right)_B = W_{Sar}^{ent} \left(\frac{dn}{dc}\right)_{B,Sar} + W_{Lys}^{ent} \left(\frac{dn}{dc}\right)_{B,Lys} \quad (50)$$

Man erhält für eine Bürste mit dieser Zusammensetzung ein Brechungssinkrement von $dn/dc = 0,18$ mL/g. Trotz vieler Abwägungen und Korrekturen stimmt die aus der statischen Lichtstreuung erhaltene Molmasse von $M_w = 11,3 \cdot 10^6$ g/mol (Abb. 80a) gut mit der theoretischen Molmasse überein (Abweichung ca. 6%). Der mittlere Trägheitsradius kann auf $R_g = 81$ nm ermittelt werden und liegt damit deutlich höher als für die reine PSar^{PAHMA*}-Bürste.

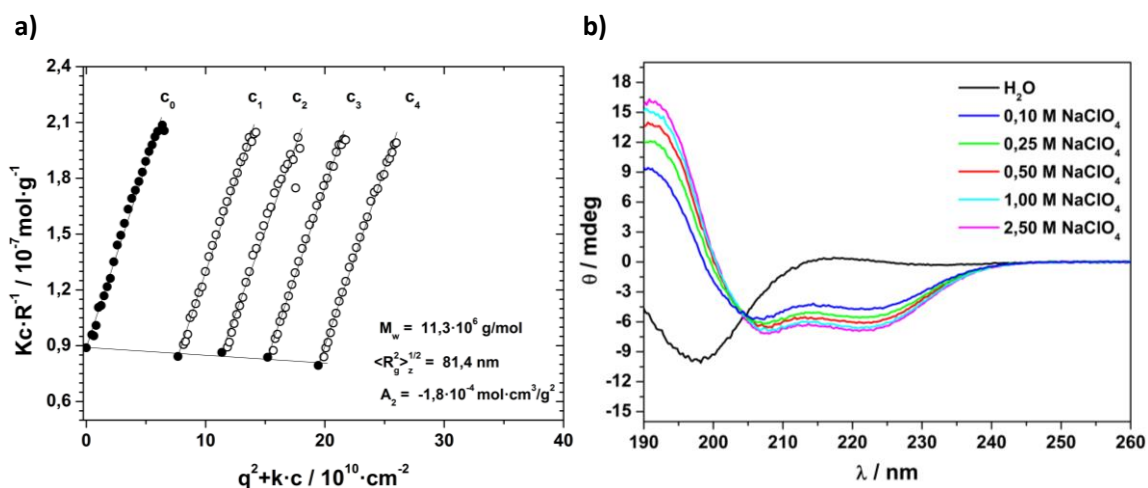


Abb. 80: Charakterisierung von PSar-b-PLL^{PAHMA*} in PBS-Puffer mittels statischer Lichtstreuung bei 20°C: **a)** Zimm-Plot im Bereich von 30° und 150° (5°-Schritte) mit $c_1 = 9,6 \text{ mg/L}$, $c_2 = 14,2 \text{ mg/L}$, $c_3 = 19,0 \text{ mg/L}$, $c_4 = 24,3 \text{ mg/L}$ und $dn/dc = 0,18 \text{ cm}^3/\text{g}$ (errechnet) **b)** CD-Spektrum von PSar-b-PLL^{PAHMA*} mit $c = 0,093 \text{ g/L}$ (korrigiert über AAA) in H_2O mit verschiedenen NaClO_4 -Konzentrationen bei 20°C

Neben der Möglichkeit, den PLL-Block als polykationisches Strukturelement für die Komplexierung von Polynukleotiden einzusetzen, gestattet Polylysin auch Konformationsübergänge durch Zusatz von Salzen, wie z.B. NaClO_4 , zu induzieren [218]. Allerdings können am PLL befestigte, achirale Blöcke wie PEG eine Helixausbildung inhibieren [6]. Um den Einfluss der äußeren Sarkosinblöcke zu testen, wird deshalb die entschützte PSar-b-PLL^{PAHMA*}-Bürste mit verschiedenen Konzentrationen wässriger NaClO_4 -Lösung versetzt (von 0 M bis 2,5 M) und mittels CD-Spektroskopie untersucht. In Abb. 80b erkennt man qualitativ die Änderung der Seitenkettenkonformation von einer „Random Coil“-Struktur in Wasser zu einer ausgeprägten helikalen Struktur bei höheren NaClO_4 -Konzentrationen. Die Konformationsübergänge sind kontinuierlicher Natur, was an der Ausbildung eines isosbestischen Punktes abgeleitet werden kann. Der innere PLL-Block ist somit ungeachtet des angebundenen Polysarkosin-Blocks, immer noch in der Lage, durch externe Stimuli seine Sekundärstruktur zu verändern.

4.5.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel werden auf verschiedene Art und Weise Diblockbürstensysteme hergestellt. Die Synthesewege sind anschaulich in Abb. 81 illustriert. Die erhaltenen Ergebnisse werden noch einmal in den folgenden Unterkapiteln kurz zusammengefasst.

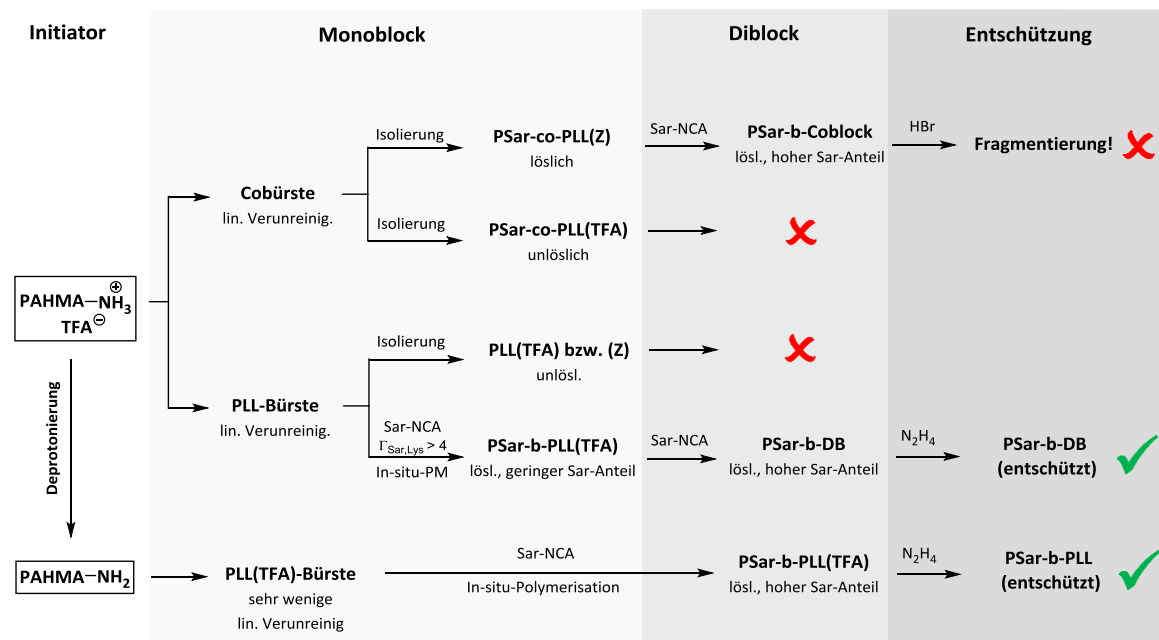


Abb. 81: Schematische Darstellung aller Synthesewege zur Erzeugung von Diblockbürsten

4.5.4.1. Synthese über Cobürsten-Precursor

Für die Diblocksynthese kann eine lösliche, zylindrische Coblockbürste [PSar-co-PLys(Z)]^{PAHMA} als Precursor hergestellt und aufgereinigt werden. Cobürsten mit Polylysin(TFA)-Bestandteil verbleiben trotz ihres Sarkosingehalts unlöslich. Bei der anschließenden Polymerisation des Precursors mit Sarkosin-NCA kann eine äußere Sarkosinschale mit einem Gewichtsanteil von ca. 60% angebracht werden. Die Bürste ist im geschützten Zustand wasserlöslich und zeigt im AFM eine stark elongierte Konformation und einer Korona, die vermutlich durch den niedrigen Pflopfungsgrad des äußeren Sarkosinblocks zustande kommt. Jedoch kann die Z-geschützte Diblockbürste nicht unter sauren Bedingungen entschützt werden, ohne dass große Teile des Polysarkosins wieder abgespalten werden. Deshalb sind Lys(Z)-haltige Diblockbürsten ungeeignet für die weitere Forschung und Anwendung als Transfektionsagenzien.

4.5.4.2. Synthese über in-situ-Polymerisation

Mit zwei unterschiedlichen Varianten, beruhend auf einem in-situ-Verfahren, können Lys(TFA)-haltige, entschützte zylindrische Diblockbürsten hergestellt werden. Bei der ersten Variante wird der PAHMA-Makroinitiator in seiner protonierten Form eingesetzt. Wegen der Bildung vieler linearer Verunreinigungen sind hohe Sarkosin-NCA-Verhältnisse nötig, um isolierbare, geschützte Diblockbürsten mit geringem Sarkosin Gehalt zu erhalten. Diese können aber nach ihrer Aufreinigung wiederum als Precursor verwendet werden, um weiteres Sarkosin anzubringen und damit eine größere Sarkosinschale zu erzeugen. In der zweiten Variante wird der vorgelegte PAHMA-Makroinitiator mit Hilfe einer sterisch gehinderten Base deprotoniert. Durch die erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit und die milderen Reaktionsbedingungen kann die Einbaueffizienz von Lysin-NCA und Sarkosin-NCA erheblich gesteigert werden, sodass sarkosinreiche Diblockbürsten direkt in einer „One-pot“-Reaktion erhalten werden können. Die Entschützung der Bürsten mit Hydrazin ist laut IR-Spektroskopie weitestgehend vollständig und führt mit hoher Sicherheit zu keiner Fragmentierung. Jedoch aggregieren die entschützten Diblockbürsten nach der Gefriertrocknung, sodass auf diese Behandlung verzichtet werden sollte. Die Zusammensetzung der einzelnen Blöcke wird über drei verschiedene Methoden (AAA, CD, GPC) ermittelt. Durch die Kombination von AAA und GPC können realistische, mittlere Polymerisationsgrade von Lysin und Sarkosin bestimmt werden, sofern von einer 100%igen Pfropfungsdichte ausgegangen wird. Dabei scheint die PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.2 einen halb so großen Lysinblock, aber dafür einen größeren Sarkosinblock als die PSar-PLL^{PAHMA*}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.3 zu besitzen (siehe Tabelle 16). Desweiteren kann über CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass in den PLL-Seitenketten, trotz angebundener Polysarkosin-Blöcke eine Helix-Konformation mit NaClO₄ induziert werden kann.

Tabelle 16: Vergleich der Charakteristika der beiden hergestellten, entschützten Diblockbürsten

Bürste \ Methode	AAA		GPC			GPC+AAA		CD
	W _{Sar} ^{ent}	X _{Sar} ^{ent}	P _{Lys}	P _{Sar}	W _{Sar} ^{ent}	P _{Sar}	Γ _{Sar,Lys}	W _{Sar} ^{ent}
PSar-b-DB _{V6} ^{PAHMA}	76%	85%	17	-	-	96	5,6	78%
PSar-b-PLL ^{PAHMA*}	58%	71%	31	96	63%	77	2,5	52%

5. Biokompatibilität

Für die Anwendung von polymeren Trägersystemen im menschlichen Körper muss deren Biokompatibilität gewährleistet sein. Wichtige Indikatoren für die Biokompatibilität von Stoffen sind unter anderem ihre Zelltoxizität und ihr Verhalten im Blutserum. Weder sollte die Aufnahme des Polymers zu einer Schädigung der Zelle führen, noch darf es im Blutkreislauf mit Proteinen wechselwirken, die eine Immunreaktion auslösen oder die Inaktivierung und Ausscheidung des Nanoträgers einleiten können. Polysarkosin wird in der Literatur ein „Stealth“-Effekt zugeschrieben, der die Bioverträglichkeit von „Drug Delivery“-Systemen deutlich verbessern kann [121-124]. Ob dieser Einfluss auch bei der in Kapitel 4.3.1 und 4.5.3.2 synthetisierten Polysarkosinbürste bzw. Diblockbürste gegeben ist, soll anhand von Toxizitätstests und der Analyse des Aggregationsverhaltens in humanem Blutserum über dynamischer Lichtstreuung untersucht werden [131].

5.1. Zelltoxizität

5.1.1. PSar-Bürste

Die MTT-Toxizitätstests werden von [REDACTED] am Institut für Dermatologie der Universitätsklinik Mainz durchgeführt. Dabei wird die Überlebensrate zweier verschiedener Zelllinien in Gegenwart von PSar^{PAHMA} nach 24 Stunden in einem Triplikat ermittelt, auf unbehandelte Zellen normiert und anschließend gemittelt. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich einerseits um dendritische Knochenmarkzellen (BM-DC = „bone marrow-derived dendritic cells“) und andererseits um menschliche, embryonale Nierenzellen (HEK293 = „human embryonic kidney 293 cells“). Die Ergebnisse in Abb. 82 bescheinigen der Bürste eine gute Verträglichkeit in HEK293-Zellen und in den sensibleren BM-DC. Die Zellviabilität liegt nach 24h auch bei sehr hohen Bürstenkonzentrationen noch zwischen 70-80%, was die schon zuvor in der Theorie beschriebene Biokompatibilität des Polysarkosins unterstreicht. Somit scheint die geringe Dichte der positiven Ladungen an den Seitenkettenenden nur geringe Auswirkungen auf die Toxizität des Polymers zu haben.

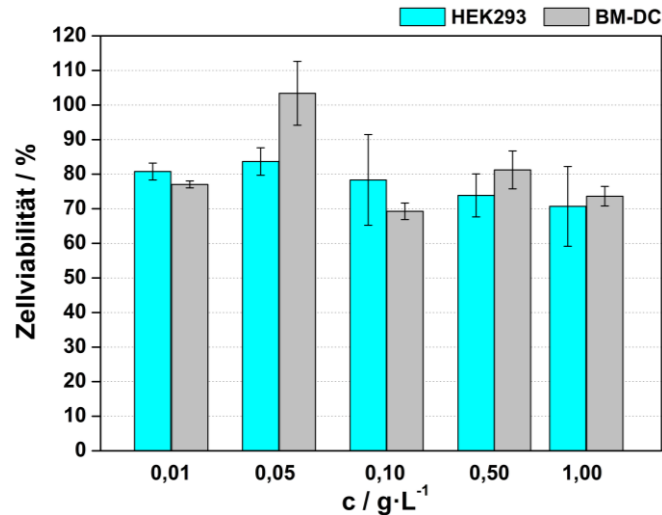


Abb. 82: MTT-Test für die PSar^{PAHMA}-Bürste an HEK293 (cyan) und BM-DC (grau) nach 24h

5.1.2. Diblockbürste

Reines Polylysin ist genauso wie Polyethylenimin (PEI) auf Grund der hohen Zahl kationischer Ladungen für die meisten Zellen stark toxisch [219-221]. Die äußere Sarkosinschale soll daher die inneren, positiven Ladungen weitestgehend abschirmen und somit die Toxizität des Systems absenken. Am Beispiel der entschützten Diblockbürste PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA} aus Kapitel 4.5.3.2 wird die Verträglichkeit dieser Systeme von [redacted] am Institut der Translationalen Immunologie der Universitätsklinik Mainz an 3T3-Fibroblasten (bewegliche Bindegewebszellen) getestet (Abb. 83).

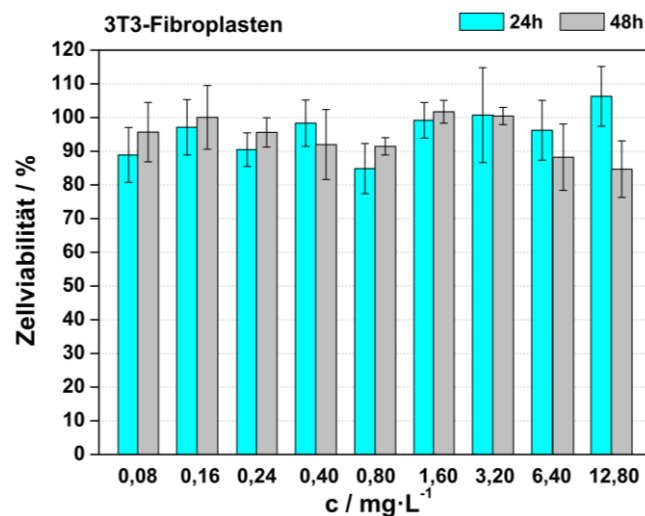



Abb. 83: MTT-Test für die entschützte PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste an 3T3-Fibroblasten nach 24h (cyan) und 48h (grau)

Die Überlebensrate liegt für Transfektionsbehandlungen üblichen Konzentrationen auch nach 48 Stunden zwischen 85-100% und beweist die gute Abschirmung der positiven Ladungen durch den äußeren Sarkosinblock.

5.2. Verhalten im Blutserum

Ob Polymere mit Bestandteilen des Blutserums aggregieren, kann mit einer von  entwickelten Methode mittels dynamischer Lichtstreuung nachgewiesen werden [131]. Hierfür werden die verdünnte Polymerprobe und das humane Blutserum zuerst in PBS-Puffer separat vermessen. Aus den jeweiligen Messungen lassen sich unter Verwendung der Software HDRC die Autokorrelationsfunktionen der Bestandteile anfitten, um die charakteristischen präsenten Abklingzeiten τ_i sowie deren Anteile an der Gesamtintensität a_i zu bestimmen. Polymere sind auf Grund ihrer vorhandenen Polydispersität meistens gut mit einer biexponentiellen Fitfunktion $g_{1,p}(t)$ zu beschreiben:

$$g_{1,p}(t) = a_{1,p} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,p}}\right) + a_{2,p} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,p}}\right) \quad (51)$$

$$\tau_i = (q^2 D_i)^{-1} \quad (52)$$

Für das humane Blutserum hat sich eine triexponentielle Fitfunktion $g_{1,s}(t)$ bewährt [131]:

$$g_{1,s}(t) = a_{1,s} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,s}}\right) + a_{2,s} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,s}}\right) + a_{3,s} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{3,s}}\right) \quad (53)$$

Falls keine oder kaum Wechselwirkungen zwischen beiden Systemen auftreten, kann die Korrelationsfunktion einer Mischung über die Addition der individuellen Korrelationsfunktionen $g_{1,i}(t)$ angefitet werden:

$$g_{1,m}(t) = f_p \cdot g_{1,p}(t) + f_s \cdot g_{1,s}(t) \quad (54)$$

Dabei werden die Parameter der Einzelfitfunktionen konstant gehalten und nur der Beitrag f_i zur Gesamtamplitude angepasst. Das Residuum sollte keine systematische Abweichung im Fitverlauf aufweisen. Zeigen sich doch Abweichungen, stammen diese

von aggregatsbildenden Wechselwirkungen zwischen den Blutbestandteilen und dem Polymer. In diesem Fall wird eine weitere aggregatsbeschreibende Fitkomponente zugefügt, deren Parameter, wie auch die einzelnen Amplitudenanteile f_i , frei gefittet werden, um eine ungefähre Aussage über den prozentualen Anteil der gebildeten Aggregate sowie deren Größe zu erlauben:

$$g_{1,m+a}(t) = f_p \cdot g_{1,p}(t) + f_s \cdot g_{1,s}(t) + f_{agg} \cdot g_{1,a}(t) \quad (55)$$

$$g_{1,a}(t) = a_{1,a} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,a}}\right) \quad (56)$$

Meist wird die Messung bei einem Streuwinkel von 30° durchgeführt, da in diesem Bereich die Sensitivität für die Detektion von größeren Teilchen am höchsten ist.

5.2.1. PSar-Bürste

Die Korrelationsfunktion der PSar^{PAHMA}-Bürste in humanem Blutserum kann ausreichend gut mit dem additiven Mischungsfit $g_{1,m}(t)$ aus den einzelnen Komponenten, ohne größere systematische Abweichungen im Residuum, beschrieben werden (Abb. 84). Die Polysarkosinbürste interagiert also nicht mit den Proteinbestandteilen des Serums, was den „Stealth“-Effekt von Polysarkosin bestätigt.

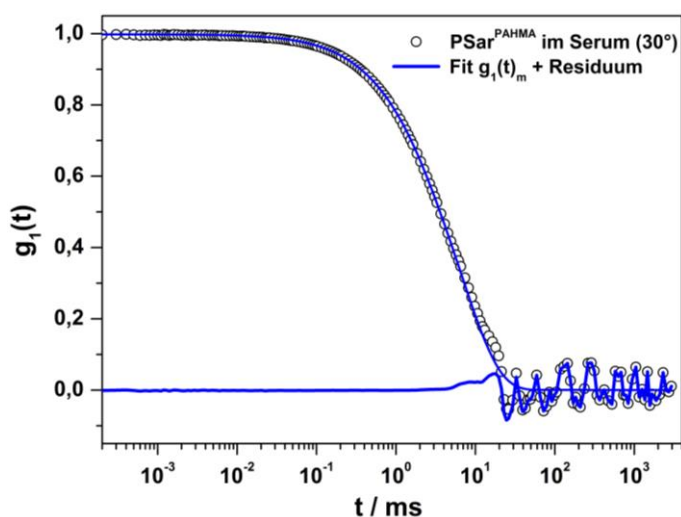


Abb. 84: Autokorrelationsfunktion (ACF) der PSar^{PAHMA}-Bürste mit Multikomponentenfit ohne zusätzliche aggregationsbeschreibende Komponente und mit entsprechendem Residuum bei 30° mit $c = 0,05$ g/L in PBS-verdünntem humanem Blutserum ($c_s = 30$ g/L)

5.2.2. Diblockbürste

Die Messung wird exemplarisch an der PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.2 durchgeführt (Abb. 85). Bei ihr stimmt der additive Multikomponentenfit $g_{1,m}(t)$ bei 30° nicht vollständig mit der gemessenen Korrelationsfunktion der Mischung überein. Es sind also kleinere Mengen an Aggregate entstanden, die mit der Hilfe einer zusätzlichen, aggregatsbeschreibenden Komponente $g_{1,m+a}(t)$ berücksichtigt und charakterisiert werden können (siehe Formel (55)). Der hydrodynamische Radius der Aggregate beläuft sich auf ca. 228 nm und ihr Anteil macht ungefähr 15% von der Gesamtintensität aus. Wird für alle Fraktionen eine Knäuelstruktur angenommen, ist die Intensität ungefähr proportional zum Produkt aus Masse und dem quadratischen hydrodynamischen Radius. Da die Aggregate im Vergleich zu den anderen Komponenten einen weitaus höheren hydrodynamischen Radius besitzen, ist ihr Massenanteil im System sehr gering. Die Sarkosinschale schirmt demnach den größten Teil der positiven Ladungen des Polylysins ab und reduziert die Aggregationstendenz im Serum.

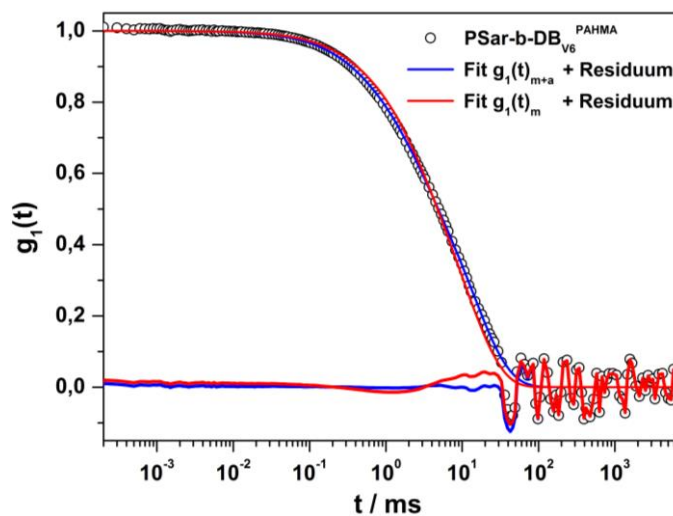


Abb. 85: Autokorrelationsfunktion (ACF) der PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste mit Multikomponentenfit mit zusätzlicher, aggregationsbeschreibender Komponente und entsprechendem Residuum bei 30° mit $c = 0,05$ g/L in PBS-verdünntem humanem Blutserum ($c_s = 30$ g/L)

5.3. Zusammenfassung

Weder die Polysarkosinbürste PSar^{PAHMA} noch die Diblockbürste PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA} sind für die Zellen schädlich. Außerdem besitzen sie keine oder nur eine schwach ausgeprägte Tendenz mit Blutserumsbestandteilen zu aggregieren. Durch den schützenden „Stealth“-Effekt der äußeren Sarkosinschale eignen sich daher beide als Transportsysteme für biotechnologische Anwendungen.

6. Anwendung in der Biotechnologie

Nach der erfolgreichen Synthese der zylindrischen Bürstenpolymere sowie der Überprüfung ihrer Biokompatibilität sollen sie in diesem Kapitel auf ihre Eignung als polymere Impfstoffe bzw. Transfektionsmittel untersucht werden. Die Polysarkosinbürsten werden zur weiteren Modifizierung und Erforschung als polymere Impfstoffe an [REDACTED] aus dem Arbeitskreis [REDACTED] übergeben. Eine kurze Zusammenfassung der von ihr bisher erzielten Ergebnisse in ihrer Diplomarbeit ist in Kapitel 6.1 gezeigt. Kapitel 6.2 beschäftigt sich mit der Komplexierungseffizienz der beiden entschützten Diblockbürsten. Außerdem wird ihr Einsatz als Transfektionsmittel für den Gen-Knockdown spezieller Proteine von [REDACTED] am Institut für [REDACTED] der Universitätsklinik Mainz untersucht.

6.1. PSar-Bürsten als polymere Impfstoffe

In der Krebsimmuntherapie sollen Polymer-Konjugate über einen angebundenen Antikörper gezielt an dendritische Zellen adressiert werden, um diese nach ihrer Aufnahme mit einem ebenfalls angebundenen Tumor-assoziierten Antigen zu aktivieren. Die aktivierten dendritischen Zellen induzieren daraufhin eine T-Zellen-Immunantwort gegen den antigentragenden Tumor und bekämpfen somit das krankhafte Gewebe (ausführliche Informationen siehe [222]). Damit der polymere Träger ausschließlich durch antikörpervermittelte Zellaufnahme in die dendritischen Zellen gelangt, darf dieser alleine jedoch keine oder nur eine sehr geringe, unspezifische Zellaufnahme zeigen. Ob diese Voraussetzung auch für reine Polysarkosinbürsten gilt, wird von Ingrid Tubbe bzw. Cinja Kappel an Alexa Fluor 488 markierten PSar^{PAHMA}-Bürsten über FACS-Messungen an der Universitätsklinik Mainz überprüft. Dabei werden die Bürsten bereits nach vier Stunden zu 36% unspezifisch in die dendritischen Zellen aufgenommen, was höchstwahrscheinlich auf den attraktiven Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Seitenkettenenden und der negativ geladenen Zellmembran beruht. Azidfunktionalisierte N₃-PSar^{PAHMA}-Bürsten hingegen zeigen nahezu keine unspezifische Aufnahme mehr (ca. 0,2% nach 4 Stunden), da der größte Teil der Kettenenden mit

ungeladenen Azidgruppen abgesättigt ist. Über die große Anzahl an Azidgruppen können sie leicht mit Antikörpern und Antigenen konjugiert werden und eignen sich daher gut für die Krebsimmuntherapie.

6.2. Diblockbürsten als Transfektionsmittel

PSar-b-PLL-Diblockbürsten sind geeignete Systeme, um therapeutische RNA oder DNA zu laden und diese im Einsatz gegen genetisch bedingte Krankheiten als Transfektionsmittel zu ihrem Einsatzort im Körper zu transportieren. Hierbei besitzt der innere, positiv geladene Polylysinblock die Aufgabe, die Polynukleotide für den Transport so im Inneren der Bürste zu komplexieren, dass sie nicht durch Diffusion oder die Verdrängung von Proteinen unwillkürlich freigesetzt werden können. Als Triebkraft für die Komplexbildung dient die gegenseitige Anziehung der unterschiedlich geladenen Polyionen, der Entropiegewinn durch die Freisetzung von Gegenionen und gebundenem Wasser sowie die Abschirmung der elektrostatischen Repulsion der gleichgeladenen Polyionen untereinander. Allerdings muss nach der Komplexbildung die Möglichkeit bestehen, die Moleküle wieder an ihrem Zielort abzugeben. Die elektrostatische Bindungsstärke in der Bürste ist auf Grund ihrer Geometrie herabgesetzt, sodass ein „Release“ der Wirkstoffe am Zielort erleichtert wird [223]. Die äußere Polysarkosinschale dient wegen ihres „Stealth“-Effekts zum Schutz des geladenen, genetischen Materials vor enzymatischem Abbau sowie zur Maskierung von verbliebenen Ladungen, die bei der Komplexbildung auf Grund des „Mismatches“ zwischen den unterschiedlichen Ladungsdichten von Bürste und den Polynukleotiden entstehen.

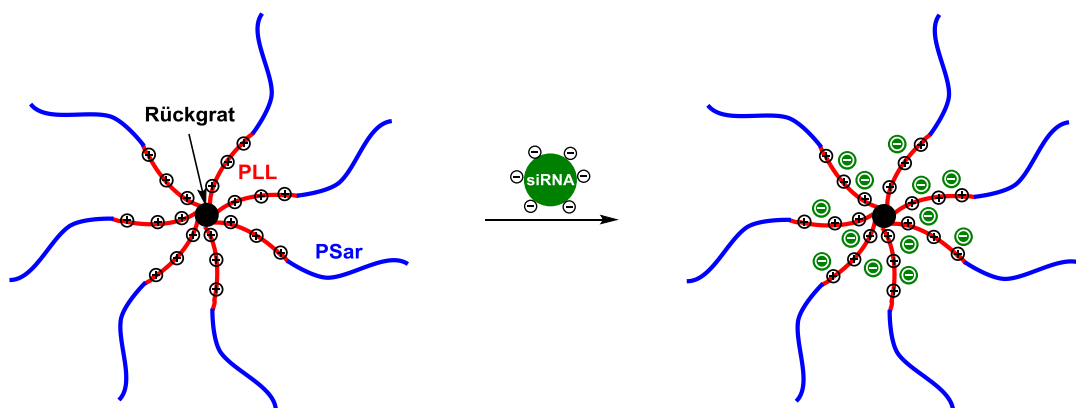


Abb. 86: Schematische Darstellung der Diblockbürsten-Komplexierung (Bürstenquerschnitt)

6.2.1. Komplexierungseffizienz

Die in Kapitel 4.5.3.2 und 4.5.3.3 erfolgreich hergestellten Diblockbürsten werden auf ihre Komplexierungseffizienz mit siRNA untersucht. Wie in Kapitel 2.4.1 bereits erklärt, wird siRNA in der Gentherapie zur Unterdrückung der Proteinexpression bestimmter Gene eingesetzt (Gen-Knockdown). Für die Komplexierung wird eine hybridisierte siRNA mit 22 Basenpaaren von der Firma IBA Nucleic Acids Synthesis verwendet ($M = 14.885 \text{ g/mol}$), die an einem Ende den Farbstoff ATTO565 trägt und für den Knockdown von GFP („Green fluorescent protein“) eingesetzt werden kann. Unter Beachtung des Korrekturfaktors für die Massenkonzentration aus der AAA werden die Bürsten in einer Küvette mit der Konzentration von ca. $20 \mu\text{g/mL}$ in PBS-Puffer vorgelegt und danach sukzessive siRNA-Lösung mit ebenfalls $20 \mu\text{g/mL}$ zutitriert. Nach jedem Zugabeschritt wird die Lösung 10 Minuten inkubiert und dann über dynamische Lichtstreuung charakterisiert. Dabei werden die mittlere Streuintensität bei 30° und der mittlere hydrodynamische Radius R_h aufgezeichnet. Die genaue Auswertung soll im Folgenden erklärt werden:

Die Molmasse der reinen Bürste M_B ist proportional zu ihrer Streuintensität $\langle R_\theta \rangle_B$ und antiproportional zu ihrer Konzentration c_B . Den reinen Intensitätsbeitrag der Bürste erhält man nach dem Abzug des Beitrags des Lösungsmittels (PBS-Puffer) von der gemessenen Intensität der Gesamtlösung. Der zweite Virialkoeffizient kann vernachlässigt werden, da er für die Bürste (und die späteren Komplexe) nahezu null ist:

$$\frac{1}{M_B} = \frac{kc_B}{\langle R_\theta \rangle_B} = \frac{kc_B}{\langle R_\theta \rangle_{Lsg} - \langle R_\theta \rangle_{PBS}} \quad (57)$$

$$M_B \sim \frac{\langle R_\theta \rangle_{Lsg} - \langle R_\theta \rangle_{PBS}}{c_B} \quad (58)$$

Wird nun RNA zugegeben und diese vollständig von der Bürste aufgenommen, kann die Molmasse des Komplexes $M_{C,app}$ berechnet werden, sofern keine Verbrückung zwischen den Bürsten eintritt (Einzelbürstenkomplexe):

$$M_C = M_B + \frac{m_{RNA}}{n_B} = M_B + M_B \frac{m_{RNA}}{m_B} = M_B \left(1 + \frac{c_{RNA}}{c_B} \right) \quad (59)$$

Während der RNA-Aufnahme ändert sich auch das Brechungsinkrement des Komplexes:

$$\left(\frac{dn}{dc} \right)_C = w_B \left(\frac{dn}{dc} \right)_B + (1 - w_B) \left(\frac{dn}{dc} \right)_{RNA} \quad (60)$$

Das Brechungsinkrement für RNA beträgt ca. $0,17 \text{ cm}^3/\text{g}$. Für die Bürste lässt sich das Brechungsinkrement wiederum mit Formel (50) aus ihrem Lysin- bzw. Sarkosin-Gewichtsanteil berechnen. Da das Brechungsinkrement quadratisch in die Molmasse eingeht, muss die Molmasse des Komplexes mit einem Korrekturfaktor φ_n angepasst werden:

$$M_{C,korr} = \varphi_n \cdot M_C = \frac{\left(\frac{dn}{dc} \right)_B^2}{\left(\frac{dn}{dc} \right)_C^2} \cdot M_C \quad (61)$$

Die Formeln (59) und (60) sind so lange gültig, bis die RNA vollständig in die Bürste eingebaut worden ist. Nach der Sättigung bleiben die Molmasse und das Brechungsindexinkrement des Komplexes konstant und es tritt ungebundene RNA auf, welche mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließender SYBR-Gold-Anfärbung nachgewiesen werden kann. Der Komplex alleine läuft auf Grund seiner hohen Molmasse nicht und bleibt in der Tasche zurück.

Da die Streuintensität aller Lösungen jeweils nur bei einem Winkel ($q \neq 0$) und einer Konzentration ($c \neq 0$) gemessen wird, sind alle aus ihr erhaltenen Molmassen als apparent zu betrachten. Durch den Vergleich der apparenten Molmassen des Komplexes mit der unkomplexierten Bürste lässt sich jedoch eine relative Komplexmolmasse $M_{C,korr}/M_B$ berechnen. Aufgetragen gegen das vorherrschende Massenverhältnis $\Psi_{RNA,B}$ zwischen RNA und Bürste, ergibt sich im Idealfall eine RNA-Titrationskurve:

$$\frac{M_{C,korr}}{M_B} \quad \text{vs.} \quad \Psi_{RNA,B} = \frac{c_{RNA}}{c_B} \quad (62)$$

In Abb. **87** ist die RNA-Titrationskurve und die PAGE-Gelelektrophorese für die PSar-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.2 zu sehen, deren Seitenketten sich laut

AAA/GPC aus $P_{Lys} = 17$ und $P_{Sar} = 96$ zusammensetzen. Für das Brechungsinkrement der reinen Bürste erhält man $dn/dc = 0,185 \text{ cm}^3/\text{g}$. In der Gelelektrophorese erkennt man, dass siRNA bis $\Psi_{RNA,B} = 0,38$ vollständig in die Bürste eingebaut wird und erst zwischen $\Psi_{RNA,B} = 0,38$ und $0,56$ freie siRNA auftritt (Sättigung der Bürste). Demzufolge können in der RNA-Titrationskurve die Punkte $\Psi_{RNA,B} = 0,19$ und $0,38$ mit Formel (59) berechnet und die folgenden gemessenen Punkte korrigiert werden. Der Komplex ist bei ca. 160% der reinen Bürstenmolmasse vollständig komplexiert und lagert keine weitere siRNA mehr ein. Legt man das theoretische Zahlenmittel der Bürstenmolmasse, welches in Kapitel 4.5.3.2 mit der Formel (48) berechnet wurde, zu Grunde, entspricht dies einer komplexierten Menge von ca. 285 RNA-Molekülen pro Bürstenpolymer. Bemerkenswert ist, dass der hydrodynamische Radius R_h bei allen Komplexierungsschritten konstant bei ca. 85 nm verbleibt (die Bürste wurde nach der Gefriertrocknung nur über 48 Stunden gelöst, was den erhöhten Radius erklärt, vergleiche Abb. 72). Es kommt also durch die Abschirmung des Polysarkosins zu keiner Aggregation der Komplexe.

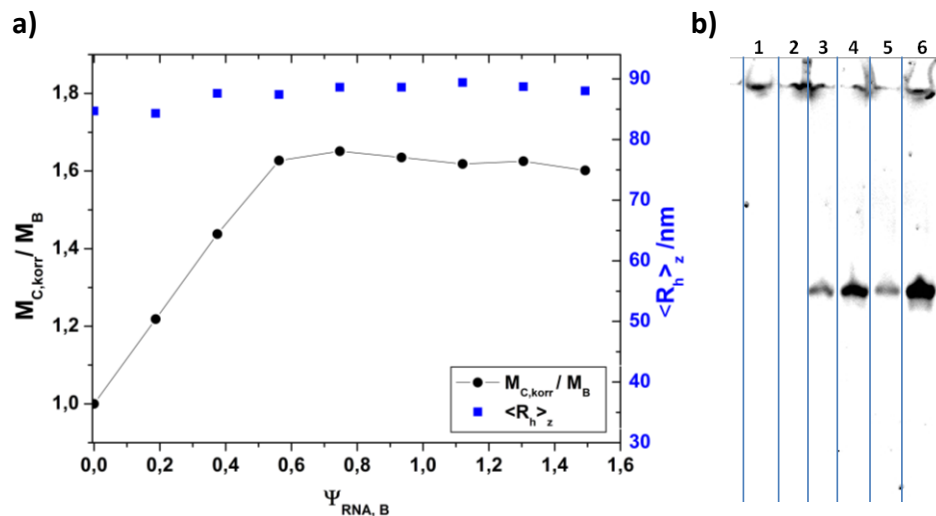


Abb. 87: Analyse der komplexierten PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste: **a)** siRNA-Titrationsdiagramm mit der Auftragung des relativen, korrigierten Molmassengewichts und des hydrodynamischen Radius der gebildeten Komplexe gegen das zugegebene siRNA-Massenverhältnis $\Psi_{RNA,B}$ **b)** PAGE-Gelelektrophorese der Komplexe mit einem siRNA-Massenverhältnis von: 1) $\Psi_{RNA,B} = 0,19$, 2) $\Psi_{RNA,B} = 0,38$, 3) $\Psi_{RNA,B} = 0,56$, 4) $\Psi_{RNA,B} = 0,75$, 5) $\Psi_{RNA,B} = 0,94$, 6) $\Psi_{RNA,B} = 1,12$. Die eingesetzte siRNA-Konzentration ist in allen Spuren gleich. Die Farben sind invertiert dargestellt

Die Komplexierungsanalyse wird mit der PSar-b-PLL^{PAHMA*}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.3, deren Seitenketten sich laut AAA/GPC aus $P_{Lys} = 31$ und $P_{Sar} = 77$ zusammensetzen,

wiederholt (Abb. 88). Dabei zeigt sie ein vollkommen anderes Verhalten: Schon bei sehr geringer RNA-Zugabe werden experimentell weitaus höhere relative Komplexmolmassen erhalten, als durch Formel (59) theoretisch erreicht werden können. Dies deutet auf eine Aggregation der Komplexe hin, wodurch die Berechnung ihre Gültigkeit verliert, da die Forderung nach Einzelbürstenkomplexen nicht mehr gegeben ist. Deutlicher wird das Aggregationsverhalten ab dem Punkt $\Psi_{\text{RNA,B}} > 0,4$, an dem nun auch der hydrodynamische Radius der Komplexe stetig anwächst. Die absolute Polysarkosinlänge und das molare Verhältnis $\Gamma_{\text{Sar,Lys}}$ der Bürste ist anscheinend zu gering, um einer Aggregation entgegenzuwirken. In der Gelelektrophorese tritt im Bereich von $\Psi_{\text{RNA,B}} = 0,22$ bis $0,40$ die erste freie siRNA auf. Unter Beachtung des fast doppelt so großen Polylysinblocks komplexiert die Bürste demnach auch weitaus weniger RNA pro positiver Ladung als die zuvor getestete PSar-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste. Dies kann wiederum mit der früh eintretenden Aggregation erklärt werden, welche durch die Zusammenlagerung der Bürsten die Komplexierung von weiterer RNA-Molekülen im Inneren verhindert.

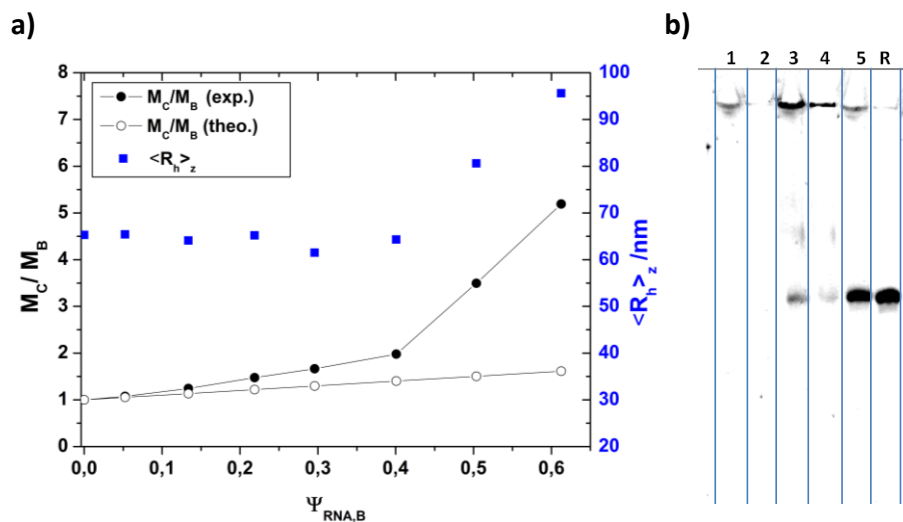


Abb. 88: Analyse der komplexierten PSar-b-PLL^{PAHMA*}-Bürste: **a)** siRNA-Titrationsdiagramm mit der Auftragung des experimentell erhaltenen sowie des theoretisch berechneten relativen Molmassengewichts (unkorrigiert) und des hydrodynamischen Radius der gebildeten Komplexe gegen das zugegebene siRNA-Massenverhältnis $\Psi_{\text{RNA,B}}$ **b)** PAGE-Gelelektrophorese der Komplexe mit einem siRNA-Massenverhältnis von: 1) $\Psi_{\text{RNA,B}} = 0,05$, 2) $\Psi_{\text{RNA,B}} = 0,22$, 3) $\Psi_{\text{RNA,B}} = 0,40$, 4) $\Psi_{\text{RNA,B}} = 0,61$, 5) $\Psi_{\text{RNA,B}} = 1,15$, R) freie siRNA. Die eingesetzte siRNA-Konzentration ist in allen Spuren gleich. Die Farben sind invertiert dargestellt

6.2.2. Gen-Knockdown

Die entschützte PSar-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste wird auf Grund ihrer guten Komplexierungseigenschaften von [REDACTED] am Institut für Translationale Immunologie der Universitätsklinik Mainz auf ihre Anwendung als Transfektionsmittel für den Gen-Knockdown untersucht. Hierfür wird zuerst die Bürste mit jeweils 25% Gewichtsprozent ($\Psi_{\text{RNA,B}} = 0,33$) einer speziellen, Cy5-markierten siRNA und einer unmarkierten „scrambled“ RNA (scRNA) beladen und in einem Agarosegel über Gelelektrophorese analysiert (Abb. 89). „Scrambled“ RNA besitzt die gleichen Basen wie die funktionsfähige siRNA, diese sind aber in einer unterschiedlichen Reihenfolge angeordnet, sodass die RNA ihre Funktion verliert und als Negativkontrolle genutzt werden kann. Vergleicht man in der Gelelektrophorese die Banden der gleichkonzentrierten, freien siRNA (4) bzw. scRNA (5) mit denen der Bürstenkomplexe (2) bzw. (3), erkennt man, dass die Bürsten die RNA vollständig aufgenommen haben.

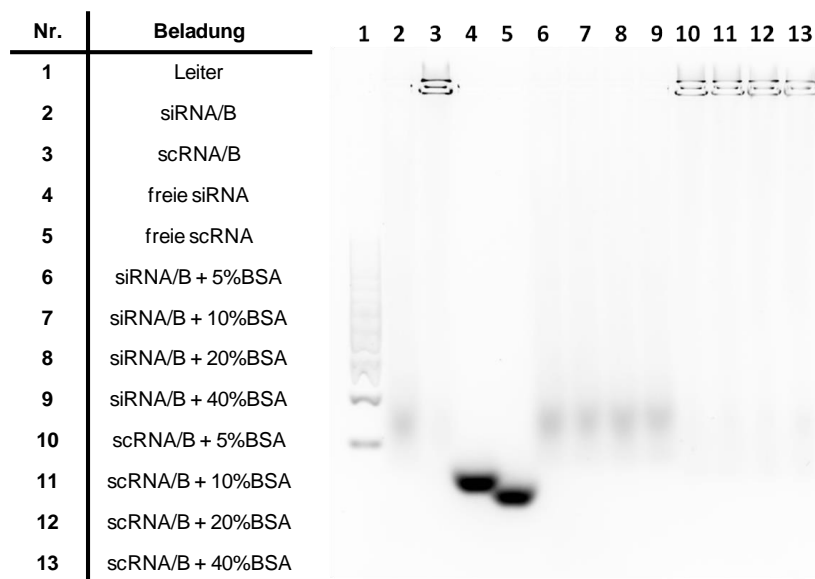


Abb. 89: Agarose-Gelelektrophorese (Agarosegel) der PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürstenkomplexe. Die beladene RNA-Menge ist in allen Spuren gleich. Die Farben sind invertiert dargestellt

Auffällig ist, dass sich zwar der scRNA-Komplex in der Tasche mit GelRed[®] anfärben lässt, der siRNA-Komplex hingegen unsichtbar bleibt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die siRNA den Farbstoff Cy5 trägt. Dessen Emissionsspektrum überlappt mit dem Absorptionsspektrum des Anfärbemittels GelRed[®], sodass es zu Quenchingeffekten der

beiden Farbstoffe kommt, die durch die hohe Beladungsdichte der Bürste zur vollständigen Auslöschung der Fluoreszenz führt. Um die Stabilität der Komplexe im Serum zu testen, werden die Komplexe mit 5-40% Albumin (BSA) versetzt (6-9 bzw. 10-13). Das in großen Mengen im Blut vorkommende Albumin kann die komplexierte RNA jedoch nicht verdrängen (keine freie RNA sichtbar), sodass ein Einsatz im Blutserum möglich ist.

Die Komplexe werden für den in-vitro-Knockdown des procol1a1-Proteins in 3T3-Fibroblasten (Bindegewebszellen) und des ApoB100-Proteins in AML-12 Hepatozyten (Leberzellen) verwendet (Abb. 90). Dabei werden sie in proteinreichem und proteinarmem Medium zu den Zellen gegeben und die nach 48 Stunden erhaltene relative Expression mit der Expression der reinen Bürste, des scRNA-Komplexes (als Negativkontrolle) sowie mit der Expression eines beladenen, hocheffizienten, aber toxischen Standardtransfektionsmittels (jetPEI) als Positivkontrolle verglichen. Die reine Bürste, der reine Puffer und der scRNA-Komplex (scRNA/B) haben erwartungsgemäß keinen Einfluss auf den Proteinmetabolismus. Die Bürstenkomplexe (siRNA/B) zeigen in den 3T3-Fibroblasten erst bei hohen Konzentrationen einen signifikanten Knockdown des Proteins procol1a1, wobei er in Serum zugegeben etwas höher ausfällt (knapp 60%). In AML-12 Hepatozyten ist der Knockdown des Proteins ApoB100 auch bei niedrigeren Konzentrationen stark ausgeprägt, sofern die Komplexe in proteinarmem Medium (PBS-Puffer) zu den Zellen gegeben werden. Werden sie hingegen in proteinreichem Medium verabreicht, vermögen sie keinen Gen-Knockdown zu induzieren. Die Ergebnisse scheinen sich für beide Zelltypen zu widersprechen. Generell hängt die Effektivität von Transfektionsagenzien aber sehr stark von der Aufnahmezeit und dem Zellaufnahmeweg ab, der für verschiedene Zellarten sehr unterschiedlich sein kann. Für die Diblockbürsten kann eine unselektive Aufnahme, z.B. durch ihre leicht positiven Kettenenden, induziert werden. Werden diese von Proteinen abgeschirmt, senkt sich auch die Aufnahmewahrscheinlichkeit. Bei anderen Zellen kann jedoch gerade diese leichte Proteinanlagerung eine Zellaufnahme durch einen Rezeptor-induzierten Eintritt ermöglichen [224]. Desweiteren wird die Effektivität auch darüber bestimmt, wie gut und schnell die RNA von den Komplexen in das Zellzytosol freigesetzt wird, bevor sie im Lysosom abgebaut wird. In Zukunft sollen anhand von Farbstoff-markierten

Diblockbürsten durch FACS- und CLSM-Messungen neue Erkenntnisse über die Zellaufnahme und den RNA-„Release“ gewonnen werden, um den induzierten Gen-Knockdown besser zu verstehen und gegebenenfalls über synthetische Modifikationen zu steuern.

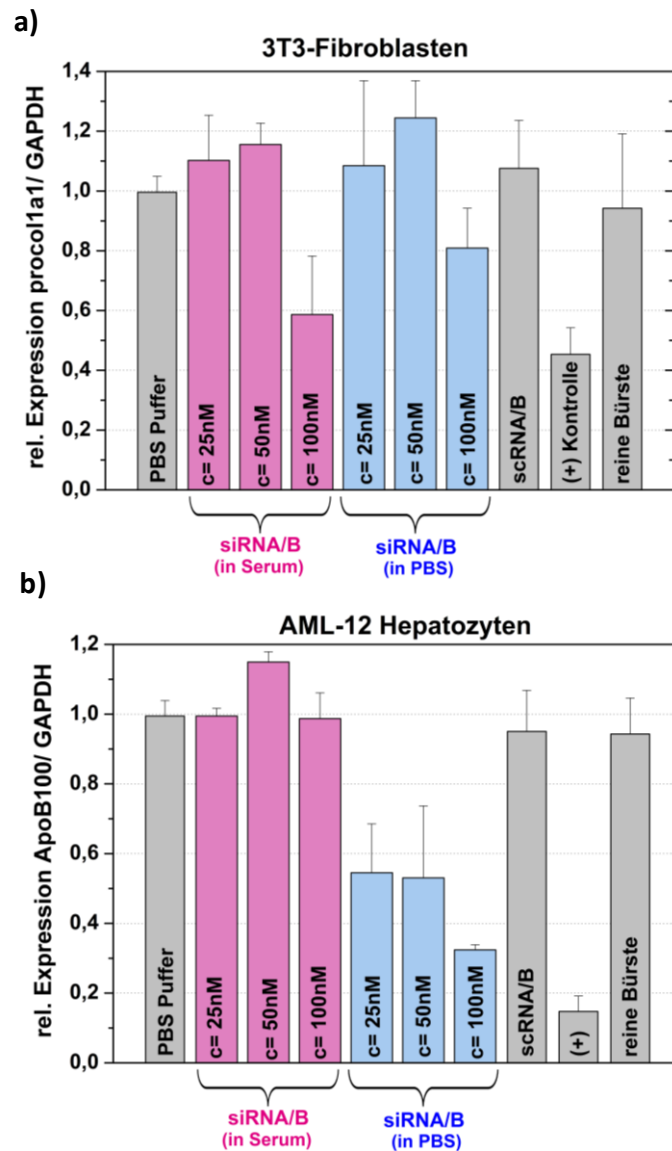


Abb. 90: In-vitro-Gen-Knockdown für **a)** das Protein procol1a1 in 3T3-Fibroblasten und **b)** das Protein ApoB100 in AML-12 Hepatozyten durch die Verwendung von PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürstenkomplexe (25% siRNA-Beladung) mit unterschiedlicher Konzentration (bezogen auf die beladene siRNA).

(+) = Positivkontrolle durch siRNA/PEI-Komplexe

6.2.3. Zusammenfassung

Die hergestellten „Drug-Delivery“-Systeme werden auf ihren Einsatz in der Krebsimmuntherapie bzw. Gentherapie überprüft. Dabei zeigen die Sarkosinbürsten nach ihrer Azidfunktionalisierung keine unspezifische Aufnahme in dendritischen Zellen, was als Grundvoraussetzung für eine effektive, antikörpervermittelte Therapie gilt.

Beide entschützte Diblockbürsten besitzen die Fähigkeit zur siRNA-Komplexierung. Jedoch ist nur die PSar-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste mit ihrem längeren Polysarkosinblock und dem wesentlich größeren molaren Verhältnis von Sarkosin zu Lysin ($\Gamma_{\text{Sar,Lys}}$) in der Lage, die siRNA ohne Aggregationsbildung aufzunehmen. Dies sollte für die Herstellung weiterer Diblocksysteme berücksichtigt werden. Es können bis zu 60% siRNA in Bezug zur eingesetzten Bürstenmolmasse im Inneren eingelagert werden, die auch durch Albumin nicht wieder verdrängt werden kann. Im Gen-Knockdown-Experiment (in vitro) an AML-12 Hepatozyten zeigt die PSar-DB_{V6}^{PAHMA} in proteinarmen Medien eine deutliche Senkung der ApoB100-Proteinexpression. Es sind aber noch weiterreichende Untersuchungen nötig, um den polymeren Träger und dessen RNA-Vermittlung besser zu verstehen und gegebenenfalls weiter zu optimieren.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zylindrische Bürstenpolymere mit reinen Polysarkosin- bzw. Diblock-Seitenketten aus Polysarkosin und Polylysin über den „grafting from“-Ansatz mit Hilfe der ringöffnenden NCA-Polymerisation hergestellt werden können. Als Makroinitiatoren wurden synthetisiertes, hochmolekulares Poly[N-(6-aminohexyl)methacrylamid] (PAHMA) und ein kommerziell erworbenes, hochmolekulares Polylysin verwendet. Alle Bürstensysteme und die zugehörigen Makroinitiatoren wurden mittels AFM, dynamischer und statischer Lichtstreuung, CD-Spektroskopie sowie GPC charakterisiert. Zudem wurden die Biokompatibilität und das Aggregationsverhalten in humanem Blutserum untersucht und die Bürsten auf ihre Eignung als polymere Wirkstoff-Trägersysteme überprüft. Die erhaltenen Ergebnisse zu den einzelnen Bürstensystemen werden noch einmal zusammenfassend dargestellt:

7.1. Zylindrische PSar-Bürsten

Ausgehend von dem PAHMA- bzw. bioabbaubaren PLL-Makroinitiator konnten erfolgreich zylindrische Polysarkosin-Bürsten mit guter Kontrolle über den Polymerisationsgrad hergestellt werden. Die theoretisch berechnete Molmasse stimmte bei beiden Bürsten gut mit dem experimentell ermittelten Wert aus der statischen Lichtstreuung überein. Die Seitenkettenenden konnten über eine anschließende Umsetzung mit Azidoessigsäure und CDI mit Azidgruppen funktionalisiert werden, welche eine effiziente Biokonjugation von z.B. Antikörpern oder Farbstoffen mittels kupferfreier Klickchemie ermöglichen. Die Kopplung der hydrophoben Azidgruppen führte hierbei nur zu einem geringen, reversiblen Aggregationsverhalten der Sarkosinbürsten. Am Beispiel von PSar^{PAHMA} wurde die Biokompatibilität der Polysarkosinbürsten überprüft. Dabei wiesen sie bei der Messung im Blutserum auf Grund des ausgeprägten „Stealth“-Effekts von Polysarkosin keine Aggregation mit Serumproteinen auf und wirkten auch in höheren Konzentrationen nicht zelltoxisch. Des Weiteren wurden azidfunktionalisierte Sarkosinbürsten nicht unspezifisch in

dendritische Zellen aufgenommen und können daher als Ausgangsmaterialien für die Synthese polymerer Antikörper-Antigen-Konjugate in der Krebsimmuntherapie dienen.

7.2. Zylindrische PSar-b-PLL-Bürsten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von zylindrischen Bürsten mit einem inneren, positiv geladenen Polylysinkern und einer äußeren Sarkosinschale. Die Synthese über isolierte PLL-Bürsten oder Cobürsten aus Sarkosin und Lysin als Precursor scheiterten auf Grund der Bildung von unlöslichen Aggregaten bzw. der Fragmentierung der Seitenketten bei der Entschützung der Z-Schutzgruppen. Dagegen konnten über eine in-situ-Polymerisation unter Verwendung von Lys(TFA)-NCA und einer großen Menge an Sarkosin-NCA zwei zylindrische Diblockbürsten mit unterschiedlicher Zusammensetzung hergestellt und erfolgreich mit Hydrazin entschützt werden. Bei der Bürstensynthese bewirkte eine Deprotonierung des eingesetzten PAHMA-Makroinitiators eine Verminderung der während der Polymerisation entstehenden, linearen Polymerfraktion. Der Gehalt an Sarkosin bzw. Lysin konnte mittels dreier verschiedener Analysemethoden (GPC, CD-Spektroskopie, AAA) bestimmt werden. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Durch Kombination von AAA und GPC konnten auch die mittleren Polymerisationsgrade der in die Seitenkette eingebauten Aminosäuren berechnet werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für den inneren PLL-Block trotz angebundenem Sarkosinblock durch Zugabe von Natriumperchlorat eine Helix-Konformation induziert werden kann. Am Beispiel der PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Diblockbürste wurde die Biokompatibilität der Systeme überprüft. Entgegen ihrer hohen, positiven Ladungsdichte im Inneren zeigten die Bürsten wegen des „Stealth“-Effekts der Polysarkosinschale auch bei längeren Behandlungszeiten kaum eine zelltoxische Wirkung und besaßen nur eine geringe Tendenz zur Aggregation im Blutserum. Die Bürsten konnten bis zu 60% ihrer eigenen Molmasse mit siRNA beladen werden, ohne dabei zu aggregieren und eignen sich daher als Transfektionsmittel in der Gentherapie. Erste Gen-Knockdown-Versuche bestätigen diese Annahme: Werden die Bürstenkomplexe in proteinarmem Medium zu AML-12 Hepatozyten gegeben, lässt sich auch bei kleineren Konzentrationen eine starke Reduktion der ApoB100-Proteinexpression nachweisen.

7.3. Ausblick

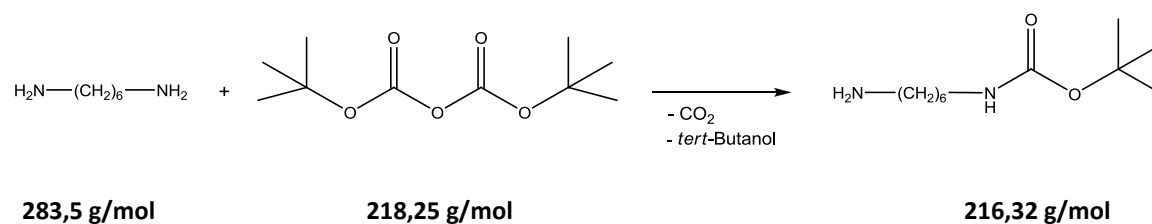
Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zylindrische Bürsten auf Basis von Polysarkosin wegen ihrer hohen funktionellen Dichte und guten Bioverträglichkeit als „Drug Delivery“-Systeme in der Nanomedizin eingesetzt werden können. Allerdings bleiben im Bereich der Synthese und Anwendung noch einige Fragestellungen offen und manche Herausforderungen zu bewältigen:

- 1) Die Bürstensynthese über die „grafting from“-Methode bedarf einer Optimierung. Zum einen muss die Entstehung von linearen Polypeptiden auf Grund von initiierenden Verunreinigungen im NCA während der Herstellung von PLL-haltigen Bürsten weiter unterdrückt werden, um eine gute Kontrolle der Polymerisation zu gewährleisten. Zum anderen sollte die Polydispersität der Bürsten für die biomedizinische Anwendung deutlich verringert werden [7], indem monodisperse Makroinitiatoren verwendet werden oder deren Verteilungsgrad vor ihrer Verwendung im geschützten Zustand, z.B. durch präparative GPC, reduziert wird.
- 2) Die Frage, inwieweit die PSar- bzw. PLL-Blocklänge die Effizienz der Transfektion beeinflusst, muss geklärt werden, um gegebenenfalls die Blocklängen in der Synthese anpassen zu können.
- 3) Die Azidfunktionalisierung der Diblockbürsten würde eine gute Biokonjugation mit z.B. Antikörper oder Farbstoffen ermöglichen. Jedoch sollte auf eine Aggregationsbildung durch die hydrophoben Azidgruppen geachtet werden. Farbstoff-markierte Bürsten können dazu genutzt werden ihre Zellaufnahme und RNA-Transfektion in die Zelle besser zu untersuchen und zu verstehen.
- 4) Die Durchführung von Stabilitätstests an der eingekapselten RNA kann die Schutzwirkung der Polysarkosin-Schale vor enzymatischem Abbau im Körper verifizieren.

8. Experimenteller Teil

8.1. Mono-N-Boc-1,6-diaminohexan

8.1.1. Reaktionsgleichung



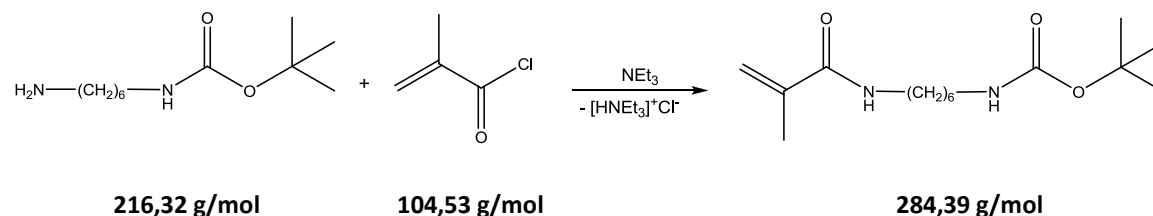
8.1.2. Allgemeine Vorschrift [198]

In einem 5L-Dreihalsrundkolben wird ein Überschuss von 283,5 g (2,44 mol; 7,5 Äq.) 1,6-Diaminohexan mit einem KPG-Rührer in 2,5 L Dioxan gelöst. Unter Luftfeuchtigkeitsausschluss tropft man langsam 71 g (0,33 mol; 1 Äq.) Di-*tert*-butyl dicarbonat in 800mL Dioxan mit Hilfe eines Tropftrichters über zwei Tage zur Lösung zu. Nach Ablauf der Zeit wird der entstandene, farblose Niederschlag mit einer Absaugfritte abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wird in 1,5 L Wasser gelöst und die unlöslichen Bestandteile (doppelt geschütztes Derivat) erneut abgetrennt. Danach wird das Produkt aus dem wässrigen Filtrat 6x mit 50 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinte organische Phase nochmals 3x mit 1 L Wasser gewaschen. Nach Trocknung über NaSO₄ und Filtration wird das Dichlormethan im Vakuum entfernt und man erhält 27,5 g eines leicht gelblichen, trüben Öls. Das Öl wird mit einer Destillation weiter aufgereinigt (Siedepunkt: 116°C bei 6,3·10⁻² mbar). Dabei entsteht ein farbloser Feststoff am Kühlfinger der Criegee-Apparatur, der zwischenzeitlich immer wieder entfernt werden sollte. Am Ende erhält man 24 g (0,11 mol; 34% der Theorie) einer farblosen, hochviskosen Flüssigkeit.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 1.28 (m, 8H); 1.39 (s, 9H); 1.70 (s, 2H); 2.63 (t, 2H); 3.06 (q, 2H); 4.56 (s, 1H)

8.2. N-Boc-N'-methacrylamid-1,6-diaminohexan

8.2.1. Reaktionsgleichung



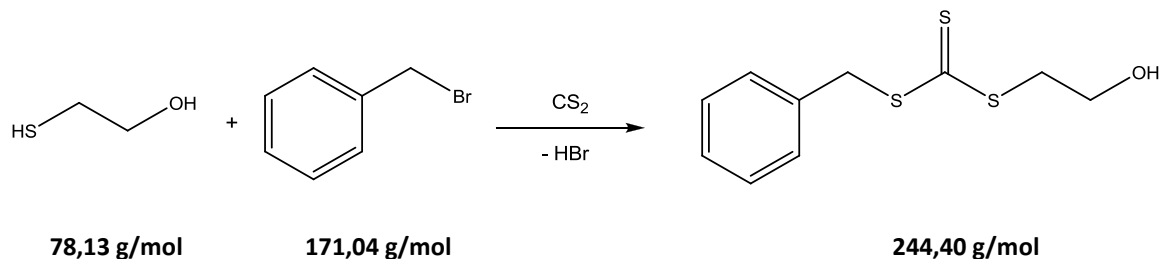
8.2.2. Allgemeine Vorschrift [198]

In einem ausgeheizten Schlenkcolben werden unter Argon-Gegenstrom 5 g (23,1 mmol; 1,0 Äq.) Mono-N-Boc-1,6-diaminohexan und 3,8 mL (27,8 mmol; 1,2 Äq.) Triethylamin in 40 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Bevor man 2,5 mL (25,8 mmol; 1,1 Äq.) Methacryloylchlorid in 17 mL Dichlormethan mit Hilfe eines Tropftrichters langsam dazu tropft, wird die Lösung mit einem Eis-Kochsalzbad auf -5°C gekühlt. Die Reaktion wird unter Argon-Atmosphäre weitere zwei Stunden bei -5°C gerührt sowie noch einmal eine ganze Nacht bei Raumtemperatur. Zwecks Aufreinigung wird die Reaktionslösung 3x mit 40 mL Wasser in einem Scheidetrichter gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und danach filtriert. Nachdem das Dichlormethan im Vakuum entfernt wurde, können 6,5 g eines leicht rötlichen Feststoffs isoliert werden. Dieser wird durch zweimalige Flashchromatographie in Ethylacetat/Toluol (1:1) weiter aufgereinigt (Säulendurchmesser: 5,5 cm, Kieselgelhöhe 25 cm + 5 cm basisches Al_2O_3 ; $R_f = 0,34$), sodass am Ende 4,7 g (16,53 mmol; 72% der Theorie) eines farblosen Feststoffs isoliert werden können.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ in ppm= 1.30-1,50 (m, 8H); 1.40 (s, 9H); 1.93 (m, 3H); 3.06 (q, 2H); 3.26 (q, 2H); 4.54 (s, 1H); 5.28 (s, 1H); 5.65 (s, 1H); 5.93 (s, 1H)

8.3. Benzyl-2-hydroxyethyl-trithiocarbonat

8.3.1. Reaktionsgleichung



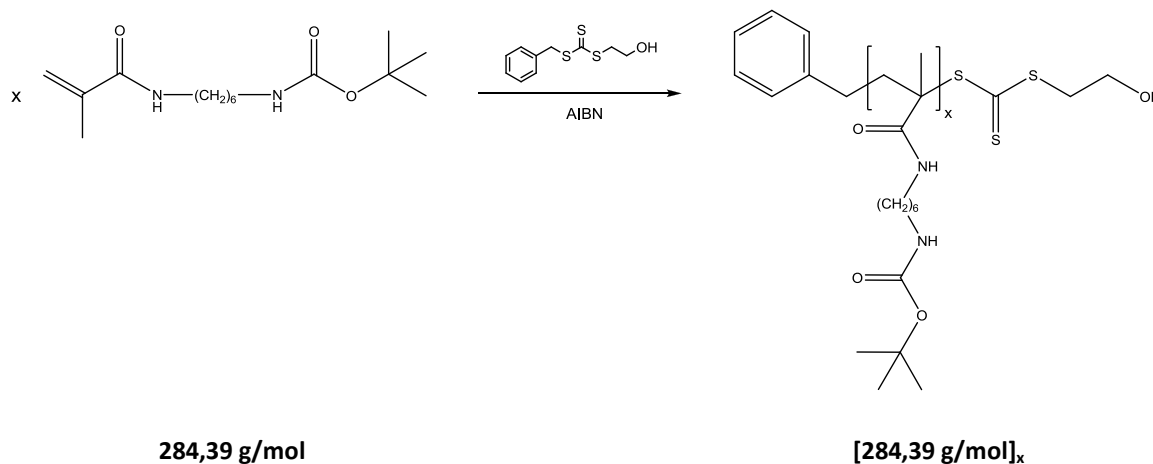
8.3.2. Allgemeine Vorschrift [201]

5,46 g (25,7 mmol; 1,0 Äq.) gemörsertes Kaliumphosphat werden unter Argon-Atmosphäre in 60 mL Aceton unter starkem Rühren dispergiert und 1,8 mL (25,6 mmol; 1,0 Äq.) 2-Mercaptoethanol mit einer Spritze durch ein Septum dazugegeben. Dann werden nacheinander jeweils mit einer 15-minütigen Unterbrechung 4,6 mL (76,1 mmol; 3,0 Äq.) Schwefelkohlenstoff und 3,0 mL (25,3 mmol; 1,0 Äq.) Benzylbromid zugegeben und man lässt die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Am nächsten Tag wird der gebildete Niederschlag durch Filtration entfernt und die zurückbleibende, gelbe Lösung vollständig evaporiert. Der Rückstand wird in 100 mL Chloroform gelöst und 3x mit jeweils 50 mL Wasser im Scheidetrichter gewaschen. Die organische Phase wird mit NaHSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zurück bleibt ein gelbes Öl, das nochmal durch eine Flashchromatographie in Hexan/ Ethylacetat (4:1) weiter aufgereinigt wird (5,38 g Probe auf 300 g Kieselgel). Durch Einengen der Produktfraktion können schlussendlich 3,9 g (16 mmol, 64% der Theorie) eines gelben Öls erhalten werden. Das CTA wurde zusammen mit XXXXXXXXXX hergestellt.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 1,76 (s, 1H); 3,60 (t, 2H); 3,88 (t, 2H); 4,6 (s, 2H); 7,29 (m, 5H)

8.4. PAHMA-Makroinitiator (geschützt)

8.4.1. Reaktionsgleichung



8.4.2. Allgemeine Vorschrift

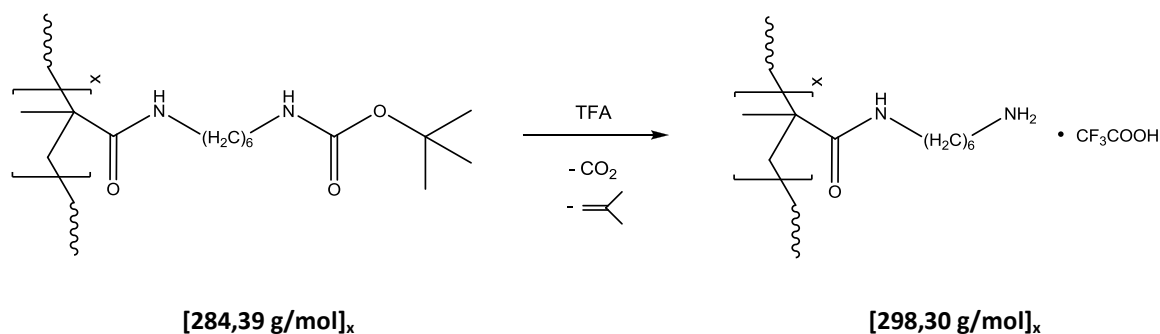
Zur Vorbereitung wird Azodiisobutyronitril (AIBN) frisch umkristallisiert. Dazu wird das AIBN in 20 mL Methanol bis zur Sättigungsgrenze gelöst, der ungelöste Überschuss abfiltriert und die Lösung bei -20°C über Nacht gelagert. Die ausgefallenen Nadeln werden über einen Büchnertrichter abgenutscht und im Vakuum getrocknet. Für die Polymerisation löst man dann 2,5 g (8,79 mmol; 700 Äq.) N-Boc-N'-methacrylamid-1,6-diaminohexan in 6,5 mL frisch destilliertem Anisol in einem ausgeheizten Schlenkrohr. Der Lösungsvorgang kann durch leichtes Erwärmen beschleunigt werden. Dann gibt man von einer zuvor hergestellten AIBN- und CTA-Stammlösung die entsprechenden Volumina für 3,06 mg ($1,25 \cdot 10^{-2}$ mmol; 1 Äq.) Benzyl-2-hydroxyethyl-trithiocarbonat und 0,3 mg ($1,85 \cdot 10^{-3}$ mmol; 0,15 Äq.) AIBN mittels einer Eppendorfpipette zu, sodass das Schlenkrohr am Ende ein Gesamtvolumen von ca. 7,5 mL Anisol enthält. Danach wird die Lösung durch vier „Freeze-pump“-Zyklen von Sauerstoff befreit, das Schlenkrohr mit Argon geflutet und die Polymerisation in einem 90°C heißen Ölbad initiiert. Nach drei Tagen wird die Reaktion in flüssigem Stickstoff inhibiert und das Polymer durch Fällung in Diethylether von nicht umgesetztem Monomer abgetrennt. Für eine vollständige Aufreinigung wird das Polymer noch zweimal in etwas THF gelöst und wieder ausgefällt.

Nach Zentrifugation und Trocknung erhält man 1,1 g (44% der Theorie) eines leicht gelblichen, amorphen Polymers. Die abgetrennte Fällungslösung sollte nicht verworfen werden. Durch Verdampfen des Diethylethers und anschließender Flashchromatographie des Rückstandes (siehe 8.2.2) kann der größte Teil an unverbrauchtem Monomer zurückgewonnen werden.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 1,4 (s, 9H)

8.5. PAHMA·TFA-Makroinitiator (entschützt)

8.5.1. Reaktionsgleichung



8.5.2. Allgemeine Vorschrift

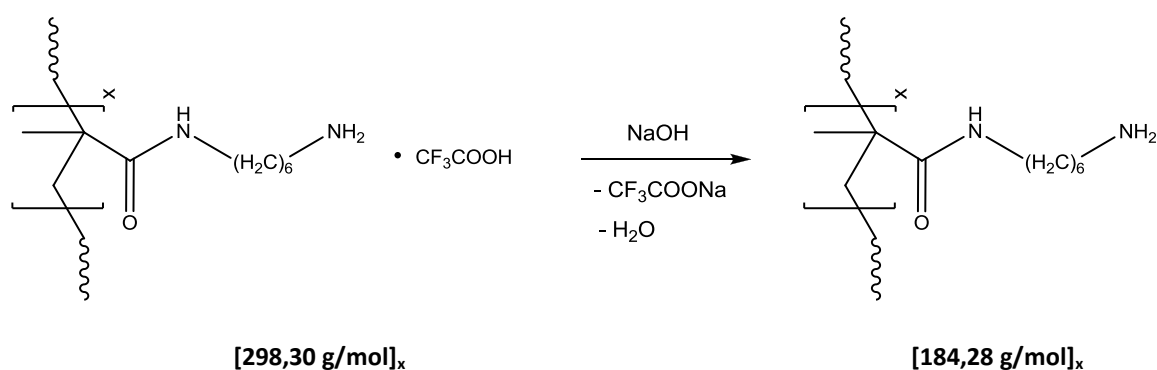
In einem 10 mL-Rundkolben werden 409 mg (1,44 mmol bezogen auf die Wiederholungseinheit; 1 Äq.) des geschützten Makroinitiators in 2 mL Dichlormethan gelöst und dann mit 2 mL (26 mmol; 18 Äq.) Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wird mit einem Glasstopfen verschlossen und über Nacht gerührt. Am nächsten Tag ist ein aufgequollenes Gel entstanden, das erst 3x mit Benzol und anschließend nochmals 3x mit Dichlormethan gewaschen wird. Der entschützte Makroinitiator wird nun in Wasser gelöst, durch einen Spritzenfilter (GHP 450 nm) filtriert und gefriergetrocknet. So können am Ende 409 mg (1,37 mmol bezogen auf die Wiederholungseinheit; 93% der Theorie) eines flockigen, farblosen Feststoffes gewonnen werden, der bei -20°C gelagert wird. Für eine noch bessere Aufreinigung kann auch ein Amicon-Zentrifugenfilter

(Ausschlussgrenze $M = 30$ kDa) benutzt werden. Jedoch verringert sich auf Grund der Adsorption des geladenen Polymers an die Membran die Ausbeute um ca. 50%.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1673 (s, C=O v. TFA), 1623 (s, C=O Amid-I-Bande), 1529 (m, Amid-II-Bande), 1174 + 1129 (s, C-F)

8.6. PAHMA-Makroinitiator (deprotoniert)

8.6.1. Reaktionsgleichung



8.6.2. Allgemeine Vorschrift

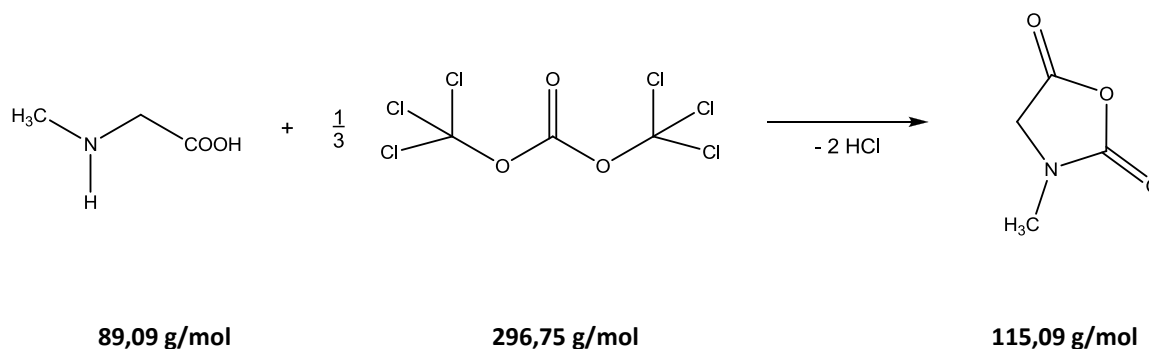
63 mg (0,21 mmol bezogen auf die Wiederholungseinheit) des entschützten Makroinitiators werden in Wasser gelöst und 3x in einem Amicon Zentrifugenfilter (Ausschlussgrenze $M = 30$ kDa) mit einer wässrigen NaOH-Lösung ($\text{pH} = 12,1$) versetzt, um die als Salz gebundene Trifluoressigsäure zu entfernen. Danach wird so lange MilliQ-Wasser dazugegeben, bis der pH-Wert des abzentrifugierten Filtrats neutral ist. Der pH-Wert des Rückstandes bleibt hingegen bei ungefähr $\text{pH} = 9,5$, was auf eine erfolgreiche Deprotonierung des Amins schließen lässt. Nachdem man mit einem Spritzenfilter (GHP 450 nm) kleine Membranfasern entfernt und die gesamte Lösung gefriergetrocknet hat, erhält man 18 mg (0,1 mmol bezogen auf die Wiederholungseinheit; 48% der Theorie) eines farblosen, flockigen Polymers. Der größte Teil des Ausbeuteverlustes geht auf die Adsorption des geladenen Makroinitiators an die Amicon-Membran zurück. Zwar ist der deprotonierte Makroinitiator in Wasser, jedoch nicht in aprotischen Lösungsmitteln wie

DMF, DMSO, Acetonitril oder THF löslich und somit nicht für eine weitere NCA-Polymerisation geeignet. Gibt man zu einer Suspension des deprotonierten Makroinitiators in DMF ein paar Tropfen Trifluoressigsäure hinzu, wandelt sich das Polymer in seine salzanaloge Form zurück und die Suspension löst sich vollständig auf.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1630 (s, C=O Amid-I-Bande), 1526 (m, Amid-II-Bande)

8.7. Sarkosin-NCA

8.7.1. Reaktionsgleichung



8.7.2. Allgemeine Vorschrift

9,0 g (101 mmol; 1 Äq.) Sarkosin werden in einem 250 mL-Dreihalsrundkolben, der mit einer Rührhantel, einem Hahn mit Olive und einem Rückflusskühler ausgestattet ist, für zwei Stunden im Vakuum getrocknet. Anschließend suspendiert man die Aminosäure in 100 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF) und erhöht die Temperatur auf 60°C. Unter kräftigem Rühren und Argon-Gegenstrom werden schnell 6,8 g (22,9 mmol; 0,35 Äq.) frisch aus Hexan umkristallisiertes Triphosgen mit einem Papiertrichter zugegeben und die Reaktion zwei Stunden gerührt. Dabei wird ein leichter Argon-Überdruck angelegt, um die aus der Reaktion entweichenden Phosgen- und HCl-Gase mit einem am Rückflusskühler angebrachten Schlauch in wässrige NaOH-Lösung zu leiten. Die Suspension löst sich mit der Zeit weitestgehend auf, bis nur noch eine leichte Trübung erhalten bleibt. Diese wird nach dem Erkalten der Reaktionslösung schnell in verschließbaren Zentrifugationsgefäßen mittels Zentrifugation bei 4000 U abgetrennt und die gelbliche

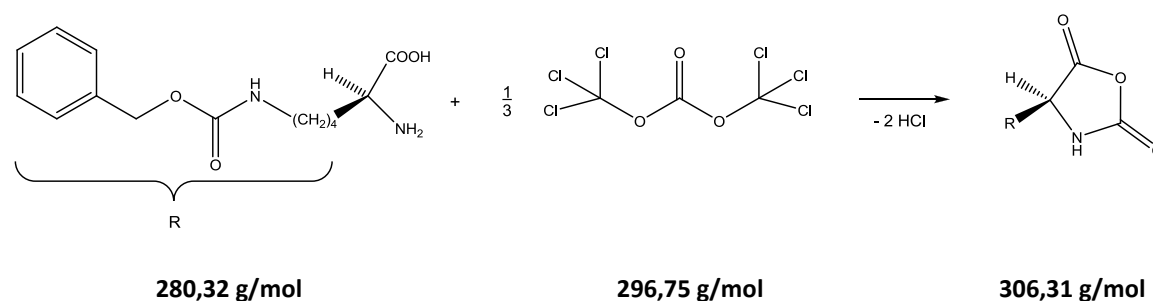
Reaktionslösung mittels Kälte­destillation eingengt. Das nun erhaltene, gelbe Öl wird ungefähr 15 min im Hochvakuum auf 70°C erhitzt, um die letzten Reste des Lösungsmittels vollständig zu entfernen. Durch leichtes Ankratzen des erkalteten Öls kristallisiert das Rohprodukt aus. Der grobe Feststoff wird in trockenem THF gelöst, filtriert und in trockenem Hexan gefällt. Nach dem Trocknen wird das Produkt mittels Sublimation bei 90°C über Nacht aufgereinigt. Es können 7,5 g (65,2 mmol, 64% der Theorie) eines farblosen, kristallinen Feststoffs erhalten werden, der bei -20°C gelagert wird. Die erfolgreiche Entfernung aller Chloridionen wird über einen negativen AgNO₃-Test der Substanz in THF bewiesen.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm)= 2,85 (s, 3H); 4,20 (s, 2H)

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹)= 1847 + 1757 (s, Anhydrid Banden)

8.8. L-Lysin(Z)-NCA

8.8.1. Reaktionsgleichung



8.8.2. Allgemeine Vorschrift

In einem 500 mL-Dreihalsrundkolben mit Rührhantel, Rückflusskühler und Hahn mit Olive werden 15,0 g (53,5 mmol; 1 Äq.) L-Lysin(Z) in 170 mL trockenem THF suspendiert und auf 60°C erhitzt. Unter kräftigem Rühren und Argon-Gegenstrom gibt man schnell 5,6 g (18,7 mmol; 0,35 Äq.) aus Hexan umkristallisiertes Triphosgen mit einem Papiertrichter zu. Dabei kommt es für kurze Zeit zu einer Stockung der Suspension, diese löst sich dann aber in den nächsten drei Stunden wieder weitestgehend auf. Während

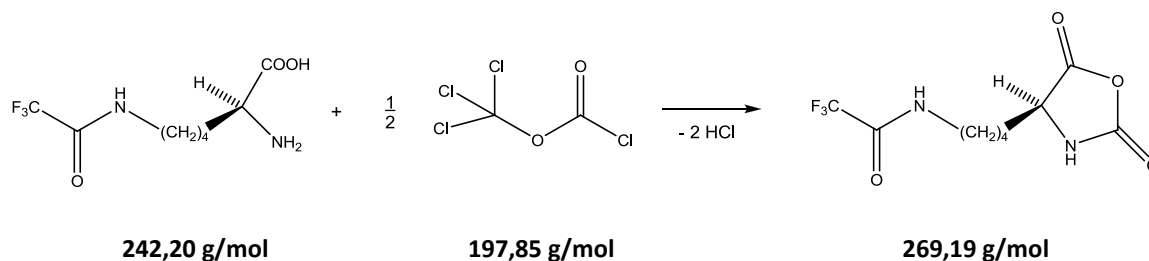
der Reaktion wird ein leichter Argon-Überdruck angelegt, um entstehende Phosgen- und HCl-Gase über einen am Rückflusskühler angebrachten Schlauch in einer wässrigen NaOH-Lösung abzufangen. Unlösliche Bestandteile werden nach Abkühlung der Reaktion schnell mit Hilfe der Zentrifuge bei 4000 U in verschließbaren Zentrifugationsgefäßen abgetrennt und die gelbliche Reaktionslösung in trockenem Hexan unter Rühren gefällt. Für Lys(Z)-NCA existieren nun zwei verschiedene Wege der Aufreinigung, die auch kombiniert werden können. In der klassischen Variante löst man das Rohprodukt in trockenem THF und kristallisiert es durch langsame Zugabe von trockenem Hexan in Kälte wieder aus (dies sollte mindestens 3x wiederholt werden). Jedoch ist Lys(Z)-NCA eines der wenigen N-Carboxy-Anhydride, die kurze Zeit in kaltem Wasser stabil bleiben [225], sodass es gelöst in EtOAc mehrmals mit eiskaltem Wasser im Scheidetrichter gewaschen werden kann, um HCl und Aminosäuresalze vollständig zu entfernen. Die durchschnittliche Ausbeute des farblosen, flockigen Pulvers beträgt ca. 5,0 g (16,3 mmol, 31% der Theorie). Das NCA erzeugt in THF nach Zugabe von AgNO_3 keinen Niederschlag und wird bei -20°C aufbewahrt.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 1,26-1,50 (m, 4H); 1,78-1,93 (m, 2H); 3,16 (m, 2H); 4,23 (t, 1H); 4,97 (s, 1H); 5,07 (s, 2H); 7,13 (s, 1H); 7,32 (m, 5H)

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1})= 1856 + 1737 (s, Anhydrid Bande), 1686 (s, C=O v. Z-Schutzgruppe)

8.9. L-Lysin(TFA)-NCA

8.9.1. Reaktionsgleichung



8.9.2. Allgemeine Vorschrift

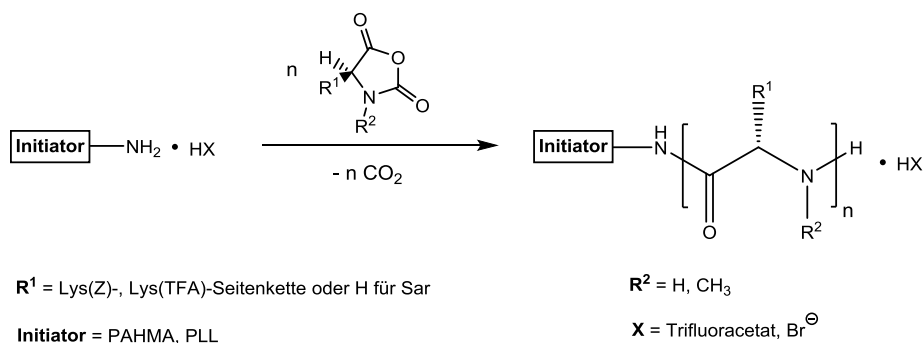
In einem 500 mL-Dreihalsrundkolben mit Rührhantel, Rückflusskühler und Hahn mit Olive suspendiert man 13,0 g (53,7 mmol; 1 Äq.) L-Lysin(TFA) in 150 mL trockenem EtOAc und erwärmt das Gemisch auf 75°C. Mit einer Spritze werden langsam 7 mL (58,5 mmol; 1,1 Äq.) Diphosgen durch ein Septum zugegeben. Dabei legt man einen leichten Argon-Überdruck an, um mit einem Schlauch am Rückflusskühler entweichende Phosgen- und HCl-Gase aus der Reaktion in eine wässrige NaOH-Lösung zu leiten. Nach vier Stunden hat sich der größte Teil der Suspension aufgelöst und die Reaktionslösung ist schwach gelblich gefärbt. Unlösliche Bestandteile werden nach dem Abkühlen der Reaktion schnell durch Zentrifugation bei 4000 U in verschließbaren Zentrifugationsgefäßen abgetrennt und die isolierte, klare Lösung in einer Kälte-destillation vollständig eingeeengt. Der entstandene Feststoff wird wieder in 40 mL trockenem EtOAc gelöst, unlösliche Bestandteile mit einem Spritzenfilter (LCR 450nm) abfiltriert und das Rohprodukt dann umkristallisiert. Dafür werden bei Raumtemperatur 80 mL trockenes Hexan mittels Tropftrichter sehr langsam (ca. 1 Tropfen alle 5 Sekunden) in die gerührte EtOAc-Lösung gegeben, bis das NCA langsam als farbloser Feststoff aus der Lösung auskristallisiert. Die Substanz wird mit Hilfe der Zentrifuge (4000 U) isoliert, mit Hexan gewaschen und anschließend weitere zwei Male mit derselben Methode umkristallisiert. Nach Trocknung im Hochvakuum erhält man 8,0 g (30 mmol, 56% der Theorie) einer farblosen, kristallinen Substanz, die bei -20°C gelagert wird.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃CN): δ (ppm)= 1,52-1,32 (m, 2H); 1,64-1,52 (m, 2H); 1,72-1,90 (m, 2H); 3,30 (m, 2H); 4,36 (t, 1H); 6,87 (s, 1H); 7,59 (s, 1H)

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹)= 1857 + 1737 (s, Anhydrid Bande), 1703 (s, C=O v. TFA-Schutzgruppe), 1194 + 1147 (s, C-F)

8.10. Polypept(o)idbürsten

8.10.1. Reaktionsgleichung



8.10.2. Allgemeine Vorschrift

Vorbereitung

Als Vorbereitung wird kommerziell erhaltenes, trockenes DMF zwei Tage über Bariumoxid getrocknet, um alle Spuren von Wasser vollständig zu beseitigen. Die anschließende Destillation wird bei Raumtemperatur im Vakuum durchgeführt, um jeglichen Zerfall des Dimethylformamids zu Dimethylamin zu vermeiden. Dafür wird der Vorlagekolben in einem Aceton/Trockeneis-Gemisch auf -40°C gekühlt, sodass das DMF langsam in den Kolben überkondensieren kann. Zum Schluss hängt man das destillierte DMF nochmals 30 min ans Hochvakuum und bewahrt es abgedunkelt im Gefrierschrank unter Schutzgas auf. Es sollte so schnell wie möglich aufgebraucht werden.

Polymerisation

In einer typischen Polymerisation wird die entsprechende Menge des Makroinitiators (bzw. des Bürstenprecursors) in ein 10 mL-Rollrandglas mit Rührfisch gegeben und dieses stehend in einen Schlenk Kolben platziert. In diesem wird die Substanz zwei Stunden im Vakuum getrocknet, bevor über ein Septum unter Argon frisch destilliertes DMF eingespritzt wird. Im Falle des PLL-Makroinitiators wird dieser zuerst in trockenem DMSO gelöst und erst dann sehr langsam DMF dazugetropft, bis ein Volumenverhältnis (DMSO zu DMF) von 1:3 erreicht wird. Der Initiator ist unter Rühren meist nach einer

Stunde vollständig gelöst. Nachdem das im Gefrierschrank aufbewahrte NCA auf Raumtemperatur gebracht wurde, wird die gewünschte Menge des NCA-Monomers in einem „Glove-bag“ (Atmosbag) in ein zuvor ausgeheiztes Schlenkrohr mit sauberem Rührfisch gegeben. Bevor die Initiatorlösung durch das Septum eingespritzt wird, wird das NCA noch einmal kurz an die Vakuumlinie gehängt. Anschließend wird das Schlenkrohr mit Alufolie abgedunkelt, mit einem Argon-Ballon bestückt und bei Verwendung des protonierten Makroinitiators für drei Tage bei 45°C polymerisiert. Soll ein deprotonierter Makroinitiator verwendet werden, wird nach dem Lösen des Initiators noch zusätzlich 1 Äq. (bezogen auf die Wiederholungseinheit) Diisopropylethylamin dazugegeben. Die Polymerisation kann dann bei Raumtemperatur durchgeführt werden und benötigt nur 24 Stunden. Im Falle der in-situ-Polymerisation der Diblockbürsten wird der erste Lysinblock wie oben beschrieben polymerisiert. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionslösung vorsichtig an die Vakuumlinie gehängt, um CO₂ und eventuell während der Reaktion entstandenes Dimethylamin zu entfernen. Das Sarkosin-NCA für den zweiten Block wird in einem Schlenkkolben unter Argon aufbewahrt und mit der Reaktionslösung gelöst. So bleibt das Reaktionsvolumen weitestgehend konstant, was für die Analyse über konzentrationsäquivalente GPC eine Voraussetzung ist.

Aufreinigung

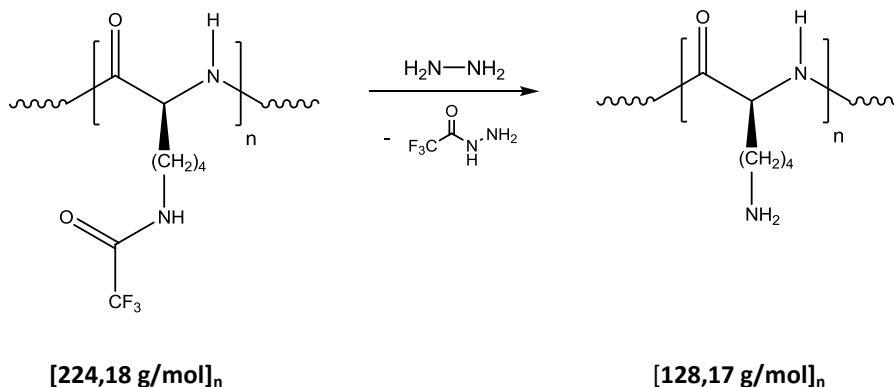
Die fertige Reaktionslösung wird mit etwas DMF verdünnt und langsam in Diethylether gefällt. Das Polymer wird durch Zentrifugation abgetrennt und im Vakuum getrocknet. Reine Lys(Z)- oder Lys(TFA)-Bürsten, [Sar-co-Lys(TFA)]-Bürsten oder manche Sar-b-Lys(TFA)-Bürsten sind im angetrockneten Zustand nicht mehr löslich und können nicht weiter verarbeitet werden. Reine PSar-Bürsten werden mit Amicon-Zentrifugation (Ausschlussgrenze $M = 50$ kDa) in Wasser aufgereinigt und gefriergetrocknet. [Sar-co-Lys(Z)]-Bürsten und manche Sar-b-Lys(TFA)-Bürsten können in Methanol mittels Amicon-Zentrifugation (Ausschlussgrenze $M = 50$ kDa) aufgereinigt und in einem HFIP/Wasser-Gemisch gefriergetrocknet werden.

Tabelle 17: Übersicht der hergestellten, geschützten Polypept(o)idbürsten mit Einwaagen, theoretisch eingestellten Polymerisationsgraden P_n und dem Reaktionsvolumen V . Unterstrichene Bürsten sind auch nach ihrer Isolierung wieder löslich

Bürste	Initiator	m_{Ini} / mg	m_{Lys} / mg	m_{Sar} / mg	P_{Lys} (theo.)	P_{Sar} (theo.)	V_{LM} /mL
<u>PSar</u>	PAHMA	51	-	1048	-	53	5
<u>PSar</u>	PLL	18,9	-	542	-	52	4
PLL(Z)	PAHMA	11,7	650	-	54	-	2,2
PLL(Z)	PAHMA	12,4	331	-	26	-	1,1
PLL(Z)	PAHMA	7,5	410	-	53	-	2,4
PLL(Z)	PAHMA	10,5	604	-	56	-	9
PLL(TFA)	PAHMA	7,0	193	-	31	-	0,8
PLL(TFA)	PAHMA	3,6	93	-	28	-	1,5
PLL(TFA)	PLL	3,0	100	-	26	-	1,0
PSar-co-PLL(Z)	PAHMA	10,0	190	78	19	20	2,8
PSar-co-PLL(TFA)	PAHMA	4,9	96	43	22	22	1,5
PSar-b-PLL(TFA) _{V1}	PAHMA	5,0	193	83	43	43	2,0
PSar-b-PLL(TFA) _{V2}	PAHMA	3,3	77	81	26	64	1,0
PSar-b-PLL(TFA) _{V3}	PAHMA	3,6	93	130	29	95	1,5
PSar-b-PLL(TFA) _{V4}	PAHMA	36,3	1000	1670	31	120	10,0
<u>PSar-b-PLL(TFA)_{V5}</u>	PAHMA	3,9	121	273	35	158	2,0
<u>PSar-b-PLL(TFA)_{V6}</u>	PAHMA	3,9	82	253	24	170	3,5
<u>PSar-b-PLL(TFA)</u>	PAHMA*	15,6	480	1250	34	208	9,0
<u>PSar-b-Coblock</u>	PSar-co-PLL(Z)	25,0	-	109	-	-	1,0
<u>PSar-b-DB_{V6}</u>	PSar-b-PLL(TFA) _{V6}	18,4	-	83	-	-	1,6

8.11. Abspaltung der TFA-Schutzgruppe

8.11.1. Reaktionsgleichung



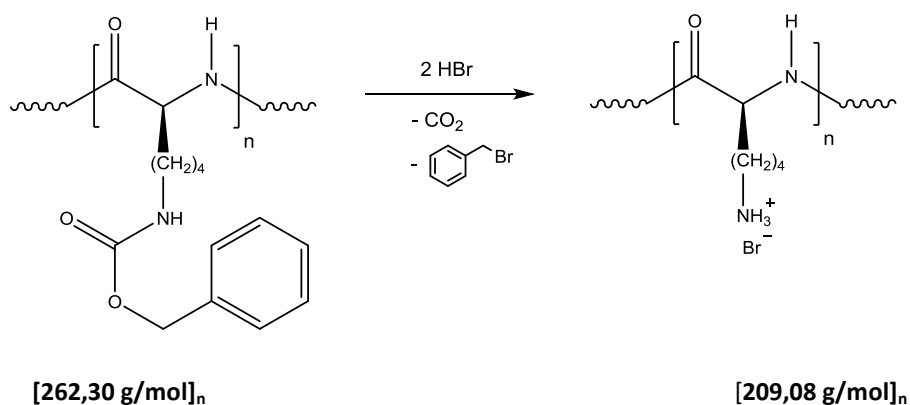
8.11.2. Allgemeine Vorschrift

Das zu entschützende Polymer wird in einem Rundkolben mit Rührfisch in MeOH oder DMF gelöst ($c = 10 \text{ mg/mL}$) und dann mit 50 Äq. (bezogen auf die Anzahl der in der Bürste enthaltenen Lys(TFA)-Einheiten) einer 35%igen, wässrigen Hydrazinlösung versetzt. Wahlweise kann auch direkt die Reaktionslösung nach der Bürstenpolymerisation benutzt werden. Die Entschützungsreaktion sollte mindestens drei Tage lang bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Bei der Reaktion in DMF ist es wichtig, das Polymer zunächst nur mit 5 Äq. Hydrazin über Nacht partiell zu entschützen und erst dann den restlichen Teil dazugeben, um ein Ausfallen des Polymers durch die hohe Wasserzufuhr zu verhindern. Das Lösungsmittel sowie das überschüssige Hydrazin werden über eine Kälte-destillation entfernt und das zurückbleibende, gelartige Polymer in Wasser gelöst. Wenn noch eine leichte Trübung zu erkennen ist, wird diese mit einem Spritzenfilter (GHP 450 nm) abfiltriert und das Filtrat mittels Amicon Zentrifugenfiltern (Ausschlussgrenze $M = 50 \text{ kDa}$) von den Abspaltungsprodukten befreit. Nach der Gefrier-trocknung erhält man ein weißes Polymer mit einer durchschnittlichen theoretischen Ausbeute von ca. 50%. Der größte Teil des Ausbeuteverlusts kommt durch Adsorption des geladenen Polymers an der Amicon-Membran zustande. Für Diblockbürsten sollte generell der Gefrier-trocknungsschritt ausgelassen werden, da es sonst zu Aggregationen

kommt. Zur Bestimmung der Massenkonzentration kann ein kleines, aliquotes Volumen der Lösung gefriergetrocknet und ausgewogen werden.

8.12. Abspaltung der Z-Schutzgruppe

8.12.1. Reaktionsgleichung

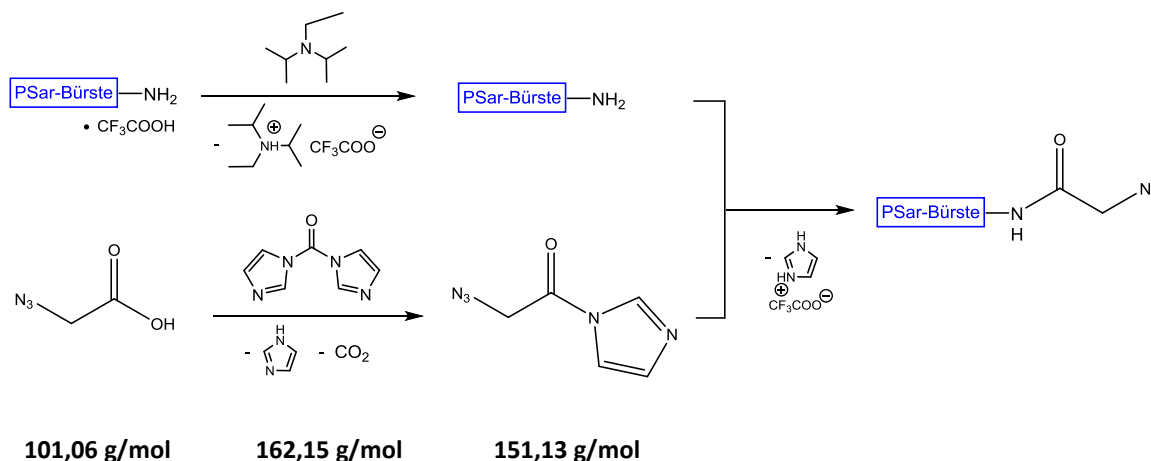


8.12.2. Allgemeine Vorschrift

Das zu entschützende Polymer wird erst in einem Rundkolben in TFA bzw. DMF vollständig gelöst ($c = 10 \text{ mg/mL}$) und mit 3 Äq. (bezogen auf die enthaltene Anzahl an Z-Schutzgruppen) einer 33%igen HBr/HAc-Lösung versetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Für die Analyse wird ein kleiner Teil der Lösung mit DMF bzw. HFIP gestreckt und mittels GPC charakterisiert.

8.13. Azidfunktionalisierung

8.13.1. Reaktionsgleichung



8.13.2. Allgemeine Vorschrift

Im ersten Schritt werden 50 Äq. Carbonyldiimidazol (CDI) in einem Schlenkcolben unter Argon in 4 mL trockenem DMF gelöst. Dazu spritzt man langsam eine Lösung aus 60 Äq. 2-Azidoessigsäure in 1 mL DMF ein und lässt die Reaktion abgedunkelt für 24 Stunden unter Argon-Atmosphäre bei Raumtemperatur rühren. Bei der Bildung von Acylimidazol steigen kleine Blasen auf (CO_2) und die Reaktionslösung verfärbt sich mit der Zeit rötlich. Nach Beendigung der Reaktion wird langsam 1 Äq. (bezogen auf die Gesamtzahl aller enthaltenen Seitenketten) der zu funktionalisierenden PSar-Bürste durch ein Septum zugegeben, welche mit 1 Äq. Diisopropylethylamin (DIPEA) versetzt wurde. Dabei kann auch direkt die Reaktionslösung aus der Bürstensynthese verwendet werden, bei der die genaue Menge des Makroinitiators bekannt ist und die Berechnung der Seitenkettenanzahl erleichtert. Die Kopplung wird 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach das Polymer in Diethylether gefällt. Das leicht bräunliche Polymer wird durch Zentrifugation isoliert, getrocknet und über eine Amicon-Zentrifugation in Wasser (Ausschlussgrenze $M = 50 \text{ kDa}$) aufgereinigt. Hierbei wird so lange frisches Wasser dazugegeben, bis das untere Filtrat keine gelbliche Farbe mehr aufweist. Der Überstand wird über einen Spritzenfilter (GHP 450 nm) von Membranfasern befreit und

schlussendlich gefriergetrocknet. Meist werden wegen Adsorptionseffekten des Polymers an der Amicon-Membran nur ungefähr 50%ige Ausbeuten erzielt.

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹)= 2108 (w, N₃-Bande), 1638 (s, C=O Amid-I-Bande), 1489 (m, Amid-II-Bande) gilt für Sar-Bürste

8.14. Verwendete Chemikalien

Tabelle 18 zeigt eine Auflistung der für diese Dissertation verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sowie deren Aufreinigung. Wasser wird von der Milipore Anlage Elix 10 entnommen.

Tabelle 18: Übersicht aller verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge: SA= Sigma Aldrich, AO= Acros Organics, (m)= über Molekularsieb (Stand: Sep. 2014)

Chemikalie	Lieferant	Bestellnr.	Aufreinigung
2-Azidoacetic acid	SA	763470	
2-Mercaptoethanol	SA	M6250	
Aceton	SA	270725	
AgNO ₃	SA	38310-1EA-R	
AIBN	SA	11630	Umkristallisation aus MeOH
Anisol	SA	296295	Destillation (bp:154°C)
Barium oxide	SA	288497	
Benzol	SA	319953	
Benzylbromid	SA	B17905	
CDI	SA	115533	
Chloroform	vwr	22711.324	
Dichlormethane (m)	SA	66749	
Diethylether	SA	32203	
Dioxane	SA	33147	
Diphosgen	SA	23261	
Di-tert-butyl dicarbonat	SA	205249	
DMF (m)	AO	AC348435000	Kälteedestillation, siehe Kap. 8.10.2
DMSO (m)	SA	276855	
Ethylacetat (m)	SA	33211	
Hexamethyldiamin	SA	H11696	
Hexan (m)	AO	AC364370010	
HFIP	SA	105228	
HBr wt. 33% in Eisessig	AO	AC123180010	
Hydrazin wt. 35% in H ₂ O	SA	309400	
Kaliumphosphat	SA	P5629	

Chemikalie	Lieferant	Bestellnr.	Aufreinigung
Kieselgel 60 (4-6,3·10⁻² mm)	vwr	1093852500	
Lys(TFA)-OH	Bachem	E-2615.0025	
Lys(Z)-OH	SA	96840	
Magnesiumsulfat	SA	208094	
Methacryloylchlorid	SA	64120	Destillation (bp.=97°C) unter Ar und Cu(I)
Methanol	SA	32213	
N,N-Diisopropylethylamin	SA	D125806	
NaOH	SA	221465	
PBS	gibco	14190	
PLL-HBr (M = 4-15kDa)	SA	P6516	In H ₂ O lyophilisiert
PLL-HBr (M > 300kDa)	SA	P1524	Dialyse mit M> 300kDa
Sarkosin	SA	84532	
THF (m)	SA	87371	
Toluol	SA	32249	
Triethylamin	SA	90335	Destillation (bp.=89°C)
Trifluoressigsäure	SA	302031	
Triphosgen	SA	15217	Umkristallisation aus Hexan

8.15. Verwendete Geräte und Methoden

Für die Übersichtlichkeit werden alle verwendeten Methoden und Geräte, sowie die eingestellten Parameter in Tabelle 19 in Kurzform aufgelistet. AFM-Messungen wurden von Sandra Decker, Brechungsinkrement-Messungen von Eva Wächtersbach durchgeführt.

Tabelle 19: Übersicht aller verwendeten Methoden, der zu Grunde liegenden Geräte sowie der eingestellten Parameter

Methode	Geräte + Parameter
GPC (DMF)	DMF mit LiBr (1 g/L) bei 60 C, Fluss: 1 mL/min Säulenmaterial: vernetztes Polystyrol (MZ-Analysentechnik; MZ-SDplus; 5 mm Material 300 x 8 mm); Porengröße: 10, 10 ² , 10 ³ nm (Oligomer-Säule); 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ , 10 ⁷ nm (Polymer-Säule) Kalibrierung: Polystyrol-Standards (von PSS, Mainz) Komponente: UV-Detektor (Waters, 486, $\lambda = 280$ nm); RI-Detektor (Hitachi, L-2490); Pumpe (Hitachi, L-7110); Degasser (Waters, AF)
GPC (HFIP)	HFIP mit KTFA (3 g/L) bei 40 C, Fluss: 0,8 mL/min Säulenmaterial: PSS PFG, Partikelgröße 7 μm , Porosität: 100 & 1000 Å Kalibrierung: PMMA-Standards (PSS, Mainz) + int. Standard (Toluol) UV-Detektor (Jasco UV-2075+) + RI Detektor (Jasco RI-2031) + Pumpe (Jasco PU2080+)
CD	Modus: continuous scan-mode v. 260-190 nm mit 20 nm/min bei 20°C; 0,5 nm-Schritte, 3 Akkumulationen Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke CD-Spektrometer (Jasco, J-815) + Halbleiterdetektor
NMR	¹ H-NMR: 300 MHz, 20°C, 7 min Messzeit (Bruker, 300 Ultra Shield) Auswertungsprogramm: „MestReNova“
FT-IR	FT-IR (ATR)-Spektrometer (Thermo Scientific, Nicolet iS10) Auswertungsprogramm: „OMNIC“
AFM	MultiModeTM Scanning Probe Microscope + Nanoscope IIIa-Controller (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) + Silicium Cantilever mit ca. 300 kHz Resonanzfrequenz (Nanosensors, Wetzlar Blankenfeld) Modus: tappingTM-Mode Substrat: Mica bzw. Graphit, Fläche ca. 1 cm ² Auftragung: Spin casting (getropft) oder in Lösung

Methode	Geräte + Parameter
dn/dc	Michelson Interferometer ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) mit 5 Konzentrationen
PAGE	<p>Gelelektrophorese: PerfectBlue Twin L vertikales Doppelsystem bei 11W Gel: 15% natives Gel aus 40% Acryl/Bisacryl-Lösung (18,75 mL), H₂O (25,75mL), 10x TBE-Puffer (5mL), APS (0,5mL), TEMED (0,5 μL) Laufmittel: TBE-Puffer (1x) Ladepuffer: Ambion AM8556 aus 40% Succrose, 0,17% Xylencyanol, 0,17% Bromphenolblau Anfärbemittel: SYBR-Gold in TBE-Puffer für 15min</p>
Lichtstreuung	<p>Temperiertes Toluolbad mit 20°C Quarzküvette (Hellma, Müllheim, $\varnothing = 20 \text{ mm}$); 20 min im Acetonbrunnen von Staub befreit; Befüllung in Flow-Box Verwendete Konzentrationen und Filter siehe jeweilige Messung Auswertungsprogramm: „HDRC“ (geschrieben v. Olliver Nirschl)</p>
SLS	<p>He-Ne-Laser (JDS Uniphase 1145p-3083): $\lambda = 632,8 \text{ nm}$; Leistung=25 mW ALV/High QEAPD Avalanche-Photodioden + Goniometer ALV-SP-86 Digital Korrelator / Strukturator ALV-3000 (ALV, Langen)</p>
DLS (grün)	<p>Ar-Ionen-Laser (Spectra Physics Stabilité 2060-4S): $\lambda = 514,5 \text{ nm}$, Leistung= 500 mW ALV/SO-SIPD Single Photon Detector + Goniometer SP-125 ALV-5000/EPP/60X Multitau Realtime Digital Korrelator (ALV Langen) Die gestreute Intensität wird gesplittet und kreuzkorreliert</p>
DLS (rot)	<p>He-Ne-Laser: $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, Leistung= 25 mW ALV-CGS 8F SLS/ DLS 5022F Goniometer + acht ALV 7004 Korrelatoren und acht QEAPD Avalanche Photodioden Detektoren</p>
Serummessung	<p>Durchgeführt an der roten DLS, siehe Kap. 5.2 Serum wurde v. der Transfusionszentrale der Uni-Klinik Mainz erhalten</p>
Komplexierung	siehe Kap. 6.2.1

9. Anhang

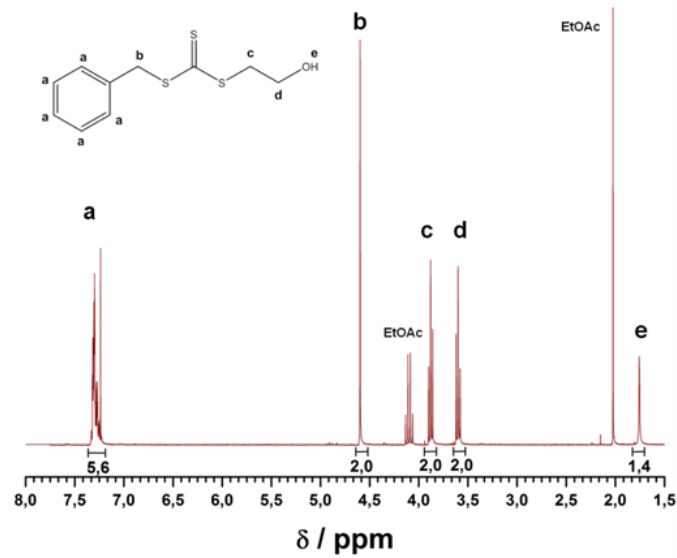


Abb. 91: ¹H-NMR-Spektrum des Kettentransferagens (CTA) aus Kapitel 4.1.1 in CDCl₃ (300 MHz, 293 K)

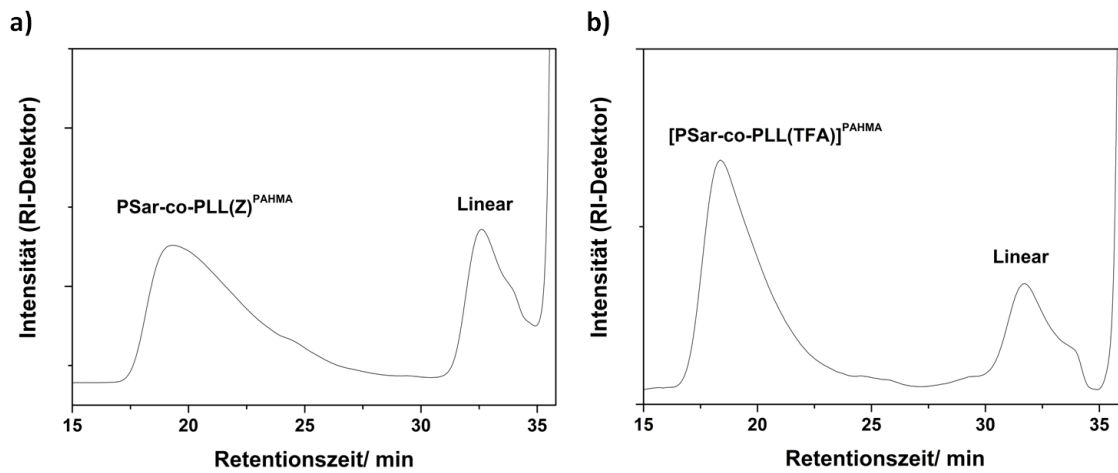


Abb. 92: GPC-Elutionsdiagramm der Reaktionslösung von a) [PSar-co-PLL(Z)]^{PAHMA} und b) [PSar-co-PLL(TFA)]^{PAHMA} aus Kapitel 4.5.2.1 in DMF (Polymersäule)

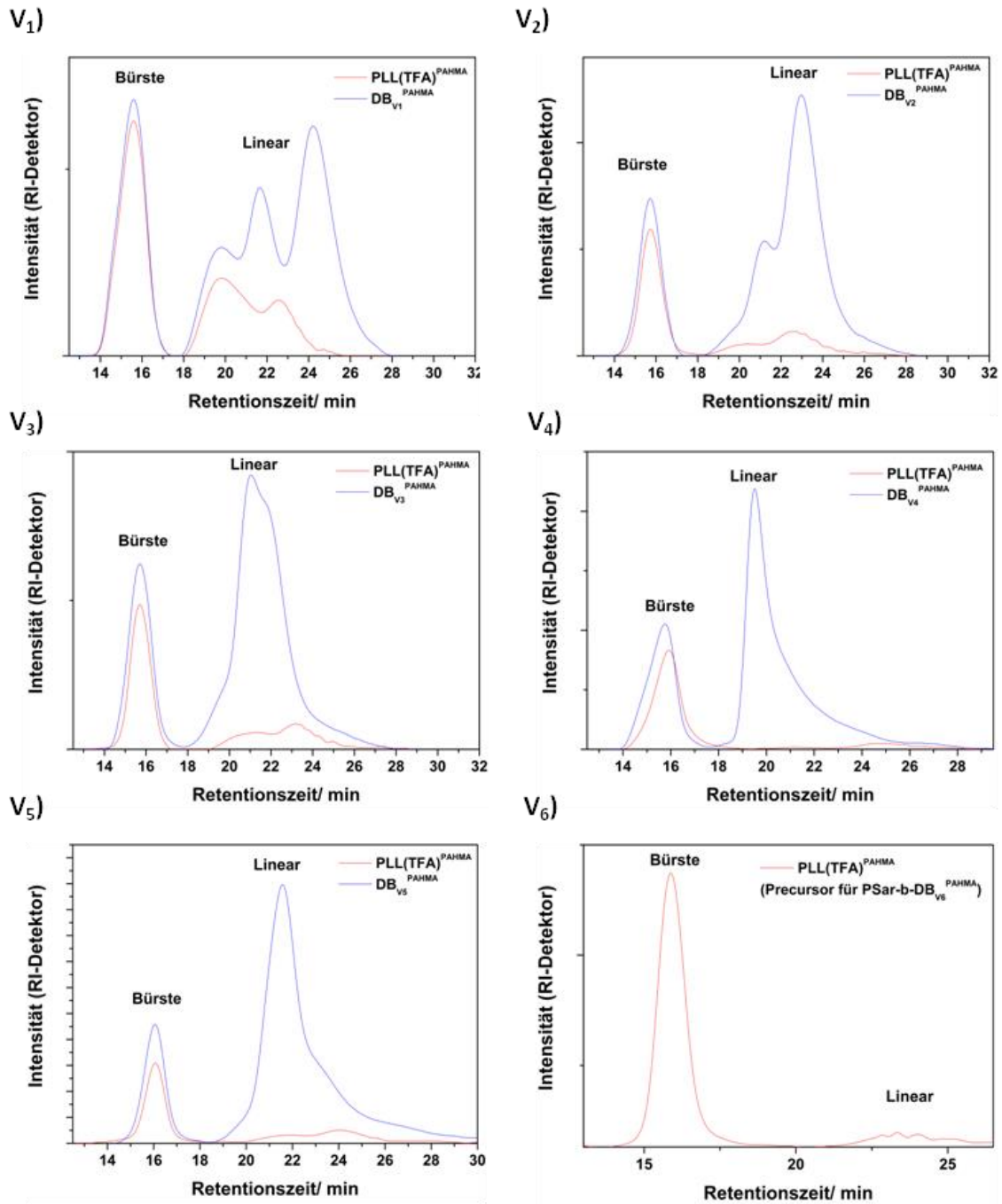


Abb. 93: Konzentrationsäquivalente GPC der Reaktionslösung des PLL(TFA)-Monoblocks (rot) und dem korrespondierenden PSAr-b-PLL(TFA)-Diblock (blau) der Versuche **V1** - **V6** aus der in-situ-Polymerisation in Kapitel 4.5.3.1

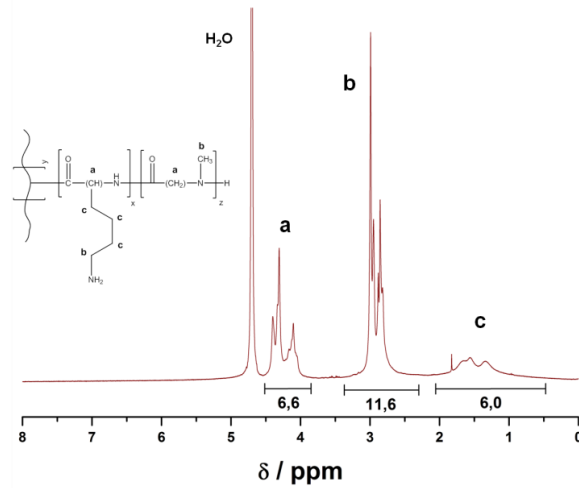


Abb. 94: ^1H -NMR-Spektrum der entschützten PSar-b-PLL_{V4}^{PAHMA} aus Kapitel 4.5.3.1 in D₂O (300 MHz, 293 K)

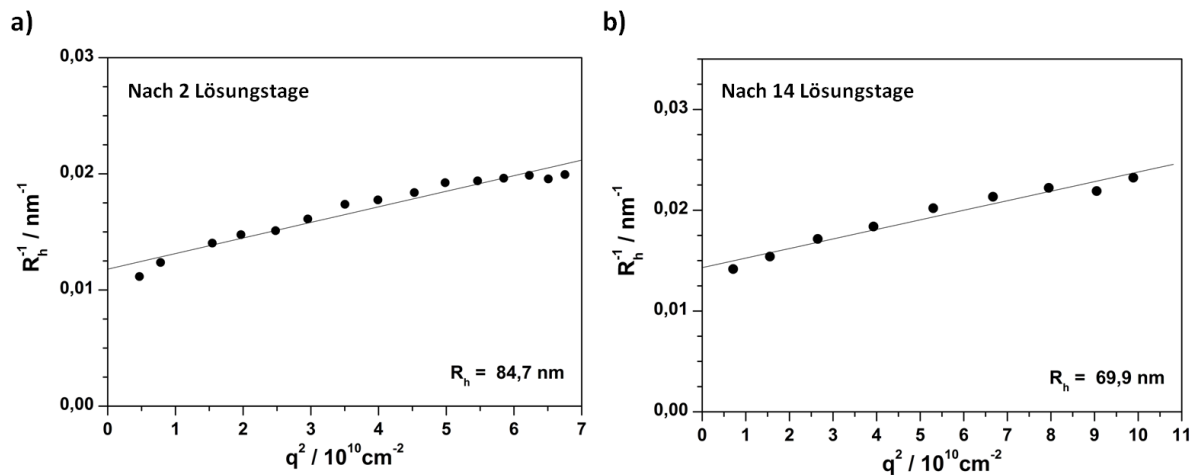


Abb. 95: DLS der entschützten PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.2 mit $c = 0,02$ g/L nach **a)** 2 Lösungstagen und **b)** 14 Lösungstagen in PBS-Puffer (Filter GHP 450 nm)

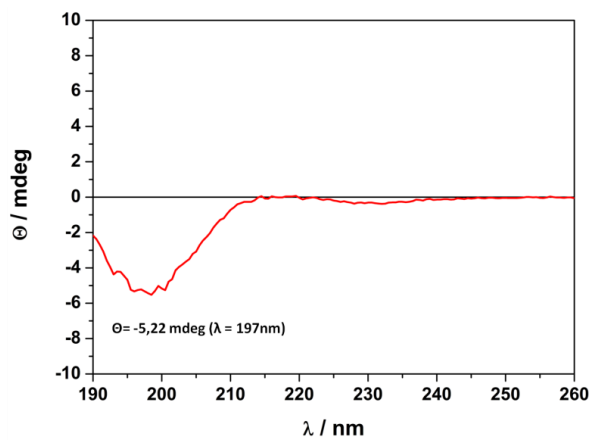


Abb. 96: CD-Spektrum der entschützten PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.2 mit $c_{\text{korrr}} = 0,105$ g/L in H₂O bei 20°C

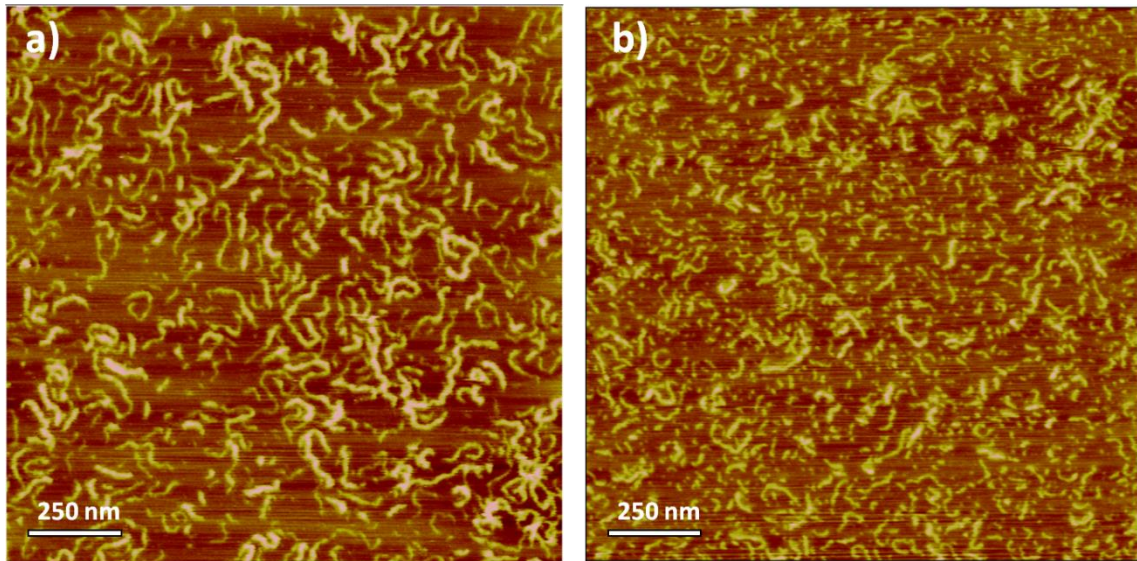


Abb. 97: AFM-Aufnahme der entschützten PSar-PLL_{V4}^{PAHMA}-Diblockbürste für Kapitel 4.5.3.2 auf Mica **a)** vor der Ultraschallbehandlung und **b)** nach 120 min im Ultraschallbad. Die Bürste wird durch Ultraschall mechanisch in der Hauptkette gebrochen

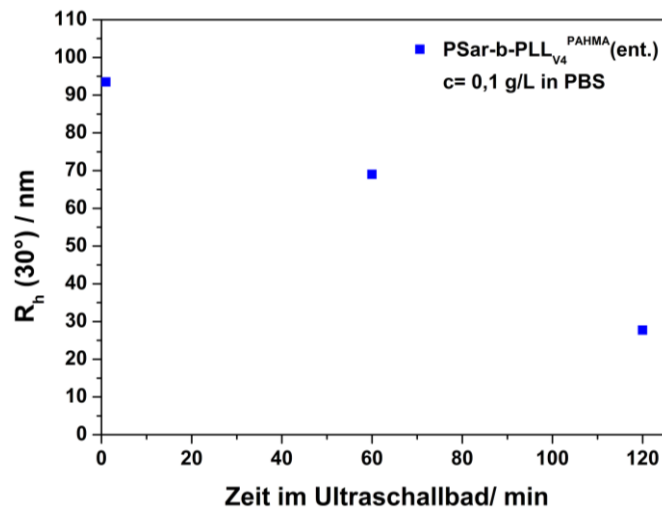


Abb. 98: DLS der entschützten PSar-PLL_{V4}^{PAHMA}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.2 mit $c = 0,1 \text{ g/L}$ in PBS in Abhängigkeit der Zeit der Ultraschallbehandlung (Filter GHP 450 nm). Der hydrodynamische Radius (bei 30°) sinkt mit der Zeit ab, da die Bürsten mechanisch in der Hauptkette gebrochen werden (vergleiche Abb. 97)

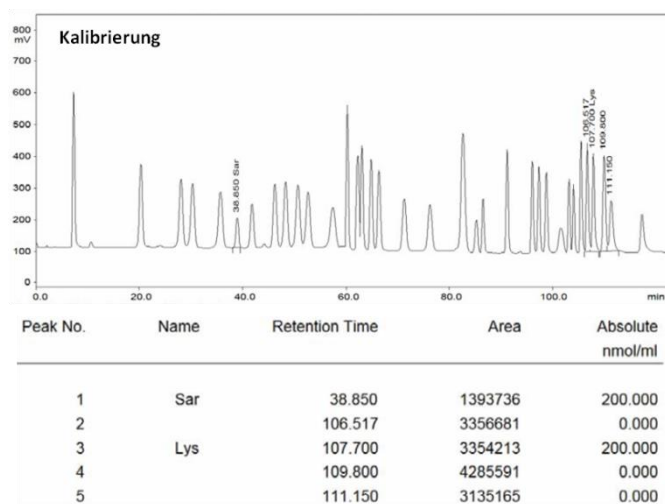


Abb. 99: Kalibrierung der AAA

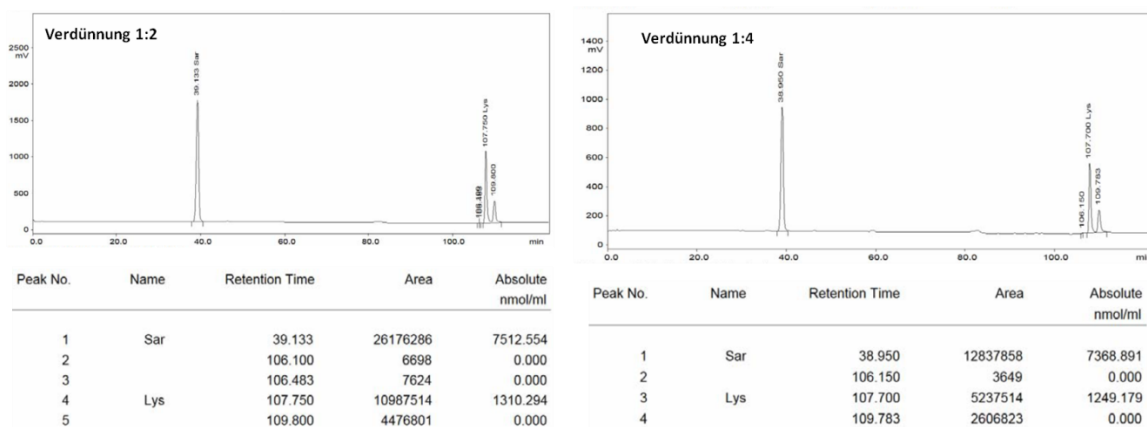


Abb. 100: AAA der entschützten PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.2 mit einer Verdünnung von 1:2 bzw. 1:4 der Startkonzentration von 1 mg/mL (eingewogen). Das Signal bei 109,8 min ist typische für reine Amine und kann von dem hydrolysierten Spacer Hexamethylendiamin stammen

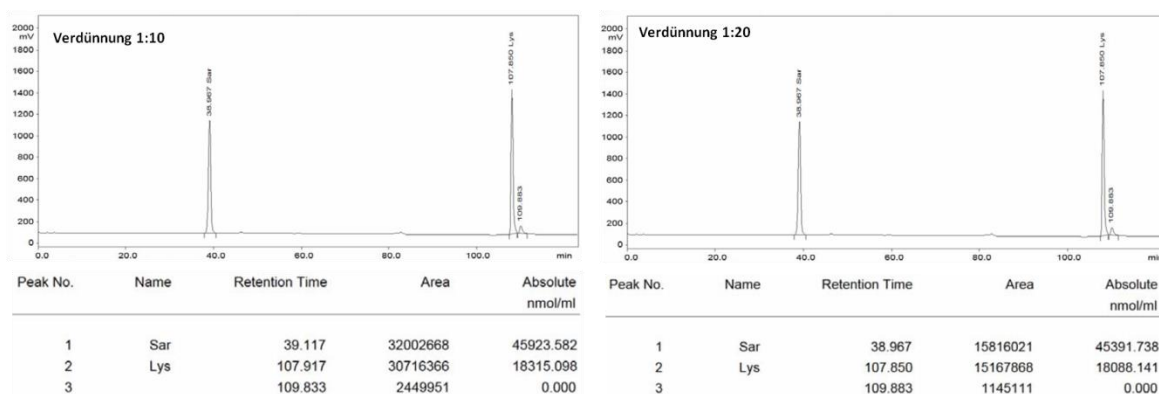


Abb. 101: AAA der entschützten PSar-b-PLL^{PAHMA*}-Bürste aus Kapitel 4.5.3.3 mit einer Verdünnung von 1:10 bzw. 1:20 der Startkonzentration von 6,42 mg/mL (eingewogen). Das Signal bei 109,8 min ist typische für reine Amine und kann von dem hydrolysierten Spacer Hexamethylendiamin stammen

Tabelle 20: Erhaltene Werte aus der AAA für beide Diblockbürste (vergleiche Abb. 99 bis Abb. 101). Die jeweilige Konzentrationen c sind aus beiden Messungen der Bürste gemittelt

Bürste	AS	M_{Wdh} / g-mol	c / nmol·mL ⁻¹	c / g·L ⁻¹	X / %	W / %	c_{ges} / g·L ⁻¹
PSar-b-DB_{V6}^{PAHMA} (entschützt)	Sar	71,08	7441	0,529	85	76	0,69
	Lys	128,17	1280	0,164	15	24	
PSar-b-PLL^{PAHMA*} (entschützt)	Sar	71,08	45658	3,245	71	58	5,58
	Lys	128,17	18202	2,333	29	42	

siRNA

Die in Kapitel 6.2.1 verwendete siRNA wird von IBA Nucleic Acids Synthesis kommerziell als Einzelstränge erworben:

„Sense“: 22 Basenpaare mit der Sequenz: `GCAAGCUGACCCUGAAGUUC`AU
M = 7851,28 g/mol; ,3'-markiert mit dem Farbstoff ATTO565

„Antisense“: 22 Basenpaare mit der Sequenz: `GAACUUCAGGGUCAGCUUGC`CG
M = 7033,28 g/mol; unmarkiert

Die Hybridisierung wurde von [REDACTED] im [REDACTED] durchgeführt, indem beide Einzelstränge äquimolar in PBS-Puffer gemischt, für kurze Zeit auf 90°C erhitzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Die Aufreinigung erfolgte mittels Fällung in NaAc-Puffer durch Zugabe von Ethanol und anschließender Zentrifugation. Die Gesamtmolmasse der hybridisierten siRNA beträgt M = 14884,56 g/mol

10. Abkürzungsverzeichnis

A ₂	2. Virialkoeffizient des osmotischen Drucks
AAA	Aminosäureanalyse
AFM	Atomic Force Microscopy
AGO	Argonaut Protein
AIBN	Azobisisobutyronitril
AMM	„Aktivierter Monomer“-Mechanismus
ATP	Adenosinriphosphat
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
ATR	„Attenuated Total Reflectance“
B	Base
b	Block
BM-DC	Dendritische Knochemarkzellen („bone marrow dendritic cells“)
Boc	tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
BSA	Rinderalbumin
Bu	Butyl
c	Konzentration
CD	Zirkulardichroismus
CLSM	„Confocal laser scanning microscopy“
co	statistischer Coblock
CpG	„—Cytosin-phosphate-Guanin—“
CTA	Kettentransferagens
DB	Diblock
DBCO	Dibenzylcyclooctyne
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPR	„Enhanced Permeation and Retention“
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
FACS	„Fluorescence-activated cell sorting“

FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FT-IR-	Fourier-Transform-Infrarot-
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GPC	Gelpermationschromatographie
GTP	Gruppen-Transfer-Polymerisation
HAc	Essigsäure
HDMS	Hexamethyldisilazane
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen
HFIP	Hexafluoroisopropanol
iBu	Isobutyl
IR	Infrarot
IRE	Reflexionselement
LCST	Lower Critical Solution Temperature
LM	Lösungsmittel
L_n	Zahlenmittel der Konturlänge
L_w	Gewichtsmittel der Konturlänge
Lys	Lysin
M/I	Monomer-Initiator-Verhältnis
Me	Methyl
MeOH	Methanol
M_n	Zahlenmittel des Molekulargewichts
M_w	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
NAM	„Normaler Amin“-Mechanismus
NCA	N-Carboxy-Anhydrid
NHC	N-heterozyklisches Carben
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance“
NNCA	N-substituiertes N-Carboxy-Anhydrid
N-TMS	N-Trimethylsilylamine
Nu	Nukleophil
PAHMA	Poly[N-(6-aminohexyl)methacrylamid]
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („Phosphate buffered saline“)
PDI	Polydispersität
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PGA	Polyglutaminsäure

PHEA	Poly(hydroxyethyl-L-asparagin)
PHEG	Poly(hydroxyethyl-L-glutamin)
PLL	Poly((L)-lysin)
PMMA	Polymethylmethacrylat
P_n	Zahlenmittel des Polymerisationsgrades
P_w	Gewichtsmittel des Polymerisationsgrades
PS	Polystyrol
PNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamid)
POx	Poly(2-oxazolin)
Pr	Propyl
PSar	Polysarkosin
q	Streuvektor
$R(\theta)$	Rayleighverhältnis
RAFT	„Reversible addition–fragmentation chain transfer“
RES	Retikuloendotheliales System
R_g	Mittlerer Trägheitsradius: $\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}$
R_h	Hydrodynamischer Radius: $\langle \frac{1}{R_h} \rangle_z^{-1}$
RI	„Refractive Index“
RISC	RNA-induced silencing“-Komplex
ROMP	„Ring-opening methasis polymerization“
ROP	ringöffnende Polymerisation
ROS	„reactive oxygen species“
Sar	Sarkosin
scRNA	„scrumbled“ RNA
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	„Size exclusion chromatography“
siRNA	"small interfering" RNA
siRNA/B	Komplex aus siRNA und Bürste
SLS	Statische Lichtstreuung
STM	Rastertunnelmikroskopie
T	Temperatur
TFA	Trifluoracetyl/ Trifluoracetat /Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett

W	Massenanteil
X	Zahlenanteil
Z	Benzyloxycarbonyl (Schutzgruppe)
Θ	Elliptizität in der Einheit [grad]
Λ	Wellenlänge
Σ	Einbauverhältnis
Γ	Zahlenverhältnis
Ψ	Massenverhältnis

11. Literaturverzeichnis

- [1] M. Dominska, D.M. Dykxhoorn; *Journal of Cell Science* **2010**, 123, 1183-1189
- [2] R. Duncan; *Nature Reviews Cancer* **2006**, 6, 688-701
- [3] H. Ringsdorf; *J. Polym. Sci. Symp.* **1975**, 51, 135–153
- [4] R. Duncan; *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, 2, 347-360
- [5] A.Z. Wang , F. Gu, L. Zhang, J.M. Chan, A. Radovic-Moreno, M.R. Shaikh, O.C. Farokhzad; *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2008**, 8, 1063-70
- [6] T. J. Deming; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 1145–1155
- [7] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, M.J. Vicent; *Polym. Chem.* **2011**, 2, 1900-1918
- [8] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U.S. Schubert; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 6430 – 6452
- [9] R. Luxenhofer, C. Fetsch, A. Grossmann; *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2013**, 51, 13, 2731-2752
- [10] S. Venkataraman, J.L. Hedrick, Z.Y. Ong, C. Yang, P.L.R. Ee, P.T. Hammond, Y.Y. Yang; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63, 1228–1246
- [11] L. Qiu, Y. Bae; *Pharmaceutical Research* **2006**, 23, 1
- [12] S.S. Sheiko, B.S. Sumerlin, K. Matyjaszewski; *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, 759-785
- [13] M.E. Fox, F.C. Szoka, J.M.J. Freché; *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 8, 1141-1151
- [14] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D.E. Discher; *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 249-255
- [15] B. Zhang, K. Fischer, M. Schmidt; *Makrom. Chem. and Phys.* **2005**, 206, 1, 157
- [16] M. Sahl, S. Muth, R. Branscheid, K. Fischer, M. Schmidt; *Macromolecules* **2012**, 45, 5167–5175
- [17] M. Sahl, *Dissertation: Synthese und Charakterisierung von zylindrischen Bürsten mit Polypeptidseitenketten*; Mainz, **2011**
- [18] S.S Sheiko, M. Möller, *Atomic force microscopy of polymers*. In: K. Matyjaszewski, Y Gnanou, L. Leibler, editors. *Macromolecular engineering*. New York; Wiley-VCH; **2007**
- [19] M. Wintermantel, M. Gerle, K. Fischer, M. Schmidt; *Macromolecules* **1996**, 29, 978-983
- [20] Shin-ichi Yamamoto, Joanna Pietrasik, Krzysztof Matyjaszewski; *Macromolecules* **2008**, 41, 7013-7020
- [21] C. Li, N. Gunari, K. Fischer, A. Janshoff, M. Schmidt; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1101 -1101
- [22] Hyung-il Lee, Joanna Pietrasik, Sergei S. Sheiko, Krzysztof Matyjaszewski; *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35, 24–44

-
- [23] H. Xu, F.C. Sun, D.G. Shirvanyants, M. Rubinstein, D. Shabratov, K.L. Beers, K. Matyjaszewski, S.S. Sheiko; *Adv. Mater.* **2007**, 19, 2930–2934
- [24] A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane; *Progress in Polymer Science* **2008**, 33, 1088–1118
- [25] J.A. Johnson, Y.Y. Lu, A.O. Burts, Y.-H. Lim, M. G. Finn, J.T. Koberstein, N.J. Turro, D.A. Tirrell, R.H. Grubbs; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 559–566
- [26] M. Zhang, C. Estournès, W. Bietsch, A.H.E. Müller; *Adv. Funct. Mater.* **2004**, 14, 871-882
- [27] J. Yuan, Y. Lu, F. Schacher, T. Lunkenbein, S. Weiss, H. Schmalz, A.H.E. Müller; *Chem. Mater.* **2009**, 21, 4146-4154
- [28] M. Zhang, M. Drechsler, A.H.E. Müller; *Chem. Mater.* **2004**, 16, 537-543
- [29] R.V. Iozzo, *Proteoglycans. Structure, biology, and molecular interactions*, M. Dekker; New York, op. **2000**
- [30] N.C. Kaneider, S. Duzendorfer, C.J. Wiedermann; *Biochemistry* **2003**, 43, 237-244
- [31] J.E. Scott; *Biochemistry* **1996**, 35, 8795–8799
- [32] G.D. Jay, K. Haberstroh; C-J. Cha; *Connect Tissue Res* **1992**, 28, 71–88
- [33] S.S. Sheiko, S.A. Prokhorova, K.L. Beers, K. Matyjaszewski, I.I. Protemkin, A.R. Khokhlov; *Macromolecules* **2001**, 34, 8354-60
- [34] J. Seog, D. Dean, A.H.K. Plaas, S. Wong-Palms, A.J. Grodzinsky; *Macromolecules* **2002**, 35, 5601-15
- [35] K. Yamada, M. Miyazaki, K. Ohno, T. Fukuda, M. Minoda; *Macromolecules* **1999**, 32, 290-3
- [36] D. Pantazis, I. Chalari, N. Hadjichristidis; *Macromolecules* **2003**, 36, 3783-3785
- [37] S. Kanaoka, M. Sueoka, M. Sawamoto, T. Higashimura; *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **1993**, 31, 2513-2521
- [38] D. Neugebauer, Y. Zhang, T. Pakula, S.S. Sheiko, K. Matyjaszewski; *Macromolecules* **2003**, 36, 6746-6755
- [39] L. Ayres, M.R.J. Vos, P.J.H.M. Adams, I.O. Shklyarevskiy, J.C.M. van Hest; *Macromolecules* **2003**, 36, 5967-5973
- [40] S. Ohno, K. Matyjaszewski; *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2006**, 44, 5454–5467
- [41] J. Bühler, S. Muth, K. Fischer, M. Schmidt; *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, 34, 588–594
- [42] D. Weller, J.R. McDaniel, K. Fischer, A. Chilkoti, M. Schmidt; *Macromolecules* **2013**, 46, 4966–4971
- [43] Y. Tsukahara, K. Mizuno, A. Segawa, Y. Yamashita; *Macromolecules* **1989**, 22, 1546-1552
- [44] S. Jha, S. Dutta, N.B. Bowden; *Macromolecules* **2004**, 37, 4365-4374

-
- [45] C. Cheng, E. Khoshdel, K.L. Wooley; *Macromolecules* **2005**, 38, 9455-9465
- [46] T. von Erlach, S. Zwicker, B. Pidhatika, R. Konradi, M. Textor, H. Hall, T. Lühmann; *Biomaterials* **2011**, 32, 5291-5303
- [47] M. Schappacher, C. Billaud, C. Paulo, A. Deffieux; *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, 200, 2377–2386
- [48] M. Schappacher, J. Bernard, A. Deffieux; *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, 204, 762–769
- [49] Y. Yan, Y. Shi, W. Zhu, Y. Chen; *Polymer* **2013**, 54, 5634-5642
- [50] H. Gao, K. Matyjaszewski; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6633-6639
- [51] I. Stupp, V. LeBonheur, K. Walker, L.S. Li, K.E. Huggins, M. Keser, A. Amstutz; *Science* **1997**, 276, 384-389
- [52] J. de Wit, G.A. van Ekenstein, E. Polushkin, J. Korhonen, J. Ruokolainen, G. Brinke, *Macromolecules* **2009**, 42, 2009–2014
- [53] M. Antonietti, J. Conrad, A. Thuenemann; *Macromolecules* **1994**, 27, 6007–6011
- [54] S.S. Sheiko, B.S. Sumerlin, K. Matyjaszewski; *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, 759–85
- [55] H.G. Börner, K. Beers, K. Matyjaszewski; *Macromolecules* **2001**, 34, 4375-4383
- [56] M. Müllner, T. Lunkenbein, J. Brey, F. Caruso, A.H.E. Müller; *Chem. Mater.* **2012**, 24, 1802–1810
- [57] M. Zhanga, T. Breinerb, H. Moria, A.H.E. Müller; *Polymer* **2003**, 44, 1449–1458
- [58] G. Cheng, A. Böker, M. Zhang, G. Krausch, A.H. E. Müller; *Macromolecules* **2001**, 34, 6883-6888
- [59] R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu, H.A. Klok; *Chem. Rev.* **2009**, 109, 5437–5527
- [60] P.M. Woster, *Protein Structure and Function- An Overview Pharmaceutical Biochemistry I.* **2007**
- [61] N. Voloshchuka, J.K. Montclare; *Mol. Biosyst.* **2010**, 6, 65–80
- [62] A. Malhotra, *Laboratory Methods in Enzymology* **2009**, 463, 239-258
- [63] R.B. Merrifield; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154
- [64] V.R. Pattabiraman, J.W. Bode; *Nature* **2011**, 480, 471-479
- [65] H. Leuchs; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, 39, 1721-1726
- [66] H.R. Kricheldorf; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5752 – 5784
- [67] C. Fetsch, A. Grossmann, L. Holz, J.F. Nawroth, R. Luxenhofer; *Macromolecules* **2011**, 44, 6746–6758
- [68] J. Cheng, T. J. Deming: *Synthesis of Polypeptides by Ring-Opening, Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides*; *Top Curr Chem*, Springer, **2011**
- [69] H.R. Kricheldorf: *α -Aminoacid-N-Carboxyanhydrides and Related Materials*, Springer, New York, **1987**
- [70] R. Katakai, Y. Iizuka; *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 715-716

-
- [71] W.H. Daly, D. Poché; *Tetrahedron Letters* **1988**, 29, 46, 5859-5862
- [72] H.R. Kricheldorf: *Models of Biopolymers by Ring-Opening Polymerization*, Penczek, S. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL **1990**
- [73] N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou; *Chem. Rev.* **2009**, 109, 5528–5578
- [74] T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadchichristidis; *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1653
- [75] J. Muzart; *Tetrahedron* **2009**, 65, 8313–8323
- [76] H.R. Kricheldorf, C. von Lossow, G. Schwarz; *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, 205, 918–924
- [77] G.J.M. Habraken, M. Peeters, C.H.J.T. Dietz, C.E. Koning, A. Heise; *Polym. Chem.* **2010**, 1, 514–524
- [78] W. Vayaboury, O. Giani, H. Cottet, A. Deratani, F. Schué; *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, 25, 1221–1224
- [79] D.L. Pickel, N.P.A. Avgeropoulos, J.M. Messman; *Macromolecules* **2009**, 42, 7781–7788
- [80] T.J. Deming; *Nature* **1997**, 390, 386
- [81] T.J. Deming; *Macromolecules* **1999**, 32, 4500-4502
- [82] T.J. Deming; *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2000**, 38, 3011
- [83] T.J. Deming; *Soft Matter* **2005**, 1, 28–35
- [84] T.J. Deming, S.A. Curtin; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5710-5717
- [85] S.A. Curtin, T.J. Deming; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7427-7428
- [86] A.J. Rhodes, T.J. Deming; *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 19463–19467
- [87] Y. Knobler, S. Bittner, M. Frankel; *J. Chem. Soc.* **1964**, 3941
- [88] Y. Knobler, S. Bittner, D. Virov, M. Frankel; *J. Chem. Soc.* **1969**, 1821
- [89] I. Dimitrov, H. Schlaad; *Chem. Commun.* **2003**, 2944–2945
- [90] H. Fischer; *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3581-3610
- [91] H. Lu, J. Cheng; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 46, 14114
- [92] H. Lu, J. Cheng; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 38, 12563
- [93] O.W. Webster, W.R. Hertler, D.Y. Sogah, W.B. Farnham, T.V. RajanBabu; *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 17, 5706
- [94] E. Peggion, A. Cosani, A.M. Mattucci, E. Scoffone; *Biopolymers* **1964**, 2, 69-78
- [95] M. Sela, E. Katchalski, M. Gehatia; *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 746
- [96] T. Miyamoto, S. Takahashi, S. Tsuji, H. Ito, H. Inagaki; *J. Appl. P. Sci.* **1986**, 31, 2303
- [97] M. Kimura, T. Egashira, T. Nishimura, M. Maeda, S. Inoue; *Makromol. Chem.* **1982**, 183, 1393
- [98] J. Boulahia, F. Carrieret, H. Sekiguchi; *Makromol. Chem.* **1989**, 190, 1975

- [99] Y. Cong, N. Gunari, B. Zhang, A. Janshoff, M. Schmidt; *Langmuir* **2009**, 25, 6392–97
- [100] N. Gunari, Y. Cong, B. Zhang, K. Fischer, A. Janshoff, M. Schmidt; *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, 29, 821–825
- [101] H. Lu, J. Wang, Y. Lin, J. Cheng; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 38, 13582
- [102] A. Zhang, Y. Guo; *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 8939
- [103] F. Fernández-Trillo, A. Duréault, J.P.M. Bayley, J.C.M. van Hest, J.C. Thies, T. Michon, R. Weberskirch, N.R. Cameron; *Macromolecules* **2007**, 40, 6094
- [104] D. Weller, A. Medina-Oliva, H. Claus, S. Gietzen, K. Mohr, A. Reuter, D. Schäffel, S. Schöttler, K. Koynov, M. Bros, S. Grabbe, K. Fischer, M. Schmidt; *Macromolecules* **2013**, 46, 8519–8527
- [105] J.J. Cornelissen, W.S. Graswinkel, P.J. Adams, G.H. Nachttegaal, A.P. Kentgens, N.A. Sommerdijk, R.J. Nolte; *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2001**, 39, 4255
- [106] Donghui Zhang, Samuel H. Lahasky, Li Guo, Chang-Uk Lee, Monika Lavan; *Macromolecules* **2012**, 45, 5833–5841
- [107] J.W. Robinson, C. Secker, S. Weidner, H. Schlaad; *Macromolecules* **2013**, 46, 580–587
- [108] S.H. Lahasky, X. Hu, D. Zhang; *ACS Macro Lett.* **2012**, 1, 580–584
- [109] J. Seo, A.E. Barron, R.N. Zuckermann; *Org. Lett.* **2010**, 2, 3, 492–495
- [110] K. Kirshenbaum, A.E. Barron, R.A. Goldsmith, P. Armand, E.K. Bradley, K.T.V. Truong, K.A. Dill, F.E. Cohen, R.N. Zuckermann; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 4303–4308
- [111] B. Paul, G.L. Butterfoss, M.G. Boswell, P.D. Renfrew, F.G. Yeung, N.H. Shah, C. Wolf, R. Bonneau, K. Kirshenbaum; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10910–10919
- [112] D.G.H. Ballard, C.H. Bamford; *J. Chem. Soc.* **1958**, 355–360
- [113] A. Cosani, M. Palumbo, M. Terbojevich, E. Peggion; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 11, 1041–1045
- [114] L. Guo, D. Zhang; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 50, 18072–74
- [115] L. Guo, S.H. Lahasky, K. Ghale, D. Zhang; *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9163–9171
- [116] H. Sun, J. Zhang, Q. Liu, L. Yu, J. Zhao; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6068–72
- [117] R.J. Simon, R.S. Kania, R.N. Zuckermann, V.D. Huebner, D.A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C.K. Marlowe, D.C. Spellmeyer, R. Tans, A.D. Frankel, D.V. Santi, F.E. Cohen, P.A. Bartlett; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9367
- [118] A.S. Culf, R.J. Ouellette; *Molecules* **2010**, 15, 5282–5335
- [119] J.H. Fessler, A.G. Ogston; *Trans. Faraday Soc.*, **1951**, 47, 667–679
- [120] M. Sisido, Y. Imanishi, T. Higashimura; *Biopolymers* **1972**, 11, 399–408
- [121] H. Tanisaka, S. Kizaka-Kondoh, A. Makino, S. Tanaka, M. Hiraoka, S. Kimura; *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 109–117

- [122] A. Makino, S. Kizaka-Kondoh, R. Yamahara, I. Hara, T. Kanzaki, E. Ozeki, M. Hiraoka, S. Kimura; *Biomaterials* **2009**, 30, 5156–5160
- [123] T. Kanzaki, Y. Horikawa, A. Makino, J. Sugiyama, S. Kimura; *Macromol. Biosci.* **2008**, 8, 1026–1033
- [124] A. Birke, D. Huesmann, A. Kelsch, M. Weilbacher, J. Xie, M. Bros, T. Bopp, C. Becker, K. Landfester, M. Barz; *Biomacromolecules* **2014**, 15, 548–557
- [125] K.H.A. Lau, C. Ren, T.S. Sileika, S. H. Park, I. Szleifer, P.B. Messersmith; *Langmuir* **2012**, 28, 16099–16107
- [126] S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhardt, M. Grunze; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9359–9366
- [127] S. Chen, L. Li, C. L. Boozer, S. Jiang; *Langmuir* **2000**, 16, 9287–9293
- [128] C. Passirani, J.-P. Benoit, *Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids*, CRC, Boca Raton, **2005**
- [129] S.I. Jeon, J.H. Lee, J.D. Andrade, P.G. de Gennes; *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 142, 149–158
- [130] S.I. Jeon, J.D. Andrade; *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 142, 159–166
- [131] K. Rausch, A. Reuter, K. Fischer, M. Schmidt; *Biomacromolecules* **2010**, 11, 2836–2839
- [132] E. Hara, M. Ueda, C.J. Kim, A. Makino, I. Hara, E. Ozeki, S. Kimura; *J. Pept. Sci.* **2014**, 20, 570–577
- [133] P.H. Maurer, D. Subrahmanyam, E. Katchalski, E.R. Blout; *J. Immunol.* **1959**, 83, 193–197
- [134] M. Sela; *Adv. Immunol.* **1966**, 5, 29–129
- [135] S.M. Miller, R.J. Simon, S. Ng, R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, W.H. Moos; *Drug Development Research* **1995**, 35, 20–32
- [136] S.M. Miller, R.J. Simon, S. Ng, R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, W.H. Moos; *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* **1994**, 4, 22, 2657–2662
- [137] G.D. Fasman, E.R. Blout; *Biopolymers* **1963**, 1, 99–109
- [138] D.H. Porter, R.J. Cook, C. Wagner; *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, 243, 2, 396–407
- [139] B.S. Berlett, E.R. Stadtman; *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 20313–20316
- [140] J. Ulbricht, R. Jordan, R. Luxenhofer; *Biomaterials* **2014**, 35, 4848–4861
- [141] T. Friedmann, R. Roblin; *Science* **1972**, 175, 4025, 949–955
- [142] M.K. Montgomery, S. Xu, A. Fire; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 15502–07
- [143] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl; *Nature* **2001**, 411, 494–498
- [144] B.E. Houk, R. Martin, G. Hochhaus, J.A. Hughes; *Pharm Res* **2001**, 18, 67–74
- [145] B.E. Houk, G. Hochhaus, J.A. Hughes; *AAPS PharmSci* **1999**, 1, 9
- [146] S. Nayak, R.W. Herzog; *Gene Therapy* **2010**, 17, 295–304

- [147] L. Biasco, C. Baricordi, A. Aiuti; *Molecular Therapy* **2012**, 20, 4, 709–716
- [148] S. Boeckle, E. Wagner; *AAPS J* **2006**, 8, 731–742
- [149] M.J. Vicent, H. Ringsdorf, R. Duncan; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, 61, 1117–1120
- [150] D. Schaffert, E. Wagner; *Gene Therapy* **2008** 15, 1131–1138
- [151] Shyh-Dar Li, Leaf Huang; *Journal of Controlled Release* **2007**, 123, 181–183
- [152] P. Caliceti, F.M. Veronese; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, 1261–1277
- [153] S.K. Hobbs, W.L. Monsky, F.Yuan et al.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1998**, 95, 4607–12
- [154] R.K. Jain, T. Stylianopoulos; *Nature Reviews Clinical Oncology* **2010**, 7, 653–664
- [155] S.H. Jang, M.G. Wientjes, D. Lu, J. L.-S. Au; *Pharmaceutical Research* **2003**, 20, 9, 1337–50
- [156] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori; *J. Control. Release* **2000**, 65, 271–284
- [157] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda; *Adv. Drug Deliv* **2011**, 63, 136–151
- [158] H. Maeda, Y. Matsumura; *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1989**, 6, 193 – 210
- [159] E.A. Azzopardi, E.L. Ferguson, D.W. Thomas; *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, 68, 257–274
- [160] R. Haag, F. Kratz; *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1218 – 1237
- [161] R. Langer; *Nature* **1998**, 392, 5 – 10
- [162] S.C. Kim, D.W. Kim, Y.H. Shim, J.S. Bang, H.S. Oha, S.W. Kimb, M.H. Seo; *J. Control. Release* **2001**, 72, 191–202
- [163] F. Zhao , Y. Zhao , Y. Liu , X. Chang , C. Chen , Y. Zhao; *small* **2011**, 7, 10, 1322–37
- [164] J. Gruenberg, F.G. van der Goot; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 495–504
- [165] A.K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H.J. Haisma; *J. Control. Release* **2011**, 151, 220–228
- [166] W. Gao, J.M. Chan, O.C. Farokhzad; *Molecular Pharmaceutics* **2010**, 7, 6, 1913–20
- [167] W. Liang, J.K.W. Lam; *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: "Molecular Regulation of Endocytosis"* **2012**
- [168] A.Z. Wang, R. Langer, O.C. Farokhzad; *Annu. Rev. Med.* **2012**. 63, 185–98
- [169] H. Pan, J. Yang, P. Kopeckova, J. Kopecek; *Biomacromolecules* **2011**, 12, 247–252
- [170] N.V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski; *Macromolecules* **2002**, 35, 9009–9014
- [171] H. Gemici, T.M. Legge, M. Whittaker, M.J. Monteiro, S. Perrier; *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2007**, 45, 11, 2334–40
- [172] B. Romberg, J.M. Metselaar, L. Baranyi, C.J. Snel, R. Bünger, W.E. Hennink, J. Szebeni, G. Storm; *Int. J. Pharm.* **2007**, 331, 186–189
- [173] C. Li, S. Wallace; *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, 60, 886–898
- [174] M. Männistö, S. Vanderkerken, V. Toncheva, M. Elomaa, M. Ruponen, E. Schacht, A. Urtti; *J. Control. Release* **2002**, 83, 169–182

- [175] D. Oupicky, M. Ogris, K.A. Howard, P.R. Dash, K. Ulbrich, L.W. Seymour; *Molecular Therapy* **2002**, 5, 4, 463-472
- [176] J. Hedrich, Y. Wu, S.L. Kuan, F. Kuehn, E. Pietrowski, M. Sahl, S. Muth, K.Müllen, H.J. Luhmann, T. Weil, M. Schmidt; *Adv. Polym. Sci.* **2014**, 260, 211-235
- [177] J.C. Middleton, A.J. Tipton; *Biomaterials* **2000**, 21, 2335-2346
- [178] K. Osada, K. Kataoka; *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 202, 113-153
- [179] J. A. Champion, S. Mitragotri; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 4930-4934
- [180] P. Zhao, L. Liu, X. Feng, C. Wang, X. Shuai, Y. Cheng; *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, 33, 1351-1355
- [181] J.A. Johnson, Y.Y. Lu, A.O. Burts, Y. Xia, A.C. Durrell, D.A. Tirrell, R.H. Grubbs; *Macromolecules* **2010**, 43, 10326-10335
- [182] J. Bühler, S. Gietzen, A. Reuter, C. Kappel, K. Fischer, S. Decker, D. Schäffel, K. Koynov, M. Bros, I. Tubbe, S. Grabbe, M. Schmidt; *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 1-7
- [183] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh; *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Thieme, Stuttgart, **2005**
- [184] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber; *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930
- [185] Bundesanstalt für Materialforschung- und prüfung (12.09.2014):
http://www.nike.bam.de/de/nike_bilder/methoden_afm_2_270.jpg
- [186] S. Mori, H.G. Barth: *Size Exclusion Chromatography*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg **1999**
- [187] L. Lighezan, R. Georgieva, A. Neagu; *Physica Scripta* **2012**, 86, 35801
- [188] G.D. Fasman: *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York **1996**
- [189] Chemgapedia (9.11.2014):
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteindynamik/circulardichroismus.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteindynamik/cd2.vscml.html>
- [190] J.W.S. Rayleigh; *Philos. Mag.* **1899**, 47, 375
- [191] A. Einstein; *Ann. Phys.* **1910**, 33, 1275
- [192] P. Debye; *J. Phys. & Colloid. Chem.* **1910**, 51, 18
- [193] M. Smoluchowski; *Ann. Phys.* **1908**, 25, 205
- [194] N. Wiener; *Acta Math.* **1930**, 118
- [195] A. Khintchine; *Math. Ann.* **1934**, 109, 604
- [196] M. Schmidt: *Dynamic Light Scattering, 372nd edition*, W. Brown (Ed.), Clarendon Press, Oxford **1993**
- [197] W. Schärtl: *Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions: with 16 tables*, Springer, Berlin **2007**
- [198] G. L. Stahl, R. Walther, C. W. Smith; *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2285
- [199] A. Favier, M.-T. Charreyre; *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, 27, 653-692

- [200] G. Moad, E. Rizzardo, S.H. Thang; *Polymer* **2008**, 49, 1079-1131
- [201] J. Skey, R.K. O'Reilly; *Chem. Commun.* **2008**, 4183-4185
- [202] A. Yaron, A. Berger, A., *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 69, 397
- [203] N. Greenfield, B. Davidson, G.D. Fasman; *Biochemistry* **1967**, 6, 6, 1630-37
- [204] J.R. Kramer, T.J. Deming; *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3668-3672
- [205] G.T. Hermanson: *Bioconjugate Techniques, 3rd Edition*; Academic Press **2013**
- [206] K.D. Janda, J.A. Ashley, T.M. Jones, D.A. McLeod, D.M. Schloeder, and M.I. Weinhouse; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 8886-88
- [207] C.D. Hein, X.-M. Liu, and D. Wang; *Pharm Res.* **2008**, 25, 2216-2230
- [208] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi; *Accounts of Chemical Research* **2011**, 44, 9, 666-676
- [209] J.E. Hudak, R.M. Barfield, G.W. de Hart, P. Grob, E. Nogales, C.R. Bertozzi, D. Rabuka; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 4161-4165
- [210] H.A. Staab; *Angew. Chem. internat. Edit.* **1962**, 1, 7, 351-367
- [211] E. Katchalski, M. Sela: *Synthesis and chemical properties of poly- α -amino acids*; *Advances in Protein Chemistry* **1953**, 13, 243-492
- [212] F. Hermes, K. Otte, J. Brandt, M. Gräwert, H.G. Börner, H. Schlaad; *Macromolecules* **2011**, 44, 7489-7492
- [213] A. Birke, *Diplomarbeit: Polypeptidic Polymer Architectures for the Transport of Bioactive Substances*, Mainz **2012**
- [214] M. Murata, T. Hara, K. Mori, M. Ooe, T. Mizugaki, K. Ebitani; K. Kaneda; *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 4981-4984
- [215] A. Fruth, M. Klapper, and K. Müllen; *Macromolecules* **2010**, 43, 467-472
- [216] Sergei S. Sheiko, Frank C. Sun, Adrian Randall, David Shirvanyants, Michael Rubinstein, Hyung-il Lee, Krzysztof Matyjaszewski; *Nature* **2006**, 440, 191-194
- [217] Z. Zheng, M. Müllner, J. Ling, A.H.E. Müller; *ACS Nano* **2013**, 7, 3, 2284-2291
- [218] E. Peggion, A. Cosani, I. Terbojevich, G. Borin; *Biopolymers* **1972**, 11, 633-643
- [219] M.A. Dobrovolskaia, S.E. McNeil; *Nature Nanotechnology* **2**, 469 - 478 (**2007**)
- [220] S. Choksakulnimitr, S. Masuda, H. Tokuda, Y. Takakura, M. Hashida; *J. Control. Release* **1995**, 34, 233-241
- [221] D.M.L. Morgan, J. Clover, J.D. Pearson; *Journal of Cell Science* **1988**, 91, 231-238
- [222] A. Reuter, *Dissertation: Towards Antibody-mediated Targeting of Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy with Multivalent Polymer-Antigen Conjugates*; Mainz **2013**
- [223] R.M. Elder, T. Emrick, A. Jayaraman; *Biomacromolecules* **2011**, 12, 3870-3879
- [224] C.C. Fleischer and C.K. Payne; *Acc. Chem. Res.*, 47 (8), 2651-59
- [225] D.S. Poché, M.J. Moore, J.L. Bowles; *Synth. Commun.* **1999**, 29 (5), 843-854

12. Danksagung

Eine Arbeit in dieser Größe ist nie das Produkt einer einzelnen Person. Sie entsteht wie ein Mosaik aus vielen kleineren und größeren Steinen, die einem im Laufe der Zeit von anderen überreicht werden und die man in ein sinnvolles Muster zusammensetzt. Diese Steine können feurige Diskussionen, Hilfestellungen, Anregungen, Trost, der Glaube, dass man es schafft oder einfach ein Lachen zum richtigen Zeitpunkt sein. Während meiner Dissertation sind mir viele Menschen begegnet, die mich reich mit solchen „Steinen“ beschenkt haben. Diesen Menschen möchte ich auf diesem Wege danken.