

Synthese und Charakterisierung von Polymeren mit peptidischen Seitenketten

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Désirée Weller

geboren in Ludwigsburg

Mainz, November 2013



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dekan:

[REDACTED]

1. Berichterstatter:

[REDACTED]

2. Berichterstatter:

[REDACTED]

Termin der mündlichen Verteidigung: 28.11.2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2010 bis November 2013 am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Betreuung von [REDACTED] [REDACTED] angefertigt.

Ich versichere, dass ich meine Doktorarbeit selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den 24.10.2013

Meiner Familie

Das Schönste, was wir entdecken können,
ist das Geheimnisvolle.

Albert Einstein

Zusammenfassung

Die Forschung im Bereich der Drug Delivery-Systeme konzentriert sich auf biokompatible und wenig immunogene Trägermoleküle. Eine Klasse vielversprechender Trägersysteme stellen Peptidbasierte Polymere dar, die neben einer hohen Biokompatibilität auch eine Sensitivität gegenüber externen Einflüssen aufweisen. Der zwitterionische Charakter von Aminosäuren und Peptiden verhindert die Adsorption von Serumproteinen und ein „antifouling“ Verhalten kann festgestellt werden, sodass diese Moleküle für den Einsatz als Wirkstoffträgersystem sehr geeignet scheinen. In Kombination mit einer bürstenartigen Struktur entstehen Systeme mit einer einzigartigen Peptidarchitektur, die sich durch eine hohe Dichte funktioneller Gruppen für Konjugationsreaktionen auszeichnen und deren formabhängige Zellaufnahme sie besonders attraktiv für die Anwendung als „Nanocarrier“ macht.

Das zwitterionische Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) ($M_w = 721,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) wurde durch freie radikalische Polymerisation dargestellt und seine Konformation in Abhängigkeit von Ionenstärke und pH-Wert untersucht. Die Biokompatibilität des Systems konnte durch Toxizitätstests und dynamische Lichtstreuung in humanem Blutserum nachgewiesen werden. Zusammen mit der vernachlässigbaren unspezifischen Aufnahme in dendritische Zellen aus Knochenmark erfüllt das System damit alle Bedingungen, die an ein polymeres Wirkstoffträgersystem gestellt werden. Darüber hinaus können Komplexe des Polymers mit DNA in Gegenwart von divalenten Metallionen für die Gentransfektion verwendet werden.

Durch Kopplung von ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin mit der Elastin-ähnlichen Polypeptid Pentasequenz Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin konnte ein Hexapeptid-Makromonomer dargestellt werden, welches anschließend mittels „grafting through“ Polymerisation zur Polymerbürste umgesetzt wurde. Die wurmartige Struktur der Polymerbürsten wurde in AFM-Aufnahmen gezeigt und eine hohe Kettensteifigkeit der Polymerbürsten über dynamische und statische Lichtstreuung nachgewiesen. Zirkulardichroismus-Messungen lieferten Informationen über struktur-, salz- und temperaturabhängige Veränderungen der Konformation. Toxizitätstests und dynamische Lichtstreuung in humanem Blutserum bestätigten die erwartete Biokompatibilität.

Basierend auf zwei Elastin-ähnlichen Polypeptiden mit ähnlicher Peptidsequenz wurden insgesamt vier unterschiedliche Makromonomere mit jeweils 20 Pentapeptid-Wiederholungseinheiten dargestellt. Über anschließende „grafting through“ Polymerisation entstanden molekulare Bürstenmoleküle mit variierenden externen funktionellen Gruppen, die für zukünftige Konjugationsreaktionen verwendet werden können. Der Einfluss von Ionenstärke und Temperatur auf die Konformation der Makromonomere und Polymere wurde mittels Zirkulardichroismus- und Trübungskurven-Messungen untersucht und ein starker Einfluss der hohen Seitenkettendichte auf das Verhalten der Polymerbürsten wurde festgestellt. Über dynamische Lichtstreuung konnte ein von den externen funktionellen Gruppen abhängiges Aggregationsverhalten in humanem Blutserum nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit synthetisierten Polymerbürsten mit peptidischen Seitenketten stellen damit biokompatible und vielversprechende Trägersysteme für die Konjugation mit Biomolekülen dar, die zukünftig als Drug Delivery-Systeme ihren Einsatz finden können.

Summary

In recent years the intensive research on new drug delivery systems enforced the demand for biocompatible, low immunogenic carrier systems suitable for conjugation of biologically active compounds. Peptide based polymers serve as good nanocarriers due to their high biocompatibility and sensitivity to environmental triggers. Since peptide based polymers comprising a zwitterionic character show antifouling properties and low protein adsorption from human blood, their application as nanocarrier systems is favorable.

The combination of a cylindrical polymer brush topology with the stimuli-responsive behavior of amino acids and peptides generates polymer brushes with unique polypeptide architecture and tunable physical properties with a high density of functional groups for conjugation reactions.

A zwitterionic poly- ϵ -N-methacryloyl-L-lysine ($M_w = 721,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) was synthesized and the ionic strength and pH dependent conformational properties were studied. The low cell toxicity and dynamic light scattering studies in human blood serum revealed the biocompatibility of the system. Together with a negligible unspecific cellular uptake, the zwitterionic polymer exhibits properties fundamental for the application as nanocarrier for immunotherapy in cancer treatment. Furthermore complexes of the polymer with DNA and divalent metal ions can be used for gene transfection.

A macromonomer comprising a zwitterionic elastin-like polypeptide (ELP) was successfully synthesized by coupling the ϵ -N-methacryloyl-L-lysine monomer to the ELP pentapeptide repeat unit Valine-Proline-Glycine-Glycine-Glycine. High molecular weight cylindrical polymer brushes were obtained by free radical polymerization of the hexapeptide macromonomers via "grafting through", which were demonstrated to exhibit a high chain stiffness as revealed by static and dynamic light scattering and AFM. Structural, salt and temperature dependent conformational changes were determined via CD spectroscopy and turbidity measurements. The expected biocompatibility of the system was shown by toxicity studies and dynamic light scattering experiments in human blood serum.

Based on two similar elastin-like polypeptides with each 20 pentapeptide repeating units, four distinct macromonomers were synthesized. Subsequent "grafting through" polymerization of the macromonomers afforded polymer brushes with varying external functional groups suitable for further conjugation experiments. The influence of salt and temperature on the conformation of the

macromonomers and polymers was studied via CD spectroscopy, turbidity measurements and light scattering demonstrating the impact of the locally high ELP concentration in the brush molecules. Dynamic light scattering of the polymer brushes in human blood serum showed the strong influence of the external groups on the aggregation formation with serum proteins.

Hence, the synthesized polymer brushes with peptide based side chains represent biocompatible and promising nanocarriers which are suitable for application in drug delivery.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	3
2 Theoretischer Hintergrund	7
2.1 Zylindrische Polymerbürsten	7
2.1.1 Synthesestrategien zur Darstellung von Polymerbürsten	8
2.1.2 Zylindrische Polypeptidbürsten	12
2.1.3 Polymerbürsten als Drug Delivery-Systeme.....	13
2.2 Zwitterionische Polymere und Polybetaine.....	16
2.2.1 Zwitterionen für die Gentransfektion.....	19
2.3 Elastin-ähnliche Polypeptide	20
2.3.1 Elastin.....	20
2.3.2 Molekulare und supramolekulare Strukturen von Elastin-ähnlichen Polypeptiden.....	21
2.3.3 Phasenübergangsverhalten der Elastin-ähnlichen Polypeptide.....	24
2.3.4 Gentechnische Darstellung, Expression und Aufreinigung von Elastin-ähnlichen Polypeptiden	25
2.3.5 Biomedizinische Anwendungsbereiche von Elastin-ähnlichen Polypeptiden.....	28
2.3.6 Polymere mit Elastinseitenketten.....	30
3 Charakterisierungsmethoden	39
3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie.....	39
3.2 Gelpermeationschromatografie	41
3.3 Lichtstreuung.....	42
3.4 Zirkulardichroismus.....	51
3.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	53
3.6 Rasterkraftmikroskopie	54

4 Ergebnisse und Diskussion	59
4.1 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)	59
4.1.1 Synthese und Farbstoffmarkierung mit Alexa Fluor 488	60
4.1.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts	63
4.1.3 Konformationsänderungen in Abhängigkeit von Ionenstärke und pH-Wert	64
4.1.4 Biokompatibilität	70
4.1.4.1 Toxizitätstests	70
4.1.4.2 Aggregationsverhalten in humanem Blutserum	71
4.1.5 Mögliche Anwendungen in biologischen Systemen	72
4.1.5.1 Zellaufnahmestudien	73
4.1.5.2 Komplexierungsexperimente	74
4.1.6 Zusammenfassung von Kapitel 4.1	76
4.2 Polymerbürsten mit ELP basierten Hexapeptidseitenketten	77
4.2.1 Synthese und Charakterisierung	78
4.2.2 Phasenübergangsverhalten	88
4.2.3 Charakterisierung der Sekundärstrukturen mittels CD-Spektroskopie	89
4.2.4 Biokompatibilität	92
4.2.4.1 Toxizitätstests	93
4.2.4.2 Aggregationsverhalten in humanem Blutserum	93
4.2.5 Zusammenfassung von Kapitel 4.2	95
4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten	96
4.3.1 Synthese und Charakterisierung von Elastin-ähnlichen Polypeptiden	97
4.3.2 Synthese und Charakterisierung von Poly-(MA-ELP)	99
4.3.2.1 Phasenübergangsverhalten und Konformationsänderungen in Abhängigkeit von Ionenstärke und Temperatur	102
4.3.3 Synthese und Charakterisierung von Poly-(MA-ELP-PEG ₆ -N ₃)	106
4.3.3.1 Phasenübergangsverhalten	110
4.3.4 Synthese und Charakterisierung von Poly-(N-Acetyl-ELP-C ₃ -MA)	111
4.3.4.1 Phasenübergangsverhalten	114
4.3.5 Synthese und Charakterisierung von MA-ELP-Lys	115
4.3.6 Charakterisierung der Sekundärstrukturen mittels CD-Spektroskopie	117
4.3.7 Aggregationsverhalten in humanem Blutserum	123
4.3.8 Zusammenfassung von Kapitel 4.3	125

5 Zusammenfassung	129
6 Experimenteller Teil.....	133
6.1 Chemikalien	133
6.2 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin).....	134
6.2.1 ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Kupfer-Komplex	134
6.2.2 ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin	134
6.2.3 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin).....	135
6.2.4 Alexa Fluor 488 Markierung von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin).....	136
6.3 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(H_3N^+ - ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin- Glycin-Glycin-Glycin-COO $^-$)	137
6.3.1 Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin.....	137
6.3.2 Boc-Gly-Gly-Gly-OEt	137
6.3.3 HCOO $\cdot H_3N^+$ -Gly-Gly-Gly-OEt.....	138
6.3.4 Boc-Val-Pro-OMe	139
6.3.5 Boc-Val-Pro-OH.....	139
6.3.6 Boc-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt.....	140
6.3.7 HCOO $\cdot H_3N^+$ -Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt	140
6.3.8 Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COOEt	141
6.3.9 Poly-(Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COOEt)	141
6.3.10 Poly-(H_3N^+ - ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COO $^-$)	142
6.4 ELP-Synthese und Aufreinigung.....	143
6.4.1 Modifizierung des Vektors pET-24(+) für die PRe-RDL	143
6.4.2 Monomer Gensynthese	144
6.4.3 Concatemerisierung	144
6.4.4 ELP-Vektor Konstrukte.....	145
6.4.5 ELP-Expression.....	146
6.4.6 ELP-Aufreinigung	146
6.5 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(MA-ELP)	147
6.5.1 N-Hydroxysuccinimidester der Methacrylsäure	147
6.5.2 MA-ELP.....	148
6.5.3 Poly-(MA-ELP)	148
6.6 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(MA-ELP-PEG $_6$ -N $_3$).....	150
6.6.1 MA-ELP-PEG $_6$ -N $_3$	150
6.6.2 Poly-(MA-ELP-PEG $_6$ -N $_3$)	150

6.7 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(N-Acetyl-ELP-C ₃ -MA)	151
6.7.1 N-Hydroxysuccinimidester des Acetylchlorids.....	151
6.7.2 N-Acetyl-ELP.....	152
6.7.3 N-(2-Methacryloyl)-1,3-diaminopropan*HCl	152
6.7.4 N-Acetyl-ELP-C ₃ -MA.....	153
6.7.5 Poly-(N-Acetyl-ELP-C ₃ -MA)	153
6.8 Darstellung von MA-ELP-Lys	154
6.9 Verwendete Geräte und Methoden	155
6.9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie	155
6.9.2 Gelpermeationschromatografie.....	156
6.9.3 Lichtstreuung.....	156
6.9.4 NMR-Spektroskopie.....	159
6.9.5 IR-Spektroskopie	159
6.9.6 Trübungskurven.....	159
6.9.7 UV-VIS-Messungen.....	159
6.9.8 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	160
6.9.9 Zirkulardichroismus	160
6.9.10 ESI-TOF-Massenspektrometrie	160
6.9.11 MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	160
6.9.12 Rasterkraftmikroskopie	161
6.9.13 Konfokalmikroskopie.....	161
6.9.14 Isoelektrische Fokussierung	162
6.9.15 Zeta-Potential-Messungen.....	163
6.9.16 Kapillarelektrophorese.....	163
6.9.17 Toxizitätstests	163
7 Anhang	167
Abkürzungsverzeichnis	188

1 Einleitung

Für die effektive Behandlung von Krebserkrankungen muss die Forschung an Drug Delivery-Systemen für die gezielte Abgabe von Wirkstoffmolekülen in Tumorzellen weiter vorangetrieben werden [1]. Bereits um 1980 wurde von Ringsdorf und Kopecek das Modell des Polymer basierten Wirkstoffträgers[2],[3] etabliert, bei dem zytotoxische Wirkstoffmoleküle an ein wasserlösliches Polymer gebunden werden um eine verminderte Toxizität, eine erhöhte Zirkulationszeit im Körper und Tumorgewebe und eine verbesserte Löslichkeit des Wirkstoffs zu garantieren. Für die Verwendung im menschlichen Körper muss das Polymer-Trägersystem jedoch gewisse Voraussetzungen erfüllen: Neben einer hohen Biokompatibilität und effizienter Wirkstoffkopplung ist eine gezielte Adressierung durch den sogenannten „Nanocarrier“ im Körper wesentlich.

Zu klinisch relevanten und etablierten „Nanocarrier“-Systemen gehören, neben den hier im Fokus stehenden Polymerkonjugaten, Liposomen, Mizellen, Proteine und Antikörper, welche zum Teil bioabbaubar sind [1],[4],[5]. Vor allem Poly-(Aminosäuren), die aufgrund des „Stealth Effect“ nicht zur Auslösung einer Immunreaktion im Körper führen sind vielversprechende Trägersysteme. Zwitterionische Aminosäuren und Proteine besitzen wie synthetische hydrophile Materialien „low-fouling“ oder „nonfouling“ Eigenschaften und finden vor allem im biomedizinischen Bereich, beispielsweise in Implantaten und Biosensoren[6],[7] ihren Einsatz. Durch die verminderte Protein Adsorption oder Adhäsion von Zellen und Bakterien an zwitterionische Oberflächen werden weniger Entzündungs- und Immunreaktionen im Körper ausgelöst. Fortschritte im Bereich der gentechnischen Darstellung ermöglichen die Herstellung von Proteinen mit genau definierter Aminosäuresequenz für die Anwendung im medizinischen Bereich [1]. Zu dieser neuen Klasse von Peptid basierten Biopolymeren gehören auch die Elastin-ähnlichen Polypeptide (ELPs), die sich als intrinsisch biokompatible Materialien vor allem durch ihr „Lower Critical Solution Temperature“ (LCST)-Verhalten auszeichnen [8]-[11]. Durch Variationen in der Aminosäuresequenz können maßgeschneidert geladene Proteine oder Proteine mit funktionellen Gruppen für Konjugationsreaktionen dargestellt werden [12],[13].

1.1 Zielsetzung

Neben der chemischen Struktur haben auch die Größe, die Form und die Oberflächenbeschaffenheit eines Trägersystems großen Einfluss auf seine Effektivität [14]. Synthetisch zugänglich sind neben den linearen Polymeren auch verzweigte oder gepfropfte Polymere, sternförmige Moleküle sowie Dendrimere und kammförmige Polymere, die sich durch eine höhere Oberflächenfunktionalität auszeichnen. Zu den auch in der Natur vorkommenden Molekülarchitekturen zählt die Bürstenkonformation, deren funktionelle Eigenschaft sich auf die hohe Seitenkettendichte zurückführen lässt. Die Konformation und das physikalische Verhalten dieser synthetischen Bürsten können meist reversibel durch externe Stimuli wie Temperatur, pH-Wert und Licht beeinflusst werden [15]. Molekulare Bürsten weisen eine gestreckte, wurmartige Struktur auf, sodass, wie für stäbchenförmige Strukturen bereits bekannt neben einer erhöhten Tumoraufnahme auch eine längere Blutzirkulationszeit erwartet werden kann [16]. Der Einsatz dieser Systeme, beispielsweise in der Krebsimmuntherapie als „Nanocarrier“ wird durch die Vielzahl an externen funktionellen Gruppen, welche eine ideale Plattform für Konjugationsreaktionen mit Bio- oder Wirkstoffmolekülen darstellen möglich.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist es Polymerbürstenstrukturen mit Aminosäure bzw. Peptid basierten Seitenketten synthetisch darzustellen, zu charakterisieren und ihren Einsatz für biomedizinische Anwendungen zu untersuchen.

Ausgehend von einer einzelnen Aminosäure soll die Seitenkettenlänge der Polymerbürsten bis auf 100 Aminosäuren erhöht werden. Als Basis für die Peptidsequenz wird die Wiederholungseinheit der Elastin-ähnlichen Polypeptide (ELP) mit (Valin-Prolin-Glycin-X-Glycin)_m gewählt, bei der X für jede Aminosäure außer Prolin steht und m die Anzahl der Wiederholungseinheiten angibt [17]. Aus den jeweiligen Aminosäuren oder Peptiden sollen durch die Einführung einer Methacrylamidgruppe die entsprechenden Makromonomere dargestellt werden, deren Umsetzung zu Polymerbürsten anschließend im wässrigen Medium mittels der „grafting through“ Methode erfolgt. Die dargestellten molekularen Bürsten besitzen somit ein Poly-(Methacrylamid)-Rückgrat und peptidische Seitenketten.

Als kleinste Seitenketteneinheit wird die Aminosäure Lysin verwendet, die über die Einführung einer Methacrylamidgruppe an der ε-Aminogruppe den zwitterionischen Charakter von Aminosäuren beibehält. Auch für das entsprechende Polymer sind im neutralen pH-Bereich zwitterionische Seitenketten zu erwarten. An diesem System soll der Einfluss von externen Stimuli wie Ionenstärke und pH-Wert auf die Polymerkonformation untersucht werden. Zudem wird der Einsatz des Polymers im biomedizinischen Bereich, als Transfektionsagens und als Wirkstoffträgersystem im Fokus stehen.

Durch Kopplung des Lysin-Monomers mit der hydrophoben Pentasequenz des Elastins wird ein Hexapeptid-Makromonomer hergestellt, welches durch freie radikalische Polymerisation zur Polymerbürste Poly-(ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin) umgesetzt werden soll. Eine zwitterionische und dadurch biokompatible Polymerbürste mit Hexapeptidseitenketten kann durch Abspaltung der Schutzgruppen dargestellt werden.

Über das Modellmonomer hinaus ist die Darstellung von Makromonomeren aus größeren Elastin-ähnlichen Polypeptiden mit der Sequenz (Valin-Prolin-Glycin-Valin-

1.1 Zielsetzung

Glycin)₂₀ das Ziel dieser Arbeit. Diese sollen ebenfalls mittels „grafting through“ Polymerisation zu den entsprechenden Polymerbürsten mit unterschiedlichen endständigen funktionellen Gruppen umgesetzt werden. Die hohe Dichte an externen funktionellen Gruppen kann für zukünftige Konjugationsreaktionen mit Wirkstoffmolekülen genutzt werden und ihr Einfluss auf das Aggregationsverhalten in humanem Blutserum soll untersucht werden.

Die synthetisch dargestellten Polymere sollen mittels dynamischer und statischer Lichtstreuung, AFM, CD-Spektroskopie, auch in Abhängigkeit von externen Einflüssen untersucht werden. Das thermoresponsive Verhalten soll neben dynamischer Lichtstreuung auch über UV-VIS-Spektroskopie verfolgt werden. Die Biokompatibilität und das Aggregationsverhalten in humanem Blutserum der Systeme werden untersucht, um ihre mögliche Anwendung als Wirkstoff-Trägersystem im menschlichen Körper zu evaluieren.

Literatur zu Kapitel 1:

- [1] Y. Zhang, H. F. Chan, K. W. Leong, *Advanced Drug Delivery: Perspectives and Prospects* 2013, 65, 104–120.
- [2] H. Bader, H. Ringsdorf, B. Schmidt, *Angew. Makromol. Chem.* 1984, 123, 457–485.
- [3] N. Peppas, R. Langer, Eds., *Biopolymers II*, Springer Berlin Heidelberg. 1995.
- [4] T. Lammers, *A Position Paper and Commentaries on More effective advanced drug delivery systems* 2013, 454, 527–529.
- [5] K. W. Leong, R. Langer, *Immunoliposomes in Vivo* 1988, 1, 199–233.
- [6] W. Yang, H. Xue, L. R. Carr, J. Wang, S. Jiang, *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 26, 2454–2459.
- [7] B. D. Ratner, S. J. Bryant, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2004, 6, 41–75.
- [8] L. Debelle, A. M. Tamburro, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999, 31, 261–272.
- [9] J. C. Rodríguez-Cabello, L. Martín, M. Alonso, F. J. Arias, A. M. Testera, *Polymer* 2009, 50, 5159–5169.
- [10] S. R. MacEwan, A. Chilkoti, *Biopolymers* 2010, 94, 60–77.
- [11] A. M. Tamburro, *Nanomedicine* 2009, 4, 469–487.
- [12] J. R. McDaniel, J. Bhattacharyya, K. B. Vargo, W. Hassouneh, D. A. Hammer, A. Chilkoti, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, n/a.
- [13] M. R. Dreher, D. Raucher, N. Balu, O. Michael Colvin, S. M. Ludeman, A. Chilkoti, *Proceedings of the Second International Symposium on Tumor Targeted Delivery Systems* 2003, 91, 31–43.
- [14] M. E. Fox, F. C. Szoka, J. M. J. Fréchet, *Acc. Chem. Res.* 2009, 42, 1141–1151.
- [15] H.-I. Lee, J. Pietrasik, S. S. Sheiko, K. Matyjaszewski, *Special Issue on Stimuli-Responsive Materials* 2010, 35, 24–44.
- [16] S. Cai, K. Vijayan, D. Cheng, E. M. Lima, D. E. Discher, *Pharm Res.* 2007, 24, 2099–2109.
- [17] D. W. Urry, *J. Phys. Chem. B.* 1997, 101, 11007–11028.

2 Theoretischer Hintergrund

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Polymere vereint ihr grundlegender Aufbau: Auf einem Poly-(Methacrylamid)-Rückgrat basierend besitzen sie Seitenketten, die aus zwitterionischen Aminosäuren aufgebaut sind. Ausgehend von einem Lysin basierten zwitterionischem Polymer ist es das Ziel dieser Arbeit auch den Übergang zu Bürstenmolekülen mit zwitterionischen Seitenketten zu realisieren. Im folgenden Kapitel wird zuerst ein Überblick über die Eigenschaften und verschiedenen Synthesestrategien von zylindrischen Polymerbürsten und deren Einsatz als Drug Delivery-Systeme gegeben. Anschließend wird der Fokus auf die Eigenschaften der Seitenketten gelegt, es folgen Einführungen in zwitterionische Polymere und Elastin-ähnliche Polypeptide.

2.1 Zylindrische Polymerbürsten

Das synthetische Pendant zu den in der Natur vorkommenden Proteoglykanen stellen die zylindrischen molekularen Bürsten dar, die abhängig von der Verzweigungsdichte auch als molekulare Flaschenbürsten bezeichnet werden [1]-[3]. Eine zylindrische Form bildet sich aus, wenn die Hauptkette der Polymerbürste deutlich länger ist als die Seitenketten. Der Aufbau molekularer Bürsten ist dabei sehr variabel: Seitenketten und Rückgrat können steif oder flexibel sein und es kann sich um Homo- oder Copolymere handeln.

Durch die veränderte Struktur und den komplexen Aufbau der Bürstenpolymere ergeben sich im Vergleich zu linearen Polymeren einzigartige Eigenschaften. Den stärksten Effekt auf die Konformation der Bürste übt die hohe Pfropfungsdichte der Seitenketten aus. Sterische Repulsion der dicht sitzenden Seitenketten bedingt eine große Steifheit des Polymerrückgrats, sodass im Allgemeinen die Kuhnlänge für Bürstenpolymere im Vergleich zum reinen Polymerrückgrat deutlich erhöht ist und die Hauptkette eine ausgedehnte wurmartige Konformation annimmt. Durch die Abstoßung der Seitenketten befinden sich die Seitenkettenenden näher an der Oberfläche der Polymerbürsten, wodurch eine relativ hohe Dichte an leicht zugänglichen Kettenenden für mögliche anschließende Funktionalisierungsreaktionen entsteht [4].

Die Konformation der Polymerbürsten kann durch externe Einflüssen wie Temperatur,

2.1 Zylindrische Polymerbürsten

Ionenstärke und pH-Wert beeinflusst werden [5]. Die Konformationsänderungen finden im Einzelmolekül statt und können durch AFM-Aufnahmen nachgewiesen werden. Von Schmidt et al.[6] konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich wurmartige molekulare Bürsten mit temperatursensitiven PNIPAM Seitenketten bei Erwärmung über ihre LCST in kugelförmige Strukturen umlagern. Andere Stimuli-responsive Polymere, z.B. Poly-(Aminosäuren) sind für praktische Anwendungen, wie beispielsweise als Sensoren[7] oder Drug Delivery-Systeme[8], interessant.

2.1.1 Synthesestrategien zur Darstellung von Polymerbürsten

Abbildung 2 - 1 zeigt die drei unterschiedlichen Synthesestrategien über die zylindrische Polymerbürsten dargestellt werden können: Das ist a) die „grafting through“ Polymerisation von Makromonomeren, b) die „grafting onto“ Addition von Seitenketten an die Polymerhauptkette und c) die „grafting from“ Polymerisation der Seitenketten an das Makroinitiatorrückgrat [1],[2],[9],[10]. Die mittels dieser Methoden synthetisierten Polymerbürsten unterscheiden sich in der Pfropfungsdichte und Einheitlichkeit der Seitenketten sowie der Seitenkettenlänge. Die verschiedenen Synthesestrategien bedienen sich unterschiedlichster Polymerisationstechniken, wie ionischer Polymerisation[11]-[13], Ringöffnungspolymerisation[14] (ROMP, ROP) sowie freier und kontrollierter radikalischer Polymerisation [15]-[18].

Die in dieser Arbeit synthetisierten zylindrischen Polymerbürsten mit Peptidseitenketten werden mittels der „grafting through“ Methode durch freie radikalische Polymerisation der entsprechenden Makromonomere dargestellt.

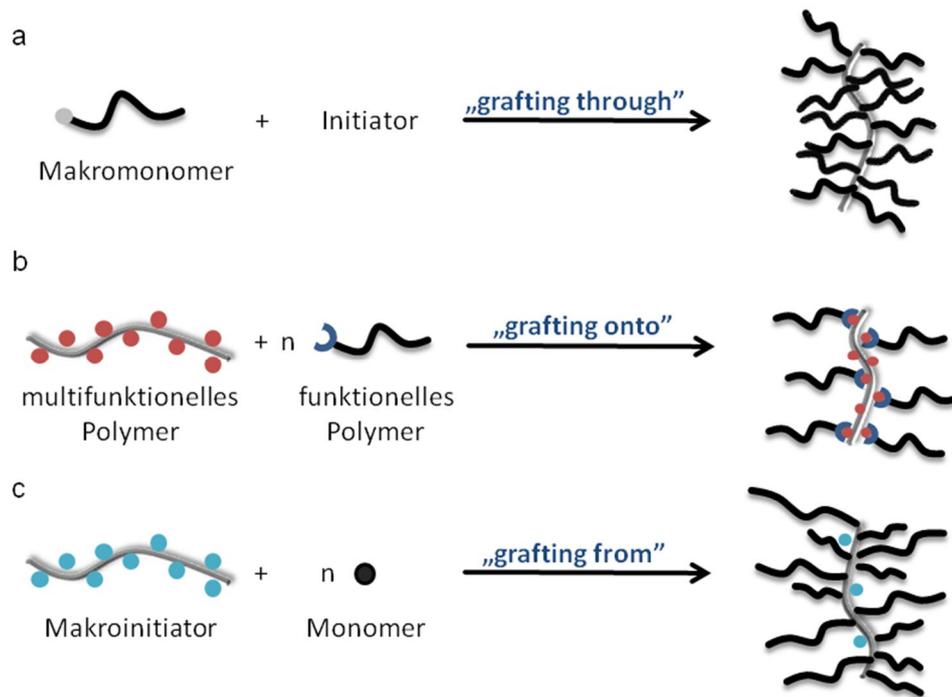


Abbildung 2 - 1: Synthesestrategien zur Darstellung von zylindrischen Polymerbürsten: a) „grafting through“ Polymerisation von Makromonomeren, b) „grafting onto“ Addition von Seitenketten an die Polymerhauptkette und c) „grafting from“ Polymerisation der Seitenketten an das Makroinitiator-Rückgrat.

„Grafting Through“

Die Homo- oder Copolymerisation von Makromonomeren ermöglicht die Darstellung von Polymerbürsten mit je einer kovalent gebundenen Seitenkette pro Hauptkettenwiederholungseinheit. Als Makromonomere werden Oligomere oder Polymere bezeichnet, die eine polymerisierbare Gruppe tragen und vollständig hinsichtlich Molmasse und Verteilung sowie Endgruppenfunktionalität charakterisiert werden können. In der anschließenden Polymerisation dieser Makromonomere werden molekulare Bürsten mit definierter Seitenkettendichte und Seitenkettenlänge erhalten. Aufgrund der niedrigen Konzentration an polymerisierbaren Endgruppen und der hohen sterischen Behinderung des wachsenden Kettenendes sind die Polymerisationen meist langsam und führen nicht zu hohen Umsätzen. Polymere, deren Polymerisationsgrad der Hauptkette deutlich größer ist als der der Seitenkette, werden durch Polymerisationen aus hoch konzentrierten Makromonomerlösungen erhalten [19]-[24].

Mittels „grafting through“ synthetisierte Polymerbürsten werden meist durch freie radikalische Polymerisation von Makromonomeren dargestellt [21],[25]-[27]. Als

2.1 Zylindrische Polymerbürsten

Nachteile der freien radikalischen Polymerisation sind die schlechte Kontrollierbarkeit der Polymerhauptkettenlänge und die unvollständige Umsetzung des Makromonomers zu sehen. Kontrollierte radikalische Polymerisationsmethoden, wie ATRP[28]-[30] und RAFT[31] ermöglichen die Synthese von molekularen Bürsten mit definiertem Hauptkettenpolymerisationsgrad. Allerdings führen diese Methoden, abhängig von der Makromonomergröße und -geometrie meist nur zu niedrigen Polymerisationsgraden und damit nur zu eher sphärischen Strukturen.

Darstellung der Polymerbürsten durch anionische Polymerisation bedingt hochreine Makromonomere und führt in den meisten Fällen zu Polymerbürsten mit geringem Molekulargewicht, sodass die Produkte eher sternförmigen Molekülen als zylindrischen Bürsten gleichen [32].

Durch Aufhebung der Ringspannung und durch den entstehenden relativ großen Abstand zwischen den Seitenketten ist es jedoch möglich Bürstenpolymere mit höheren Polymerisationsgraden durch Ringöffnungspolymerisation von Makromonomeren mit Oxazolin-[33] oder Norbornylgruppen[34] darzustellen. Allerdings führt die Polymerisation bei Ersteren zur 1,4 und bei Letzteren sogar nur zur 1,6 bzw. 1,7 Positionierung der Seitenketten, sodass im Vergleich zur 1,3 Positionierung bei den Vinylmakromonomeren eine weniger ausgeprägte Formpersistenz und Kettensteifigkeit zu erwarten ist.

„Grafting Onto“

Bei dieser Methode werden das Polymerrückgrat und die Seitenketten der Polymerbürste getrennt voneinander mittels verschiedenster Polymerisationstechniken synthetisiert und anschließend über ihre jeweiligen funktionellen Gruppen miteinander verknüpft. Die Polydispersität der Haupt- und Seitenkette können beide kontrolliert werden, was ein Vorteil gegenüber den anderen Darstellungsmethoden ist. Der Pfropfungsgrad überschreitet allerdings selten 50 Prozent, da aus kinetischen und thermodynamischen Gründen die „grafting density“ der Polymerbürsten häufig sehr gering wird. Die zunehmende Pfropfungsdichte während der Kopplung und die damit verbundene zunehmende sterischen Hinderung, ebenso wie der abnehmende osmotische Gradient der Segmente mit zunehmendem Pfropfungsgrad, verringert die Diffusion der endgruppenreaktiven Seitenketten zu den reaktiven Gruppen an der Hauptkette. Des Weiteren ist die Kopplung von Seitenketten an eine Bürste mit einer hohen Pfropfdichte entropisch ungünstig, da die Konformation der Hauptkette vom

statistischen Knäuel zu einer eher gestreckten Konformation übergehen muss. Um eine hohe „grafting density“ zu erhalten, muss deshalb ein großer Überschuss an Seitenkettenmolekülen eingesetzt werden, was jedoch die Aufreinigung erschwert. Nur sehr effektive Reaktionen, wie nukleophile Substitutionen[35] (mit nahezu 100-prozentigem Umsatz) oder „click“-Reaktionen[36],[37] werden für die Kopplung verwendet. Neben der Verknüpfung über kovalente Bindungen können die Polymerbürsten auch durch sekundäre Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen[38]-[40] oder ionische Wechselwirkungen[41] aufgebaut werden.

„Grafting From“

Die „grafting from“ Synthese von molekularen Bürsten beginnt mit der Darstellung des Polymerrückgrats (Makroinitiator), welches eine festgelegte Anzahl an Initiierungsstellen für die anschließende Polymerisation der Seitenketten trägt. Der Makroinitiator kann direkt oder als Vorläufermolekül, das anschließend mit Initiatorgruppen funktionalisiert wird hergestellt werden. Sowohl das Polymerrückgrat als auch die Seitenketten können durch verschiedene Polymerisationsmethoden dargestellt werden. Acrylat-, Methacrylat- oder Acrylamidmonomere werden meist durch ATRP vom Makroinitiator polymerisiert [9]. Die ringöffnende Polymerisation der Leuchs'schen Anhydride wird durch die Aminofunktionalitäten am Makroinitiator initiiert [25],[42].

Verglichen mit der „grafting through“ Methode ist die Kontrolle über die Seitenkettenlänge und „grafting density“ eingeschränkt. Je nach Technik können Pfropfungsdichten zwischen 30-90 Prozent erreicht werden [43],[44]. Zudem können die Seitenketten bezüglich ihrer mittleren Länge nicht unabhängig charakterisiert werden. Dies ist nur möglich, wenn die Pfropfungsdichte, das Molekulargewicht und die mittlere Anzahl der Monomereinheiten des Rückgrats unabhängig bestimmt werden können.

2.1.2 Zylindrische Polypeptidbürsten

Im Gegensatz zu zylindrischen Polymerbürsten mit synthetischen Seitenketten gibt es nur wenige Arbeiten zu molekularen Bürsten mit Polypeptidseitenketten [25],[28],[31],[45]-[49]. Häufig wird zur Darstellung von zylindrischen Polypeptidbürsten die „grafting from“ Methode verwendet: Die Peptidseitenketten werden durch Ringöffnungspolymerisation der Leuch'schen Anhydride an den Aminofunktionalisierten Makroinitiator anpolymerisiert [45],[46],[48]. Alternativ können Polypeptid-Makromonomere mittels „grafting through“ zu makromolekularen Bürsten umgesetzt werden [20],[25],[28],[31],[49].

Die Bürstenkonformation kann durch die Eigenschaften der Peptidseitenketten beeinflusst werden: Die Sekundärstruktur der Peptidseitenketten (z.B. „random coil“ vs. Helix) kann die Konformation der Hauptkette bestimmen, zudem kann eine Strukturveränderung der relativ steifen peptidischen Seitenketten durch Veränderungen der Ionenstärke, des pH-Werts und der Temperatur eine Konformationsänderung der Bürste bedingen [50]. CD-Messungen zeigen, dass durch Zusatz von Natriumperchlorat zu einer wässrigen Lösung von Polymerbürsten mit Poly-(L-Lysin) Seitenketten der Übergang von einer „random coil“ Struktur in eine α -Helix für die Seitenketten induziert wird, die Konformation des Polymerrückgrats wird durch diese Strukturveränderung jedoch nicht beeinflusst [45].

Abbildung 2 - 2 zeigt jedoch, dass die Komplexbildung dieser Polymerbürsten mit SDS zur Ausbildung einer Helixkonformation der Hauptkette führt [51].

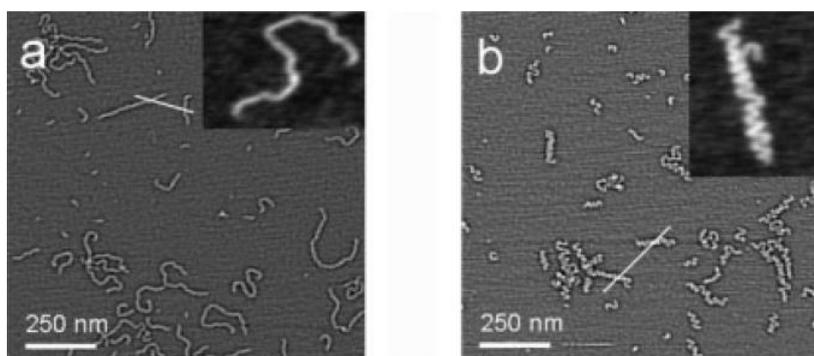


Abbildung 2 - 2: AFM-Höhenaufnahmen von a) zylindrischen Poly-(L-Lysin) Bürsten und b) Poly-(L-Lysin) Bürsten-SDS-Komplexen [51].

Die positiv geladenen Poly-(L-Lysin) Bürsten können negativ geladene DNA-Moleküle komplexieren und stellen damit potenzielle Kandidaten für die Verwendung in der Gentransfektion dar.

In Kapitel 2.3.6 wird genauer auf die Synthese und Eigenschaften von Polymeren mit Elastin basierten Seitenketten[28],[31],[49] eingegangen.

2.1.3 Polymerbürsten als Drug Delivery-Systeme

Während einer Chemotherapie kann aufgrund der Vielzahl an Nebenwirkungen nur eine bestimmte Dosis an Zytostatika verabreicht werden. Um diese Nebenwirkungen reduzieren und höhere Dosen an Zytostatika verabreichen zu können, muss die Pharmakokinetik von Wirkstoffmolekülen verbessert werden. Aus diesem Grund wurde um 1980 von Ringsdorf und Kopecek das Modell des Polymer basierten Wirkstoffträgers[52],[53] etabliert, bei dem zytotoxische Wirkstoffmoleküle über mehr oder weniger labile Bindungen an ein wasserlösliches Polymer gebunden werden. Das Polymer-Wirkstoff-Konjugat zeigt im Vergleich zum reinen Wirkstoff eine verminderte Toxizität, eine erhöhte Zirkulationszeit im Körper und Tumorgewebe und verbessert zudem die Wirkstofflöslichkeit. Grundlage für die beiden ersteren Phänomene ist die verringerte renale Ausscheidung von Makromolekülen (es gilt die Daumenregel: nur Moleküle kleiner als 40 kDa werden renal eliminiert) und ihr „enhanced permeation and retention“ [54] (EPR)-Effekt. Da der Porendurchmesser von Tumorblutgefäßen mit 40-80 nm deutlich größer als bei gesundem Gewebe (Porendurchmesser des Endothels: 2-6 nm) ist und zudem kein lymphatisches System im Tumorgewebe vorhanden ist, können Makromoleküle in das Tumorgewebe diffundieren ohne über das lymphatische System eliminiert zu werden (EPR-Effekt). Das Polymer-Wirkstoff-Konjugat kann hingegen nicht in das gesunde Gewebe eindringen, wird daraufhin über das lymphatische System aus dem Interstitium zurück in den Blutkreislauf gebracht, wodurch folglich weniger Nebenwirkungen auftreten [55].

Neben der renalen Ausscheidung werden die Makromoleküle auch über die Leber und bei Auslösung einer Immunreaktion durch das Konjugat durch das Retikuloendotheliale System (RES) aus dem Körper eliminiert. Bestimmte Polymere, darunter PEG und auch Poly-(Aminosäuren) können das Transportsystem gegen unspezifische Wechselwirkungen mit dem Organismus, z.B. mit Blutkomponenten (Opsonierung), die

2.1 Zylindrische Polymerbürsten

das Komplementsystem aktivieren, abschirmen. Dies ist allgemein als „Stealth Effect“ bekannt [56]. Bioabbaubare Polymere, wie beispielsweise Proteine können nach ihrem Einsatz als Drug Delivery-System über Pinozytose in die Zellen aufgenommen werden, wo sie für den Abbau in die späten Endosomen und Lysosomen gelangen und in ihre Einzelbausteine abgebaut werden, um anschließend über die Niere ausgeschieden zu werden [57]. Nicht abbaubare Polymere verbleiben in Vesikeln verpackt in der Zelle, wo sie zelltoxisch wirken können.

Wichtige Faktoren für die Eliminierung sind, wie in Abbildung 2 - 3 dargestellt neben der Größe auch die Form und die Zusammensetzung des Polymers [58]-[60].

Es kann gezeigt werden, dass die Geometrie eines Partikels einen wesentlich größeren Einfluss auf die Phagozytose hat als seine Größe und zudem die Anlagerung von Partikeln an Makrophagen nur ein Aspekt des phagozytotischen Prozesses darstellt. Das Actin Netzwerk, das für die Phagozytose ausgebildet werden muss, ist je nach Kontaktwinkel zwischen Partikel und Makrophage unterschiedlich komplex. So kommt es nicht zur Internalisierung, sondern nur zur Anlagerung des Partikels an die Makrophage, wenn kein Actin Netzwerk aufgebaut werden kann. Wie in Abbildung 2 - 4 B zu sehen, ist dies der Fall, wenn der Kontakt des Partikels mit dem Makrophagen an der wenig gekrümmten Oberfläche stattfindet [60].

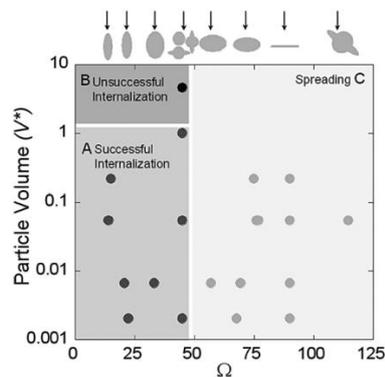


Abbildung 2 - 3: Phagozytose Phasendiagramm mit Ω , dem Winkel zwischen der Membran-Normalen und dem initialen Kontaktpunkt sowie einem dimensionslosen Partikelvolumen V^* [60].

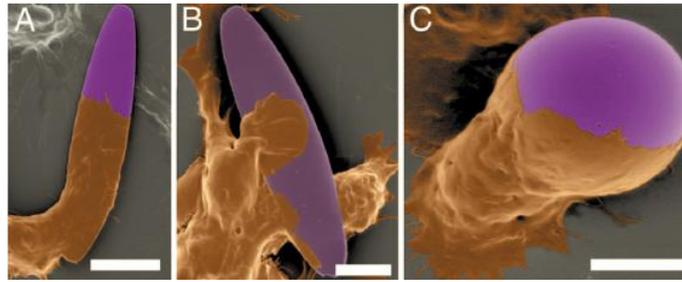


Abbildung 2 - 4: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen von Makrophagen (braun) und Partikeln (violett). (A) Aufnahme einer elliptischen Scheibe in die Makrophage (Maßstabsskala: 10 μm). (B) Anlagerung einer Makrophage an die flache Seite einer elliptischen Scheibe; es kommt nicht zur Zellaufnahme (Maßstabsskala: 5 μm). (C) Ein sphärischer Partikel hat sich an die Oberfläche der Makrophage angelagert und ist fast bis zur Hälfte von der Zellmembran bedeckt (Maßstabsskala: 5 μm) [60].

Dies kann auch für prolate ellipsoide Polymere beobachtet werden, die im Gegensatz zu sphärischen Partikeln trotz erhöhter Anlagerungstendenz an Makrophagen sehr viel weniger durch Phagozytose in Makrophagen aufgenommen werden [61]. Zudem zeigen zylindrische Mizellen aus amphiphilen Copolymeren (Filomizellen) eine zehnfach höhere Plasmazirkulationszeit als sphärische Mizellen [62]. Form und Flexibilität des Polymers haben einen ebenso großen Einfluss auf die Tumorakkumulation und Penetration: Flexible Knäuel können sich leicht deformieren und durch Poren diffundieren, dies ist bei starren verzweigten oder sternförmigen Polymeren nicht möglich. Steife stäbchenförmige Polymere, wie Polymerbürsten diffundieren leicht durch Poren und zeigen zudem eine höhere Akkumulation im Tumorgewebe als flexible, elongierte Polymere [63],[64]. Dies wird mit einer geringeren Verschlaufungstendenz der starren Makromoleküle mit der Extrazellulären Matrix erklärt [65].

Für zylindrische Peptid basierte Polymerbürsten, die sich durch ihre Bioabbaubarkeit und den „Stealth Effect“ auszeichnen, kann neben einer erhöhten Tumoraufnahme auch eine längere Blutzirkulationszeit erwartet werden. Zylindrische Polymerbürsten mit Peptidseitenketten stellen damit aufgrund ihrer Eigenschaften und ihrer Vielzahl an funktionellen Gruppen für Biokonjugationen die idealen Drug Delivery-Systeme dar, die je nach gewünschtem Anwendungsbereich maßgeschneidert dargestellt werden können.

2.2 Zwitterionische Polymere und Polybetaine

Aminosäuren liegen als Feststoffe und in wässrigen Lösungen als Zwitterionen vor, da die α -Aminogruppe protoniert ist, die α -Carboxygruppe deprotoniert ist und das Molekül damit keine Nettoladung trägt. Die Protonen können innerhalb des Zwitterions von der Carboxy- zur Aminogruppe wandern, was sowohl bei Aminosäuren als auch bei Peptiden und Proteinen zu beobachten ist [66]. Häufig wird aber auch für Polybetaine und Polyampholyte die Bezeichnung „zwitterionischer Polyelektrolyt“ verwendet. Als Betaine werden Moleküle bezeichnet, die sowohl eine positive als auch eine negative Ladung tragen, demnach nach außen hin ungeladen sind, in denen es aber anders als bei den Zwitterionen nicht zu einer Protonenwanderung kommen kann. Ihre Bezeichnung leitet sich von dem Molekül Betain ab, einer quaternären Ammoniumverbindung mit drei Methylgruppen, die als Oxidationsprodukt des Cholins entsteht und ein Derivat der Aminosäure Glycin ist. Typische Beispiele für Polybetaine sind Poly-(Carboxybetain)e (pCB) und Poly-(Sulfobetain)e (pSB), bei denen das Monomer ein positiv geladenes quaternäres Amin und eine negativ geladene Carboxy- oder Sulfatgruppe beinhaltet [67],[68]. Polyampholyte hingegen bestehen aus Monomeren, die entweder positiv oder negativ geladen sind und für die bei einem 1:1 Monomermischungsverhältnis ein nach außen hin neutrales, zwitterionisches Polymer entsteht [69].

Die Eigenschaften zwitterionischer Polyelektrolyte sind Gegenstand vieler Forschungsarbeiten[70]-[88], quantitative Charakterisierungen für zwitterionische Polyelektrolyte in Bezug auf Molekulargewicht und Kettendimensionen, wie R_g und R_h sind jedoch rar [89]-[99]. Das Verhalten von zwitterionischen Polyelektrolyten in wässrigen Lösungen wird durch ihr „antipolyelektrolyt Verhalten“ bestimmt: Sie zeigen im Gegensatz zu Polyelektrolyten nach Salzzugabe eine gesteigerte Viskosität und Löslichkeit [100],[101]. Dies ist durch die Coulomb-Anziehung zwischen den unterschiedlichen Ladungen im Zwitterion zu verstehen, die das Molekül in eine eher kollabierte, globuläre Struktur zwingen, weswegen dann hydrophobere Polybetaine generell unlöslich in Wasser sind. Nach Salzzugabe werden die entgegengesetzten Ladungen jedoch abgeschirmt, durch die somit verringerten Anziehungskräfte nimmt das Zwitterion nun eine besser solvatisierte, stärker expandierte Konformation ein und wird somit leichter löslich. In der Regel ist die Zugabe einer kritischen Salzkonzentration nötig um zwitterionische Polymere im wässrigen Medium zu lösen. Dies gilt

insbesondere für eher hydrophobe Strukturen in Kombination mit ionischen Gruppen, die auf schwächeren Elektrolyten basieren. Aus diesem Grund sind die physikalischen Eigenschaften von zwitterionischen Polyelektrolyten generell stark von der Menge und Art des zugegebenen Salzes abhängig. Das Löslichkeitsverhalten dieser Polymere hängt zudem von den im Polymer vorliegenden ionischen Gruppen ab. So sind pCBs deutlich besser in entionisiertem Wasser löslich als pSBs, da die Carboxylatgruppen im wässrigen Medium leicht protoniert werden, wohingegen die Sulfonatgruppen schwache Basen darstellen und damit im wässrigen Medium geladen vorliegen [89]. Variationen im pH-Wert beeinflussen das Ladungsverhältnis und die physikalischen Eigenschaften lassen sich über die Ionenstärke, den pH-Wert und die Temperatur beeinflussen, weswegen zwitterionische Polyelektrolyte zu den „smart“ Stimuli-responsiven Materialien zählen.

Zwitterionische Polyelektrolyte gehören neben hydrophilen Materialien zu den „low-fouling“ oder „nonfouling“ Materialien, die vor allem im biomedizinischen Bereich, beispielsweise in Implantaten und Biosensoren ihren Einsatz finden [102],[103]. Die Protein Adsorption oder Adhäsion von Zellen und Bakterien an zwitterionische Oberflächen wird unterdrückt, wodurch weniger Entzündungs- und Immunreaktionen im Körper ausgelöst werden. Materialien erhalten die Bezeichnung „antifouling“ wenn sie $< 5 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ Fibrinogen adsorbieren. „Low-fouling“ oder „antifouling“ Materialien weisen neben einer ausgeprägten Hydrophilie auch elektrische Neutralität auf und sind zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen fähig. Es wird davon ausgegangen, dass die „antifouling“ Kapazität mit der Ausbildung einer Wasserschicht an der Oberfläche im Zusammenhang steht[104],[105], da eine eng gebundene Wasserschicht eine physikalische und energetische Barriere für die Oberflächenadsorption von Proteinen darstellt [69]. Die Wassermoleküle können an den „nonfouling“ Oberflächen sitzen oder in sie eindringen. Hydrophile Oberflächen bilden dabei recht schwache und leicht zu brechende Wasserstoffbrückenbindungen mit den Wassermolekülen aus, bei zwitterionischen Materialien kommt es hingegen zur stärkeren ionischen Solvation[69], sodass für die zwitterionischen Oberflächen keine Gefahr der Umwandlung in „fouling“ Materialien besteht [106],[107]. Die Oberflächenhydratation wird neben den physikochemischen Eigenschaften der Materialien, wie dem Molekulargewicht und der Oberflächenchemie, auch vom Aufbau der Oberfläche (z.B. Filmdicke, Packungsdichte und Kettenkonformation) beeinflusst. Da es bei der Annäherung eines Proteins an die Oberfläche zur sterischen Repulsion aufgrund von

2.2 Zwitterionische Polymere und Polybetaine

Kompression der Polymerketten kommt, stellt neben der Oberflächenhydratation auch die Kettenflexibilität einen wichtigen Faktor für die Beständigkeit gegen Proteinadsorption dar [108],[109]. Viele wasserlösliche Polymere können bis zu einem gewissen Grad die Proteinadsorption verringern, das größte „antifouling“ Potential zeigen jedoch Polymere, die sowohl eine Oberflächenhydratation als auch eine sterische Abstoßung garantieren. Im Gegensatz zu PEG[110], das sich zwar durch seine starke „antifouling“ Fähigkeit auszeichnet, werden zwitterionische Polymere im biologischen Medium jedoch nicht oxidiert und zeigen damit eine höhere Stabilität [111].

Studien an Polyampholyten mit variabler Nettoladung an der Oberfläche zeigen, dass die Adsorption von Proteinen nur bei Ladungsneutralität der Oberfläche unterdrückt wird, da sonst elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche auftreten [112],[113]. Diese Ergebnisse werden in der Forschungsarbeit von Dr. Kristin Mohr[114] zum Aggregationsverhalten von Partikeln in humanem Blutserum bestätigt: Partikel mit stark positivem oder stark negativem Zeta-Potential führen zur Aggregation im Blutserum. Bei Partikeln mit leicht positivem oder leicht negativem Zeta-Potential kommt es lediglich zur Ausbildung von kleineren oder gar keinen Aggregaten und für zwitterionische Strukturen kann keine Aggregation in humanem Serum festgestellt werden. Untersuchungen bezüglich der Interaktionen zwischen zwitterionischen Oberflächen mit Blutplasma ergeben entsprechende Ergebnisse: Zwitterionische Oberflächen zeigen ein extrem niedriges „fouling“ Potential in Blutplasma [115]-[117].

Untersuchungen an zwitterionischen Polymeren mit Aminosäureseitenketten ergeben ebenfalls vielversprechende Ergebnisse, auch hier kann eine hohe Biokompatibilität, eine niedrige Protein Adsorption und eine Stimuli-Responsivität festgestellt werden [118],[119].

Die unterdrückte Adsorption von Proteinen und die nicht auftretende Aggregation in humanem Blutserum machen zwitterionische Nanopartikel zu idealen Trägersystemen.

2.2.1 Zwitterionen für die Gentransfektion

Kationische Polymere oder Lipide werden für den nichtviralen Gentransport verwendet um DNA durch die Lipidmembran in das Zellinnere zu transportieren. Durch die Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Molekülen und der negativ geladenen DNA wird der DNA-Komplex komprimiert und kann durch die Membran gelangen ohne abgebaut zu werden [120]-[123]. Ein großer Nachteil der kationischen Moleküle ist jedoch ihre hohe Zelltoxizität[124], weswegen zwitterionische Phospholipide als Bestandteile der Zellmembran eine vielversprechende Alternative darstellen. Wie von Ainalem et al.[125] gezeigt werden konnte, adsorbiert DNA an Modellmembranen, aufgebaut aus zwitterionischen, flüssigkristallinen Phospholipid Doppelschichten, die in Lösungen mit divalentem Ca^{2+} oder monovalentem Na^{+} vorliegen. Die Wechselwirkungen zwischen der Membran und DNA in Anwesenheit von Na^{+} (ohne andere mehrwertige Ionen) sind sehr schwach, die DNA liegt in einer expandierten Knäuelkonformation auf der Membran auf. In Gegenwart von Ca^{2+} ist das davor zwitterionische Lipid hingegen positiv geladen und die Antriebskraft für die DNA-Adsorption ist elektrostatischer Natur. Für die Adsorption von DNA, auch in Na^{+} -Lösung, werden zudem hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den (internen) DNA-Basen der Doppelhelix und den in der Doppelschicht innen liegenden Acylketten in Betracht gezogen.

Von Zhang et al.[126] wurde hingegen gezeigt, dass nur der Ester des pCBs DNA komplexiert, zwitterionische pCBs jedoch keine Komplexe mit DNA ausbilden. Der stabile DNA/pCB-Komplex löst sich nach Hydrolyse der Estergruppe zum Zwitterion auf und die DNA wird freigesetzt, da elektrostatische Anziehungen zwischen der DNA und zwitterionischen Polymeren nicht begünstigt sind [67].

Neben der effektiven Ladung beeinflusst auch die Topologie die Transfektion. So konnte gezeigt werden, dass zylindrische, quaternäre Poly-(Vinylpyridin) Polymerbürsten im Vergleich zu ihren linearen Analoga eine bessere Zellaufnahme und Transfektionseffizienz zeigen [127].

2.3 Elastin-ähnliche Polypeptide

2.3.1 Elastin

Elastin ist ein unlösliches Strukturprotein, welches die Elastizität der Gewebe und Organe von Säugern gewährleistet. Zudem können Elastin basierte Peptide, wenn in den Blutkreislauf gelangt, eine Vasodilatation auslösen [128]. Elastin ist aus großen hydrophoben Domänen und kleineren alaninreichen Regionen sowie Vernetzungsdomänen aufgebaut: Der hydrophobe Bereich besteht vor allem aus den hydrophoben Aminosäuren Prolin (P), Alanin (A), Leucin (L), Isoleucin (I), Valin (V) und Glycin (G), wobei die beiden Letzteren den größeren Anteil ausmachen [129]. Es treten verschiedene, sich wiederholende Motive dieser hydrophoben Sequenz auf, in den prolin- oder alaninreichen Regionen der Vernetzungsdomänen sind Lysine paarweise oder in Triplets angeordnet [130].

Die Elastogenese ist die biologische Synthese des Elastins und beginnt in der Zelle [130]. Zunächst wird das Vorläufermolekül Tropoelastin gebildet, welches durch Bindung an Galactolectin vor intrazellulärer Aggregation geschützt wird. Galactolectin und Tropoelastin bilden bis zum Eintritt in den extrazellulären Raum einen Komplex, dort wechselwirkt das Galactolectin dann stärker mit den vorliegenden Galactosezuckern der Mikrofibrillen und die Affinität zum Tropoelastin nimmt drastisch ab. Das unkomplexierte Tropoelastin lagert sich an die Mikrofibrillen an, welche für die richtige Anordnung der Tropoelastine verantwortlich sind. Anschließend desaminiert und oxidiert das Enzym Lysyloxidase eine Vielzahl von Lysinseitenketten im Tropoelastin, sodass Allysin entsteht.

Die Reaktion von Allysinseitenketten mit sich selbst und Aminogruppen von unmodifiziertem Lysin führt zur Vernetzung, wodurch Desmosine und Isodesmosine entstehen [131]. Die Vergrößerung des Elastinnetzwerks verursacht die Unlöslichkeit der Tropoelastinketten und das fertige Elastin besteht schließlich aus mehreren, kovalent miteinander verknüpften Tropoelastinmolekülen. Elastin bildet Filamente aus, die sich zu großen Bündeln zusammen lagern und eine Art „verdrehtes Seil“ Struktur aufweisen [132]. Trotz seines sehr hydrophoben Charakters ist Elastin stark hydratisiert und liegt *in vivo* gelartig gequollen vor.

Elastin-ähnliche Polypeptide („Elastin-like Polypeptides“, ELPs) leiten sich von den hydrophoben, sich wiederholenden Peptidmotiven im Tropoelastin ab. Das verbreiteteste Motiv ist die Pentapeptid-Wiederholungseinheit $(VPGXG)_m$, bei der X für jede Aminosäure außer Prolin steht und m die Anzahl der Wiederholungseinheiten angibt [133]. Es gibt jedoch eine Vielzahl anderer Wiederholungssequenzen, wie beispielsweise die Pentapeptidsequenzen KGGVG[134] oder LGGVG[135] sowie Hexa- als auch Nonapeptidsequenzen [136]. Die in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse für Elastin-ähnliche Polypeptide beschränken sich auf das Peptidmotiv $(VPGXG)_m$.

2.3.2 Molekulare und supramolekulare Strukturen von Elastin-ähnlichen Polypeptiden

Bis zum jetzigen Zeitpunkt können keine exakten Aussagen über die Konformationsänderungen der Elastine gemacht werden. Aufgrund der hohen Mobilität des Peptidrückgrats der Elastine sind weder high-resolution NMR- noch Röntgenstruktur-Aufnahmen möglich. Spektroskopische Untersuchungen von Urry[137] und „molecular dynamics“ (MD) Simulationen von Li[138] führen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Aufgrund der Unlöslichkeit von Elastin muss man sich bei der Untersuchung der molekularen und supramolekularen Strukturen auf lösliche Abkömmlinge des Elastins beschränken. Hierbei handelt es sich zum Einen um das Vorläuferprotein Tropoelastin[139], als auch um α -Elastin, ein 70 kDa schweres Abbauprodukt des faserartigen Elastins und Elastin-ähnliche Polypeptide [137],[140],[141]. Verschiedene Untersuchungsmethoden belegen das Vorkommen von β -turn Strukturen im Elastin.

Derzeit werden zwei unterschiedliche Modelle zur Beschreibung der molekularen Struktur des Elastins diskutiert. Basierend auf Untersuchungen an Poly-(VPGVG) kommt Urry zu dem Schluss, dass sich wiederholende Typ II β -turn Motive zur Ausbildung einer helikalen β -Spiralstruktur führen [137].

2.3 Elastin-ähnliche Polypeptide

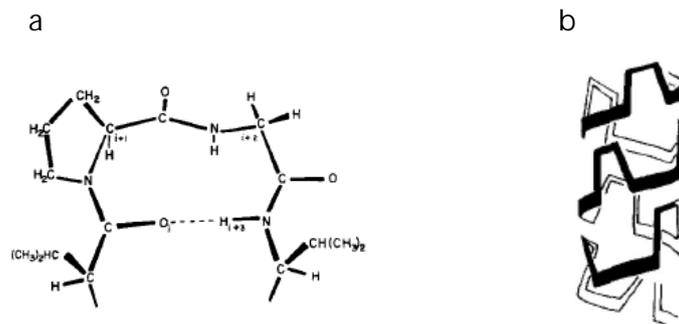


Abbildung 2 - 5: Modell nach Urry: a) β -turn einer Pentapeptid-Wiederholungseinheit; b) Schematische Darstellung der β -Spirale mit den β -turns als Abstandshalter in der Helix [131].

Jede Pentamereinheit bildet einen Typ II β -turn aus, bei dem PG an den Biegungen sitzen und sich eine 1 \rightarrow 4 Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe des ersten Valins und der NH-Gruppe des vierten Valins der Pentasequenz ausbildet (Abbildung 2 - 5 a). Durch die Wiederholung dieses Motivs entsteht eine β -Spiralstruktur (Abbildung 2 - 5 b). Die β -Spirale kann als eine offene, Wasser enthaltende Helix beschrieben werden, in denen β -turns als Abstandshalter zwischen den Windungen der Helix fungieren. Die Wechselwirkungen zwischen den turns sind hydrophober Natur [131]. Zwischen den β -turns sitzen VP-Dipeptidsegmente, in denen Schwingungen mit großer Amplitude jedoch geringer Frequenz auftreten können. Durch Dehnung wird die Schwingungsamplitude geringer, was zu einer starken Abnahme der Entropie im Segment führt und somit die Triebkraft für die Rückkehr in den entspannten Zustand darstellt [130].

Gegen das Modell der β -Spiralstruktur sprechen spektroskopische Untersuchungen, die Hinweise auf eine deformierte β -Faltblattstruktur geben [142]. „Molecular dynamics“ Simulationen (MD) von Li et al.[138], bei denen das Elastin von einer anfänglichen β -Spiralstruktur in eine amorphe Struktur in Wasser (mit ungeordneten β -Strängen und fluktuierenden β -turns) übergeht, unterstützen die Theorie der isolierten β -turns von Tamburro et al. [130],[143],[144]. In diesem Modell wird von isolierten, sich nicht wiederholenden Typ II β -turns für die Wiederholungseinheit GXGGX ausgegangen. Dabei sitzen XG- oder GG-Segmente an den Biegungen und es bilden sich Wasserstoffbrücken entweder zwischen dem ersten und vierten Glycin oder der zweiten und fünften Aminosäure X aus.

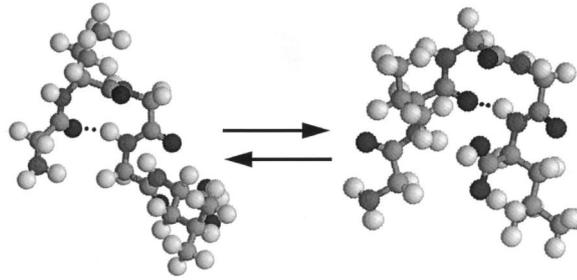


Abbildung 2 - 6: Modell nach Tamburro: dynamisch gleitende β -turns [130].

Da das Prolin durch Glycin ersetzt wird, werden die turns labiler und es kann zum dynamischen Gleiten der β -turns entlang der Kette kommen (Abbildung 2 - 6) [130]. Die Polypeptidketten fluktuieren frei und verursachen die hohe intrinsische Entropie, die zur Elastizität des Proteins beiträgt [145].

Die Strukturmodelle nach Urry und Tamburro betrachten unterschiedliche Regionen des Elastins, sie verbindet jedoch die Vorstellung des Typ II β -turns Motivs. Unterschiede sind hingegen im dynamischen Verhalten zu finden.

Der biologische Nutzen der β -turns ist in der Gewährleistung der richtigen Anordnung der Tropoelastinketten, als Vorstufe zur Vernetzung zu sehen [146],[147].

Die supramolekulare Struktur von Elastinen gleicht denen der Tropoelastine, α -Elastine und Elastin-ähnlichen Polypeptide [132]. Drei verschiedene Aggregationsmuster können festgestellt werden [132],[148]: a) Dies ist zum Einen die schon beschriebene fibrilläre Anordnung der ungefähr 5 nm dicken Filamente zu parallel angeordneten oder verdrehten Faserbündeln. Diese Anordnung wird sowohl für Tropoelastin[149], α -Elastin[150] als auch für ELPs gefunden [148]. b) Zum Anderen kann man in TEM-Aufnahmen kugel- und blattartige Strukturen[132] sowie c) Amyloid-Aggregationsmuster[151] erkennen.

2.3.3 Phasenübergangsverhalten der Elastin-ähnlichen Polypeptide

Grundlegend für die Faltung der Elastine und damit auch Grundlage für ihre Funktionsweise ist ihr inverses Phasenübergangsverhalten [152],[141]. Für das Vorläuferprotein Tropoelastin findet bei 37 °C, pH = 7-8 und physiologischen Salzbedingungen eine Coazervatbildung statt, wodurch die richtige Anordnung der Domänen für die intermolekularen Vernetzungen gewährleistet wird [145].

Neben Tropoelastin sind auch Elastin-ähnliche Polypeptide, wie beispielsweise Poly-(VPGVG) nur bis zu einer gewissen Übergangstemperatur (T_i) in Wasser löslich [153]. Die Polymerketten liegen unterhalb dieser Temperatur ungeordnet und voll hydratisiert vor, da die hydrophoben Bereiche von geordneten käfigförmigen Wasserstrukturen umgeben sind [154]. Oberhalb der T_i verschlechtert sich die Löslichkeit, in den Polymerketten lagern sich die hydrophoben Bereiche zusammen und es bildet sich eine geordnete, aus β -turns bestehende β -Spiral Struktur aus. Die β -Spiral Struktur wird durch die hydrophoben intra-spiral, inter-turn und inter-spiral Wechselwirkungen stabilisiert. Der Übergang von einer ungeordneten Struktur in eine entropisch ungünstigere, geordnete Konformation wird durch die hydrophobe Dehydratisierung verursacht. Beim Erhitzen wird das an das ELP gebundene Wasser freigesetzt, wodurch der hydrophobe Charakter des Proteins verstärkt wird und Aggregation eintritt. Die Freisetzung von Hydratwasser kompensiert dabei den Verlust an Konformationsfreiheit des Proteins und die Veränderungen in der Struktur und der Hydrophobizität werden von fortschreitender Aggregation und schließlich Präzipitation des ELPs begleitet. Dieser Vorgang ist vollständig reversibel [155]. Die T_i des inversen Temperaturübergangs wird durch die Aminosäuresequenz[156], die Länge des Polypeptids[157],[158], die Ionenstärke[156] und den pH-Wert des umgebenden Mediums[49] sowie der ELP-Konzentration[157],[158] beeinflusst [141],[152]. So steigt die T_i bei sinkender Kettenlänge, da kürzere Ketten in einer geordneteren Struktur vorliegen und mehr Energie benötigt wird, um von einer geordneten Struktur in eine andere geordnete überzugehen [159]. Da es sich beim Übergang von der „random coil“ Struktur in die β -Spiralstruktur um einen kooperativen Prozess handelt fällt mit steigender Konzentration des Polymers die T_i , da bei hohen Konzentrationen dieser Effekt eine größere Rolle spielt [49].

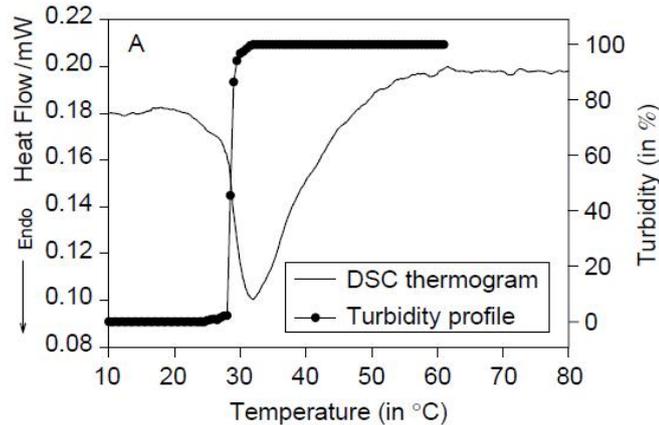


Abbildung 2 - 7: DSC-Thermogramm von Poly-(VPGVG), 50 mg·L⁻¹ in Wasser (Heizrate: 5 °C·min⁻¹) und die Trübungskurve als Funktion der Temperatur für eine wässrige 5 mg·L⁻¹ Lösung desselben Polymers [160].

Die Konformationsänderungen unter Temperaturerhöhung können mittels CD-Spektroskopie verfolgt werden [140]. Die T_t und der damit verknüpfte Phasenübergang (einphasige Lösung geht in den zweiphasigen Sol-Gel-Bereich über) können mit verschiedenen Techniken bestimmt werden. Am häufigsten werden Trübungsmessungen oder kalorimetrische Methoden verwendet, wobei temperaturabhängig die optische Dichte bzw. der Wärmefluss während des Phasenübergangs gemessen wird [160]. Die T_t -Werte, die bei den verschiedenen Messmethoden erhalten werden können allerdings stark variieren. Mit Lichtstreuung konnte nachgewiesen werden, dass bereits im Bereich unterhalb des eigentlichen Phasenübergangs Aggregation eintritt [161].

2.3.4 Gentechnische Darstellung, Expression und Aufreinigung von Elastin-ähnlichen Polypeptiden

Es gibt eine Vielzahl an rekombinanten DNA-Methoden zur Darstellung von synthetischen Genen, welche für repetitive Polypeptide codieren. Häufig verwendete Methoden dafür sind beispielsweise die „Polymerase chain reaction“ (PCR) Cloning [162], [163], die „Concatemerization“ Methode [164] und das „Seamless Cloning“ [165]-[167].

2.3 Elastin-ähnliche Polypeptide

Bei der von Meyer et al.[168] entwickelten „recursive directional ligation“ (RDL) Methode werden schrittweise kurze Oligomere entweder mit sich selbst oder anderen DNA-Sequenzen durch rekombinante DNA-Methoden nahtlos miteinander verknüpft. Diese Methode weist jedoch ihre Grenzen auf: So können beispielsweise aufgrund von Selbstligation eines Vektors neue Vektoren entstehen, die für keine ELP-Sequenz mehr codieren. Des Weiteren kann die Klonierungseffizienz durch Selbstligation und Ringschluss des ELP-Oligomers vermindert werden. Die RDL Methode ist zudem durch ihre vielen Klonierungsschritte sehr zeitaufwendig und fehleranfällig und lässt nur die Synthese bestimmter Sequenzen zu [169]. Um diese Probleme zu umgehen wurde von McDaniel et al.[169] auf Basis der RDL die „recursive directional ligation by plamid reconstruction“ (Pre-RDL) entwickelt, welche die Synthese von monodispersen, repetitiven Polypeptiden jeglicher Sequenz ermöglicht. Die im Rahmen dieser Dissertation hergestellten ELPs werden unter Verwendung dieser Methode synthetisiert. In einem Pre-RDL Zyklus werden zwei Hälften eines ursprünglichen Plasmids, jedes enthält eine Kopie des Oligomers, miteinander legiert, wodurch ein dimerisiertes Oligomer sowie ein wiederhergestelltes Plasmid entstehen. Wie Abbildung 2 - 8 zeigt, besteht dieser Zyklus aus 3 Schritten: In Schritt 1 werden dem ursprünglichen Plasmid die Typ II Endonucleasen *AclI* und *BglI* zugesetzt und das entstehende ELP enthaltende DNA-Fragment muss von dem Vektorfragment gereinigt werden. In Schritt 2 werden die Typ II Endonucleasen *BseRI* und *BglI* verwendet und auch hier muss das Vektorfragment entfernt werden, damit in Schritt 3 der ursprüngliche Vektor durch Ligation der 2 ELP enthaltenden DNA-Fragmente wiederhergestellt werden kann und sich dabei die DNA-Sequenzlänge verdoppelt. Bei dieser Methode kann es im Gegensatz zur RDL nicht zur Selbstligation oder zum Ringschluss des ELP enthaltenden DNA-Fragments kommen, da die Endonucleasen *BseRI* und *AclI* 2 Basenpaar-Überhänge entstehen lassen, welche nicht mit der durch *BglI* entstehenden Schnittstelle kompatibel sind.

Die Ergebnisse der Oligomerisierungsschritte werden sowohl durch Agarose Gelelektrophorese als auch durch DNA-Sequenzierung überprüft. Für die Expression des ELPs wird das mittels Pre-RDL hergestellte Gen vom Klonvektor in einen Expressionsvektor überführt. Die verwendeten Vektoren und Gensequenzen sind Kapitel 6.3 zu entnehmen.

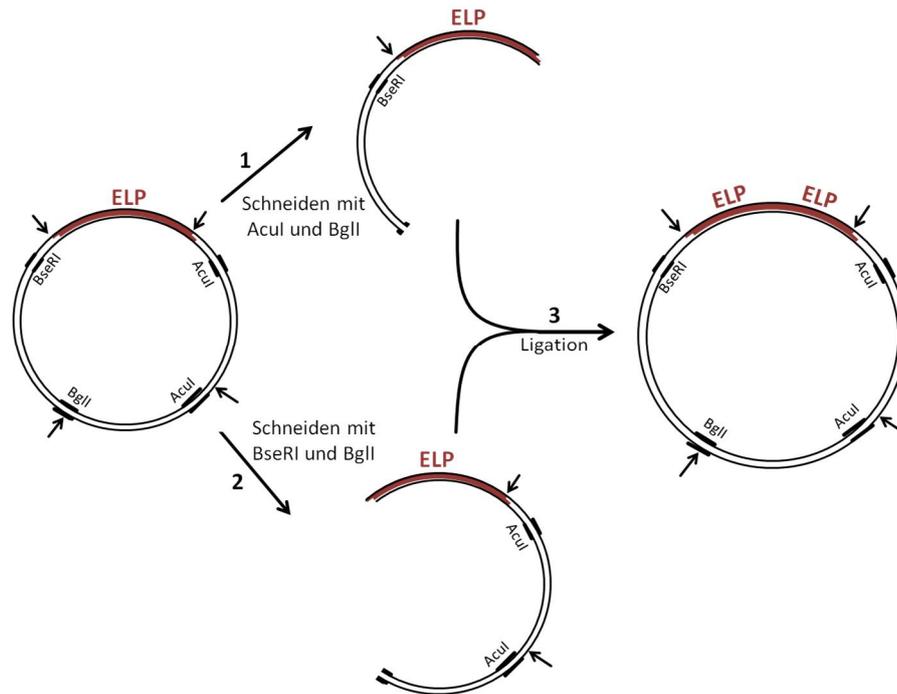


Abbildung 2 - 8: Schematische Darstellung der „recursive directional ligation by plasmid reconstruction“ (PRe-RDL). Die schwarzen Pfeile weisen auf die Schnittstellen der Enzyme, die verdickten Stellen am Vektor verdeutlichen die Erkennungssequenzen der Enzyme.

Die Plasmid-DNA wird für die Expression in *E. coli* eingebracht, wodurch ELP in größeren Mengen hergestellt werden kann. Wie in Abbildung 2 - 9 gezeigt, erfolgt die anschließende Aufreinigung, auch „inverse temperature cycling“ (ITC) genannt, unter Ausnutzung des inversen Temperaturübergangs der ELPs (siehe Kapitel 2.1.2).

ELPs sind unterhalb ihrer T_i in Puffer löslich und werden erst beim Erhitzen über ihre T_i unlöslich. Das ELP kann von unlöslichen Proteinverunreinigungen aus dem Zelllysat durch Zentrifugieren bei niedrigen Temperaturen getrennt werden („cold spin“). Das lösliche ELP befindet sich im Überstand, die Proteinverunreinigungen werden als Niederschlag erhalten. Der Überstand wird abgenommen und erhitzt, wodurch das ELP unlöslich wird. Anschließendes Zentrifugieren bei hoher Temperatur ergibt einen ELP-Niederschlag („hot spin“). Die löslichen Verunreinigungen befinden sich im Überstand und können abgenommen werden, das als Niederschlag verbleibende ELP wird in kaltem Puffer gelöst und kann durch Wiederholung der zuvor beschriebenen Schritte weiter aufgereinigt werden. Typischerweise werden 3-5 solcher ITC-Zyklen durchgeführt, die Reinheit der Produkte wird mittels SDS-PAGE überprüft.

2.3 Elastin-ähnliche Polypeptide

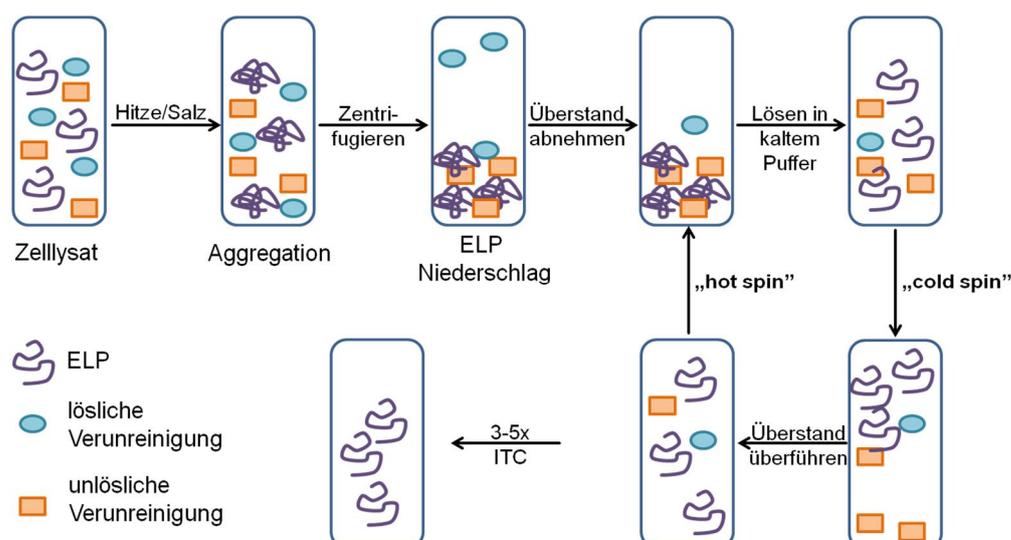


Abbildung 2 - 9: Schematische Darstellung der ELP-Aufreinigung durch „inverse temperature cycling“ (ITC). Das ELP wird von löslichen und unlöslichen Verunreinigungen durch sich wiederholende „hot spins“ und „cold spins“ gereinigt.

2.3.5 Biomedizinische Anwendungsbereiche von Elastin-ähnlichen Polypeptiden

Elastin-ähnliche Polypeptide finden aufgrund ihrer Vielfalt an unterschiedlichen Eigenschaften im biomedizinischen Bereich breite Anwendung [155]. Sie gehören zur Klasse der „smart“ Stimuli-responsiven Biopolymere und zeichnen sich durch ihre Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit aus. Ihre gentechnische Darstellung und Expression in *E. coli* ermöglicht die Synthese von monodispersen Proteinen mit variabler Peptidsequenz im Halbmikro-Maßstab. Diese Eigenschaften und das thermosensitive Verhalten machen ELPs attraktiv für den Einsatz in Bereichen wie Proteinaufreinigung, Drug Delivery und „Tissue Engineering“ [170].

Auch „ELP Fusion Proteine“ zeigen ein LCST-Verhalten, welches zur Proteinaufreinigung ausgenutzt werden kann. Das „ELP Fusion Protein“ wird durch mehrere ITC-Zyklen von den Verunreinigungen aus dem Zelllysat getrennt, der ELP-Anhang wird anschließend enzymatisch abgespalten, wodurch das aufgereinigte Protein erhalten wird [171].

Protein basierte Drug Delivery-Systeme weisen einige Vorteile gegenüber PEG basierten Drug Delivery-Systemen auf. Elastin-ähnliche Polypeptide sind bioabbaubar, die natürlichen Aminosäuren werden als Abbauprodukte erhalten. Diese Bioabbaubarkeit

ermöglicht, im Gegensatz zu PEG basierten Drug Delivery-Systemen den Einsatz von Proteinen mit einem Molekulargewicht, das über der renalen Ausscheidungsgrenze ($M_w = 40$ kDa) liegt. Zudem zeichnen sich Poly-(Aminosäuren) durch ihren „Stealth Effect“ aus [56]. Die gentechnische Synthese von ELPs ermöglicht es monodisperse Proteine mit bestimmter Peptidsequenz darzustellen, wodurch Aminosäuren mit funktionellen Gruppen sowie bestimmte „Targeting“ Peptide in die Peptidsequenz eingebaut werden können. Auch die Thermoresponsivität der ELPs kann für den zielgerichteten Transport von Wirkstoffmolekülen ausgenutzt werden [172]-[174]. Über einen pH sensitiven Hydrazon-Linker kann beispielsweise der hydrophobe Wirkstoff Doxorubicin an Cystein-[175] oder Lysin-[176] Seitenketten mit dem ELP verknüpft werden. Der hydrophobe Wirkstoff induziert die Bildung von nahezu monodispersen Mizellen, die auch über einen breiten Konzentrationsbereich eine konstante Übergangstemperatur (innerhalb von 2°C) aufweisen [175]. In Zellkompartimenten mit einem sauren pH, wie dem Lysosom wird der Wirkstoff vom ELP abgespalten und damit freigesetzt. Für ELP-Unimere hingegen ist eine starke Konzentrationsabhängigkeit der T_t festzustellen. Dies stellt sich als nachteilig heraus, wenn man die schnelle Verteilung und Verdünnung der ELPs nach intravenöser Injektion betrachtet, da die T_t bei kleinen Konzentrationen über dem medizinisch relevanten Bereich von 37-42 °C liegt [177].

Durch extern applizierte Wärme (Hyperthermie) kann eine Aggregation der ELPs im Tumorgewebe induziert werden. Begründet durch den EPR-Effekt erhöht sich, im Vergleich zum freien Wirkstoff die Verweildauer des Wirkstoffs im Tumorgewebe, wodurch eine erhöhte Antitumor-Wirkung erzielt werden kann [178]. ELPs mit einer Übergangstemperatur zwischen 25-37 °C können als lokales Drug Delivery-System verwendet werden. Durch lokale Injektion bildet sich *in vivo* bei Körpertemperatur ein hoch viskoses ELP-Coazervat. Diese ELP-Coazervate weisen, im Vergleich zum löslichen ELP eine vielfach erhöhte Verweildauer im Gewebe auf und ermöglichen somit eine kontinuierliche, lokale Wirkstofffreisetzung [179].

Elastin-ähnliche Polypeptide werden zudem zum Aufbau von Knorpelmaterial verwendet [180]. Chondrozyten werden in ein gelartiges Substrat, das aus aggregierten ELPs besteht eingebracht und können dort sowohl Glykosaminoglykane als auch Kollagen Typ II, die charakteristischen Proteine der Extrazellulären Matrix des Knorpelgewebes produzieren. ELP basierte Gele werden für die Einlagerung von Zellen genutzt und können neben der Coazervatbildung durch Temperaturerhöhung auch durch physikalische oder chemische Vernetzung von ELPs hergestellt werden [170].

Somit werden bei Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten die Eigenschaften der zylindrischen Polymerbürsten mit den Stimuli-responsiven Eigenschaften der Elastin-ähnlichen Polypeptide kombiniert, wodurch ein System entsteht, das sich sehr gut für den Einsatz in biomedizinischen Anwendungen, beispielsweise als Drug Delivery-System eignet.

2.3.6 Polymere mit Elastinseitenketten

Nach der Vorstellung von zylindrischen Polymerbürsten mit Peptidseitenketten in Kapitel 2.1.3 soll nun im Speziellen auf Polymerbürsten mit Elastinseitenketten (Elastin-based side chain polymers, EBPs) eingegangen werden.

EBPs konnten via ATRP[28],[49] und RAFT[31] Polymerisationen der VPGVG basierten Makromonomere dargestellt werden. Durch kontrollierte radikalische Polymerisation konnten Polymere mit einem niedrigen PDI und geringem Molekulargewicht erhalten werden. Zudem wurden ABA-Triblock-Copolymere aus dem VPGVG-Monomer (A) und einem bifunktionellen PEG basierten Initiator (B) synthetisiert [28],[49].

Das für ELPs beobachtete LCST-Verhalten konnte mittels CD-Spektroskopie[28] und Trübungskurven-Messungen[31] auch für die EBPs detektiert werden. Die gemessenen CD-Spektren weisen Ähnlichkeiten mit denen in dieser Arbeit (Kapitel 4.2.3) für das VPGGG-Pentapeptid erhaltenen auf. Wie auch für die ELPs haben die Polymerkonzentration, der pH-Wert und die Blocklänge einen Einfluss auf die Übergangstemperatur der EBPs. In Abbildung 2 - 10 a ist zu erkennen, dass für eine Mischung von ELPs mit unterschiedlicher Kettenlänge die individuelle Übergangstemperatur beibehalten wird [181].

Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 2 - 10 b, dass man für die Mischung unterschiedlich langer EBPs nur eine einzige Übergangstemperatur erhält, für die ein linearer Zusammenhang zwischen der Übergangstemperatur und dem Mischungsverhältnis zweier EBPs mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad besteht [182].

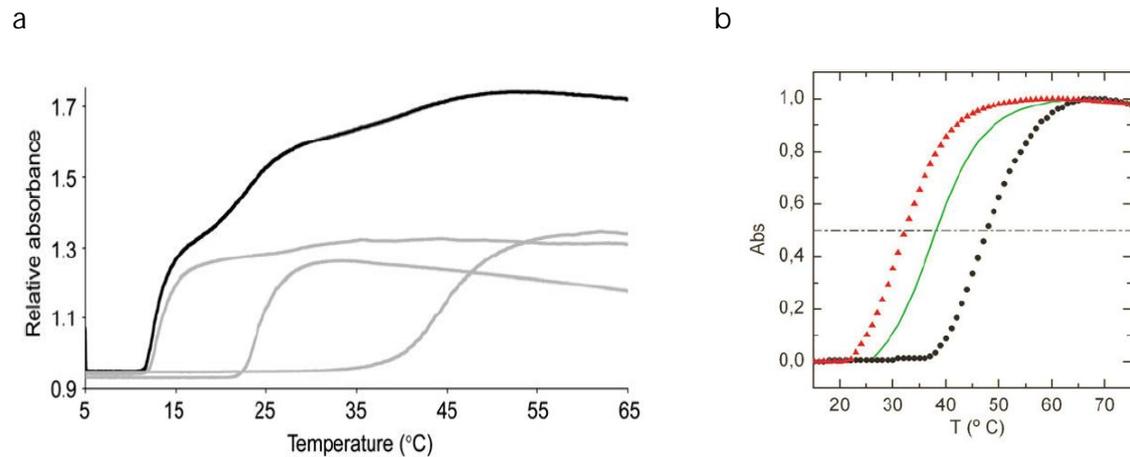


Abbildung 2 - 10: a) Trübungskurven einer ELP-Polymer-Mischung (schwarz) und der einzelnen ELPs (grau) [181]; b) Trübungskurven von EBP-Polymer A (rot), $DP_n = 29$ und EBP-Polymer D (schwarz), $DP_n = 88$, sowie deren 1:1 Volumenanteilmischung (grün) [182].

Somit kann die gewünschte Übergangstemperatur durch Variation des Mischungsverhältnisses der verschiedenen EBPs erhalten werden. Die damit der „self-assembly“ bevorzugte „co-assembly“ ermöglicht die reversible Anlagerung von kürzeren EBPs an eine mit EBPs modifizierte Oberfläche. Senkung des pH-Werts induziert die „co-assembly“ und führt zur Anlagerung der kurzen EBPs an die Oberfläche [183].

Die im Rahmen dieser Dissertation dargestellten Polymerbürsten mit Elastin basierten Seitenketten werden mittels freier radikalischer Polymerisation der entsprechenden Makromonomere hergestellt. Es werden Polymerbürsten mit hohem Molekulargewicht und einer bei der freien radikalischen Polymerisation zu erwartenden breiteren Molekulargewichtsverteilung erhalten.

Literatur zu Kapitel 2:

- [1] M. Zhang, A. H. E. Müller, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 2005, *43*, 3461–3481.
- [2] S. S. Sheiko, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Progress in Polymer Science* 2008, *33*, 759–785.
- [3] *Polymer Brushes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2005.
- [4] S. A. Bencherif, H. Gao, A. Srinivasan, D. J. Siegwart, J. O. Hollinger, N. R. Washburn, K. Matyjaszewski, *Biomacromolecules* 2009, *10*, 1795–1803.
- [5] H.-i. Lee, J. Pietrasik, S. S. Sheiko, K. Matyjaszewski, *Special Issue on Stimuli-Responsive Materials* 2010, *35*, 24–44.
- [6] C. Li, N. Gunari, K. Fischer, A. Janshoff, M. Schmidt, *Angewandte Chemie International Edition* 2004, *43*, 1101–1104.
- [7] D. W. Urry, *Biopolymers* 1998, *47*, 167–178.
- [8] A. K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, *Progress in Polymer Science*. 2008, *33*, 1088–1118.
- [9] A. D. Schlüter and C. J. Hawker, Ed., *Synthesis of Polymers: Cylindrical Polymer Brushes*, WILEY-VCH Verlag. 2012.
- [10] J. Yuan, A. H. E. Müller, "Cylindrical Polymer Brushes", in *Materials Science and Technology* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2006.
- [11] R. Advincula, "Polymer Brushes by Anionic and Cationic Surface-Initiated Polymerization (SIP)", in *Advances in Polymer Science* Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. 2006, p. 107 ff.
- [12] H. L. Hsieh, Quirk R.P., *Anionic Polymerization: Principles and Practical Applications*, Marcel Dekker. 1996.
- [13] K. Matyjaszewski, *Cationic Polymerizations: Principles and Practical Applications*, Marcel Dekker. 1996.
- [14] T. Saegusa, E. Goethals, *Ring-Opening Polymerization: ACS Symposium Series*, American Chemical Society. 1977.
- [15] Matyjaszewski Krzysztof, "Overview: Fundamentals of Controlled/Living Radical Polymerization", in *Controlled Radical Polymerization* American Chemical Society. 1998, p. 2-30 ff.
- [16] K. Matyjaszewski, T. P. Davis, "Frontmatter", in *Handbook of Radical Polymerization* John Wiley & Sons, Inc. 2003, p. 1 ff.
- [17] K. Matyjaszewski, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 1996, *1*, 769–776.
- [18] S. Gaynor, D. Greszta, D. Mardare, M. Teodorescu, K. Matyjaszewski, *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 1994, *31*, 1561–1578.
- [19] J. Bühler, S. Muth, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromol. Rapid Commun.* 2013, *34*, 588-594.
- [20] D. Weller, J. R. McDaniel, K. Fischer, A. Chilkoti, M. Schmidt, *Macromolecules* 2013, *46*, 4966–4971.
- [21] M. Wintermantel, M. Gerle, K. Fischer, M. Schmidt, I. Wataoka, H. Urakawa, K. Kajiwara, Y. Tsukahara, *Macromolecules* 1996, *29*, 978–983.
- [22] Y. Tsukahara, K. Mizuno, A. Segawa, Y. Yamashita, *Macromolecules* 1989, *22*, 1546–1552.
- [23] M. Wintermantel, M. Schmidt, Y. Tsukahara, K. Kajiwara, S. Kohjiya, *Macromol. Rapid Commun.* 1994, *15*, 279–284.
- [24] P. Dziezok, K. Fischer, M. Schmidt, S. S. Sheiko, M. Möller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997, *36*, 2812–2815.
- [25] B. Zhang, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromol. Chem. Phys.* 2005, *206*, 157–162.
- [26] M. Gerle, K. Fischer, S. Roos, A. H. E. Müller, M. Schmidt, S. S. Sheiko, S. Prokhorova, M. Möller, *Macromolecules* 1999, *32*, 2629–2637.

- [27] A. P. Vogt, B. S. Sumerlin, *Macromolecules* 2006, 39, 5286–5292.
- [28] L. Ayres, M. R. J. Vos, P. J. H. M. Adams, I. O. Shklyarevskiy, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* 2003, 36, 5967–5973.
- [29] D. Neugebauer, Y. Zhang, T. Pakula, S. S. Sheiko, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* 2003, 36, 6746–6755.
- [30] H. G. Börner, K. Matyjaszewski, *Macromol. Symp.* 2002, 177, 1–16.
- [31] 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, 6094–6099.
- [32] D. Pantazis, I. Chalari, N. Hadjichristidis, *Macromolecules* 2003, 36, 3783–3785.
- [33] R. D. Puts, D. Y. Sogah, *Macromolecules* 1997, 30, 7050–7055.
- [34] S. Jha, S. Dutta, N. B. Bowden, *Macromolecules* 2004, 37, 4365–4374.
- [35] M. Schappacher, A. Deffieux, *Macromol. Chem. Phys.* 1997, 198, 3953–3961.
- [36] Y. Yan, Y. Shi, W. Zhu, Y. Chen, *Polymer* 2013.
- [37] C. Li, Z. Ge, J. Fang, S. Liu, *Macromolecules* 2009, 42, 2916–2924.
- [38] J. Ruokolainen, M. Torkkeli, R. Serimaa, E. Komanshek, G. ten Brinke, O. Ikkala, *Macromolecules* 1997, 30, 2002–2007.
- [39] J. de Wit, G. A. van Ekenstein, E. Polushkin, J. Korhonen, J. Ruokolainen, G. ten Brinke, *Macromolecules* 2009, 42, 2009–2014.
- [40] S. Valkama, T. Ruotsalainen, A. Nykänen, A. Laiho, H. Kosonen, G. ten Brinke, O. Ikkala, J. Ruokolainen, *Macromolecules* 2006, 39, 9327–9336.
- [41] M. Antonietti, J. Conrad, A. Thuenemann, *Macromolecules* 1994, 27, 6007–6011.
- [42] M. Sahl, S. Muth, R. Branscheid, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromolecules* 2012, 45, 5167–5175.
- [43] H. G. Börner, K. Beers, K. Matyjaszewski, S. S. Sheiko, M. Möller, *Macromolecules* 2001, 34, 4375–4383.
- [44] G. Cheng, A. Böker, M. Zhang, G. Krausch, A. H. E. Müller, *Macromolecules* 2001, 34, 6883–6888.
- [45] M. Sahl, S. Muth, R. Branscheid, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromolecules* 2012, 45, 5167–5175.
- [46] Mike Sahl, *Synthese und Charakterisierung von zylindrischen Bürsten mit Polypeptidseitenketten*, Mainz. 2011.
- [47] A. Zhang, Y. Guo, *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 8939–8946.
- [48] A. J. Rhodes, T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 19463–19467.
- [49] L. Ayres, K. Koch, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* 2005, 38, 1699–1704.
- [50] Y. Cong, N. Gunari, B. Zhang, A. Janshoff, M. Schmidt, *Langmuir* 2009, 25, 6392–6397.
- [51] N. Gunari, Y. Cong, B. Zhang, K. Fischer, A. Janshoff, M. Schmidt, *Macromol. Rapid Commun.* 2008, 29, 821–825.
- [52] H. Bader, H. Ringsdorf, B. Schmidt, *Angew. Makromol. Chem.* 1984, 123, 457–485.
- [53] N. Peppas, R. Langer, Eds., *Biopolymers II*, Springer Berlin Heidelberg. 1995.
- [54] Yasuhiro Matsumura and Hiroshi Maeda, *Cancer Research* 1986, 46, 6387–6392.
- [55] M. E. Fox, F. C. Szoka, J. M. J. Fréchet, *Acc. Chem. Res.* 2009, 42, 1141–1151.
- [56] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angewandte Chemie* 2010, 122, 6430–6452.
- [57] Ruth Duncan, *Adv. Polym. Sci.* 1984, 57, 51–101.
- [58] Y. Chen, *Macromolecules* 2012, 45, 2619–2631.
- [59] M. Liang, I.-C. Lin, M. R. Whittaker, R. F. Minchin, M. J. Monteiro, I. Toth, *ACS Nano* 2009, 4, 403–413.
- [60] J. A. Champion, S. Mitragotri, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103, 4930–4934.

- [61] G. Sharma, D. T. Valenta, Y. Altman, S. Harvey, H. Xie, S. Mitragotri, J. W. Smith, *Journal of Controlled Release* 2010, 147, 408–412.
- [62] S. Cai, K. Vijayan, D. Cheng, E. M. Lima, D. E. Discher, *Pharm Res.* 2007, 24, 2099–2109.
- [63] C. C. Lee, M. Yoshida, J. M. J. Fréchet, E. E. Dy, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* 2005, 16, 535–541.
- [64] E. E. Uzgiris, H. Cline, B. Moasser, B. Grimmond, M. Amaratunga, J. F. Smith, G. Goddard, *Biomacromolecules* 2003, 5, 54–61.
- [65] E. Uzgiris, *Invest. Radiol.* 2004, 39, 131–137.
- [66] L. J. Harris, T. W. Birch, *Biochem. J.* 1930, 24, 1080–1097.
- [67] S. Jiang, Z. Cao, *Adv. Mater.* 2010, 22, 920–932.
- [68] C. L. M. A. B. Lowe, *Chem. Rev.* 2002, 102, 4177–4189.
- [69] S. Chen, L. Li, C. Zhao, J. Zheng, *Polymer* 2010, 51, 5283–5293.
- [70] H. Morawetz, "Polyelectrolyte Solutions: Phenomena and Interpretation", in *Polyelectrolytes and Polyzwitterions* American Chemical Society. 2006, p. 1-18 ff.
- [71] T. Alfrey, H. Morawetz, *J. Am. Chem. Soc.* 1952, 74, 436–438.
- [72] T. Alfrey, R. M. Fuoss, H. Morawetz, H. Pinner, *J. Am. Chem. Soc.* 1952, 74, 438–441.
- [73] S. Kudaibergenov, W. Jaeger, A. Laschewsky, "Polymeric Betaines: Synthesis, Characterization, and Application", in *Advances in Polymer Science* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. 2006, p. 157 ff.
- [74] M. Ballauff, A. Batog, J. Bolze, N. Dingenouts, S. Kudaibergenov, P. Penczek, I. Pet'ko, D. Pötschke, *Adv. Polym. Sci.* 1999, 144, 1–209.
- [75] B. Yu, A. B. Lowe, K. Ishihara, *Biomacromolecules* 2009, 10, 950–958.
- [76] P. K. Singh, V. K. Singh, M. Singh, *e-Polymers* 2006, 030, 1–34.
- [77] L. Shen, J. Du, S. P. Armes, S. Liu, *Langmuir* 2008, 24, 10019–10025.
- [78] Q. S. Mu, X. B. Zhao, J. R. Lu, S. P. Armes, A. L. Lewis, R. K. Thomas, *J. Phys. Chem. B.* 2008, 112, 9652–9659.
- [79] J. Li, T. Wang, D. Wu, X. Zhang, J. Yan, S. Du, Y. Guo, J. Wang, A. Zhang, *Biomacromolecules* 2008, 9, 2670–2676.
- [80] N. Karanikolopoulos, M. Pitsikalis, N. Hadjichristidis, K. Georgikopoulou, T. Calogeropoulou, J. R. Dunlap, *Langmuir* 2007, 23, 4214–4224.
- [81] Di Wang, T. Wu, X. Wan, X. Wang, S. Liu, *Langmuir* 2007, 23, 11866–11874.
- [82] J. Du, Y. Tang, A. L. Lewis, S. P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 17982–17983.
- [83] K. M. Johnson, M. J. Fevola, C. L. McCormick, *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, 92, 647–657.
- [84] J. Virtanen, M. Arotçaréna, B. Heise, S. Ishaya, A. Laschewsky, H. Tenhu, *Langmuir* 2002, 18, 5360–5365.
- [85] R. S. Armentrout, C. L. McCormick, *Macromolecules* 1999, 33, 419–424.
- [86] A. B. Lowe, N. C. Billingham, S. P. Armes, *Macromolecules* 1999, 32, 2141–2148.
- [87] C. Konak, R. C. Rathi, P. Kopeckova, J. Kopecek, *Macromolecules* 1994, 27, 1992–1996.
- [88] E. E. L. Kathmann, D. D. Davis, C. L. McCormick, *Macromolecules* 1994, 27, 3156–3161.
- [89] M. Kobayashi, Y. Terayama, M. Kikuchi, A. Takahara, *Soft Matter* 2013, 9, 5138.
- [90] Y. Matsuda, M. Kobayashi, M. Annaka, K. Ishihara, A. Takahara, *Langmuir* 2008, 24, 8772–8778.
- [91] M. Kikuchi, Y. Terayama, T. Ishikawa, T. Hoshino, M. Kobayashi, H. Ogawa, H. Masunaga, J.-i. Koike, M. Horigome, K. Ishihara, A. Takahara, *Polym J.* 2012, 44, 121–130.
- [92] M. J. Fevola, J. K. Bridges, M. G. Kellum, R. D. Hester, C. L. McCormick, *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, 94, 24–39.
- [93] M. B. Huglin, M. A. Radwan, *Polym. Int.* 1991, 26, 97–104.
- [94] A. Niu, D.-J. Liaw, H.-C. Sang, C. Wu, *Macromolecules* 2000, 33, 3492–3494.

- [95] M. B. Huglin, M. A. Radwan, *Macromolecules* 1992, 25, 999–1002.
- [96] M. B. Huglin, M. A. Radwan, *Makromol. Chem.* 1991, 192, 2433–2445.
- [97] D.-J. Liaw, W.-F. Lee, Y.-C. Whung, M.-C. Lin, *J. Appl. Polym. Sci.* 1987, 34, 999–1011.
- [98] A. V. Lezov, P. S. Vlasov, A. A. Lezov, N. S. Domnina, G. E. Polushina, *Polym. Sci. Ser. A* 2011, 53, 1012–1018.
- [99] A. A. Lezov, P. S. Vlasov, G. E. Polushina, A. V. Lezov, *Macromol. Symp.* 2012, 316, 17–24.
- [100] P. K. Singh, V. K. Singh, M. Singh, *e-Polymers* 2007, 030, 1.
- [101] A. B. Lowe, C. L. McCormick, *Chem. Rev.* 2002, 102, 4177–4190.
- [102] W. Yang, H. Xue, L. R. Carr, J. Wang, S. Jiang, *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 26, 2454–2459.
- [103] B. D. Ratner, S. J. Bryant, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2004, 6, 41–75.
- [104] S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhardt, M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 9359–9366.
- [105] S. Chen, L. Li, C. L. Boozer, S. Jiang, *Langmuir* 2000, 16, 9287–9293.
- [106] Y. He, Y. Chang, J. C. Hower, J. Zheng, S. Chen, S. Jiang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008, 10, 5539–5544.
- [107] Y. He, J. Hower, S. Chen, M. T. Bernardis, Y. Chang, S. Jiang, *Langmuir* 2008, 24, 10358–10364.
- [108] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. de Gennes, *Journal of Colloid and Interface Science* 1991, 142, 149–158.
- [109] S. I. Jeon, J. D. Andrade, *Journal of Colloid and Interface Science* 1991, 142, 159–166.
- [110] Harris JM, *Poly(ethylene glycol) chemistry - biotechnical and biomedical applications* 1992.
- [111] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir* 2001, 17, 5605–5620.
- [112] M. T. Bernardis, G. Cheng, Z. Zhang, S. Chen, S. Jiang, *Macromolecules* 2008, 41, 4216–4219.
- [113] G. Li, H. Xue, C. Gao, F. Zhang, S. Jiang, *Macromolecules* 2009, 43, 14–16.
- [114] Kristin Rausch, *Interaktions- und Aggregationsverhalten von Nanopartikeln in Blutserum*, Mainz. 2013.
- [115] N. Y. Kostina, C. Rodriguez-Emmenegger, M. Houska, E. Brynda, J. Michálek, *Biomacromolecules* 2012.
- [116] C. Rodriguez Emmenegger, E. Brynda, T. Riedel, Z. Sedlakova, M. Houska, A. B. Alles, *Langmuir* 2009, 25, 6328–6333.
- [117] J. Ladd, Z. Zhang, S. Chen, J. C. Hower, S. Jiang, *Biomacromolecules* 2008, 9, 1357–1361.
- [118] K. Shiraishi, M. Kohta, K. Sugiyama, *Chemistry Letters* 2004, 33, 646–647.
- [119] R. Hamawaki, A. Tominaga, K. Shiraishi, K. Sugiyama, Y. Nitta, T. Nakatani, K. Okamoto, *Journal of Photopolymer Science and Technology* 2011, 24, 447–452.
- [120] R. Dias, S. Mel'nikov, B. Lindman, M. G. Miguel, *Langmuir* 2000, 16, 9577–9583.
- [121] D. D. Lasic, H. Strey, M. C. A. Stuart, R. Podgornik, P. M. Frederik, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 832–833.
- [122] S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeev, K. Yoshikawa, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 9951–9956.
- [123] M.-L. Öberg, K. Schillén, T. Nylander, *Biomacromolecules* 2007, 8, 1557–1563.
- [124] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Kriegelstein, T. Kissel, *Biomaterials* 2003, 24, 1121–1131.
- [125] M.-L. Ainalem, N. Kristen, K. J. Edler, F. Höök, E. Sparr, T. Nylander, *Langmuir* 2009, 26, 4965–4976.

- [126] Z. Zhang, G. Cheng, L. R. Carr, H. Vaisocherová, S. Chen, S. Jiang, *Biomaterials* 2008, 29, 4719–4725.
- [127] Frauke Kühn, *Dissertation*, Mainz. 2010.
- [128] L. Robert, M. P. Jacob, T. Fülöp, “Elastin in Blood Vessels”, in *Ciba Foundation Symposium 192 - The Molecular Biology and Pathology of Elastic Tissues* John Wiley & Sons, Ltd. 2007, p. 286 ff.
- [129] J. A. Foster, E. Bruenger, W. R. Gray, L. B. Sandberg, *Journal of Biological Chemistry* 1973, 248, 2876–2879.
- [130] L. Debelle, A. M. Tamburro, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999, 31, 261–272.
- [131] D. W. Urry, *Ultrastruct Pathol.* 1983, 4, 227–251.
- [132] A. Pepe & A. M. Tamburro, *Nanomedicine* 2007, 2, 203–218.
- [133] D. W. Urry, *J. Phys. Chem. B.* 1997, 101, 11007–11028.
- [134] M. Martino, A. M. Tamburro, *Biopolymers* 2001, 59, 29–37.
- [135] M. Martino, A. Coviello, A. M. Tamburro, *International Journal of Biological Macromolecules* 2000, 27, 59–64.
- [136] C. Spezzacatena, T. Perri, V. Guantieri, L. B. Sandberg, T. F. Mitts, A. M. Tamburro, *Eur. J. Org. Chem.* 2002, 2002, 95–103.
- [137] C. M. Venkatachalam, D. W. Urry, *Macromolecules* 1981, 14, 1225–1229.
- [138] B. Li, D. O. V. Alonso, V. Daggett, *Journal of Molecular Biology* 2001, 305, 581–592.
- [139] A. M. Tamburro, A. Pepe, B. Bochicchio, *Biochemistry* 2006, 45, 9518–9530.
- [140] D. W. Urry, R. G. Shaw, K. U. Prasad, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1985, 130, 50–57.
- [141] D. W. Urry, *J. Phys. Chem. B.* 1997, 101, 11007–11028.
- [142] Peter C. Groß and Michael Zeppezauer, *Z. Naturforsch C.* 2003, 58, 873–878.
- [143] F. Lelj, A. M. Tamburro, V. Villan, P. Grimaldi, V. Guantieri, *Biopolymers* 1992, 32, 161–172.
- [144] A. M. Tamburro, V. Guantieri, L. Pandolfo, A. Scopa, *Biopolymers* 1990, 29, 855–870.
- [145] A. M. Tamburro, *Nanomedicine* 2009, 4, 469–487.
- [146] D. W. Urry, *Perspect. Biol. Med.*, 21, 265–295.
- [147] V. Guantieri, A. M. Jaques, A. Serafini-Fracassini, A. M. Tamburro, *Biopolymers* 1987, 26, 1957–1963.
- [148] R. Flamia, P. A. Zhdan, M. Martino, J. E. Castle, A. M. Tamburro, *Biomacromolecules* 2004, 5, 1511–1518.
- [149] D. W. Urry, *Journal of Biological Chemistry* 1974, 249, 907–908.
- [150] D. Volpin, D. W. Urry, B. A. Cox, L. Gotte, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 1976, 439, 253–258.
- [151] A. M. Tamburro, *Journal of Biological Chemistry* 2004, 280, 2682–2690.
- [152] D. W. Urry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 819–841.
- [153] M. Pechar, J. Brus, L. Kostka, Č. Koňák, M. Urbanová, M. Šlouf, *Macromol. Biosci.* 2007, 7, 56–69.
- [154] J. C. Rodríguez-Cabello, M. Alonso, T. Pérez, M. M. Herguedas, *Biopolymers* 2000, 54, 282–288.
- [155] J. C. Rodríguez-Cabello, L. Martín, M. Alonso, F. J. Arias, A. M. Testera, *Polymer* 2009, 50, 5159–5169.
- [156] D. W. Urry, D. C. Gowda, T. M. Parker, C.-H. Luan, M. C. Reid, C. M. Harris, A. Pattanaik, R. D. Harris, *Biopolymers* 1992, 32, 1243–1250.
- [157] D. W. Urry, T. L. Trapane, K. U. Prasad, *Biopolymers* 1985, 24, 2345–2356.
- [158] D. E. Meyer, A. Chilkoti, *Biomacromolecules* 2004, 5, 846–851.
- [159] H. e. a. Reiersen, *J. Mol. Biol.* 1998, 283, 255–264.

- [160] J. Carlos Rodríguez-Cabello, J. Reguera, A. Girotti, M. Alonso, A. M. Testera, *Progress in Polymer Science* 2005, 30, 1119–1145.
- [161] M. R. Dreher, A. J. Simnick, K. Fischer, R. J. Smith, A. Patel, M. Schmidt, A. Chilkoti, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 130, 687–694.
- [162] H. Kurihara, T. Morita, M. Shinkai, T. Nagamune, *Biotechnol Lett.* 2005, 27, 665–670.
- [163] L. Mi, *Biomacromolecules* 2006, 7, 2099–2107.
- [164] J. H. Lee, P. M. Skowron, S. M. Rutkowska, S. S. Hong, S. C. Kim, *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1996, 13, 139–145.
- [165] S. Ståhl, A. Sjölander, M. Hansson, P.-Å. Nygren, M. Uhlén, *Gene* 1990, 89, 187–193.
- [166] R. A. McMillan, T. A. T. Lee, V. P. Conticello, *Macromolecules* 1999, 32, 3643–3648.
- [167] K. A. Padgett, J. A. Sorge, *Gene*. 1996, 168, 31–35.
- [168] D. E. Meyer, A. Chilkoti, *Biomacromolecules* 2002, 3, 357–367.
- [169] J. R. McDaniel, J. A. MacKay, F. G. Quiroz, A. Chilkoti, *Biomacromolecules* 2010, 11, 944–952.
- [170] S. R. MacEwan, A. Chilkoti, *Biopolymers* 2010, 94, 60–77.
- [171] K. Trabbic-Carlson, L. Liu, B. Kim, A. Chilkoti, *Protein Science* 2004, 13, 3274–3284.
- [172] S. Moktan, E. Perkins, F. Kratz, D. Raucher, *Molecular Cancer Therapeutics* 2012, 11, 1547–1556.
- [173] G. L. Bidwell, A. N. Davis, I. Fokt, W. Priebe, D. Raucher. *Invest New Drugs* 2007, 25, 313–326.
- [174] M. R. Dreher, W. Liu, C. R. Michelich, M. W. Dewhirst, A. Chilkoti, *Cancer Research* 2007, 67, 4418–4424.
- [175] J. R. McDaniel, J. Bhattacharyya, K. B. Vargo, W. Hassouneh, D. A. Hammer, A. Chilkoti, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, n/a.
- [176] M. R. Dreher, D. Raucher, N. Balu, O. Michael Colvin, S. M. Ludeman, A. Chilkoti, *Proceedings of the Second International Symposium on Tumor Targeted Delivery Systems* 2003, 91, 31–43.
- [177] J. R. McDaniel, S. R. MacEwan, M. Dewhirst, A. Chilkoti, *Journal of Controlled Release* 2012, 159, 362–367.
- [178] J. Andrew MacKay, M. Chen, J. R. McDaniel, W. Liu, A. J. Simnick, A. Chilkoti, *Nat Mater.* 2009, 8, 993–999.
- [179] H. Betre, W. Liu, M. R. Zalutsky, A. Chilkoti, V. B. Kraus, L. A. Setton, *Journal of Controlled Release* 2006, 115, 175–182.
- [180] H. Betre, L. A. Setton, D. E. Meyer, A. Chilkoti, *Biomacromolecules* 2002, 3, 910–916.
- [181] R. L. M. Teeuwen, F. A. de Wolf, H. Zuilhof, J. C. M. van Hest, *Soft Matter*. 2009, 5, 4305.
- [182] F. Fernández-Trillo, J. C. M. van Hest, J. C. Thies, T. Michon, R. Weberskirch, N. R. Cameron, *Chem. Commun.* 2008, 2230.
- [183] F. Fernández-Trillo, J. C. M. van Hest, J. C. Thies, T. Michon, R. Weberskirch, N. R. Cameron, *Adv. Mater.* 2009, 21, 55–59.

3 Charakterisierungsmethoden

3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) ermöglicht neben der Trennung auch die Identifizierung von Substanzen durch die Kopplung mit spektroskopischen Methoden (FTIR, UV-Array, NMR, Masse).

Das Trennprinzip der Chromatografie beruht auf den unterschiedlichen Wechselwirkungen der zu untersuchenden Moleküle mit der stationären und der mobilen Phase. Die in der mobilen Phase, auch Eluent genannt gelöste Probe wird durch eine mit der stationären Phase gefüllte Trennsäule gepumpt. Für die stationäre Phase wird Füllmaterial mit kleiner Körngröße (3-10 μm) und enger Größenverteilung verwendet, wodurch eine hohe Trennleistung gewährleistet wird. Unterschiedlich starke Wechselwirkungen zwischen der Probe mit der stationären und der mobilen Phase beeinflussen das Elutionsverhalten. Die Substanz wird nach Verlassen der Säule über einen Detektor nachgewiesen. Zur Detektion von Aminosäuren und Peptiden werden häufig UV-Detektoren verwendet, die die Probe in einem Wellenlängenbereich von 220-250 nm detektieren.

Im Chromatogramm erscheinen die getrennten Stoffe als Messsignale (Peaks) mit unterschiedlicher zeitlicher Verschiebung und Größe. Die Retentionszeit (t_R) ist die Zeit zwischen dem Einspritzen der Probe und dem Auftreten des Peakmaximums und für die zu untersuchenden Substanzen charakteristisch. Sie ist jedoch von der Art der mobilen bzw. stationären Phase sowie der Temperatur und der Durchflussgeschwindigkeit abhängig. Die Durchflusszeit, auch als Totzeit bezeichnet entspricht der Zeit, die der Eluent benötigt um durch die Säule mit der stationären Phase zu fließen.

Es besteht eine Proportionalität zwischen der Peakfläche und der eingespritzten Menge der Probe, wodurch eine quantitative Analyse bei entsprechender Kalibrierung möglich wird.

3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

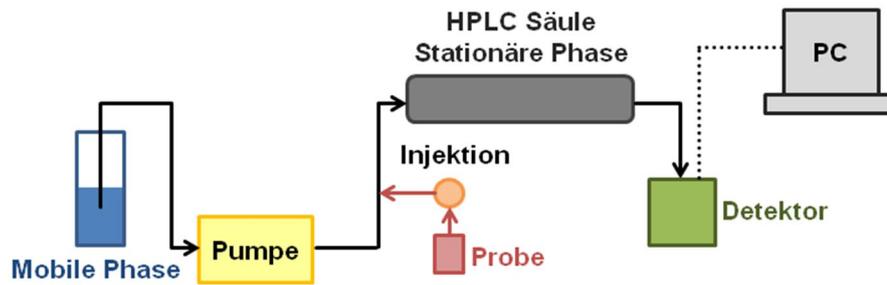


Abbildung 3 - 1: Schematischer Aufbau einer Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-Messanlage.

Bei der HPLC wird zwischen zwei Methoden unterschieden: der Normalphasen- (NP) und der Umkehrphasenmethode (RP).

Eine polare stationäre Phase findet man bei der NP-HPLC vor. Die Elutionskraft der mobilen Phase hängt von ihrer Polarität ab und steigt mit zunehmender Polarität des Eluenten an (elutrope Reihe). Aufgrund der nichtwässrigen, unpolaren Eluenten findet diese Methode im Bereich der Biomakromoleküle keine Anwendung und man bedient sich bei wässrigen Systemen der RP-HPLC [1].

Bei der in der RP-HPLC verwendeten unpolaren stationären Phase handelt es sich meist um Silicagel-Partikel, die mit einer kovalent gebundenen Schicht hydrophober Alkane belegt ist. Es kann jedoch auch eine stationäre Phase aus einer weitgehend quervernetzten makroporösen, sphärischen Polystyrol-Divinylbenzol-Polymermatrix benutzt werden. Der Eluent ist in diesem Fall wässrig, polar. Die Retentionszeit t_R der Probe steigt somit mit zunehmender Hydrophobizität des Coeluenten entgegen der elutrophen Reihe der NP-HPLC.

Im Gegensatz zur isokratischen Trennung, bei der die Zusammensetzung des Lösungsmittels konstant bleibt, verändert sich bei der Gradiententrennung die Zusammensetzung und somit die Polarität des Eluenten.

Neben einer qualitativen Untersuchung von Substanzen ist auch die quantitative Trennung von verschiedenen Molekülen über eine präparative HPLC-Säule möglich.

3.2 Gelpermeationschromatografie

Die Gelpermeationschromatografie (GPC), auch „size exclusion chromatography“ (SEC) genannt, ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Bestimmung der Molmassenmittelwerte und -verteilungen von Polymeren [2]. Die GPC gehört zu den Relativmethoden, sodass eine vorherige Kalibrierung für die Bestimmung des Molekulargewichts notwendig ist. Bei dieser Variante der Flüssigkeitschromatografie wird eine verdünnte Polymerprobe im Lösemittelstrom durch mehrere Säulen mit porösem Füllmaterial transportiert. Das verwendete Füllmaterial besteht aus hochvernetzten Polystyrolkugeln mit definierter Porengröße, die vom Vernetzungsgrad des Polystyrols abhängig ist. Nach Zugabe des Elutionsmittels quellen diese Polystyrolkugeln auf und bilden dadurch Hohlräume in ihrem Inneren aus, die für die Trennung notwendig sind.

Die Trennung erfolgt über die unterschiedlichen hydrodynamischen Radien. Moleküle mit einem geringen hydrodynamischen Radius diffundieren während des Transports in die Poren des Füllmaterials und eluieren später als Moleküle mit einem größeren hydrodynamischen Radius. Das obere und untere Ausschlussvolumen wird durch die Molekülgröße definiert: Sind die Moleküle zu klein, diffundieren sie in jede Pore, sind die Moleküle hingegen zu groß, diffundieren sie gar nicht in die Poren und gelangen ungehindert durch die Säule. In beiden Fällen kommt es nicht zu einer Auftrennung. Wechselwirkungen zwischen der Probe und der stationären Phase sind unerwünscht, stellen jedoch ein häufiges Problem bei Polyelektrolyten dar.

Die Detektion erfolgt in der Regel durch einen Brechungsindexdetektor und/oder einen UV-Detektor. Das Signal und die Massenkonzentration des Polymers im Eluat sind in beiden Fällen proportional.

Durch Kalibrierung mit eng verteilten Standardproben unterschiedlicher Molmasse werden Molekulargewicht und Elutionsvolumen miteinander korreliert. Als Standards werden meist lineare Homopolymere eingesetzt, was bei der Vermessung von Proben mit anderer Polymerarchitektur zu Problemen führen kann. Das hydrodynamische Volumen V_h ist proportional zum Molekulargewicht und zur intrinsischen Viskosität des Polymers, die sich mit abweichender Polymerstruktur stark verändern kann.

3.3 Lichtstreuung

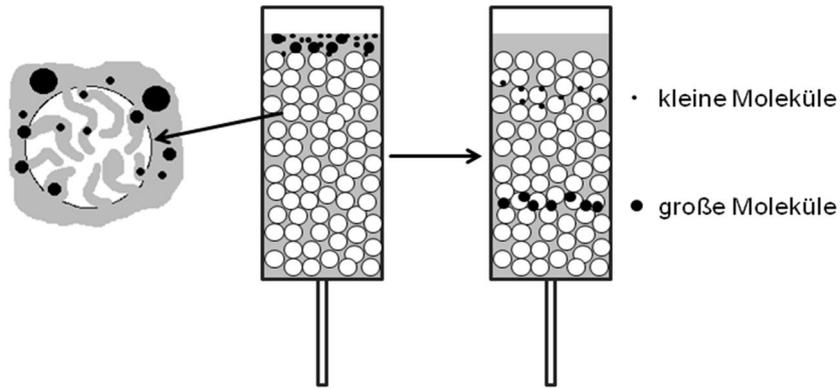


Abbildung 3 - 2: Schematischer Aufbau und Funktionsprinzip der GPC.

Über die Mark-Kuhn-Houwink Beziehung kann eine universelle Kalibrierung erstellt werden [3]-[5].

$$[\eta] = k \cdot M^a \quad (3.2.1)$$

Sie verknüpft die intrinsische Viskosität $[\eta]$ mit dem Molekulargewicht M , dabei müssen die Konstanten k und a allerdings für das Polymer bekannt sein. Wird die universelle Größe $[\eta] \cdot M$ gegen das Elutionsvolumen bei bekanntem Staudingerindex aufgetragen, kann die Molmasse unabhängig von der Topologie bestimmen werden.

3.3 Lichtstreuung

Mittels Lichtstreuung können Molekulargewicht, Partikelgröße und -form sowie der Diffusionskoeffizient von Polymeren und Nanopartikeln in Lösung bestimmt werden.

Grundlegend dafür ist die Induktion eines oszillierenden elektrischen Dipolmoments im Molekül durch die eingehende elektromagnetische Welle. Das Molekül wirkt damit selbst als eine Art Sender, von dem elektromagnetische Strahlung gleicher Wellenlänge (elastische Strahlung) ausgeht, welche dann winkelabhängig detektiert werden kann.

Die Polarisierbarkeit α dieses streuenden Moleküls sowie der elektrische Feldvektor \vec{E} der anregenden Strahlung haben Einfluss auf die Richtung und Stärke des erzeugten Dipolmoments \vec{m} .

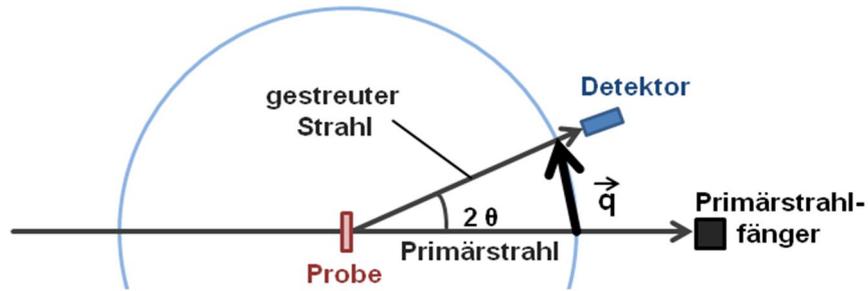


Abbildung 3 - 3: Skizze einer Lichtstreuungsanlage mit Streuwinkel θ und dem Streuvektor \vec{q} .

Es wird zwischen zwei verschiedenen Methoden unterschieden: 1) Bei der statischen Lichtstreuung erhält man aus dem zeitlichen Mittel der winkelabhängigen Intensität, extrapoliert auf Streuwinkel Null Informationen über das massenverteilte Gewichtsmittel $\overline{M_w}$ und aus der Konzentrationsabhängigkeit den zweiten Virialkoeffizienten des osmotischen Drucks A_2 sowie das z-Mittel des quadratischen Trägheitsradius $\langle R_g^2 \rangle_z$. 2) Die dynamische Lichtstreuung hingegen betrachtet die zeitlichen Fluktuationen der Intensität, wodurch Informationen über die Teilchenmobilität (Diffusionskoeffizient) und den hydrodynamischen Radius erhalten werden können. Der schematische Aufbau einer Lichtstreuungsanlage ist in Abbildung 3 - 3 gezeigt.

Statische Lichtstreuung

Basierend auf den Entdeckungen von Lord Rayleigh zur Induktion von Dipolmomenten in Gasmolekülen durch Lichteinstrahlung entstand die grundlegende Theorie der Lichtstreuung [6]. Von Einstein[7], Debye[8] und Smoluchowski[9] wurde diese Theorie weiter zur Fluktuationstheorie entwickelt. Streuung kann in Lösungen nur auftreten, wenn Unterschiede im Brechungsindex für einen kleinen Volumenbereich im Vergleich zum benachbarten Medium bestehen. Da α in einer Lösung oder Flüssigkeit als Funktion der Dichtefluktuations- und der Konzentrationsfluktuation beschrieben wird, ergibt sich für Lösungen mit Teilchen kleiner $\lambda/20$ ($R = 10$ nm, $d = 20$ nm) ein Rayleigh-Verhältnis von:

$$R(\theta) = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_L} \left[\rho n_0^2 \left(\frac{dn}{d\rho} \right)^2 RT\beta + \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 RT \frac{M_0}{\rho_0} \frac{c}{\left(\frac{-d\Delta\mu}{dc} \right)} \right] \quad (3.3.1)$$

3.3 Lichtstreuung

$R(\theta)$: Rayleigh-Verhältnis

λ_0 : Wellenlänge des Primärstrahls

N_L : Avogadrokonstante

ρ, ρ_0 : Dichte der Lösung und des Lösungsmittels

n, n_0 : Brechungsindex der Lösung und des Lösungsmittels

R : Ideale Gaskonstante

T : Temperatur

β : Isotherme Kompressibilität

M_0 : Molekulargewicht des Lösungsmittels

$\Delta\mu$: Differenz der chemischen Potentiale von Lösung und Lösungsmittel

c : Konzentration der Probe

$\left(\frac{dn}{d\rho}\right)$: Brechungsindexinkrement (nach der Dichte)

$\left(\frac{dn}{dc}\right)$: Brechungsindexinkrement (nach der Konzentration)

Um vom experimentellen Aufbau abhängige Parameter zu eliminieren, muss die absolute Streuintensität des reinen Lösungsmittels bestimmt werden, da die gemessene Streuintensität I nur in relativen Einheiten gemessen wird. Aus ihr können andere absolute Streuintensitäten bestimmt werden. Für das Rayleigh-Verhältnis $R(\theta)$ gilt:

$$R(\theta) = \frac{I(\theta)_L - I(\theta)_{LM}}{I(\theta)_{Std.}} I(\theta)_{Std.abs.} \quad (3.3.2)$$

Für verdünnte Lösungen kann angenommen werden, dass sich der Beitrag der Dichtefluktuation für die Lösung (L) und für das Lösungsmittels (LM) nicht unterscheidet und somit gilt:

$$R(\theta) = R(\theta)_L - R(\theta)_{LM} = \frac{4 \pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_L} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 RT \frac{M_0}{\rho_0} \frac{c}{\left(\frac{-d\Delta\mu}{dc}\right)} \quad (3.3.3)$$

Die konzentrationsabhängige Änderung des chemischen Potentials kann als Änderung des osmotischen Drucks mit der Konzentration verstanden werden. Daraus ergibt sich nach Verwendung einer Reihenentwicklung für den osmotischen Druck in Abhängigkeit von der Konzentration:

$$-\left(\frac{d\Delta\mu}{dc}\right) = \frac{M_0}{\rho_0} \left(\frac{d\pi}{dc}\right) = \frac{M_0}{\rho_0} RT \left(\frac{1}{M} + 2A_2c + \dots\right) \quad (3.3.4)$$

A_2 : zweiter Virialkoeffizient

M : Molekulargewicht des gelösten Stoffs

π : osmotischer Druck

Durch Einsetzen von Gleichung 3.3.4 in 3.3.3 ergibt sich mit dem Kontrastfaktor K :

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{M} + 2A_2c + \dots \quad (3.3.5)$$

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_L} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2$$

Polymere mit einer Partikelgröße größer $\lambda/20$ können nicht mehr als Punktstreuer bezeichnet werden und der Beitrag intrapartikulärer zur winkelabhängigen Streuintensität muss berücksichtigt werden. Dies geschieht durch die Einführung des Formfaktors $P(q)$, der die Winkelabhängigkeit der Streuintensität beschreibt und von der Geometrie des Teilchens abhängig ist.

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{MP(q)} + 2A_2c \quad (3.3.6)$$

$$P(q) = \frac{1}{N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle \exp(iqr_{ij}) \rangle$$

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$$

$r_{ij} = r_i - r_j$: Abstandsvektor der Streuzentren i und j

q : Streuvektor

N : Anzahl der Streuzentren

θ : Streuwinkel

Über eine Taylorentwicklung wird für kleine q für den Formfaktor folgendes erhalten:

$$P(q) = 1 - \frac{q^2}{3! N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle r_{ij}^2 \rangle + \dots \quad (3.3.7)$$

3.3 Lichtstreuung

Das Quadrat des Trägheitsradius ist wie folgt definiert:

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_i^N \langle r_i^2 \rangle = \frac{1}{2N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle r_{ij}^2 \rangle \quad (3.3.8)$$

und somit ergibt sich durch Einsetzen von Gleichung 3.3.8 in 3.3.7:

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle + \dots \quad (3.3.9)$$

Diese Gleichung gilt jedoch nur für monodisperse Proben, wenn die Polydispersität berücksichtigt wird ergibt sich für das Quadrat des Trägheitsradius:

$$\langle R_g^2 \rangle_z = \frac{\sum_i m_i M_i \langle R_g^2 \rangle_i}{\sum_i m_i M_i} \quad (3.3.10)$$

und somit für $P(q)$:

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z + \dots \quad (3.3.11)$$

Unter Verwendung folgender Beziehung:

$$1 - x = \frac{1}{1 + x} \quad (3.3.12)$$

$$x = \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z$$

und anschließendem Einsetzen von $P(q)$ in Gleichung 3.3.5 ergibt sich die Zimm-Gleichung für polydisperse Systeme:

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z \right) + 2A_2c \quad (3.3.13)$$

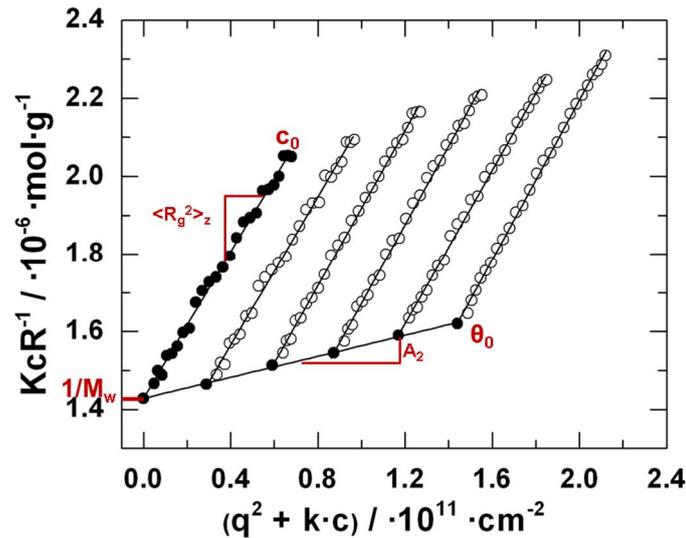


Abbildung 3 - 4: Exemplarischer Zimm-Plot mit gemessenen Werten (weiße Punkte) und extrapolierten Werten (schwarze Punkte) für c_0 und θ_0 , worüber $1/M_w$, $\langle R_g^2 \rangle_z$ sowie A_2 bestimmt werden können.

Trägt man $\frac{Kc}{R(\theta)}$ gegen $q^2 + kc$ bzw. $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + k'c$ auf so ergibt sich ein Zimm-Plot

(Abbildung 3 - 4) mit den Spreizfaktor k bzw. k' .

Wie in Abbildung 3 - 4 dargestellt, kann durch Extrapolation der Werte für $\theta \rightarrow 0$ und $c \rightarrow 0$ aus der Steigung der jeweiligen Geraden A_2 sowie $\langle R_g^2 \rangle_z$ bestimmt werden. M_w entspricht dem inversen y-Achsenabschnitt.

Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung basiert auf der Messung der zeitlichen Intensitätsfluktuationen bei gegebenem Winkel.

Nach dem Wiener-Khintchine-Theorem[10],[11] gibt es zu jedem Intensitätsspektrum im Frequenzraum eine fouriertransformierte Funktion im Zeitraum, die sogenannte Autokorrelationsfunktion der Streuintensität $g_2(t)$ [12]. Die gemessenen Fluktuationen der Streuintensität werden in eine Zeit-Intensitäts-Korrelationsfunktion umgewandelt:

$$g_2(t) = \langle I(0) \cdot I(n \cdot \tau) \rangle \quad (3.3.14)$$

3.3 Lichtstreuung

τ : Zeitintervall (mit $\tau = 1-1000 \mu\text{sec}$)

n : Anzahl der Intervalle (meist zwischen $n = 100-500$)

$I(0)$: Streuamplitude zum Zeitpunkt 0

$I(n \cdot \tau)$: Streuamplitude zum Zeitpunkt $n \cdot \tau$

Diese Autokorrelationsfunktion $g_2(t)$ multipliziert die Streuintensität zum Zeitpunkt 0 mit dem Zeitpunkt $n \cdot \tau$ (τ stellt das kleinst mögliche Zeitintervall dar). Dieser Vorgang wird für viele n und unterschiedliche Startzeiten wiederholt und anschließend über alle Werte gemittelt. Als Maximalwert für $g_2(t)$ wird $\langle I^2 \rangle$ zum Zeitpunkt $t = 0$ erhalten. Die Funktion nimmt exponentiell auf $\langle I \rangle^2$ ab, da im Laufe der Zeit die Teilchen voneinander wegdiffundieren und damit ihre Wechselbeziehung (Korrelation) abnimmt.

Über die Siegert-Relation kann $g_2(t)$ in die Autokorrelationsfunktion des Streufeldes $g_1(t)$ überführt werden. Diese ist als Quotient des dynamischen und statischen Strukturfaktors definiert:

$$g_1(t) = \frac{S(q, t)}{S(q)} = \sqrt{\frac{g_2(t) - A}{A}} \quad (3.3.15)$$

$S(q, t)$: Dynamischer Strukturfaktor

$S(q)$: Statischer Strukturfaktor

A : Experimentell bestimmte Basislinie

Diese entspricht der Amplitudenkorrelationsfunktion $g_1(t)$ für kleine monodisperse Teilchen in Lösung:

$$g_1(t) = B \exp(-q^2 D t) \quad (3.3.16)$$

B : experimentell gegebenes Signal-Rausch Verhältnis

D : translatorischer Diffusionskoeffizient

Polymere sind jedoch meist groß und polydispers weswegen $g_1(t)$ als ein z-Mittel von Exponentialfunktionen der Teilchensorte i beschrieben werden muss:

$$g_1(t) = B \frac{\sum_i m_i M_i P_i(q) \exp(-q^2 D_i t)}{\sum_i m_i M_i P_i(q)} \quad (3.3.17)$$

D_i : translatorischer Diffusionskoeffizient der Teilchensorte i

m_i : Massenanteil der Teilchensorte i

M_i : Molmasse der Teilchensorte i

$P_i(q)$: Formfaktor

Das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten wird aus der Anfangssteigung der Auftragung von $d(\ln(g_1(t)))/dt$ gegen q^2 erhalten:

$$\left[\frac{d(\ln(g_1(t)))}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = q^2 \frac{\sum_i m_i M_i D_i}{\sum_i m_i M_i} = q^2 D_z \quad (3.3.18)$$

Es wird hieraus der wahre Diffusionskoeffizient der Probe erhalten, da D_z sowohl winkel- als auch konzentrationsabhängig ist.

$$D_{app}(q, c) = D_z (1 + C \langle R_g^2 \rangle_z q^2 + \dots) (1 + k_d c + \dots) \quad (3.3.19)$$

C : dimensionslose Größe, von der Molekülstruktur abhängig

$$k_d = 2A_2 - k_f - v_p$$

$$k_f = f_0 (1 + k_i c + \dots)$$

f_0 : Reibungskoeffizient

v_p : Partielles Molvolumen des Polymers

Für polydisperse Proben ergibt sich der Diffusionskoeffizient als z-Mittelwert, der nur aus der Winkelabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten bei gegebenem Winkel (und gegebener Konzentration) durch Extrapolation auf Winkel Null bestimmt werden kann. Dies ist eine direkte Folge der unterschiedlichen Wichtung der Komponenten mit dem Formfaktor,

$$D_{app} = \frac{\sum m_i M_i D_i P_i(\theta)}{\sum m_i M_i P_i(\theta)} \quad (3.3.20)$$

3.3 Lichtstreuung

da der Intensitätsbeitrag hochmolekularer Fraktionen stärker mit dem Streuwinkel abnimmt, wie der niedermolekularer, also kleinerer Fraktionen.

Über das Stokes Einstein Gesetz (3.3.21) wird dann der kugeläquivalente hydrodynamische Radius berechnet, der angibt wie groß eine harte Kugel mit entsprechendem Diffusionskoeffizient wäre.

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (3.3.21)$$

R_h : kugeläquivalente hydrodynamische Radius

k : Boltzmann-Konstante

T : Temperatur

D : Diffusionskoeffizient

η : Viskosität des Lösungsmittels

In der Folge stellt sich der hydrodynamische Radius R_h als komplexer Mittelwert dar (Reziprokwert eines reziproken z-Mittels):

$$R_h \equiv \left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1} \quad (3.3.22)$$

Das ρ -Verhältnis (engverteilter) Proben ist folgendermaßen definiert:

$$\rho = \frac{\langle R_g^2 \rangle_z^{1/2}}{\left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1}} \quad (3.3.23)$$

und liefert in Abhängigkeit der Teilchenform einen charakteristischen Wert. Dies ist besonders hilfreich für Teilchen < 100 nm, da hier die statische Winkelabhängigkeit der Lichtstreuung kaum Informationen über die Form liefert und deshalb auf Röntgenstreuung und SANS zurückgegriffen werden muss.

Tabelle 3 - 1: Übersicht des sich ergebenden ρ -Verhältnisse für verschiedene Teilchengometrien [13].

Teilchengometrie	Theoretisch berechnetes ρ -Verhältnis
Harte Kugel	0.775
Hohlkugel	1
Ellipsoid	0.775-4
Zufallsknäuel	1.505

3.4 Zirkulardichroismus

Die CD-Spektroskopie[14]-[17] ist eine Methode, die häufig zur Untersuchung der Konformation von Peptiden und Proteinen verwendet wird. Optisch aktive Moleküle, wie beispielsweise Aminosäuren absorbieren in unterschiedlichem Maß links und rechts zirkular polarisiertes Licht. Daher gilt für die Extinktionskoeffizienten: $\epsilon_L \neq \epsilon_R$. Unter Verwendung des Beer-Lambert-Bouguer Gesetzes kann dies mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$\Delta A = A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R)cl \quad (3.2.1)$$

ΔA : Zirkulardichroismus

A_L, A_R : Absorption von links bzw. rechts polarisiertem Licht

ϵ_L, ϵ_R : molarer (dekadischer) Absorptionskoeffizient

c : Konzentration

l : Schichtdicke

Die unterschiedliche Absorption der rechts und links zirkular polarisierten Komponenten des ursprünglich linear polarisierten Lichts führt dazu, dass das Licht das Molekül mit elliptischer Polarisation verlässt (Abbildung 3 - 5).

Die Elliptizität θ_d [Grad] der austretenden elektromagnetischen Welle wird definiert als:

$$\theta_d = \tan^{-1} \frac{b}{a} = 33^\circ \Delta A \quad (3.2.2)$$

3.4 Zirkulardichroismus

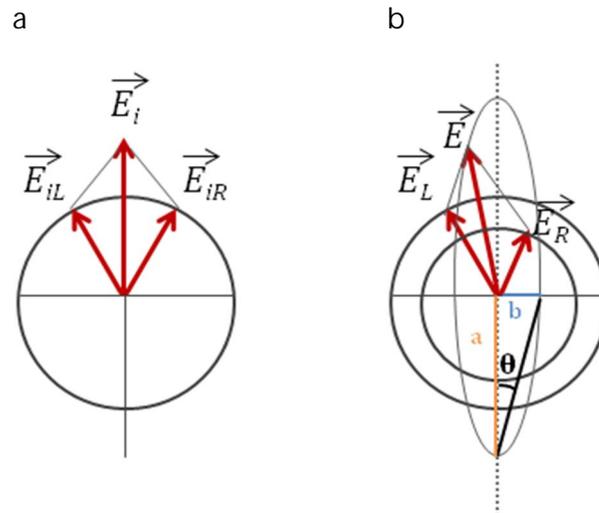


Abbildung 3 - 5: Rechts und links zirkular polarisierte Komponenten (\vec{E}_R und \vec{E}_L) des elektrischen Feldvektors (\vec{E}) des (a) linear polarisierten, einfallenden Lichts; (b) des ausfallenden, elliptisch polarisierten Lichtstrahls mit der Elliptizität θ .

Durch Normierung kann die Elliptizität unterschiedlich chiraler Proben verglichen werden. Hierfür wird meist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure θ_{mr} [$Grad \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1} \cdot residue^{-1}$] verwendet:

$$\theta_{mr} = 100 \frac{\theta_d \cdot M}{c \cdot S_D \cdot n_r} \quad (3.2.3)$$

θ_d : gemessene Elliptizität in [$Grad$]

c: Konzentration der Probe in [$g \cdot l^{-1}$]

S_D : Schichtdicke der Küvette [cm]

n_r : Anzahl der Aminosäuren

M: Molekulargewicht der Probe

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie können unterschiedliche Informationen über die Proteinstruktur erhalten werden. Durch Messungen im Fern UV-Bereich ($\lambda = 240-180$ nm) können Aussagen über die Sekundärstruktur, wie α -Helix, β -Faltblatt und β -turns, der Proteine getroffen werden. In diesem Bereich absorbiert die Peptidbindung der Proteine und ein schwacher $n \rightarrow \pi^*$ Übergang bei 210 nm und ein starker $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang bei 190 nm können detektiert werden. Im Nah UV-Bereich ($\lambda = 290-250$ nm) absorbieren die aromatischen Seitenketten bestimmter Aminosäuren und ermöglichen Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur bzw. Faltung der Proteine. Der schematische Aufbau eines CD-Spektroskops ist in Abbildung 3 - 6 gezeigt.

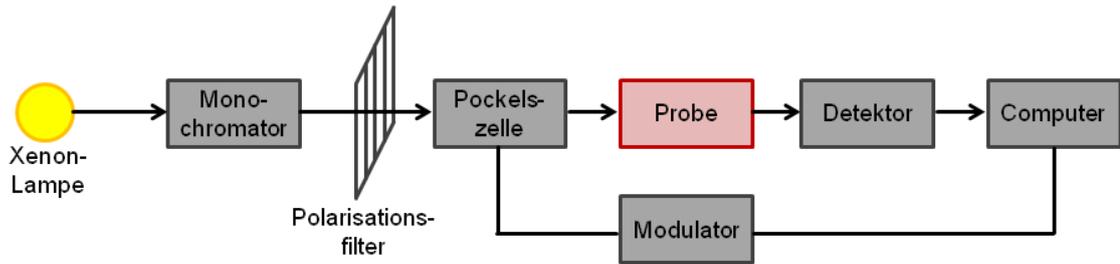


Abbildung 3 - 6: Schematischer Aufbau eines CD-Spektroskops.

3.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Abkürzung MALDI-TOF-MS steht für „Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry“. Bei dieser speziellen Methode der Massenspektrometrie erfolgen Ionisierung und Desorption ohne Fragmentierung der Analytmoleküle, sodass sie eine der wichtigsten Techniken zur Analyse von synthetischen Polymeren aber auch von Biomolekülen, wie Proteinen darstellt.

Für die Durchführung einer MALDI-TOF-Messung wird eine Matrix mit der Polymerprobe (Verhältnis meist 1000:1) gemischt und durch Beschuss mit einem UV-Laser in die Gasphase gebracht und ionisiert (siehe Abbildung 3 - 7). Die Matrix besteht aus UV-absorbierenden organischen Verbindungen, wie beispielsweise Dithranol oder Sinapinsäure und hat die Aufgabe die Laserstrahlung zu absorbieren und die aufgenommene Energie rasch und ohne Zersetzung an die Polymerprobe zu übertragen, wodurch diese ionisiert wird.

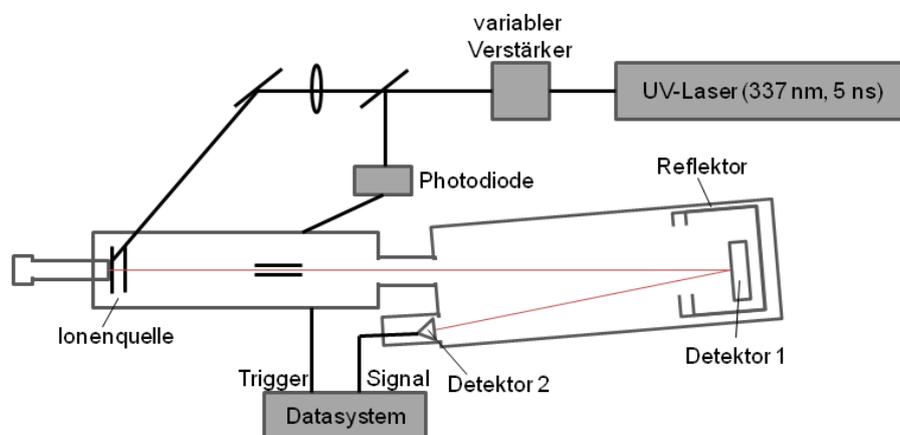


Abbildung 3 - 7: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Spektrometers mit Reflektoren.

3.6 Rasterkraftmikroskopie

Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld in Richtung des Detektors beschleunigt. Nachdem sie eine feldfreie Strecke mit definierter Länge passiert haben treffen sie auf den Detektor. Dies kann entweder linear (Detektor 1 in Abbildung 3 - 7) oder in Reflexion (Detektor 2 in Abbildung 3 - 7) erfolgen. Das Masse-zu-Ladungsverhältnis der Ionen bestimmt ihre Geschwindigkeit und damit die Zeit bis zum Auftreffen am Detektor.

$$\frac{m}{z} = \frac{2Ut^2}{s^2} \quad (3.5.1)$$

m : Masse des Ions

z : Ladungszahl

U : Beschleunigungsspannung

t : Flugzeit

s : Flugstrecke

Über die gemessene Zeit kann somit das Masse-zu-Ladungsverhältnis und die Massenverteilung der Polymerprobe bestimmt werden. Proteine bis 400,000 g·mol⁻¹ und synthetische Polymere bis 40,000 g·mol⁻¹ können mithilfe dieser Methode untersucht werden.

3.6 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (im Englischen „atomic force microscopy“ (AFM) genannt) ermöglicht die Oberflächen- und Strukturanalyse von organischen, anorganischen und biologischen Materialien im Nanometerbereich. Eine grundlegende Einführung in diese Methode findet man beispielsweise in der Veröffentlichung von S. S. Sheiko [18]. Für Polymerproben dient sie zur Bestimmung der Morphologie und der gebildeten Überstrukturen, zudem kann in Kombination mit der Langmuir-Blodgett (LB) Technik die absolute Molmassenverteilung bestimmt werden [19].

Während einer Messung wird die Spitze (Radius ~ 10-20 nm) einer Cantilever zeilenweise in einem bestimmten Raster über die Oberfläche der Probe geführt. Dabei wird die Auslenkung der Cantilever detektiert und somit die Kräfte, welche auf den

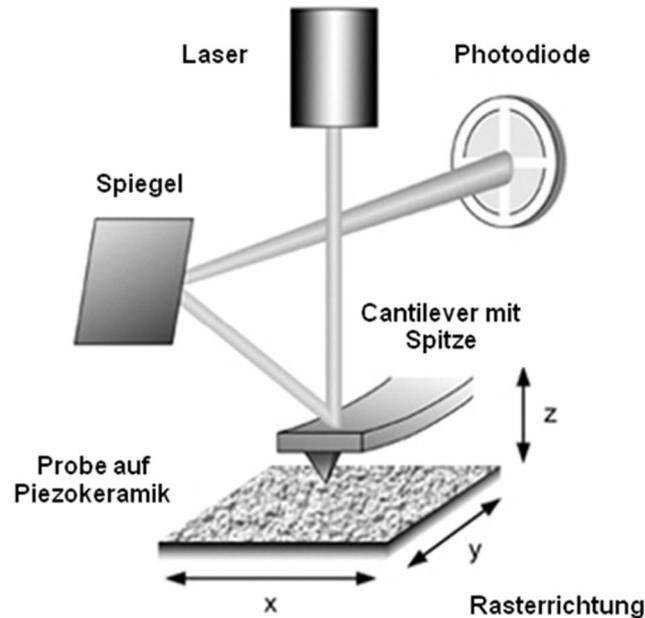


Abbildung 3 - 8: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops [20].

Cantilever wirken gemessen. Die Probe befindet sich auf einer Piezokeramik, welche die Positionierung während des Rastervorgangs übernimmt. Die Detektion findet mit Hilfe einer Viersegmentphotodiode und einem Laserstrahl statt. Kommt es zur Auslenkung der Cantilever aus der Nullstellung, wird die Reflexion des Laserstrahls, der auf die Oberseite der Cantilever fokussiert ist, verändert. Die Photodiode detektiert diese Verschiebung und es kommt abhängig von der Messmethode zur Verarbeitung des Signals.

Beim „constant force“-Modus wird die Auslenkung der Cantilever konstant gehalten und der Piezo, auf dem sich die Probe befindet, wird in z-Richtung gegengesteuert. Im „constant-height“-Modus hingegen bleibt die z-Position des Piezos konstant und es wird die Auslenkung der Cantilever registriert. In Bezug auf den verwendeten Wechselwirkungsbereich werden weitere Methoden unterschieden.

So steht die Spitze der Cantilever im „contact mode“ in direktem Kontakt mit der Probenoberfläche und es wird im repulsiven Bereich des Potentials gearbeitet. Diese Messmethode eignet sich vor allem für harte Oberflächen. Im „non contact mode“ bewegt sich die Spitze in geringem Abstand über der Oberfläche, wodurch es zu attraktiven Van-der-Waals-Wechselwirkungen kommt.

Im „tapping mode“ werden vor allem weiche, biologische Proben untersucht. Bei dieser

3.6 Rasterkraftmikroskopie

Methode oszilliert der Cantilever mit hoher Schwingungsfrequenz und berührt nur kurzzeitig die Oberfläche der Probe, wodurch ein Festkleben der abzubildenden Probe vermieden wird. Die Änderung in der Schwingungsamplitude und -phase wird automatisch in ein 2-D-Bild der Oberflächenmorphologie umgewandelt.

Literatur zu Kapitel 3:

- [1] John N. Manning and Paul F. Davis, *Journal of Chromatography A* 1989, 487, 41–50.
- [2] *Physical Analysis and Characterization*, Advances in Polymer Science, Springer Berlin / Heidelberg. 1994.
- [3] Z. Grubisic, P. Rempp, H. Benoit, *J. Polym. Sci. B Polym. Lett.* 1967, 5, 753–759.
- [4] H. G. Barth, *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* 1996, 34, 1705–1706.
- [5] H. C. Paul, P. T. Lodge, Eds., *Polymer Chemistry*, 2nd edition, CRC Press; 2nd Edition. 2007.
- [6] J. W. S. Rayleigh, *Philos. Mag.* 1899, 47, 375.
- [7] A. Einstein, *Ann. Phys.* 1910, 33, 1275.
- [8] P. Debye, *J. Phys. & Colloid. Chem.* 1910, 51, 18.
- [9] M. Smoluchowski, *Ann. Phys.* 1908, 25, 205.
- [10] N. Wiener, *Acta Math.* 1930, 118.
- [11] A. Khintchine, *Math. Ann.* 1934, 109, 604.
- [12] M. Schmidt, *Dynamic Light Scattering*, 372nd edition, W. Brown (Ed.), Clarendon Press, Oxford. 1993.
- [13] W. Schärtl, *Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions: with 16 tables*, Springer (Springer laboratory manuals in polymer science), Berlin. 2007.
- [14] S. M. Kelly and N. C. Price, *Biochimica et Biophysica Acta* 1997, 1338, 161–185.
- [15] N. J. Greenfield, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 1999, 18, 236–244.
- [16] L. Lighezan, R. Georgieva, A. Neagu, *Physica Scripta* 2012, 86, 35801.
- [17] N. Berova, R. W. Woody, *Wiley-VCH*. 2000, 2nd Edition.
- [18] S. S. Sheiko, *Advances in Polymer Science* 2000 61-174, 151.
- [19] S. S. Sheiko, M. da Silva, D. Shirvanians, I. LaRue, S. Prokhorova, M. Moeller, K. Beers, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6725–6728.
- [20] Bundesanstalt für Materialforschung- und prüfung,
http://www.nike.bam.de/de/nike_bilder/methoden_afm_2_270.jpg.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

Der Einsatz von polymeren Zwitterionen als „Nanocarrier“ für Drug Delivery-Systeme wird in aller Regel durch ihre geringe Löslichkeit in Wasser und wässrigen, isotonischen Lösungen erschwert.

Das hier vorgestellte Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) ist hingegen sowohl in Wasser als auch in 5 M Natriumperchloratlösung gut löslich, womit ein Einsatz als „Nanocarrier“ möglich wird. Für die Anwendung als solcher müssen jedoch weitere Bedingungen erfüllt sein:

- 1) Das System muss biokompatibel sein und damit eine geringe Zytotoxizität aufweisen.
- 2) Der „Nanocarrier“ darf nicht in humanem Blutserum aggregieren.
- 3) Eine Vielzahl von funktionellen Gruppen für die Konjugation von Wirkstoffmolekülen ist notwendig.
- 4) Für den gezielten Wirkstofftransport darf das Trägersystem keine unspezifische Zellaufnahme zeigen.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der synthetischen Darstellung sowie der Konformationsänderung des Polymers in Abhängigkeit von pH-Wert und Ionenstärke erläutert. Es wird auf die Biokompatibilität des Systems eingegangen und Zellaufnahmestudien werden präsentiert. Zudem wird das Komplexierungsverhalten mit DNA in Gegenwart von divalenten Metallionen für den Einsatz als Transfektionsagenz vorgestellt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen größtenteils eine Reproduktion bereits veröffentlichter Daten dar, vgl. D. Weller et al., „Solution Properties and Potential Biological Applications of Zwitterionic Poly(ϵ -methacryloyl-L-lysine)“, *Macromolecules*, 2013.

4.1.1 Synthese und Farbstoffmarkierung mit Alexa Fluor 488

Die Synthese von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) wird basierend auf vorhergehenden Ergebnissen durchgeführt [1]. Modifikationen in der Darstellung des Monomers werden im Folgenden beschrieben, eine Übersicht über die Synthesestrategie zur Darstellung von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) ist in Abbildung 4 - 1 gezeigt.

Die Darstellung des Monomers ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin 6 erfolgt nach der Methode von S. Nagaoka et al. [2]. Die selektive Reaktion des Methacrylsäurechlorids mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins wird durch die Bildung des Lysin-Kupfer-Komplexes ermöglicht.

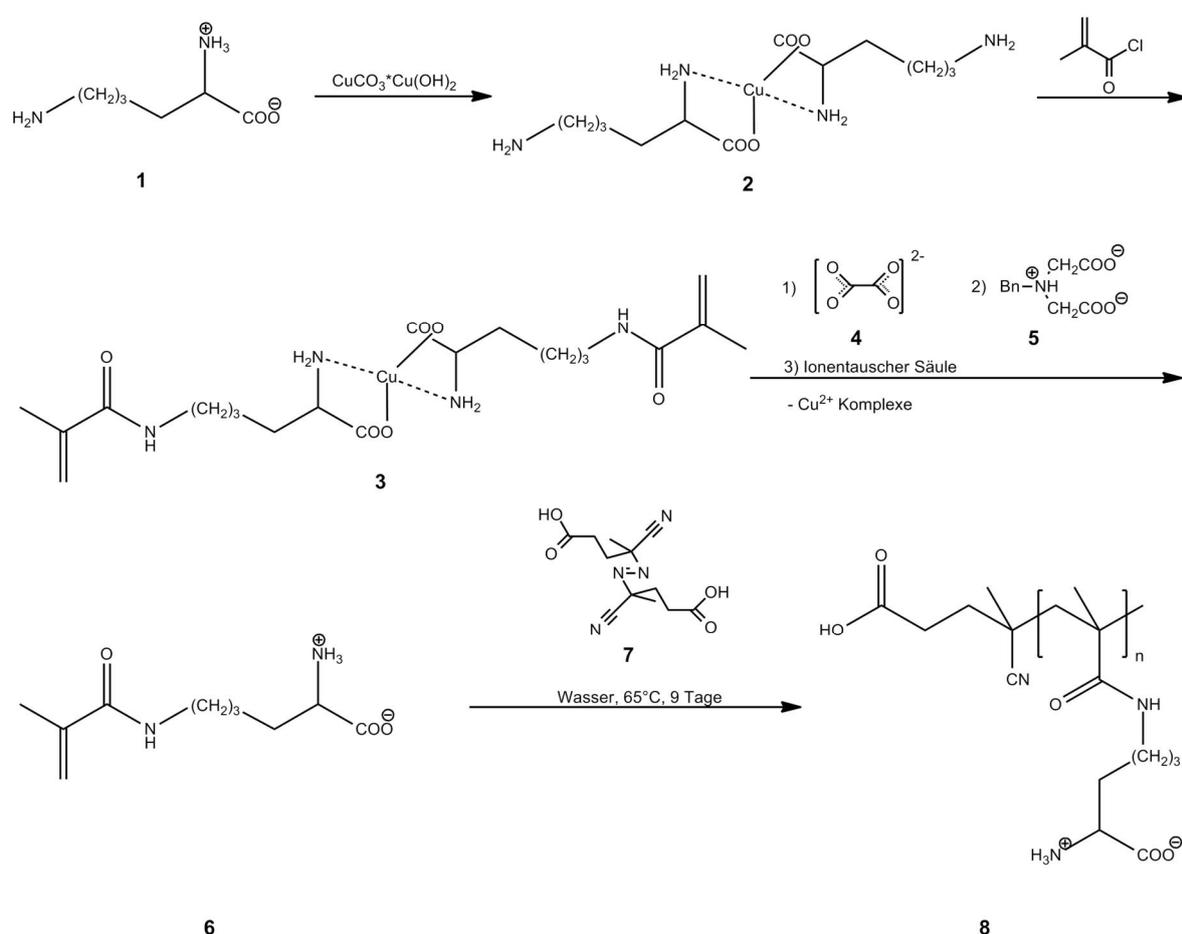


Abbildung 4 - 1: Darstellung des Monomers ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin 6, ausgehend von L-Lysin 1 mit anschließender freier radikalischer Polymerisation zum Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) 8.

Im Unterschied zur bisherigen Darstellung wird der Lysin-Kupfer-Komplex jedoch nicht durch Zugabe von 8-Quinolinol aufgelöst. Stattdessen werden zur basischen Lysin-Kupfer-Komplexlösung Oxalat 4 und Chelex 100 5 zugegeben, um den Metall-Komplex mit dem Lysin durch Fällung des schwerlöslichen Kupferoxalats ($L = 4.4 \cdot 10^{-10} \text{ M}^2$) bzw. das Kupfer durch Bindung im stärkeren Komplex abzufangen und damit das unkomplexierte ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin freizusetzen. Der Restkupfergehalt liegt so im Bereich kleiner 0.1 ppB, wie für Chelex verifiziert wurde und liegt damit weit unter Werten mit zytotoxischer Wirkung. 8-Quinolinol kann in der späteren freien radikalischen Polymerisation als Inhibitor wirken, durch die Verwendung von Oxalat sowie Chelex 100 wird dieses Problem hingegen umgangen. Nach Abtrennung der Kupfer-Komplexe und Aufreinigung über eine Ionentauscher-Säule wird das zwitterionische ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin Monomer erhalten. Die Reinheit wird mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (siehe Anhang Abbildung A - 1) und HPLC (siehe Anhang Abbildung A - 2) überprüft.

Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) 8 wird durch freie radikalische Polymerisation des Monomers ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin 6 dargestellt. Hierfür wird das Monomer in Wasser gelöst und für 9 Tage bei 65 °C unter Zusatz von 0.4 mol% des Initiators 4-Azobis-4-cyanovaleriansäure 7 polymerisiert. Das restliche Monomer wird durch Dialyse mit 3 kDa Amicon Zentrifugenfilter vom Polymer abgetrennt. Nach Gefriertrocknung aus der wässrigen Lösung wird das Polymer erhalten.

Für Zellaufnahmestudien und zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts (IEP) wird von [REDACTED], wie in Abbildung 4 - 2 gezeigt das Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) an der α -Aminogruppe mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 funktionalisiert.

Der überschüssige Farbstoff wird durch Dialyse mit 3 kDa Amicon Zentrifugenfilter vom Polymer entfernt und per FCS-Messungen kann von [REDACTED] die Anzahl von Farbstoffmolekülen pro Polymer auf ca. 10 bestimmt werden. Die Autokorrelationsfunktionen sind in Abbildung 4 - 3 a gezeigt. Die mittlere Anzahl an Molekülen im konfokalen Volumen wird über die nicht normierte Amplitude der Korrelationsfunktion bestimmt. Die Fluoreszenzintensität für das Farbstoff markierte Polymer wird durch die Fluoreszenzintensität der freien Farbstoffmoleküle geteilt. Dieser Wert wird anschließend auf die mittlere Anzahl der Moleküle im konfokalen Volumen bezogen, wodurch die Anzahl von Farbstoffmolekülen pro Polymer auf ca. 10 bestimmt wird. Im Anhang sind genauere Angaben zur Auswertung zu finden.

4.1 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

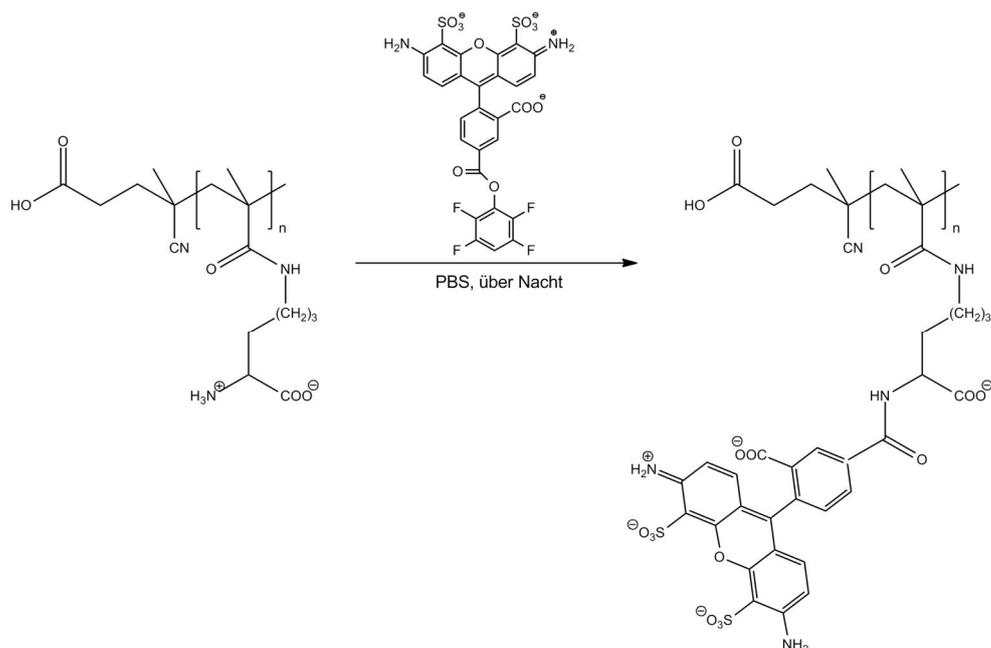


Abbildung 4 - 2: Farbstoffmarkierung des Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) mit Alexa Fluor 488.

Wie in Abbildung 4 - 3 b zu sehen ist, kann über Kapillarelektrophorese nachgewiesen werden, dass die Polymerprobe keinen freien Farbstoff mehr enthält: Es wird jeweils nur ein identischer Peak für die UV-Absorption bei 230 nm (Polymerdetektion) und 480 nm (Farbstoffdetektion) erhalten.

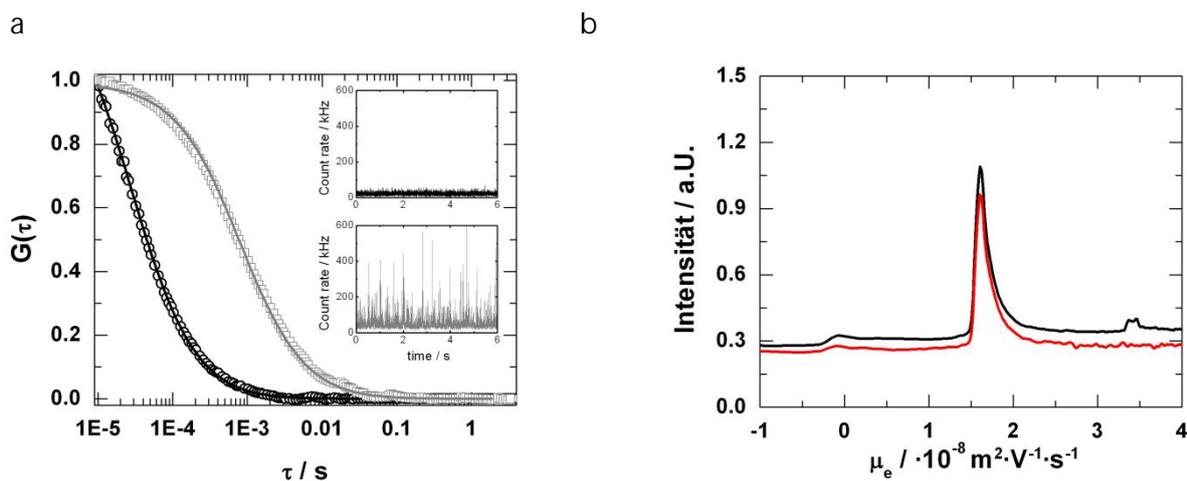


Abbildung 4 - 3: a) Normierte FCS-Autokorrelationsfunktionen mit den entsprechenden Fitfunktionen (Linien) für den Alexa Fluor 488 Farbstoff (schwarze Kreise) und das Farbstoff markierte Polymer (graue Quadrate). Zudem sind die entsprechenden Fluoreszenzintensitätsfluktuationen für Lösungen ähnlich molarer Konzentration gezeigt; b) Kapillarelektrophoresespektren von Alexa Fluor 488 markiertem Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) mit UV-Detektion bei 230 nm (schwarze Linie) und 480 nm (rote Linie) in Natriumborat-Puffer bei pH = 9.2 (Kapillarlänge: 45 cm, 293 K, 15 min, $c = 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

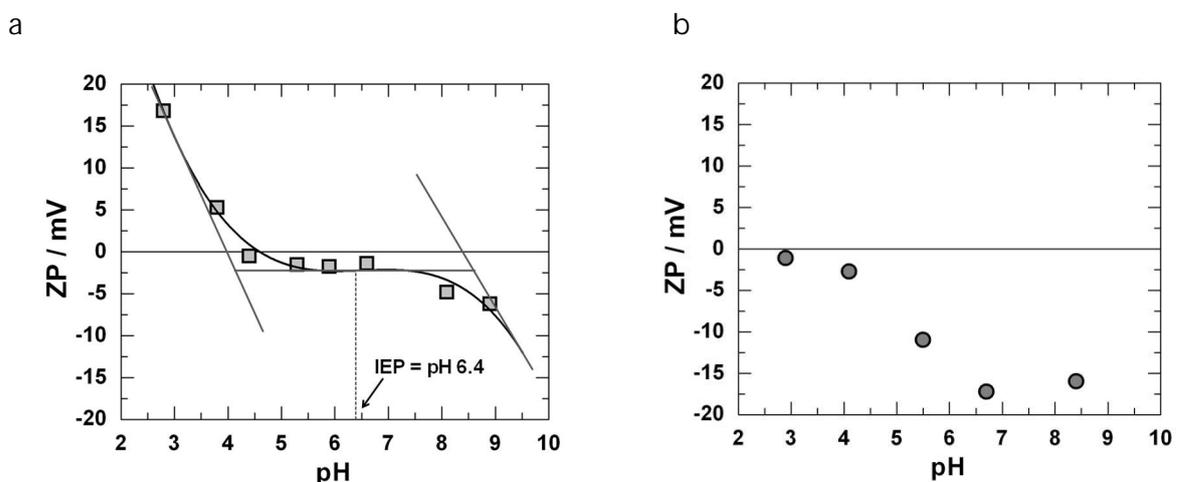
4.1.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Der isoelektrische Punkt (IEP) des wie in Kapitel 4.1.1 beschriebenen synthetisierten Polymers wird über unterschiedliche Methoden ermittelt: a) Die isoelektrische Fokussierung auf „immobilized pH gradient“ (IPG) Streifen (siehe Anhang Abbildung A - 4) und mittels „Micro-Rotaphor™ Preparative IEF-Cell“ (siehe Anhang Abbildung A - 3) sowie b) Zeta-Potential-Messungen (Abbildung 4 - 4). Die isoelektrischen Fokussierungen werden mit Hilfe

durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4 - 1 zusammengefasst.

Für das nicht Farbstoff markierte Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) wird der IEP durch Zeta-Potential-Messungen, wie in Abbildung 4 - 4 a gezeigt auf ca. pH = 6.4 bestimmt und stimmt damit mit bereits bekannten Werten für den IEP überein [3].

In Abbildung 4 - 4 b ist zu erkennen, dass für das Farbstoff markierte Polymer Zeta-Potential-Messungen hingegen nicht eindeutig sind, aber auf einen isoelektrischen Punkt von ca. IEP < pH 3 hindeuten. Durch isoelektrische Fokussierung wird der IEP für das mit Alexa Fluor 488 Farbstoff markierte Polymer auf pH = 3.6 ± 0.3 bestimmt (siehe Anhang Abbildung A - 3 und Abbildung A - 4) und liegt damit niedriger als der des unmarkierten. Dies wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Carboxylat- und Sulfatgruppen des Alexa Fluor 488 Farbstoffs verursacht. Ähnliche Effekte sind auch aus neuesten Arbeiten für andere Farbstoff markierte Proteine bekannt [4]-[6].



Abbildungung 4 - 4: Zeta-Potential-Messungen in Abhängigkeit des pH-Werts: a) Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) ohne Alexa Fluor 488 Farbstoff Markierung. b) Poly-(ϵ -Methacryloyl-L-Lysin) mit Alexa Fluor 488 Farbstoff Markierung. Die Messungen werden in wässriger 5 mM Zitronensäure/ Natriumhydrogenphosphat-Pufferlösung und bei einer Polymerkonzentration von $c = 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ durchgeführt.

4.1 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

Tabelle 4 - 1: Ergebnisse für den isoelektrischen Punkt des unmarkierten und des Farbstoff markierten Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin), erhalten durch Zeta-Potential-Messungen und isoelektrische Fokussierung auf IPG-Streifen und mittels Rotaphor.

	IEP Polymer unmarkiert	IEP Polymer markiert
Zeta-Potential	6.4	<3
Rotaphor-Zelle	-	3.9
IPG-Streifen	-	3.4

4.1.3 Konformationsänderungen in Abhängigkeit von Ionenstärke und pH-Wert

Aufgrund von starken Wechselwirkungen zwischen dem zwitterionischen Polymer und dem GPC-Säulenmaterial wird ein anomales Elutionsverhalten für das Polymer in GPC-Messungen detektiert und verlässliche GPC-Ergebnisse sind schwer zu erhalten. Die in Kapitel 6 beschriebene Laufmittel und Säulenkombination führt vermutlich zu erfolgreichen Messungen, die in Abbildung 4 - 5 gezeigt sind. Die Elutionskurve weist allerdings ein leichtes „Tailing“ auf, das entweder durch eine niedermolekulare Fraktion oder durch ein anomales Elutionsverhalten der hochmolekularen Fraktion verursacht wird. In Tabelle 4-2 sind die Ergebnisse der verschiedenen Auswertungen aufgeführt. Eine Polydispersität nahe der Schulz-Flory Verteilung wird erhalten unter Vernachlässigung des „Tailings“. Wenn das „Tailing“ jedoch in die Auswertung mit einbezogen wird, wird eine wesentlich breitere Verteilung erhalten. Aufgrund des eher geringen Unterschieds im Molekulargewicht wird auf eine Fraktionierung verzichtet.

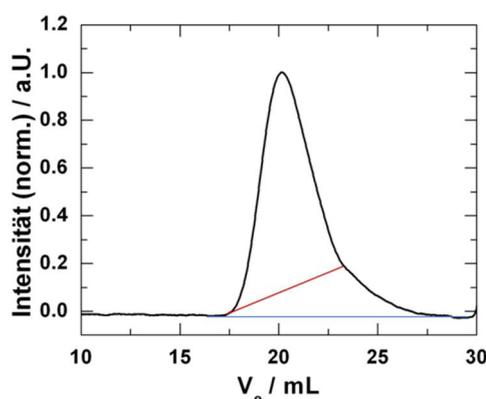


Abbildung 4 - 5: GPC-Elutionskurve von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) in wässriger 0.1 M Natriumnitratlösung. Die rote gezogene Basislinie ignoriert das „Tailing“ der Elutionskurve, für die blaue Basislinie wird das „Tailing“ mitgefittet. RI-Detektion bei einer Flussrate von 1 ml·min⁻¹.

Tabelle 4 - 2: Ergebnisse der GPC-Messungen von Poly-(ϵ -Methacryloyl-L-Lysin) in wässriger 0.1 M Natriumnitratlösung. Es wird ein Pullulan-Standard zur Kalibrierung verwendet. Auswertung der Elutionskurve mit oder ohne „Tailing“.

	$M_n / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_w / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	PDI
ohne Tailing	$2.41\cdot 10^5$	$4.38\cdot 10^5$	1.82
mit Tailing	$1.39\cdot 10^5$	$3.90\cdot 10^5$	2.80

Die Konformationen und das Molekulargewicht von nicht Farbstoff markiertem Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) werden mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung in verschiedenen molaren Salzlösungen und bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt.

Die Messungen in unterschiedlich molaren Natriumperchloratlösungen werden nahe am IEP bei pH = 6.7 durchgeführt. Eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse zeigen Tabelle 4 - 3 und Abbildung 4 - 6 d. In Abbildung 4 - 6 a-c sind die Zimm-Plots zur Bestimmung des Molekulargewichts und R_g gezeigt.

Sowohl Wasser als auch die 5 M Natriumperchloratlösung sind gute Lösungsmittel für das Polymer, da in allen Fällen der zweite Virialkoeffizient A_2 , welcher eine Aussage über die Lösungsmittelqualität macht größer als $10^{-4} \text{ cm}^3\cdot\text{mol}\cdot\text{g}^{-2}$ ist. Der im Vergleich zu den Salzlösungen höhere A_2 -Wert für Wasser wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch verbleibende Nettoladungen am Polymer verursacht. Das auffällig kleinere Molekulargewicht von $M_w = 5.5\cdot 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ in Wasser wird ebenfalls von den vorhandenen Nettoladungen verursacht, die mit Hilfe folgender Formel abgeschätzt werden können:

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_w} + \alpha \quad (4.1)$$

mit dem in salzfreier Lösung bestimmten apparenten Polymerisationsgrad P_{app} , dem wahren gewichtsgemittelten Polymerisationsgrad P_w , der bei hoher Salzkonzentration gemessen wird. Die Netto Ladungsdissoziation kann mit den Ergebnissen von Tabelle 4 - 3 auf $\alpha = 0.01 \%$ bestimmt werden.

In Übereinstimmung mit dem erhaltenen Wert für den IEP von pH = 6.4 sollte das Polymer bei pH = 6.7 eine sehr geringe negative Nettoladung aufweisen.

4.1 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

Tabelle 4 - 3: Ergebnisse der statischen und dynamischen Lichtstreuung für Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) in wässrigen Natriumperchloratlösungen.

Lösungsmittel	R_g / nm	R_h / nm	ρ -Verh.	M_w / g·mol	A_2 / mol·cm ³ ·g ⁻²
Wasser	33	20	1.65	$5.50 \cdot 10^5$	$4.73 \cdot 10^{-4}$
0.1 M	42	21.9	1.92	$7.21 \cdot 10^5$	$1.59 \cdot 10^{-4}$
5 M	45	25.3	1.78	$7.03 \cdot 10^5$	$2.09 \cdot 10^{-4}$

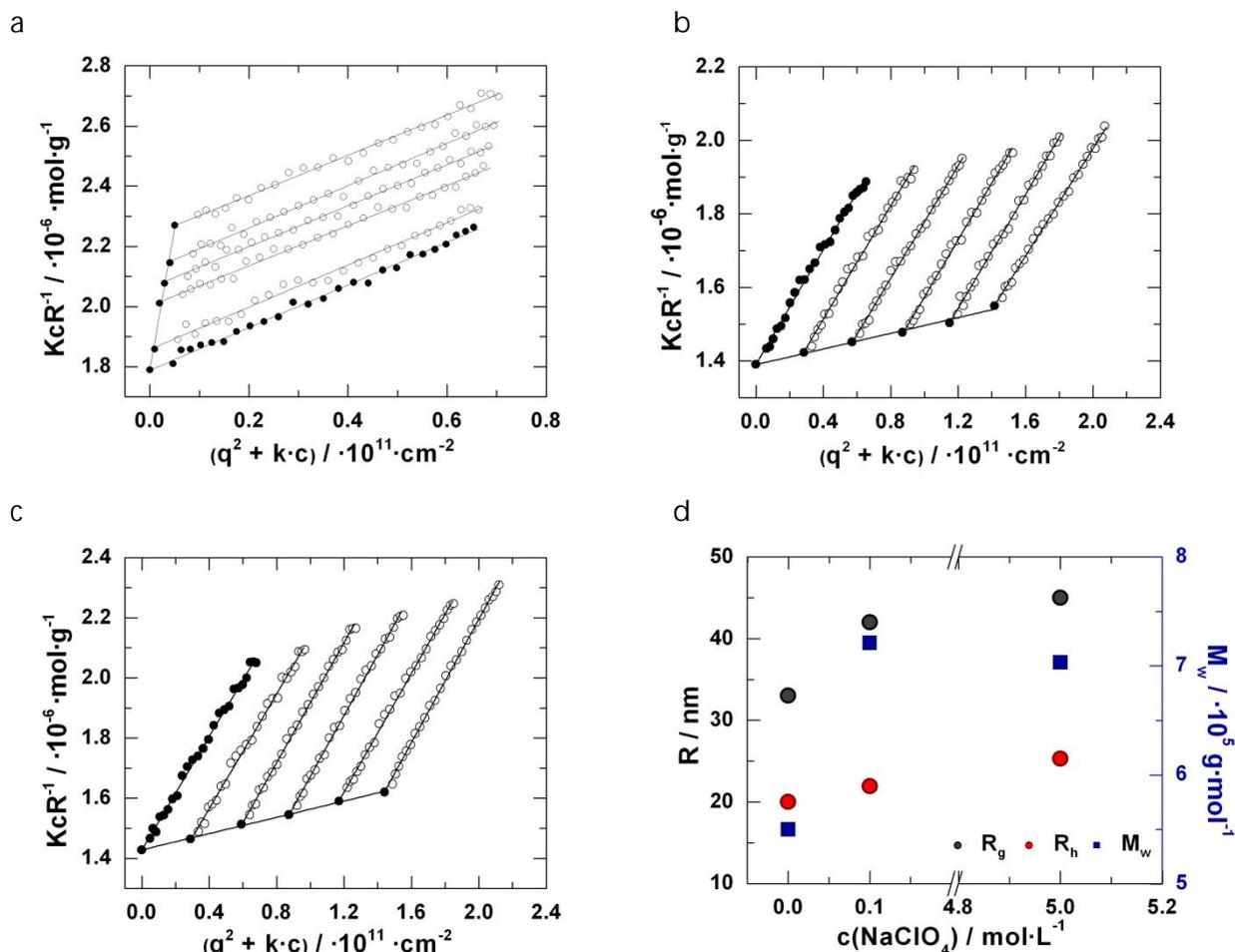


Abbildung 4 - 6: Zimm-Plots von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) in a) Wasser, b) 0.1 M und c) 5 M wässriger Natriumperchloratlösung; d) Grafische Darstellung der Ergebnisse der statischen und dynamischen Lichtstreuung von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) in verschiedenen molaren Natriumperchloratlösungen. dn/dc (Wasser und 0.1 M NaClO₄) = $0.1904 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (gemessen) und dn/dc (5 M NaClO₄) = $0.1651 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (gemessen); Brechungsindex (Wasser und 0.1 M NaClO₄) = 1.3328 (gemessen) und Brechungsindex (5 M NaClO₄) = 1.3592 (gemessen); Viskosität (Wasser und 0.1 M NaClO₄) = 1.005 cP (gemessen) und Viskosität (5 M NaClO₄) = 1.87 cP (gemessen).

Während in den 0.1 M und 5 M Natriumperchloratlösungen die Ladungen am Polymer abgeschirmt sind, kommt es in reinem Wasser nicht zur Ladungsabschirmung und Coulomb-Anziehungen der Zwitterionen bedingen einen kleineren R_g und R_h für das Polymer in Wasser. Salzzugabe führt zur leichten Expansion der beiden Radien, bekannt als „Antipolyelektrolyt Effekt“ und ist durch die Zunahme der sterischen Repulsion aufgrund des ausgeschlossenen Volumen Effekts zu verstehen. Die Expansion fällt bedeutend geringer aus als typischerweise für Betaine bekannt. Das ρ -Verhältnis liegt für alle Salzkonzentrationen bei ca. $\rho = 1.8$ und lässt auf eine polydisperse Knäuelstruktur in guten Lösungsmitteln (siehe unten) schließen, bestätigt durch große A_2 -Werte, vgl. Tabelle 4-3.

Den durch dynamische Lichtstreuung ermittelten z-gemittelten Diffusionskoeffizienten D_z (siehe Anhang Abbildung A - 5) erhält man durch Extrapolation des apparenten Diffusionskoeffizienten D_{app} auf Streuwinkel $q^2 = 0$ und Konzentration $c = 0$ nach Gleichung 4.2 [7]:

$$D_{app} = D_z(1 + C \cdot q^2 \cdot R_g^2) \cdot (1 + c \cdot k_D) \quad (4.2)$$

C ist eine Konstante, die von der Kettenstruktur und Polydispersität definiert wird [7]-[9]. k_D steht über folgende Gleichung mit dem zweiten Virialkoeffizienten A_2 und der Konzentrationsabhängigkeit des Reibungskoeffizienten k_f in Zusammenhang [10]:

$$k_D = 2 \cdot A_2 \cdot M_w - k_f - \nu \quad (4.3)$$

mit dem partiellen spezifischen Volumen des Polymers ν . Die theoretische Herleitung für k_f lautet wie folgt [11]-[13]:

$$k_f = \frac{k_{f0} \cdot N_A \cdot V_h}{M_w} \quad (4.4)$$

mit der Avogadrozahl N_A und dem hydrodynamischen Volumen V_h .

4.1 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

Tabelle 4 - 4: Berechnete Werte für k_d , k_{f0} und C in wässrigen, verschieden molaren Natriumperchloratlösungen.

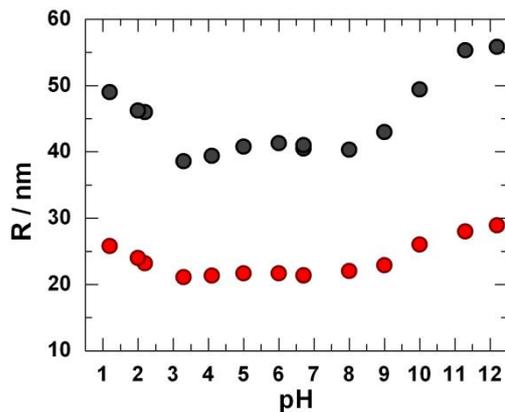
Lösungsmittel	$k_d / \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	k_{f0}	C
Wasser	291	6.23	$1.29 \cdot 10^{-1}$
0.1 M	83	3.96	$1.39 \cdot 10^{-1}$
5 M	148	2.5	$1.51 \cdot 10^{-1}$

k_{f0} ist abhängig von der gegenseitigen Durchdringung von zwei flexiblen Ketten und nimmt Werte zwischen 2.24 und 7.14 an, welche die Grenzwerte für Theta und gute Lösungsmittel darstellen [12]. Damit deuten die k_{f0} -Werte für 0.1 M und 5 M Natriumperchloratlösung darauf hin, dass es sich um Lösungsmittel nahe der Theta Lösungsmittelgrenze handelt, wohingegen der höhere Wert für Wasser durch elektrostatische Effekte bedingt sein wird. Da die Werte für k_{f0} aus einer Kombination von vier verschiedenen experimentell bestimmten Werten, die jeweils den Mittelwert der breit verteilten Probe darstellen abgeleitet werden, sollten aufgrund der experimentellen Ungenauigkeit die Ergebnisse für k_{f0} nicht überinterpretiert werden.

Der große Einfluss des ausgeschlossenen Volumens auf die Kettendimensionen erschwert die Bestimmung der statistischen Kuhn-Segmentlänge l_k . Ausgehend von R_g und R_h (R_h zeigt eine geringere Abhängigkeit vom ausgeschlossenen Volumen als R_g) kann nach dem Wurmketten-Modell[14],[15] l_k abgeschätzt werden. Je nach Salzkonzentration liegt l_k bei $l_k = 6-8$ nm, was in Anbetracht der geringen Seitenkettenlänge sehr groß ist. Die hohe Kettensteifheit des Polymers wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch repulsive dipolare und/oder elektrostatische Wechselwirkungen verursacht. CD-Messungen lassen auf keine Sekundärstruktur schließen.

Statische und dynamische Lichtstreuung in einem pH Bereich $1.2 < \text{pH} < 12.2$ geben Aufschluss über den Einfluss der Ladungen auf die Konformation des Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin). Dabei wird die Salzkonzentration mit 0.1 M Natriumperchlorat konstant gehalten und bei einer $c(\text{Polymer})$ zwischen $0.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} < c < 0.19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen.

a



b

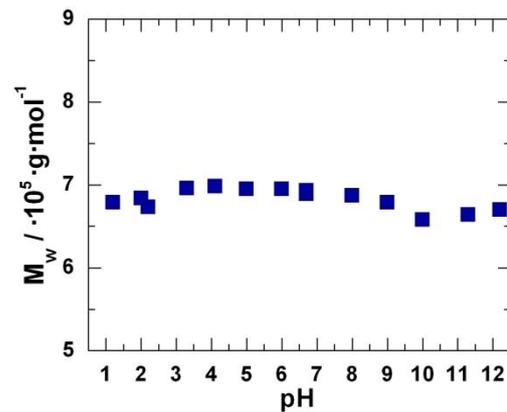


Abbildung 4 - 7: Zusammenhang zwischen pH-Wert und a) dem Trägheitsradius R_g (schwarz) sowie dem hydrodynamischen Radius R_h (rot) und b) dem Molekulargewicht M_w von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) in 0.1 M Natriumperchloratlösung. Die pH-Werte werden durch Zugabe von Salzsäure oder Natriumhydroxid eingestellt.

In Abbildung 4 - 7 ist zu sehen, dass sowohl R_g als auch R_h nach Zugabe von Salzsäure oder Natriumhydroxid bei $\text{pH} < 3$ und $\text{pH} > 8$ größer werden, im Bereich $3 < \text{pH} < 8$ jedoch relativ konstant bleiben (einige repräsentative statische und dynamische Lichtstreuungsmessungen sind im Anhang Abbildung A - 6 bis Abbildung A - 10 gezeigt).

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass im neutralen pH-Bereich die Nettoladung des Polymers gering ist, in den extremen pH-Bereichen jedoch größer wird, wodurch es zur Expansion der Knäuelstruktur um bis zu 40 Prozent (im Vergleich zur Dimension im Neutralen) kommt. Dieser Effekt ist nicht stärker ausgeprägt, da für eine große Veränderung des pH-Werts relativ viel Säure oder Base zugegeben werden muss, wodurch jedoch auch die Ionenstärke in der Lösung ansteigt und die entstehenden Ladungen abgeschirmt werden.

In der Literatur[3] wird berichtet, dass die Carboxy- und Aminogruppen im Poly-(ϵ -N-methacryloyl-L-Lysin) nur einen pK_a -Wert von etwa $\text{pK}_a = 6.5$ aufweisen, der zudem unabhängig von der zugegebenen Salzmenge ist. Dies steht im Widerspruch zum Verhalten der Poly-(Carboxybetain)e, die 2 pK_a -Werte aufweisen, welche nach Salzzugabe weiter auseinanderdriften [16]. Es ist davon auszugehen, dass die große räumliche Nähe der Carboxy- und Aminogruppen zu elektrostatischen Wechselwirkungen führt, welche einen sehr starken Einfluss auf das Säure-Base-Gleichgewicht ausüben. Solch ein Verhalten wurde bereits in den theoretischen Arbeiten von Rice und Harris[17] und Katchalsky[18] vorhergesagt.

4.1 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

Da das ρ -Verhältnis für alle pH-Werte (siehe Anhang Tabelle A - 2) zwischen $\rho = 1.8-1.9$ liegt und zudem kein signifikanter Einfluss des pH-Werts auf das Molekulargewicht festzustellen ist, liegt das Polymer über den kompletten pH-Bereich als Einzelkettenmolekül in einer Knäuelstruktur vor, ohne eine Aggregationstendenz zu zeigen.

4.1.4 Biokompatibilität

Für die Anwendung von polymeren Trägersystemen im menschlichen Körper muss deren Biokompatibilität gewährleistet sein. Adsorption von Serumproteinen, die zur Aggregation führt ist daher unerwünscht. Ebenfalls darf es durch Aufnahme der Polymere in die Zelle nicht zum Zelltod kommen. Um dies auszuschließen muss die Zellüberlebensrate in Gegenwart von Polymer und das Verhalten der Polymere in humanem Blutserum überprüft werden, bevor die Systeme *in vivo* getestet werden können.

4.1.4.1 Toxizitätstests

Die Toxizitätstests werden von [REDACTED] durchgeführt.

Die Überlebensrate von zwei verschiedenen Zelllinien in Gegenwart von Polymer wird untersucht. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um dendritische Knochenmarkzellen („bone marrow-derived dendritic cells“ = BM-DC) und um menschliche embryonale Nierenzellen („human embryonic kidney 293 cells“ = HEK293), die in mit Polymer versetztem Zellmedium resuspendiert werden. Die aus zwei unabhängigen Experimenten erhaltenen Ergebnisse der Zellüberlebensrate (in Gegenwart von verschieden hoher Polymerkonzentration) werden auf die Überlebensrate nicht behandelte Zellen normiert und anschließend gemittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 - 5 gezeigt.

Tabelle 4 - 5: Überlebensrate \bar{U} in Prozent von BM-DC und HEK293 Zellen in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin).

c(Polymer) / $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	0.01	0.05	0.1	0.5	1
$\bar{U}(\text{BM-DC}) / \%$	78.2 ± 3.8	74.9 ± 4.1	80 ± 5.3	78.2 ± 0.9	78.3 ± 3.6
$\bar{U}(\text{HEK293}) / \%$	97.9 ± 3.1	86.3 ± 6.2	72.6 ± 5.2	77.8 ± 4.4	74.7 ± 3.7

Sowohl für die dendritischen Knochenmarkszellen als auch für die embryonalen Nierenzellen liegt selbst bei sehr hohen Polymerkonzentrationen die Überlebensrate bei über 70 Prozent. Höhere Polymerkonzentrationen werden nicht getestet, da bei *in vivo* und *in vitro* Experimenten meist sehr viel geringere Polymerkonzentrationen verwendet werden.

4.1.4.2 Aggregationsverhalten in humanem Blutserum

Das Interaktions- und Aggregationsverhalten von Polymeren in humanem Blutserum trägt maßgeblich zur Biodistribution der Polymerpartikel bei und ist somit ein wichtiger Faktor, der über eine mögliche Anwendung von Polymeren als Wirkstoffträger im menschlichen Körper entscheiden kann [19].

Für Poly-(Aminosäuren) wird ein „Stealth Effect“ erwartet, sodass von keinen Wechselwirkungen mit humanen Serumproteinen ausgegangen werden sollte. Dies sollte durch den zwitterionischen Charakter der Aminosäuren und Peptide unterstützt werden, welcher, wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben eine Wasserschuttschicht um das Polymer gewährleistet und somit eine Adsorption von Serumproteinen einschränkt.

Über dynamische Lichtstreuung kann das Verhalten von Polymeren in humanem Blutserum untersucht werden. Die hier gezeigten dynamischen Lichtstremessungen der Polymerproben in humanem Blutserum zur Bestimmung des Aggregationsverhalten werden bei 20 °C durchgeführt und mittels einer speziell entwickelten Methode ausgewertet [20].

In Abbildung 4 - 8 sind die Autokorrelationsfunktion und der entsprechende Multikomponentenfit für das zwitterionische Polymer Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) und das Blutserum gezeigt. Die Funktion kann perfekt durch den Fit, bestehend aus der Kombination der Fitfunktionen der beiden Einzelkomponenten beschrieben werden.

4.1 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

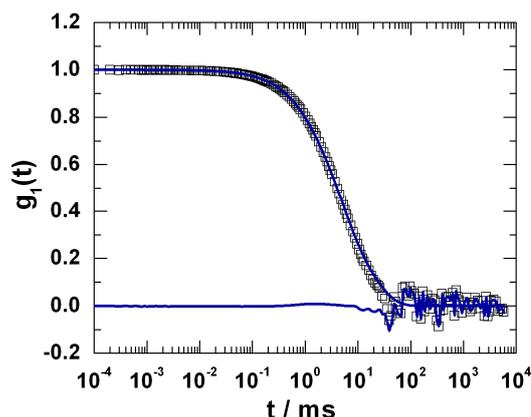


Abbildung 4 - 8: Autokorrelationsfunktion und Multikomponentenfit mit entsprechendem Residuum für Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) mit $c = 0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und Serum. Die Probe wird in PBS-Puffer gelöst und in humanem Blutserum gemessen. Streuwinkel 30° .

Weitere Fitparameter zur Beschreibung der Datenpunkte sind nicht nötig, weswegen eine Aggregation in humanem Blutserum für das zwitterionische Polymer, wie zu erwarten ausgeschlossen werden kann.

Somit ist die Biokompatibilität des Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) durch Messungen in humanem Blutserum und Toxizitätstests eindeutig nachgewiesen werden.

Die Messungen werden von [REDACTED] durchgeführt und ausgewertet.

4.1.5 Mögliche Anwendungen in biologischen Systemen

Über die Amino- und Carboxygruppen des Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) können verschiedene Konjugationsreaktionen am Polymer durchgeführt werden, was bereits durch die Kopplung mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 gezeigt werden kann. Durch Kopplung mit Antikörpern und Antigenen könnte das Polymer als Wirkstoffträgersystem in der Krebsimmuntherapie eingesetzt werden. Für die gezielte, durch Antikörper vermittelte Zellaufnahme, sollte das Polymer jedoch keine oder nur eine sehr geringe unspezifische Aufnahme zeigen.

Nach Zugabe von divalenten Metallionen zum zwitterionischen Polymer können Komplexe zwischen dem Polymer und DNA oder siRNA ausgebildet werden, welche für die Gentransfektion genutzt werden können um DNA oder RNA in Zellen einzubringen. Durch das Ersetzen eines defekten Gens durch ein gesundes Gen können beispielsweise Erkrankungen geheilt werden.

4.1.5.1 Zellaufnahmestudien

Die unspezifische Zellaufnahme des Alexa Fluor 488 markierten Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) wird untersucht, um den potentiellen Einsatz des Zwitterions als „Nanocarrier“ in der Immunkrebstherapie zu beurteilen. Für die Immunkrebstherapie ist ein Polymer erwünscht, das eine geringe, bis keine unspezifische Zellaufnahme aufweist, sodass die Adressierung und Zellaufnahme einzig allein durch den an das Polymer konjugierten Antikörper vermittelt wird.

Das Alexa Fluor 488 markierte Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) sollte bei neutralem pH-Wert negativ geladen vorliegen, weswegen keine unspezifische Zellaufnahme zu erwarten ist, da die negativen Ladungen an der Membranoberfläche repulsiv auf das negativ geladene Polymer wirken. FACS-Messungen bestätigen diese Annahme, das Polymer wird nur zu 1.8 Prozent von dendritischen Knochenmarkzellen aufgenommen, wie in Abbildung 4 - 9 a zu sehen ist.

In der FACS-Aufnahme gibt der Bereich rechts des vertikalen Trennstrichs, also Q2 und Q4 die Anzahl der Zellen mit aufgenommenem Polymer an, der Bereich links des vertikalen Trennstrichs (Q1 und Q3) gibt hingegen Auskunft über Zellen, die kein Polymer aufgenommen haben

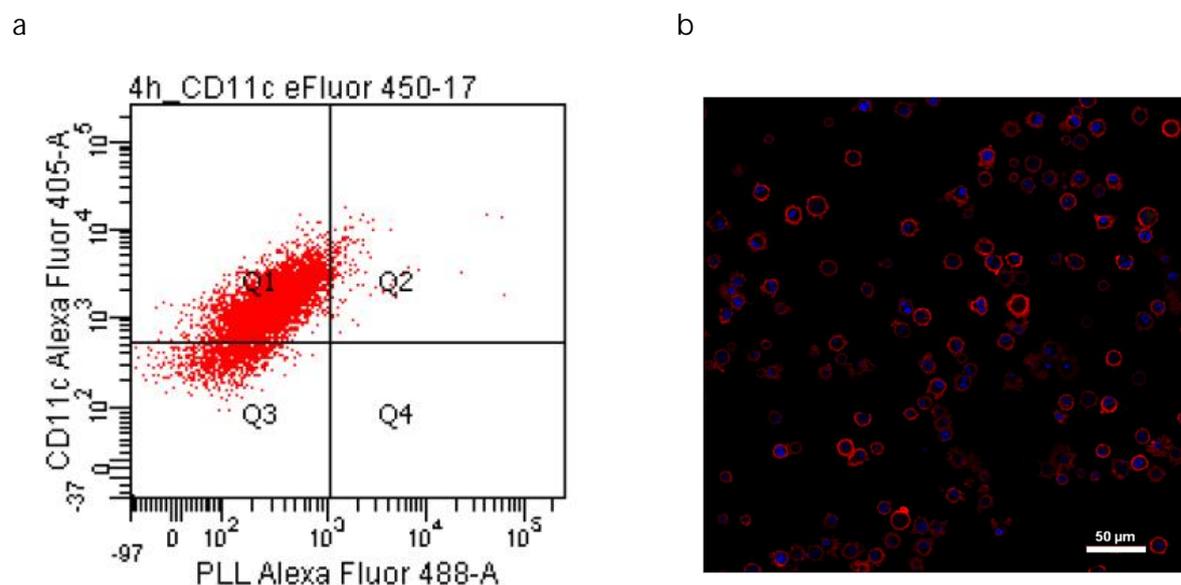


Abbildung 4 - 9: Zellaufnahmestudien von Alexa Fluor 488 markiertem Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) in dendritische Knochenmarkzellen: a) FACS-Messung und b) CLSM-Aufnahme. Die Zellen liegen in 1xPBS vor, sind nicht fixiert, für 4 Stunden inkubiert und liegen mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{12}$ Partikeln pro $5 \cdot 10^5$ Zellen vor; blau: Hoechst 33342 – Markierung des Zellkern; rot: Cell Mask Orange – Markierung der Zellmembran; grün: Alexa Fluor 488 markiertes Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin).

4.1 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

Auch in der CLSM-Aufnahme in Abbildung 4 - 9 b ist keine unspezifische Aufnahme in die dendritischen Knochenmarkzellen zu erkennen, womit das Ergebnis der FACS-Messung bestätigt wird.

Die FACS-Messungen werden von [REDACTED] durchgeführt. Am [REDACTED] werden die CSLM-Messungen von [REDACTED] durchgeführt.

4.1.5.2 Komplexierungsexperimente

Es wird das Komplexierungsverhalten von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) mit DNA und divalenten Metallionen untersucht um eine mögliche Anwendung dieser Komplexe in der Gentransfektion zu evaluieren.

Bei neutralem pH-Wert liegt Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) negativ geladen vor, weswegen durch elektrostatische Repulsion keine Komplexe mit negativ geladener DNA ausgebildet werden können. Diese Annahme wird experimentell bestätigt. Es ist bekannt, dass Polymere mit Carboxylatgruppen (beispielsweise Poly-(Acrylsäure)) starke Komplexe mit divalenten Metallionen, wie Ca^{2+} oder Zn^{2+} ausbilden, sodass diese Eigenschaft ausgenutzt werden kann um eine kationische Nettoladung in das Polymer einzubringen [21]-[23]. In 0.15 M Natriumchloridlösung und mit einem Verhältnis von $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^- < 115$ bzw. $\text{Zn}^{2+}/\text{COO}^- < 50$ tritt bei der Bindung von Ca^{2+} bzw. Zn^{2+} an das Zwitterion, anders als bei der Poly-(Acrylsäure) keine Aggregation oder Phasenseparation auf (siehe Anhang Abbildung A - 11). Die positiv geladenen Ammoniumgruppen halten das Polymer auch bei möglicher Komplexierung der Carboxylatgruppen mit den Ionen in Lösung, ähnlich wie bei Poly-(Acrylsäure)-Poly-(2-Acrylamido-2-methyl-propansulfonat) Blockcopolymeren, in denen die negativ geladenen Sulfonatgruppen die Löslichkeit des Polymers garantieren [24]. Auch DNA bildet mit einem Verhältnis von $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^- < 157$ bzw. $\text{Zn}^{2+}/\text{PO}_4^- < 84$ keinerlei Aggregate mit den Metallionen aus. Für die Untersuchung des Komplexierungsverhaltens des Zwitterions mit DNA in Gegenwart von Ca^{2+} bzw. Zn^{2+} wird zu den Metall-Polymer-Lösungen DNA zugegeben. Für sehr hohe Konzentrationen an Ca^{2+} kann eine DNA-Komplexbildung beobachtet werden, in Gegenwart von Zn^{2+}

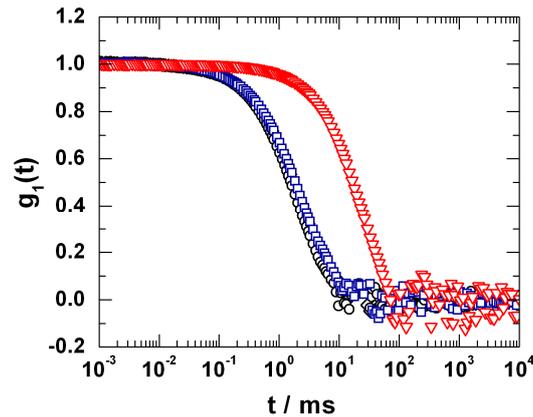


Abbildung 4 - 10: Autokorrelationsfunktionen von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) in wässriger 0.15 M Natriumchloridlösung (blaue Vierecke), Polymer + Zn^{2+} (Zn^{2+} /Wiederholungseinheit des Zwitterions = 16) (schwarze Kreise) und Polymer + Zn^{2+} + DNA (PO_4^- /Wiederholungseinheit des Zwitterions = 0.31) (rote Dreiecke). Streuwinkel 30° und $c(\text{Polymer}) = 0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

tritt die Komplexbildung hingegen schon, wie in Abbildung 4 - 10 zu sehen bei einem Verhältnis von $Zn^{2+}/COO^- > 10$ auf, wenn das Zn^{2+}/PO_4^- Verhältnis hoch genug ist. Mit zunehmendem Zn^{2+}/COO^- Verhältnis nimmt das benötigte Zn^{2+}/PO_4^- Verhältnis wie zu erwarten ab.

Nach Zugabe von Zn^{2+} zur Polymerlösung nimmt der hydrodynamische Radius des Polymers von $R_h = 23 \text{ nm}$ auf $R_h = 20 \text{ nm}$ ab, nach Zugabe von DNA bilden sich dann Komplexe mit $R_h = 220 \text{ nm}$ aus.

Die Messungen werden von [REDACTED] durchgeführt.

4.1.6 Zusammenfassung von Kapitel 4.1

Das zwitterionische Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) mit $M_w = 721,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ wurde durch freie radikalische Polymerisation des Monomers ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin dargestellt und zeigte sowohl in Wasser als auch in 5 M Natriumperchloratlösung über einen breiten pH-Bereich ($1.3 \leq \text{pH} \leq 12.7$) eine gute Löslichkeit. Auch am isoelektrischen Punkt (IEP) bei $\text{pH} = 6.4$ lag das zwitterionische Polymer in einer expandierten Knäuelstruktur vor, bei Zugabe von Säure oder Base erfolgte weitere Expansion. Bei allen pH-Werten und Ionenstärken konnte ein Einzelkettenmolekülverhalten nachgewiesen und jegliche Aggregationstendenz ausgeschlossen werden.

Das Polymer erfüllt folgende vier Grundvoraussetzungen, die an einen „Nanocarrier“ mit potentieller Anwendung im menschlichen Körper gestellt werden:

- 1) Da in humanem Blutserum keine Aggregation auftrat und die Überlebensrate von BM-DC und HEK293 Zellen auch bei hohen Polymerkonzentrationen bei über 70 Prozent lag, kann es als biokompatibel angesehen werden.
- 2) Nach Zugabe von Zn^{2+} bildete es mit DNA Komplexe aus, die in der Gentransfektion ihren Einsatz finden können.
- 3) Die Aminogruppen können, wie durch Farbstoffmarkierung mit Alexa Fluor 488 gezeigt wurde für die Konjugation mit Biomolekülen genutzt werden.
- 4) Zellaufnahmestudien belegten eine geringe unspezifische Aufnahme des Polymers in dendritische Knochenmarkzellen, was grundlegend für das Antikörper vermittelte spezifische „Targeting“ von Zellen ist.

4.2 Polymerbürsten mit ELP basierten Hexapeptidseitenketten

In diesem Kapitel wird neben der Synthese und Charakterisierung von Polymerbürsten mit zwitterionischen Hexapeptidseitenketten auch auf ihre Biokompatibilität eingegangen.

Das Makromonomer Boc- ϵ -N-Methacryloyl-Lys-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COOEt wird durch Kopplung von Boc- ϵ -N-Methacryloyl-Lys-COOH mit der ELP basierten Pentapeptid-Wiederholungseinheit H₂N-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COOEt dargestellt und frei radikalisch mittels „grafting through“ zur geschützten zylindrischen Polymerbürste mit Hexapeptidseitenketten umgesetzt. Durch Abspaltung der Boc- und Ethylester-Schutzgruppen wird das wasserlösliche zwitterionische Poly-(H₃N⁺- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lys-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COO-) erhalten.

Die Peptid basierten Polymerbürsten werden mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung, GPC und AFM charakterisiert. Ihr Phasenübergangsverhalten wird über Trübungskurven-Messungen untersucht und CD-Spektren geben Aufschluss über Konformationsänderungen in Abhängigkeit von Peptidsequenz, Salz und Temperatur. Toxizitätstests und dynamische Lichtstreuung in humanem Blutserum werden durchgeführt um die Biokompatibilität des Systems zu überprüfen.

4.2.1 Synthese und Charakterisierung

In Abbildung 4 - 13 ist die Synthesestrategie zur Darstellung der zwitterionischen Polymerbürste mit ELP basierten Hexapeptidseitenketten 5 gezeigt. Das Makromonomer 3 wird durch Kopplung der hydrophoben Pentasequenz des Elastins Val-Pro-Gly-Gly-Gly 2 mit Boc-ε-N-Methacryloyl-Lys 1 synthetisch dargestellt [1]. Dafür wird das Pentapeptid, wie in Abbildung 4 - 11 gezeigt stufenweise aus den Aminosäuren aufgebaut. Das orthogonale Schutzgruppensystem gewährleistet eine selektive Abspaltung der Schutzgruppen und durch Kopplung der entsprechenden Aminosäuren mittels Chlorameisensäureisobutylester in Chloroform wird das Pentapeptid im Gramm Maßstab dargestellt. Das Boc-ε-N-Methacryloyl-Lys wird durch Umsetzung der α-Aminogruppe des ε-N-Methacryloyl-Lys mit Di-tert-butylidicarbonat dargestellt und anschließend mit dem Pentapeptid zum Makromonomer umgesetzt.

In Abbildung 4 - 12 ist die HPLC-Messung der beiden Komponenten 1 und 2, sowie ihrem Produkt, dem Makromonomer 3 gezeigt. Zuerst eluiert das Pentapeptid 2 mit seiner Verunreinigung 2v, gefolgt vom Boc-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin 1. Der Peak des Boc-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin entspricht nicht dem Peak der Verunreinigung im Monomer 3v, der kurz nach dem Peak des Boc-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin erscheint. Als Letztes eluiert das Makromonomer 3. Bifunktionelle Verunreinigungen werden durch ESI-Messungen ausgeschlossen [1].

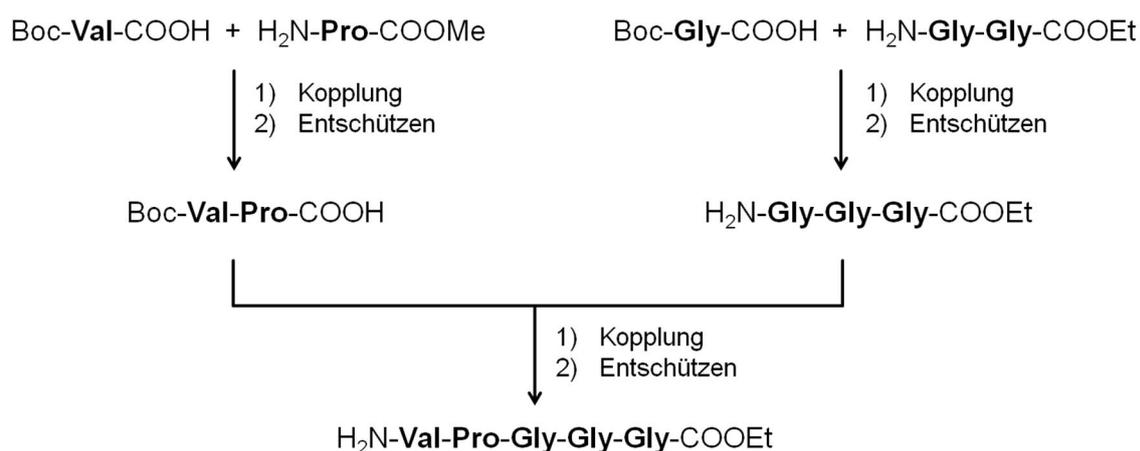


Abbildung 4 - 11: Schematische Darstellung der mehrstufigen Synthese der Elastin basierten Pentapeptid-Wiederholungseinheit H₂N-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COOEt [1].

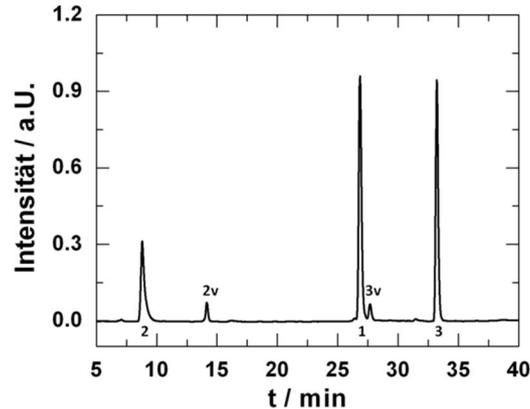


Abbildung 4 - 12: HPLC-Messung des Pentapeptids Boc- ϵ -N-Methacryloyl-Lys-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COOEt 3 im Gemisch mit den Edukten Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin 1 und HCOO-H₃N⁺-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COOEt 2 (Nucleosil-Säule, UV-Detektion bei 220 nm, je c = 0.5 g·L⁻¹, Gradient in 45 min von H₂O/AN = 95/5 auf H₂O/AN = 60/40). v = Verunreinigungen.

Das Monomer Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lys-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COOEt wird durch freie radikalische Polymerisation mit 4,4-Azobis-4-cyanovaleriansäure als Initiator für 24 Stunden bei 70 °C in Wasser polymerisiert. Das molare Monomer zu Initiator-Verhältnis beträgt $[M]/[I] = [100]/[0.5]$. Nach Zugabe der Initiatorlösung zum Monomer scheidet sich eine viskosere Gelphase ab, sodass ein zweiphasiges Gemisch entsteht, was auf eine Mischungslücke im System Monomer/Wasser hinweist. Auch beim Erhitzen auf 70 °C bleiben die 2 Phasen bestehen, was das LCST-Verhalten der Mischung belegt. Zur Abtrennung des Monomers, wie zur Fraktionierung des Polymers wird die Polymerbürste in HFIP gelöst. Zu dieser Polymerlösung wird eine Wasser/Hexafluorisopropanol-Mischung = 9/1 zugetropft, bis eine Trübung eintritt. Im Kühlschrank kommt es zur Sol-Gel-Phasentrennung: Die Solphase wird abgehoben, die Gelphase gefriergetrocknet. Zur Solphase wird bis zur erneuten Trübung weitere Wasser/Hexafluorisopropanol-Mischung = 9/1 zugetropft und das Produkt durch Gefrier Trocknung der Gelphase 2 erhalten. Gelphase 1 kann erneut in HFIP gelöst werden und durch Zugabe von Wasser/Hexafluorisopropanol-Mischung = 9/1 weiter fraktioniert werden.

4.2 Polymerbürsten mit ELP basierten Hexapeptidseitenketten

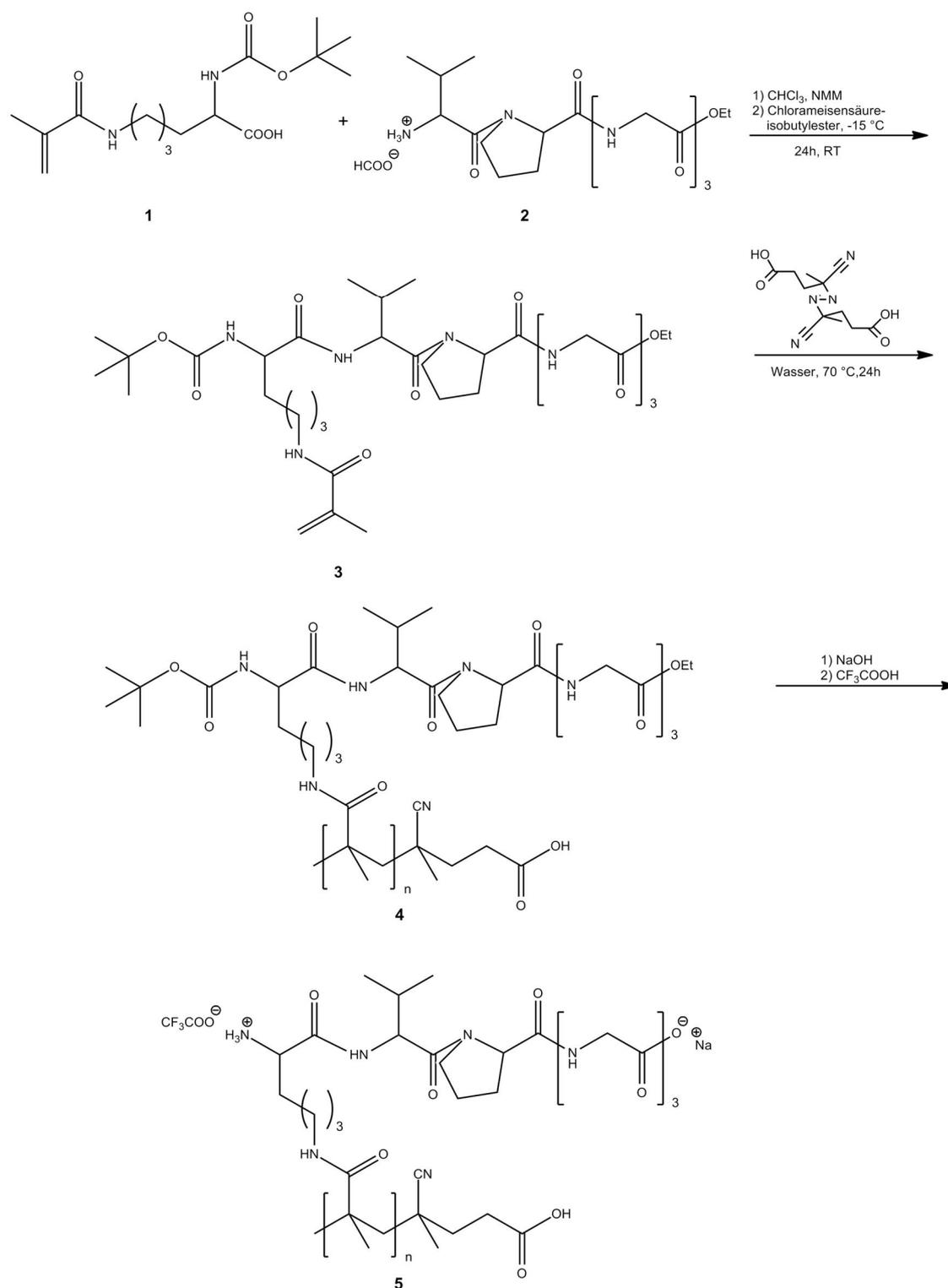


Abbildung 4 - 13: Reaktionsschema zur Darstellung von Poly-($\text{H}_3\text{N}^+\text{-}\epsilon\text{-N-Methacryloyl-Lys-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COO}^-$) 5. Das Makromonomer 3 wird durch Kopplung von Boc- $\epsilon\text{-N-Methacryloyl-Lys}$ 1 mit dem Pentapeptid (VPGGG) 2 dargestellt und zur geschützten Polymerbürste mit Hexapeptid-seitenketten 4 polymerisiert. Nach dem Entschützen wird die zwitterionische Polymerbürste 5 erhalten.

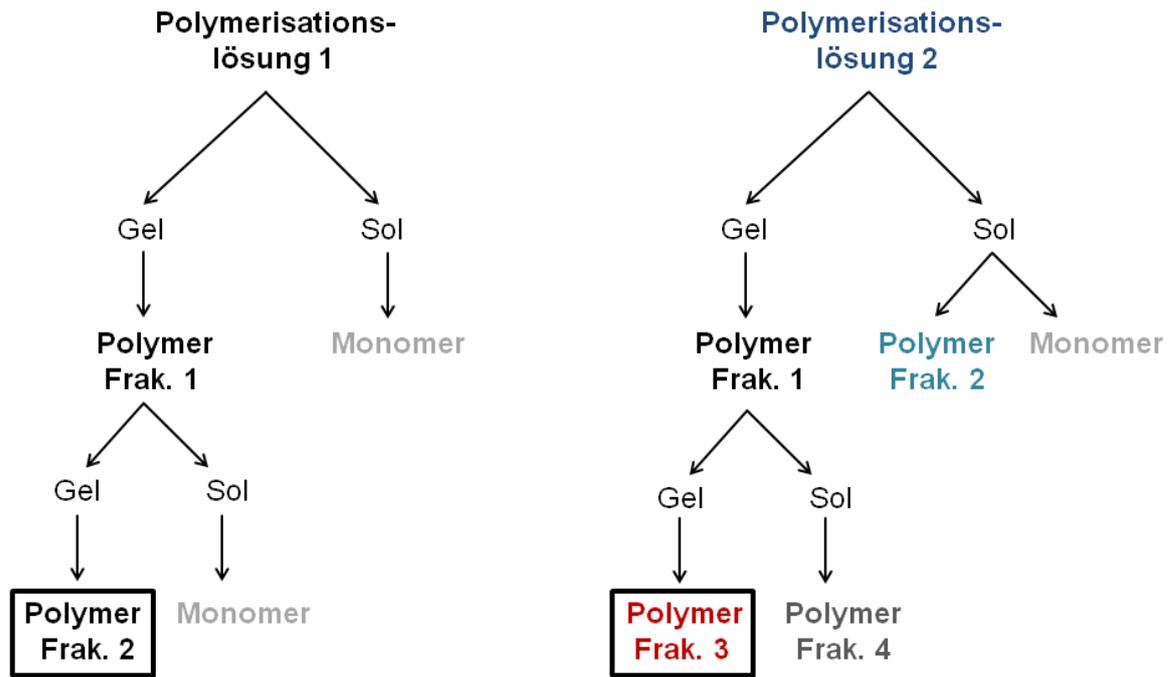


Abbildung 4 - 14: Schematische Darstellung der verschiedenen Fraktionierungsschritte der Polymere 1 und 2 mit den der GPC-Messungen entsprechenden Farbcodes. Die umrandeten Fraktionen werden in der Lichtstreuung vermessen.

Es werden zwei Ansätze zur Synthese der Polymerbürste durchgeführt, die Produkte aus den verschiedenen Ansätzen werden unterschiedlich oft fraktioniert, vgl. Abbildung 4 - 14.

Polymerbürsten aus Polymerisation 1 werden im Folgenden als Polymer 1 Fraktion x bezeichnet, entsprechend stammen die Polymere 2 Fraktion x aus Polymerisation 2. Bestimmte Fraktionen beider Polymerbürsten werden mit Hilfe statischer und dynamischer Lichtstreuung, sowie GPC- und AFM-Messungen charakterisiert.

Die GPC-Messungen (in DMF mit LiCl) der Polymere 1 und 2 zeigen relativ breite Elutionskurven, die ein starkes „Tailing“ aufweisen, was durch eine vergleichsweise breite Molmassenverteilung begründet sein kann. Der steile Anstieg der Peaks deutet darauf hin, dass die obere Ausschlussgrenze der GPC-Säule erreicht wird.

Wie bereits beschrieben, zeigt die GPC-Messung der Fraktion 1 des Polymers 1, dass noch ein Anteil an Restmonomer vorhanden ist [1]. Deshalb wird durch Fraktionierung der Restmonomeranteil auf 13 Prozent verringert, was anhand von GPC-Messungen gezeigt werden kann.

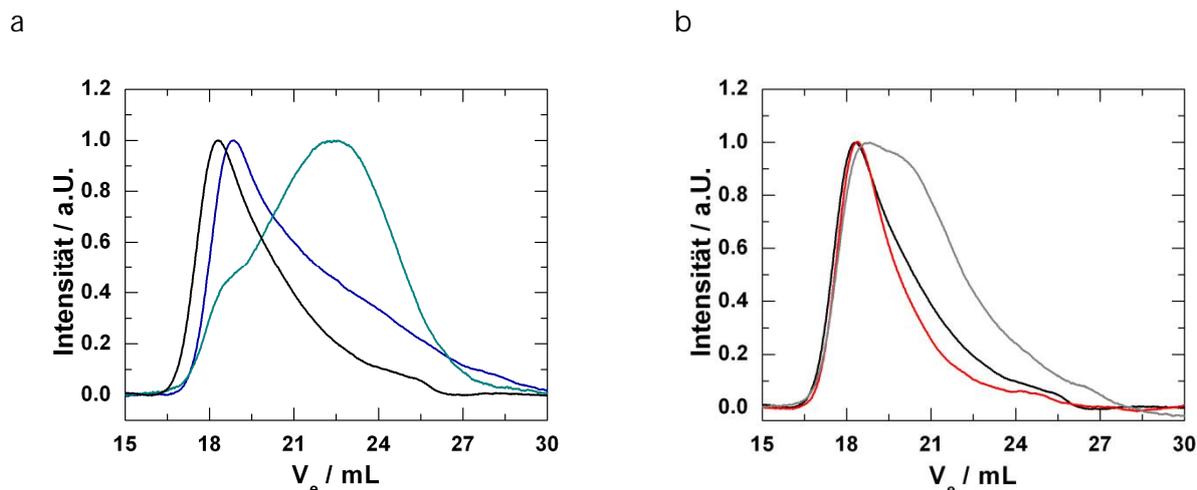


Abbildung 4 - 15: GPC-Messungen der verschiedenen Fraktionen von Polymer 2: a) Polymerisationslösung (blau), Fraktion 1 (schwarz) und Fraktion 2 (türkis); b) Polymer 2 mit Fraktion 1 (schwarz), Fraktion 3 (rot) und Fraktion 4 (grau).

Die GPC-Messungen der unterschiedlichen Fraktionen von Polymer 2 sind in Abbildung 4 - 15 gezeigt. Das Monomer kann bereits in der ersten Fällung abgetrennt werden, die weiteren Fraktionierungsschritte dienen nur der Abtrennung von niedermolekularen Polymeren. Beim Vergleich der Peaks für Fraktion 3 (rot) und der Polymerisationslösung (blau) ist ein deutlich geringeres „Tailing“ für die rote Kurve festzustellen, was zeigt, dass durch wiederholte Fraktionierung eine Abtrennung der niedermolekularen Polymere (türkis und grau) möglich ist. In Fraktion 3 wird schließlich ein Polymer mit sehr hohem Molekulargewicht erhalten.

Da für die Polymerbürsten kein guter Vergleichsstandard in dieser Molekulargewichtsgröße vorhanden ist, dienen die GPC-Messungen nur der qualitativen Veranschaulichung, es können aber keine quantitativen Aussagen über die Molekulargewichte der Polymerbürsten getroffen werden. Daher wird das Molekulargewicht M_w durch statische Lichtstremessungen ermittelt, die Ergebnisse der statischen und dynamischen Lichtstreuung sind in Tabelle 4 - 6 aufgeführt. Es werden von beiden Polymeren nur die hochmolekularen Proben, also Polymer 1 Fraktion 2 (Bezeichnung in Tabelle 4 - 6: Polymer 1) und Polymer 2 Fraktion 3 (Bezeichnung in Tabelle 4 - 6: Polymer 2) durch Lichtstreuung charakterisiert.

Tabelle 4 - 6: Ergebnisübersicht der statischen und dynamischen Lichtstreuemessungen der geschützten (1 und 2) und entschützten (1b und 2b) Polymerbürsten mit Hexapeptidseitenketten.

Polymer	1	1b	2	2b
geschützt	ja	nein	ja	nein
$M_w / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$6.1\cdot 10^6$	$6.3\cdot 10^{6^*}$	$7.4\cdot 10^6$	$9.3\cdot 10^{6^*}$
P_w	8590	8705	10420	12935
R_g / nm	140	155	170	106
R_h / nm	64	78	77	101
ρ -Verhältnis	2.2	2	2.2	1
$A_2 / \text{mol}\cdot\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-2}$	$1.7\cdot 10^{-7}$	$7.37\cdot 10^{-9}$	$1.9\cdot 10^{-7}$	$8.7\cdot 10^{-8}$

* dn/dc geschätzt auf $0.16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Aus Gründen der Anschaulichkeit zeigen Abbildung 4 - 16 a und c Zimm-Plots der Polymere 1 und 2 mit quadratischem Fit. Für die Bestimmung von M_w und R_g aus den statischen Messungen wird jedoch die Anfangssteigung der Kurven linear gefittet. Beide Polymerbürsten weisen hohe Polymerisationsgrade, $DP_1 = 8590$ und $DP_2 = 10420$ auf, die Konturlängen der Polymerbürsten liegen damit bei 2150 nm und 2600 nm (mit 0.25 nm pro Methacrylamideinheit). Auch die Werte für R_g mit $R_{g1} = 140 \text{ nm}$ und $R_{g2} = 170 \text{ nm}$, sowie R_h mit $R_{h1} = 64 \text{ nm}$ und $R_{h2} = 77 \text{ nm}$ bestätigen die großen Dimensionen der Polymerbürsten. Ein ρ -Verhältnis von $\rho = 2.2$ lässt auf eine polydisperse Wurmkeule mit großer Persistenzlänge schließen ($l_k \sim 30 \text{ nm}$), auch die Abwärtsbiegung der statischen Lichtstreuemessungen im Bereich kleiner Streuwinkel bestätigt die schon durch GPC-Messungen festgestellte hohe Polydispersität der Proben. Die positiven A_2 -Werte zeigen, dass es sich bei HFIP um ein gutes Lösungsmittel für das Polymer handelt.

AFM-Messungen (spin-cast der HFIP-Lösung auf Kohle beschichtetem Mica) von Polymer 2, gezeigt in Abbildung 4 - 17 lassen eine eher knäuelartige Struktur der Polymerbürsten erkennen. Aus diesem Grund ist es auch nicht möglich die Kettenlänge der Polymerbürsten durch Auswertung der AFM-Aufnahmen zu bestimmen und sie mit der theoretischen Konturlänge von 2600 nm zu vergleichen. Es kann nur erneut die Polydispersität der Probe festgestellt werden, da vor allem in Abbildung 4 - 17 b sehr kleine Polymere zu erkennen sind, die sich teilweise in eher knäuelartige Strukturen zusammenlagern.

4.2 Polymerbürsten mit ELP basierten Hexapeptidseitenketten

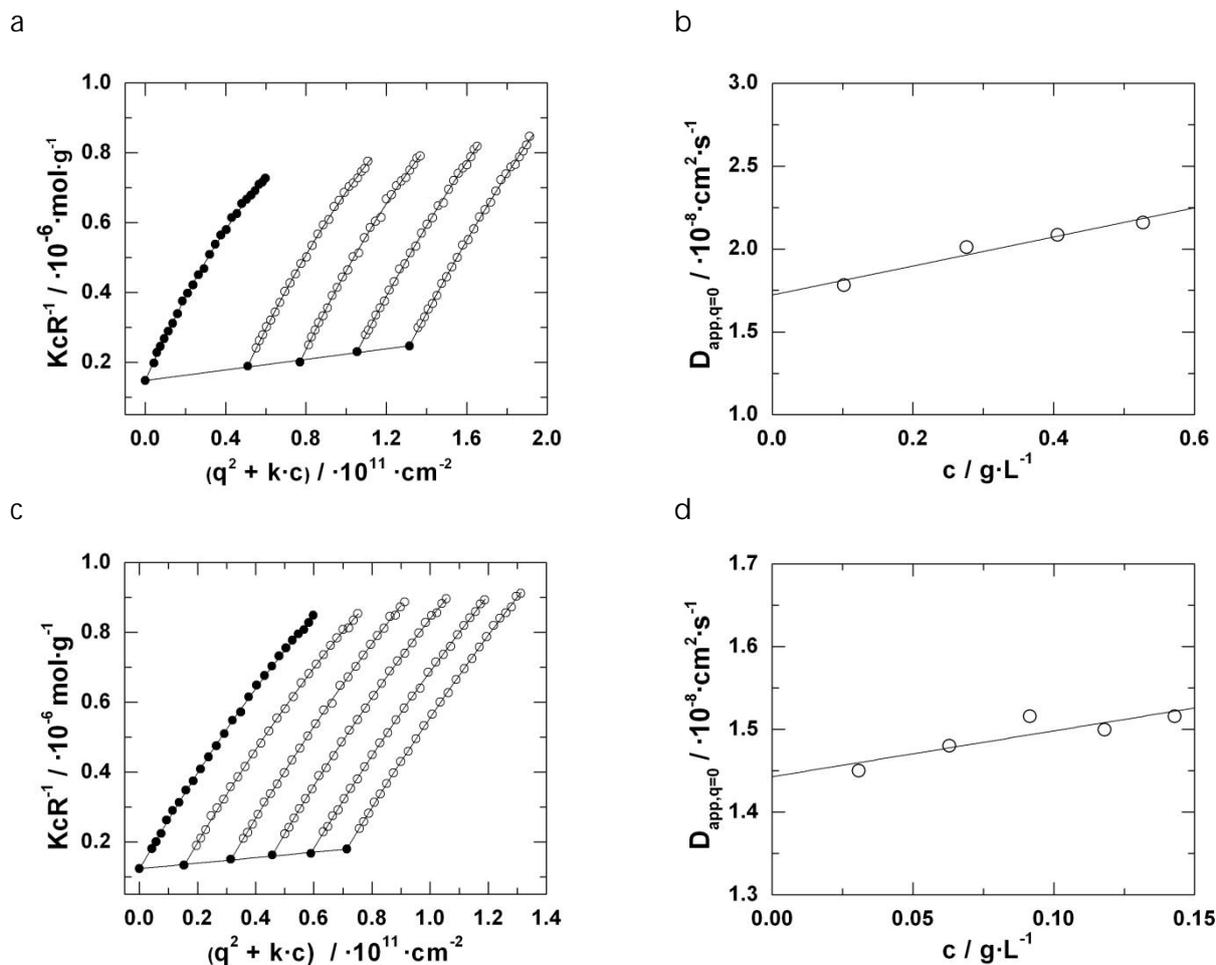


Abbildung 4 - 16: Zimm-Plots der geschützten Polymere 1 und 2: a) Statische und b) dynamische Lichtstreuung für Polymer 1 in 20 mM NaCF_3COOH -HFIP Lösung; c) Statische und d) dynamische Lichtstreuung für Polymer 2 in 5 mM NaCF_3COOH -HFIP Lösung. $dn/dc = 0.18 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (gemessen), $\lambda = 632.8 \text{ nm}$

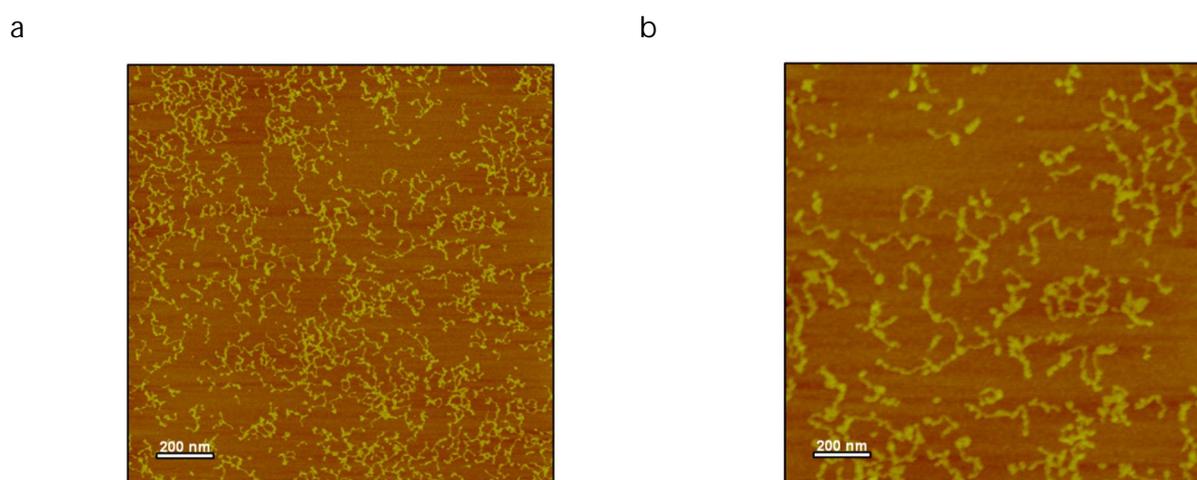


Abbildung 4 - 17: AFM-Höhenbilder von Poly-(Boc-ε-Methacryloyl-Lys-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COOEt), spin-cast der HFIP-Lösung mit $c = 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ auf Kohle beschichtetem Mica.

Nach Abspaltung der Boc- und Ethylester-Schutzgruppen durch Zugabe von Trifluoressigsäure und Natriumhydroxidlösung zu Poly-(Boc- ϵ -N-Methacryloyl-Lys-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-COOEt) werden die wasserlöslichen zwitterionischen Polymerbürsten Poly-(H₃N⁺- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) erhalten, welche als Polymer 1b bzw. 2b bezeichnet werden. Für Polymer 2 ergeben sich bei der Entschützungsreaktion Löslichkeitsprobleme, sodass eine hohe Zugabe an Trifluoressigsäure sowie Natriumhydroxidlösung wahrscheinlich, wie in AFM-Aufnahmen (Anhang Abbildung A - 12) zu erkennen, zu Veränderungen in der Struktur der entschützten Hexapeptidbürste 2 führen. Zur Entfernung des überschüssigen Salzes wird eine Dialyse mit einer Float-A-Lyzer CE (MWCO 5000) Dialysemembran gegen Wasser durchgeführt. Das Produkt wird durch Gefriertrocknung der wässrigen Lösung isoliert. Im Falle von Polymer 2b wird das dialysierte Polymer zudem durch einen GV 200 nm Filter filtriert und anschließend nach Gefriertrocknung erhalten. Die wasserlöslichen Polymere werden mittels Lichtstreuung, AFM und CD-Spektroskopie charakterisiert. GPC-Messungen sind aufgrund der starken Adsorption der zwitterionischen Polymere an das Säulenmaterial nicht möglich. Das Verhalten der zwitterionischen Hexapeptid-Polymerbürsten in humanem Blutserum und Toxizitätstests werden in Kapitel 4.2.4 diskutiert.

Die Ergebnisse der statischen und dynamischen Lichtstreuung sind in Tabelle 4 - 6 aufgeführt. Wie bereits bei der geschützten Probe werden die Ergebnisse der statischen Lichtstreuung (M_w , R_g und A_2) durch lineares Fitten der Anfangssteigung erhalten, die quadratischen Fits sind nur als Hilfslinie für das Auge gezeigt. Das Brechungsindexinkrement der wässrigen Hexapeptid-Polymerlösung wird ausgehend von dem dn/dc -Wert der ELP-Polymerbürste Poly-(MA-ELP) und dem dn/dc -Wert von Poly-(Methacrylamid) in Wasser auf $dn/dc = 0.16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ abgeschätzt. Damit werden durch statische Lichtstremessungen Molekulargewichte von $M_{w(1b)} = 6.3\cdot 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $M_{w(2b)} = 9.3\cdot 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ erhalten, woraus sich mit $P_{w(1b)} = 8705$ und $P_{w(2b)} = 12935$, ausgehend von einer Länge von 0.25 nm pro Methacrylamideinheit Konturlängen von 2180 nm bzw. 3230 nm ergeben. Für Polymer 1 liegen damit die Polymerisationsgrade der geschützten und der entschützten Bürste mit $P_{w(1)} = 8590$ und $P_{w(1b)} = 8705$ im Bereich des Fehlers.

4.2 Polymerbürsten mit ELP basierten Hexapeptidseitenketten

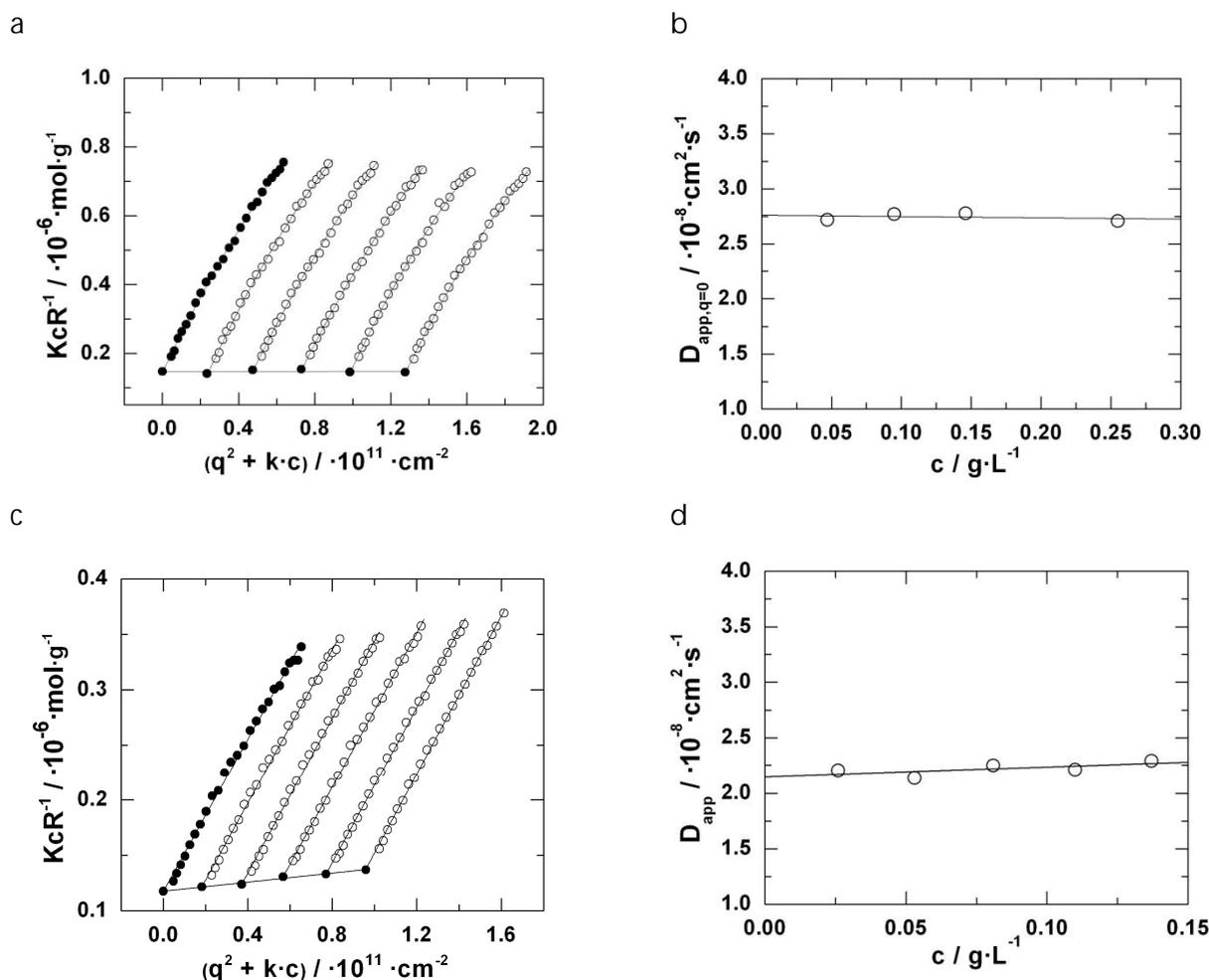


Abbildung 4 - 18: Zimm-Plot der entschützten Polymere 1b (a und b) und 2b (c und d):
a) Statische und b) dynamische Lichtstreuung in wässriger 50 mM NaCl Lösung des Polymers 1b und c) Statische und d) dynamische Lichtstreuung in wässriger 50 mM NaCl Lösung des Polymers 2b; $dn/dc = 0.16 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (geschätzt), $\lambda = 632.8 \text{ nm}$.

Bei Polymer 2 ist hingegen der Polymerisationsgrad der entschützten Bürste um ca. 20 Prozent größer als der der geschützten Polymerbürste. Da das Polymer jedoch nach dem Entschützen aufgrund von Aggregationen filtriert werden muss, ist eine Fraktionierung durch den Filter nicht auszuschließen und die molekularen Eigenschaften der Polymerbürste 2 und 2b sind nicht zu vergleichen.

Die Radien der entschützten Polymerbürste 1b, $R_g = 155 \text{ nm}$ und $R_h = 78 \text{ nm}$, sind etwas größer als die der entsprechenden geschützten Polymerbürste. Aufgrund der im zwitterionischen Polymer vorliegenden Ladungen kann es zu elektrostatischen Abstoßungen der lokal dicht sitzenden negativen Ladungen der Carboxylatgruppen (an der Außenseite der Bürste), sowie der positiv geladenen Ammoniumgruppen (im Inneren der Bürste) kommen, wodurch die größeren Radien erklärt werden können.

Sowohl die geschützte als auch die zwitterionische Hexapeptid-Polymerbürste weisen

eine sehr hohe Kettensteifigkeit im Bereich von $l_k = 30$ nm auf, die wahrscheinlich durch die starre Peptidstruktur in der Seitenkette verursacht wird und über Lichtstreuung bestimmt werden kann.

Die AFM-Aufnahmen des zwitterionischen Poly-($H_3N^+-\epsilon$ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO-) 1b, spin-cast der wässrigen Lösung bei $pH = 4$ auf Mica sind in Abbildung 4 - 19 gezeigt. Die wurmartigen Strukturen lassen sich hier viel deutlicher als in den AFM-Aufnahmen der geschützten Probe erkennen. Die Polymerbürsten sind relativ dick (Breite: 19 nm, Höhe: 26 nm), was bei einer Seitenkette von nur 6 Aminosäuren auf eine verdrillte Struktur hinweist. Da es sich um AFM-Messungen der getrockneten wässrigen Polymerlösung auf Mica handelt, muss zudem von Wechselwirkungen mit der Oberfläche ausgegangen werden. Die aus dem Polymerisationsgrad theoretisch berechnete Konturlänge kann auch hier nicht mit den aus den AFM-Aufnahmen bestimmten Längen der Polymerbürsten verglichen werden.

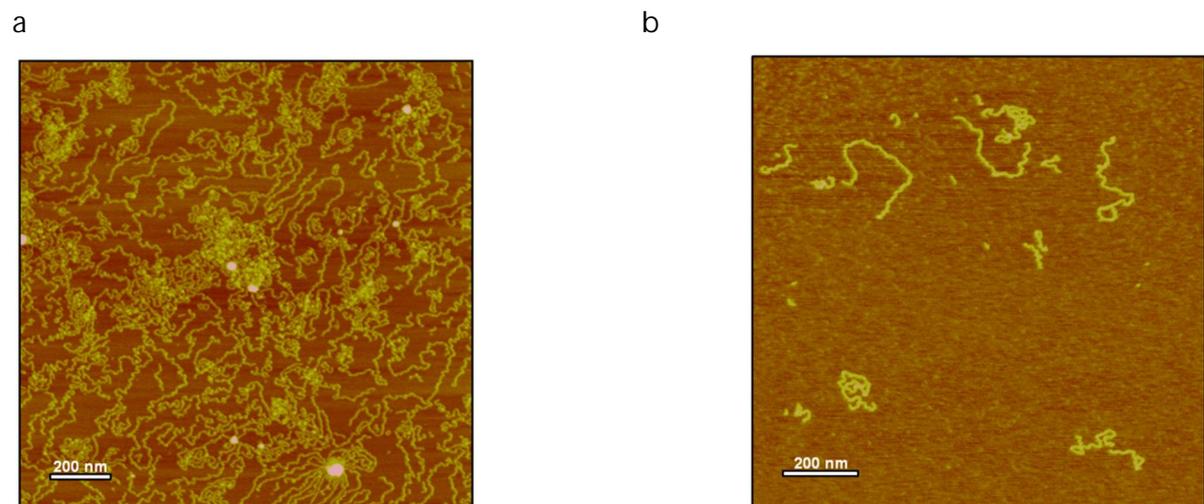


Abbildung 4 - 19: AFM-Höhenbilder von Poly-($H_3N^+-\epsilon$ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO-), spin-cast der wässrigen Lösung mit $pH = 4$ auf Mica mit a) $c = 0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und b) $c = 0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.2.2 Phasenübergangsverhalten

Für Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) werden Trübungskurven bei pH = 1.4 in wässriger 1.5 M NaCl Lösung mit verschiedenen Polymerkonzentrationen aufgenommen (Abbildung 4 - 20). Alleinige Salzzugabe (bis 2 M NaCl) führt hingegen nicht zur Trübung, da durch die relativ hohe Hydrophilie der Hexapeptidsequenz mit der hydrophilen Gastaminosäure Glycin an Position 4 eine verminderte Aggregationstendenz besteht. Durch Abspaltung der Schutzgruppen steigt zudem die Hydrophilie der Hexapeptidsequenz. Ähnliche Ergebnisse sind für (VPGVG)₄ beschrieben, für das ohne Schutzgruppe auch bei hohen Konzentrationen unter Temperaturerhöhung keine Aggregation stattfindet [25]. Es wird vermutet, dass für eine stabile wasserfreie peptidreiche Phase eine kooperative Stabilisierung Voraussetzung ist. Für diese kooperative Stabilisierung werden ELPs mit höherer Anzahl von Pentapeptid-Wiederholungseinheiten benötigt. Unklar bleibt jedoch, ob für diese kooperativen Wechselwirkungen hydrophobe Kräfte zwischen den Peptidketten oder intermolekulare Wasserstoffbrücken verantwortlich sind. Eine temperaturabhängige Aggregation kann hingegen für Fmoc-(VPGVG)₄ Peptide festgestellt werden, welche aufgrund der hydrophoben Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus des Peptids eine erhöhte Hydrophobizität aufweisen [25].

Aufgrund der hohen Seitenkettendichte in der Polymerbürste Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) befinden sich die Hexapeptidsequenzen in starker räumlicher Nähe, wodurch eine lokal hohe Konzentration an Hexapeptidsequenzen entsteht, sodass es aufgrund des kooperativen Effekts zur Aggregation kommt.

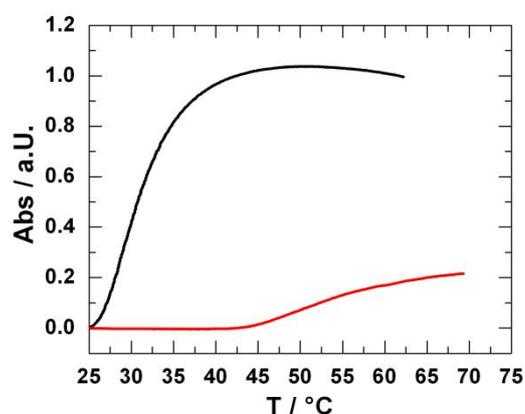


Abbildung 4 - 20: Trübungskurven der entschützten Hexapeptid Polymerbürste 1b in wässriger 1.5 M NaCl-Lösung mit pH = 1.4 und $c(\text{Polymer}) = 0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (schwarz) und $c(\text{Polymer}) = 0.125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (rot). Heizrate: $0.5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Wie bereits in Kapitel 2.3.6 erwähnt, können für EBPs[26] mit VPGVG Sequenz und für EBP-PEG-EBP Triblockcopolymeren[27],[28] in einem pH-Bereich von pH = 1-3 Trübungskurven gemessen werden, die bei niedrigerem pH und höherer Konzentration eine zu erwartende erniedrigte Übergangstemperatur aufweisen (siehe Anhang Abbildung A - 13). Für eine Mischung von EBPs mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad wird nur eine einzige Übergangstemperatur erhalten, für die ein linearer Zusammenhang mit dem Mischungsverhältnis der EBPs besteht (Abbildung 2 - 10 b) [26]. Dies wird durch die der „self-assembly“ bevorzugte „co-assembly“ ermöglicht [29].

Die gleichen Ergebnisse werden auch für das hier beschriebene Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) erhalten: Es kann nur bei pH = 1.4 eine Trübung gemessen werden, die wie in Abbildung 4 - 20 zu sehen ist mit abnehmender Konzentration immer unschärfer wird. Aus den Trübungskurven können die Übergangstemperaturen T_t mit 31 °C für $c(\text{Polymer}) = 0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und $T_t = 54 \text{ °C}$ für $c(\text{Polymer}) = 0.125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aus dem Maximum der 1. Ableitung der Trübungskurve bestimmt werden. Bei pH = 1.4 kann im Gegensatz zu höheren pH-Werten eine Aggregation festgestellt werden, da bei diesem pH-Wert alle Carboxylatgruppen protoniert vorliegen und somit der hydrophobe Charakter des Polymers zunimmt. Zugabe von NaCl (bis zu 2 M) allein führt hingegen nicht zur Aggregation.

4.2.3 Charakterisierung der Sekundärstrukturen mittels CD-Spektroskopie

Wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, wird die CD-Spektroskopie häufig zur Sekundär- und Tertiärstrukturanalyse von Peptiden und Proteinen herangezogen. In diesem Abschnitt werden die sequenz-, temperatur- und salzabhängigen Strukturänderungen, die mittels CD-Spektroskopie detektiert werden können erläutert.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt können keine exakten Aussagen über die Konformationsänderungen der Elastine gemacht werden. Aufgrund der hohen Mobilität des Peptidrückgrats der Elastine sind weder high-resolution NMR- noch Röntgenstruktur-Aufnahmen möglich. Spektroskopische Untersuchungen von Urry[30] und „molecular dynamics“ (MD) Simulationen von Li[31] führen zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Der inverse Temperaturübergang der Elastine wird nach Urry durch den Übergang von einer ungeordneten („random coil“) in eine geordnete β -Spiralstruktur durch Temperaturerhöhung erklärt [32]. Drei Pentamereinheiten, jede weißt eine Typ II β -turn Struktur auf, bilden eine Biegung der Spirale. Wie von Reiersen et al.[33] mit Hilfe von CD-Spektroskopie gezeigt werden konnte, ist der Übergang der Elastine von der „random coil“ in die β -Spiralstruktur unabhängig von der Kettenlänge. Die Untersuchung von Elastinen mit unterschiedlicher Anzahl von Pentamer-Wiederholungseinheiten (VPGVG)_n (n = 1-5) lässt zu dem Schluss kommen, dass bei Temperaturerhöhung bereits eine einzelne Pentamereinheit eine Strukturveränderung induziert und somit die weitreichenden Wechselwirkungen keinen großen Einfluss auf die inverse Strukturveränderung haben. Dies wird mit einem positiven ΔS Term für den Übergang begründet, welcher bei höherer Pentapeptid-Wiederholungszahl nur geringfügig ansteigt und somit der Entropiegewinn zum Großteil aus der Monomereinheit herrührt [33]. Dieses β -Spiral Modell stimmt mit den experimentellen spektroskopischen Ergebnissen überein.

Experimentelle Ergebnisse für in Wasser gequollene Elastine lassen jedoch die Vermutung aufkommen, dass dieses in eine „random coil“ Struktur kollabiert und als amorphes Polymer vorliegt [34]-[36]. MD Simulationen von Li[31], bei denen das Elastin von einer anfänglichen β -Spiralstruktur in eine amorphe Struktur in Wasser (mit ungeordneten β -Strängen und fluktuierenden β -turns) übergeht, unterstützen die Theorie des amorphen Polymers [37].

Typische CD-Spektren für Elastine zeigen ein globales Minimum unter 200 nm, welches auf eine „random coil“ Struktur hinweist, ein Maximum bei 207 nm ist charakteristisch für eine Typ II β -turn Konformation[38] und ein Minimum bei 222 nm lässt auf eine Typ III β -turn Konformation schließen [39].

In Abbildung 4 - 21 a ist zu sehen, dass die CD-Spektren von NH₂-VPGGG-COOEt und Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COOEt Unterschiede aufweisen. Das CD-Spektrum des unfunktionalisierten Pentapeptids lässt kein globales Minimum bei 200 nm erkennen, sodass dieses einen hohen Anteil an β -turn Strukturen besitzt und nicht in der Zufallsknäuel Struktur vorliegt. Dieses Verhalten konnte bereits von Nuhn et al.[40] festgestellt werden und Ähnlichkeiten mit den CD-Spektren von EBPs[41] und Elastin-ähnlichen Polypeptiden mit höherem Molekulargewicht in Trifluoroethanol (TFE) werden deutlich [42]. Durch das Anknüpfen des N-Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysins wird

die Ordnung gestört und das entstehende Minimum bei 200 nm deutet darauf hin, dass das Hexapeptid neben der β -turn Konformation auch in der „random coil“ Struktur vorliegt. Im Falle des Pentapeptids hat die Temperaturerhöhung zur Folge, dass sich das Anteilsverhältnis zwischen Typ II/Typ III β -turn Konformationen zugunsten der Typ III β -turn Konformation ändert, was an dem größer werdenden Minimum bei 222 nm und dem abnehmenden Maximum bei 207 nm zu erkennen ist. Bei dem Hexapeptid nimmt bei Erwärmung der „random coil“ Anteil stark ab, die Typ III β -turn Konformation wird bei höheren Temperaturen die vorherrschende Konformation. Die isodichroischen Punkte bei 201 nm für das Pentapeptid und bei 209 nm für das Hexapeptid weisen auf einen definierten Übergang in eine geordnete Struktur hin [39].

Abbildung 4 - 21 b zeigt, dass sowohl Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COOEt als auch Poly-($\text{H}_3\text{N}^+-\epsilon$ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO \cdot) beide ein Minimum im Bereich von 200 nm, ein Maximum bei 205-210 nm sowie ein Minimum bei 220 nm aufweisen. Das globale Minimum liegt bei zunehmender Temperatur bei 220 nm und das Minimum bei 200 nm (charakteristisch für die „random coil“ Struktur) ist weniger stark ausgeprägt. Aus diesem Grund kann, wie bereits oben beschrieben davon ausgegangen werden, dass sowohl das Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COOEt als auch das Poly-($\text{H}_3\text{N}^+-\epsilon$ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO \cdot) bereits bei Raumtemperatur in einer relativ geordneten Struktur vorliegen. Die höhere Ordnung von Poly-($\text{H}_3\text{N}^+-\epsilon$ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO \cdot) im Vergleich zum Makromonomer kann durch eine Abnahme der Intensitätsbanden gezeigt werden [43].

Die hohe Pfropfungsdichte der Hexapeptid Seitenketten verursacht eine starke räumliche Nähe, die den kooperativen Übergang in die geordnete β -turn Konformation begünstigt. Wie in Abbildung 4 - 21 b und c zu erkennen ist, verschwindet das Minimum bei 200 nm durch Temperaturerhöhung sowie Salzzugabe, was mit der Abnahme an „random coil“ Konformation begründet werden kann. Der Anteil an Typ III β -turn Konformationen nimmt zu. In beiden Fällen ist ein isodichroischer Punkt bei 205 nm bzw. 213 nm zu erkennen, der wieder für einen definierten Übergang in die geordnetere Konformation spricht.

In Kapitel 4.3.6 werden die CD-Spektren der Hexapeptid-Polymerbürste mit denen der ELP-Polymerbürsten verglichen.

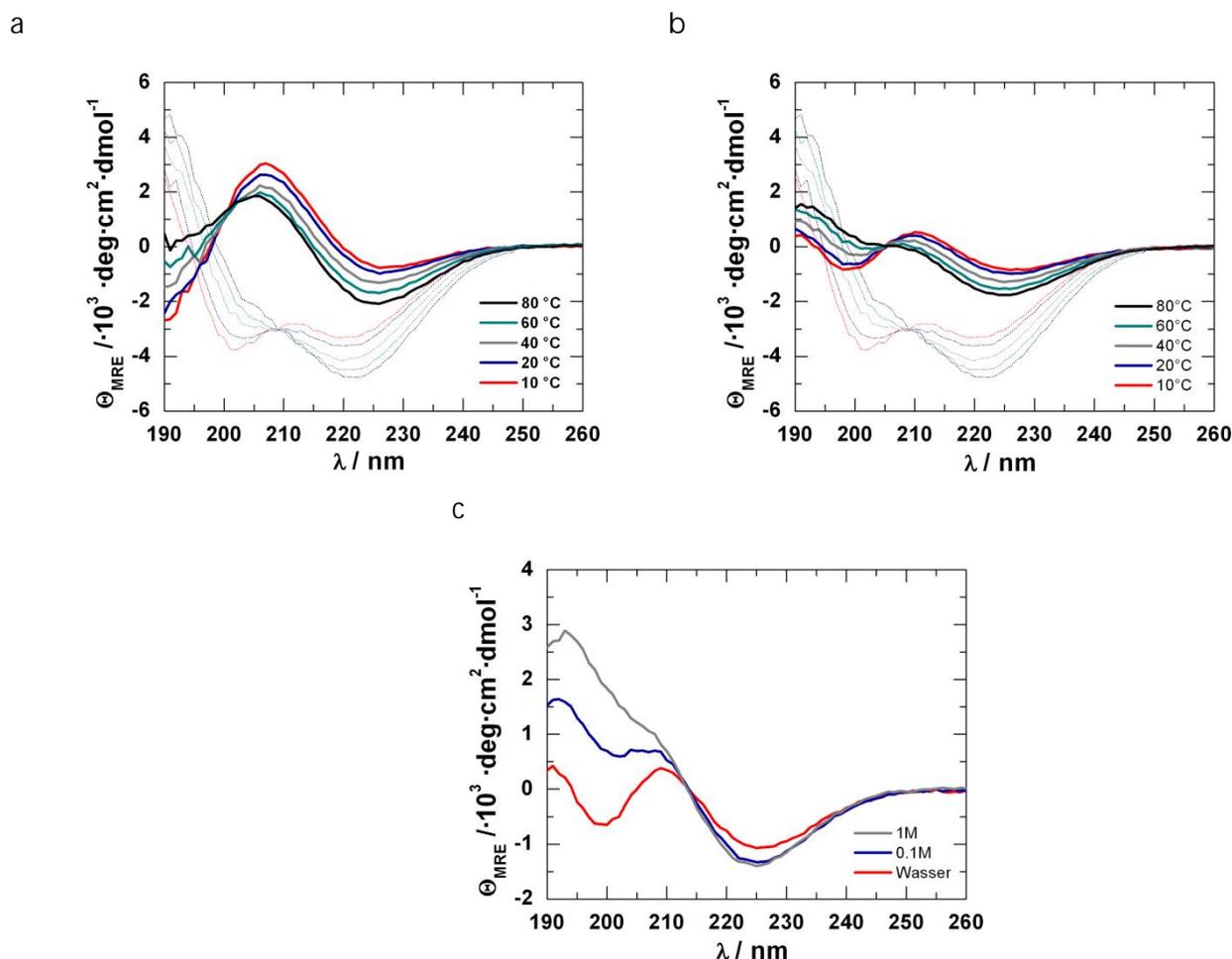


Abbildung 4 - 21: a) Vergleich der temperaturabhängigen CD-Spektren von $\text{NH}_2\text{-VPGGG-COOEt}$ (Linie) und $\text{Boc-}\epsilon\text{-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COOEt}$ (Punkte), je $c = 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser; b) Vergleich der temperaturabhängigen CD-Spektren von $\text{Boc-}\epsilon\text{-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-OEt}$ (Punkte) und $\text{Poly-(H}_3\text{N}^+\text{-}\epsilon\text{-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO-)}$ (Linie), je $c = 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser; c) CD-Spektren des $\text{Poly-(H}_3\text{N}^+\text{-}\epsilon\text{-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO-)}$ mit $c = 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in wässrigen, unterschiedlich molaren NaClO_4 -Lösungen bei 20°C .

4.2.4 Biokompatibilität

Wie bereits für $\text{Poly-(}\epsilon\text{-N-Methacryloyl-L-Lysin)}$ beschrieben, muss auch für $\text{Poly-(H}_3\text{N}^+\text{-}\epsilon\text{-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO-)}$ die Biokompatibilität durch Toxizitätstests und Messungen in humanem Blutserum nachgewiesen werden, damit das System als Wirkstoff-Trägersystem im menschlichen Körper verwendet werden kann.

4.2.4.1 Toxizitätstests

Auch für Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) wird die Überlebensrate von dendritischen Knochenmarkszellen („bone marrow-derived dendritic cells“ = BM-DC) und menschlichen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney 293 cells“ = HEK293) von Dr. Matthias Bros untersucht.

Die Überlebensrate wird durch Normierung und nach Vergleich mit der Überlebensrate unbehandelter Zellen erhalten und ist in Tabelle 4 - 7 aufgeführt. In diesem Fall sind die Überlebensraten der BM-DC Zellen deutlich besser, jedoch ist für beide Zelllinien eine gute Überlebensrate bei niedrigen Polymerkonzentrationen festzustellen.

Tabelle 4 - 7: Überlebensrate \bar{U} in Prozent von BM-DC und HEK293 Zellen in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻).

c(Polymer) / $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	0.01	0.05	0.1	0.5	1
$\bar{U}(\text{BM-DC}) / \%$	95.3 ± 1.2	82.4 ± 5.4	80.2 ± 3.7	81.6 ± 5.5	94.9 ± 3.2
$\bar{U}(\text{HEK293}) / \%$	85.4 ± 9.2	79.4 ± 4.7	71.9 ± 7.1	57.6 ± 8.7	66.2 ± 10.5

4.2.4.2 Aggregationsverhalten in humanem Blutserum

Abbildung 4 - 22 zeigt die Autokorrelationsfunktion und den entsprechenden Multikomponentenfit[44] für das zwitterionische Polymer Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) und das Blutserum. Die Funktion wird perfekt durch die Fitfunktion beschrieben, sodass kein weiterer Fitparameter zur Beschreibung der Datenpunkte nötig ist und eine Aggregation in humanem Blutserum auch für dieses zwitterionische Polymer ausgeschlossen werden kann.

Auch für das zwitterionische Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) kann somit die erwartete Biokompatibilität durch Messungen in humanem Blutserum und Toxizitätstests bestätigt werden.

Die Messung und Auswertung werden von [REDACTED]

[REDACTED] durchgeführt.

4.2 Polymerbürsten mit ELP basierten Hexapeptidseitenketten

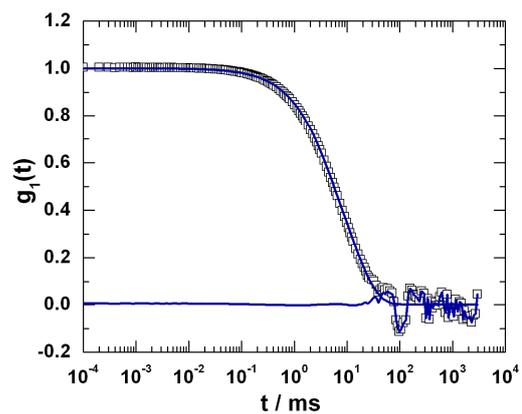


Abbildung 4 - 22: Autokorrelationsfunktion und Multikomponentenfit mit entsprechendem Residuum für das entschützte Hexapeptid Poly-($\text{H}_3\text{N}^+-\epsilon\text{-N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO-}$) 1b mit $c = 0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und Serum. Die Probe wird in PBS-Puffer gelöst und in humanem Blutserum gemessen. Streuwinkel 30° .

4.2.5 Zusammenfassung von Kapitel 4.2

Die hochmolekulare Polymerbürste Poly-(Boc- ϵ -N-Methacryloyl-Lys-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt) wurde durch freie radikalische Polymerisation des Makromonomers dargestellt und durch anschließende Fraktionierung aufgereinigt.

Die wurmartige Struktur konnte sowohl für die geschützte als auch für die entschützte Polymerbürste Poly-(H₃N⁺- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) in AFM-Aufnahmen dargestellt werden.

Mittels CD-Spektroskopie wurde gezeigt, dass die Einführung des Lysins in die Elastin Pentapeptidsequenz zum Übergang einer β -turn in eine „random coil“ Struktur führt. Die Konformation des Peptids zeigte zudem eine starke Abhängigkeit von der Ionenstärke. Für die Polymerbürste konnte im Vergleich zum Makromonomer zudem eine erhöhte Ordnung festgestellt werden, die durch die lokal hohe Dichte an Seitenketten in der Bürste verursacht wird. Über Trübungskurvenmessungen bei pH = 1.4 und unter Zusatz von Natriumchlorid wurden stark konzentrationsabhängige Übergangstemperaturen gemessen.

Für das wasserlösliche Poly-(H₃N⁺- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) konnte eine vernachlässigbare Toxizität nachgewiesen werden. Dazu konnte keine Aggregatbildung in humanem Blutserum festgestellt werden, weswegen das System als biokompatibel bezeichnet werden kann.

Die freien Amino- und Carboxygruppen können für Konjugationsreaktionen am Polymer genutzt werden, sodass diese Polymerbürste ein ideales Trägersystem für Bio- oder Wirkstoffmoleküle darstellt und als Drug Delivery-System verwendet werden kann.

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

Im nun folgenden Kapitel wird die Synthese und Charakterisierung von ELPs, ELP-basierten Makromonomeren und Polymerbürsten vorgestellt. Elastin-ähnliche Polypeptide leiten sich vom natürlichen Protein Tropoelastin ab und zeichnen sich durch ihre Biokompatibilität und ihr LCST-Verhalten aus. Durch Kombination dieser Proteine mit der komplexen Polymerbürstenstruktur entstehen Systeme, die im biomedizinischen Bereich eingesetzt werden können.

Die Elastin-ähnlichen Polypeptide E4-20 in JMD5 und in JMD6 werden über die PRE-RDL Methode dargestellt [45]. Ausgehend von den beiden ELPs mit den Sequenzen $\text{H}_2\text{N}-(\text{GVGVP})_{20}\text{G}-\text{COOH}$ und $\text{H}_2\text{N}-(\text{GVGVP})_{20}\text{GK}-\text{COOH}$ werden insgesamt vier verschiedene Makromonomere dargestellt. Diese werden mittels „grafting through“ zu den entsprechenden Polymerbürsten mit unterschiedlichen Endgruppen polymerisiert. Die ELPs, Makromonomere und ELP-Polymerbürsten werden mittels MALDI, Lichtstreuung und HPLC charakterisiert und auf ihre Phasenübergänge und Strukturveränderungen in Abhängigkeit von externen Stimuli wie Temperatur und Ionenstärke untersucht. Über CD-Spektroskopie können Konformationsänderung der ELPs und ELP-Polymerbürsten unter Einfluss von Salz und Erwärmung gezeigt werden. Mittels dynamischer Lichtstreuung wird das Aggregationsverhalten in humanem Blutserum in Abhängigkeit der endständigen Funktionalitäten untersucht.

Diese externen funktionellen Carboxy-, Azid- und Aminogruppen sollen für zukünftige Konjugationsreaktionen mit Wirkstoff- oder Biomolekülen genutzt werden um die peptidischen Polymerbürsten als Drug Delivery-Systeme verwenden zu können.

Polymerbürsten mit externen positiv geladenen Aminogruppen können zudem als Transfektionsagenz für die Komplexierung von DNA- und RNA-Molekülen in der Gentherapie ihren Einsatz finden.

4.3.1 Synthese und Charakterisierung von Elastin-ähnlichen Polypeptiden

Es werden zwei verschiedene Elastin-ähnliche Polypeptide in Kooperation mit [REDACTED] synthetisch dargestellt:

- a) E4-20 im Vektor JMD5 mit der Sequenz $\text{H}_2\text{N}-(\text{GVGVP})_{20}\text{G}-\text{COOH}$ und
- b) E4-20 im Vektor JMD6 mit der Aminosäuresequenz $\text{H}_2\text{N}-(\text{GVGVP})_{20}\text{GK}-\text{COOH}$.

Für die beiden Vektoren werden die entsprechenden Oligonukleotide (siehe Anhang Abbildung A - 14) synthetisiert, die in einen linearisierten Vektor eingebracht werden. Ein synthetisches Gen, das für die $(\text{GVGVP})_{20}$ Peptidsequenz codiert wird mittels PRE-RDL in den Klonierungsvektor eingebracht, die ELPs werden von *E. coli* exprimiert und anschließend durch mehrere ITC-Zyklen aufgereinigt.

Die Reinheit der ELPs wird über SDS-PAGE-Gelelektrophorese (Anhang Abbildung A - 16), HPLC (Abbildung 4 - 23) und MALDI-TOF (siehe Anhang Abbildung A - 15) bestätigt. Abbildung 4 - 26 b zeigt die Bestimmung des hydrodynamischen Radius für das E4-20 in JMD5 auf $R_h = 2.5 \text{ nm}$ und für das E4-20 in JMD6 auf $R_h = 2.6 \text{ nm}$ über dynamische Lichtstreuung. Diese Werte stimmen mit Literaturwerten[46] für ähnliche ELPs überein und sind in Tabelle 4 - 8 zusammengefasst.

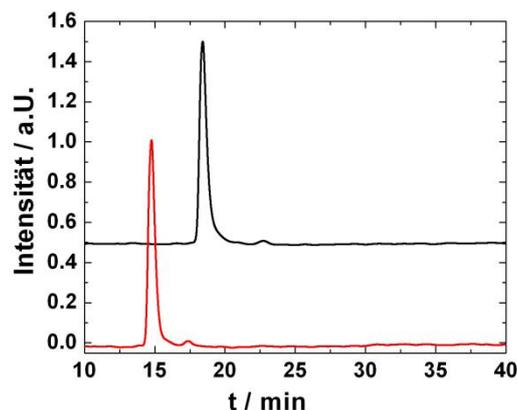


Abbildung 4 - 23: HPLC-Messungen von E4-20 in JMD5 (schwarz) und JMD6 (rot) mit $c = 0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Waters X-Bridge BEH300 C4-Säule, UV-Detektion bei 230 nm, Gradient: in 40 min. von $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 70/30$ auf $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 90/10$ mit je 0.1 % TFA)

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

Tabelle 4 - 8: Ergebnisse der Charakterisierung des E4-20 in JMD5 und in JMD6 mittels dynamischer Lichtstreuung und MALDI-TOF und theoretische Werte für M_w .

Probe	$M_w / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_w(\text{theor.}) / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	R_h / nm
E4-20 JMD5	8260*	8264	2.5
E4-20 JMD6	8384*	8392	2.6

*über MALDI-TOF bestimmt

Die Übergangstemperaturen werden für E4-20 in JMD5 und E4-20 in JMD6 aus den Maxima der 1. Ableitung der Trübungskurven bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt und sind in Abbildung 4 - 24 a und b gezeigt. Die Übergangstemperaturen für E4-20 in JMD6 liegen leicht höher als für das E4-20 in JMD5, da das zusätzliche Lysin im E4-20 in JMD6 zu einer erhöhten Hydrophilie führt. Aus diesem Grund eluiert das E4-20 in JMD6 auch vor dem E4-20 in JMD5 in der HPLC.

Die beiden ELPs werden anschließend mit einer Vinylgruppe funktionalisiert um als Makromonomere mittels „grafting through“ zu zylindrischen Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten umgesetzt zu werden.

Ausgehend von E4-20 in JMD5 werden drei verschiedene Makromonomere dargestellt:

- MA-ELP, dessen polymerisierbare Methacrylamidgruppe am N-Terminus sitzt und das einen freien C-Terminus aufweist,
- N-Acetyl-ELP-C₃-MA, welches einen Acetyl-geschützten N-Terminus hat und bei dem die Methacrylamidgruppe an den C-Terminus über einen C₃-Linker gekoppelt ist und
- MA-ELP-PEG-N₃, dessen N-Terminus mit einer Methacrylamidgruppe funktionalisiert ist und der C-Terminus mit einer PEG₆-N₃ Gruppe verknüpft ist.

Das auf E4-20 in JMD6 basierende Makromonomer (MA-ELP-Lys) wird durch Funktionalisierung des N-Terminus mit einer Methacrylamidgruppe dargestellt. Der C-Terminus stellt in Kombination mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins ein Betain dar.

Die Polymerisation der Makromonomere wird in Wasser durchgeführt und es werden Polymere mit unterschiedlichen Endgruppen erhalten.

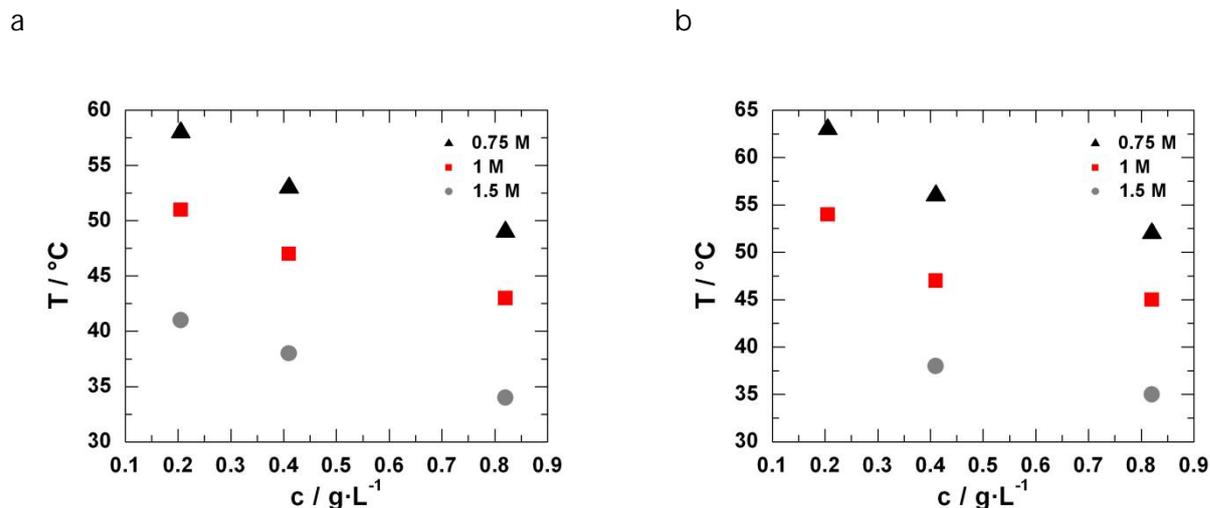


Abbildung 4 - 24: Übergangstemperatur T_i als Funktion der ELP-Konzentration in wässrigen, verschieden molaren NaCl-Lösungen für a) E4-20 JMD5 und b) E4-20 JMD6.

4.3.2 Synthese und Charakterisierung von Poly-(MA-ELP)

Die hier vorgestellten Ergebnisse für die Polymerbürste Poly-(MA-ELP) stellen überwiegend eine Reproduktion bereits veröffentlichter Daten dar, vgl. D. Weller, J. R. McDaniel, K. Fischer, A. Chilkoti und M. Schmidt, *Macromolecules*, 2013 [47].

In Abbildung 4 - 25 ist die Darstellung von Polymerbürsten mit Elastin basierten Polypeptidseitenketten mit externem C-Terminus 6 gezeigt. Diese Bürstenmoleküle sollen zukünftig als Drug Delivery-Systeme genutzt werden, da über die endständigen funktionellen Carboxygruppen die Umsetzung mit Wirkstoffmolekülen ermöglicht wird. Für die Synthese des Makromonomers 4 wird der N-Terminus des ELPs E4-20 in JMD5 3 mit dem NHS-Ester der Methacrylsäure 2 umgesetzt. Die Reinheit des ELP-Makromonomers (MA-ELP) kann, wie in Abbildung 4 - 26 a gezeigt über HPLC-Messungen und MALDI-TOF (Abbildung A - 17) nachgewiesen werden.

Wie in Tabelle 4 - 9 gezeigt wird, liefert dynamische Lichtstreuung für das ELP-Makromonomer einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 3.4$ nm, der im Vergleich zum nicht funktionalisierten ELP, $R_h = 2.5$ nm, deutlich vergrößert ist. Dieses Ergebnis lässt zu dem Schluss kommen, dass das Makromonomer in Lösung sphärische Mizellen ausbildet, da der hydrodynamische Radius des unfunktionalisierten ELPs mit bereits veröffentlichten Ergebnissen[46] übereinstimmt.

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

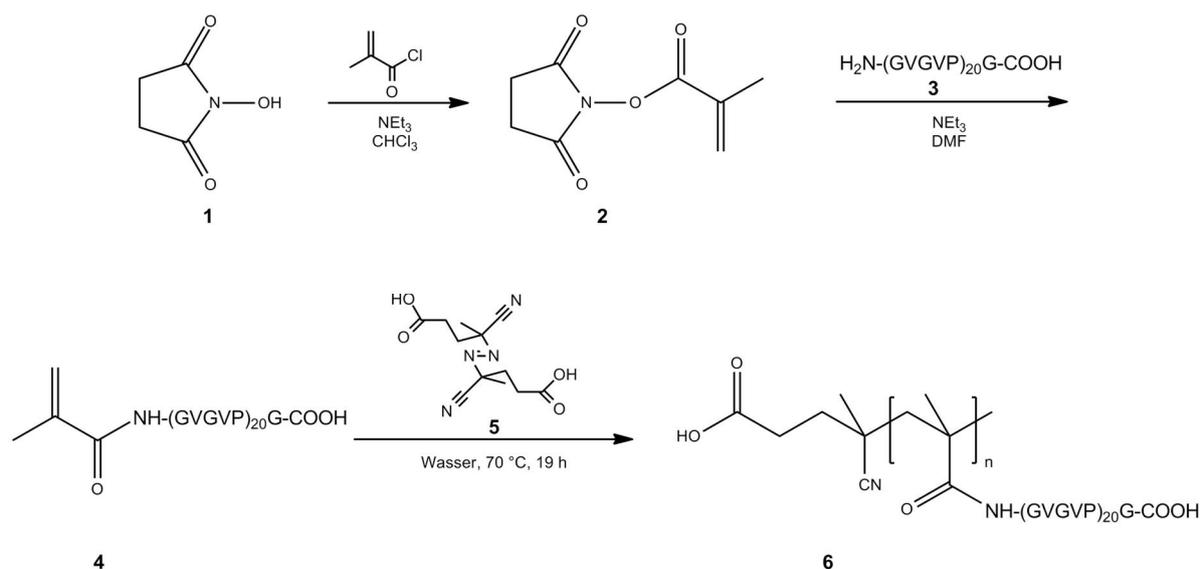


Abbildung 4 - 25: Reaktionsschema zur Darstellung der Polymerbürste mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten mit externem C-Terminus 6 durch „grafting through“ des Makromonomers 4.

Hochmolekulare Makromonomere müssen in stark konzentrierter Lösung und ausreichend lange polymerisiert werden, damit zylindrische Polymerbürsten mit großem Polymerisationsgrad entstehen [48],[49]. Aus diesem Grund wird das ELP-Makromonomer in hochkonzentrierter wässriger Lösung ($0.33 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) unter Zusatz von 0.5 mol% 4-Azobis-4-cyanovaleriansäure 5 als Initiator für 19 Stunden bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ polymerisiert, sodass für die Lösung eine Phasenseparation auftritt. Die Polymerisation findet hauptsächlich in der extrem hochkonzentrierten Gelphase statt, nach Abtrennung des Makromonomers durch Dialyse mit Amicon 30 kDa Zentrifugenfilter wird die zylindrische ELP-Polymerbürste erhalten. Die makromolekulare ELP-Bürste wird, wie in diesem und dem folgenden Kapitel beschrieben, mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung, AFM und CD-Spektroskopie auf ihre Größe und Konformation in Abhängigkeit von Ionenstärke und Temperatur untersucht.

Tabelle 4 - 9: Ergebnisse der Charakterisierung des ELPs, ELP-Makromonomers und der ELP-Bürste mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung und MALDI-TOF.

Probe	$M_w / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_w (\text{theor.}) / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	R_h / nm	R_g / nm	$A_2 / \text{mol}\cdot\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-2}$
ELP	8260*	8264	2.5	-	-
ELP-Makromonomer	8331*	8332	3.4	-	-
ELP-Polymerbürste	$4.9\cdot 10^6$	-	35.2	51.7	$3.67\cdot 10^{-5}$

*bestimmt durch MALDI-TOF

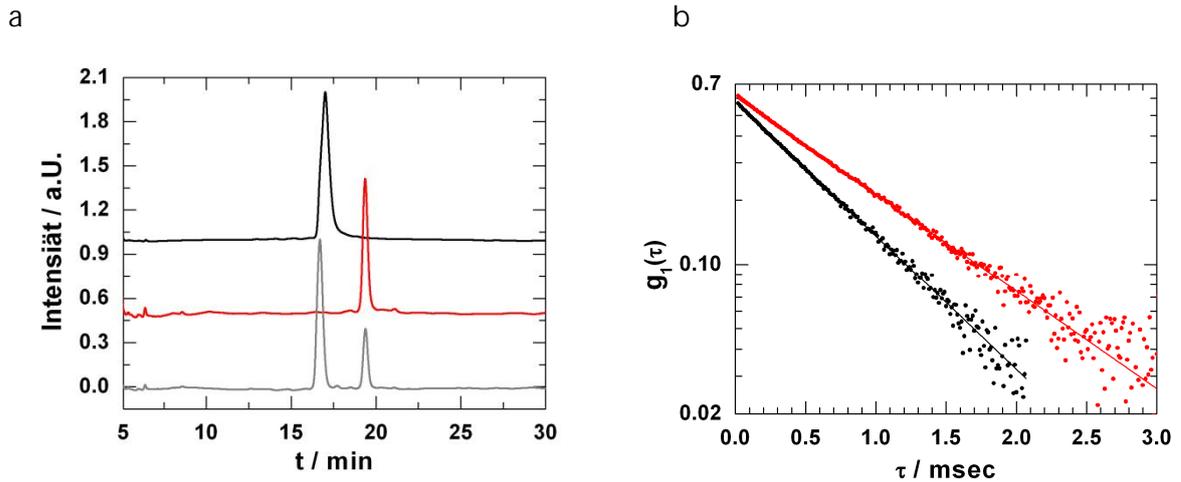


Abbildung 4 - 26: Charakterisierung des ELP E4-20 in JMD5 (schwarz) und des MA-ELP-Makromonomers (rot): a) HPLC des ELP und MA-ELP-Makromonomers sowie der 2/1 Mischung (grau) mit $c = 0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Waters X-Bridge BEH300 C4-Säule, UV-Detektion bei 230 nm, Gradient: in 40 min. von $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 70/30$ auf $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 90/10$ mit je 0.1 % TFA); b) Dynamische Lichtstreuung mit $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in 2 mM NaCl und Streuwinkel $\theta = 18^\circ$ bei $T = 293 \text{ K}$.

In Anbetracht des trotz großer Seitenkettenlänge hohen Polymerisationsgrads, $P_w = 590$, kann davon ausgegangen werden, dass die Makromonomer Mizellen sich bei höherer Konzentration und/oder Temperatur in zylindrische Mizellen umwandeln, wodurch die Polymerisation der hochmolekularen Makromonomere vereinfacht wird [50].

Eine Bestimmung der Molmassenverteilung durch GPC-Messung ist aufgrund der starken Adsorption der ELP-Bürste an das GPC-Säulenmaterial nicht möglich. Mittels dynamischer Lichtstreuung kann $\mu_2 = 0.2$ bestimmt werden, sodass von einer Schulz-

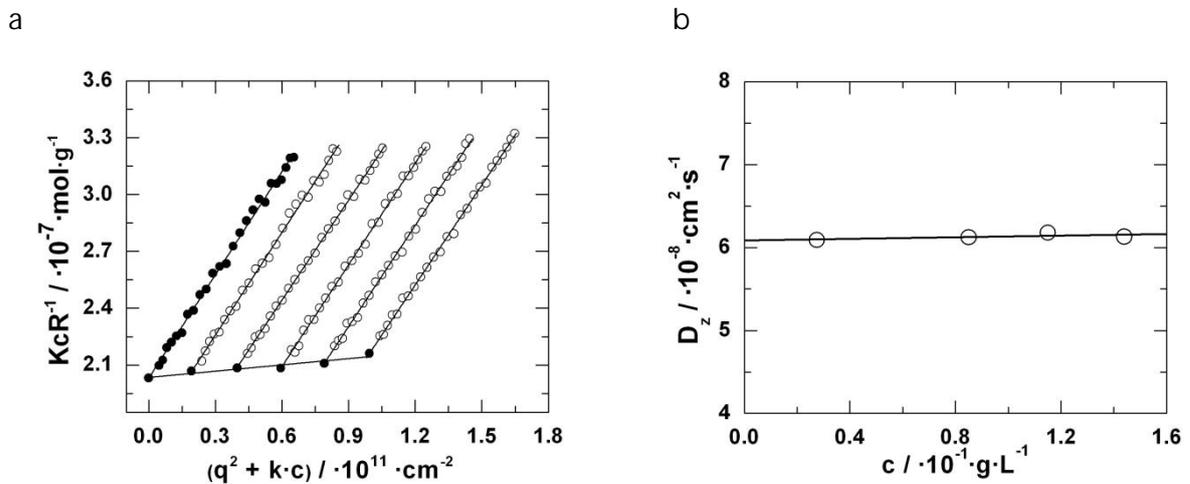


Abbildung 4 - 27: Charakterisierung von Poly-(MA-ELP) mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung bei 293 K in wässriger 2 mM NaCl-Lösung: a) Zimm-Plot im Bereich von $30\text{-}150^\circ$ (5° -Schritte) mit $dn/dc = 0.1548 \text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$; b) Bestimmung von $D_{z(c=0, q=0)}$ durch Extrapolation.

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

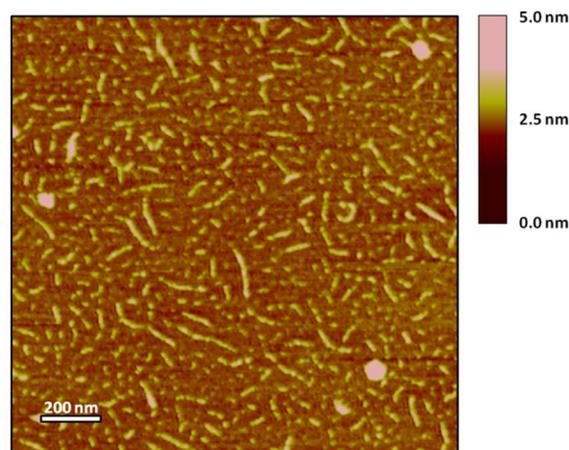


Abbildung 4 - 28: AFM-Aufnahme der ELP-Polymerbürste; spincast der wässrigen Lösung mit $c = 0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ auf Mica.

Flory-Verteilung der Kettenlänge ausgegangen werden kann.

AFM-Aufnahmen zeigen, dass die Verteilung der Molmasse, wie bei freier radikalischer Polymerisation zu erwarten, relativ breit ist. Es kann jedoch ein Bruch der Hauptketten aufgrund der starken Wechselwirkungen der ELP-Seitenketten mit der Mica-Oberfläche nicht ausgeschlossen werden (siehe dazu Anhang Abbildung A - 18). Dieses Phänomen wurde bereits von Sheiko und Matyjaszewski für Polymerbürsten mit einem Poly-(2-Hydroxyethylmethacrylat)-Rückgrat und sehr langen Poly-(*n*-Butylacrylat)-Seitenketten beobachtet [51],[52]. Aus den AFM-Aufnahmen kann eine durchschnittliche Höhe der Polymerbürsten von 1-1.2 nm, sowie eine Breite von 17 nm bestimmt werden.

Auf die Charakterisierung der Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten in Bezug auf Sekundärstruktur und Konformationsänderungen unter Einfluss externer Stimuli wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

4.3.2.1 Phasenübergangsverhalten und Konformationsänderungen in Abhängigkeit von Ionenstärke und Temperatur

Trübungskurven-Messungen verschieden konzentrierter ELP-Makromonomerlösungen in 0.75 M, 1 M und 1.5 M wässrigen NaCl-Lösungen ergeben, wie in Abbildung 4 - 29 a gezeigt Übergangstemperaturen in einem Bereich von 55 - 25 °C. Diese Übergangstemperaturen liegen durchschnittlich 5 °C unter denen des unfunktionalisierten ELPs (vgl. Abbildung 4 - 24 a), da durch die Umsetzung am N-

Terminus des ELPs das entstehende ELP-Makromonomer eine stärkere Hydrophobizität aufweist.

AFM-Aufnahmen der hergestellten ELP-Polymerbürsten deuten auf eine breitere Molekulargewichtsverteilung hin. Wie in Abbildung 4 - 29 b und d zu erkennen ist wird eine definierte Übergangstemperatur für die ELP-Polymerbürste festgestellt, womit die von Fernández-Trillo et al.[26] für EBPs erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Die Übergangstemperatur der ELP-Polymerbürste ist, wie in Abbildung 4 - 29 b zu sehen ist, deutlich niedriger als die des ELP-Makromonomers und zeigt zudem eine viel geringere Konzentrationsabhängigkeit. Abbildung 4 - 29 a zeigt, dass für das Makromonomer über einen geringen Konzentrationsbereich (0.21-0.82 g·L⁻¹, damit 4-fach) die Übergangstemperatur in 0.75 M NaCl von 55 °C auf 34 °C ($\Delta T = 11^\circ\text{C}$) fällt.

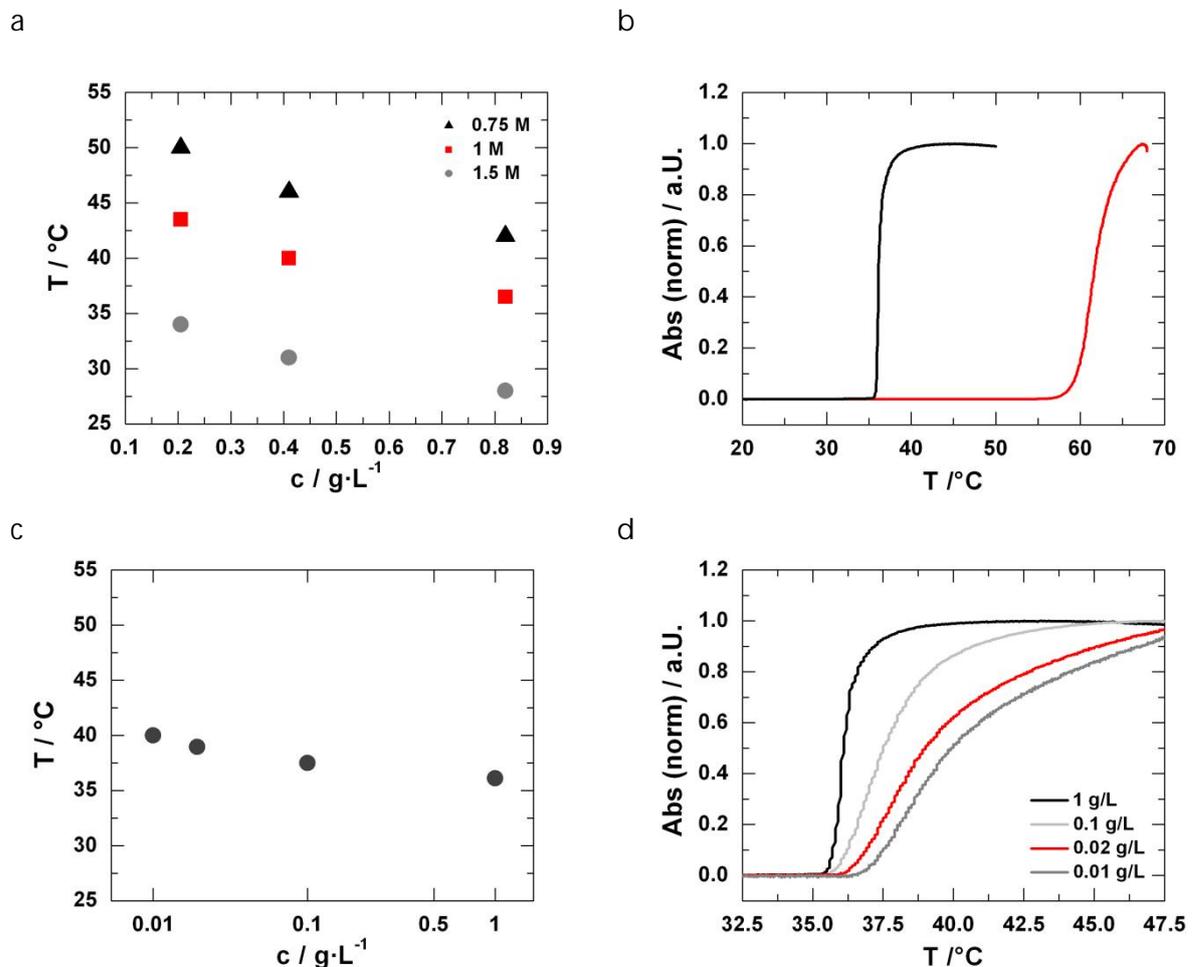


Abbildung 4 - 29: a) Übergangstemperatur als Funktion der Makromonomerkonzentration in wässrigen, verschieden molaren NaCl-Lösungen; b) Trübungskurven der ELP-Polymerbürste (schwarz) und des Makromonomers (rot), je $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in PBS; c) Übergangstemperatur als Funktion der ELP-Polymerbürstenkonzentration in PBS; d) Trübungskurven für verschiedene Konzentrationen der ELP-Polymerbürste in PBS. Heizrate je $1^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

Für die ELP-Polymerbürste (Abbildung 4 - 29 c) findet man hingegen über einen viel breiteren Konzentrationsbereich ($0.01-1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, damit 100-fach) nur eine Abnahme der Übergangstemperatur von $40 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $36 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta T = 4^\circ\text{C}$). Dies ist durch die hohe lokale ELP-Konzentration in der ELP-Bürste zu verstehen, die auf 30 mM bei einem Bürstendurchmesser von $d = 30 \text{ nm}$ geschätzt wird.

Ähnliche Ergebnisse werden auch für ELP-Mizellen erhalten, die im Vergleich zu ELP-Einzelkettenmolekülen eine niedrigere Übergangstemperatur aufweisen, die zudem eine geringere Konzentrationsabhängigkeit zeigt [53],[54]. Diese Eigenschaft wirkt sich vorteilhaft in der Anwendung als Drug Delivery-System aus, da selbst bei hoher Verdünnung nach Injektion der gewünschte Phasenübergang in einem kleinen Temperaturbereich stattfindet.

Die Schärfe des Phasenübergangs hängt von der Aggregationskinetik im Bereich der Spinodalen/Binodalen ab [55]. Die Kinetik wiederum ist von der Breite des Spinodalen Bereichs, der Konzentration[56],[57] sowie der Heizrate abhängig. Zudem ist der Phasenübergang auch vom Molekulargewicht des Polypeptids abhängig [56]. Wie in Abbildung 4 - 29 d zu sehen ist, ist für die ELP-Bürste eine sehr starke Konzentrationsabhängigkeit der Trübungskurven festzustellen. Bei einer Konzentration von $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ist der Übergang sehr scharf ($\Delta T = 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$), wird aber für $c = 0.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\Delta T > 4 \text{ }^\circ\text{C}$) deutlich unschärfer (siehe Anhang Tabelle A - 3).

Der Einfluss von Salz und Temperatur auf die Konformation von Poly-(MA-ELP) wird mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung untersucht. In Abbildung 4 - 30 a ist der Einfluss der Ionenstärke auf die Konformation dargestellt: Sowohl der hydrodynamische Radius als auch der Trägheitsradius nehmen mit steigender Salzkonzentration ab.

Die Abnahme der Radien ist als Vorstufe der Aggregation zu interpretieren, die für ELPs durch Salzzugabe und Erwärmen hervorgerufen wird. Cl^- -Ionen zählen in der Hofmeister-Reihe zu den kosmotropen Anionen, die durch Polarisierung der Grenzflächen-Wassermoleküle, welche bei der Hydratisierung der Amidgruppen in den ELPs eine Rolle spielen zur Senkung der LCST führen [58]. Die hydrophoben Wechselwirkungen werden somit verstärkt und das Protein ausgesalzt, es kommt zur Proteinaggregation.

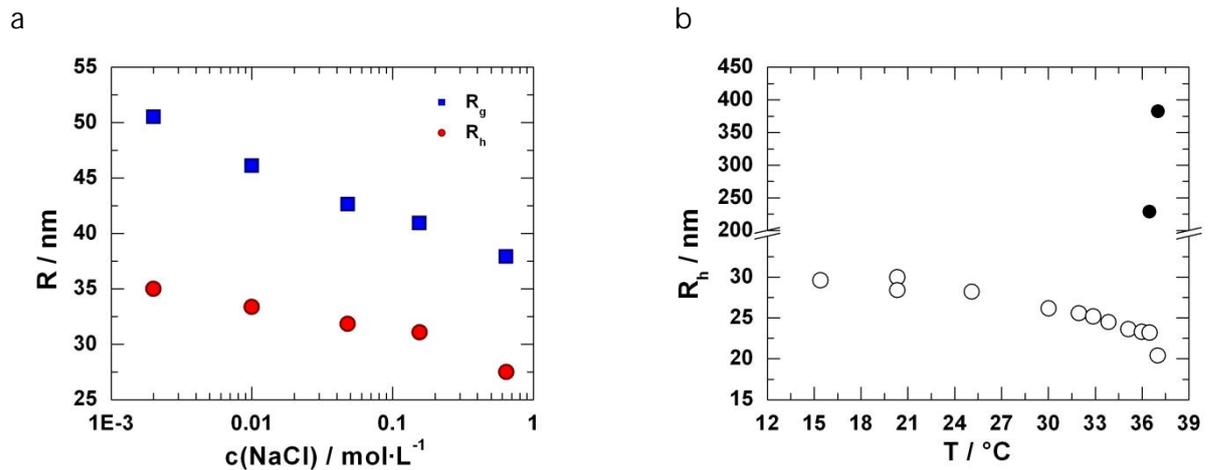


Abbildung 4 - 30: a) Einfluss der NaCl-Konzentration in Lösung auf den hydrodynamischen und den Trägheitsradius von Poly-(MA-ELP); b) Temperaturabhängigkeit des hydrodynamischen Radius bei $c(\text{Polymer}) = 0.019 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in PBS mit Aggregation bei 36.5°C .

Zur quantitativen Analyse der Konformationsänderung wird das Wurmketten-Modell von Kratky[9],[14] zur Bestimmung der statistischen Kuhnsegmentlänge herangezogen: Man erhält eine Abnahme von $l_k = 120 \text{ nm}$ in 2 mM NaCl-Lösung auf $l_k = 54 \text{ nm}$ in 64 mM NaCl-Lösung. Im Rahmen der experimentellen Ungenauigkeiten bleibt der hydrodynamische effektive Durchmesser der Bürste mit $d = 30 \text{ nm}$ konstant und ist damit deutlich größer als der zweifache End-zu-End-Abstand, $2\langle R^2 \rangle^{1/2} = 18 \text{ nm}$, der entsprechenden linearen ELP-Kette. Das ELP liegt bis auf die terminale Carboxygruppe nicht geladen vor, weswegen die hohe Kettensteifigkeit nur schwer über elektrostatische Wechselwirkungen erklärt werden kann. Selbst bei 2 mM NaCl ist die Debye Abschirmlänge kleiner als 10 nm und entspricht somit grob dem durchschnittlichen Abstand des geladenen Kettenendes zum Polymerrückgrat. Als alternative Erklärung kann die erhöhte Anziehung zwischen den ELP-Seitenketten mit zunehmender Salzkonzentration in Betracht gezogen werden, wodurch die repulsiven Kräfte verringert werden, sodass die Ausdehnung der Hauptkette (entspricht der Länge des Zylinders) oder die gerichtete Persistenz der Hauptkette bei gleichbleibender Zylinderlänge abnimmt. Um zwischen den beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, müssten aufwendige SANS- oder SAXS-Messungen durchgeführt werden, die jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Unter der Annahme, dass sich die Persistenzlänge bei konstanter maximaler Konturlänge des Zylinders ($L_w = b \cdot P_w = 147 \text{ nm}$ und $b = 0.25 \text{ nm}$, der Länge einer Vinyl-Wiederholungseinheit) ändert, kann das Kratky-Porod Wurmketten-Modell verwendet werden um die statistische Kuhnsegmentlänge und den hydrodynamischen effektiven Zylinderdurchmesser aus

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

Tabelle 4 - 10: Abhängigkeit der statistischen Kuhnsegmentlänge l_k und dem hydrodynamischen effektiven Durchmesser d der ELP-Bürste von der Ionenstärke.

$c(\text{NaCl}) / \text{mM}$	l_k / nm	d / nm
2	120	30
10	90	30
48	75	28
155	65	28
640	54	22

den gemessenen Werten für R_g und R_h (Abbildung 4 - 30 a) zu bestimmen. Eine Übersicht über die Ergebnisse liefert Tabelle 4 - 10. Der hydrodynamische effektive Durchmesser und damit die Ausdehnung der Seitenketten bleibt interessanterweise bis zu 0.15 M zugegebenem Salz konstant bei $d = 30 \text{ nm}$ und nimmt bei 0.64 M Salz auf $d = 22 \text{ nm}$ ab. Die statistische Kuhnsegmentlänge variiert zwischen $l_k = 120 \text{ nm}$ bei 2 mM Salz und $l_k = 54 \text{ nm}$ bei 0.64 M Salz und liegt somit im Bereich vergleichbarer Bürstenpolymere [59].

Die Größe der zylindrischen ELP-Polymerbürste hängt, wie bereits erwähnt ebenfalls von der Temperatur ab. Abbildung 4 - 30 b zeigt den hydrodynamischen Radius der Bürste in 0.15 M PBS als Funktion der Temperatur. Bei $36.5 \text{ }^\circ\text{C}$ beginnt die Bürste schnell zu aggregieren ($> 200 \text{ nm}$ große Aggregate) und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ist kein Einzelmolekülverhalten mehr durch Lichtstreuung messbar.

4.3.3 Synthese und Charakterisierung von Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃)

Die Darstellung von Polymerbürsten mit ELP-PEG₆-N₃ 8 Seitenketten ist in Abbildung 4 - 31 gezeigt. Die externen Azidgruppen stellen ideale Funktionalitäten für Umsetzungen mit Farbstoffmolekülen sowie Antigenen und Antikörpern über Click-Reaktionen dar, sodass diese Polymerbürsten zukünftig als Wirkstoffträger-Systeme verwendet werden können. Ausgehend von MA-ELP 4 wird der C-Terminus mit O-(2-Aminoethyl)-O'-(2-azidoethyl)pentaethylglykol (H₂N-PEG₆-N₃) 5 unter Verwendung von N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) zum Makromonomer MA-ELP-PEG₆-N₃ 6 umgesetzt.

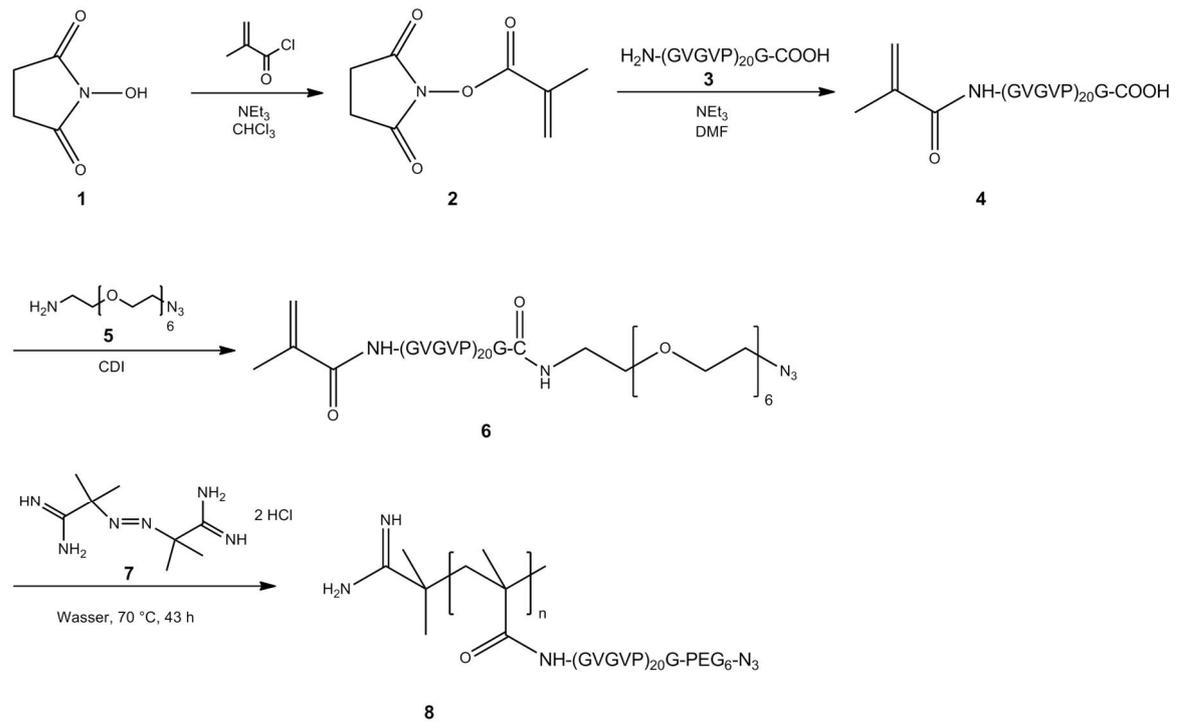


Abbildung 4 - 31: Reaktionsschema zur Darstellung der Polymerbürste mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten mit externem PEG₆-Azid 8 durch „grafting through“ des Makromonomers 6.

HPLC-Messungen in Abbildung 4 - 32 a zeigen, dass ein 90 prozentiger Umsatz zum Makromonomer erzielt wird. Wie in Abbildung 4 - 32 b zu sehen ist, zeigt die IR-Messung des Makromonomers die für die Azidgruppe typische Schwingungsbande bei 2100 cm⁻¹. Diese ist jedoch aufgrund des geringen Anteilverhältnisses der Azidgruppen zu Peptidbindungen nicht sehr stark ausgeprägt. Das MALDI-Spektrum des Makromonomers ist im Anhang Abbildung A - 19 zu finden und weist die Struktur nach.

Dynamische Lichtstreuungsmessungen ergeben einen hydrodynamischen Radius $R_h = 2.7$ nm für das MA-ELP-PEG₆-N₃, der geringfügig größer als der des E4-20 in JMD5 ($R_h = 2.5$ nm) ist. Er ist jedoch kleiner als der des Makromonomers MA-ELP ($R_h = 3.4$ nm), für das eine Mizellbildung angenommen wird, sodass im Falle des Makromonomers MA-ELP-PEG₆-N₃ nicht von einer Mizellbildung ausgegangen wird.

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

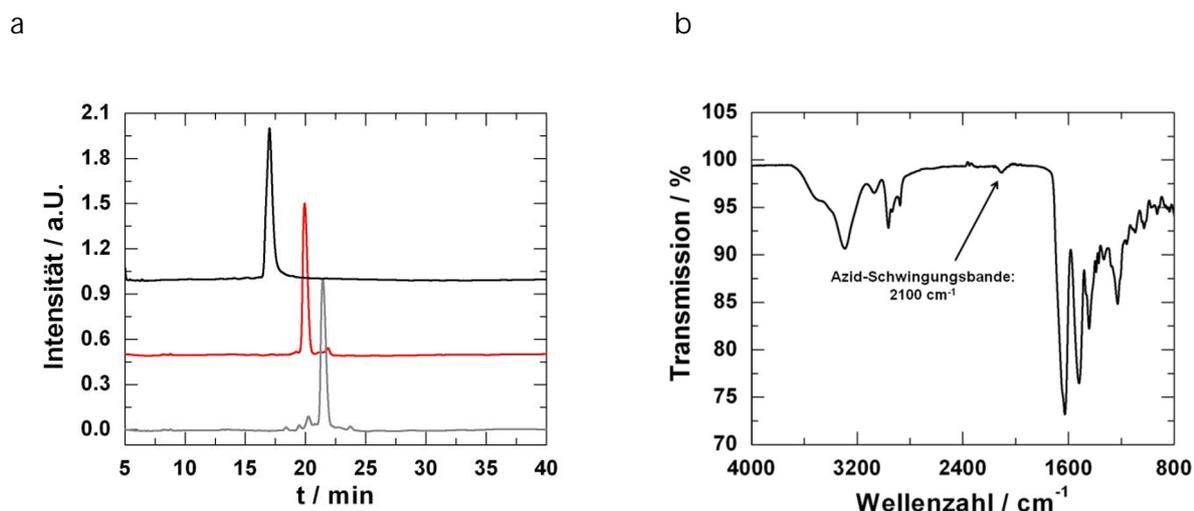


Abbildung 4 - 32: a) HPLC des ELP E4-20 in JMD5 (schwarz), MA-ELP (rot) und MA-ELP-PEG₆-N₃-Makromonomers (grau); (Waters X-Bridge BEH300 C4-Säule, UV-Detektion bei 230 nm, Gradient: in 40 min. von H₂O/MeOH = 70/30 auf H₂O/MeOH = 90/10 mit je 0.1 % TFA); b) IR-Spektrum des MA-ELP-PEG₆-N₃-Makromonomers mit der Azid-Schwingungsbande bei 2100 cm⁻¹.

Die Polymerisation findet, wie für das Makromonomer MA-ELP in hoch konzentrierter wässriger Lösung unter Zusatz von 1 mol % 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidin) Dihydrochlorid bei 70 °C statt. Es bildet sich wie für das Makromonomer MA-ELP ein 2-Phasen-Gemisch aus, wobei die Polymerisation hauptsächlich in der sehr hoch konzentrierten unteren Gelphase stattfindet. Das restliche Makromonomer wird durch Dialyse mit 10 kDa Amicon Zentrifugenfilter abgetrennt.

Über statische Lichtstreuung wird ein Polymerisationsgrad von $P_w = 208$ erhalten, der somit geringer als der des Poly-(MA-ELP) mit $P_w = 590$ ist. Der geringere Polymerisationsgrad kann über die fehlende Mizellbildung für das Makromonomer MA-ELP-PEG₆-N₃ erklärt werden, wodurch die Polymerisation erschwert wird. Zudem führt der höhere Anteil an Initiator im Polymerisationsansatz zu niedrigeren Polymerisationsgraden. Das ρ -Verhältnis von $\rho = 1.4$ entspricht dem der Polymerbürste Poly-(MA-ELP).

Tabelle 4 - 11: Ergebnisse der Charakterisierung des MA-ELP-PEG₆-N₃-Makromonomers und der ELP-Bürste mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung und MALDI-TOF(*) sowie theoretische Werte für M_w .

Probe	$M_w / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_w(\text{theor.}) / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	R_h / nm	R_g / nm	$A_2 / \text{mol}\cdot\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-2}$
ELP-Makromonomer	8658*	8666	2.7	-	-
ELP-Polymerbürste	$1.8\cdot 10^6$	-	23.5	33.3	$2.52\cdot 10^{-8}$

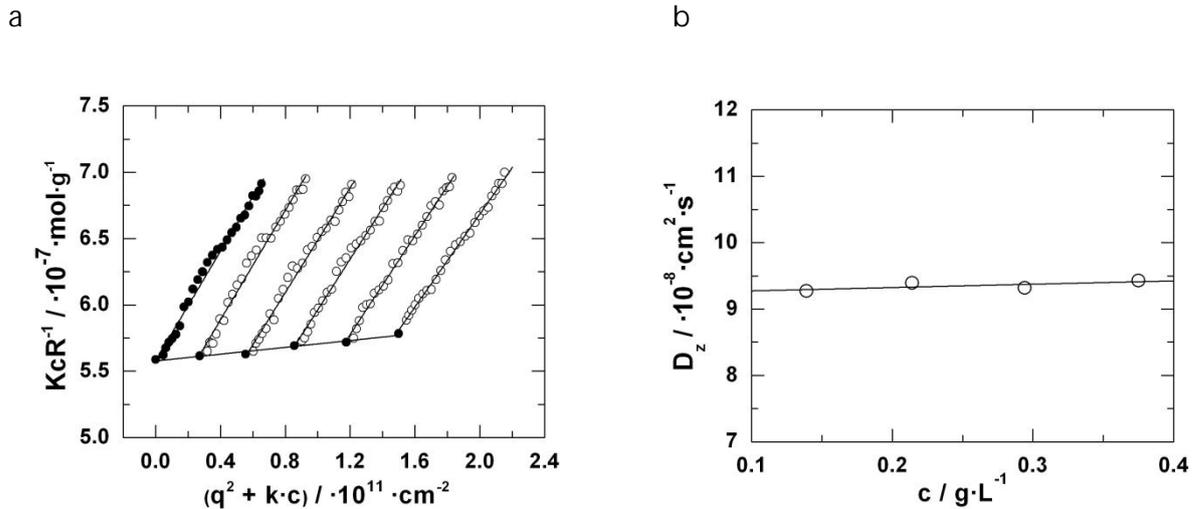


Abbildung 4 - 33: Charakterisierung von Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung bei 293 K in wässriger 2 mM NaCl-Lösung: a) Zimm-Plot im Bereich von 30-150° (5°-Schritte) mit $dn/dc = 0.1548 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$; b) Bestimmung von $D_{z(c=0, q=0)}$ durch Extrapolation.

Die Azidgruppe bleibt auch nach der Polymerisation erhalten, wie die Azid-Schwingungsbande im IR-Spektrum in Abbildung 4 - 34 a zeigt. In den AFM-Aufnahmen in Abbildung 4 - 34 b sind nur kurze wurmartige, eher kugelförmige oder ellipsoide Strukturen zu erkennen, die mit einer Länge von durchschnittlich 50 nm mit dem $P_w = 208$ übereinstimmen. Für das Verhältnis V der theoretischen voll ausgestreckten Hauptkettenlänge zur theoretischen zweifachen voll gestreckten Länge der Seitenkette ergibt sich $V = 52 \text{ nm} / 75 \text{ nm} = 0.7$. Dieser Wert ist nicht mit experimentell erhaltenen Ergebnissen zu vergleichen bei denen die Ketten gequollen oder in einer eher knäuelartigen Konformation vorliegen.

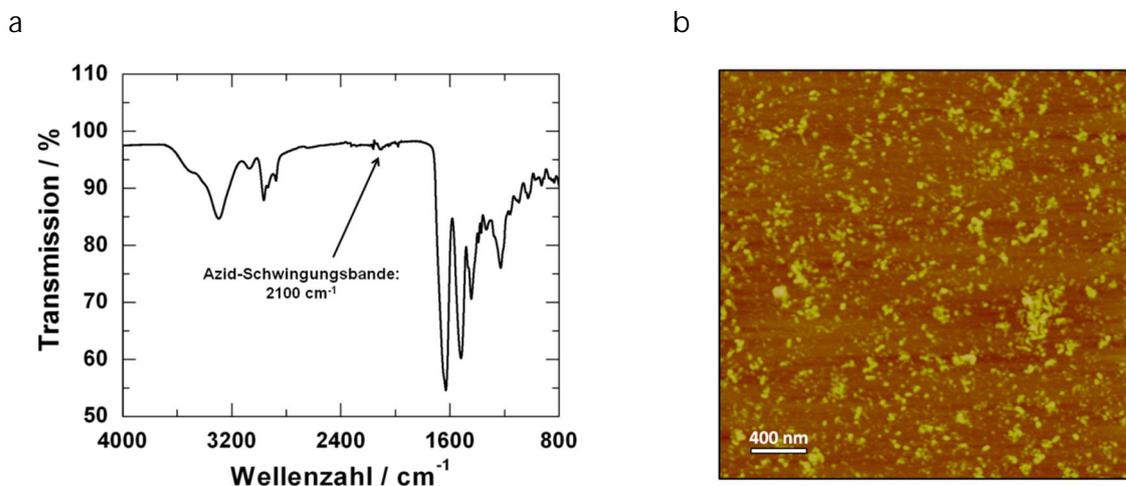


Abbildung 4 - 34: a) IR-Spektrum des Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) mit der charakteristischen Azid-Schwingungsbande bei 2100 cm^{-1} ; b) AFM-Aufnahme des Poly-(MA-ELP-PEG-N₃), spin-cast der wässrigen Lösung mit $c = 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ auf Mica.

In diesem Fall führen die starken Wechselwirkungen der Seitenketten mit der Mica Oberfläche nicht zum Bruch der Hauptketten, da sich durch die geringere Anzahl an Seitenketten weniger starke Kräfte ausbilden.

4.3.3.1 Phasenübergangsverhalten

Abbildung 4 - 35 a und d zeigen die starke Konzentrationsabhängigkeit der Übergangstemperatur für das Makromonomer MA-ELP-PEG₆-N₃, die bereits für das Makromonomer MA-ELP festgestellt werden konnte. Die T_t für das Makromonomer mit PEG₆-N₃-Endgruppe liegt jedoch in PBS bei $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ mit $51 \text{ }^\circ\text{C}$, im Vergleich zu $62 \text{ }^\circ\text{C}$ für die freie Carboxy-Endgruppe deutlich tiefer.

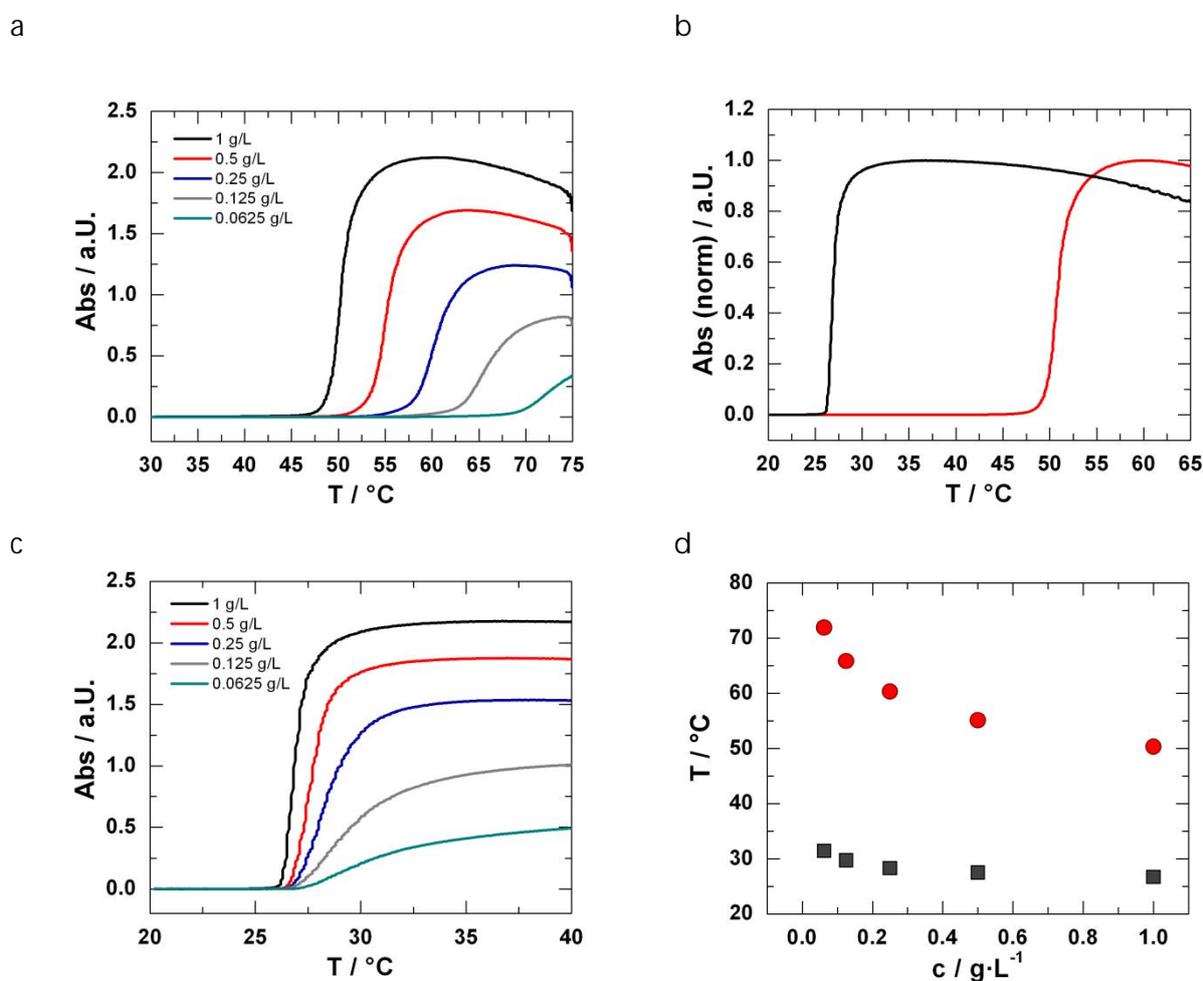


Abbildung 4 - 35: Trübungskurven von a) dem Makromonomer MA-ELP-PEG₆-N₃ in PBS bei verschiedenen Konzentrationen, b) dem Makromonomer (rot) und dem Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) (schwarz) mit je $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in PBS, c) dem Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) in PBS bei verschiedenen Konzentrationen und d) die Konzentrationsabhängigkeit der Übergangstemperatur für das Makromonomer (rot) und die Bürste (schwarz).

Dies wird wahrscheinlich durch die erhöhte Hydrophobizität des Makromonomers MA-ELP-PEG₆-N₃ verursacht, was auch in HPLC-Messungen über die erhöhte Retentionszeit beobachtet werden kann (siehe Abbildung 4 - 32 a).

Die Übergangstemperatur des Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) liegt mit $T_t = 27\text{ °C}$ auch tiefer als die des Poly-(MA-ELP), für das eine Übergangstemperatur von $T_t = 37\text{ °C}$ erhalten wird. Die lokal hohe Dichte an Seitenketten im Polymer führt, wie bereits erwähnt zur Absenkung der T_t im Vergleich zum Makromonomer und garantiert eine deutlich geringere Konzentrationsabhängigkeit der Übergangstemperatur, wie in Abbildung 4 - 35 d zu sehen ist. Die T_t für das Makromonomer nimmt im Konzentrationsbereich von 0.0625–1 g·L⁻¹ von 71.9 °C auf 50.3 °C ab ($\Delta T = 21.6\text{ °C}$), für die Polymerbürste hingegen ist im selben Konzentrationsbereich nur eine Abnahme der T_t um $\Delta T = 4.7\text{ °C}$ festzustellen.

4.3.4 Synthese und Charakterisierung von Poly-(N-Acetyl-ELP-C₃-MA)

Abbildung 4 - 36 zeigt das Reaktionsschema zur Darstellung der ELP-Polymerbürste mit externer Acetylgruppe 8 durch „grafting through“ Polymerisation des Makromonomers 6. Durch Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe von Polymer 8 kann die Polymerbürste mit externem N-Terminus erhalten werden, welche beispielsweise für die Gentransfektion eingesetzt werden könnte. Komplexe aus positiv geladener Polymerbürste und DNA oder RNA werden besser in die Zelle aufgenommen, sodass ein gezielter Transport der DNA in die Zelle über diese Komplexe möglich wird.

Im ersten Schritt der Darstellung wird das N-Acetyl-ELP 4 dargestellt, das durch Einführung einer Acetyl-Schutzgruppe über den NHS-Ester des Acetylchlorids 2 am N-Terminus des ELPs E4-20 in JMD5 3 hergestellt wird. Anschließend wird der C-Terminus mit N-(2-Methacryloyl)-1,3-diaminopropan·HCl 5 unter Verwendung von N,N'-Carbonyldiimidazol und Triethylamin umgesetzt und das Makromonomer N-Acetyl-ELP-C₃-MA 6 wird erhalten.

Der Umsatz der Reaktion und die Reinheit des Makromonomers werden mittels HPLC, gezeigt in Abbildung 4 - 37 und MALDI-TOF (siehe Anhang Abbildung A - 20) untersucht. Das Makromonomer enthält einen etwa 20 prozentigen Anteil an nicht umgesetzten N-Acetyl-ELP 4.

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

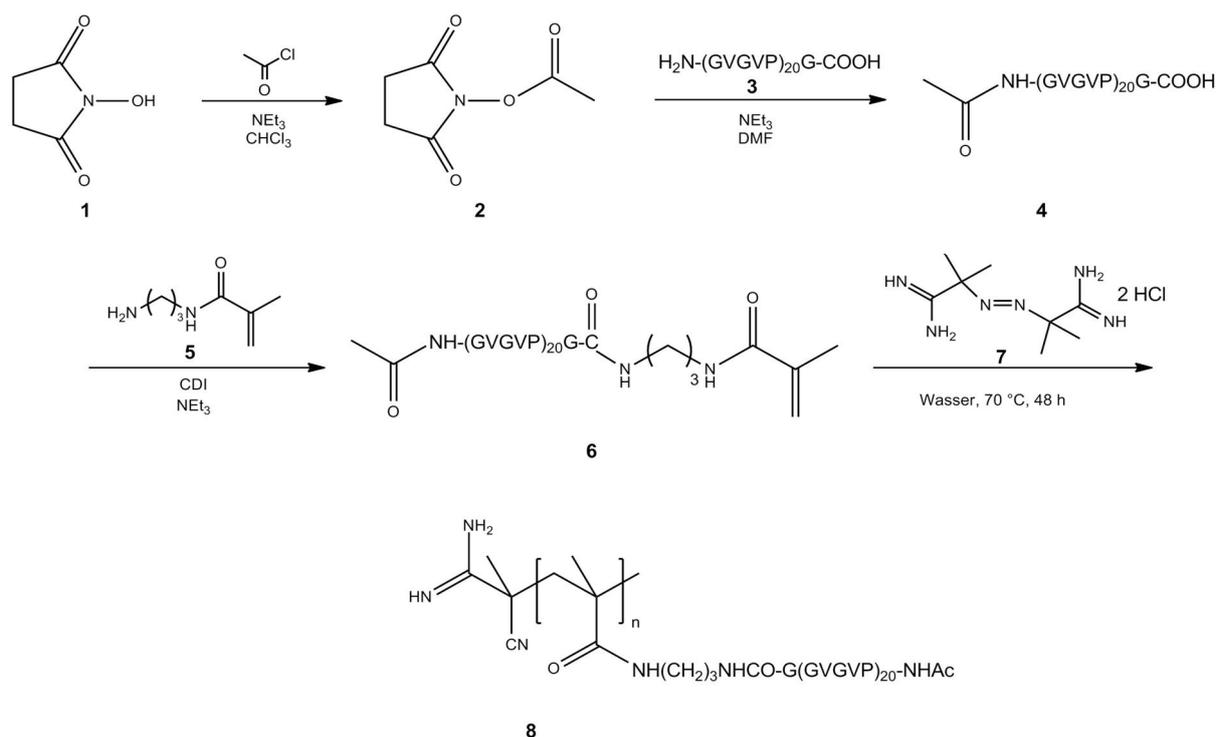


Abbildung 4 - 36: Reaktionsschema zur Darstellung der Polymerbürste mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten mit externer N-Acetyl-Schutzgruppe 8 durch „grafting through“ des Makromonomers 6.

Es ergibt sich eine bimodale Verteilung für den hydrodynamischen Radius des Makromonomers, der über dynamische Lichtstreuung bestimmt wird. Für den „fast-mode“ wird $R_h = 2.5 \text{ nm}$ erhalten. Dieser Wert liegt im Größenbereich der nicht aggregierten Makromonomere. Für den „slow-mode“ ergibt sich $R_h = 37 \text{ nm}$, der wahrscheinlich durch eine Aggregatbildung der hydrophoben Makromonomere entsteht. Die Korrelationsfunktion ist im Anhang in Abbildung A - 21 zu finden.

Die Polymerisation findet, wie für die beiden anderen Makromonomere bereits beschrieben in hoch konzentrierter Lösung über der Übergangstemperatur statt. Unter Zusatz von 1 mol % 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidin) Dihydrochlorid als Initiator wird für 48 Stunden bei 70 °C polymerisiert. Die Polymerisation findet überwiegend in der sehr hoch konzentrierten Gelphase statt und das restliche Makromonomer wird größtenteils durch Dialyse mit 10 kDa Amicon Zentrifugenfilter abgetrennt.

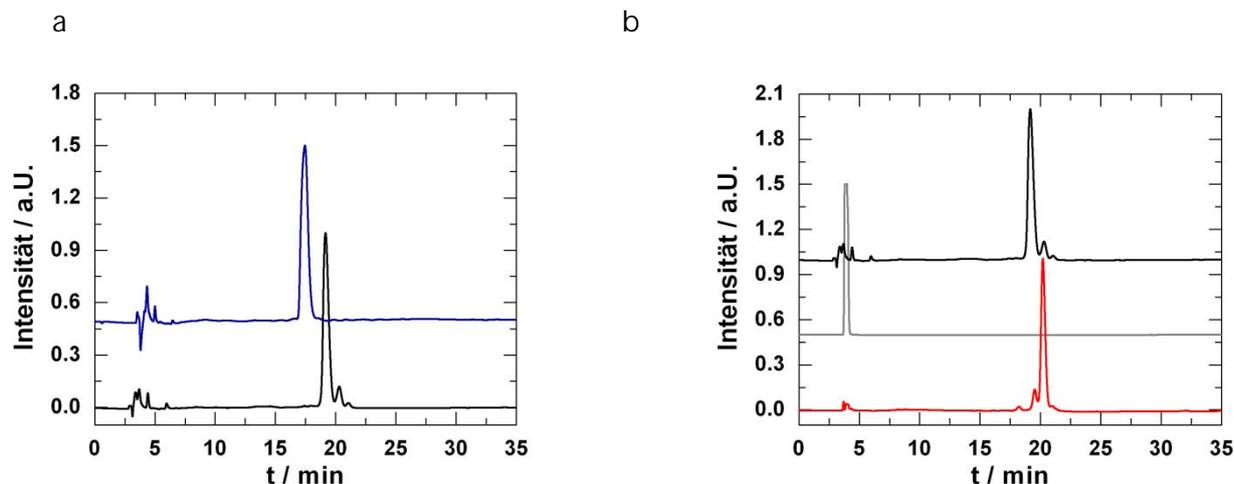


Abbildung 4 - 37: HPLC der einzelnen Komponenten zur Darstellung des N-Acetyl-ELP-C₃-MA-Makromonomers (rot): a) ELP E4-20 in JMD5 3 (blau) und N-Acetyl-ELP 4 (schwarz) und b) N-Acetyl-ELP 4 (schwarz), N-(2-Methacryloyl)-1,3-diaminopropan*HCl 5 (grau) und N-Acetyl-ELP-C₃-MA-Makromonomer 6 (rot) mit je $c = 0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Waters X-Bridge BEH300 C4-Säule, UV-Detektion bei 230 nm, Gradient: in 40 min. von H₂O/MeOH = 70/30 auf H₂O/MeOH = 90/10 mit je 0.1 % TFA).

Die dargestellte Polymerbürste kann mittels AFM, CD-Spektroskopie und Trübungskurven-Messungen charakterisiert werden. Aufgrund des starken Aggregationsverhaltens der hydrophoben Polymerbürste, kann diese nicht über statische und dynamische Lichtstreuung charakterisiert werden.

AFM-Aufnahmen zeigen kugelförmige Strukturen mit einer durchschnittlichen Länge von 50 nm, sodass von einem geringen Polymerisationsgrad ausgegangen wird. Der geringe P_w wird, wie für die PEG₆-Azid-Polymerbürste wahrscheinlich durch den höheren Anteil an Initiator sowie die verminderte Mizellbildung des Makromonomers verursacht. Zudem besteht die Polymerisationslösung aus ungefähr 20 Prozent nicht funktionalisiertem ELP, wodurch die Konzentration an polymerisierbaren Gruppen verringert wird und somit nur ein niedrigerer Polymerisationsgrad erhalten werden kann.

Aus zeitlichen Gründen konnte die Umsetzung der Polymerbürsten mit endständigen N-Acetylgruppen zu Polymerbürsten mit externen Aminogruppen nicht mehr durchgeführt werden.

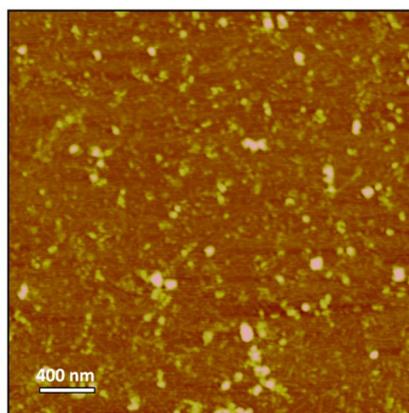


Abbildung 4 - 38: AFM-Aufnahme des Poly-(N-Acetyl-ELP-C₃-MA), spin-cast der wässrigen Lösung mit $c = 0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ auf Mica.

4.3.4.1 Phasenübergangsverhalten

Wie für die zuvor beschriebenen ELP basierten Makromonomere und Polymerbürsten ist auch in diesem Fall derselbe Trend zu erkennen: Die Übergangstemperatur des Makromonomers ist stark konzentrationsabhängig und liegt mit $51 \text{ }^\circ\text{C}$ bei $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in PBS deutlich über der der Polymerbürste mit $T_t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Diese zeigt, eine geringe Konzentrationsabhängigkeit, vgl. Abbildung 4 - 39 d. In Abbildung 4 - 39 b ist die deutliche Absenkung der T_t der Polymerbürste im Vergleich zum Makromonomer zu erkennen. Es kommt zu einer Absenkung der Übergangstemperatur um $\Delta T = 26 \text{ }^\circ\text{C}$, im Vergleich dazu sinkt die T_t für das PEG₆-N₃-System um etwa $\Delta T = 23 \text{ }^\circ\text{C}$ ab, für das Carboxy-terminierte System um $\Delta T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Zusammenfassend führt die lokal hohe ELP-Konzentration in den Polymerbürsten zu einer durchschnittlichen Absenkung der Übergangstemperatur um etwa $\Delta T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Abbildung 4 - 39 d zeigt, die auch in diesem Fall deutlich geringere Konzentrationsabhängigkeit der Übergangstemperatur für die Polymerbürste. In einem Konzentrationsbereich von $0.01\text{-}1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sinkt die T_t der Polymerbürste um $\Delta T = 1.3 \text{ }^\circ\text{C}$, wohingegen für das Makromonomer eine Abnahme der T_t um $\Delta T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$ festzustellen ist.

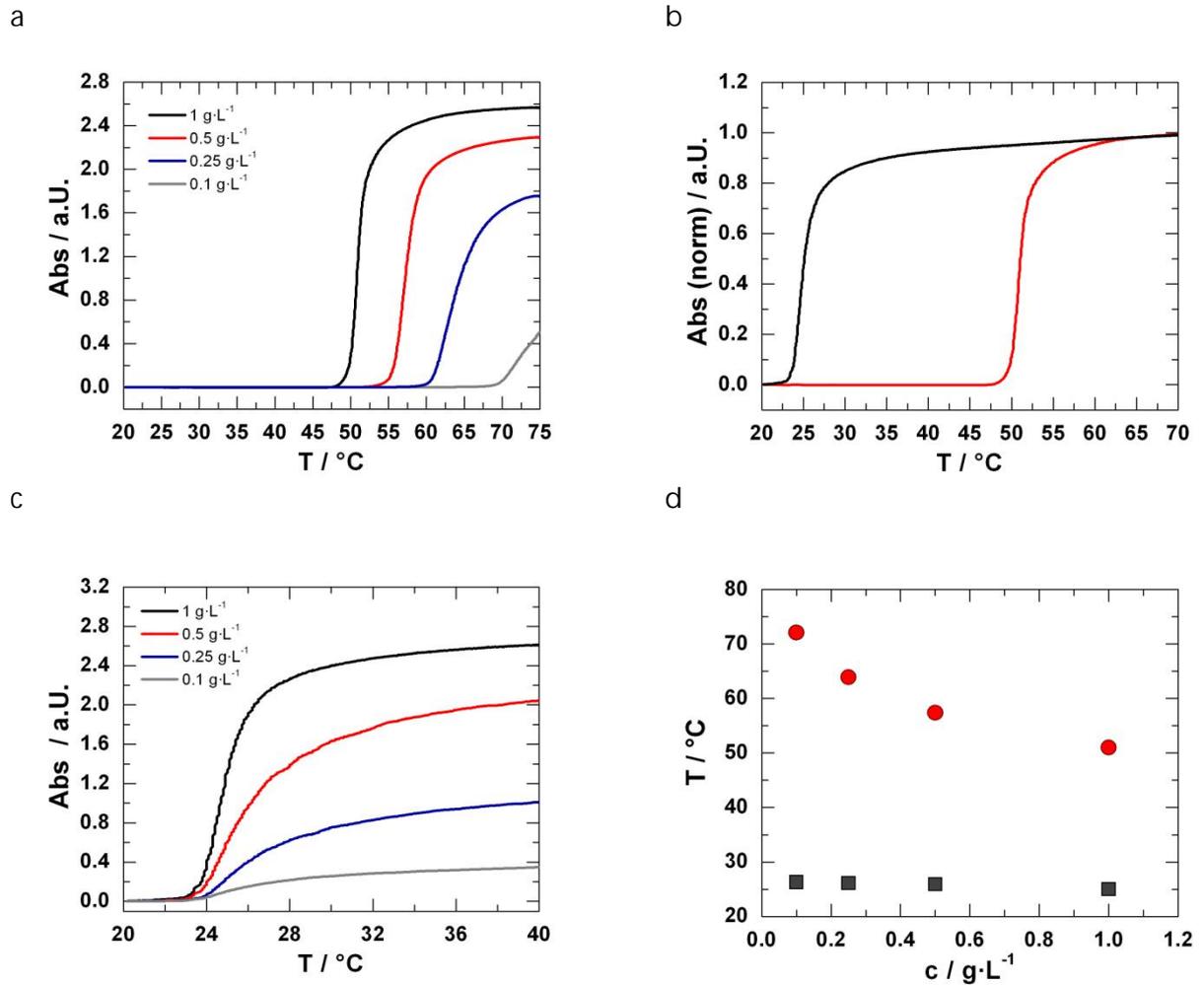


Abbildung 4 - 39: Trübungskurven des a) N-Acetyl-ELP-C₃-MA-Makromonomers in PBS bei verschiedenen Konzentrationen; b) des N-Acetyl-ELP-C₃-Makromonomers (rot) und des Poly-(N-Acetyl-ELP-C₃-MA) (schwarz) mit je $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in PBS; c) des Poly-(N-Acetyl-ELP-C₃-MA) in PBS bei verschiedenen Konzentrationen und d) Übergangstemperaturen des Makromonomers (rot) und des Polymeren (schwarz) bei verschiedenen Konzentrationen in PBS. Heizrate $1 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.3.5 Synthese und Charakterisierung von MA-ELP-Lys

Wie in Abbildung 4 - 40 gezeigt, kann aus dem E4-20 in JMD6 3 mit der Peptidsequenz $\text{H}_2\text{N}-(\text{GVGVP})_{20}\text{GK}-\text{COOH}$ durch Kopplung mit dem NHS-Ester der Methacrylsäure das monofunktionelle Betain Makromonomer MA-ELP-Lys 4 dargestellt werden. Für das primäre Amin am N-Terminus des ELPs ist ein pK_s -Wert von etwa $\text{pK}_s = 8$ anzunehmen, für die ϵ -Aminogruppe des Lysins am C-Terminus etwa $\text{pK}_s = 10$, sodass der N-Terminus in einem Reaktionsmedium mit $\text{pH} = 6.5$ eine höhere Reaktivität aufweisen sollte [60]. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen, wie dem Überschuss an NHS-Ester sowie der Reaktionszeit kann somit der Anteil an

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

Nebenprodukten (monofunktionellem ELP-Lys-MA 5 und bifunktionellem MA-ELP-Lys-MA 6) minimiert werden.

Für einen 10-fachen Überschuss an NHS-Ester und 24-stündige Reaktionszeit wird das E4-20 in JMD6, wie in Abbildung 4 - 41 a zu sehen ist vollständig zu den drei Produkten 4-6 umgesetzt. Das Hauptprodukt ist das doppelt umgesetzte MA-ELP-Lys-MA, das aufgrund der erhöhten Hydrophobizität als Letztes eluiert. MALDI-Messungen belegen den Umsatz zum einfach und doppelt umgesetzten Makromonomer (siehe Anhang Abbildung A - 22). Wie in Abbildung 4 - 41 b gezeigt, wird für einen 1.5-fachen Überschuss an NHS-Ester und 4-stündige Reaktionszeit kein vollständiger Umsatz des E4-20 in JMD6 erreicht, jedoch entsteht überwiegend das gewünschte MA-ELP-Lys, welches nach dem Edukt eluiert. Das doppelt umgesetzte MA-ELP-Lys-MA sowie das ELP-MA-Lys entstehen zu geringeren Anteilen, da die ϵ -Aminogruppe des Lysins eine geringere Reaktivität aufweist.

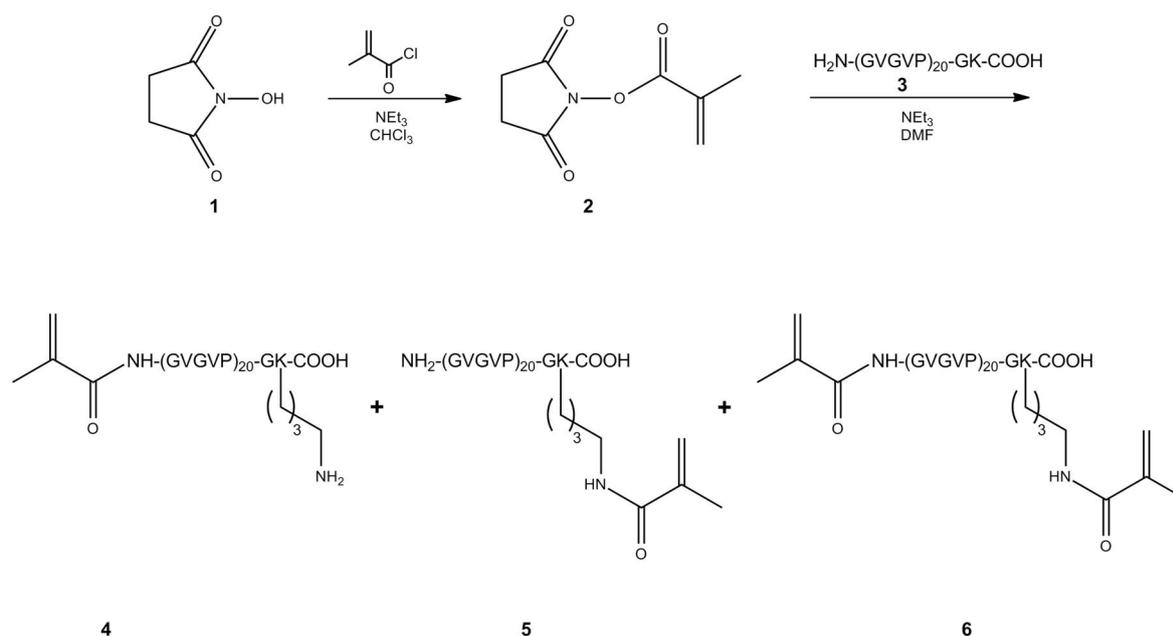


Abbildung 4 - 40: Synthesestrategie zur Darstellung des Betain Makromonomer MA-ELP-Lys 4 aus E4-20 in JMD6 3 mit den beiden Nebenprodukten ELP-Lys-MA 5 und dem bifunktionellen MA-ELP-Lys-MA 6.

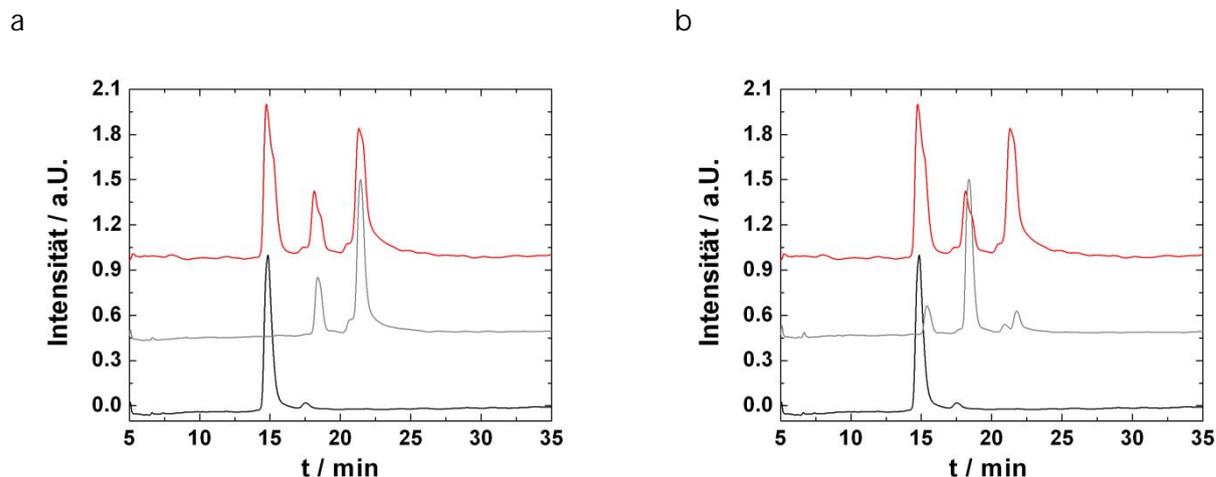


Abbildung 4 - 41: HPLC-Messungen des Edukts E4-20 in JMD6 (schwarz), der Produkte 4-6 (grau) und der Produkt-Edukt-Mischung (rot). a) Die graue Kurve zeigt die Produkte nach 24-stündiger Reaktionszeit mit 10-fachem NHS-Ester Überschuss. Das Edukt ELP wird vollständig umgesetzt und es entsteht überwiegend bifunktionelles Produkt; b) Die graue Kurve gibt die Produktverteilung nach 4-stündiger Reaktionszeit und 1.5-fachem Überschuss an NHS-Ester an. Es ist noch restliches Edukt vorhanden, als Hauptprodukt entsteht aber das gewünschte monofunktionelle MA-ELP-Lys. Waters X-Bridge BEH300 C4-Säule, UV-Detektion bei 230 nm, $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Gradient: in 40 min. von $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 70/30$ auf $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 90/10$ mit je 0.1 % TFA.

Wie im Anhang in Abbildung A - 23 an einer semi-präparativen Säule gezeigt wird, kann das monofunktionelle MA-ELP-Lys mittels präparativer HPLC von den Nebenprodukten abgetrennt werden. Dies wird unter isokratischen Bedingungen und für verschiedene Konzentrationen gezeigt. Der hohe Zeit- und Kostenaufwand einer präparativen HPLC gleicht jedoch nicht den Nutzen des Produkts aus, weswegen auf die Isolierung des Produkts 4 verzichtet wird. Es kann jedoch gezeigt werden, dass die Darstellung und Isolierung des MA-ELP-Lys möglich ist.

4.3.6 Charakterisierung der Sekundärstrukturen mittels CD-Spektroskopie

Wie bereits erwähnt zeigen typische CD-Spektren für Elastine ein globales Minimum unter 200 nm, welches auf eine „random coil“ Struktur hinweist. Ein Maximum bei 207 nm ist charakteristisch für eine Typ II β -turn Konformation[38] und ein Minimum bei 222 nm lässt auf eine Typ III β -turn Konformation schließen [39].

Die während dieser Dissertation aufgenommenen CD-Spektren für ELP basierte Makromonomere und Polymere weisen starke Ähnlichkeit mit den gemessenen

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

Spektren für lineares Elastin GVG(GVGVP)₂VP und lineares Elastin (GVGVP)₅ auf [39],[40].

Wie in Abbildung 4 - 42 a und Abbildung 4 - 43 a zu erkennen ist, zeigen sowohl das unfunktionalisierte E4-20 in JMD5, das Makromonomer MA-ELP als auch die ELP-Bürste Poly-(MA-ELP) die für die Elastine in Wasser typischen CD-Spektren auf.

Das Minimum verschiebt sich in allen Fällen unter Temperaturerhöhung nicht. Für das Maximum bei 207 nm bzw. das Minimum bei 222 nm ist jedoch eine Verschiebung zu kleineren bzw. größeren Wellenlängen zu erkennen, was mit der Veränderung der entsprechenden Strukturanteile erklärt werden kann.

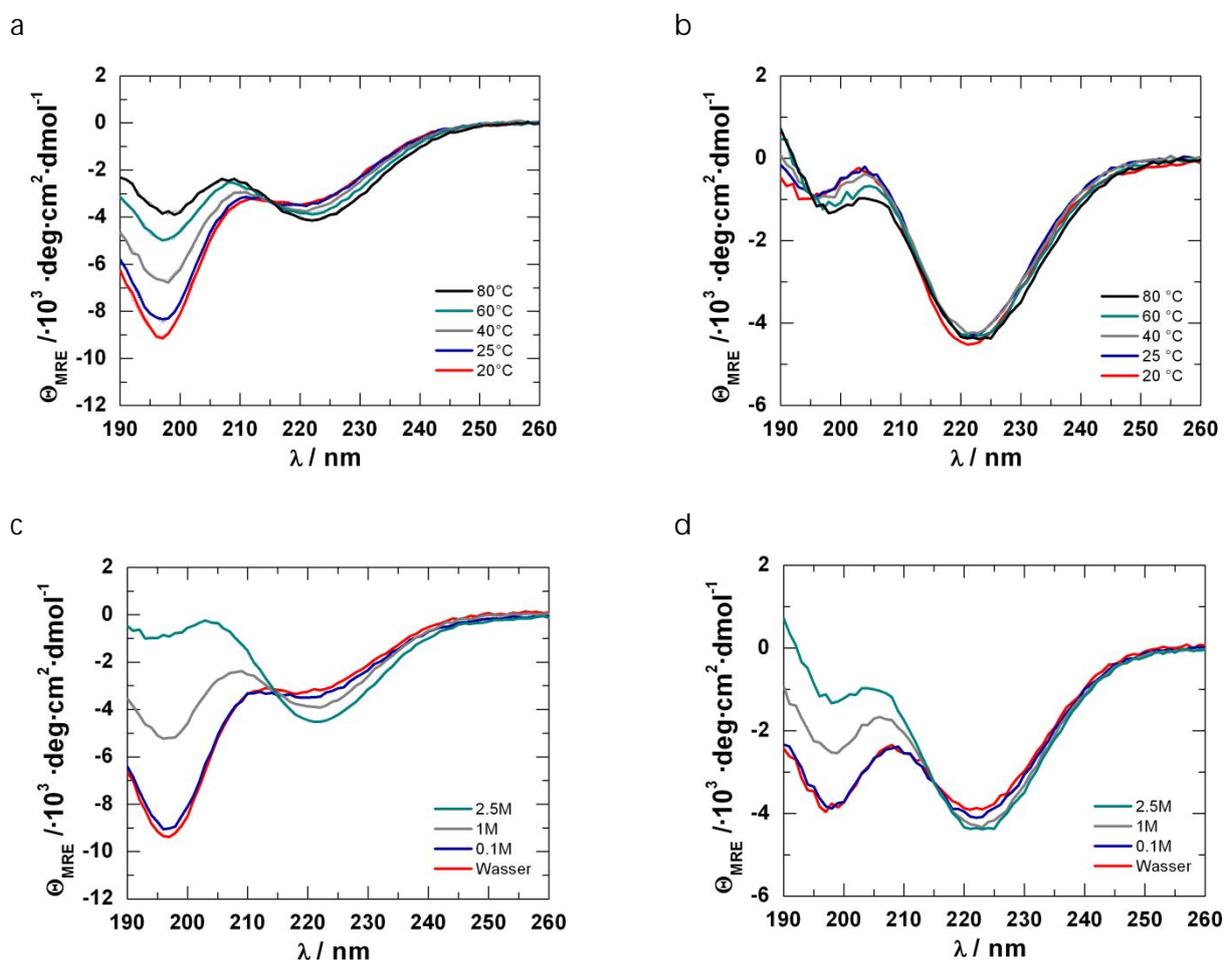


Abbildung 4 - 42: a) CD-Spektren des unfunktionalisierten E4-20 in JMD5 (ELP) (durchgezogen) und des funktionalisierten E4-20 JMD5 (MA-ELP) (gestrichelt) in Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen, je $c = 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; b) CD-Spektren des Makromonomers MA-ELP in wässriger 2.5 M NaClO₄-Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen und bei c) 20 °C und d) 80 °C in unterschiedlich molaren NaClO₄-Lösungen.

Die Spektren für das unfunktionalisierte E4-20 in JMD5 und das Makromonomer MA-ELP, beide gezeigt in Abbildung 4 - 42 a sind fast identisch, sodass die Methacrylamidgruppe, anders als beim Hexapeptid geringen Einfluss auf die Konformation des Proteins hat. Geringfügige Unterschiede lassen sich durch Fehler in der Konzentration begründen. Der geringe Einfluss ist durch die höhere Anzahl an Pentapeptid-Wiederholungseinheiten zu erklären, sodass der Einfluss der Einführung einer Methacrylamidgruppe deutlich geringer als beim Hexapeptid ist. In Gegensatz zum Pentapeptid aus Kapitel 4.2 liegt das unfunktionalisierte E4-20 in JMD5 bereits vor der Funktionalisierung in der „random coil“ Struktur vor.

Das unfunktionalisierte und funktionalisierte E4-20 in JMD5 (Abbildung 4 - 42 a) sowie die Polymerbürste (Abbildung 4 - 43 a) zeigen bei niedrigen Temperaturen in Wasser vor allem ein ausgeprägtes Minimum bei kleiner 200 nm, das für eine „random coil“ Konformationen spricht. Werte der mittleren molaren Elliptizität im Bereich von $-10\ 000\ \text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ für das globale Minimum lassen jedoch auf eine geordnetere Konformation schließen, da typische Werte der mittleren molaren Elliptizität für eine ideale „random coil“-Struktur im Bereich von $-40\ 000\ \text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ liegen [33]. Auch die negative Schulter bei 220 nm spricht für eine geordnete Konformation, da ein Wert nahe Null oder mit positiven Werten auf eine ungeordnete Struktur deuten würde [38]. Das Auftreten eines isodichroischen Punktes bei 216-217 nm (siehe Anhang Abbildung A - 26) bekräftigt die Annahme, dass mehrere Hauptkonformationen nebeneinander vorliegen, deren Anteilsverhältnisse sich durch Temperaturerhöhung oder Salzzugabe definiert ändern. In Abbildung 4 - 42 und Abbildung 4 - 43 ist an einem ausgeprägter werdenden Minimum bei 222 nm, einem intensiver werdenden Maximum bei 207 nm und einem schwächer werdenden Minimum bei 198 nm zu erkennen, dass durch Erwärmung sowie Salzzugabe der Übergang in die β -turn Konformationen induziert wird.

Wie in Abbildung 4 - 42 b zu sehen ist, liegt das Makromonomer in einer wässrigen 2.5 M Natriumperchloratlösung bereits bei Raumtemperatur in der vollständig geordneten Struktur vor, sodass Temperaturerhöhung keinen Einfluss mehr auf die Konformation hat. Für das Polymer erhält man in einer wässrigen 0.1 M Natriumperchloratlösung (Abbildung 4 - 43 b) bei Erwärmung auf 60 °C und in wässriger 2.5 M Natriumperchloratlösung (Abbildung 4 - 43 c) bereits bei Raumtemperatur eine

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

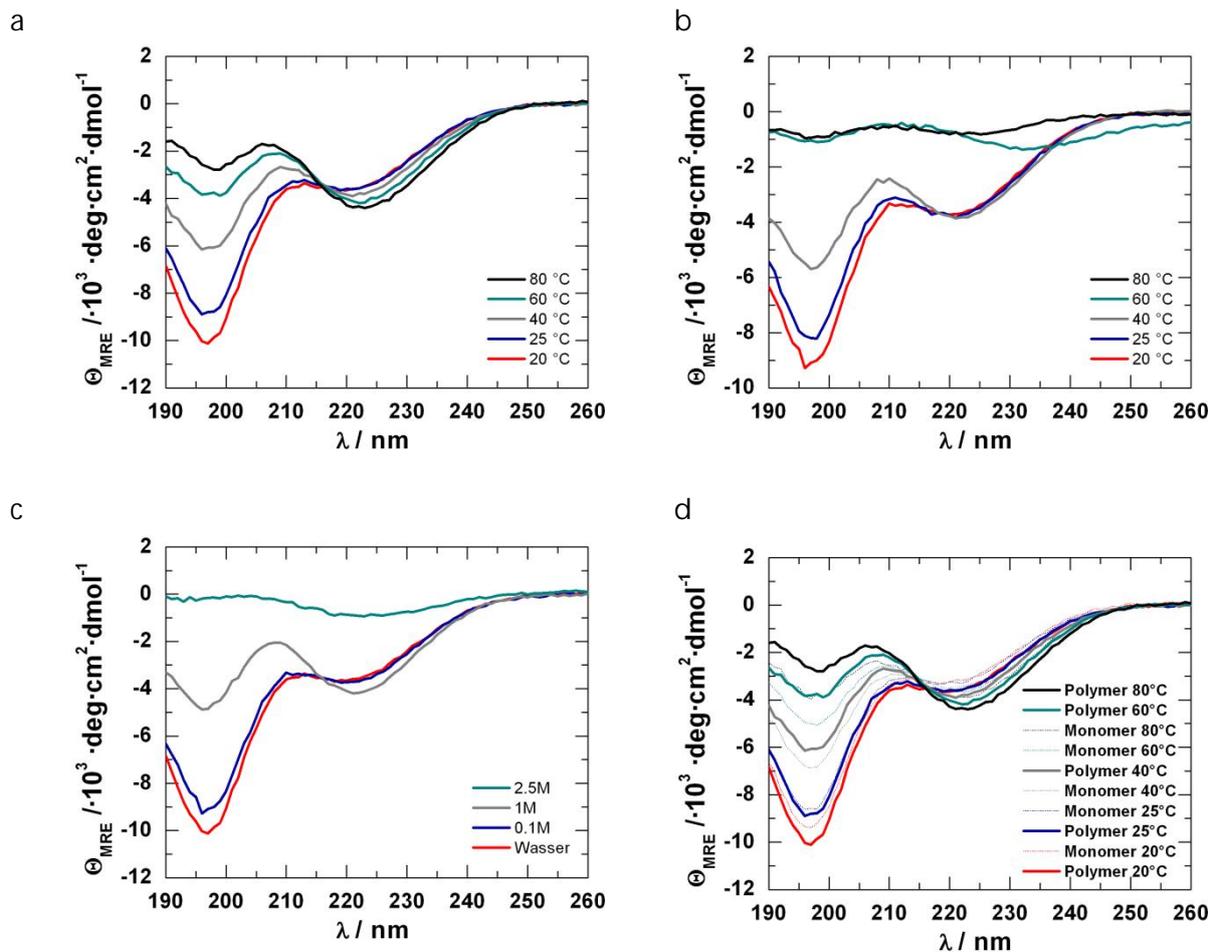


Abbildung 4 - 43: CD-Spektren des Polymers Poly-(MA-ELP) mit $c = 0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in a) Wasser und b) wässriger 0.1 M NaClO_4 -Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen; c) bei 20 °C in unterschiedlich molaren NaClO_4 -Lösungen; d) Vergleich zwischen Monomer und Polymer in Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen.

Trübung, weswegen die Konformation nicht mehr genau mittels CD-Spektroskopie bestimmt werden kann. Dieselben Trends zeigen sich ebenfalls für das MA-ELP-PEG₆-N₃ und das N-Acetyl-ELP-C₃-MA-Makromonomer und die daraus synthetisierten Bürsten, wie im Anhang in den Abbildung A - 28 bis A - 31 zu sehen ist.

In Abbildung 4 - 44 a ist zu sehen, dass bei gleicher Konzentration in Wasser die Polymerbürste Poly-(MA-ELP) verstärkt die charakteristischen Maxima bzw. Minima aufweist. Das globale Minimum bei 198 nm ist damit für die Bürste bei niedrigen Temperaturen stärker ausgeprägt als für das Monomer, bei Temperaturerhöhung erhält man hingegen ein stärker ausgeprägtes Minimum bei 220 nm. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch die hohe Propfungsichte der Seitenketten der Polymerbürste induziert, da die Kooperativität der Konformationsänderung im Vergleich zum Makromonomer verstärkt wird. Dieser Effekt erklärt auch die unterschiedlichen

Übergangstemperaturen für das Makromonomer und das Poly-(MA-ELP).

Für das System mit PEG₆-N₃-Endgruppe ist hingegen die Polymerbürste bereits in wässriger Lösung bei 20 °C in einer geordneteren Konformation als das Makromonomer und bleibt dies auch über den kompletten Salz und Temperaturbereich (vgl. Abbildung 4 - 44 b), ähnlich wie die Hexapeptidbürste in Kapitel 4.2. Dies könnte durch die erhöhte Hydrophobizität der PEG₆-N₃-Endgruppe im Vergleich zur freien Carboxygruppe verursacht werden. Wie in Abbildung 4 - 44 a und b zu erkennen ist, liegt darin wahrscheinlich auch die Begründung für den stärkeren Unterschied in den CD-Spektren des Monomers und Polymers für das PEG₆-N₃-System. Abbildung 4 - 44 c zeigt, dass die Polymerbürste Poly-(N-Acetyl-ELP-C₃-MA) in wässriger Lösung bei 20 °C in einer

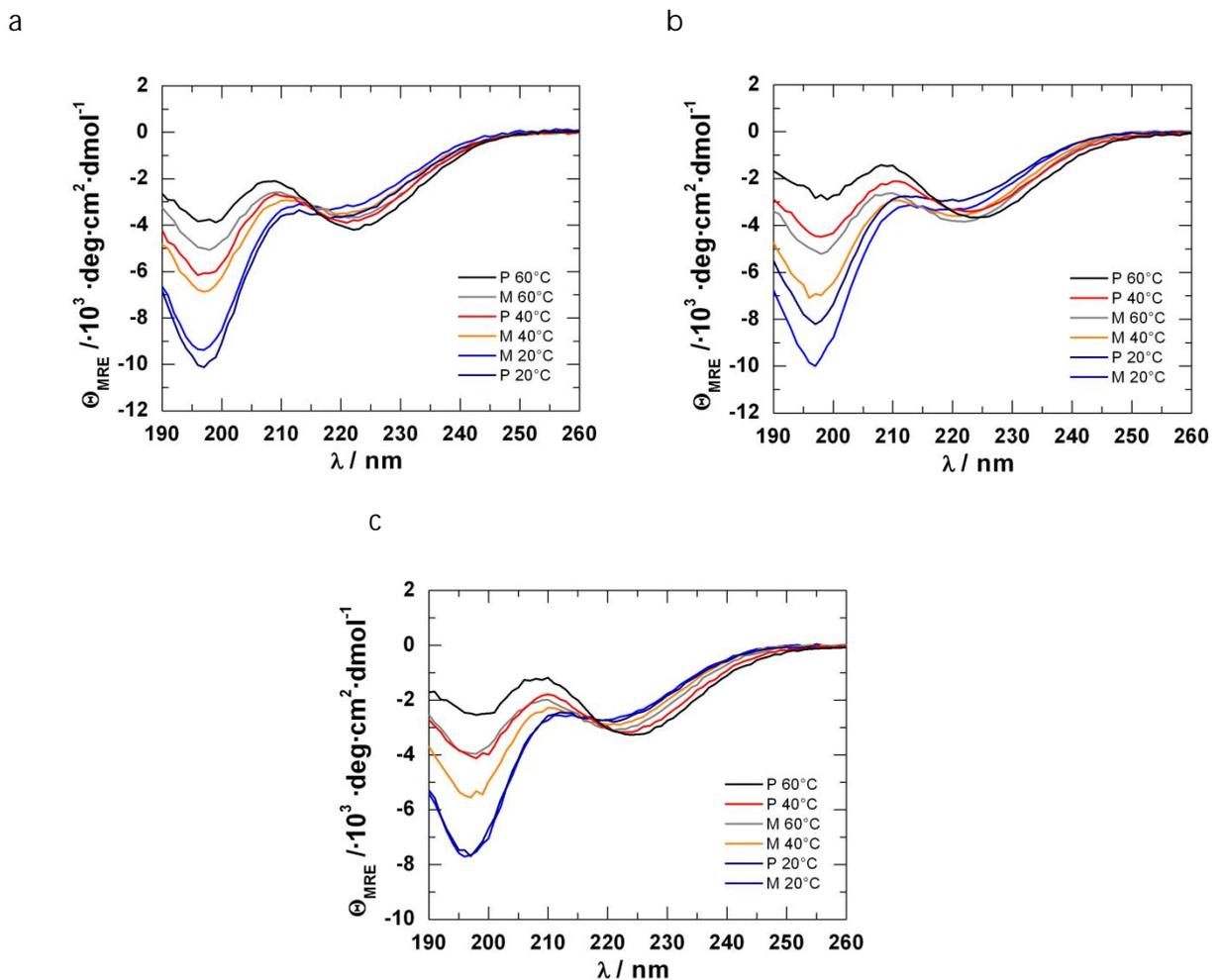


Abbildung 4 - 44: CD-Spektren a) des Makromonomers MA-ELP (M) und des Polymers Poly-(MA-ELP) (P), b) des Makromonomers MA-ELP-PEG₆-N₃ (M) und des Polymers Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) (P) und c) des Makromonomers N-Acetyl-ELP-C₃-MA (M) und des Polymers Poly-(N-Acetyl-ELP-C₃-MA) (P), mit je $c = 0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser und bei unterschiedlichen Temperaturen.

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

ähnlichen Konformation wie das Makromonomer vorliegt. Bei Temperaturerhöhung ist die β -turn Struktur für die Polymerbürste jedoch ausgeprägter. In allen Fällen lassen sich isodichroische Punkte für die CD-Spektren der Makromonomere und Polymere feststellen.

Messungen der Polymerbürste in 2 mM Phosphatpuffer mit pH = 7.4 gleichen denen in Wasser (siehe Anhang Abbildung A - 32).

Abbildung 4 - 45 zeigt, dass für die Minima in den CD-Spektren von Poly-(H₃N⁺- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) im Vergleich zu den CD-Spektren des Poly-(MA-ELP) eine geringere Intensität gemessen wird. Dies lässt vermuten, dass die Hexapeptid-Polymerbürste eine geordnetere Konformation annimmt als die Polymerbürste mit 20 Pentapeptid-Wiederholungseinheiten in der Seitenkette [43].

Somit wird eine höhere Ordnung für kürzere Peptidsequenzen festgestellt, was die Ergebnisse von Reiersen et al. bestätigt [33]. Die Spektren für das Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃), welches in einer geordneteren Struktur als das Poly-(MA-ELP) vorliegt, liegen zwischen denen des Poly-(H₃N⁺- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) und des Poly-(MA-ELP).

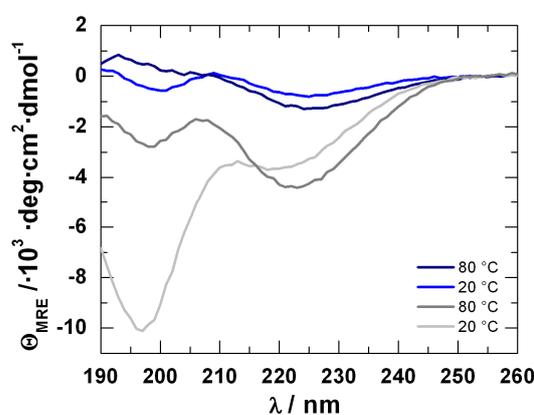


Abbildung 4 - 45: Vergleich der CD-Spektren von Poly-(H₃N⁺- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-VPGGG-COO⁻) (blau) und Poly-(MA-ELP) (grau) bei verschiedenen Temperaturen in Wasser.

4.3.7 Aggregationsverhalten in humanem Blutserum

Für Poly-(Aminosäuren) wird, wie bereits erwähnt ein „Stealth Effect“ erwartet, sodass von keinen Wechselwirkungen mit Proteinen aus dem Blutserum ausgegangen werden sollte. Jedoch können durch Ladungen am Polymer Wechselwirkungen mit ebenfalls vorzugsweise entgegengesetzt geladenen Serumproteinen induziert werden [61].

Für die Poly-(MA-ELP) Bürste, die auf der Außenseite negativ geladene Carboxygruppen trägt, tritt anders als bei den Zwitterionen eine Aggregation mit Serumproteinen auf. Dies lässt sich daran erkennen, dass die Autokorrelationsfunktion in Abbildung 4 - 46 a nicht mehr perfekt durch einen einfachen Multikomponentenfit (in rot dargestellt) gefittet werden kann. Nach Ergänzung des Multikomponentenfits um einen Aggregatparameter können die Datenpunkte jedoch beschrieben werden (in blau dargestellt) und es lassen sich bei 30° Aggregate mit einem Anteil von 38 Prozent an der Gesamtintensität und mit Größen im Bereich von 280 nm nachweisen. In Tabelle 4 - 12 sind die verschiedenen hydrodynamischen Radien und Intensitätsbeiträge der Mischung aus der Polymerbürste und dem Serum aufgeführt.

Wie in Abbildung 4 - 46 b zu sehen ist, zeigt die ELP-Polymerbürste mit externen PEG₆-Azidgruppen eine deutlich geringere Aggregationstendenz in humanem Blutserum als Poly-(MA-ELP). Jedoch ist auch in diesem Fall ein Aggregatanteil von 14 Prozent festzustellen, der vermutlich durch die ungefähr 10 Prozent nicht umgesetzten Carboxygruppen verursacht wird. Zudem zeichnet sich das System mit seinem geschützten C-Terminus durch eine erhöhte Hydrophobizität aus, was ebenfalls zu Aggregatbildung führen kann [61].

Tabelle 4 - 12: Übersicht über die hydrodynamischen Radien R_h und die Intensitätsbeiträge der Mischung aus Poly-(MA-ELP) und Serum. (S = Serum; I = prozentualer Intensitätsanteil, berechnet aus dem Betrag der Amplitude $g_1(t)$; P = untersuchter Partikel; A = Aggregat).

	R_h / nm (S)	I% R_h (S)	R_h / nm (P)	I% R_h (P)	R_h / nm (A)	I% R_h (A)
30°	41	0.60	23	0.02	277	0.38
60°	35	0.80	22	0.01	262	0.19
90°	35	0.87	22	0	207	0.13
120°	32	0.87	22	0.02	158	0.11
150°	30	0.86	21	0.04	150	0.10

4.3 Polymerbürsten mit Elastin-ähnlichen Polypeptidseitenketten

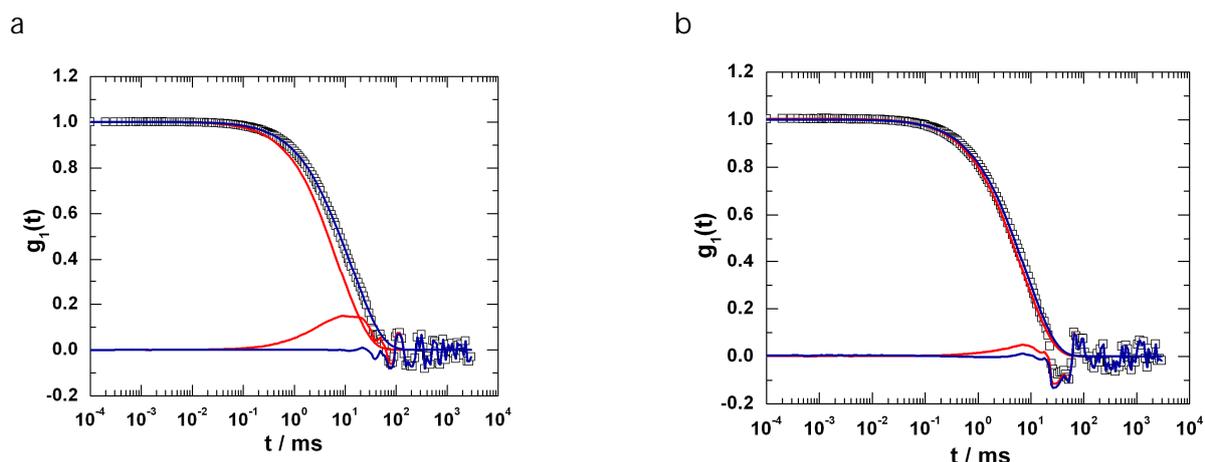


Abbildung 4 - 46: Autokorrelationsfunktion und Multikomponentenfits mit entsprechenden Residuen bei Streuwinkel 30° für a) Poly-(MA-ELP) und Blutserum ohne zusätzliche Fitfunktion (rot) und mit zusätzlicher Aggregat-beschreibender Funktion (blau) und b) Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) und Blutserum ohne zusätzliche Fitfunktion (rot) und mit zusätzlicher Aggregat-beschreibender Funktion (blau). Die Proben werden in PBS Puffer gelöst und mit $c = 0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ für Poly-(MA-ELP) und $c = 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ für Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) in humanem Blutserum gemessen.

Generell ist aus diesen Ergebnissen zu schließen, dass die endständigen Carboxygruppen die Aggregation der Polymerbürste in humanem Blutserum verursachen und durch Funktionalisierung der Carboxygruppen die Aggregationstendenz deutlich herabgesetzt werden kann. Zwitterionische Strukturen scheinen jedoch die geringste Aggregationstendenz aufzuweisen. Dies könnte beispielsweise durch eine Elastin basierte Polymerbürste mit zwitterionischen Gruppen belegt werden, die z.B. aus Azid, aber auch den Carboxylat-funktionalisierten Makromonomeren dargestellt werden könnte.

Die Messungen werden von [REDACTED] durchgeführt.

Tabelle 4 - 13: Übersicht über die hydrodynamischen Radien R_h und die Intensitätsbeiträge der Mischung aus Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) und Serum. (S = Serum; I = prozentualer Intensitätsanteil, berechnet aus dem Betrag der Amplitude $g_1(t)$; P = untersuchter Partikel; A = Aggregat).

	R_h / nm (S)	I% R_h (S)	R_h / nm (P)	I% R_h (P)	R_h / nm (A)	I% R_h (A)
30°	34	0.86	34	0	160	0.14
60°	31	0.80	30	0.08	225	0.12
90°	26	0.88	29	0	100	0.12

4.3.8 Zusammenfassung von Kapitel 4.3

Zwei sich am C-Terminus unterscheidende Elastin-ähnliche Polypeptide wurden über die PRe-RDL Methode dargestellt, anschließend von *E. Coli* exprimiert und mittels ITC aufgereinigt. Diese ELPs wurden zu insgesamt vier unterschiedlichen Makromonomeren umgesetzt.

Die Polymerisation der Makromonomere fand in hoch konzentrierter, wässriger Lösung oberhalb der Übergangstemperatur statt, wodurch Polymere mit unterschiedlichen Endgruppen erhalten wurden. Die wurm- oder kugelförmige Struktur der Polymere konnte in AFM-Aufnahmen gezeigt werden. Die lokal hohe Konzentration an Seitenketten in den Bürstenmolekülen führte zu einer Absenkung der Übergangstemperatur um durchschnittlich $\Delta T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ und verringerte die Konzentrationsabhängigkeit der T_t im Vergleich zu den entsprechenden Makromonomeren. Salzzugabe führte zum Schrumpfen der Polymerbürste und mittels dynamischer Lichtstreuung konnte der Bürstenkollaps bei erhöhter Temperatur beobachtet werden.

Über CD-Spektroskopie konnte der Übergang von einer „random coil“ in eine β -turn Konformation nach Zugabe von Salz und/oder Erwärmen beobachtet werden. Die Polymerbürsten zeigten meist eine geordnetere Konformation als die entsprechenden Makromonomere, was wiederum über die lokal hohe ELP-Konzentration in der Polymerbürste erklärt werden konnte.

Die außen liegenden Endgruppen der Polymerbürsten beeinflussten in starkem Maße die Aggregationstendenz in menschlichem Blutserum. So bildeten sich für die Polymerbürsten mit externem, negativ geladenen C-Terminus Aggregate im Serum aus, für Polymerbürsten mit 90 Prozent PEG₆-N₃-Endgruppen war hingegen eine verminderte Aggregationstendenz festzustellen.

Die funktionellen Gruppen an der Außenseite der Bürsten stellen eine ideale Konjugationsplattform für Umsetzungen mit Bio- und Wirkstoffmolekülen dar und positiv geladenen Bürstenmoleküle können als potentielle Transfektionsagenzien für die Komplexierung von DNA und RNA eingesetzt werden.

Literatur zu Kapitel 4:

- [1] D. Weller, *Synthese und Charakterisierung von Makromolekülen mit Peptidseitenketten*, Mainz 2010.
- [2] S. Nagaoka, A. Shundo, T. Satoh, K. Nagira, R. Kishi, K. Ueno, K. Iio, H. Ihara, *Synthetic Communications* 2005, 35, 2529–2534.
- [3] A. Lekchiri, M. Morcellet, M. Wozniak, *Polyhedron* 1987, 6, 633–639.
- [4] N. J. Boylan, W. Zhou, R. J. Proos, T. J. Tolbert, J. L. Wolfe, J. S. Laurence, *Bioconjugate Chem.* 2013, 1008–1016.
- [5] E. Maeda, K. Urakami, K. Shimura, M. Kinoshita, K. Takechi, *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 7164–7171.
- [6] A. Wakankar, Y. Chen, Y. Gokarn, F. S. Jacobson, *mabs* 2011, 3, 161–172.
- [7] W. Burchard, *J. Adv. Polym. Sci.* 1983, 48, 1.
- [8] W. Burchard, M. Schmidt, W. H. Stockmayer, *Macromolecules* 1980, 13, 1265–1272.
- [9] M. Schmidt, *Macromolecules* 1984, 17, 553–560.
- [10] H. Yamakawa, *Harper and Row, New York* 1971, Ch. 6.
- [11] H. Yamakawa, *J. Chem. Phys.* 1962, 36, 2995.
- [12] C. W. Pyun, M. Fixman, *J. Chem. Phys.* 1964, 41, 937.
- [13] S. Imai, *J. Chem. Phys.*, 50, 2116.
- [14] O. Kratky, G. Porod, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1949, 68, 1106–1122.
- [15] M. Schmidt, *Macromolecules* 1984, 17, 553–560.
- [16] Stuart A. Rice and Mitsuru Nagasawa, *Polyelectrolyte Solutions - A theoretical introduction*, Academia Press London and New York. 1961.
- [17] S. A. Rice, F. E. Harris, *J. Chem. Phys.* 1956, 24, 326.
- [18] A. Katchalsky, I. R. Miller, *J. Polym. Sci.* 1954, 13, 57–68.
- [19] D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 5761–5768.
- [20] K. Rausch, A. Reuter, K. Fischer, M. Schmidt, *Biomacromolecules* 2010, 11, 2836–2839.
- [21] K. Huber, *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 9825–9830.
- [22] S. Lages, R. Michels, K. Huber, *Macromolecules* 2010, 43, 3027–3035.
- [23] S. Lages, G. Goerigk, K. Huber, *Macromolecules* 2013, 46, 3570–3580.
- [24] M. Dietzsch, M. Barz, T. Schüler, S. Klassen, M. Schreiber, M. Susewind, N. Loges, M. Lang, N. Hellmann, M. Fritz, K. Fischer, P. Theato, A. Kühnle, M. Schmidt, R. Zentel, W. Tremel. *Langmuir* 2013, 29, 3080–3088.
- [25] M. Pechar, J. Brus, L. Kostka, Č. Koňák, M. Urbanová, M. Šlouf, *Macromol. Biosci.* 2007, 7, 56–69.
- [26] F. Fernández-Trillo, J. C. M. van Hest, J. C. Thies, T. Michon, R. Weberskirch, N. R. Cameron, *Chem. Commun.* 2008, 2230.
- [27] L. Ayres, K. Koch, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* 2005, 38, 1699–1704.
- [28] 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, 6094–6099.
- [29] F. Fernández-Trillo, J. C. M. van Hest, J. C. Thies, T. Michon, R. Weberskirch, N. R. Cameron, *Adv. Mater.* 2009, 21, 55–59.
- [30] C. M. Venkatachalam, D. W. Urry, *Macromolecules* 1981, 14, 1225–1229.
- [31] B. Li, D. O. V. Alonso, V. Daggett, *Journal of Molecular Biology* 2001, 305, 581–592.
- [32] D. W. Urry, *Ultrastruct Pathol.* 1983, 4, 227–251.
- [33] H. e. a. Reiersen, *J. Mol. Biol.* 1998, 283, 255–264.
- [34] C. A. J. Hoeve, P. J. Flory, *Biopolymers* 1974, 13, 677–686.
- [35] J. M. Gosline, *Biopolymers* 1978, 17, 697–707.
- [36] J. M. Gosline, C. J. French, *Biopolymers* 1979, 18, 2091–2103.

- [37] S. R. Kakivaya, C. A. Hoeve, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975, 72, 3505–3507.
- [38] D. W. Urry, R. G. Shaw, K. U. Prasad, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1985, 130, 50–57.
- [39] Z. Ahmed, J. P. Scaffidi, S. A. Asher, *Biopolymers* 2009, 91, 52–60.
- [40] H. Nuhn, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* 2008, 9, 2755–2763.
- [41] L. Ayres, M. R. J. Vos, P. J. H. M. Adams, I. O. Shklyarevskiy, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* 2003, 36, 5967–5973.
- [42] D. W. Urry, M. M. Long, B. A. Cox, T. Ohnishi, L. W. Mitchell, M. Jacobs, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 1974, 371, 597–602.
- [43] B. Bochicchio, N. Floquet, A. Pepe, A. J. P. Alix, A. M. Tamburro, *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 3166–3176.
- [44] K. Rausch, A. Reuter, K. Fischer, M. Schmidt, *Biomacromolecules* 2010, 11, 2836–2839.
- [45] J. R. McDaniel, J. A. MacKay, F. G. Quiroz, A. Chilkoti, *Biomacromolecules* 2010, 11, 944–952.
- [46] S. Fluegel, K. Fischer, J. R. McDaniel, A. Chilkoti, M. Schmidt, *Biomacromolecules* 2010, 11, 3216–3218.
- [47] D. Weller, J. R. McDaniel, K. Fischer, A. Chilkoti, M. Schmidt, *Macromolecules* 2013, 46, 4966–4971.
- [48] Y. Tsukahara, K. Mizuno, A. Segawa, Y. Yamashita, *Macromolecules* 1989, 22, 1546–1552.
- [49] Y. Tsukahara, K. Tsutsumi, Y. Yamashita, S. Shimada, *Macromolecules* 1990, 23, 5201–5208.
- [50] S. Kawaguchi, M. Schmidt, *Polymer journal* 2002, 34, 253–260.
- [51] N. V. Lebedeva, F. C. Sun, H.-i. Lee, K. Matyjaszewski, S. S. Sheiko, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 4228–4229.
- [52] S. S. Sheiko, F. C. Sun, A. Randall, D. Shirvanyants, M. Rubinstein, H.-i. Lee, K. Matyjaszewski, *Nature*. 2006, 440, 191–194.
- [53] J. R. McDaniel, J. Bhattacharyya, K. B. Vargo, W. Hassouneh, D. A. Hammer, A. Chilkoti, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, n/a.
- [54] J. R. McDaniel, S. R. MacEwan, M. Dewhirst, A. Chilkoti, *Journal of Controlled Release* 2012, 159, 362–367.
- [55] W. Li, A. Zhang, K. Feldman, P. Walde, A. D. Schlüter, *Macromolecules* 2008, 41, 3659–3667.
- [56] D. W. Urry, T. L. Trapane, K. U. Prasad, *Biopolymers* 1985, 24, 2345–2356.
- [57] F. Sciortino, M. Ugo Plama, D. W. Urry, K. U. Prasad, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988, 157, 1061–1066.
- [58] Y. Cho, Y. Zhang, T. Christensen, L. B. Sagle, A. Chilkoti, P. S. Cremer, *J. Phys. Chem. B.* 2008, 112, 13765–13771.
- [59] J. Bühler, S. Muth, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromol. Rapid Commun.* 2013, n/a.
- [60] Z. Zhang, S. Chen, Y. Chang, S. Jiang, *J. Phys. Chem. B.* 2006, 110, 10799–10804.
- [61] Kristin Rausch, *Interaktions- und Aggregationsverhalten von Nanopartikeln in Blutserum*, Mainz 2013.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Polymere mit unterschiedlich langen peptidischen Seitenketten mittels „grafting through“ Polymerisation der entsprechenden Makromonomere dargestellt werden können. Es handelte sich grundsätzlich um drei verschiedene Polymersysteme, die entweder eine, sechs oder 100 Aminosäuren als Seitenkette tragen. Die Monomere und Polymere wurden auf die Änderung ihrer physikalischen Eigenschaften unter Einfluss von externen Stimuli untersucht. Zudem wurden die Biokompatibilität und das Aggregationsverhalten in humanem Blutserum überprüft, um die Eignung dieser Makromoleküle als mögliche polymere Wirkstoff-Trägersysteme beurteilen zu können.

Für die Darstellung von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) wurde das zwitterionische Monomer ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin frei radikalisch in Wasser polymerisiert. Das Polymer wurde mit Alexa Fluor 488 Farbstoffmolekülen konjugiert, worüber eine spätere Detektion in Zellaufnahmestudien und bei der Bestimmung des isoelektrischen Punkts möglich wurde. Der isoelektrische Punkt wurde für das unmarkierte und das Alexa Fluor 488 markierte Polymer über verschiedene Methoden bestimmt und es konnte ein starker Einfluss der Farbstoffmoleküle auf den isoelektrischen Punkt des Polymers festgestellt werden. Die Helix induzierende Wirkung von Natriumperchlorat für Poly-(L-Lysin) konnte über statische und dynamische Lichtstremessungen nicht für das unmarkierte Polymer Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) nachgewiesen werden, dessen Konformation kaum von der Natriumperchloratkonzentration in der Lösung beeinflusst wurde. Das zwitterionische Polymer expandierte jedoch in den extremen pH-Bereichen nach Zugabe von Salzsäure und Natriumhydroxid zur wässrigen Polymerlösung und zeigte damit ein Stimuli-responsives Verhalten.

Die Überlebensrate für dendritische Knochenmarkzellen und humane embryonale Nierenzellen war nach Zugabe des Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) hoch und auch in humanem Blutserum trat keine Aggregation auf, weswegen das System als biokompatibel bezeichnet werden kann. Aufgrund der sehr geringen unspezifischen Zellaufnahme in dendritische Knochenmarkzellen, die für das Alexa Fluor 488 markierte Polymer über Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie gezeigt werden konnte, scheint das Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) ein geeignetes Trägersystem für die

Anwendung, beispielsweise in der Krebsimmuntherapie zu sein. Wirkstoffmoleküle, Antigene und Antikörper können zukünftig über Konjugationsreaktionen an die Amino- und/oder Carboxygruppen des Polymers konjugiert werden.

Ein weiterer Anwendungsbereich stellt die Gentransfektion dar, in der DNA-Polymer-Komplexe, die sich in Gegenwart von divalenten Metallionen ausbildeten eingesetzt werden können.

Das Makromonomer Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-Ethylester konnte ausgehend von dem Monomer ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin durch Kopplung mit einem Elastin basierten Pentapeptid dargestellt werden. Mittels der „grafting through“ Methode entstanden durch freie radikalische Polymerisation hochmolekulare geschützte Polymerbürsten mit Hexapeptidseitenketten, die erst nach Abspaltung der Schutzgruppen in Wasser löslich wurden.

Die wurmartige Struktur der Polymerbürsten konnte in Rasterkraftmikroskopie-Aufnahmen gezeigt werden. Der hydrodynamische Radius, das Trägheitsradienquadrat und das Molekulargewicht wurden durch dynamische und statische Lichtstreuung bestimmt, worüber eine hohe Kettensteifigkeit für die Bürstenmoleküle nachgewiesen wurde. Nach Zugabe von Natriumchlorid und bei einem pH von $\text{pH} = 1.4$ trat eine Trübung für die entschützte zwitterionische Bürste auf, welche über UV-Messungen detektiert wurde.

Zirkulardichroismus-Messungen zeigten, dass die Pentapeptidsequenz Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin in einer β -turn Struktur mit hoher Ordnung vorliegt, diese jedoch durch die Einführung des ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysins gestört wurde. Im Vergleich zum Makromonomer lag die Polymerbürste in einer geordneteren Konformation vor, zudem waren die Sekundärstrukturen aller Moleküle von der Temperatur und der Salzkonzentration in Lösung abhängig.

Für das zwitterionische Polymer waren keine Wechselwirkungen mit Serumproteinen nachweisbar und auch die Überlebensrate der beiden verschiedenen Zelllinien nach Zugabe der Polymerlösung war hoch, sodass auch für dieses Polymer von einem potenziellen „Nanocarrier“ gesprochen werden kann.

Elastin-ähnliche Polypeptide mit 20 Wiederholungen der Pentapeptidsequenz Valin-Prolin-Glycin-Valin-Glycin und zwei unterschiedlichen Endgruppen wurden über die „recursive directional ligation by plasmid reconstruction“ Methode dargestellt. Über

verschiedene Methoden konnte die Reinheit dieser beiden Peptide bestätigt werden und die weitere Umsetzung zu insgesamt vier unterschiedlichen Makromonomeren erfolgte über die Einführung von Methacrylamidgruppen.

Über „grafting through“ Polymerisation der Makromonomere entstanden Polymerbürsten mit unterschiedlichen Endgruppen und einem Poly-(Methacrylamid)-Rückgrat. Die externen Carboxy-, Amino- und Azidgruppen der Polymerbürsten sollen für zukünftige Konjugationsreaktionen mit Farbstoff-, Wirkstoff- oder Biomolekülen verwendet werden. Zudem sind Komplexierungsexperimente der Polymerbürsten mit endständigen Aminogruppen mit DNA- oder RNA-Molekülen geplant um den Einsatz dieser Komplexe in der Gentransfektion zu evaluieren.

Durch Messung von konzentrationsabhängigen Trübungskurven konnte gezeigt werden, dass die Übergangstemperatur der Makromonomere eine stärker ausgeprägte Konzentrationsabhängigkeit aufweist als die der Polymerbürsten. Die hohe Dichte an Seitenketten in der Polymerbürste verursacht eine lokal hohe ELP-Konzentration, über die zum einen die Absenkung der Übergangstemperatur und zum Anderen auch die geringe Konzentrationsabhängigkeit erklärt werden kann. Statische und dynamische Lichtstreuungsmessungen zeigten, dass es durch Salzzugabe und Erwärmen erst zur Schrumpfung und später zum Kollaps der Polymerbürste kam.

Über Zirkulardichroismus-Messungen wurde gezeigt, dass die Elastin-ähnlichen Polypeptide bei niedrigen Temperaturen und in wässriger Lösung vorwiegend in einer „random coil“ Struktur vorlagen und es nach Zugabe von Salz oder Erwärmen zur Ausbildung von β -turn Strukturen kam. Dies trat sowohl für die Elastin-ähnlichen Polypeptide, die entsprechenden Makromonomere und die Polymerbürsten auf. Für die Polymerbürsten konnte jedoch wegen der Kooperativität der Konformationsänderung ein stärkerer Effekt beobachtet werden.

Für Polymerbürsten mit in den Seitenketten endständigen Carboxygruppen konnte über dynamische Lichtstreuung eine Aggregatbildung in humanem Blutserum nachgewiesen werden. Polymerbürsten mit überwiegendem Anteil an externen Polyethylenglykol-Azidgruppen zeigten hingegen aufgrund der verminderten Ladung (nur ungefähr 10 Prozent) eine geringere Aggregationstendenz mit Serumproteinen, sodass diese Moleküle die attraktiveren „Nanocarrier“ darstellen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemikalien

Lösungsmittel wie Chloroform und Ethylacetat werden von Fisher Scientific Inc., Methanol, Isopropanol sowie Aceton werden von Merck bezogen. Hexafluorisopropanol und Acetonitril werden von Sigma Aldrich bezogen.

Wasserfreie Zitronensäure, N-Methyl-Morpholin, Triethylamin, Chlorameisensäureisobutylester, Methacrylsäurechlorid, basisches Kupfer(II)carbonat, Natriumsulfat, L-Lysin-Monohydrochlorid, Boc-Val-OH, HCl*Pro-OMe und Boc-Gly-OH, O-(2-Aminoethyl)-O'-(2-azidoethyl)pentaethylenglykol und CDI werden von Sigma-Aldrich/Fluka bezogen, H-Gly-Gly-OEt von Bachem. Natriumhydroxid stammt von Riedel-de Haen, konzentrierte Salzsäure von VWR, Natriumhydrogencarbonat von Fisher Scientific Inc. und Magnesiumsulfat sowie Natriumchlorid von Roth. Restriktionsenzyme und „calf intestinal phosphatase“ (CIP) werden von New England Biolabs (Ipswich, MA), T4 DNA Ligase von Invitrogen (Carlsbad, CA) und der pET-24a+ Klonierungsvektor von Novagen Inc. (Madison, WI) verwendet. Alle Oligonukleotide werden von Integrated DNA Technologies Inc. hergestellt (Coralville, IA). EB5 α and BL21 *E. coli* Zellen werden bei Edge BioSystems (Gaithersburg, MD) bestellt. Alle *E. coli* Kulturen wachsen in TBDry media (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). Die DNA miniprep, Gel Purification, und PCR Purification Kits werden von Qiagen Inc. (Germantown, MD) bezogen.

Die ELPs werden in der Gruppe von Ashutosh Chilkoti im Department of Biomedical Engineering an der Duke University, Durham NC hergestellt.

6.2 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

6.2.1 ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Kupfer-Komplex

Die Reaktion wird analog der Vorschrift von S. Nagaoka et al.[1] durchgeführt und ist bereits beschrieben [2].

L-Lysin Hydrochlorid (60.47 g, 331.07 mmol) wird bei 90 °C in Wasser (725 mL) gelöst. Nach langsamer Zugabe von basischem Kupfercarbonat (40.24 g, 181.85 mmol) färbt sich die farblose und klare Lösung dunkelblau. Es wird 10 Minuten lang gerührt. Nach dem Abkühlen wird der unlösliche, türkisfarbene Rest abfiltriert und Aceton (350 mL) sowie 2 M Kaliumhydroxidlösung (165.54 mL) werden zugegeben. Methacrylsäurechlorid (10mL) (über Kupfer(I)chlorid destilliert) und 2 M Kaliumhydroxidlösung (46.5 mL) werden bei 3 °C zugegeben. Dies wird im 5 minütigen Abstand weitere vier Mal wiederholt. Die Reaktionsmischung wird für 12 Stunden gerührt, wobei sich ein Feststoff bildet, welcher abfiltriert und mit Wasser, Methanol und Ether gewaschen wird. Das Produkt wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 32.58 g (66.56 mmol, 37% d. Th.)

Eigenschaften: hellblauer Feststoff

IR (cm⁻¹): 3100-3400, $\nu_{\text{N-H}}$ (Amid, Amin); 2870-2950, $\nu_{\text{C-H}}$; 1650, $\nu_{\text{C=O}}$ (Amid I); 1620, $\delta_{\text{N-H}}$ (Amid II); 670, $\delta_{\text{N-H}}$ (Amid V)

6.2.2 ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin

Der ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Kupfer-Komplex (17.8 g, 36 mmol) wird in 1 N NaOH Lösung (285 mL) suspendiert. Zu der blau gefärbten Suspension wird in Wasser (285 mL) gelöstes Natriumoxalat (9.79 g, 72 mmol) zugegeben und für 3 Tage gerührt. Durch Zentrifugation wird der braune Niederschlag von der Lösung abgetrennt. Anschließend wird zu der bläulich gefärbten wässrigen Lösung Chelex 100 (28.5 g) zugegeben und für

1 Stunde gerührt um eine vollständige Entfernung des Kupfers zu garantieren. Das Chelex 100 wird abfiltriert und die farblose Lösung (pH 12) gefriergetrocknet. Ein farbloser Feststoff (17.8 g) wird erhalten.

Eine Ionenchromatografie wird zur Entfernung des restlichen NaOH Salzes durchgeführt. Die Säule wird mit einer Suspension aus Ag 1 Resin in Chlorid Form (125 g) und Wasser (300 mL) befüllt und durch Waschen mit 2 M NaOH-Lösung (2L) und Wasser (300 mL) in die Ag 1 Resin Hydroxid Form überführt [3]. Die Säule wird mit ϵ -Methacryloyl-L-Lysin (17.8 g in 150 mL Wasser) beladen und mit Wasser und 1 Prozent Ameisensäure gewaschen. Das Produkt eluiert bei pH = 7-8. Die Lösung wird anschließend filtriert (VV 100 μ m) und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 10.5 g (49 mmol, 67% d. Th.)

Eigenschaften: farbloser, flockiger Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (D₂O, TMS, δ in ppm): 5.64 (m, 1 H), 5.41 (m, 1 H), 3.67-3.72 (t, 1H), 3.22-3.27 (t, 2H), 1.80-1.9 (m, 5H), 1.52-1.61 (m, 2H), 1.32-1.44 (m, 2H).

HPLC: Elutionszeit 5.14 min, Nucleosil-Säule, siehe Anhang Abbildung A - 2.

6.2.3 Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin (0.5 g, 2.33 mmol) wird in einen sauberen 25 mL Spitzkolben überführt. Als Initiator wird 4,4-Azobis-4-cyanovaleriansäure (aus Methanol-Lösung unterhalb Raumtemperatur rekristallisiert) im molaren Verhältnis $[\text{M}]/[\text{I}] = [100]/[0.4]$ verwendet. Der Initiator (2.5 mg, $8.9 \cdot 10^{-3}$ mmol) wird in Wasser (8 mL) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Natriumhydrogencarbonat ist der Initiator vollständig gelöst und die wässrige Initiatorlösung wird zum Monomer gegeben. Nach 3-4 „Freeze-Pump“-Zyklen zum Entfernen des Sauerstoffs wird der Spitzkolben mit einem Glasstopfen verschlossen und in ein auf 65 °C vorgeheiztes Ölbad gegeben. Es wird 9 Tage bei 65 °C polymerisiert. Nach beendeter Polymerisation wird eine Dialyse zur Isolation des Polymers durchgeführt. Dafür wird Wasser (15 mL) zur Polymerlösung hinzu gegeben um die Viskosität zu verringern. Es wird ein Amicon Ultrazentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von 3,000 g·mol⁻¹ verwendet und 15-20 Mal bei 4000 rpm und 15 °C zentrifugiert. Das Produkt wird als wässrige Lösung isoliert und anschließend gefriergetrocknet.

6.2 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

Ausbeute: 0.253 mg (51% d. Th.)

Eigenschaften: farbloser, flockiger Feststoff

6.2.4 Alexa Fluor 488 Markierung von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)

Die Synthese wurde von [REDACTED] durchgeführt.

Zu einer Lösung von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-lysine) (31 mg, $4.3 \cdot 10^{-8}$ mol) in 1x PBS (3.1 mL) wird eine Lösung von Alexa Fluor 488 TFP Ester (1.4 mg) (1:7.4) in DMSO (0.2 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 20 °C über Nacht inkubiert und anschließend mit Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices 3 kDa bei 4000 rpm, 15 °C und 20 min aufgereinigt, bis das Filtrat farblos ist.

Durch FCS-Messungen wird die Anzahl von Farbstoffmoleküle pro Polymerkette auf 10 bestimmt. Fluoreszenzspektroskopie-Messungen ergeben, dass der Quantenausbeuteverlust des konjugierten im Vergleich zum freien Farbstoff als vernachlässigbar erachtet werden kann.

6.3 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COO⁻)

6.3.1 Boc-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin

Die Reaktion wird analog der Methode von Sutherland und Willis[4] und wie bereits beschrieben durchgeführt [2].

ε-N-Methacryloyl-L-Lysin (5 g, 0.023 mol) wird in 2 M Natriumhydroxidlösung (23.36 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es erfolgt eine langsame Zugabe von Di-tert.-butyldicarbonat (6.12 g, 0.028 mmol). Anschließend wird eine halbe Stunde bei 0 °C und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man bringt die Reaktionslösung mit 30-40 prozentiger Salzsäure auf pH = 2 und extrahiert das Produkt mit Ethylacetat. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird aus Methanol und Ethylacetat umkristallisiert und man erhält farblose Kristalle.

Ausbeute: 5.04 g (0.016 mol, 70% d. Th.)

Eigenschaften: farblose Kristalle

DC(SiO₂x60): Chloroform/Methanol/Eisessig: R_f = 0.33

¹H-NMR (d⁴-MeOH, TMS, δ in ppm): δ 5.71-5.72 (m, 1 H), 5.38-5.4 (m, 1 H), 4.07-4.11 (m, 1 H), 3.26-3.3 (t, 2H), 1.97-1.98 (m, 1H)

ESI-TOF-MS: MW(Boc-ε-Methacryloyl-L-Lysin + Na⁺) = 337.19 g·mol⁻¹

6.3.2 Boc-Gly-Gly-Gly-OEt

Es wird nach der Methode von Guantieri et al.[5] verfahren.

In einem 1 L Mehrhalskolben wird eine Mischung aus N-Methyl-Morpholin (NMM) (16.16 mL, 0.147 mol) und Boc-Gly-OH (25.75 g, 0.147 mol) in Chloroform (588 mL) hergestellt. Die Mischung wird mit Hilfe eines Thermostaten auf -15 °C gekühlt. Wenn

6.3 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COO-)

diese Temperatur erreicht ist, wird Chlorameisensäureisobutylester (19.1 mL, 0.147 mol) zugegeben und 1 min bei -15 °C gerührt. Anschließend werden Cl-H₃N⁺-Gly-Gly-OEt (28.9 g, 0.147 mol) sowie NMM (16.16 mL, 0.147 mol) zugespritzt. Es entsteht eine gelb gefärbte Lösung, welche 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wird. Die Aufarbeitung erfolgt durch jeweils zweimaliges Waschen mit 5 prozentiger Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 5 prozentiger Zitronensäure und Wasser. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und es entsteht ein gelbes, zähflüssiges Öl. Das Produkt wird aus Petrolether auskristallisiert.

Ausbeute: 29 g (0.09 mol, 61% d. Th.)

Eigenschaften: farblose Kristalle

DC(SiO₂x60): Butanol/Eisessig/Wasser (3:3:1), R_f = 0.82

¹H-NMR (d⁴-MeOH, TMS, δ in ppm): δ 4.18-4.25 (q, 2H), 3.97-3.99 (d, 4H), 3.78 (s, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.28-1.33 (t, 3H)

ESI-TOF-MS: MW(Boc-Gly-Gly-Gly-OEt + Na⁺) = 340.15 g·mol⁻¹

6.3.3 HCOO·H₃N⁺-Gly-Gly-Gly-OEt

Es wird nach der Methode von Guantieri et al.[5] verfahren.

Boc-Gly-Gly-OEt (25 g, 78.86 mmol) wird in 98 prozentiger Ameisensäure (369 mL) gelöst. Es wird 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Ameisensäure wird im Vakuum entfernt, bis ein öliges Produkt im Kolben verbleibt. Das Produkt wird aus Acetonitril auskristallisiert.

Ausbeute: 13.08 g (49.73 mmol, 63% d. Th.)

Eigenschaften: farblose Kristalle

DC(SiO₂x60): Butanol/Eisessig/Wasser (3:3:1), R_f = 0.35

¹H-NMR (d⁴-MeOH, TMS, δ in ppm): δ 8.55 (s, 1H), 4.19-4.26 (q, 2H), 3.77-4.04 (d, 4H), 3.55 (s, 2H), 1.28-1.33 (t, 3H)

ESI-TOF-MS: MW(H₃N⁺-Gly-Gly-Gly-OEt + Na⁺) = 457.27 g·mol⁻¹

6.3.4 Boc-Val-Pro-OMe

Die Reaktion wird nach der Methode von Guantieri et al.[5] durchgeführt.

Boc-Val-OH (32.79 g, 0.15 mol) und N-Methyl-Morpholin (16.6 mL, (0.15 mol) werden in Chloroform (604 mL) gelöst. Bei einer Temperatur von -15 °C wird Chlorameisensäureisobutylester (19.58 ml, 0.15 mol) zugegeben und die Temperatur für 1 Minute gehalten. Dann werden Pro-OMe*HCl (25 g, 0.15 mol) und N-Methyl-Morpholin (16.6 mL, 0.15 mol) zugefügt. Da das Pro-OMe*HCl sehr hygroskopisch ist muss eine schnelle Zugabe erfolgen. Die rot gefärbte Reaktionsmischung wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt durch jeweils zweimaliges Waschen mit 5 prozentiger Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 5 prozentiger Zitronensäure und Wasser. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 40 g (0.12 mol, 80% d. Th.)

Eigenschaften: orange gefärbtes, zähflüssiges Öl

DC(SiO₂x60): Butanol/Eisessig/Wasser (3:3:1), R_f = 0.82

ESI-TOF-MS: MW(Boc-Val-Pro-OMe + Na⁺) = 351.19 g·mol⁻¹

6.3.5 Boc-Val-Pro-OH

Es wird analog der Vorschrift von Urry und Ohnishi vorgegangen [6].

Boc-Val-Pro-OMe (39.3 g, 0.12 mol) wird in Methanol (188 mL) gelöst. Es wird 1 N Natriumhydroxidlösung (151 mL) zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Wasser (94 mL) wird hinzugefügt und das Methanol wird im Vakuum bei einer Temperatur zwischen 15-25 °C entfernt. Anschließend wird mit Ether gewaschen und die wässrige Phase wird unter Kühlung mit 2 N Salzsäure angesäuert. Das ölige Produkt wird mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und es entsteht ein farbloser, amorpher Feststoff welcher aus Ethylacetat und Petrolether umkristallisiert wird.

6.3 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COO⁻)

Ausbeute: 20 g (0.06 mol, 53% d. Th.)

Eigenschaften: farblose, feine Kristalle

DC(SiO₂x60): Butanol/Eisessig/Wasser (3:3:1), R_f = 0.79

¹H-NMR (CDCl₃, TMS, δ in ppm): 9.38-9.46 (s, 1H), 5.30-5.33 (d, 1H), 4.53-4.57 (m, 1H), 4.22-4.28 (m, 1H), 3.6-3.8 (m, 2H), 1.97-2.17 (m, 5H), 1.4 (s, 9H), 0.89-0.98 (m, 6H)

ESI-TOF-MS: MW(Boc-Val-Pro-OH + Na⁺) = 337.19 g·mol⁻¹

6.3.6 Boc-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt

Es wird nach der Methode von Guantieri et al.[5] verfahren.

Boc-Val-Pro-OH (10 g, 0.029 mol) wird in Chloroform (117 mL) gelöst, anschließend wird N-Methyl-Morpholin (3.21 mL, 0.029 mol) zugegeben. Chlorameisensäureisobutylester (3.79 mL, 0.029 mol) wird bei -15 °C zugegeben. Nach 1 Minute werden bei derselben Temperatur HCOO·H₃N⁺-Gly-Gly-Gly-OEt (8.15 g, 0.029 mol) und N-Methyl-Morpholin (3.21 mL, 0.029 mol) zugegeben. Nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird durch jeweils zweimaliges Waschen mit 5 prozentiger Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 5 prozentiger Zitronensäure und Wasser aufgearbeitet. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 9.9 g (0.019 mol, 67% d. Th.)

Eigenschaften: farbloser, amorpher Feststoff

ESI-TOF-MS: MW(Boc-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt + Na⁺) = 536.25 g·mol⁻¹

6.3.7 HCOO·H₃N⁺-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt

Es wird analog Guantieri et al.[5] verfahren.

Boc-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt (2.67 g, 5.2 mmol) wird in 98 prozentiger Ameisensäure (24 mL) gelöst. Es wird 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Ameisensäure wird im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 2.3 g (3.24 mmol, 62% d. Th.)

Eigenschaften: farbloser, amorpher Feststoff

ESI-TOF-MS: $MW(H_3N^+-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt+Na^+) = 827.44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

6.3.8 Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COOEt

Es wird nach der Methode von Guantieri et al.[5] verfahren.

Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin (1.3 g, 4 mmol) wird in Chloroform (10 mL) nach Zugabe von N-Methyl-Morpholin (0.45 mL, 4 mmol) gelöst. Chlorameisensäureisobutylester (0.53 mL, 4 mmol) wird bei -15 °C zugegeben. Nach 1 Minute wird bei derselben Temperatur HCOO- H_3N^+ -Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt (1.9 g, 4 mmol) in Chloroform (6.5 mL) gelöst und N-Methyl-Morpholin (0.45 mL, 4 mmol) zugegeben. Es entsteht eine klare Lösung, die sich beim Erwärmen auf Raumtemperatur gelb färbt. Nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird durch jeweils zweimaliges Waschen mit 5 prozentiger Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 5 prozentiger Zitronensäure und Wasser aufgearbeitet. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum.

Ausbeute: 1.6 g (2.26 mmol, 57% d. Th.)

Eigenschaften: farbloser, amorpher Feststoff

ESI-TOF-MS:

$MW(\text{Boc-}\epsilon\text{-N-Methacryloyl-L-Lysin-Val-Pro-Gly-Gly-Gly-OEt+Na}^+) = 732.40\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

6.3.9 Poly-(Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COOEt)

In einen sauberen 10 mL Spitzkolben wird das Monomer Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COOEt (650 mg, 0.917 mmol) überführt. Der Feststoff wird entgast und der Kolben anschließend mit Argon geflutet. Der Initiator 4,4-Azobis-4-cyanovaleriansäure (aus Methanol unterhalb Raumtemperatur rekristallisiert) wird im

6.3 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-COO⁻)

Verhältnis [M]/[I] = [100]/[0.5] eingesetzt. Dafür wird der Initiator (1.28 mg, 4.58·10⁻³ mmol) in Wasser (3.25 mL) unter Zugabe von einer Spatelspitze Natriumhydrogencarbonat gelöst und anschließend zum Monomer in den Spitzkolben gespritzt. Nach 3 „Freeze-Pump“-Zyklen wird der Kolben mit einem Glasstopfen verschlossen und in ein auf 70 °C vorgeheiztes Ölbad gegeben. Es wird 24 Stunden bei 70 °C polymerisiert. Dabei bilden sich zwei Phasen, die untere ist gelblich gefärbt und klar, die obere trüb. Nach beendeter Polymerisation wird zum Entfernen des Wassers gefriergetrocknet. Das getrocknete Produkt wird in ca. 20 mL Hexafluorisopropanol gelöst und durch einen PALL Glass Aerodisc (25mm, 1 µm) Filter filtriert. Zum Fraktionieren wird anschließend eine Wasser/Hexafluorisopropanol-Mischung = 9/1 zugetropft, bis sich eine Trübung erkennen lässt. Im Kühlschrank kommt es zur Sol-Gel-Phasentrennung. Die Solphase wird abgehoben, die Gelphase gefriergetrocknet. Es wird die 1. Fraktion erhalten.

Für Polymerisationslösung 2:

Zur Solphase wird erneut eine Wasser/Hexafluorisopropanol-Mischung = 9/1 zugetropft, bis sich eine Trübung erkennen lässt. Es kommt wieder zur Sol-Gel-Phasentrennung und die Gelphase wird gefriergetrocknet und Fraktion 2 erhalten.

Zur wiederholten Fraktionierung von Fraktion 1 wird diese in 4 mL Hexafluorisopropanol gelöst und eine Wasser/Hexafluorisopropanol-Mischung = 9/1 zugetropft, bis sich eine Trübung erkennen lässt. Zur Phasentrennung wird der Kolben in den Kühlschrank gestellt und anschließend die Solphase abgehoben. Fraktion 3 wird durch Gefrier Trocknung der Gelphase gewonnen.

Ausbeute (Fraktion 1): 0.214 g (33% d. Th.)

Eigenschaften: pulveriger, farbloser Feststoff

6.3.10 Poly-(H₃N⁺-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-COO⁻)

In einem sauberen 25 mL Rundkolben wird zu Poly-(Boc-ε-N-Methacryloyl-L-Lysin-Valin-Prolin-Glycin-Glycin-Glycin-OEt) (0.250 mg) Trifluoressigsäure (5 mL) zugegeben. Nach der vollständigen Lösung des Polymers wird 2 Stunden bei Raumtemperatur

gerührt. Überschüssige Trifluoressigsäure wird unter Vakuum entfernt. Es wird unter Kühlung 0.1 N Natriumhydroxidlösung (5 mL) zugegeben und mit 1 N Natriumhydroxidlösung auf pH = 13 eingestellt. Es wird 1 Stunde bei 40 °C gerührt. Der pH-Wert wird danach mit 1 N HCl auf pH = 6-7 eingestellt. Zur Entfernung des überschüssigen Salzes wird eine Dialyse mit einer Float-A-Lyzer CE (MWCO 5000) Dialysemembran gegen Wasser durchgeführt. Das Produkt wird durch Gefriertrocknung der wässrigen Lösung isoliert.

Ausbeute: 81.7 mg (33 % d. Th.)

Eigenschaften: pulvriger, farbloser Feststoff

6.4 ELP-Synthese und Aufreinigung

Die Synthese und Aufreinigung wird nach der Vorschrift von J. R. McDaniel et al.[7] durchgeführt. Die DNA- und Peptidsequenzen für die unterschiedlichen ELPs sind im Anhang zu finden.

6.4.1 Modifizierung des Vektors pET-24(+) für die PRE-RDL

Es wird ein modifizierter pET-24(+) Vektor hergestellt, welcher zwei neue Endonuklease Restriktionsstellen für BseRI und Acul sowie eine kurze Leadersequenz (Met) und Trailersequenz (Lysin-Stop-Stop) beinhaltet.

Dafür wird 1.5 µg des pET-24a(+) Vektor mit 20 U XbaI und 20 U BamHI in NEB Puffer 3 versetzt. Die Reaktion wird 4 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Die 5'-Enden werden 1 Stunde bei 37 °C durch Zusatz von 1 U CIP dephosphoryliert. Anschließend wird der Vector mit Hilfe des Qiagen „PCR Purification Kit“ aufgereinigt. Der linearisierte Vektor wird mit 30 µL Milli-Q-Wasser eluiert. Zwei 66 nt Oligonukleotide (forward and reverse) werden designt:

5'-ctagaataattttgtttaactttaagaagGAGGAGtacatatgggcaaatgataatgatCTTCAG-3' und

5'-gatcCTGAAGatcattatcatttgcctatgtaCTCCTCcttcttaaagttaagtaaacaaaattattt-3'.

Diese DNA-Sequenz beinhaltet die zwei neuen Restriktionsstellen für BseRI und Acul

6.4 ELP-Synthese und Aufreinigung

(Großbuchstaben) und die kurze Leadersequenz (Met) sowie die Trailersequenz (Lysin-Stop-Stop). Die BseRI Restriktionsstelle wird in die Shine-Dalgarno ribosomale Bindungsstelle neben dem Startcodon (unterstrichen) eingebaut. Die zwei Oligonukleotide werden durch zwei-minütiges Erhitzen auf 95 °C und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur von je 50 µL einer 2 µmolaren Oligonukleotid-Lösung in T4 DNA Ligase Puffer hybridisiert. Man erhält eine Doppelstrang (ds) DNA mit XbaI und BamHI kompatiblen „sticky ends“. Die Ligation des modifizierten „Cloning Inserts“ in die „multiple cloning site“ des pET-24a(+) wird durch Inkubation von 20 pmol der hybridisierten dsDNA mit 0.1 pmol des linearisierten Vektors unter Verwendung von 400 U T4 DNA Ligase Puffer bei 20 °C nach 1 Stunde erreicht. Das Produkt wird bei 37 °C (1 Stunde) in chemisch kompetente EB5α-Zellen, welchen Luria Broth zugesetzt wird eingebracht. Die Zellen werden auf einer TBdry Platte, auf welcher zuvor 45 µg·mL⁻¹ Kanamycin aufgebracht werden ausplattiert. Die Sequenz wird durch DNA Sequenzierung bestätigt.

6.4.2 Monomer Gensynthese

Ein synthetisches Gen, welches für die (GVGVP)₅ Peptidsequenz für ELP₄ codiert wird als zwei 75nt Einzelstrang-Oligonukleotide (sense und antisense Stränge) hergestellt. Die zwei Oligonukleotide werden durch zwei-minütiges Erhitzen auf 95 °C und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur von je 50 µL einer 2 µmolaren Oligonukleotid-Lösung in T4 DNA Ligase Puffer hybridisiert. Man erhält eine Doppelstrang (ds) DNA mit nichtpalindromischen, 2 bp, 3'-Überhängen.

6.4.3 Concatemerisierung

1.5 µg des pET-24a(+) Vektor werden mit 2 U BseRI in NEB Puffer 4 versetzt. Die Reaktion wird 16 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Die 5'-Enden werden 1 Stunde bei 37 °C durch Zusatz von 1 U CIP dephosphoryliert. Anschließend wird der Vektor mit Hilfe des Qiagen „PCR Purification Kit“ aufgereinigt. Der linearisierte Vektor wird mit 30 µL Milli-Q-Wasser eluiert. Die Ligation der Concatemere wird durch Inkubation von 20

pmol der hybridisierten dsDNA mit 0.1 pmol des linearisierten Vektors unter Verwendung von 400 U T4 DNA Ligase Puffer bei 20 °C nach 1 Stunde erreicht. Das Produkt wird bei 37 °C (1 Stunde) in chemisch kompetente EB5 α -Zellen, welchen Luria Broth zugesetzt wurde eingebracht. Die Zellen werden auf einer TBdry Platte, auf welcher zuvor 45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kanamycin aufgebracht wird ausplattiert. Eine Colony PCR zeigt, dass ELP₄-(GVGVP)_n mit n = 5, 10, 15 erhalten wird. Die Plasmid DNA einer Auswahl von Colonien wird mit Hilfe des Qiagen „PCR Purification Kit“ aufgereinigt und die Sequenzen werden mit Hilfe der DNA-Sequenzierung bestätigt.

6.4.4 ELP-Vektor Konstrukte

Die „Recursive directional ligation by plasmid reconstruction“ (PRe-RDL) Methode[7] wird angewandt um verschiedene ELP4-Wiederholungseinheiten in die unterschiedlichen Vektoren einzubringen (JMD5-7). Ein Ablauf der PRe-RDL beinhaltet mehrere Schritte. (1) Die Aufreinigung des ELP-enthaltenden DNA-Fragments des ursprünglichen Vektors, welcher mit AcuI und BglII verdaut wird. Dies entspricht dem „A“-Fragment. Dafür werden 4 μg ELP4-20 mit 10 U AcuI und 40 U BglII für 3 Stunden bei 37 °C in NEB Puffer 2 versetzt. (2) Für das „B“-Fragment werden 4 μg der entsprechenden Vektor-DNA mit 8U BseRI und BglII für 3 Stunden bei 37 °C in NEB Puffer 2 versetzt und anschließend aufgereinigt. Die beiden verdauten DNA-Fragmente werden auf ein low melting point Agarose Gel aufgetragen. Für die „A“-Verdauung erhält man 3 Banden: ein 1586 bp-, ein 1821 bp-, und ein 1891bp + ELP- Fragment. Das letztgenannte Fragment wird aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiagen „Gel Purification Kits“ aufgereinigt. Anschließend wird es mit 30 μL Milli-Q-Wasser eluiert. Bei der „B“-Verdauung werden 2 Banden erhalten: ein 1891 bp sowie ein 3407 bp + ELP-Fragment, welches ausgeschnitten, aufgereinigt und mit 30 μL Milli-Q-Wasser eluiert wird. (3) Äquimolare Mengen des „A“- und „B“-Fragments mit einer Gesamt-DNA-Konzentration von 5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in 20 μL werden durch einstündige Inkubation mit T4 DNA Ligase bei 20 °C miteinander verknüpft. Das Produkt wird bei 37 °C (1 Stunde) in chemisch kompetente EB5 α -Zellen, welchen Luria Broth zugesetzt wird, eingebracht. Die Zellen werden auf einer TBdry Platte, auf welcher zuvor 45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kanamycin aufgebracht wurde ausplattiert. Sequenzen werden mit Hilfe der DNA-Sequenzierung bestätigt.

6.4.5 ELP-Expression

Eine Gesamtmenge von 100 ng Plasmid DNA wird in chemisch kompetente *E. coli* BL21 Zellen (Novagen; Carlsbad, CA) transformiert. In einem 250 mL Erlenmeyer Kolben werden 50 mL TBdry Medium (mit $45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kanamycin versetzt) mit diesen Zellen angeimpft. Die Bakterienkultur wird in einem Schüttler bei 200 rpm über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Starterkultur wird anschließend verwendet um 1 L TBdry Medium (mit $45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kanamycin versetzt) in einem 4 L Erlenmeyer Kolben anzuimpfen. Die Bakterienkultur wird in einem Schüttler bei 200 rpm über Nacht bei 37°C inkubiert. Dieses „Hyperexpression“ Expressionsprotokoll begründet sich durch die Durchlässigkeit des T7 Promoters für die Expression des ELPs [8].

6.4.6 ELP-Aufreinigung

Nach 24-stündiger Inkubationszeit werden die Zellen für 10 min bei 3000g in 1 L Behältern zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 mL PBS resuspendiert und die Zellen werden anschließend durch Ultraschallbehandlung auf Eis lysiert (3 min: 10s on/40s off; Sonicator 3000, Misonix, Farmingdale, NY). Um Nukleinsäure Kontaminationen auszufällen wird 0.7 Prozent w/v Polyethylenamin (PEI) zum Zelllysats zugesetzt. Das ELP wird dann durch „inverse transition cycling“ (ITC) aufgereinigt. Dafür wird das Zelllysats in 30 mL Zentrifugenröhrchen bei 4°C und 1100 g für 10 min zentrifugiert, sodass sich die unlösliche Fraktion des Zelllysats am Boden des Röhrchens absetzt. Das lösliche ELP befindet sich im Überstand, welcher in ein neues 30 mL Zentrifugenröhrchen überführt wird und auf $60\text{-}65^\circ\text{C}$ erhitzt wird um sowohl ELP als auch Kontaminationen auszufällen. Anschließend wird das ELP durch Kühlen und Vortexen der Probe wieder in Lösung gebracht. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 4°C und 1100 g wird der Überstand mit dem löslichen ELP in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Erwärmen auf 37°C und Zusatz von bis zu 3 M Natriumchlorid kommt es zur Aggregation des ELPs, sodass man eine trübe Lösung erhält. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 37°C und 1100 g erhält man ein Pellet aus aggregiertem, unlöslichen ELP. Der Überstand wird abdekantiert und das Pellet in 10 mL kaltem, PBS-Puffer resuspendiert. Diese Prozedur wird noch einmal wiederholt um ein sauberes Produkt zu erhalten. Die Reinheit wird durch SDS-PAGE verifiziert.

Ausbeute: 1.3 g aus 7 L Bakterienkultur

HPLC: siehe Abbildung 4 - 23

MALDI: MW(E4-20 in JMD5 + Na⁺) = 8283 g·mol⁻¹ (Abbildung A - 15 a)

MALDI: MW(E4-20 in JMD6 + Na⁺) = 8407 g·mol⁻¹ (Abbildung A - 15 b)

6.5 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(MA-ELP)

6.5.1 N-Hydroxysuccinimidester der Methacrylsäure

Die Reaktion wird analog Batz et al.[9] durchgeführt.

Triethylamin und Methacrylsäure werden unter Argonatmosphäre destillativ aufgereinigt. In einem 2 L 4-Halskolben, der mit einem Thermometer, einem KPG-Rührer und zwei Tropftrichtern versehen ist, wird N-Hydroxysuccinimid (83.37 g, 0.72 mol) in Dichlormethan (290 mL) unter Kühlung (maximal 4 °C) gelöst. Triethylamin (73.25 g, 0.72 mol) und Methacrylsäure (77.29 g, 0.74 mol) werden in Dichlormethan (je 218 mL) gelöst. Die beiden Lösungen werden gleichzeitig unter Kühlung zu der N-Hydroxysuccinimid-Lösung zugetropft. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wird die Lösung für 24 Stunden im Kühlschrank gelagert. Das ausgefallene Triethylamin·HCl wird abfiltriert und die organische Phase wird mit Eiswasser (200 mL), kalter, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) und Eiswasser (400 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt wird nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum erhalten und aus Dichlormethan umkristallisiert.

Ausbeute: 100 g (0.55 mol, 76% d. Th.)

Eigenschaften: farblose, nadelförmige Kristalle

¹H-NMR (CDCl₃, TMS, δ in ppm): 2.00 (s, 3H), 2.89 (m, 4H), 5.92 (q, 1H), 6.21 (q, 1H)

6.5.2 MA-ELP

Das verwendete ELP E4-20 JMD5, bestehend aus 20 GVGVP-Wiederholungseinheiten hat ein Molekulargewicht von $8264 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und besitzt weder Leader- noch Tailingsequenz.

Die Reaktion wird vollständig unter Schutzgas in einem ausgeheizten, sauberen und mit einem Rührfisch bestückten Schlenkkolben durchgeführt. Das Triethylamin wird durch Destillation aufgereinigt. Das E4-20 JMD5 (1.8 g, 0.219 mmol) wird in den Schlenkkolben überführt. Der Kolben wird erneut entgast und mit Argon geflutet. Anschließend wird wasserfreies DMF (25.2 mL) zugespritzt und das E4-20 JMD5 darin gelöst. Der N-Hydroxysuccinimidester der Methacrylsäure (3.97 g, 21.93 mmol) wird in einem separatem Gefäß in DMF (9 mL) gelöst und zu der farblosen E4-20 JMD5 DMF-Lösung zugespritzt. Anschließend wird das in DMF (1.8 mL) gelöste Triethylamin (2.73 mL, 19.5 mmol) zugespritzt und die farblose Lösung für 24 Stunden unter Schutzgas und Lichtausschluss gerührt. Dabei ergibt sich eine orange-rote Färbung. Das DMF wird durch Kälteedestillation entfernt und ein orangener, amorpher Feststoff wird erhalten. Dieser wird in Methanol/Wasser (20 mL) im Verhältnis 3/1 gelöst und für 2 Tage gegen Methanol/Wasser im Verhältnis 3/1 und für 1 Tag gegen Methanol/Wasser im Verhältnis 2/1 dialysiert. Es wird eine Spectra/Por Dialysemembran mit Ausschlussgrenze $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ verwendet. Die Produktlösung ist auch nach Dialyse noch gelblich gefärbt und trüb. Nach Zentrifugation (40 min, 4000 rpm, 4°C) wird eine klare, gelbe Lösung erhalten, welche anschließend gefriergetrocknet wird.

Ausbeute: 1.38 g (0.166 mmol, 76% d. Th.)

Eigenschaften: leicht gelblicher amorpher Feststoff

HPLC: siehe Abbildung 4 - 26 a

MALDI: $\text{MW}(\text{MA-ELP} + \text{Na}^+) = 8355 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (siehe Abbildung A - 17)

6.5.3 Poly-(MA-ELP)

Das Makromonomer MA-ELP (1.33 g, 0.16 mmol) wird in einen sauberen 25 mL Spitzkolben überführt und 3-mal entgast. Anschließend wird mit Argon geflutet. Es

wird Wasser (3.9 mL) zum Monomer in den Kolben gegeben. Um eine vollständige und homogene Lösung des Monomers in Wasser zu gewährleisten wird der Spitzkolben für 2 Stunden auf den Schüttler gestellt. Für die Initiator-Stammlösung wird 4,4-Azobis-4-cyanovaleriansäure (aus Methanol unterhalb Raumtemperatur rekristallisiert) (22 mg) in Wasser (10 mL) unter Zugabe einer Spatelspitze Natriumhydrogencarbonat vollständig gelöst. Die Initiatorlösung wird durch 3 „Freeze-Pump“-Zyklen von Sauerstoff befreit und anschließend werden 100 µL (0.22 mg, $8 \cdot 10^{-4}$ mmol) zu der wässrigen Monomerlösung gegeben, sodass ein $[M]/[I] = [100]/[0.5]$ Verhältnis gegeben ist. Der Spitzkolben wird mit einem Glasstopfen verschlossen und zur Homogenisierung unter Lichtausschluss für 2 Stunden auf den Schüttler gestellt. Es ergibt sich eine homogene, leicht viskose und gelb gefärbte Lösung. Es wird bei 70 °C für 19 Stunden polymerisiert. Ein Zwei-Phasen-System mit einer öligen, gelben (unten) und einer trüben, flüssigen (oben) Phase bildet sich aus. Die untere Phase wird während der Polymerisation fest. Der Polymerisationsansatz wird gefriergetrocknet. Zur Abtrennung des überschüssigen Monomers wird Wasser (30 mL) zur vollständigen Lösung des Polymers zugegeben um eine verdünnte Lösung für die anschließende Dialyse herzustellen. Es wird ein Amicon Ultrazentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von $10,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ verwendet. Es wird 15-20 mal bei 4000 rpm und 15 °C zentrifugiert. Das Produkt wird als wässrige Lösung isoliert und anschließend gefriergetrocknet. Es ergibt sich eine Ausbeute von 1.21 g (91% d. Th.). Das Polymer wird in Wasser (30 mL) gelöst und mittels eines Amicon Ultrazentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von $30,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ fraktioniert. Nach Zentrifugation (15-20 mal bei 4000 rpm und 15 °C) wird die wässrige Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 0.96 g (72% Ausbeute)

Eigenschaften: farbloser, flockiger Feststoff

6.6 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃)

6.6.1 MA-ELP-PEG₆-N₃

Unter Argonatmosphäre wird MA-ELP (0.11 g, 14 μ mol) in DMF (1 mL) gelöst. In einer Portion wird N,N'-Carbonyldiimidazol (0.12 g, 0.7 mmol) zugegeben und für 3 Stunden unter Schutzgas gerührt. Das Produkt wird aus Acetonitril (10 mL) gefällt und durch Zentrifugieren abgetrennt. Es wird mit Acetonitril gewaschen und über Nacht getrocknet. Das MA-ELP-CDI (0.12 g, 14 μ mol) wird unter Schutzgasatmosphäre in DMF (1 mL) gelöst, dann wird H₂N-PEG₆-N₃ (0.25 g, 0.7 mmol) in DMF (0.5 mL) gelöst zugespritzt. Es wird über Nacht gerührt, das DMF durch Kälteedestillation entfernt und der Feststoff in Wasser gelöst. Es wird mit Amicon Ultrazentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von 3,000 g·mol⁻¹ aufgereinigt und das Produkt nach Gefriertrocknung erhalten.

Ausbeute: 0.113 g (93% Ausbeute)

Eigenschaften: farbloser, flockiger Feststoff

HPLC: siehe Abbildung 4 - 32

MALDI: MW(MA-ELP-PEG-N₃) = 8658 g·mol⁻¹ (siehe Abbildung A - 19)

6.6.2 Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃)

Das Makromonomer MA-ELP-PEG₆-N₃ (564 mg, 6.5·10⁻⁵ mol) wird in einen sauberen 10 mL Spitzkolben überführt und 3-mal entgast. Anschließend wird mit Argon geflutet. Für die Initiator-Stammlösung wird V50 (81 mg) in Wasser (10 mL) vollständig gelöst. Aus dieser Stammlösung werden 130 μ L mit 10.07 mL Wasser gemischt und die Initiatorlösung wird durch 3 „Freeze-Pump“-Zyklen von Sauerstoff befreit. Anschließend werden 1.7 mL (1.76·10⁻⁴ g, 6.5·10⁻⁷ mmol) zum Monomer gegeben, sodass ein [M]/[I] = [100]/[1] Verhältnis gegeben ist. Der Spitzkolben wird mit einem Glasstopfen

verschlossen und zur Homogenisierung unter Lichtausschluss für 3 Stunden auf den Schüttler gestellt. Es ergibt sich eine homogene Lösung. Es wird bei 70 °C für 41 Stunden polymerisiert. Ein Zwei-Phasen-System mit einer öligen, gelben (unten) und einer trüben, flüssigen (oben) Phase bildet sich aus. Der Polymerisationsansatz wird gefriergetrocknet. Zur Abtrennung des überschüssigen Monomers wird Wasser (30 mL) zur vollständigen Lösung des Polymers zugegeben um eine verdünnte Lösung für die anschließende Dialyse herzustellen. Es wird ein Amicon Ultrazentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von 10,000 g·mol⁻¹ verwendet. Es wird 10 mal bei 4000 rpm und 15 °C zentrifugiert. Das Produkt wird als wässrige Lösung isoliert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 0.48 g (85% Ausbeute)

Eigenschaften: farbloser, flockiger Feststoff

6.7 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(N-Acetyl-ELP-C₃-MA)

6.7.1 N-Hydroxysuccinimidester des Acetylchlorids

Die Reaktion wird analog Heidlas et al.[10] durchgeführt.

Es wird eine Suspension aus N-Hydroxysuccinimid (8.34 g, 72.47 mmol) in trockenem Dichlormethan (200 mL) unter N₂-Atmosphäre hergestellt. Zur Suspension wird trockenes Triethylamin (10.6 mL, 76.4 mmol) zugegeben und die entstehende klare Lösung wird auf 0 °C gekühlt. Es wird langsam Acetylchlorid (5.4 mL, 76.4 mmol) zugegeben und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Ether (200 mL) wird das ausgefallene Triethylamin·HCl Salz abfiltriert und das Produkt durch Entfernen des Lösungsmittels erhalten. Das Produkt wird aus Ethylacetat und Chloroform (5/1) umkristallisiert.

Ausbeute: 10.1 g (89% Ausbeute)

Eigenschaften: farblose Kristalle

6.7 Syntheseschritte zur Darstellung von Poly-(N-Acetyl-ELP-C3-MA)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS, δ in ppm): 2.31 (s, 3H), 2.81 (2, 4H)

6.7.2 N-Acetyl-ELP

ELP E4-20 in JMD5 (0.6 g, 0.073 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre in DMF (8.7 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wird der NHS-Ester des Acetylchlorids (1.15 g, 7.3 mmol), gelöst in DMF (3.1 mL) zugespritzt und anschließend wird Triethylamin (0.9 mL, 6.6 mmol) in DMF (0.6 mL) zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 24 Stunden unter Schutzgas gerührt. Das DMF wird durch Kälteedestillation entfernt. Zum Produkt wird Methanol zugegeben, der unlösliche Anteil (N-Acetyl-ELP) wird durch Zentrifugation abgetrennt und in Wasser gelöst. Das Produkt wird mittels eines Amicon Ultrazentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von $3,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ aufgereinigt und nach Gefriertrocknung erhalten.

Ausbeute: 0.5 g (82% Ausbeute)

Eigenschaften: farbloser Feststoff

HPLC: siehe Abbildung 4 - 37

6.7.3 N-(2-Methacryloyl)-1,3-diaminopropan*HCl

Die Durchführung stellt eine Abwandlung der Vorschrift von Stahl et al.[11] dar.

N-*tert*-Butyloxycarbonyl-N'-(2-Methacrylyl)-1,3-diaminopropan (2.18 g, 9 mmol) wird in Methanol (3 mL) gelöst, dann wird unter Kühlung 3 M HCl-MeOH (11 mL) zugegeben und die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Boc-Schutzgruppenabspaltung wird mittels DC überprüft. Das Lösungsmittel wird in einer Kälteedestillation entfernt und das reine Produkt wird erhalten.

Ausbeute: 1.6 g (100% Ausbeute)

Eigenschaften: farbloser Feststoff

DC(SiO₂x60): Toluol/Ethylacetat (4:6), R_f = 0

¹H-NMR (d⁴-MeOH, TMS, δ in ppm): 1.74-1.79 (m, 2H), 1.83 (s, 3H), 2.81-2.86 (t, 2H), 3.23-3.27 (t, 2H), 5.3 (s, 1H), 5.64 (s, 1H)

6.7.4 N-Acetyl-ELP-C₃-MA

Die Durchführung stellt eine Abwandlung der Vorschrift von Axen et al.[12] dar.

N-Acetyl-ELP (0.5 g, 0.06 mmol) wird unter Schutzgas in DMF (4 mL) gelöst und es wird N,N'-Carbonyldiimidazol (0.5 g, 3.01 mmol) in einer Portion als Feststoff zugegeben. Es wird 2 Stunden unter Schutzgas gerührt, anschließend wird das Produkt aus Acetonitril (40 mL) gefällt. Der Feststoff wird abzentrifugiert, erneut mit Acetonitril gewaschen und über Nacht getrocknet. Das Produkt (0.5 g, 0.06 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre in DMF (4 mL) gelöst, dann wird N-(2-Methacrylyl)-1,3-diaminopropan*HCl (0.55 g, 3.01 mmol) in DMF (1 mL) zugespritzt und anschließend mit Triethylamin (0.14 mL, 1mmol) in DMF (0.5 mL) versetzt. Es entsteht ein Niederschlag, der sich auch nach Zugabe von DMF (5 mL) nicht auflöst. Es wird über Nacht gerührt, der Niederschlag wird durch Zentrifugation abgetrennt und das DMF wird durch Kälteedestillation entfernt. Das Produkt wird mittels eines Amicon Ultrazentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von 3,000 g·mol⁻¹ aufgereinigt und nach Gefriertrocknung erhalten.

Ausbeute: 0.42 g (82% Ausbeute)

Eigenschaften: farbloser Feststoff

HPLC: siehe Abbildung 4 - 37

MALDI: MW(N-Acetyl-ELP-C₃-MA + K⁺) = 8458 g·mol⁻¹

6.7.5 Poly-(N-Acetyl-ELP-C₃-MA)

Das Makromonomer N-Acetyl-ELP-C₃-MA, (polymerisierbares Makromonomer: 840 mg, 9.96·10⁻⁵ mol) wird in einen sauberen 10 mL Spitzkolben überführt und 3-mal entgast. Anschließend wird mit Argon geflutet. Für die Initiator-Stammlösung wird V50 (81 mg)

6.8 Darstellung von MA-ELP-Lys

in Wasser (10 mL) vollständig gelöst. Aus dieser Stammlösung werden 100 µL mit 9.86 mL Wasser gemischt und die Initiatorlösung wird durch 3 Freeze-Pump-Zyklen von Sauerstoff befreit. Anschließend werden 3.32 mL ($2.7 \cdot 10^{-4}$ g, $9.96 \cdot 10^{-7}$ mmol) zum Monomer gegeben, sodass ein $[M]/[I]=[100]/[1]$ Verhältnis gegeben ist. Der Spitzkolben wird mit einem Glasstopfen verschlossen und zur Homogenisierung unter Lichtausschluss für 3 h auf den Schüttler gestellt. Es ergibt sich eine homogene Lösung. Es wird bei 70 °C für 48 Stunden polymerisiert. Ein Zwei-Phasen-System mit einer öligen, gelben (unten) und einer trüben, flüssigen (oben) Phase bildet sich aus. Der Polymerisationsansatz wird gefriergetrocknet. Zur Abtrennung des überschüssigen Monomers wird Wasser zur vollständigen Lösung des Polymers zugegeben um eine verdünnte Lösung für die anschließende Dialyse herzustellen. Es wird ein Amicon Ultrazentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von $10,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ verwendet. Es wird 10 mal bei 4000 rpm und 15 °C zentrifugiert und die wässrige Lösung wird gefriergetrocknet. Das überschüssige Makromonomer wird nicht vollständig durch die Dialyse entfernt.

Ausbeute: 1000 mg

Eigenschaften: farbloser, flockiger Feststoff

6.8 Darstellung von MA-ELP-Lys

E4-20 in JMD6 (500 mg, $6 \cdot 10^{-5}$ mol) werden in 50 mM Phosphatpuffer mit pH = 6.5 (10 mL) gelöst. Zur Lösung wird NHS-Ester der Methacrylsäure (1.5-facher, oder 10-facher molarer Überschuss) zugegeben und für 4 oder 24 Stunden im Kühlschrank gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird abzentrifugiert, die Lösung wird unter Verwendung von 3 kDa Amicon Zentrifugenfilter gegen Wasser bei 15 °C dialysiert. Das Produkt wird nach Gefrier Trocknung der wässrigen Lösung erhalten.

Ausbeute: 0.46 g (90% Ausbeute)

Eigenschaften: farbloser Feststoff

HPLC: siehe Abbildung A - 23

MALDI:

$MW(\text{MA-ELP-Lys} + \text{Na}^+) = 8482 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$MW(\text{MA-ELP-Lys-MA} + \text{Na}^+) = 8549 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$MW(\text{MA-ELP-Lys-MA} + 2 \text{Na}^+) = 8571 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$MW(\text{MA-ELP-Lys-MA} + \text{Na}^+ + \text{K}^+) = 8588 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

6.9 Verwendete Geräte und Methoden

6.9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Für die Charakterisierung der Moleküle mittels HPLC werden verschiedene HPLC-Säulen mit unterschiedlichem Säulenmaterial verwendet. Die entsprechenden Säulen und die Laufbedingungen für die Moleküle sind im Folgenden aufgeführt:

Aminosäuren und Peptide

Zur Detektion der Aminosäuren und Peptide für die Hexapeptidsynthese kommen RP-Säulen der Firma Macherey-Nagel zum Einsatz:

- 1) Nucleosil® 100-5C18 PPN: RP18-Säule, Länge 125 mm, Durchmesser 4 mm, Partikelgröße 5 µm
- 2) Nucleogel® RP 100-5: Länge 250 mm, Durchmesser 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm. Das Säulenmaterial besteht aus mit Divinylbenzol quervernetztem Polystyrolharz.

Es werden verschiedene Laufmittelgemische aus Wasser und Acetonitril, jeweils mit 0.1 % Trifluoressigsäure versetzt, verwendet. Die Messungen werden bei einem Fluss von 1 ml·min⁻¹ durchgeführt.

ELPs

Zur Detektion der ELPs wird eine X-Bridge™ BEH300 C4 Säule mit einer Partikelgröße von 3.5 µm der Firma Waters verwendet. Länge und Durchmesser der Säule betragen 150 mm bzw. 4.6 mm. Als Laufmittel werden Wasser und Methanol, unter Zusatz von 0.1% Trifluoressigsäure, verwendet. Es wird in 40 min das Lösungsmittelverhältnis von 70 % auf 90 % Methanol verändert, bei einer Flussrate von 0.5 ml·min⁻¹.

Die Laufmittel werden mit einem EC3114 Degasser entgast und mit einer Pumpe der Firma Hitachi Modell L7100 befördert. Die Messungen werden bei einer Ofentemperatur von 22 °C durchgeführt. Pro Messung werden 20 µL eingespritzt. Die Detektion erfolgt mittels eines UV Waters 481 Detektor bei 220 nm (Aminosäuren und Peptide) bzw. 230 nm (ELPs).

6.9.2 Gelpermeationschromatografie

Die GPC-Messungen werden von [REDACTED] durchgeführt. Für das Poly-(ε-N-Methacryloyl-L-Lysin) werden die Messungen in wässriger 0.1 M Natriumnitratlösung bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹ durchgeführt. Die GPC-Apparatur setzt sich aus einer Hitachi L-2130 Pumpe, einem VWR 7614 Entgaser, einem Hitachi L2350 Säulenofen, einem RI-Detektor des Typs Hitachi L-2490 und Novema Säulen 30, 300, 3000 mit 10 µm Material der Firma PSS zusammen. Die Messungen werden bei 25 °C durchgeführt und es werden 20 µL einer Polymerlösung mit $c = 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, gelöst im Laufmittel eingespritzt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wird ein Pullulanstandard mit Molekulargewicht von 5,900 g·mol⁻¹ bis 788,000 g·mol⁻¹ verwendet.

Die GPC-Messungen für die geschützte Hexapeptid Polymerbürste werden in DMF mit LiCl ($c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹ durchgeführt. Die GPC Apparatur setzt sich aus einer MZ-SDplus-Säule mit 5 µm Material der Firma MZ-Analysentechnik (Porengröße 1000; 10⁴; 10⁵; 10⁶Å) und einem RI-Detektor des Typs Hitachi L-2490 zusammen.

6.9.3 Lichtstreuung

Alle statischen Lichtstremessungen werden an einer Anlage durchgeführt, die aus einem Helium-Neon-Laser (JDS Uniphase 1145p-3083, Wellenlänge 632.8 nm, Leistung 25 mW) und einer ALV/High QEAPD Avalanche-Photodioden Detektionseinheit besteht. Für die dynamischen Messungen werden zwei verschiedene Apparaturen

verwendet. Dies ist zum Einen eine Apparatur, bestehend aus einem ALV-SP125 Goniometer, einem ALV-5000 Korrelator sowie einem Spectra Physics Argon-Laser (Wellenlänge 514.5nm, Leistung 500mW). Die gestreute Intensität wird von einem Beam Splitter geteilt (ca. 50:50), beide Anteile werden von einem Photomultiplier detektiert. Die beiden Signale werden gekreuzkorreliert um elektrische Störsignale zu minimieren. Die zweite Apparatur besteht aus einem HeNe Laser (632.8 nm, 25 mW output power), einem ALV-CGS 8F SLS/ DLS 5022F Goniometer, der mit acht gleichzeitig funktionierenden ALV 7004 Korrelatoren ausgestattet ist und acht QEAPD Avalanche Photodioden Detektoren besitzt.

Die Lösungen werden im Winkelbereich von 30° bis 150° in 5° Schritten (SLS) und in 15° oder 20° bzw: 17° (ALV-CGS-8F) (DLS) Schritten vermessen.

Messungen in humanem Blutserum werden wie bereits beschrieben von [REDACTED] durchgeführt [13]. Die verwendeten Polymerkonzentrationen sind den Bildunterschriften zu entnehmen.

Die Komplexierungsreaktionen mit DNA und divalenten Metallionen werden von [REDACTED] durchgeführt. Die wässrige Lösung des Poly-(ϵ -Methacryloyl-L-Lysin) mit $c = 0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ wird durch einen Millex GS Filter (220 nm Porengröße) in staubfreie Suprasilküvetten filtriert. Eine bestimmte Menge an Metallionen-Lösung wird direkt in die Küvette filtriert (Millex GV, 100 nm Porengröße), sodass eine Endkonzentration des Polymers von $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ vorliegt und das $\text{Me}^{2+}/\text{COO}^-$ Verhältnis den im Text angegebenen Mengen entspricht. Anschließend wird eine Lösung von pUC19 Plasmid DNA (2682 bp, $c = 50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durch Millex GHP Filter (200 nm Porengröße) in die Küvette filtriert. Nach jeder Zugabe wird die Küvette mit einem staubfreien Deckel aus Teflon verschlossen und leicht geschüttelt. Das $\text{Me}^{2+}/\text{PO}_4^-$ Verhältnis wird durch Wiegen bestimmt.

Für die Messungen werden Küvetten aus Quarzglas der Firma Hellma, Müllheim, mit einem Durchmesser von 20 mm und einem Volumen von 14 ml verwendet. Vor dem Befüllen mit der Probenlösung werden die Küvetten mit destilliertem Aceton staubfrei gespült und danach in einer staubfreien Flow-Box mit der Öffnung nach unten getrocknet. In Tabelle 6 - 1 sind die für die verschiedenen Proben verwendeten Filter aufgeführt. Die Polymerkonzentration wird über das Gewicht ermittelt.

Das Brechungsindexinkrement wird bei einer Wellenlänge von $\lambda = 632.8$ nm mit Hilfe eines selbst gebauten Michelson Interferometer gemessen [14]. Der experimentelle Fehler für die Bestimmung von dn/dc wird auf ± 2 % geschätzt.

Tabelle 6 - 1: Filterspezifikationen für die unterschiedlichen Proben.

Probe	Filter	Porengröße / nm
Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)	GS	200
Poly-(Boc- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lys-VPGGG-OEt)	LCR	450
Poly-(H ₂ N- ϵ -N-Methacryloyl-L-Lys-VPGGG-OH)	HV	450
Poly-(MA-ELP)	HV	450
Poly-(MA-ELP-PEG-N ₃)	HV	450
ELP Makromonomere	Anotop	20

Tabelle 6 - 2: Gemessene dn/dc -Werte bei 20°C und $\lambda = 632.8$ nm für unterschiedliche Proben in verschiedenen Lösungsmitteln.

Probe	Lösungsmittel	Salz	dn/dc / g·dm ⁻³
Poly-(ϵ -Methacryloyl-L-Lysin)	Wasser	0.1M NaClO ₄	$1.904 \cdot 10^{-4}$
Poly-(ϵ -Methacryloyl-L-Lysin)	Wasser	5M NaClO ₄	$1.651 \cdot 10^{-4}$
Poly-(Boc- ϵ -Methacryloyl-L-Lys-VPGGG-OEt)	HFIP	-	$1.8 \cdot 10^{-4}$
Poly-(MA-ELP)	Wasser	-	$1.548 \cdot 10^{-4}$

Die Viskosität und der Brechungsindex für die wässrigen, unterschiedlich molaren Natriumperchloratlösungen werden bestimmt und die Ergebnisse sind in Tabelle 6 - 3 aufgeführt.

Tabelle 6 - 3: Gemessene Viskositäten η und Brechungsindex n für wässrige Natriumperchloratlösungen.

Probe	η / cP	n
0.1 M	1.005	1.3328
5 M	1.87	1.3592

6.9.4 NMR-Spektroskopie

^1H -NMR und ^{13}C -NMR Messungen werden an einem Bruker 300 Ultra Shield bei 293 K durchgeführt. Die Messzeit beträgt 7 Minuten für die ^1H -NMR Messungen und 3 Stunden für die ^{13}C -NMR Messungen. Als Lösungsmittel werden CDCl_3 , D_2O und CD_3OD verwendet.

6.9.5 IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren werden an einem Nicolet iS10 FT-IR Spektrometer der Firma Thermo Scientific mittels einer ATR-Einheit in einem Wellenzahlbereich von 4000 cm^{-1} bis 500 cm^{-1} gemessen. Die Auswertung erfolgt mit der Software „OMNIC“.

6.9.6 Trübungskurven

Die Küvetten werden mit 3 mL der Probenlösung befüllt und die Absorption wird bei $\lambda = 345\text{ nm}$ im 0.2 sec Intervall temperaturabhängig mit einem Carry 100Bio UV-VIS Spectrophotometer (Varian, Inc) bestimmt. Die Heizrate beträgt $1\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Die Übergangstemperatur T_i wird als Wendepunkt der Trübungskurve graphisch ermittelt.

6.9.7 UV-VIS-Messungen

Mit einem Carry 100Bio UV-VIS Spectrophotometer (Varian, Inc) werden UV-Spektren im Wellenlängenbereich $\lambda = 200\text{-}700\text{ nm}$ aufgenommen. Die aus den verschiedenen Kammern der „Micro-Rotaphor™ Preparative IEF-Cell“ erhaltenen Proben werden unverdünnt gemessen.

6.9.8 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Experimente werden von [REDACTED] an einem kommerziell erhältlichen Gerät durchgeführt, welches ein inverses IX 70 Mikroskop, einen FluoView 300 konfokalen Laser (beides von Olympus) und eine FCS Einheit (PicoQuant), bestehend aus einer single-photon Avalanche Diode (τ -SPAD) und einer Zeit-korrelierten single-photon counting card TimeHarp 200, beinhaltet. Es wird über einen Argon Laser bei $\lambda = 488 \text{ nm}$ (8 mW, CVI Melles Griot) angeregt und das Fluoreszenzsignal wird nach dem Filtern mit einem LP488R Raman Edge long-pass Filter detektiert. Ein UPLSAPO 60XW Objektiv von Olympus wird verwendet.

6.9.9 Zirkulardichroismus

Die Messungen werden an dem Modell J-815 der Firma Jasco, versehen mit einem Halbleiterdetektor durchgeführt. Die Spektren werden im Wellenlängenbereich von 260-190 nm aufgenommen. Es wird im continuous-scan-Mode mit einer Scan-Geschwindigkeit von $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, einer Bandbreite von 1 nm und einer Zeitkonstante von 1 s gemessen. Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm werden mit 400 μL Messlösungen der Konzentration $c = 0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ befüllt.

6.9.10 ESI-TOF-Massenspektrometrie

Die ESI-TOF-Messungen werden mit einem Q-TOF Ultima TMAP1 der Firma Quadrapol gemessen. Die Konzentration der Lösungen beträgt $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Als Lösungsmittel werden Acetonitril oder Methanol verwendet.

6.9.11 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Messungen werden von [REDACTED] durchgeführt. MALDI-TOF Messungen werden mit einem Micromass ToFSpec E Mass Spectrometer im positiven Reflektronbetrieb

durchgeführt. Für alle Experimente wird α -Cyano als Matrix verwendet. Die Polymerlösung wird in Acetonitril/Wasser = 50/50 mit 0.1 % TFA gelöst ($c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) und mit der Matrixlösung im gleichen Lösungsmittel ($c = 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) im 1/1-Verhältnis gemischt. Von dieser Lösung wird $1 \mu\text{l}$ auf ein „Target“ aufgetragen. Vor jeder Messung wird mit einem Polystyrolstandard von PSS, Mainz kalibriert.

6.9.12 Rasterkraftmikroskopie

Die Messungen werden von [REDACTED] durchgeföhrt. Die AFM-Aufnahmen werden an einem MultiMode™ Scanning Probe Microscope, ausgestattet mit einem Nanoscope IIIa-Controller (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) im tapping™-Modus gemessen. Zur Abbildung der Proben werden Cantileverspitzen aus Silizium von der Firma Nanosensors, Wetzlar Blankenfeld, mit einer Federkonstanten von $42 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ und einem Radius von etwa 10nm eingesetzt.

$20 \mu\text{L}$ der Proben werden durch spin-casting auf frisch gespaltenes Mica bzw. Graphit, zugeschnitten auf eine GröÙe von ca. 1 cm^2 , aufgebracht und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet.

6.9.13 Konfokalmikroskopie

Die Messungen werden von [REDACTED] durchgeföhrt. Die Zellen werden mit $c = 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hoechst 33342 Lösung angefärbt und mit $c = 2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cellmask Orange™ (Invitrogen, Germany) Lösung kurz vor der Bildgebung versetzt. Die Zellen werden in „Nunc® Lab-Tek® Chambered Coverglasses“ unter Verwendung eines Zeiss LSM 710 NLO Konfokalmikroskops (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Germany) und 405 nm (Hoechst 33342), 488 nm (Alexa Fluor® 488) and 543 nm (CellMask™ orange) Laserlinien abgebildet. Für die Auswertung der Bilder wird die Zeiss Zen-2009 Software (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Germany) verwendet.

6.9.14 Isoelektrische Fokussierung

Der isoelektrische Punkt des Alexa Fluor 488 markierten Poly-(ϵ -Methacryloyl-L-Lysin) wird durch isoelektrische Fokussierung bestimmt. Dafür werden a) eine „Micro-Rotaphor™ Preparative IEF-Cell“ und b) IPG-Streifen verwendet.

IEF mit „Micro-Rotaphor™ Preparative IEF-Cell“

Die Messungen werden von [REDACTED] durchgeföhrt. Zur isoelektrischen Fokussierung wird eine „Micro-Rotaphor™ Preparative IEF-Cell“ von BIO-RAD verwendet. Es werden 200 μ L salzfreie, wässrige Polymerlösung ($c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) mit 2470 μ L Wasser und 60 μ L Fluka Ampholytlösung pH 3-6 gemischt und luftblasenfrei in die Fokussierkammer geladen. Es wird für 4 Stunden bei 20 °C, 1-200V und 1 W fokussiert. Nach 4 Stunden werden die Proben den 10 Fokussierkammern entnommen und der Polymergehalt mittels UV- und FCS-Messungen bestimmt.

IEF mit IPG-Streifen

Die Fokussierung wird von [REDACTED] durchgeföhrt. Für die isoelektrische Fokussierung auf immobilized pH gradient (IPG) - Streifen wird AF488 markiertes Polymer (160 μ g) mit Rehydratationspuffer (500 μ l), bestehend aus 7 M Urea, 2 M Thiourea, 4 % (w/v) CHAPS, 2 % (v/v) Carrier Ampholytes (SERVALYT™ 3-10, SERVA Electrophoresis) und 0.001 % (w/v) Bromophenol Blau verdünnt. Der IPG-Streifen (SERVA IPG *BlueStrip* 3-10/24 cm, SERVA Electrophoresis) wird über Nacht in der Polymer-Rehydratationspufferlösung eingelegt. Die rehydrierten Streifen werden an einer IEF100 Isoelektischen Fokussierungseinheit (Hoefer Inc.) bei 20 °C fokussiert und mit einer Schicht Immobiline DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) bedeckt. Es wird 1 Stunde bei 500 V fokussiert, dann in einem Gradienten auf 8000 V erhöht, wodurch sich eine Gesamtspannung von 75 000 V/h ergibt. Nach der IEF wird der Streifen für 2 Stunden in einer Lösung aus 10 % (v/v) Essigsäure und 35 % (v/v) Methanol inkubiert und anschließend unter Verwendung eines LAS-3000 Imager (Fujifilm) ausgewertet.

6.9.15 Zeta-Potential-Messungen

Zeta-Potentiale werden an einem Malvern Instruments „Zetasizer Nano ZS“ unter Verwendung der „Zetasizer Software“ gemessen. Als Küvetten werden die von Malvern vertriebenen Einmalküvetten aus Polystyrol (Typ „DTS1060“ für Messungen in wässriger Lösung) verwendet. Die Probe wird von einem Helium-Neon-Laser (Wellenlänge $\lambda = 633 \text{ nm}$) bestrahlt, und der Zetasizer bestimmt dann mittels elektrophoretischer Lichtstreuung die elektrophoretische Mobilität bei einem Messwinkel von 17° . Die Proben werden bei einer Konzentration von $c = 0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in wässrigen 5 mM Zitronensäure- NaHPO_4 Pufferlösungen in einem pH Bereich von $\text{pH} = 2.8\text{-}8.6$ angesetzt, anschließend entgast und durch einen GS Filter mit $0.2 \mu\text{m}$ Porengröße filtriert.

6.9.16 Kapillarelektrophorese

Die Messungen werden [REDACTED] durchgeführt. Die Analysen durch Kapillarelektrophorese werden an einer Apparatur der Firma Agilent Technologies (7100 Capillary) durchgeführt. Die Detektion des Signals erfolgt über einen UV-Detektor bei verschiedenen Wellenlängen. Die genauen Messbedingungen sind in den Bildunterschriften der Spektren vermerkt.

6.9.17 Toxizitätstests

Die Toxizitätstests werden von [REDACTED] durchgeführt. Es werden BM-DC und HEK293 Zellen verwendet, die auf unterschiedliche Art mit der Polymerlösung versetzt werden.

Die BM-DCs werden in Zellkulturmedien, welche Polymer im Konzentrationsbereich von $c = 0.01\text{-}1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ enthalten resuspendiert und in „wells“ von 96 „well culture plates“ in dreifacher Ausführung eingebracht ($2.5\cdot 10^5 \text{ cells}/100\mu\text{L}$). Einen Tag später wird die Zellüberlebensrate über einen MTT Assay überprüft. Die Ergebnisse werden auf die

6.9 Verwendete Geräte und Methoden

Überlebensrate nicht behandelter BM-DCs normiert und von 2 unabhängigen Experimenten vereint.

HEK293 Zellen (je $2 \cdot 10^4$) werden in dreifacher Ausführung in „wells“ von 96 „well culture plates“ aufgetragen. Einen Tag später wird zum Zellkulturmedium Polymer enthaltendes Medium zugefügt mit Polymerkonzentrationen von $c = 0.01-1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (je 100 μL). Einen weiteren Tag darauf wird die Zellüberlebensrate über einen MTT Assay überprüft. Die Ergebnisse werden auf die Überlebensrate nicht behandelter HEK293 Zellen normiert und von 2 unabhängigen Experimenten vereint.

Literatur zu Kapitel 6:

- [1] S. Nagaoka, A. Shundo, T. Satoh, K. Nagira, R. Kishi, K. Ueno, K. Iio, H. Ihara, *Synthetic Communications* 2005, 35, 2529–2534.
- [2] D. Weller, *Synthese und Charakterisierung von Makromolekülen mit Peptidseitenketten*, Mainz 2010.
- [3] D. M. LeMaster, F. M. Richards, *Analytical Biochemistry* 1982, 122, 238–247.
- [4] A. Sutherland, C. L. Willis, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 7764–7769.
- [5] V. Guantieri, S. Grando, L. Pandolfo, A. M. Tamburro, *Biopolymers* 1990, 29, 845–854.
- [6] D. W. Urry, T. Ohnishi, *Biopolymers* 1974, 13, 1223–1242.
- [7] J. R. McDaniel, J. A. MacKay, F. G. Quiroz, A. Chilkoti, *Biomacromolecules* 2010, 11, 944–952.
- [8] C. Guda, *Biotechnol. Lett.* 1995, 17, 745–750.
- [9] H.-G. Batz, G. Franzmann, H. Ringsdorf, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1972, 11, 1103–1104.
- [10] J. E. Heidlas, W. J. Lees, P. Pale, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 1992, 57, 146–151.
- [11] G. L. Stahl, R. Walter, C. Smith, *J. Org. Chem.* 1978, 43, 2285–2286.
- [12] U. Axen, *Prostaglandins* 1974, 5, 45–47.
- [13] K. Rausch, A. Reuter, K. Fischer, M. Schmidt, *Biomacromolecules* 2010, 11, 2836–2839.
- [14] A. Becker, W. Köhler, B. Müller, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 1995, 99, 600–608.

7 Anhang

Zu Kapitel 4.1

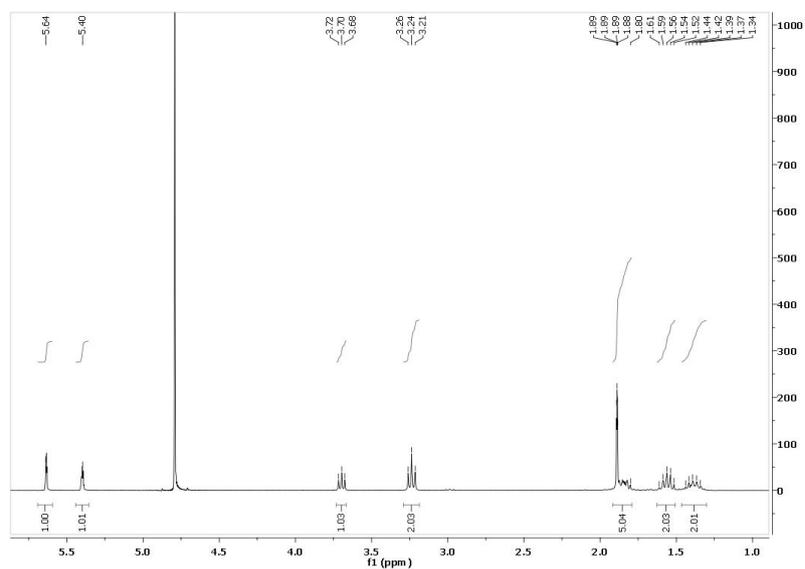


Abbildung A - 1: ^1H -NMR-Spektrum von ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin in D_2O (300 MHz, $T = 293\text{ K}$, $c = 20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

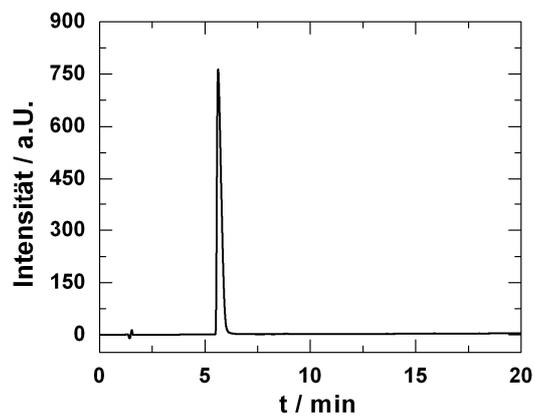
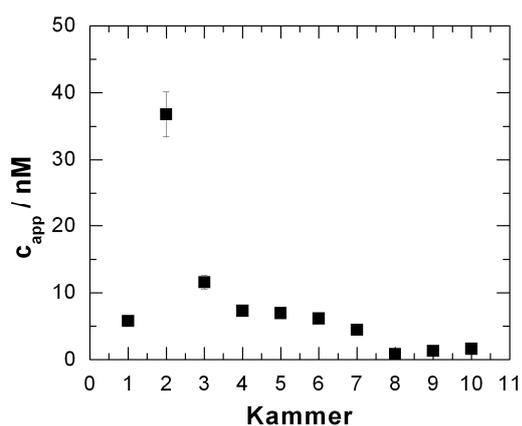


Abbildung A - 2: HPLC-Spektrum von ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin (Nucleosil-Säule, UV-Detektion bei 220 nm , $c = 0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, Gradient: in 45 min. von $\text{H}_2\text{O}/\text{AN} = 95/5$ auf $\text{H}_2\text{O}/\text{AN} = 40/60$ mit je 0.1% TFA).

Tabelle A - 1: pH-Werte der Kammern 1-10 der "Micro-Rotaphor™ Preparative IEF-Cell" nach der IEF.

Kammer	pH
1	3.41
2	3.87
3	4.76
4	5.2
5	6.12
6	6.31
7	6.72
8	7.12
9	7.26
10	7.48

a



b

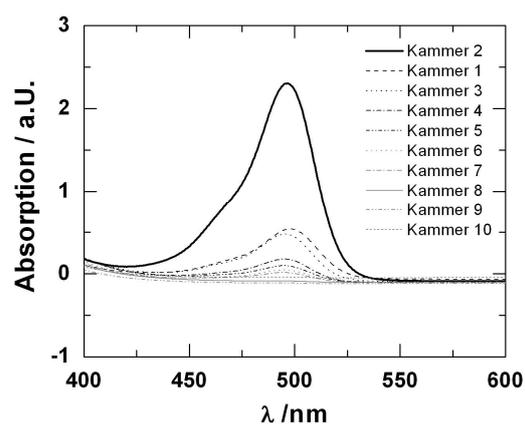


Abbildung A - 3: Bestimmung der Polymerkonzentration des Alexa Fluor 488 markierten Poly-(ε-N-Methacryloyl-L-Lysin) in den Kammern 1-10 nach der IEF mit der "Micro-Rotaphor™ Preparative IEF-Cell" über a) FCS- und b) UV-Messungen. Über beide Methoden wird die höchste Polymerkonzentration in Kammer 2 festgestellt.

Auswertung der FCS-Daten

Aus den gemessenen zeitlichen Fluktuationen der Fluoreszenz-Intensität $\delta F(t)$, die durch die Diffusion der fluoreszierenden Partikel im konfokalen Detektionsvolumen V verursacht wird, ergibt sich eine experimentelle Autokorrelationsfunktion:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (A1)$$

Wie für eine Ansammlung von identischen, frei diffundierenden fluoreszierenden Spezies theoretisch [1] gezeigt werden kann, hat die Autokorrelationsfunktion die folgende analytische Form:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right) \sqrt{1 + \frac{t}{S^2 \tau_D}}} \quad (A2)$$

Mit N , der durchschnittlichen Anzahl an Farbstoffmolekülen in V und $S = z_o/r_o$, dem sogenannten Strukturparameter, der das Verhältnis zwischen seitlicher und radialer Dimension des V beschreibt. Die durchschnittliche Diffusionszeit τ_D eines Farbstoffmoleküls durch V hängt direkt mit dem Diffusionskoeffizienten $D = r_o^2/4\tau_D$ zusammen.

Durch Fitten der experimentellen Autokorrelationskurve mit dem analytischen Modell (Gleichung A2) wird der Diffusionskoeffizient bestimmt und über die Stokes-Einstein-Gleichung wird der hydrodynamische Radius der Moleküle erhalten. Zudem wird die Konzentration N/V und die Fluoreszenzhelligkeit $\langle F \rangle / N$ berechnet. Da die Größe des konfokalen Detektionsvolumen nicht genau bekannt ist, wird es durch Referenzmessungen mit einem Farbstoff mit bekanntem Diffusionskoeffizienten, z.B. Alexa 488 bestimmt [2].

- [1] R. Rigler, E. Elson, *Fluorescence correlation spectroscopy: theory and applications* Springer: Berlin; New York, 2001.
- [2] Z. Petrásek, P. Schwille, *Biophys. J.* 2008, 94 (4), 1437-1448.

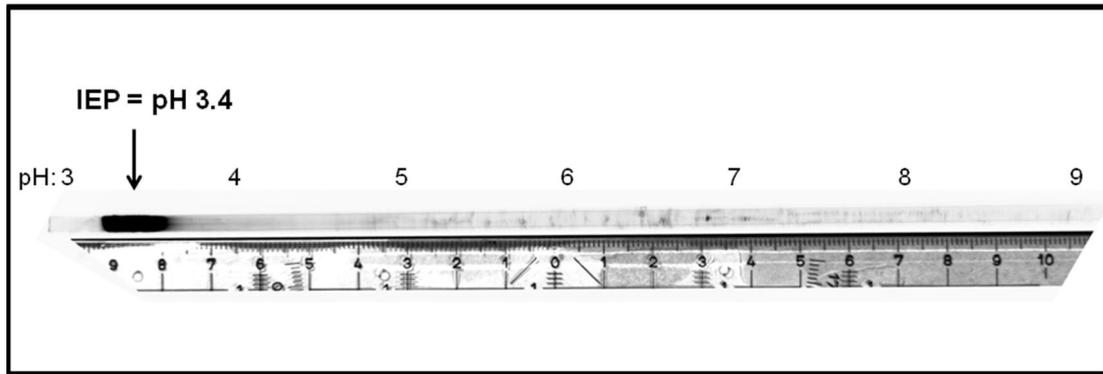
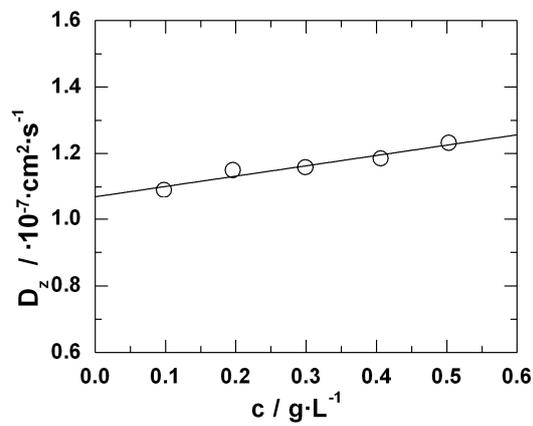
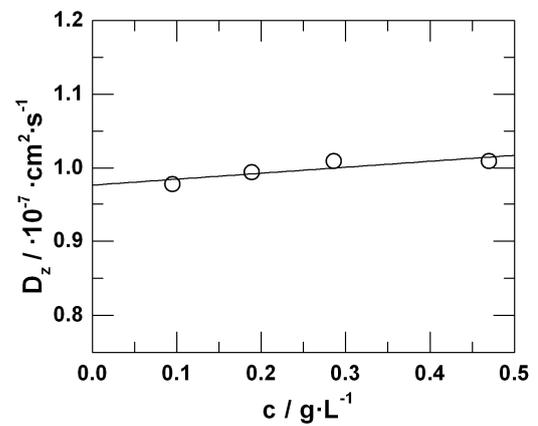


Abbildung A - 4: Bestimmung des IEP des Alexa Fluor 488 markierten Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) über IEF auf IPG-Streifen auf IEP = pH 3.4.

a



b



c

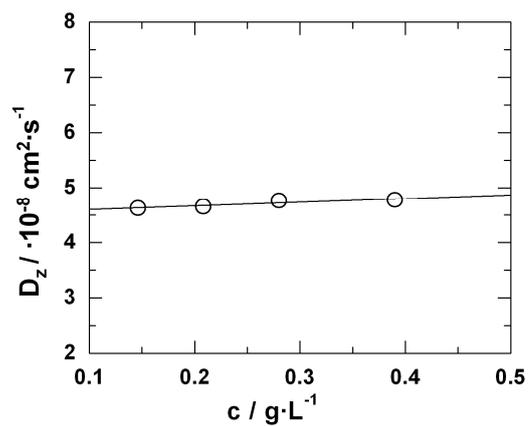
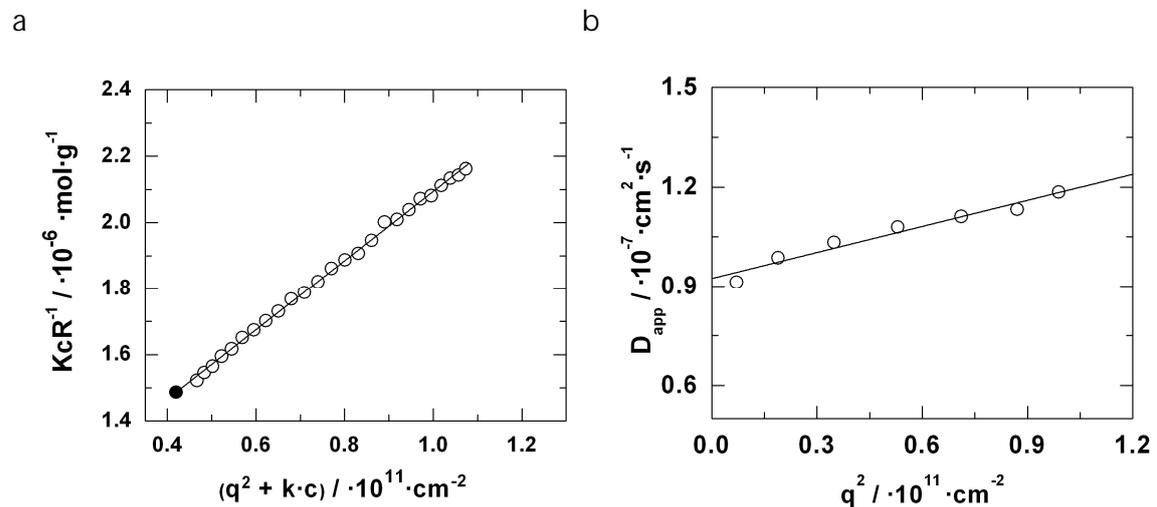


Abbildung A - 5: Bestimmung des z-gemittelten Diffusionskoeffizienten D_z (extrapoliert nach $q = 0$) von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) in a) Wasser, b) wässriger 0.1 M NaClO_4 Lösung und c) wässriger 5 M NaClO_4 -Lösung.

Tabelle A - 2: Ergebnisse der pH-abhängigen Titration von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) in wässriger 0.1 M NaClO₄-Lösung.

pH	R _g / nm	R _h / nm	R _g /R _h	M _w / g·mol ⁻¹	c / g·L ⁻¹
6.7	41	21.4	1.92	6.93·10 ⁵	0.189
6	41.3	21.7	1.90	6.95·10 ⁵	0.183
5	40.8	21.7	1.88	6.95·10 ⁵	0.168
4.1	39.4	21.3	1.85	6.98·10 ⁵	0.163
3.3	38.6	21.1	1.83	6.96·10 ⁵	0.151
2.2	46	23.2	1.98	6.73·10 ⁵	0.14
1.2	49	25.8	1.90	6.79·10 ⁵	0.13
2	46.2	24	1.93	6.84·10 ⁵	0.141
6.7	40.5	21.3	1.90	6.89·10 ⁵	0.189
8	40.3	22	1.83	6.87·10 ⁵	0.184
9	43	22.9	1.88	6.79·10 ⁵	0.175
10	49.4	26	1.90	6.58·10 ⁵	0.164
11.3	55.3	28	1.98	6.64·10 ⁵	0.16
12.2	55.8	28.9	1.93	6.70·10 ⁵	0.157

Abbildung A - 6: Statische (a) and dynamische (b) Lichtstreuungsmessungen von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) bei pH = 2.2 in wässriger 0.1 M NaClO₄-Lösung.

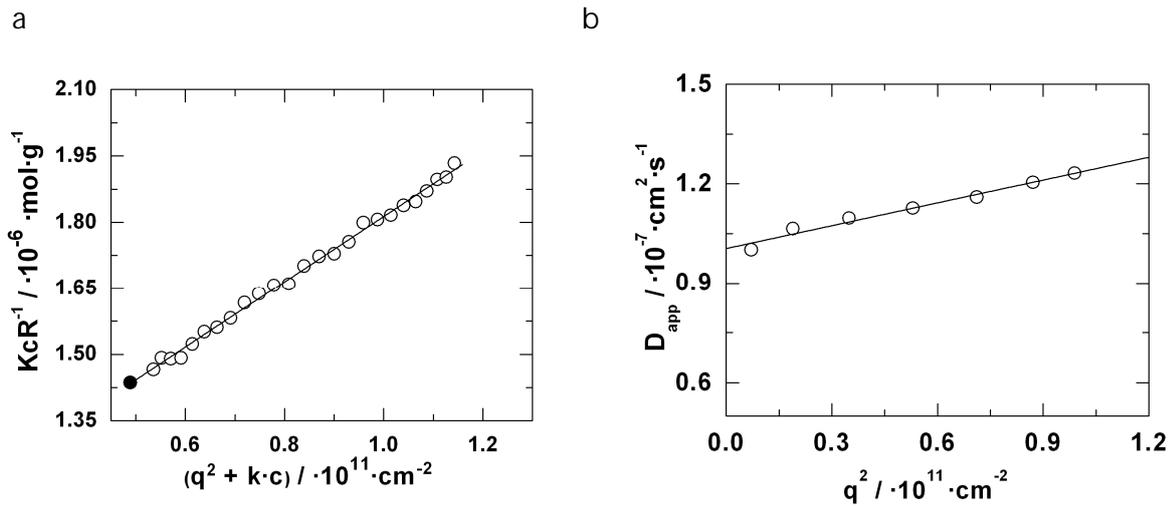


Abbildung A - 7: Statische (a) and dynamische (b) Lichtstreuemessungen von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) bei pH = 4.1 in wässriger 0.1 M NaClO₄-Lösung.

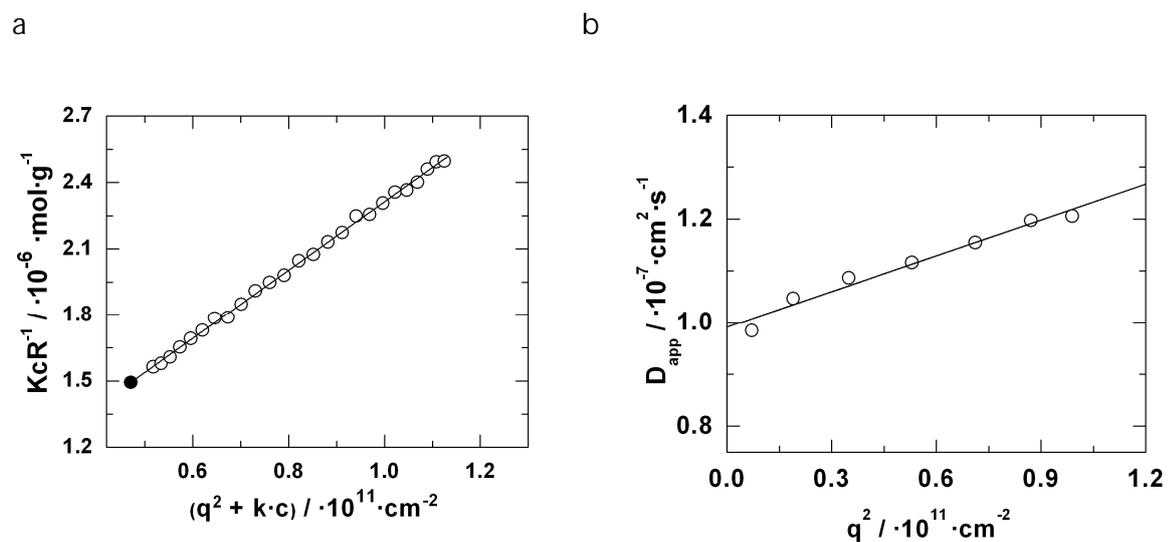


Abbildung A - 8: Statische (a) and dynamische (b) Lichtstreuemessungen von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) bei pH = 6.7 in wässriger 0.1 M NaClO₄-Lösung

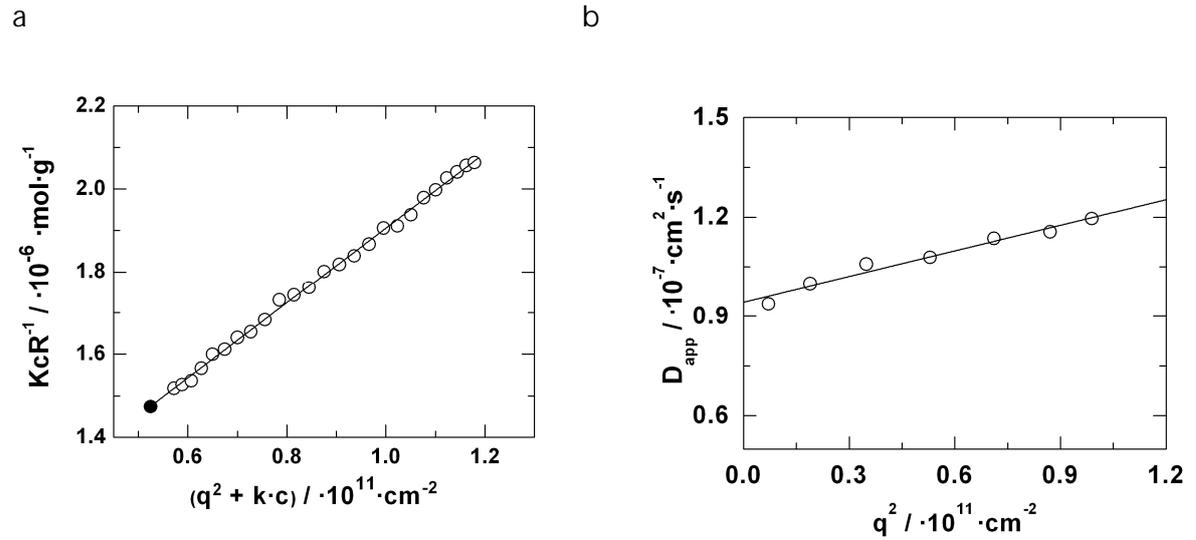


Abbildung A - 9: Statische (a) and dynamische (b) Lichtstreuungen von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) bei pH = 9 in wässriger 0.1 M NaClO₄-Lösung.

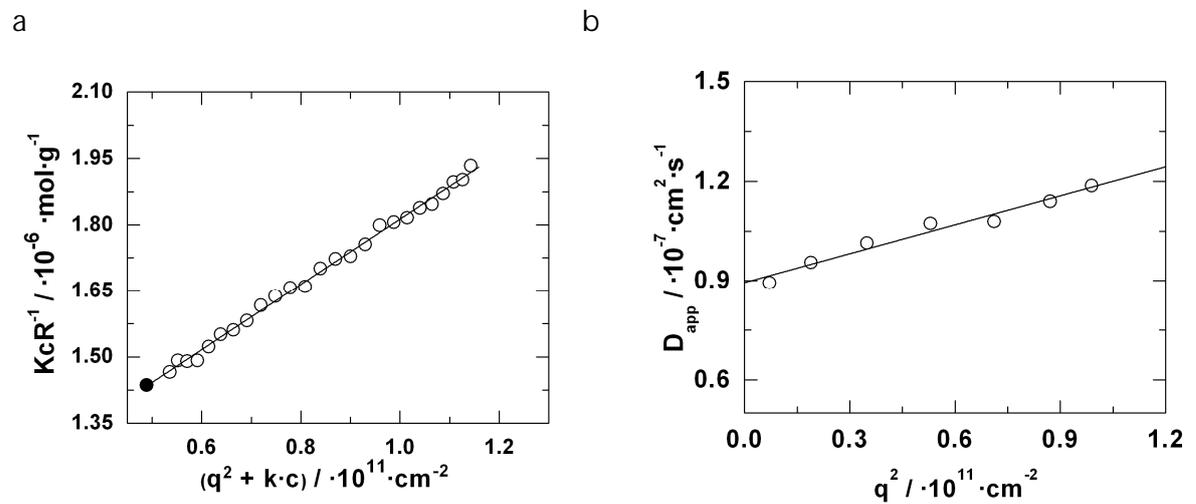
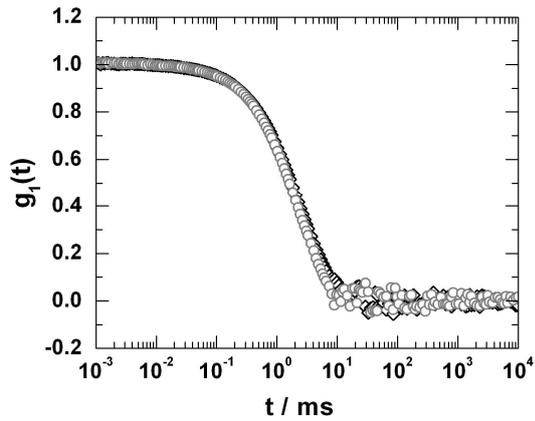


Abbildung A - 10: Statische (a) and dynamische (b) Lichtstreuungen von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) bei pH = 12.2 in wässriger 0.1 M NaClO₄ -Lösung.

a



b

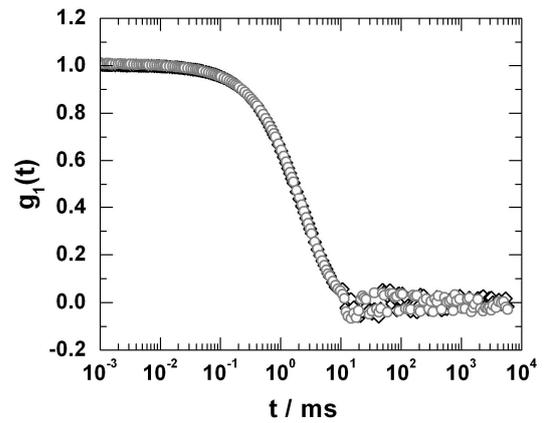


Abbildung A - 11: Autokorrelationsfunktionen von Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) (schwarze Diamanten) in 0.15 M wässriger NaCl-Lösung nach Zugabe von a) Zn^{2+} ($\text{Zn}^{2+} / \text{COO}^- = 49$) (graue Kreise) und b) Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+} / \text{COO}^- = 115$) (graue Kreise). Streuwinkel 30° .

Zu Kapitel 4.2

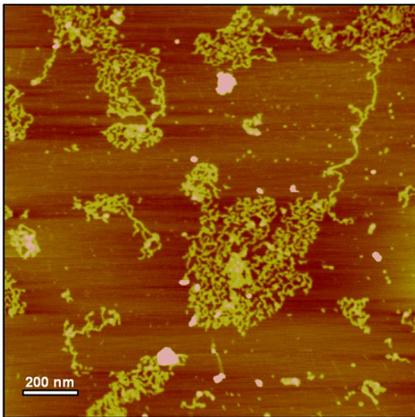


Abbildung A - 12: AFM-Aufnahmen des Poly-(H_3N^+ - ϵ -N-Methacryloyl-Lys-VPGGG-COO-) 2b, spin-cast der wässrigen Lösung bei $\text{pH} = 5$ auf Mica.

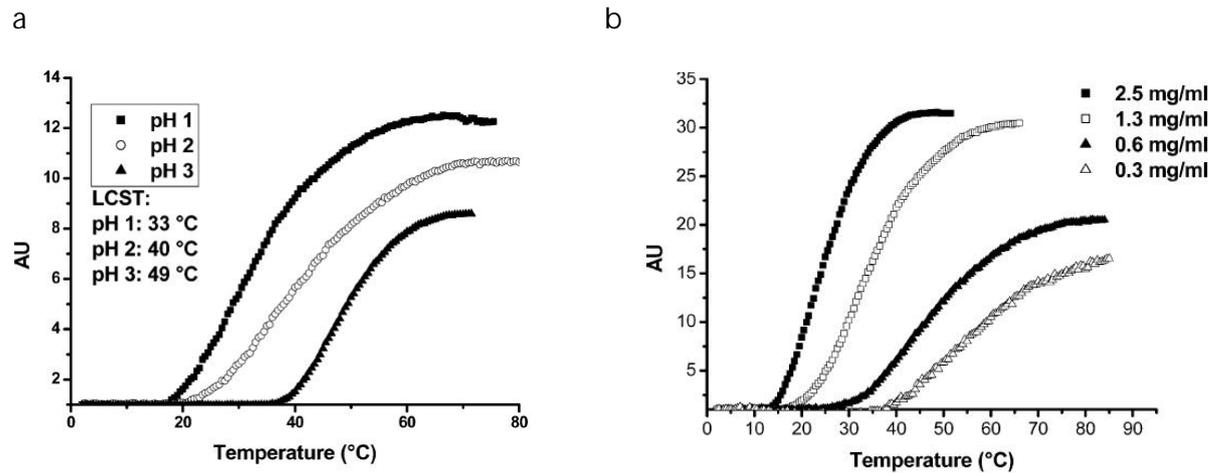


Abbildung A - 13: Trübungskurven-Messungen des EBP-PEG-EBP Triblockcopolymers C bei a) verschiedenem pH und b) bei pH = 1 und verschiedenen Konzentrationen {Ayres 2005 #454}.

Zu Kapitel 4.3

Darstellung von E4-20 in JMD5 und in JMD6:

Es werden zwei 66 bp Oligonukleotide für den JMD5 Vektor designt:

sense 5' - ctagaataattttgtttaactttaagaaggaggagtacatatgggctgataataatgatcttcag - 3' und

antisense 3' - gatcctgaagatcattattatcagcccatatgtactcctcctcttaaagttaaacaaaattattt - 5'.

Und zwei 66 bp Oligonukleotide für den JMD6 Vektor:

sense 5' - ctagaataattttgtttaactttaagaaggaggagtacatatgggcaaatgataatgataatgatcttcag -

3' und

antisense 3' - ttattaaacaaattgaaattcttctcctcatgtataccgttactattactagaagtcctag - 5'.

Diese Oligos werden mit ihrem entsprechenden komplementären Strang verschmolzen und in einen linearisierten, modifizierten pET-24a(+) Klonierungsvektor eingebracht. Ein synthetisches Gen, das für die (GVGVP)₂₀ Peptidsequenz codiert wird mittels PRe-RDL in den Klonierungsvektor eingebracht.

a

```

ATG (GGC GTG GGT GTT CCG GGC GTA GGT GTC CCA GGT GTG GGC GTA CCG
(M)  G  V  G  V  P  G  V  G  V  P  G  V  G  V  P
GGC GTT GGT GTT CCT GGT GTC GGC GTG CCG)4 GGC TGA TAA TAA TGA
G  V  G  V  P  G  V  G  V  P  G  .  .  .  .
    
```

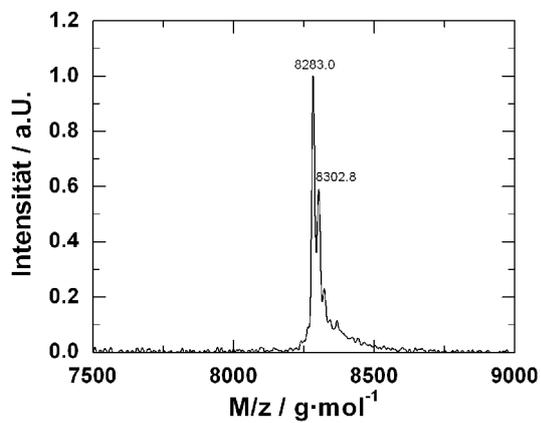
b

```

ATG (GGC GTG GGT GTT CCG GGC GTA GGT GTC CCA GGT GTG GGC GTA CCG
(M)  G  V  G  V  P  G  V  G  V  P  G  V  G  V  P
GGC GTT GGT GTT CCT GGT GTC GGC GTG CCG)4 GGC AAA TGA TAA TGA
G  V  G  V  P  G  V  G  V  P  G  K  .  .  .  .
    
```

Abbildung A - 14: Gen- und Polypeptidsequenz von E4-20 in JMD5 (a) und in JMD6 (b). Die ELPs werden mittels PRe-RDL hergestellt.

a



b

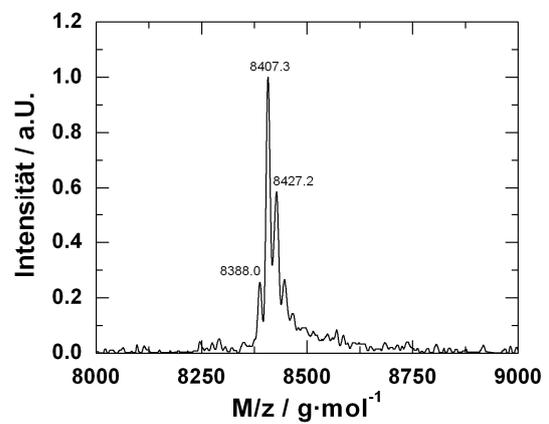


Abbildung A - 15: MALDI-TOF von a) E4-20 in JMD5 $MW(\text{MA-ELP} + \text{Na}^+) = 8283 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und b) E4-20 in JMD6 $MW(\text{MA-ELP} + \text{Na}^+) = 8407 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

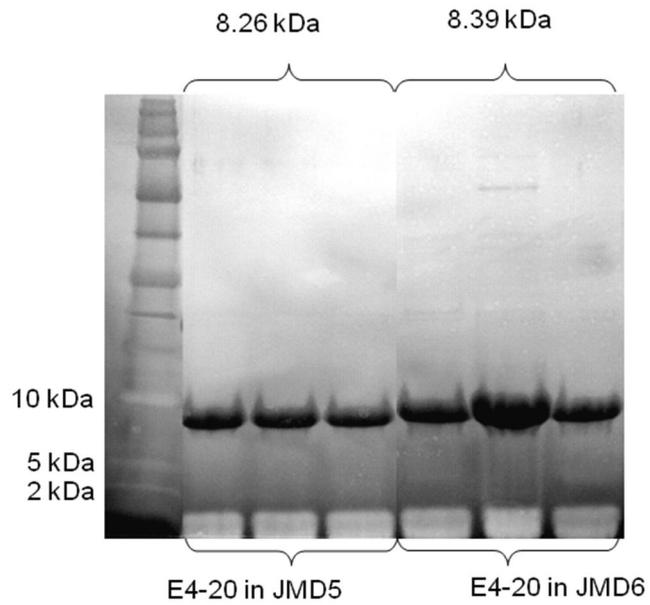


Abbildung A - 16: 10-20 % Tris-Tricine/Peptide SDS-PAGE Gel von gereinigtem E4-20 in JMD5 und E4-20 in JMD6 mit Kupferfärbung. Die entsprechenden Banden für E4-20 in JMD5 und in JMD6 werden nachgewiesen, Verunreinigungen können keine festgestellt werden.

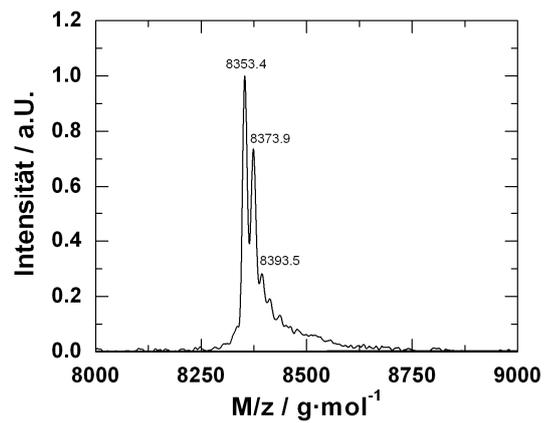


Abbildung A - 17: MALDI-TOF vom Makromonomer MA-ELP. $MW(\text{MA-ELP} + \text{Na}^+) = 8354 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabelle A - 3: Übergangstemperaturen T_t und Temperaturbereich des Übergangs als Funktion der Konzentration von Poly-(MA-ELP) in PBS.

$c / \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$T_t / ^\circ\text{C}$	Temperaturbereich / $^\circ\text{C}$
1	36.1	0.5
0.1	37.3	3
0.02	39	3.8
0.01	39.8	4.5

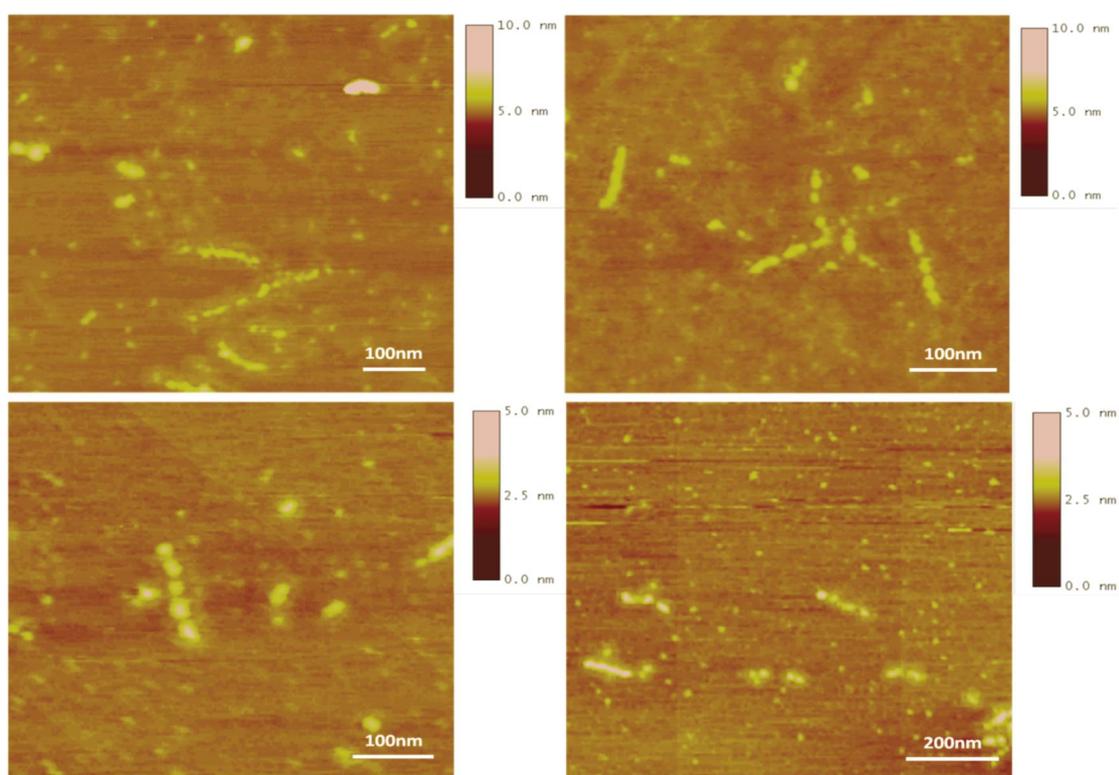


Abbildung A - 18: AFM-Aufnahmen der gebrochenen Polymerbürsten Poly-(MA-ELP).

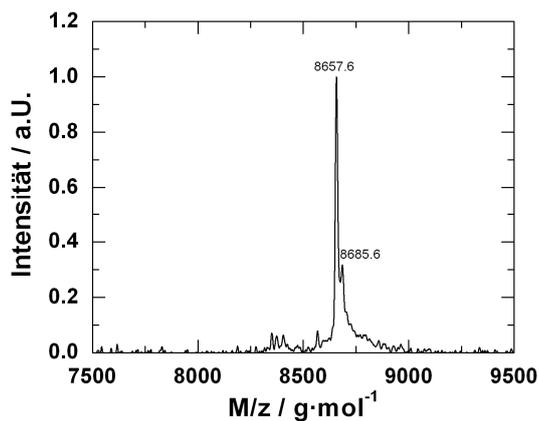


Abbildung A - 19: MALDI-TOF vom Makromonomer MA-ELP-PEG₆-N₃. MW(MA-ELP-PEG-N₃) = 8658 g·mol⁻¹.

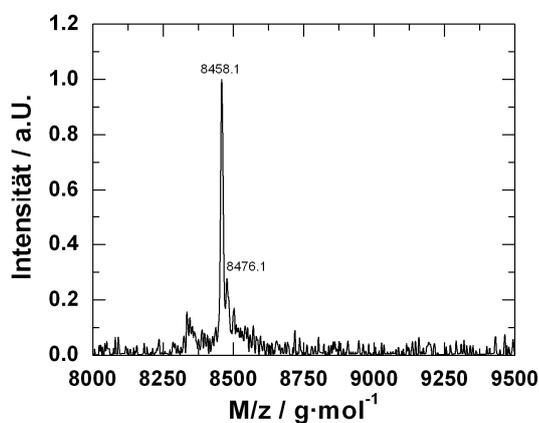


Abbildung A - 20: MALDI-TOF vom Makromonomer N-Acetyl-ELP-C₃-MA. MW(N-Acetyl-ELP-C₃-MA + K⁺) = 8458 g·mol⁻¹.

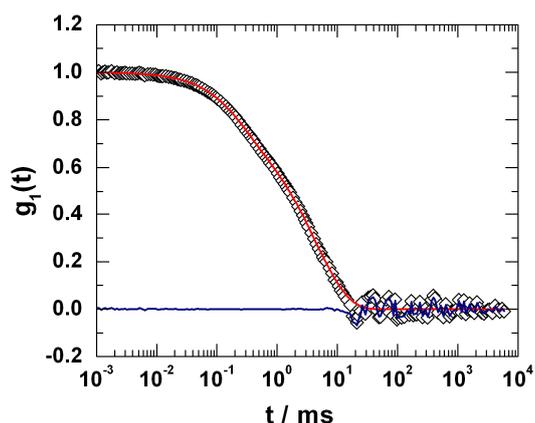


Abbildung A - 21: Autokorrelationsfunktion des Makromonomers Ac-ELP-C₃-MA in 2 mM NaCl. Es ergibt sich eine bimodale Verteilung mit einem $R_h = 2.5$ nm für den „fast-mode“ und $R_h = 37$ nm für den „slow-mode“. Streuwinkel: 30°.

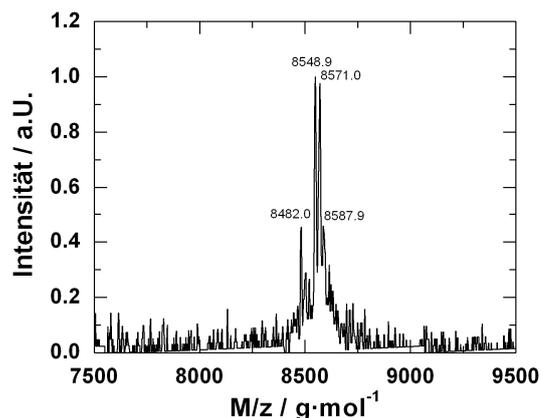
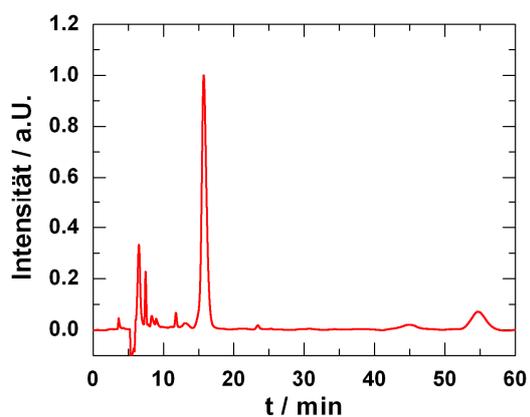


Abbildung A - 22: MALDI-TOF vom Makromonomer MA-ELP-Lys und dem doppelt umgesetzten Makromonomer MA-ELP-Lys-MA. $MW(\text{MA-ELP-Lys} + \text{Na}^+) = 8482 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $MW(\text{MA-ELP-Lys-MA} + \text{Na}^+) = 8549 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $MW(\text{MA-ELP-Lys-MA} + 2 \text{Na}^+) = 8571 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $MW(\text{MA-ELP-Lys-MA} + \text{Na}^+ + \text{K}^+) = 8588 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

a



b

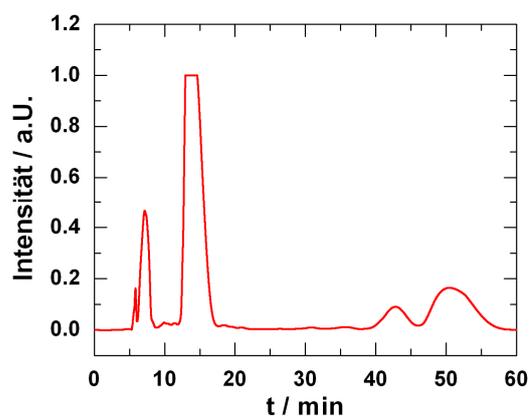


Abbildung A - 23: HPLC-Messungen der Umsetzung von E4-20 in JMD6 mit 1.5-fachem Überschuss an NHS-Ester und 4-stündiger Reaktionszeit. Produktmischung mit dem gewünschten Produkt MA-ELP-Lys mit einer Elutionszeit von 15 min mit a) $c = 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und b) $c = 50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. (SelectX-Säule, UV-Detektion bei 230 nm, isokratisch: $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 30/70$ mit je 0.1 % TFA).

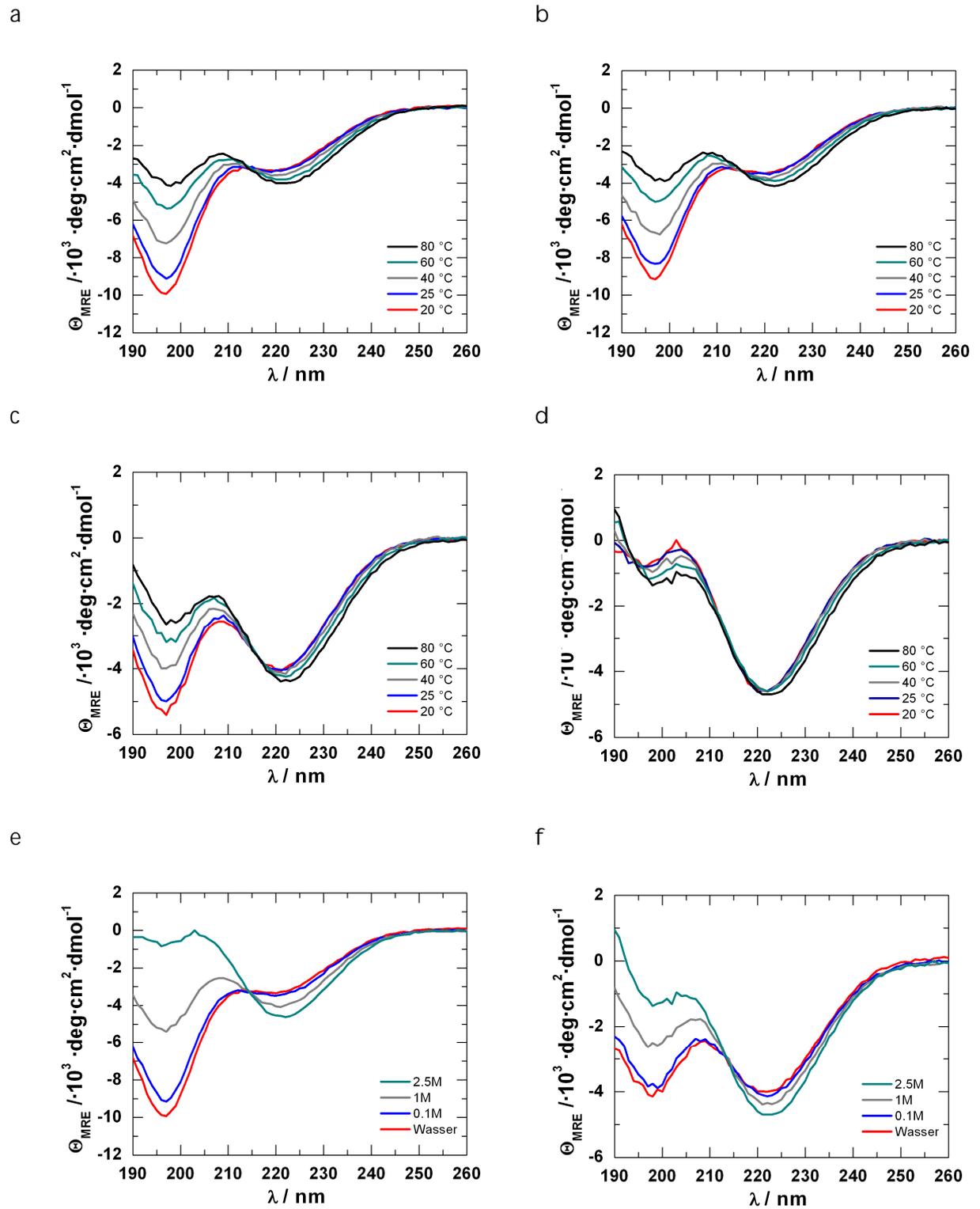


Abbildung A - 24: CD-Spektren des E4-20 in JMD5 in a) Wasser, b) 0.1 M Natriumperchlorat, c) 1 M Natriumperchlorat, d) 2.5 M Natriumperchlorat mit je $c = 0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen, e) bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und f) bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ in verschieden molaren Salzlösungen.

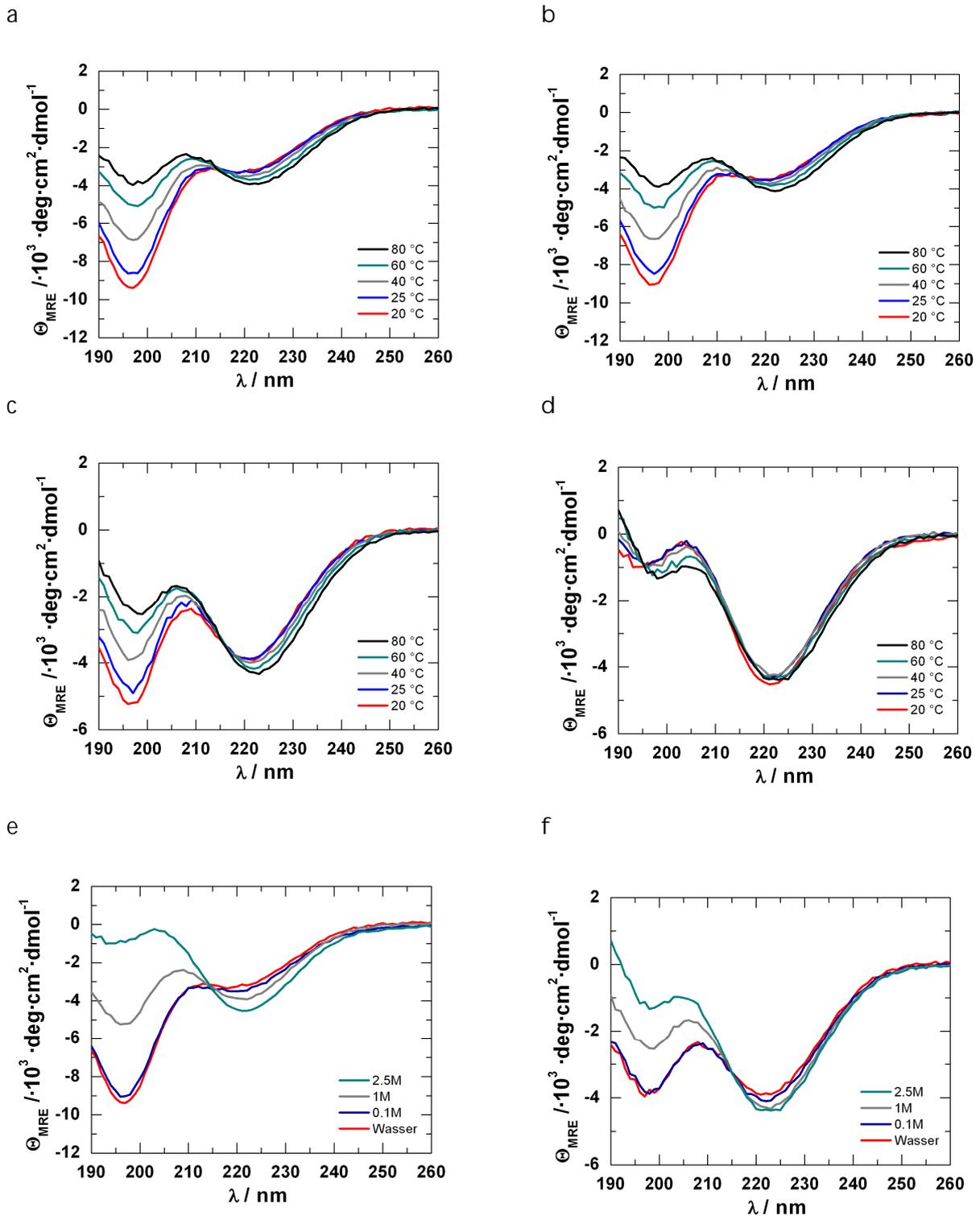


Abbildung A - 25: CD-Spektren des Makromonomers MA-ELP in a) Wasser, b) 0.1 M Natriumperchlorat, c) 1 M Natriumperchlorat, d) 2.5 M Natriumperchlorat mit je $c = 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen, e) bei 20 °C und f) bei 80 °C in verschieden molaren Salzlösungen.

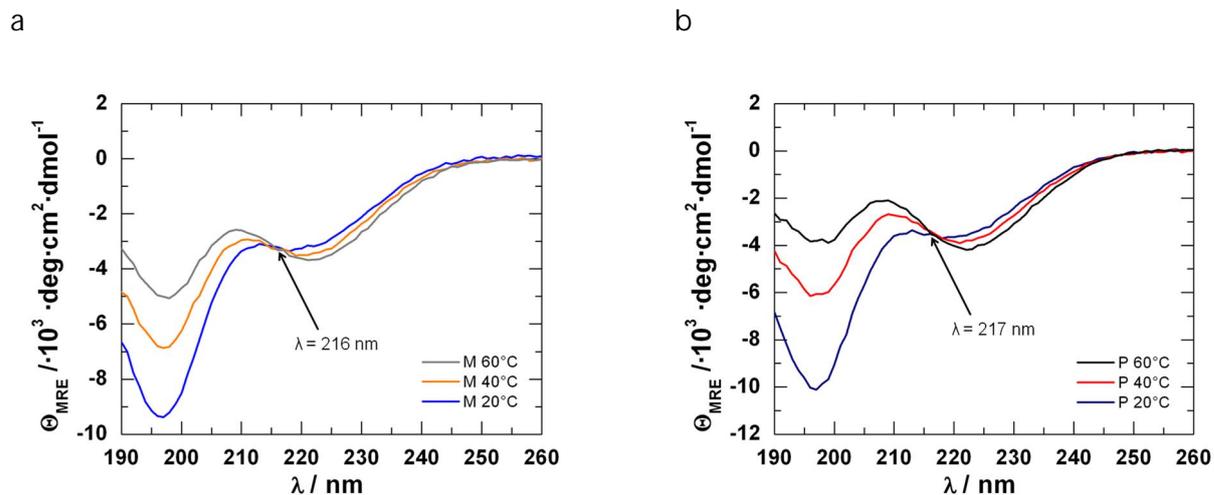


Abbildung A - 26: CD-Spektren mit isodichroischen Punkt für a) Makromonomer MA-ELP (M) und b) Poly-(MA-ELP) (P) mit je $c = 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen in Wasser.

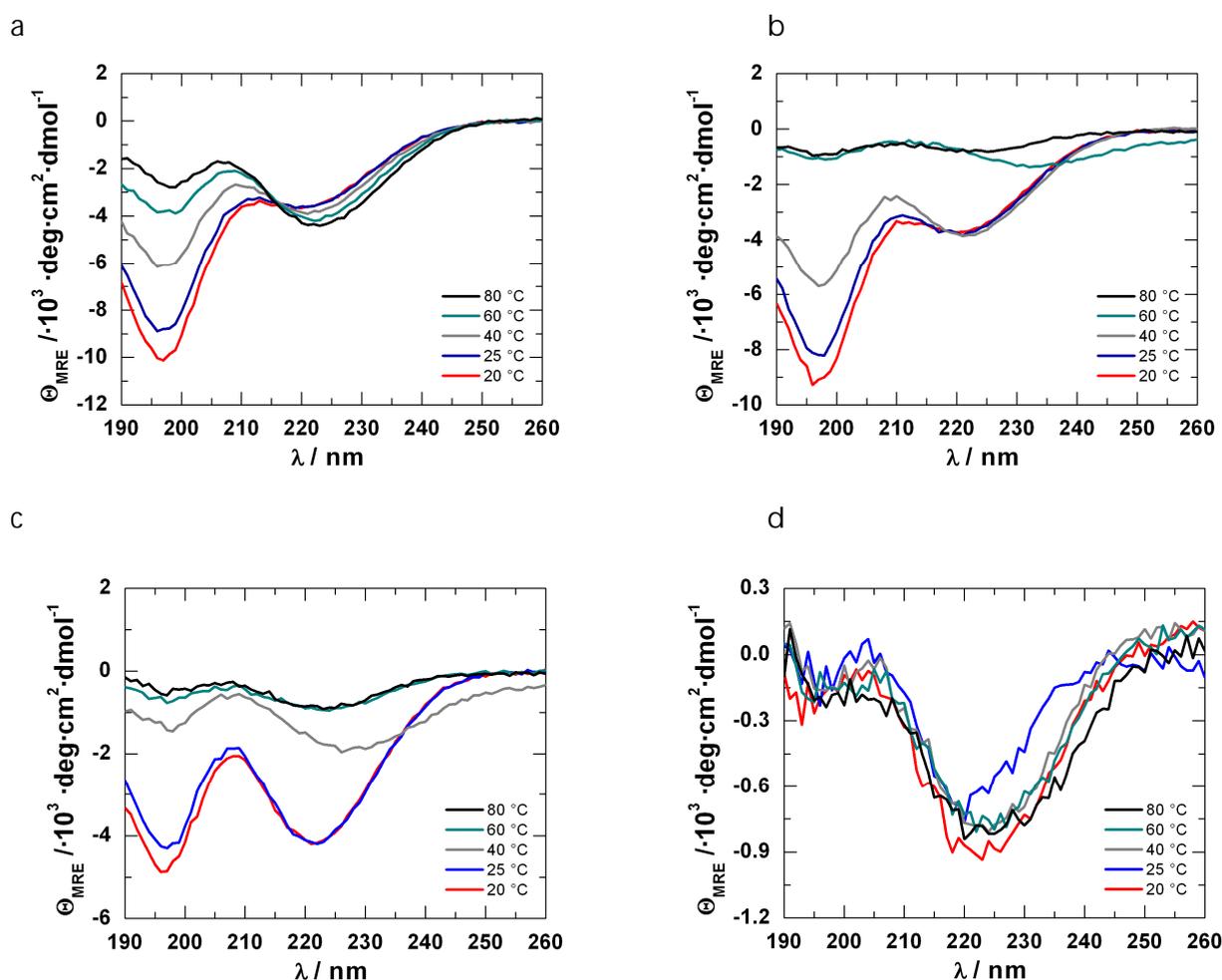


Abbildung A - 27: CD-Spektren der Polymerbürste Poly-(MA-ELP) in a) Wasser, b) 0.1 M Natriumperchlorat, c) 1 M Natriumperchlorat, d) 2.5 M Natriumperchlorat mit je $c = 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen.

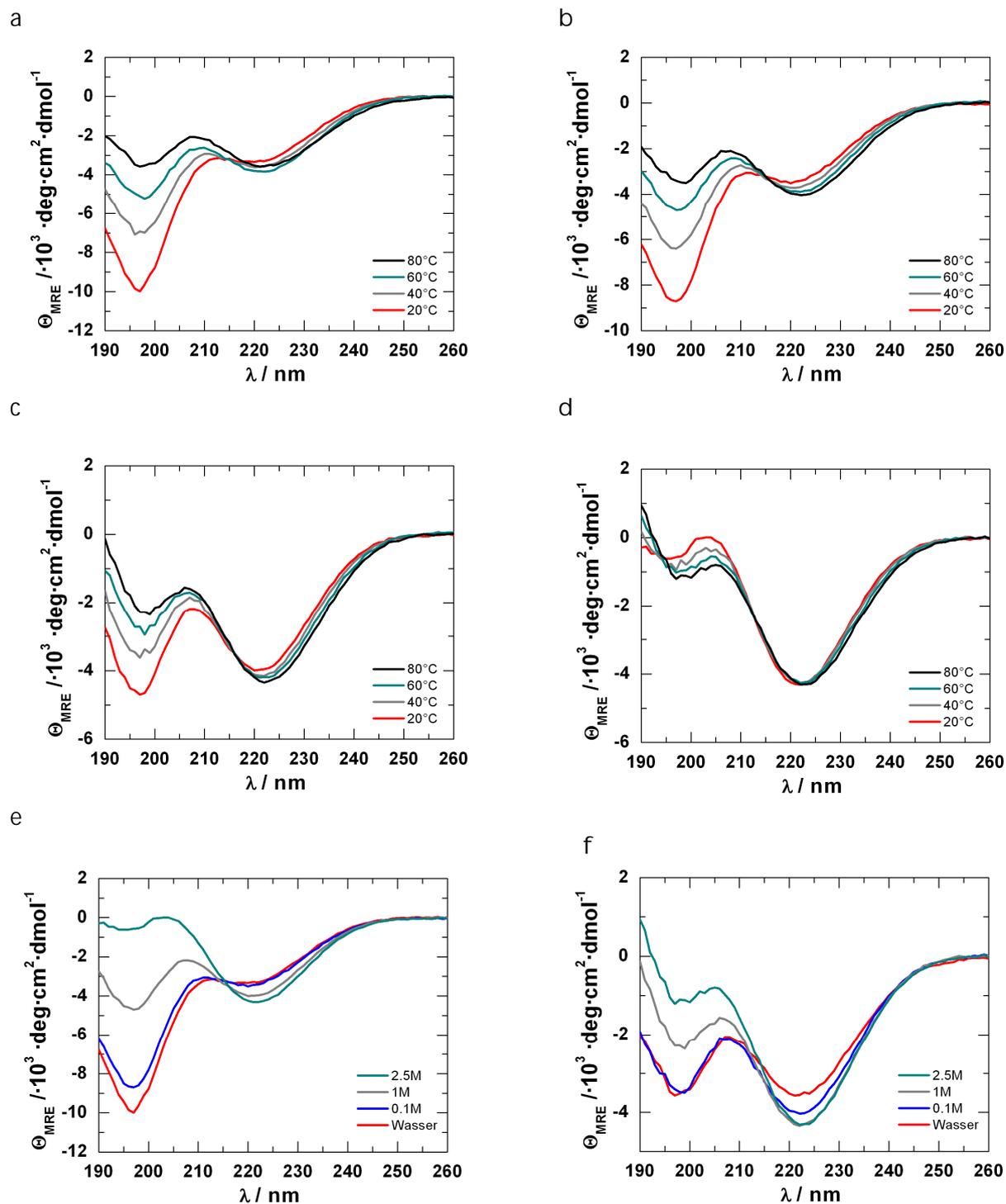


Abbildung A - 28: CD-Spektren des Makromonomers MA-ELP-PEG₆-N₃ in a) Wasser, b) 0.1 M Natriumperchlorat, c) 1 M Natriumperchlorat, d) 2.5 M Natriumperchlorat mit je $c = 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen, e) bei 20 °C und f) bei 80 °C in verschiedenen molaren Salzlösungen.

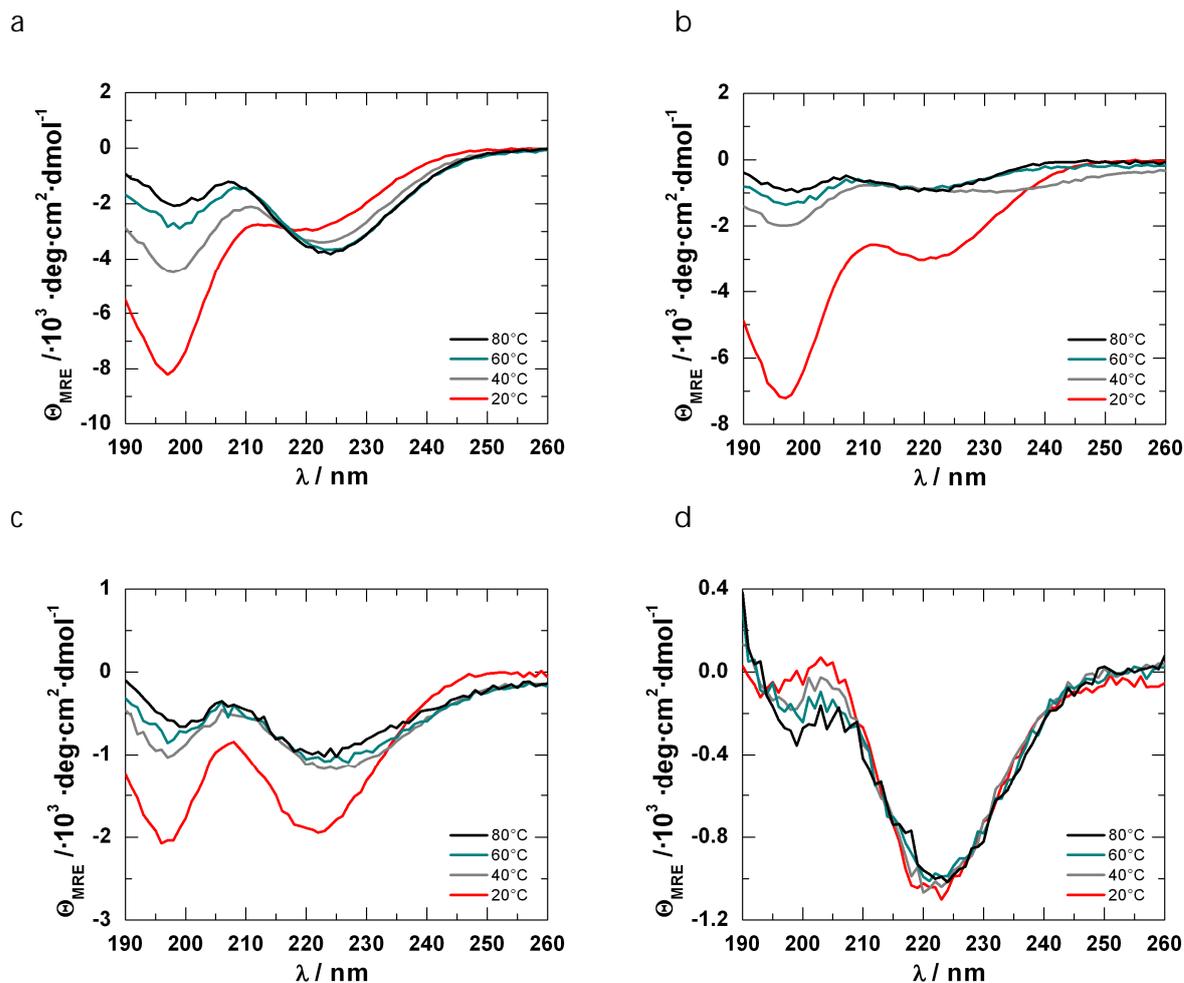


Abbildung A - 29: CD-Spektren des Poly-(MA-ELP-PEG₆-N₃) in a) Wasser, b) 0.1 M Natriumperchlorat, c) 1 M Natriumperchlorat, d) 2.5 M Natriumperchlorat mit je $c = 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen.

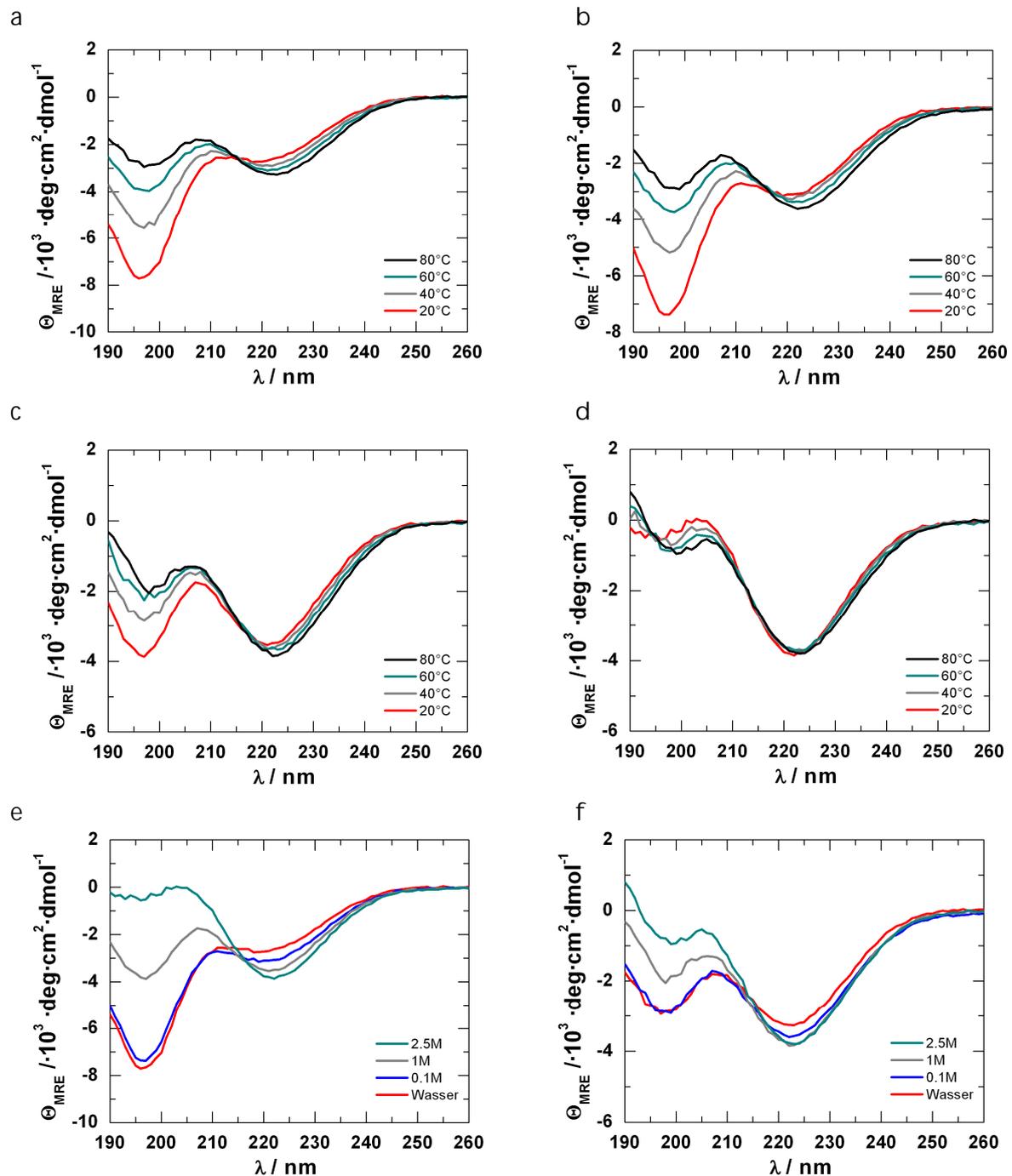


Abbildung A - 30: CD-Spektren des Makromonomers N-Acetyl-ELP-C₃-MA in a) Wasser, b) 0.1 M Natriumperchlorat, c) 1 M Natriumperchlorat, d) 2.5 M Natriumperchlorat mit je $c = 0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen, e) bei 20 °C und f) bei 80 °C in verschiedenen Salzlösungen.

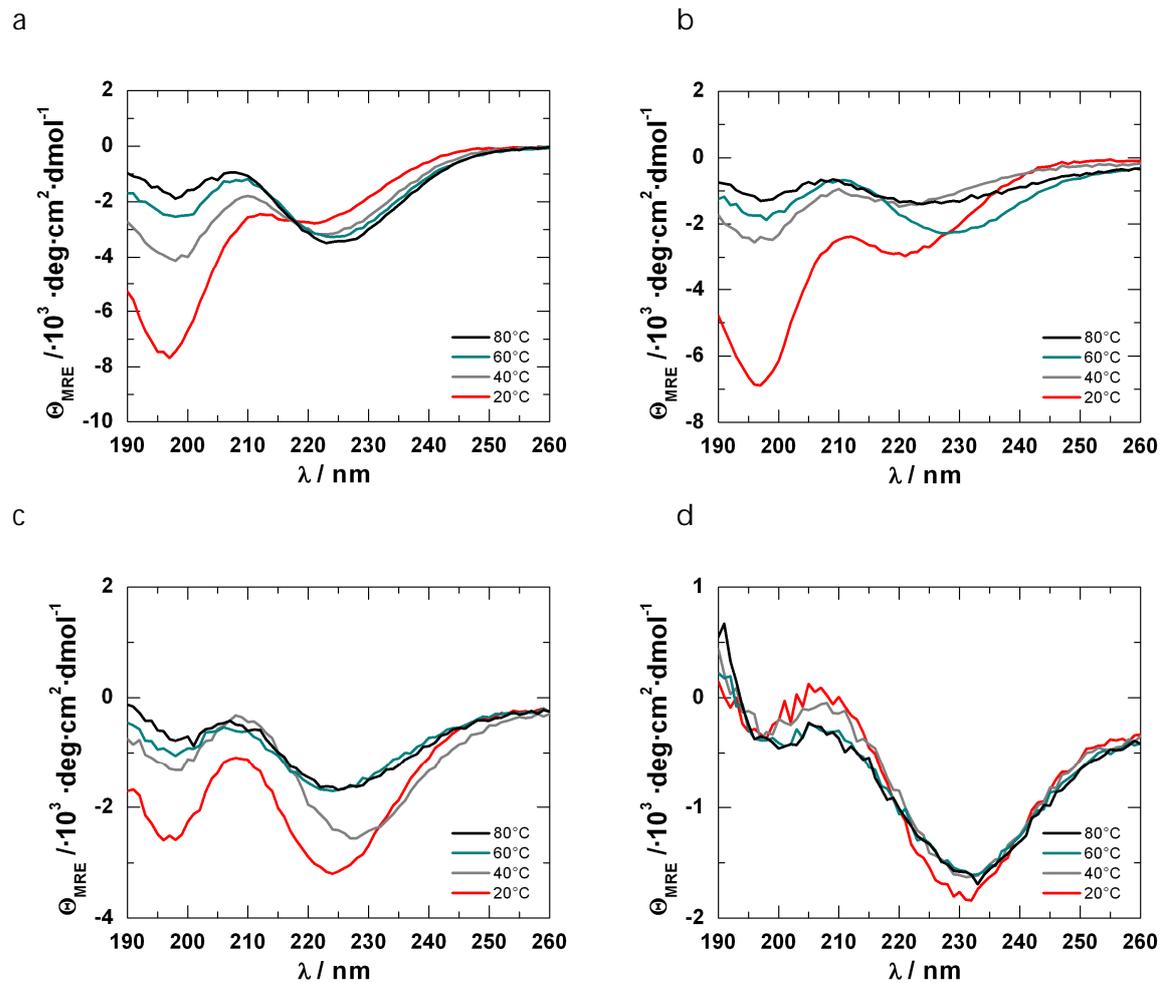


Abbildung A - 31: CD-Spektren des Poly-(N-Acetyl-ELP-C₃-MA) in a) Wasser, b) 0.1 M Natriumperchlorat, c) 1 M Natriumperchlorat, d) 2.5 M Natriumperchlorat mit je $c = 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei verschiedenen Temperaturen.

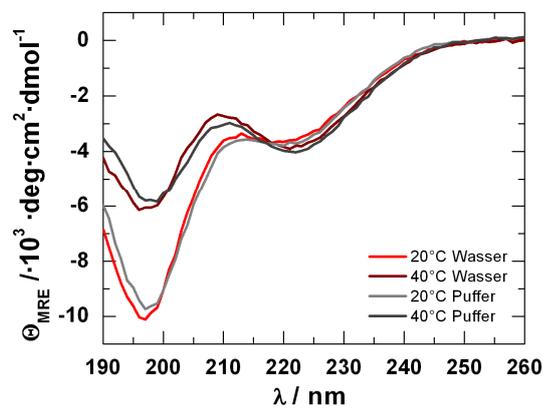


Abbildung A - 32: Vergleich der CD-Spektren von Poly-(MA-ELP) in Wasser und 2 mM Natriumphosphat-puffer mit pH = 7.4, je $c = 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
A	Experimentell bestimmte Basislinie
A_2	Zweiter Virialkoeffizient
α	Polarisierbarkeit
ΔA	Zirkulardichroismus
A_L, A_R	Absorption von links bzw. rechts polarisiertem Licht
AFM	„Atomic force microscopy“
ATRP	„Atom Transfer Radical Polymerization“
B	Signal-Rausch Verhältnis
β	Isotherme Kompressibilität
BM-DC	Dendritische Knochemarkzellen („bone marrow dendritic cells“)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
c	Konzentration der Probe
C	Dimensionslose Größe, von der Molekülstruktur abhängig
CD	Zirkulardichroismus
$CDCl_3$	Deuteriochloroform
CDI	Carbonyldiimidazol
CIP	„Calf Intestinal Phosphatase“
D	Translatorischer Diffusionskoeffizient
d	Durchmesser
D_i	Translatorischer Diffusionskoeffizient der Teilchensorte i
$\Delta\mu$	Differenz der chemischen Potentiale von Lösung und Lösungsmittel
$\left(\frac{dn}{dc}\right)$	Brechungsindexinkrement (nach der Konzentration)
$\left(\frac{dn}{d\rho}\right)$	Brechungsindexinkrement (nach der Dichte)
DC	Dünnschichtchromatografie
DCM	Dichlormethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DP	Polymerisationsgrad
DSC	„Differential Scanning Calorimetry“
E	Energie
\vec{E}	Elektrische Feldvektor

ϵ_L, ϵ_R	Molarer (dekadischer) Absorptionskoeffizient
EBP	„Elastin-based sidechain Polypeptide“
ELP	„Elastin-like Polypeptide“
EPR	„Enhanced Permeation and Retention“
ESI-TOF-MS	„Electrospray ionization time of flight mass spectrometry“
η	Viskosität des Lösungsmittels
$[\eta]$	Intrinsische Viskosität
f_0	Reibungskoeffizient
$\langle F \rangle / N$	Fluoreszenzhelligkeit
$\delta F(t)$	Fluoreszenz-Intensität
FT	Fouriertransformation
$g_2(t)$	Autokorrelationsfunktion
G	Glycin
Gly	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatografie
HCl	Salzsäure
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
I	Isoleucin
$I(0)$	Streuamplitude zum Zeitpunkt 0
$I(n \cdot \tau)$	Streuamplitude zum Zeitpunkt $n \cdot \tau$
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	„Immobilized pH gradient“
IR	Infrarot
ITT	Inverser Temperaturübergang
ITC	„Inverse Transition Cycling“
K	Lysin
k	Tausend
K	Optische Konstante
k	Boltzmann-Konstante
k, k'	Spreizfaktor
λ_0	Wellenlänge des eingehenden Strahls
L	Links

7 Anhang

L	Leucin
l	Schichtdicke
l_k	Kuhn-Segmentlänge
LCST	„Lower critical solution temperature“
MALDI	„Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation“
M	Molekulargewicht
M	Molarität
m	Anzahl der Wiederholungseinheiten
\vec{m}	Dipolmoment
m_i	Massenanteil der Teilchensorte i
M_0	Molekulargewicht des Lösungsmittels
MD	„Molecular Dynamics“
M_i	Molmasse der Teilchensorte i
$\overline{M_w}$	Massenverteiltes Gewichtsmittel
MS	Massenspektrometrie
n, n_0	Brechungsindex von Lösung und Lösungsmittel
n	Anzahl der Intervalle
N	Anzahl der Streuzentren
N	Durchschnittliche Anzahl an Farbstoffmolekülen
N_A	Avogadrokonstante
N_L	Avogadrokonstante
n_r	Anzahl der Aminosäuren
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMM	N-Methyl-Morpholin
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance“
NP	„Normal phase“
Ω	Winkel zwischen der Membran-Normalen und dem initialen Kontaktpunkt
P	Prolin
$P(q)$	Formfaktor
P(CB)	Poly-(Carboxybetain)
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PEG	Poly-(Ethylenglykol)
Pre-RDL	„Recursive directional ligation by plasmid reconstruction“

Pro	Prolin
P(SB)	Poly-(Sulfobetain)
π	Osmotischer Druck
q	Streuvektor
R	Ideale Gaskonstante
R(θ)	Rayleigh-Verhältnis
RAFT	„Reversible addition–fragmentation chain transfer“
RDL	„Recursive directional ligation“
RES	Retikuloendotheliales System
ρ, ρ_0	Dichte der Lösung bzw. des Lösungsmittels
RI	„Refractive Index“
RKM	Rasterkraftmikroskopie
$\langle R_g^2 \rangle_z$	z-Mittel des quadratischen Trägheitsradius
R_h	Kugeläquivalente hydrodynamische Radius
ROMP	„Ring-opening methasis polymerization“
RP	„Reverse phase“
S	Serin
S	Strukturparamter
s	Flugstrecke
S_D	Schichtdicke der Küvette
SDS-PAGE	„Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
$S(q)$	Statischer Strukturfaktor
$S(q, t)$	Dynamischer Strukturfaktor
T	Absolute Temperatur in Kelvin
τ	Zeitintervall
t	Flugzeit
τ_D	Durchschnittliche Diffusionszeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TFA	Trifluoressigsäure
U	Beschleunigungsspannung
Ü	Überlebensrate
θ	Streuwinkel
θ_{mr}	Mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure

7 Anhang

Tof	„Time of Flight“
t_R	Retentionszeit
T_t	Übergangstemperatur
UV	Ultraviolett
V	Valin
V	Konfokales Detektionsvolumen
V^*	Dimensionsloses Partikelvolumen
V_h	Hydrodynamisches Volumen
Val	Valin
v_p	Partielles Molvolumen des Polymers
z	Ladungszahl

