

Synthese und Charakterisierung von zylindrischen Bürsten mit Polypeptidseitenketten

Dissertation

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

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

Mike Sahl

Mainz 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2008 bis Februar 2011 am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 21.02.2011

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



(Mike Sahl)

„Die Wissenschaft richtig verstanden, heilt den Menschen von seinem Stolz;

denn sie zeigt ihm seine Grenzen“

(Albert Schweizer)

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die grafting-from-Methode verschiedene geschützte Polypeptidbürsten basierend auf L-glutaminsäure, L-asparaginsäure, L-lysin und L-ornithin synthetisch zugänglich sind. Zur Verwirklichung dieser Synthesestrategie wurde mehrstufig ein Makroinitiator auf Basis von N-methacrylamid-1,6-diaminohexan hergestellt, der die ringöffnende Polymerisation von Leuchs'schen Anhydriden zur Entwicklung von geschützten Polypeptidseitenketten initiieren kann.

Durch stark saure bzw. alkalische Abspaltbedingungen war es möglich, die Schutzgruppen bei allen geschützten Bürsten bis auf eine Spezies erfolgreich zu entfernen.

Weitergehende Untersuchungen an den positiv bzw. negativ geladenen Polyelektrolytbürsten mittels statischer Lichtstreuung und Kapillarelektrophorese zeigten, dass lediglich die Z-geschützten Poly-L-lysinbürsten ohne Kettenabbau entschützt werden konnten. In allen anderen Fällen wurden nach Abspaltung der Schutzgruppen lineare Kettenfragmente detektiert.

Durch die Zugabe von NaClO_4 oder Methanol zu den wässrigen Lösungen der Poly-L-lysinbürsten konnte mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Seitenketten von einer ungeordneten Konformation in eine α -helikale Konformation übergehen. In weiterführenden Experimenten wurde mittels statischer Lichtstreuung, dynamischer Lichtstreuung, SAXS, und AFM-Aufnahmen in Lösung bewiesen, dass die helikale Konformation der Seitenketten eine deutliche Abnahme des Zylinderquerschnitts und des Querschnittsträgheitsradius zur Folge hat, die Topologie der Bürste allerdings unverändert bleibt.

Weiterhin konnte mittels Kapillarelektrophorese die elektrophoretische Mobilität der Poly-L-lysinbürsten und ihrer linearen Analoga bestimmt werden. Mit diesen Resultaten war es in Kombination mit statischen Lichtstreuexperimenten möglich, die effektive Ladung von linearem und verzweigten Poly-L-lysin nach einer Theorie von Muthukumar zu berechnen. Das Ergebnis dieser Rechnungen bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen von Peter Dziezok, der in seiner Dissertation durch Leitfähigkeits- und Lichtstremessungen an linearem PVP und PVP-Bürsten herausfand, dass die effektive Ladung von Polymerbürsten mindestens um einen Faktor 10 kleiner ist als bei den korrespondierenden linearen Analoga.

Summary

The present study shows that polypeptide brushes consisting of Z-protected poly-L-lysine, TFA-protected poly-L-lysine, Z-protected poly-L-ornithine, TFA-protected poly-L-ornithine, benzyl-protected poly-L-glutamic acid, methyl protected poly-L-glutamic acid and benzyl-protected poly-L-aspartic acid are synthetically accessible by use of the grafting-from method. To achieve this multi-step synthesis strategy, a macroinitiator based on N-methacrylamide-1,6-diaminohexan was used to develop the protected polypeptide side chains via ring opening polymerization of Leuchs anhydrides.

The protection groups of the brushes could be removed by applying strong acidic or alkaline conditions depending on the reactivity of the protection group.

Further studies on the positively or negatively charged polyelectrolyte brushes by static light scattering and capillary electrophoresis proved that only the Z-protected poly-L-lysine brushes could be deprotected without chain degradation. In all other cases linear chain fragments generated by hydrolyses of the peptide side chains were detected after cleavage of the protection groups.

Concerning the secondary structures of the poly-L-lysine side chains, CD-measurements showed that a coil α -helix transition can be achieved by adding NaClO_4 or methanol to an aqueous solution of the poly-L-lysine brushes. Although light scattering and AFM experiments in solution proved that the α -helical conformation of the side chains does not change the topology of the brushes, a strong decrease of the cross-section radius of gyration (SAXS) and the cross section (AFM in solution) was detected under these conditions.

Furthermore the electrophoretic mobility of the poly-L-lysine brushes and linear poly-L-lysine was determined via capillary electrophoresis. With the help of these results and static light scattering experiments, the effective charge of the poly-L-lysine derivatives was calculated using Muthukumar's theory. The calculations show that the effective charge of poly-L-lysine brushes is at least ten times smaller in comparison to the linear analogues.

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Zielsetzung.....	3
Kapitel 2: Theoretische Grundlagen.....	4
2.1 Synthesestrategien zur Herstellung von Polymerbürsten.....	4
2.2 Mechanismen der ringöffnenden Polymerisation.....	7
2.3 Die Herstellung von Polypeptidbürsten: eine Zusammenfassung.....	11
2.4 Sekundärstrukturen von Flaschenbürstenpolymeren.....	15
Kapitel 3: Analysemethoden.....	19
3.1 Gelpermeationschromatographie.....	19
3.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	20
3.3 Gaschromatographie.....	22
3.4 Kapillarelektrophorese.....	23
3.5 Statische Lichtstreuung.....	27
3.6 Dynamische Lichtstreuung.....	30
3.7 Röntgenkleinwinkelstreuung.....	33
3.8 Kernspinresonanzspektroskopie.....	34
3.9 Zirkulardichroismus.....	36
3.10 UV-VIS.....	40
3.11 Rasterkraftmikroskopie.....	41
Kapitel 4: Herstellung von Polypeptidbürsten.....	44
4.1 Monomersynthese zur Herstellung des Makroinitiatorprecursors.....	44
4.2 Herstellung des Makroinitiatorprecursors.....	47
4.3 Synthese und Charakterisierung von Leuchs´schen Anhydriden.....	53
4.4 Synthese und Charakterisierung von geschützten Polypeptidbürsten.....	57
4.5 Synthese von kationisch geladenen Polypeptidbürsten.....	63
4.6 Synthese von anionisch geladenen Polypeptidbürsten.....	71
4.7 Zusammenfassung von Kapitel 4.....	78
Kapitel 5: Sekundärstrukturen von Poly-L-lysinbürsten.....	80
5.1 Sekundärstrukturen von Poly-L-lysinbürsten durch Zugabe von NaClO ₄	81

5.2 Bestimmung der Topologie von Poly-L-lysinbürsten im α -helikalen Zustand, induziert durch die Zugabe von NaClO ₄	84
5.3 Sekundärstrukturen von Poly-L-lysinbürsten durch Zugabe von MeOH.....	93
5.4 Bestimmung der Topologie von Poly-L-lysinbürsten im α -helikalen Zustand, induziert durch die Zugabe von MeOH.....	96
5.5 Änderung der Querschnittsträgheitsradien der Bürsten durch die helikale Konformation der Seitenketten.....	102
5.6 Berechnung der Kuhnlänge von Poly-L-lysinbürsten auf Basis des Wurmkettenmodells von Kratky und Porod.....	106
5.7 Zusammenfassung von Kapitel 5.....	108
Kapitel 6: Bestimmung der effektiven Ladung von Poly-L-lysinbürste...	110
6.1 Zusammenfassung von Kapitel 6.....	119
Zusammenfassung und Ausblick.....	120
Zusammenfassung.....	120
Ausblick.....	122
Kapitel 7: Experimenteller Teil.....	123
7.1 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel.....	123
7.2 Synthesevorschriften.....	126
7.3 Verwendete Geräte.....	138
8. Anhang.....	141
8.1 Zusätzliche Daten und Ergebnisse.....	141
8.2 Symbol und Abkürzungsverzeichnis.....	173
Danksagung.....	177

Kapitel 1: Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaute Makromoleküle und gehören zu den Grundbausteinen aller Zellen. Sie verleihen der Zelle nicht nur Struktur, sondern sind die molekularen „Maschinen“, die Stoffe transportieren, Ionen pumpen, chemische Reaktionen katalysieren und Signalstoffe erkennen ^[1].

Als Primärstruktur eines Proteins wird die Abfolge (Sequenz) der einzelnen Aminosäuren einer Polypeptidkette bezeichnet.

Die Sekundärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung der Aminosäuren. Man unterscheidet dabei meistens zwischen folgenden Strukturmotiven: α -Helix, β -Faltblatt, β -Schleifen und ungeordnete, so genannte random-coil-Strukturen.

Fast alle in der Natur vorkommenden Proteine besitzen nicht nur eine definierte Sekundärstruktur, sondern bilden in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz eine Aneinanderreihung verschiedener Sekundärstrukturen aus, welche für die übergeordnete räumliche Ausdehnung der Proteine (Tertiärstruktur) verantwortlich ist.

Die Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen ist seit mehr als 60 Jahren in Bereichen der Medizin, Physik, Chemie und Biologie Gegenstand der Forschung, da sie maßgeblich die biologische Aktivität von Proteinen beeinflusst ^[2-3].

Änderungen der Sekundärstruktur von Proteinen können aus diesem Grund Krankheiten wie z.B. Alzheimer oder Parkinson verursachen ^[4-7].

Durch den Einsatz verschiedener physikalischer Analysemethoden (NMR, IR, SAXS, CD-Spektroskopie etc.) sind Forscher mittlerweile in der Lage, die Änderungen der Sekundärstruktur zu detektieren ^[8-10]. Nichts desto trotz ist es aufgrund der Komplexität der Proteine immer noch schwierig zu verstehen, durch welche Einflüsse diese Änderungen und die damit verbundenen biologischen Fehlfunktionen hervorgerufen werden.

Deshalb untersuchen Forscher bis heute Modellsysteme, die wie die Proteine ein Sekundärstrukturverhalten aufweisen, jedoch aufgrund ihrer relativ simplen chemischen Struktur einfacher zu verstehen sind.

Die Makromolekulare Chemie liefert hierfür eine große Anzahl von Verbindungen, die seit der Mitte des 20. Jahrhunderts bezüglich ihres Sekundärstrukturverhaltens studiert werden. Bei diesen Verbindungen handelt es sich oft um lineare Polypeptidketten, die meistens durch ringöffnende Polymerisation von Leuchs'schen Anhydriden dargestellt werden. Gängige Polypeptide deren Sekundärstrukturverhalten bis heute im Fokus der Forschung steht, sind z.B. lineare Polyelektrolyte wie Poly-L-lysin oder Poly-L-glutaminsäure ^[11-14].

Ein jüngeres Forschungsgebiet beschäftigt sich mit dem Sekundärstrukturverhalten von verzweigten Polypeptiden, das sich von dem der linearen Analoga unterscheidet. Nolte und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ein Rückgrat mit helikaler Konformation die Seitenketten einer Polymerbürste in eine β -Faltblattstruktur überführt ^[15].

Die helikale Anordnung einer Aneinanderreihung von β -Faltblattsegmenten wird auch als β -Helix bezeichnet. Dieses Strukturmotiv wurde erstmalig 1993 in einem natürlich vorkommenden Protein, der Pektat Lyase entdeckt und ist seitdem Zeitpunkt Gegenstand vieler Forschungsarbeiten, weil es mit der Alzheimerkrankheit in Verbindung gebracht wird. Wissenschaftliche Arbeiten neueren Datums zeigen, dass die Ausbildung von β -Helices bei Beta-Amyloid-Peptiden die Bildung von Aggregaten fördert und dadurch Proteinablagerungen auf den Nervensträngen im menschlichen Gehirn entstehen, die die Symptome der Alzheimerkrankheit hervorrufen ^[16-17].

Ähnliche Resultate wie die der Nolte-Gruppe konnten auch von Dr. Yang Cong, einer ehemaligen Mitarbeiterin der Schmidtgruppe, erzielt werden. Cong überführte die Seitenketten einer Poly-L-lysinbürste durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat in eine β -Faltblattkonformation, wodurch die vormals zylinderförmigen Bürstenpolymere die Topologie von supramolekularen Helices annahmen ^[18].

Die Arbeiten von Nolte und Cong zeigen eindrucksvoll, wie die Konformation von Seitenketten und Rückgrat sich gegenseitig beeinflussen können. So gut wie keine Informationen gibt es allerdings über die Änderung der Topologie von Polymerbürsten, deren Seitenketten von einer random-coil-Konformation in eine α -helikale Konformation gezwungen werden. Über diese Thematik gibt es nach Kenntnisstand des Autors bis jetzt nur ein paar theoretische Arbeiten (Computersimulationen), und lediglich eine Veröffentlichungen die sich mit den praktischen Aspekten dieser interessanten Fragestellung beschäftigt hat ^[19-22].

1.2 Zielsetzung:

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Reihe von zylindrischen Bürsten mit unterschiedlich langen Seitenketten zu synthetisieren und den Effekt der Seitenkettenkonformation auf die Hauptkette systematisch zu untersuchen.

Im Mittelpunkt steht die Frage, ob die Polypeptidseitenketten von einer Knäuelkonformation in eine helikale Konformation durch Änderung von pH, Salz, Temperatur oder Lösungsmittelzusammensetzung etabliert werden können und welche Auswirkung dies auf die Struktur des Gesamtmoleküls hat.

Aufbauend auf Vorarbeiten des AK-Schmidt sollen dazu durch grafting-from-Polymerisation der Leuchs'schen Anhydride des L-lysins, des L-ornithins, der L-asparaginsäure und der L-glutaminsäure Bürsten von einem möglichst hochmolekularen Makroinitiators dargestellt und durch Streumethoden, CD-Spektroskopie, Kapillarelektrophorese und AFM bezüglich Molmasse, Größe, Topologie und effektiver Ladungsdichte detailliert charakterisiert werden.

Literatur zu Kapitel 1

- [1] D. Voet, J. G. Voet; *Biochemie, J. Wiley & Sons*, (2004)
- [2] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler; *Biophysik, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York* (1982)
- [3] K. E. van Holde, W. C. Johnson, P.S. Ho; *Physical Biochemistry, Pearson Education International, New York* (2006)
- [4] D.J. Selkoe; *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1054 (2004)
- [5] B. Caughey, P. T. Lansbury; *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267 (2003)
- [6] K. M. Pan; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **90**, 10962 (1993)
- [7] Z. Huang, S.B. Prusiner, F.E. Cohen; *Structures of prion proteins and conformational models for prion diseases IN Prions Prions Prions, Springer-Verlag, Berlin* (1996)
- [8] Y. H. Chen, J. T. Yang, H. M. Martinez; *Biochemistry*, **11**, 4120 (1972)
- [9] A. Dong, P. Huang, W. S. Caughey; *Biochemistry*, **29**, 3303 (1990)
- [10] P. Garcia, L. Serrano, D. Durand, M. Rico, M. Bruix; *Protein Sci.*, **10**, 1100 (2001)
- [11] K. E. Gebhardt, S. Ahn, G. Venkatachalam, D. A. Savin; *Langmuir*, **23**, 2851 (2007)
- [12] K. M. Hawkins, S. S. S. Wang, D. M. Ford, D. F. Shantz; *JACS*, **126**, 9112 (2004)
- [13] A. M. Pilbat, V. Ball, P. Schaaf, J. C. Voegel, B. Szalontai; *Langmuir*, **22**, 5753 (2006)
- [14] K. Inoue, N. Baden, M. Terazima; *J. Phys. Chem B.*, **109**, 22623 (2005)
- [15] J.J. L. M. Cornelissen, J. J. J. M. Donners, R. de Gelder, W. S. Graswinckel, G. A. Metselaar, A.E. Rowan, N. A. J. M. Sommerdijk, R. J. M. Nolte; *Science*, **293**, 676 (2001)
- [16] N. Gunari, Y. Cong, B. Zhang, K. Fischer, A. Janshoff, M. Schmidt; *Macromol. Rapid Commun.*, **29**, 821 (2009)
- [17] C. Govaerts, H. Wille, S.B. Prusiner, F.E. Cohen; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8342 (2004)
- [18] R. Wetzel; *Structure* **10**, 1031 (2002)
- [19] R. Stepanyan, A. Subbotin, G. ten Brinke; *Phys. Rev E.*, **63**, 61850 (2001)
- [20] A. Subbotin, M. Saariaho, R. Stepanyan, O. Ikkala, G. ten Brinke; *Macromolecules*, **33**, 6168 (2000)
- [21] M. Saariaho, A. Subbotin, I. Szleifer, O. Ikkala, G. ten Brinke; *Macromolecules*, **32**, 4439 (1999)
- [22] A. Zhang, Y. Guo; *Chem. Eur. J.*, **14**, 8939 (2008)

Kapitel 2: Theoretische Grundlagen

2.1 Synthesestrategien zur Herstellung von Polymerbürsten

Grafting-through-Methode

Als grafting-through-Methode bezeichnet man die Herstellung von Polymerbürsten durch Polymerisation von Makromonomeren (Abb. 2.1.1). Bei einem Makromonomer handelt es sich um eine Oligomerkette, die an einem Ende mit einer polymerisierbaren Gruppe verbunden ist.

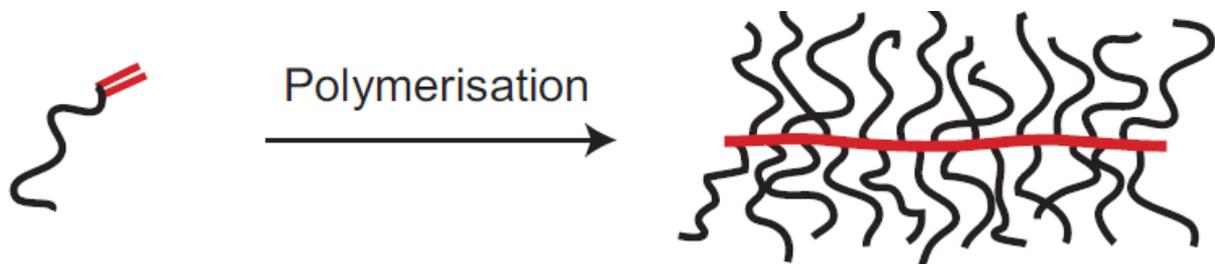


Abbildung 2.1.1: Schematische Darstellung der grafting-through-Methode

Die Oligomere werden in der Regel durch lebende anionische Polymerisation hergestellt. Diese Polymerisationstechnik bietet zum einen eine hohe Kontrolle über die Länge des Oligomers, verknüpft mit einer geringen Polydispersität und zum anderen die Möglichkeit definierte Blockstrukturen herzustellen.

Als Abbruchreagenzien dienen normalerweise Vinylderivate, um das Oligomer zum Makromonomer zu funktionalisieren ^[1]. Alternativ ist es aber auch möglich, als polymerisierbare Endgruppe ein Norbornylderivat zu verwenden. Dieses System wurde erfolgreich, von Valérie Héroguez und Yves Gnanou eingeführt ^[2-6]. Anstatt der radikalischen Polymerisation die im Fall der vinylfunktionalisierten Makromonomere Anwendung findet, wird bei diesem System die ringöffnende Metathesepolymerisation zur Herstellung der Bürste verwendet. Weitere Arbeiten mit diesem System wurden von Grubbs und Bowden veröffentlicht. Grubbs war es möglich, mit Hilfe der REMP norbornylfunktionalisierte Phenoldendrimere zu ringförmigen Nanostrukturen zu polymerisieren ^[7]. Bowden gelang es norbornylfunktionalisierte Polylactide zu Bürsten mit Molekulargewichten bis zu 1.2E07 g/mol durch ROP herzustellen ^[8].

Bei der Polymerisation der Makromonomere ist zu beachten, dass man stark konzentrierte Systeme verwenden muss, um einen hohen Polymerisationsgrad bezüglich des Rückgrats erzielen zu können ^[9-10]. Dies ist insbesondere bei der radikalischen Polymerisation der

Makromonomere von entscheidender Bedeutung, weil die Lebensdauer von Radikalen in Systemen mit hohen Viskositäten wesentlich erhöht ist.

Die Pfropfdichte der Seitenketten am Rückgrat der Bürste beträgt immer 100 %, was den größten Vorteil der grafting-through-Methode darstellt. Des Weiteren ist es mit dieser Methode relativ einfach möglich, Kern-Schale-Strukturen zu herzustellen. Dies kann zum einen durch die Verwendung eines Blockmakromonomers realisiert werden, bzw. durch Polymerisation einer Mischung aus verschiedenen Makromonomeren ^[11-12].

Von großem Nachteil hingegen ist die breite Verteilung der Bürste, die man durch die Polymerisation der Makromonomere erhält, sowie die notwendige Abtrennung der nicht umgesetzten Makromonomere vom Produkt. Außerdem gelingt es nur in einzelnen Fällen, Bürsten mit Seitenketten zu synthetisieren, deren mittlere Anzahl an Wiederholungseinheiten größer 40 ist.

Grafting-from-Methode

Bei der grafting-from-Methode wird im ersten Schritt das Rückgrat der Polymerbürste synthetisiert und mit funktionellen Gruppen versehen, die im zweiten Schritt die Polymerisation der Seitenketten initiieren (Abb. 2.1.2).

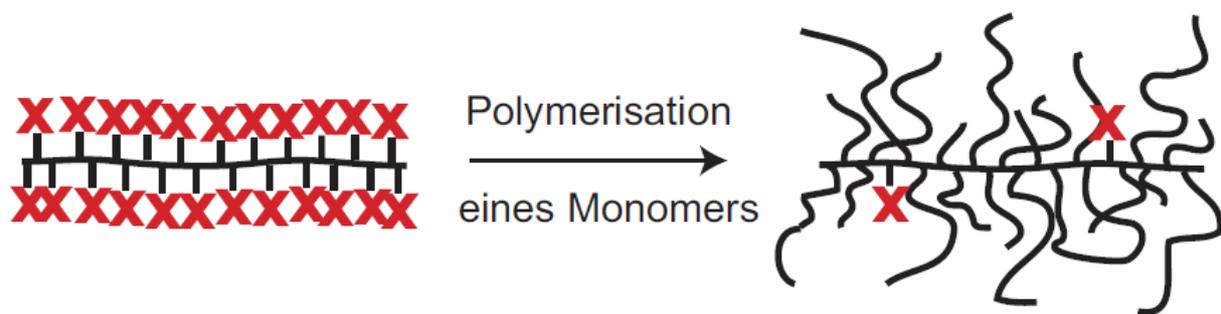


Abbildung 2.1.2: Schematische Darstellung der grafting-from-Methode

Ein gängiges System für diese Methode stellt ein Poly(hydroxyethylmethacrylat)-Rückgrat dar, welches in einem zweiten Schritt mit Bromo-iso-Buttersäurebromid funktionalisiert wird. Die Polymerisation der Seitenketten wird anschließend durch ATRP an den Bromid-funktionalisierten Enden der Monomereinheiten gestartet. Durch sequentielle Zugabe der Monomere ist bei dieser Methode die Synthese von Bürsten mit Kern-Schale-Struktur möglich. Aufgrund der Tatsache, dass das Rückgrat der Bürste in einem separaten Schritt hergestellt wird, können durch geschickte Copolymerisation Polymerketten synthetisiert werden, bei denen die Konzentration an initiierendem Monomer entlang der Kette abnimmt. Wird dieses Polymer als Makroinitiator verwendet ist es möglich, eine sog. Gradientenbürste zu synthetisieren, bei der die Pfropfdichte entlang des Rückgrats stetig abnimmt ^[13-18].

Ein weiteres System was in der Vergangenheit oft verwendet wurde und auch in dieser Dissertation Anwendung findet, ist ein aminofunktionalisiertes Rückgrat, mit der man Leuchs'sche Anhydride ringöffnend zu Polypeptidbürsten polymerisieren kann ^[19-21].

Werden Blockcopolymere als Makroinitiator verwendet, die nur einen funktionalisierten Block enthalten, können sogenannte rod-coil-Polymere hergestellt werden, die durch Selbstorganisation supramolekulare Strukturen ausbilden können ^[22]. Durch Verwendung von orthogonalen Schutzgruppen ist es sogar möglich, Block-Bürsten zu synthetisieren ^[23].

Allgemein kann man also sagen, dass ein großer Vorteil der grafting-from-Methode der unabhängige Aufbau des Rückgrats ist, mit der man die Möglichkeit besitzt, Bürstenstrukturen zu synthetisieren (rod-coil-Bürsten, Block-Bürsten, Gradientenbürsten), die mit der grafting-through- bzw. grafting-onto-Methode nur schwer zugänglich sind. Außerdem lässt sich durch den unabhängigen Aufbau des Rückgrats die Länge bzw. die Polydispersität der Bürste wesentlich genauer kontrollieren als z.B. bei der grafting-through-Methode.

Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Tatsache, dass bei der Polymerisation der Seitenketten häufig keine linearen Verunreinigungen entstehen. Somit ist es wesentlich einfacher die Bürsten aufzureinigen, weil lediglich das nicht umgesetzte Monomer vom Produkt abgetrennt werden muss.

Von großem Nachteil ist mit Sicherheit, dass keine 100 %ige Pfropfdichte der Seitenketten erreicht werden kann, es sei denn, die Seitenketten können abgespalten und separat charakterisiert werden. Die grafting density von Bürsten die nach dieser Methode hergestellt werden, variiert je nach System zwischen 30 bis 90 % ^[14-15, 19]. In vielen Fällen ist es zudem nicht möglich, verlässliche Daten über die grafting density zu ermitteln. Weiterhin sollte beachtet werden, dass eine unabhängige Analyse der Seitenketten bei dieser Methode meistens nicht vorgenommen werden kann, weil es in den meisten Fällen nicht möglich ist, die Seitenketten der Bürste vom Rückgrat abzutrennen. Aus diesem Grund ist es z.B. äußerst schwierig, die mittlere Länge der Seitenketten zu ermitteln. Eine solche Analyse kann nur dann exakt durchgeführt werden, wenn sich die Möglichkeit bietet, die grafting density der Bürste, ihr Molekulargewicht und die mittlere Anzahl der Monomereinheiten des Rückgrats zu bestimmen.

Grafting-onto-Methode

Bei der grafting-onto-Methode werden Rückgrat und Seitenketten der Bürste in separaten Schritten voneinander synthetisiert und anschließend in einem finalen Schritt miteinander verbunden (Abb. 2.1.3). Die Seitenketten, sowie auch das Rückgrat müssen in diesem Fall funktionelle Gruppen tragen, damit beide Komponenten miteinander verbunden werden können.

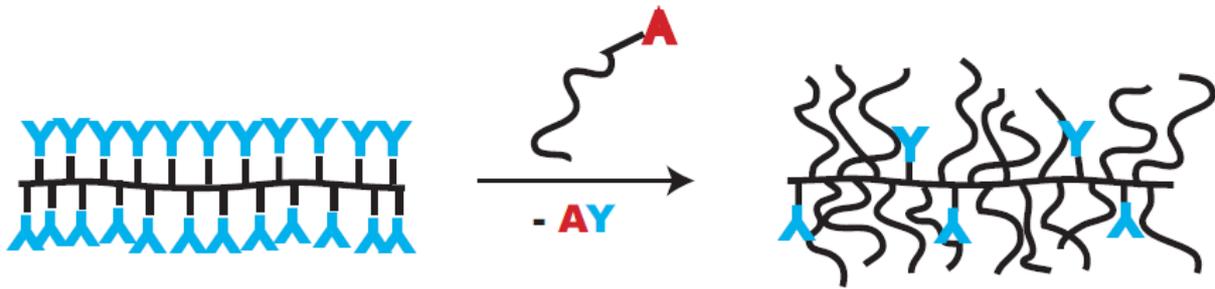


Abbildung 2.1.3: Schematische Darstellung der grafting-from-Methode

Normalerweise geschieht die Verknüpfung der Komponenten durch eine lebend anionische Polymerisation der Seitenketten, die durch Zugabe eines Rückgrats mit elektrophilen Gruppen zu einer Bürste bzw. sternförmigen Nanostrukturen (je nach Länge des Rückgrats) miteinander verbunden werden ^[24-26].

Ein besonders erfolgreiches System ist die von Deffieux und Schappacher eingeführte Kombination einer lebend kationisch hergestellten Poly(chlorethylvinylether) (PCEVE) Hauptkette mit durch Diphenylethylen-Endgruppen stabilisierten lebenden anionischen Seitenketten. Verwendet man Blockcopolymerer als Seitenketten, ist es mit Hilfe dieser Technik möglich, Kern-Schale-Strukturen zu erzeugen. Durch den Einsatz eines Blockcopolymerer als Rückgrat, das nur einen funktionalisierten Block hat, ist es wie bei der grafting-from-Methode möglich, rod-coil-Nanostrukturen zu synthetisieren ^[26-30].

Der größte Vorteil der grafting-onto-Methode ist sicherlich das unabhängige Design der Seitenketten und des Rückgrats, dass es ermöglicht, wohl definierte Bürstenstrukturen zu erzielen. Insbesondere die gleichzeitige Kontrolle über die Polydispersität von Haupt und Seitenkette stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber der grafting-from bzw. grafting-through-Methode dar, bei denen nur die Polydispersität der Hauptkette bzw. der Seitenketten kontrolliert werden kann.

Nachteile dieser Methode sind die möglicherweise geringen Pfropfdichten der Seitenketten, sowie die Abtrennung von überschüssigen Seitenketten, die im finalen Verbindungsschritt nicht mit dem Rückgrat reagiert haben. Des Weiteren ist es wie bei der grafting-from-Methode äußerst schwierig, die grafting density der Bürste zu bestimmen.

2.2 Mechanismen der ringöffnenden Polymerisation

Bezüglich der ringöffnenden Polymerisation von Leuchs'schen Anhydriden gibt es zwei verschiedene Mechanismen, die während dieser Reaktion ablaufen können ^[31-32]. Die Mechanismen werden als aktivierter Monomermechanismus bzw. Aminmechanismus

bezeichnet. Die Entscheidung welcher der beiden Mechanismen während der Polymerisation abläuft, wird von der chemischen Beschaffenheit des Initiators getroffen. In den meisten Fällen laufen aber beide Mechanismen nebeneinander ab. Der aktivierte Monomermechanismus stellt somit eine Nebenreaktion des Aminmechanismus dar und umgekehrt.

Der aktivierte Monomermechanismus

Abbildung 2.2.1 zeigt das Reaktionsprinzip, das beim aktivierten Monomermechanismus durchlaufen wird. Im ersten Schritt wird das Leuchs'sche Anhydrid am Amidstickstoff vom Initiator deprotoniert. Das negativ geladene Monomer attackiert im nächsten Schritt ein anderes neutrales Monomer, wodurch die Ringstruktur von diesem Monomer geöffnet wird. Es entsteht ein anionisches Zwischenprodukt, was ein weiteres Leuchs'sches Anhydrid am Amidstickstoff deprotoniert. Nach der Neutralisation des Zwischenprodukts findet ein Wasserstofftransfer statt und durch Abspaltung von CO_2 kommt es zur Entstehung des N-aminoacyl NCA's. Weiterhin übrig ist ein negativ geladenes Monomer was, wie oben beschrieben, ein anderes neutrales Monomer angreifen kann oder in Reaktion mit der Ringstruktur des N-aminoacyl NCA's tritt und ein Trimer bildet. Am Anfang des aktivierten Monomermechanismus werden somit Oligomere gebildet, die gegen Ende, wenn fast alle Monomere umgesetzt sind, miteinander zu langen Polypeptidketten kondensieren.

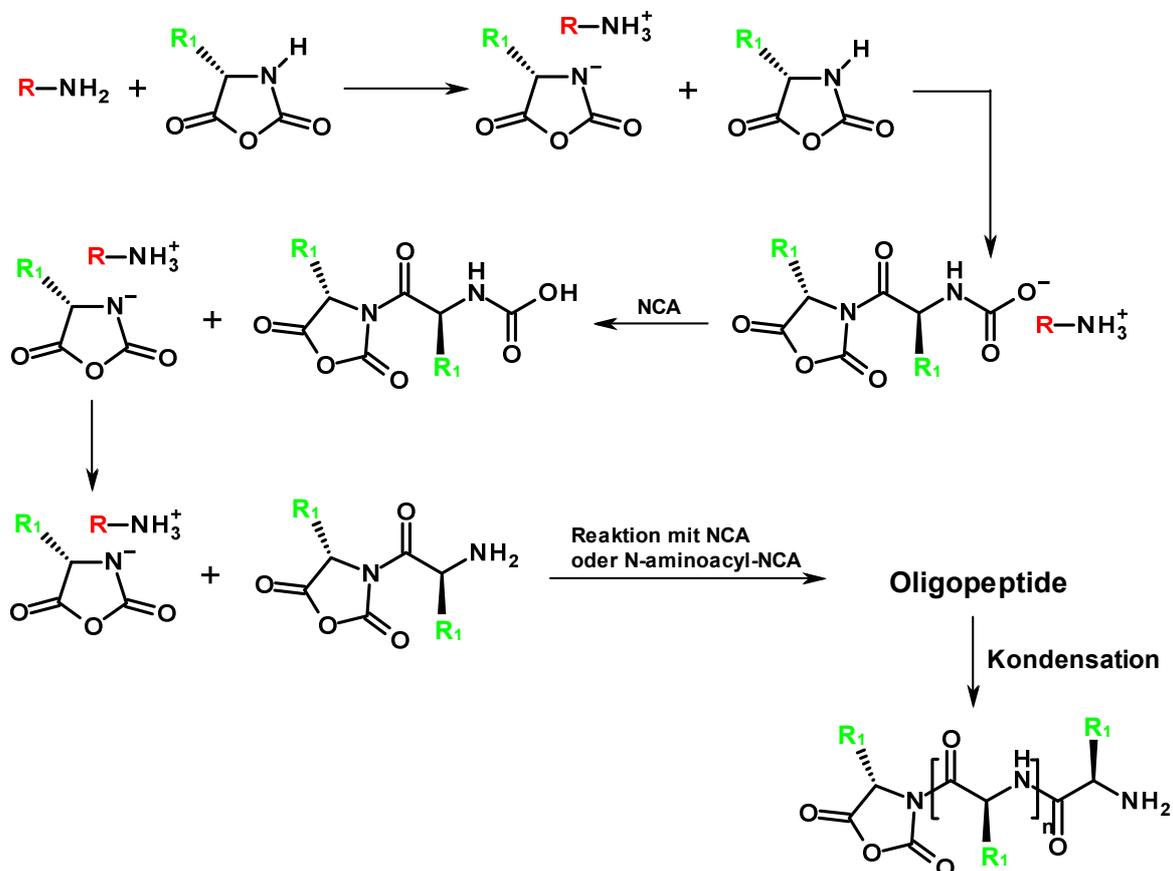


Abbildung 2.2.1: Reaktionsschema des aktivierten Monomermechanismus

Der Initiator ist bei diesem Mechanismus niemals mit den Kettenenden verbunden. Er hat lediglich die Aufgabe, Monomere am Anfang der Reaktion zu deprotonieren. Möchte man Polypeptide durch den aktivierten Monomermechanismus herstellen, so sollte der Initiator stark basische Eigenschaften und eine geringe Nukleophilie besitzen. Gängige Initiatoren für den aktivierten Monomermechanismus sind Alkalialkoholate, oder tertiäre Amine wie z.B. Triethylamin, DBN oder DBU.

Der Vorteil gegenüber dem Aminmechanismus liegt in den hohen Molekulargewichten der Polypeptide, die mit diesem Mechanismus erzielt werden können. Blout und Carlson haben dies äußerst eindrucksvoll bewiesen, in dem sie Benzyl-geschützte Poly-L-glutaminsäure mit Molekulargewichten von bis zu $1 \cdot 10^6$ g/mol erzielen konnten, durch Verwendung von Natriummethanolat als Initiator ^[33].

Der Aminmechanismus

Im Gegensatz zum aktivierten Monomermechanismus stellt der Aminmechanismus einen klassischen Kettenwachstumsprozess dar, wie er auch bei der lebenden anionischen Polymerisation vorliegt.

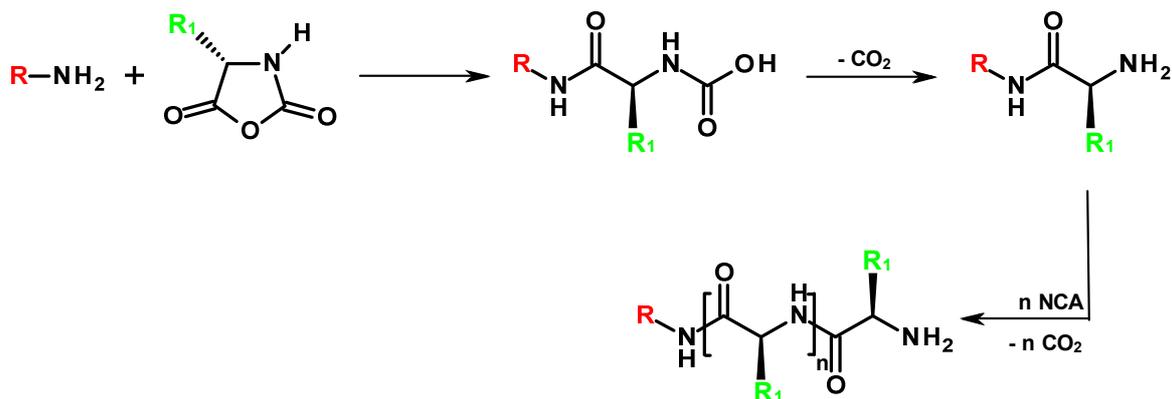


Abbildung 2.2.2: Reaktionsschema des Aminmechanismus

Im ersten Schritt greift der Initiator den Carbonylkohlenstoff in Nachbarschaft zum asymmetrischen C-Atom am Leuchs'schen Anhydrid an. Die Ringstruktur öffnet sich und es kommt zur Wasserstoffübertragung von der endständigen Säuregruppe auf den Amidstickstoff in Nachbarschaft zur Carbonylfunktion. CO_2 spaltet sich ab und es entsteht ein Aminosäurederivat, was über den C-Terminus mit dem Initiator verbunden ist. Der N-Terminus hingegen ist in der Lage, das nächste Monomer anzugreifen. Die Molekulargewichte die mit diesem Mechanismus erreicht werden können, liegen maximal bei etwa 160000 g/mol ^[34]. Sie sind somit wesentlich kleiner, verglichen mit Massen, die der aktivierte Monomermechanismus liefern kann. Allerdings ist wie schon angesprochen der

Initiator mit der Polypeptidkette verbunden, was für die Herstellung einer Polypeptidbürste nach der grafting-from-Methode unabdinglich ist.

Schlaad's Mechanismus

Möchte man einen aminofunktionalisierten Makroinitiator zur Herstellung einer Polypeptidkette verwenden, muss sicher gestellt sein, dass die Polymerisation nach dem Aminmechanismus abläuft. Tritt als Nebenreaktion der aktivierte Monomechanismus auf, wird am Ende der Polymerisation das Produkt mit linearen Polypeptidketten verunreinigt sein, die nur schwierig abzutrennen sind. 2003 entwickelte Helmut Schlaad eine Methode, den aktivierten Monomermechanismus vollständig zu unterdrücken^[35]. Schlaad entdeckte, dass es möglich ist, die ringöffnende Polymerisation von Leuchs'schen Anhydriden mit Ammoniumsalzen zu initiieren:

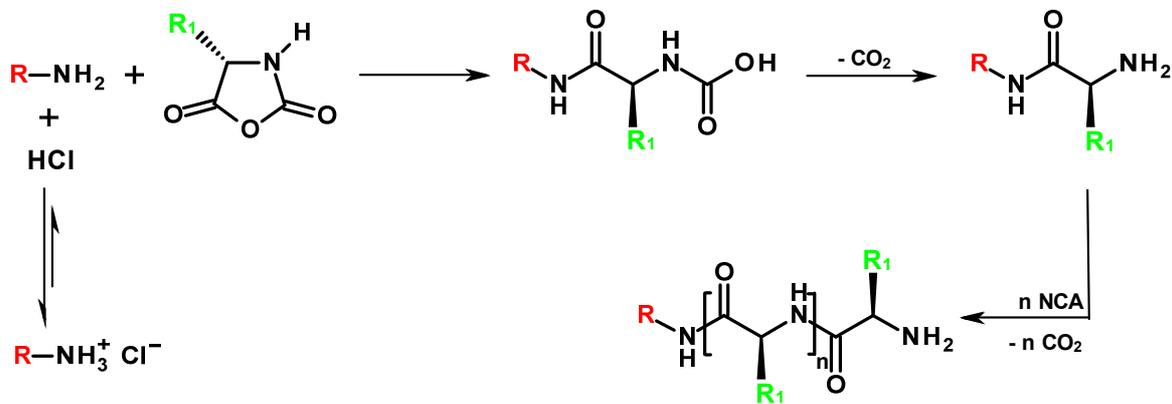


Abbildung 2.2.3: Reaktionsschema der ringöffnenden Polymerisation nach Schlaad's Methode

Die grundsätzliche Idee geht auf Knobler zurück, der Ammoniumsalze von Aminosäuren mit Leuchs'schen Anhydriden reagieren ließ, um Dipeptide herzustellen^[36].

Für die Polymerisation wird der Initiator in einem apolaren Lösungsmittel mit hoher Dielektrizitätskonstante gelöst und das Reaktionsgemisch auf etwa 60°C erhitzt. Unter diesen Bedingungen tritt ein Gleichgewicht zwischen der protonierten Form des Initiators (inaktive Form) und dem freien Amin (aktive Form) ein. Das freie Amin kann die Leuchs'schen Anhydride nach dem Aminmechanismus polymerisieren. Der aktivierte Monomermechanismus kann unter diesen Bedingungen allerdings nicht stattfinden, weil die freie Säure, die durch die Dissoziation des Ammoniumsalzes entsteht, die Deprotonierung der Leuchs'schen Anhydride verhindert:

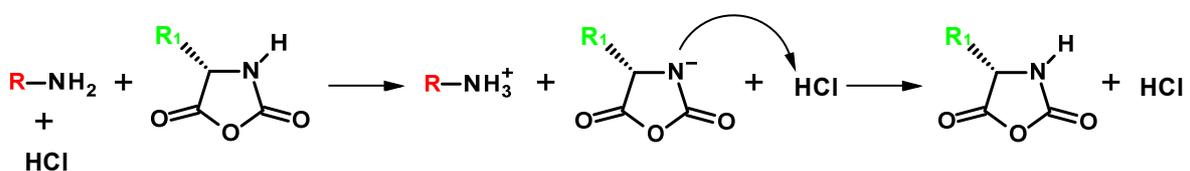


Abbildung 2.2.4: Reaktionsschema zur Inhibierung des aktivierten Monomermechanismus nach Schlaad's Methode

2.3 Die Herstellung von Polypeptidbürsten: Eine Zusammenfassung

Das älteste Syntheseprinzip zur Herstellung von Polypeptidbürsten beruht auf der grafting-from-Methode. Nach dem Kenntnisstand des Autors war es Michael Sela, der diese Technik 1955 das erste Mal verwendete, um besagte Strukturen herzustellen^[37]. Sela ging dabei von einem linearen Poly-L-lysin aus, was er als Makroinitiator verwendete, um verschiedene Polypeptidketten (R =Poly-L-alanin, Z-geschütztes Poly-L-lysin, Benzyl-geschützte Poly-L-glutaminsäure, Poly-L-tyrosin und Z-geschütztes Poly-DL-ornithin) auf das Rückgrat zu pflanzen:

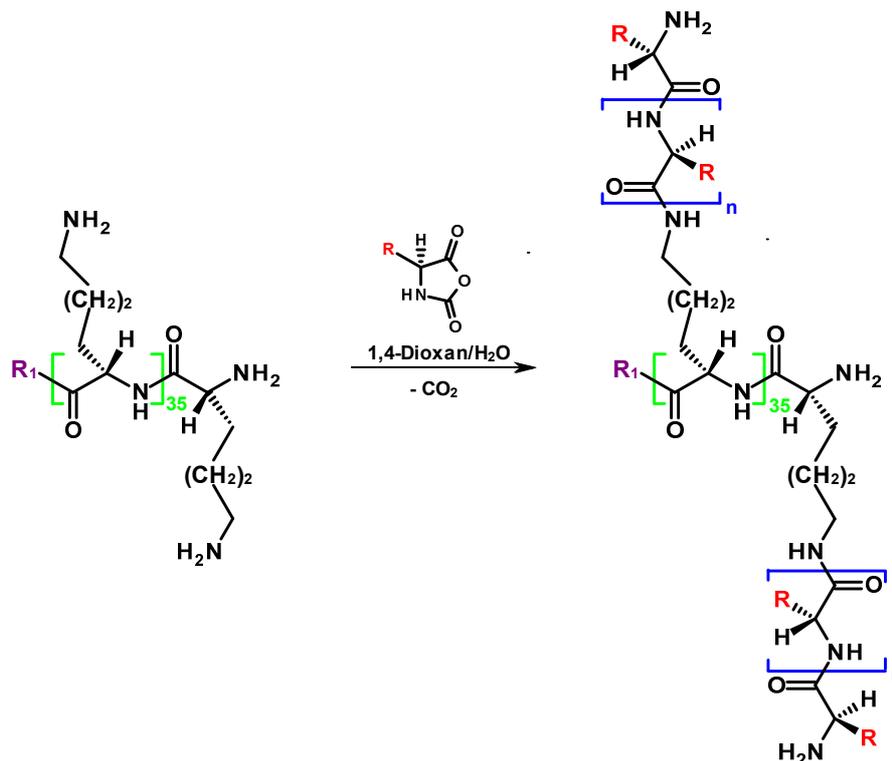


Abbildung 2.3.1: Herstellung von verzweigten Polypeptidstrukturen nach Sela

Im Fall der geschützten Polypeptidseitenketten (siehe oben) war es ihm außerdem möglich, die Schutzgruppen durch Einsatz von Wasserstoffbromid zu entfernen. Aufgrund der Tatsache das Poly-L-lysin in organischen Medien schlecht löslich ist, verwendete er 1,4-Dioxan/Wasser-Mischungen für die ringöffnende Polymerisation der Seitenkette. Aus diesem Grund waren seine Strukturen immer mit linearem Polypeptid verunreinigt, was er durch aufwändige Dialyseprozesse versuchte zu entfernen. Ein Beweis, dass er die linearen Verunreinigungen komplett abtrennen konnte, wurde allerdings niemals publiziert. Des Weiteren waren die erhaltenen Polymere, relativ klein, weil das Rückgrat lediglich aus 36 Monomereinheiten aufgebaut war. Aus diesem Grund ist eher davon auszugehen, dass es sich bei Sela's Strukturen um kugelförmige Gebilde anstatt um Zylinder handelte.

Hiroshi Inakagi und Mitarbeiter verwendeten aminofunktionalisierte Cellulose als Makroinitiator^[38]. Sie pflanzten mit Hilfe der grafting-from-Technik Benzyl-geschützte

Poly-L-glutaminsäureketten an das Celluloserückgrat, die in einem darauffolgenden polymeranalogen Schritt in Poly-N^δ-2-hydroxyethyl-L-glutamin umgewandelt wurden. Die linearen Ketten, die während der ringöffnenden Polymerisation entstanden, wurden durch selektive Extraktion mit 1,4-Dioxan entfernt. Weiterführende Charakterisierungen mit Hilfe von DSC zeigten, dass in der Tat Polypeptidseitenketten aufgepfropft werden konnten. Es werden in dieser Publikation jedoch keine Daten gezeigt, die Informationen über das Molekulargewicht bzw. die Länge der Seitenketten geben. Aus diesem Grund ist es auch in diesem Fall fragwürdig, ob es sich bei diesen Strukturen wirklich um zylindrische Flaschenbürstenpolymere handelt.

Einen weiteren Versuch Polypeptidbürsten mit Hilfe der grafting-from-Methode zu synthetisieren, wurde von der Gruppe um Shoei Inoue unternommen ^[39]. Inoue verwendete statt linearen Biopolymeren, ein Copolymer bestehend aus Styrol und N-methyl-N-(4-vinylphenethyl)ethylenediamin, was durch radikalische Copolymerisation hergestellt wurde (Abb.: 2.3.2).

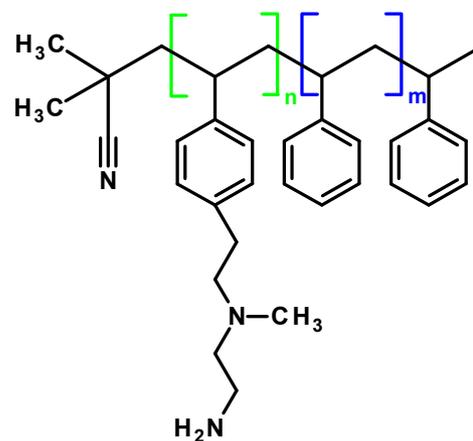


Abbildung 2.3.2: Inoue's Makroinitiator

Dieses Polymer ist zwar in trockenem THF löslich, hat aber den Nachteil, dass es neben primären Aminogruppen auch sekundäre Aminogruppen beinhaltet. Es war Inoue möglich, die ringöffnende Polymerisation der Leuchs'schen Anhydride zu starten, allerdings geht aus seiner Publikation kein eindeutiger Beweis hervor, ob er lediglich lineares Polymer, eine Mischung aus linearem Polypeptid und Bürste oder nur verzweigte Strukturen erhalten hat.

Der fehlende Beweis, dass man mit synthetischen hergestellten, aminofunktionalisierten Polymeren verzweigte Polypeptidstrukturen erzeugen kann, wurde 1989 von Jalel Boulahia und Mitarbeitern erbracht ^[40]. Boulahia verwendete als Makroinitiator ein Copolymer bestehend aus N-Benzylacrylamide und N-(3-aminopropyl)methacrylamide hydrochloride. Nach Neutralisation der Aminogruppen pfropfte er durch ringöffnende Polymerisation Poly-L-alaninseitenketten auf das Copolymer (Abb. 2.3.3).

Durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnte Boulahia beweisen, dass die Polypeptidketten mit dem Makroinitiator verbunden sind. Allerdings kann auch in diesem Fall keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob es bei den angesprochenen Strukturen wirklich um eine Bürste handelt, weil keine Informationen über die Länge bzw. das Molekulargewicht des radikalisch synthetisierten Rückgrats ersichtlich sind.

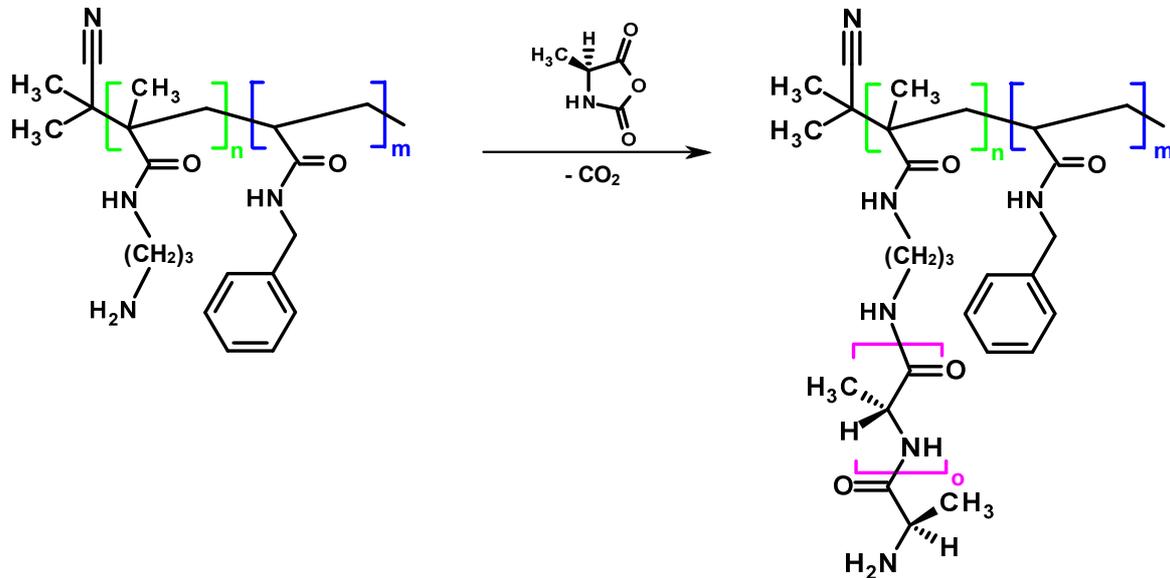


Abbildung 2.3.3: Boulahia's Syntheseprinzip zur Herstellung von verzweigten Polypeptidstrukturen

Der erste eindeutige Beweis, dass man mit diesem Syntheseprinzip Bürstenpolymere herstellen kann, wurde 2004 durch Bin Zhang erbracht ^[41]. Zhang verwendete ein ähnliches System wie Boulahia als Makroinitiator. Allerdings war sein Rückgrat nur aus N-(3-aminopropyl)methacrylamid-Einheiten aufgebaut. Die Konturlänge dieses Initiators betrug etwa 300 nm. Die ringöffnende Polymerisation zur Entwicklung der Seitenketten wurde in Zhang's Arbeit in trockenem DMF durchgeführt. Nur in vereinzelten Fällen klappte die Polymerisation der Leuchs'schen Anhydride und die Proben die Zhang nach beenden der Reaktion erhielt, konnten bis auf ganz wenige Ausnahmen nicht mehr in Lösung gebracht werden. Wie schon in Kapitel 1 erwähnt, gestalteten sich weiterführende Charakterisierungen z.B. mit statischer und dynamischer Lichtstreuung als äußerst schwierig. War es Zhang in vereinzelten Fällen möglich, seine verzweigten Polymere in Lösung zu bringen, beinhalteten sie jedoch einen großen Anteil an Aggregaten, die eine Charakterisierung durch Streumethoden bzw. durch chromatographische Analysetechniken nahe zu unmöglich machte. Nichts desto trotz konnten seine Nanostrukturen durch AFM-Aufnahmen auf Graphit und Mica sichtbar gemacht werden. Diese Aufnahmen zeigten eindeutig, dass Flaschenbürstenpolymere synthetisiert wurden.

Neben den Versuchen Polypeptidbürsten mit Hilfe der grafting-from-Methode herzustellen, gibt es mehrere Publikationen, bei der die grafting-through-Technik zur Herstellung der

Bürsten zum Einsatz kam. Ochiai ^[42] verwendete m,p-Vinylbenzylamin als Initiator und synthetisierte ein Makromonomer bestehend aus einer Poly-DL-phenylalaninkette. Anschließend versuchte er mittels radikalischer Polymerisation das Makromonomer zu einer Bürste umzusetzen:

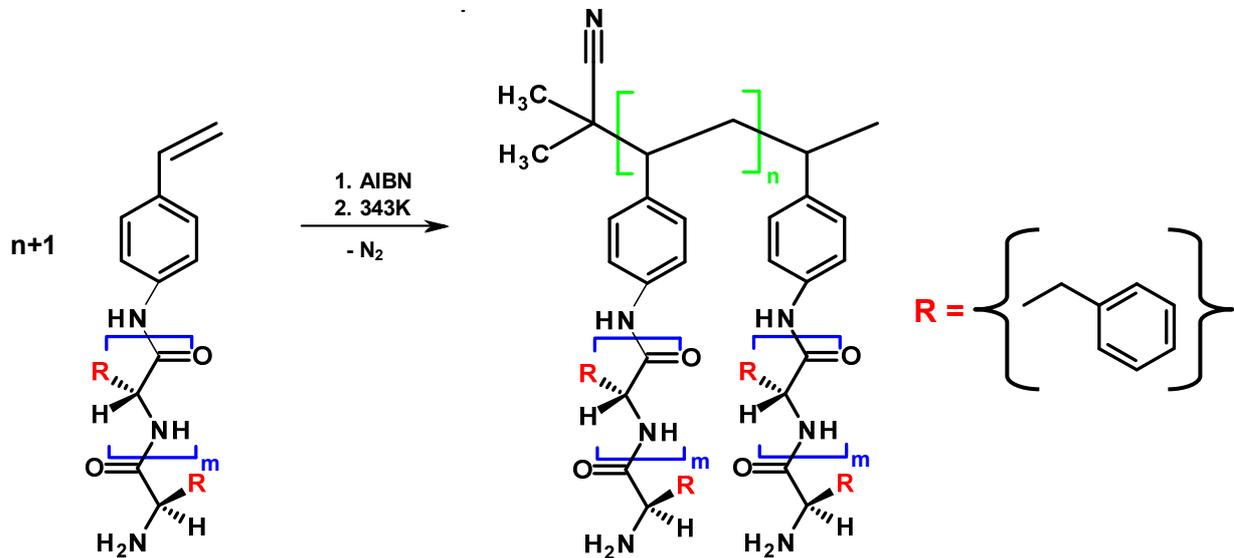


Abbildung 2.3.4: Ochiai's Methode zur Herstellung von verzweigten Polypeptidstrukturen

Durch GPC-Analysen konnten Ochiai und Mitarbeiter zeigen, dass die Makromonomere radikalisch miteinander verknüpft wurden. Allerdings sind keine Angaben zum Molekulargewicht der Moleküle ersichtlich, wodurch keine klare Aussage darüber getroffen werden kann, wie lang das Rückgrat von Ochiai's Nanostrukturen wirklich ist.

Auch Bin Zhang versuchte mit Hilfe der grafting-through-Technik Polypeptidbürsten herzustellen ^[43]. Er konnte erfolgreich ein Makromonomer aus Z-geschützten Poly-L-lysin synthetisieren und versuchte wie Ochiai dieses radikalisch zu einer Bürste zu synthetisieren. Es konnte lediglich eine Verknüpfung weniger Makromonomere erzielt werden, wodurch es zur Entstehung von kugelförmigen Nanostrukturen kam. Bürstenpolymere konnten jedoch nicht synthetisiert werden.

Wesentlich erfolgreicher war eine Arbeit von Afang Zhang, einem ehemaligen Doktoranden der Schlütergruppe ^[44]. Zhang synthetisierte durch schrittweisen Aufbau ein monodisperses Poly-L-prolinoligomer bestehend aus 16 Monomereinheiten, was er anschließend mit einer polymerisierbaren Methacrylatgruppe am N-Terminus der Peptidsequenz verknüpfte. Durch freie radikalische Polymerisation dieses Makromonomers war es Zhang möglich, Bürsten mit einer Konturlänge von etwa 90 nm herzustellen.

Ähnliche Resultate wurden auch in Arbeiten von Désirée Weller und Francisco Fernández-Trillo erzielt ^[45-46]. In beiden Arbeiten wurde eine elastinähnliche Peptidpentasequenz synthetisiert und durch anbinden einer Methacrylatgruppe ein Makromonomer hergestellt, was im finalen Schritt durch radikalische Polymerisation zu einem verzweigten Polymer

umgesetzt wurde. In Weller's Arbeit konnte durch AFM und Lichtstreuemessungen gezeigt werden, dass Polymere mit einer Konturlänge von mehr als 250 nm und einem Molekulargewicht von mehreren MDa hergestellt wurden. Währenddessen in Fernandez-Trillo's Publikation maximal 90 Monomere miteinander verknüpft wurden. Es ist allerdings anzumerken, dass Fernandez-Trillo die RAFT-Technik zur Polymerisation der Monomere einsetzte und Weller die freie Radikalik wählte, was sich auch in der Polydispersität der erhaltenen Nanopartikel deutlich bemerkbar macht. Fernandez-Trillo erzielte Polydispersitäten von ungefähr 1.2, währenddessen die Polydispersität von Weller's Strukturen Werte größer 1.7 annahm.

Ebenfalls erwähnenswert ist das Syntheseprinzip, welches von der Nolte-Gruppe ^[47] verwendet wurde (siehe auch Kapitel 1), um verzweigte Polymere mit Peptidsequenzen als Seitenkette zu synthetisieren. Nolte und Mitarbeiter stellten kurze Peptidsequenzen her, führten jedoch als polymerisierbare Funktionalität eine Isocyanidgruppe ein und polymerisierten die dadurch erhaltenen Monomere mit Hilfe von Nickel(II)salzen zu verzweigten Polymeren. Die Konturlänge und das Molekulargewicht, der nach dieser Methode erhaltenen Polymere, hatten ähnliche Dimensionen wie in Weller's Arbeit.

Die in dieser Dissertation vorgestellten Polypeptidbürsten wurden nach dem gleichen Syntheseprinzip hergestellt, wie es Bin Zhang in seiner Dissertation verwendete. Statt dem N-(3-aminopropyl)methacrylamid wurde allerdings das N-(6-aminohexyl)methacrylamid als Wiederholungseinheit für den Makroinitiator gewählt. Im Gegensatz zu Zhang's Strukturen konnten Makromoleküle synthetisiert werden, die im geschützten Zustand in organischen Lösungsmitteln löslich waren und deswegen mit unterschiedlichsten Analysemethoden charakterisiert werden konnten (GPC, AFM, SLS, DLS, CD-Spektroskopie, etc.). Nach der Abspaltung Schutzgruppen, war es wiederum möglich die meisten Partikel in Wasser zu lösen und mit SLS, DLS, CE, AFM, CD-Spektroskopie zu charakterisieren.

2.4 Sekundärstrukturen von Flaschenbürstenpolymeren

Seit mehr als 60 Jahren untersuchen Naturwissenschaftler die Sekundärstrukturen von Makromolekülen. In den meisten Fällen handelte es sich dabei um lineare makromolekulare Strukturen, die in der Natur vorkommen wie z.B. DNA, Proteine oder auch synthetische Polymere (Poly-L-lysin, Poly-L-glutaminsäure, Polyisocyanate etc.) ^[48-50].

Ein jüngeres Forschungsgebiet beschäftigt sich mit den Sekundärstrukturen von synthetisch hergestellten, verzweigten Polymeren (z.B. Flaschenbürstenpolymeren) deren Sekundärstrukturverhalten sich in vielen Fällen von den korrespondierenden linearen Strukturen unterscheidet.

Verzweigte Strukturen sind unter anderem in der Lage bestimmte Überstrukturen stärker zu stabilisieren als die korrespondierenden linearen Analoga. Ein Beispiel für dieses Phänomen stellt eine Arbeit von Afang Zhang dar, der das Sekundärstrukturverhalten von linearem und verzweigten Poly-L-prolin miteinander verglich ^[44]. Das lineare Polypeptid liegt, insofern es in Wasser gelöst ist, immer in der PPI-Konformation vor. Gibt man allerdings zu den wässrigen Lösungen aliphatische Alkohole, ändert das lineare Poly-L-prolin seine Sekundärstruktur von PPI zu PPII. Bei diesen Sekundärstrukturen handelt es sich in beiden Fällen um Helices. Die PPI-Konformation repräsentiert eine kompakte rechtsdrehende Helix, in der durchschnittlich 3.3 Monomereinheiten für eine Windung benötigt werden. Im Fall der PPII-Konformation handelt es sich um eine linksdrehende Helix mit 3 Monomereinheiten pro Windung, dessen Durchmesser wesentlich weiter ist, als die der PPI-Konformation. Das Besondere an dieser Helix ist, dass aufgrund des großen Durchmessers keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidbindungen ausgebildet werden, wie das normalerweise bei der Bildung von α -Helices etc. der Fall ist.

Bei den Poly-L-prolinbürsten, die Zhang und Mitarbeiter mittels der grafting-through-Methode synthetisierten (siehe auch Kapitel 2.3), konnte dieser Übergang nicht mehr beobachtet werden. Die Poly-L-prolinseitenketten lagen immer in der PPI-Konformation und konnten nicht durch die Erhöhung hydrophober Wechselwirkungen in die PPII-Konformation überführt werden. Die sterische Wechselwirkung der dicht gepackten Poly-L-prolinseitenketten stabilisiert somit die PPI-Helix und verhindert die Ausbildung der PPII-Helix. Der Grund für diese Tatsache liegt in der voluminösen Ausdehnung der PPII-Konformation, die sich aufgrund der engen Anordnung der Poly-L-prolinseitenketten nicht ausbilden kann.

An dieser Stelle sollte auch nochmal das β -Helixmotiv erwähnt werden, was bei verzweigten Polypeptidstrukturen eine entscheidende Rolle spielen kann und schon ausführlich in Kapitel 1 erläutert wurde ^[51-53].

Die oben erwähnten Beispiele beschäftigten sich ausnahmslos mit Polymeren, deren Seitenketten aus chiralen Molekülen (Polypeptide) bestehen. Chiralität ist allerdings nicht unbedingt nötig, um verzweigte Polymeren in eine definierte Überstruktur zu zwingen. Ein Beispiel ist durch die Arbeit von Schlüter und Mitarbeiter gegeben, die Dendronbürsten synthetisierten, welche aus einem Polystyrolrückgrat und Phenoldendrimeren als „Seitenketten“ bestehen. Durch Cryo-TEM- und AFM-Aufnahmen konnte die Gruppe um Schlüter in Kooperation mit Christoph Böttcher die Aufwicklung dieser Dendronbürsten zu einer supramolekularen Helix sichtbar machen ^[54].

Literatur zu Kapitel 2

- [1] M. Wintermantel, M. Gerle, K. Fischer, M. Schmidt, I. Wataoka, H. Urakawa, K. Kajiwara, Y. Tsukahara; *Macromolecules*, **29**, 978 (1996)
- [2] V. Héroguez, Y. Gnanou, M. Fontanille; *Macromolecules*, **30**, 4791 (1997)
- [3] D. Grande, J.-L. Six, S. Breunig, V. Héroguez, M. Fontanille, Y. Gnanou; *Polymers for Advanced Technologies*, **9**, 601 (1998)
- [4] V. Héroguez, E. Amedro, D. Grande, M. Fontanille, Y. Gnanou; *Macromolecules*, **33**, 7241 (2000)
- [5] V. Héroguez, D. Taton, Y. Gnanou; *Polymer News*, **26**, 150 (2001)
- [6] T. Lesne, V. Héroguez, Y. Gnanou, R. Duplessix; *Colloid Polym. Sci.*, **279**, 190 (2001)
- [7] A. J. Boydston, T. W. Holcombe, D. A. Unruh, J. M. J. Fréchet, R. H. Grubbs; *JACS*, **131**, 5388 (2009)
- [8] S. Jha, S. Dutta, N. B. Bowden; *Macromolecules*, **37**, 4365 (2004)
- [9] Y. Tsukahara, K. Mizuno, A. Segawa, Y. Yamashita; *Macromolecules*, **22**, 1546 (1989)
- [10] Y. Tsukahara, K. Tsutsumi, Y. Yamashita, S. Shimada; *Macromolecules*, **23**, 5201 (1990)
- [11] M. W. Neiser; *Dissertation*, Mainz (2003)
- [12] M. W. Neiser, S. Muth, U. Kolb, J. R. Harris, J. Okuda, M. Schmidt; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 3192 (2004)
- [13] H. G. Böerner, K. Beers, K. Matyjaszewski; *Macromolecules*, **34**, 4375 (2001)
- [14] G. Cheng, A. Böker, M. Zhang, G. Krausch, A. H. E. Müller; *Macromolecules*, **34**, 6883 (2001)
- [15] H. G. Böerner, K. Beers, K. Matyjaszewski, S. S. Sheiko, M. Möller; *Macromolecules*, **34**, 4375 (2001)
- [16] F. Schön, M. Hartenstein, A. H. E. Müller; *Macromolecules*, **34**, 5394 (2001)
- [17] Y. Inoue, T. Matsugi, N. Kashiwa, K. Matyjaszewski; *Macromolecules*, **37**, 3651 (2004)
- [18] M. Zhang, T. Breiner, H. Mori, A. H. E. Müller; *Polymer*, **44**, 1449 (2003)
- [19] J. Boulahia, F. Carrieret, H. Sekiguchi; *Makromol. Chem.*, **190**, 1975 (1989)
- [20] B. Zhang, K. Fischer, M. Schmidt; *Makrom. Chem. and Phys.*, **206**, 157 (2005)
- [21] M. Kimura, T. Egashira, T. Nishimura, M. Maeda, S. Inoue; *Makromol. Chem.*, **183**, 1393 (1982)
- [22] S. A. Jenekhe, X. L. Chen; *Science*, **283**, 372 (1999)
- [23] S. Qin, K. Matyjaszewski, H. Xu, S. S. Sheiko; *Macromolecules*, **36**, 605 (2003)
- [24] M. Schappacher, C. Billaud, C. Paulo; A. Deffieux; *Macromol. Chem. Phys.*, **200**, 2377 (1999)
- [25] M. Schappacher, A. Deffieux; *Macromolecules*, **33**, 7371 (2000)
- [26] Z. Mughtar, M. Schappacher, A. Deffieux; *Macromolecules*, **34**, 7595 (2001)
- [27] M. Schappacher, A. Deffieux; *Macromolecules*, **38**, 4942 (2005)
- [28] M. Schappacher, A. Deffieux; *Macromolecules*, **38**, 7209 (2005)
- [29] J. Bernard, M. Schappacher, P. Viville, R. Lazzaroni A. Deffieux; *Macromolecules*, **38**, 4942 (2005)
- [30] J. Bernard, M. Schappacher, P. Viville, R. Lazzaroni A. Deffieux; *Polymer*, **46**, 6767 (2005)
- [31] H. R. Kricheldorf; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 5752 (2006)
- [33] Timothy J. Deming; *Adv. Polym. Sci.*, **202**, 1 (2006)
- [33] E. R. Blout, R. H. Karlson; *JACS*, **78**, 941 (1956)
- [34] T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadchichristidis; *Biomacromolecules*, **5**, 1653 (2004)
- [35] I. Dimitrov, H. Schlaad; *Chem. Commun.*, 2944 (2003)
- [36] Y. Knobler, S. Bittner M. Frankel *J. Chem. Soc.*, 3941 (1964)
- [37] M. Sela, E. Katchalski, M. Gehatia; *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 746 (1956)

- [38] T. Miyamoto, S. Takahashi, S. Tsuji, H. Ito, and H. Inagaki; *J. Appl. P. Sci.*, **31**, 2303 (1986)
- [39] M. Kimura, T. Egashira, T. Nishimura, M. Maeda, S. Inoue; *Makromol. Chem.*, **183**, 1393 (1982)
- [40] J. Boulahia, F. Carrieret, H. Sekiguchi; *Makromol. Chem.*, **190**, 1975 (1989)
- [41] B. Zhang, K. Fischer, M. Schmidt; *Makrom. Chem. and Phys.*, **206**, 1, 157 (2005)
- [42] M. Takaki, R. Asami, Y. Hanada, N. Ochiai; *Polymer Bulletin*, **18**, 105 (1987)
- [43] *Dissertation* von Bin Zhang, Mainz (2004)
- [44] A. Zhang, Y. Guo; *Chem. Eur. J.*, **14**, 8939 (2008)
- [45] 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*, **40**, 6094 (2007)
- [46] *Diplomarbeit*; Désirée Weller, Mainz (2010)
- [47] J. J. L. M. Cornelissen, W. S. Graswinkel, P. J. H. M. Adams, G. H. Nachttegaal, A. P. A.P.M. Kentgens, N. A. J. M. Sommerdijk, R. J. M. Nolte; *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **39**, 4255 (2001)
- [48] J. D. Watson, F. H. C. Crick; *Nature*, **171**, 737 (1953)
- [49] W. Renth, R. J. M. Nolte; *Accounts of Chemical Research* **12**, 30 (1979)
- [50] Y. P. Myer; *Macromolecules*, **2**, 624 (1969)
- [51] M. D. Yoder, N. T. Keen, F. Jurnak; *Science*, **260**, 1503 (1993)
- [52] J.J. L. M. Cornelissen, J. J. J. M. Donners, R. de Gelder, W. S. Graswinckel, G. A. Metselaar, A.E. Rowan, N. A. J. M. Sommerdijk, R. J. M. Nolte; *Science*, **293**, 676 (2001)
- [53] N. Gunari, Y. Cong, B. Zhang, K. Fischer, A. Janshoff, M. Schmidt; *Macromol. Rapid Commun.*, **29**, 821 (2009)
- [54] C. Böttcher, B. Schade, C. Ecker, J. P. Rabe, L. Shu, and A. Dieter Schlüter; *Chem. Eur. J.*, **11**, 2923 (2005)

Kapitel 3: Analysemethoden

3.1 Gelpermeationschromatographie (GPC) ^[1]

Die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) oder auch Size-Exclusion-Chromatographie (SEC) ist eine wichtige Methode zur Bestimmung der Molmassenmittelwerte von Polymeren. Es handelt sich dabei um eine Variante der Flüssigkeitschromatographie, bei der eine verdünnte Polymerprobe durch eine Serie von Säulen mit porösem Füllmaterial gepresst wird.

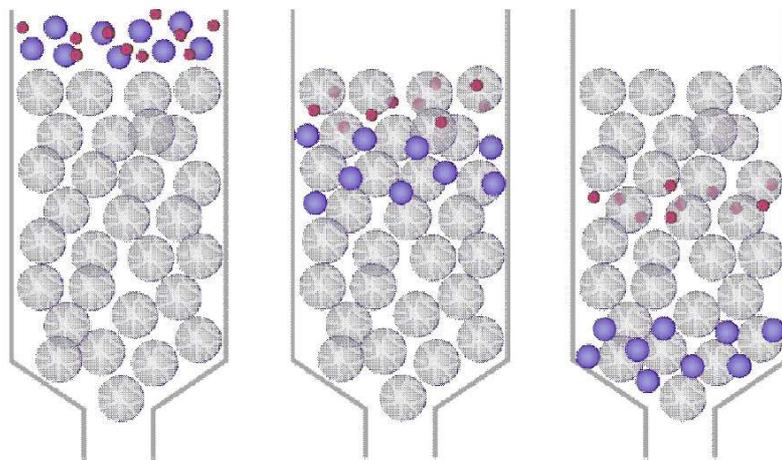


Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung des Trennmechanismus einer GPC-Säule

Bei dem Füllmaterial handelt es sich um hochvernetztes Polystyrol, das durch Kontakt mit dem Elutionsmittel aufquillt und Poren ausbildet. Die Größe der Poren kann über den Vernetzungsgrad des Polystyrols variiert werden und ist zudem abhängig vom Elutionsmittel. Der Trennprozess dieser Methode beruht darauf, dass das hydrodynamische Volumen eines Makromoleküls molekulargewichtsabhängig ist. Das hydrodynamische Volumen steuert die Permeation der Makromoleküle in der Porenstruktur des mikroporösen Gels. Nach einem diffusionsbestimmten Gleichgewicht verteilen sich die Polymermoleküle auf eine mobile Lösungsmittelphase und die stationäre Gelphase. Strömt nun das kontinuierlich fließende Lösungsmittel durch die Trennsäule, werden alle Makromoleküle, die eine gewisse Größe (obere Ausschlussgrenze) überschreiten und somit nicht in die stationäre Phase eindringen können, gemeinsam mit der mobilen Phase zuerst eluiert. Kleinere Moleküle mit größerem Permeationsvermögen dringen zunächst in die stationäre Phase ein, werden sie danach aber wieder verlassen, da infolge des Lösungsmittelstroms in der mobilen Phase ein Konzentrationsgradient zwischen mobiler und stationärer Phase entsteht. Dabei werden die jeweils kleinsten Moleküle die Poren des Gels zuletzt verlassen und entsprechend zum

Schluss eluiert werden. Unterhalb einer bestimmten Molekülgröße (untere Ausschlussgrenze) erfolgt keine Trennung mehr. Die Moleküle sind dann so klein, dass sie in die Poren ungehindert eindringen können und diese ohne Trennung wieder verlassen.

Die Detektion erfolgt in der Regel durch einen Brechungsindexdetektor und/oder einen UV-Detektor. In beiden Fällen ist das Signal proportional zur Massenkonzentration des Polymers im Eluat.

Bei der GPC handelt es sich nicht um eine Absolutmethode, weil für jedes Polymer eine eigene Kalibrierung mit engverteilten Standards durchgeführt werden muss, um eine eindeutige Beziehung zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen zu erhalten. Für ein gegebenes Polymer-Lösungsmittel-System steht das Elutionsvolumen in Bezug zum Molekulargewicht über:

$$\log M = a - b \cdot V_e \quad (3.1.1)$$

V_e : Elutionsvolumen

M : Molekulargewicht

a, b : Konstanten

Durch Ermittlung des Elutionsvolumens kann man über eine Eichkurve $\log M$ berechnen und somit die Elutionskurve in eine Verteilungskurve umrechnen.

3.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ^[2,3]

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist eine sehr leistungsfähige und schnelle Variante der Säulenflüssigkeitschromatographie für die Trennung von Substanzgemischen im analytischen und präparativen Maßstab. Es werden stationäre Phasen kleiner Korngrößen (3 bis 10 μm) und enger Größenverteilung verwendet, durch die das Elutionsmittel unter hohem Druck (50 bis 500 bar) gepresst wird. Hier für stehen automatisierte kommerzielle Geräte zur Verfügung deren Aufbau schematisch in Abbildung 3.2.1 skizziert ist.

Die Säule besteht normalerweise aus Edelstahl und hat bei analytischen Anwendungen einen Durchmesser von 2 bis 5 mm. Die verwendeten Trägermaterialien ergeben dichte und regelmäßige Säulenpackungen hoher Trennwirkung, so dass kurze Säulen von 5 bis 25 cm Länge verwendet werden.

Das zu trennende Substanzgemisch wird am Säulenanfang in den Elutionsmittelstrom injiziert, und die eluierenden Stoffe werden am Säulenende durch einen geeigneten Detektor angezeigt und registriert. Zur Detektion lässt sich eine beliebige Stoffeigenschaft

heranziehen, z.B. Fluoreszenz-Emission, elektrische Leitfähigkeit etc. Am häufigsten werden UV-Detektoren verwendet, um die getrennten Substanzen zu detektieren.

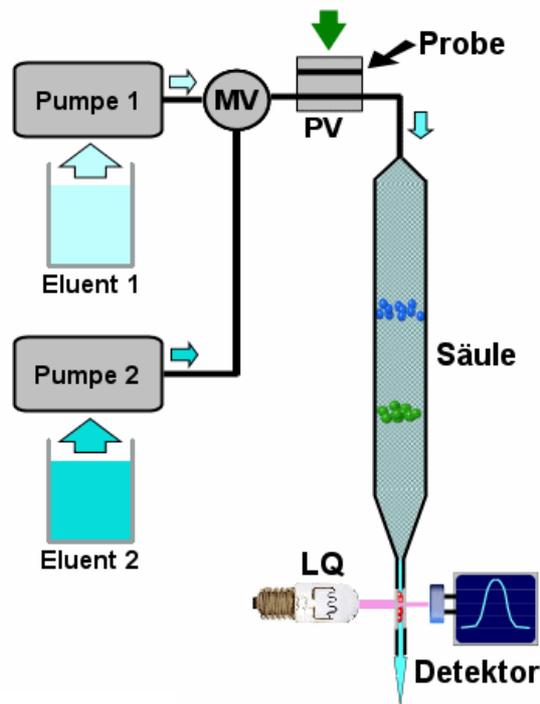


Abbildung 3.2.1: Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur

Die getrennten Stoffe erscheinen im Chromatogramm als Peaks. Als Retentionszeit (t_R) bezeichnet man die Zeit vom Einspritzen der Probe bis zum Auftreten des Peakmaximums. Die Durchflusszeit oder Totzeit ist die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um durch die stationäre Phase zu fließen. Bei konstanter Strömungsgeschwindigkeit des Elutionsmittels entspricht die Retentionszeit einem Volumen, das Retentionsvolumen (V_R) genannt wird. Retentionszeit bzw. Retentionsvolumen sind für eine Substanz charakteristisch wie z. B. der R_F -Wert in der Dünnschichtchromatographie. Sie hängen natürlich auch von der Art der mobilen bzw. stationären Phase ab sowie von der Temperatur und der Durchflussgeschwindigkeit.

Die Peakfläche ist der Menge der getrennten Substanzen proportional und wird daher zu deren quantitativen Analyse herangezogen. Moderne HPLC-Geräte integrieren die Peakflächen automatisch. Näherungsweise kann man sie nach der Dreiecksmethode oder durch multiplizieren der Peakhöhe mit der Halbwertsbreite berechnen. Höhe und Fläche der Peaks hängen natürlich auch von der Empfindlichkeit des Detektors für eine bestimmte Substanz ab. Der Zusammenhang zwischen Peakfläche und Stoffmenge muss daher durch Aufnahme von Eichkurven bestimmt werden.

3.3 Gaschromatographie (GC) ^[4]

Die Gaschromatographie ist ein sehr leistungsfähiges und schnelles Trennverfahren, das vorwiegend zur qualitativen Analyse aber auch zur präparativen Trennung eingesetzt wird. Sie ist auf alle Stoffe beschränkt, die ohne Zersetzung verdampft werden können oder die bei ihrer thermischen Zersetzung definierte gasförmige Produkte ergeben. Als stationäre Phase für die Gaschromatographie finden organische Flüssigkeiten mit niedrigem Dampfdruck ($\leq 0,1\text{kPa}$ bei herrschender Arbeitstemperatur; z.B. Squalen oder Apiezonfette) Verwendung. Als Trägermaterial eignen sich Kieselgur oder Kieselgele. Die Trennsäule ist aus Kupfer, Stahl, oder Quarzglas gefertigt und besitzt in der Regel einen Durchmesser von 3 bis 8 mm. Die Länge kann zwischen 1-6 m variieren. Auch sog. Kapillarsäulen (Durchmesser 0.1-0.5 mm, Länge 10-300 m) sind gebräuchlich, die eine außerordentlich hohe Trennleistung besitzen. Bei ihnen befindet sich die stationäre Phase als Flüssigkeitsfilm direkt auf der Kolonnenwand (Dünnschicht-Kapillaren) oder auf einer dünnen Schicht des Trägermaterials (Dünnschicht-Kapillaren). Mit gepackten Säulen können Substanzmengen von 0.5-30 mg, mit Kapillarsäulen Mengen im μg -Bereich getrennt werden. Abbildung 3.3.1 zeigt schematisch den Aufbau eines Gaschromatographen.

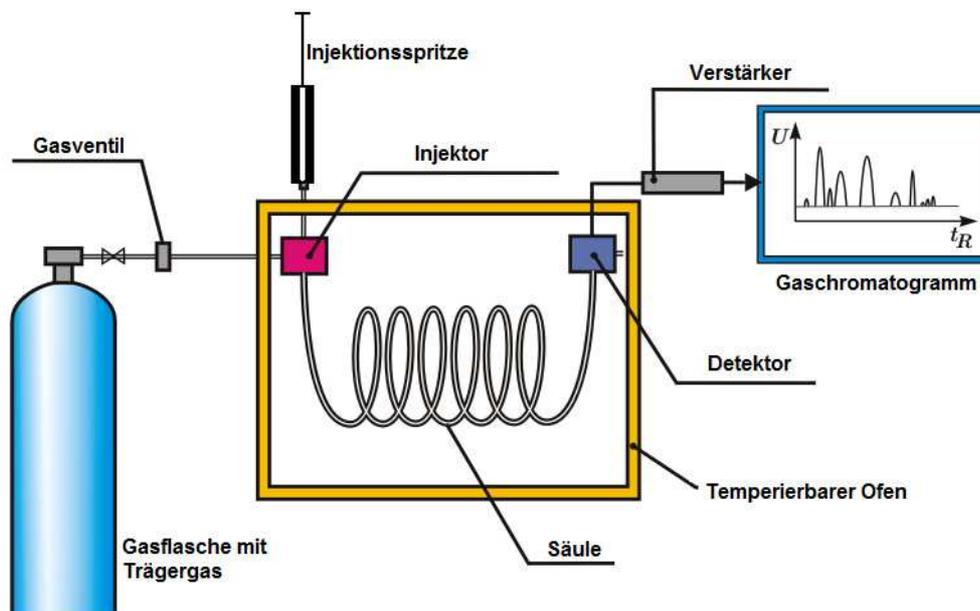


Abbildung 3.3.1: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen

Während der Trennung wird die Säule immer von einem Trägergas (Helium, Argon oder Wasserstoff) durchströmt. Am Kopf der Säule wird die zu analysierende Substanz (gelöst in einem flüchtigen Lösungsmittel) mit Hilfe einer Injektionsspritze auf die stationäre Phase aufgetragen. Die Trennung geschieht durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen der zu trennenden Substanzen mit der stationären bzw. mobilen Phase.

Die im Gaschromatographen herrschende Arbeitstemperatur (0 bis 400 °C) soll etwa 100-200 °C unterhalb der mittleren Siedetemperatur der zu trennenden Substanzen liegen. Sie wird durch einen Thermostaten aufrechterhalten und kann im Laufe der Trennung kontinuierlich erhöht werden, was der Gradientenelution bei der Flüssigkeitschromatographie entspricht.

Als Detektor werden in der Regel Karthometer, Flammenionisationsdetektoren, IR-Detektoren oder Massenspektrometer verwendet. Die Detektorsignale werden von einem empfindlichen Kompensationsschreiber registriert und nach Digitalisierung einem Rechner zugeführt.

Die Flächen der Peaks sind der Menge der auftretenden Stoffe proportional, unter folgenden Voraussetzungen:

- 1) die Zahl der Komponenten entspricht der Zahl der auftretenden Peaks,
- 2) der Detektor misst über einen großen Konzentrationsbereich linear,
- 3) im Gemisch handelt es sich um chemisch verwandte Stoffe.

Sind diese Bedingungen erfüllt, kann man durch Berechnung der Fläche, Aussagen über die Quantität der einzelnen Stoffe im zu analysierenden Substanzgemisch treffen.

3.4 Kapillarelektrophorese ^[5,6]

Die Trennung von Ionen in einem elektrophoretischen System beruht auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten. Die Geschwindigkeit der Ionen ist abhängig von ihrer Geometrie und der Ladung. Außerdem hängt sie von der Temperatur, dem pH-Wert, der Viskosität des Trennmediums und der elektrischen Feldstärke ab. Substanzen, die in einer Elektrolytlösung als Ionen vorliegen, sind im elektrischen Feld zwei verschiedenen Kräften ausgesetzt. Hier bei handelt es sich um die elektrophoretische Kraft, bedingt durch das elektrische Feld und um die Reibungskraft, die der elektrophoretischen Kraft entgegen wirkt.

Die elektrophoretische Kraft (F_{ep}) berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$F_{ep} = z_i \cdot e \cdot E \quad (3.4.1)$$

z_i : Ladungszahl des Teilchens

e : Elementarladung

E : elektrisches Feld

Die auf die bewegten Teilchen ausgeübte Reibungskraft (F_R) kann unter der Annahme von kugelförmigen Ionen in einem laminaren Fluss näherungsweise durch das Stokesche Gesetz beschrieben werden:

$$F_R = 6\pi \cdot \eta \cdot R_H \cdot v_{ep} \quad (3.4.2)$$

η : Viskosität der Probe

R_H : hydrodynamischer Radius

v_{ep} : Wanderungsgeschwindigkeit der Probe

Das Ion wird solange beschleunigt, bis es zu einem Kräftegleichgewicht zwischen der Reibungskraft und der elektrophoretischen Kraft kommt:

$$F_R = F_{ep} \quad (3.4.3)$$

Im Kräftegleichgewicht bewegen sich alle Ionen mit einer konstanten Geschwindigkeit, die direkt proportional zum angelegten Feld ist:

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad (3.4.4)$$

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität

E : elektrische Feldstärke

Die elektrophoretische Mobilität stellt für eine ionische Spezies eine Konstante dar und repräsentiert die Wanderungsgeschwindigkeit bei einer angelegten Feldstärke von 1 V/m. Die Werte der elektrophoretischen Mobilitäten unterschiedlicher Ionen unter Standardbedingungen sind tabelliert. Die elektrophoretischen Mobilitäten der Kationen erhalten ein positives Vorzeichen, die der Anionen ein negatives Vorzeichen.

Durch einsetzen von Gleichung 3.4.4 in Gleichung 3.4.2 und anschließendem Gleichsetzen mit Gleichung 3.4.1 erfolgt:

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \frac{z_i \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (3.4.5)$$

Die direkte Berechnung der elektrophoretischen Mobilität ist aufgrund der molekül- und pufferspezifischen Größen mit dieser Gleichung nicht möglich, da sie nur für sphärische Teilchen in unendlich verdünnten Lösungen gilt. In einer realen Elektrolytlösung endlicher Ionenkonzentration baut sich um ein Ion eine Wolke aus Gegenionen auf, welche die effektive Ladung des Ions verringert. Deshalb migriert das Ion langsamer als es seiner Ladung entspricht. Dies nennt man den elektrophoretischen Effekt. Eine weitere Konsequenz

ist der Relaxationseffekt, der aus dem stetigen Auf- und Abbau der Gegenionenwolke im elektrischen Feld resultiert. Die Ionenwolke deformiert sich dabei, so dass die Zentren der positiven und negativen Ladungen nicht mehr zusammenfallen und dadurch die Bewegung des Zentralions ebenfalls gebremst wird.

Ein zweiter für die Trennung in der CE wichtiger elektrokinetischer Effekt ist die Elektroosmose. Darunter versteht man die Bewegung einer Elektrolytlösung relativ zu einer geladenen Oberfläche durch ein angelegtes elektrisches Feld. Wegen des niedrigen pK_s -Wertes werden fused-silica Kapillaren, die mit einer Elektrolytlösung gefüllt sind, als negativ geladene Oberfläche betrachtet. Die dissoziierten Silanolgruppen stellen den stationären negativen Teil der elektrischen Doppelschicht dar, an dem Kationen adsorbiert und Anionen abgestoßen werden. Ein Teil dieser Kationen wird durch die elektrostatische Anziehungskraft in der Nähe der Kapillarwand fixiert. Diese starre Grenzschicht mit adsorbierten Kationen wird auch als Sternschicht bezeichnet. Um die verbleibenden negativen Ladungen an der Kapillaroberfläche auszugleichen, werden weitere Gegenionen angelagert. Bedingt durch ihre Hydrathülle können nicht alle Kationen an der Oberfläche fixiert werden. Es entsteht eine diffuse Grenzschicht, die sogenannte Gouy-Chapman-Schicht, deren Kationenkonzentration exponentiell mit dem Abstand von der fused silica Oberfläche abnimmt. Mit größer werdender Entfernung zwischen negativer Kapillarwand und Kationen der Gouy-Chapman-Schicht verringert sich die Coulombsche Wechselwirkung und ermöglicht die Wanderung der diffusen Grenzschicht zum negativ geladenen Pol. Dabei gleitet die Gouy-Chapman-Schicht über die an der Kapillarwand fixierte erste Schicht, was zu einer Scherfläche zwischen den Schichten führt. Die starre Sternschicht, in der das Potential mit zunehmender Entfernung zur Kapillarwand linear abnimmt, ist im Gleichgewicht mit der diffusen Grenzschicht, in der das Potential exponentiell auf null zurückgeht. Die Elektroosmose ist von dem Potential an der Scherfläche zwischen starrer und beweglicher Schicht abhängig, was als zeta-Potential bezeichnet wird. Es gilt, dass das zeta-Potential und damit auch der EOF sich umgekehrt proportional zur Ionenstärke des Elektrolyten und direkt proportional zur Ladungsdichte an der Kapillarwand verhalten:

$$v_{eof} = -\frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{\eta} = \frac{\omega \cdot E}{\eta} \cdot \frac{1}{F} \quad (3.4.6)$$

v_{eof} : elektroosmotischer Fluss

ε : Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten

ε_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums

ζ : zeta-Potential

ω : Ladungsdichte an der Wandoberfläche

F : Faradaykonstante

R : ideale Gaskonstante

T : Temperatur

I : Ionenstärke

$$P = \sqrt{\frac{2000 \cdot F^2 \cdot \sqrt{I}}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon \cdot R \cdot T}} : \text{Debye-Hückel Parameter}$$

Aus Gleichung 3.4.6 ist ersichtlich, dass das zeta-Potential und damit auch der EOF sich umgekehrt proportional zur Ionenstärke des Elektrolyten und direkt proportional zur Ladungsdichte an der Kapillarwand verhalten. Eine Konzentrationserhöhung des Puffers bewirkt somit eine Verringerung, eine Steigerung des pH-Wertes eine Erhöhung des elektroosmotischen Flusses.

Der schematische Aufbau einer Kapillarelektrophorese ist in Abbildung 3.4.1 dargestellt:

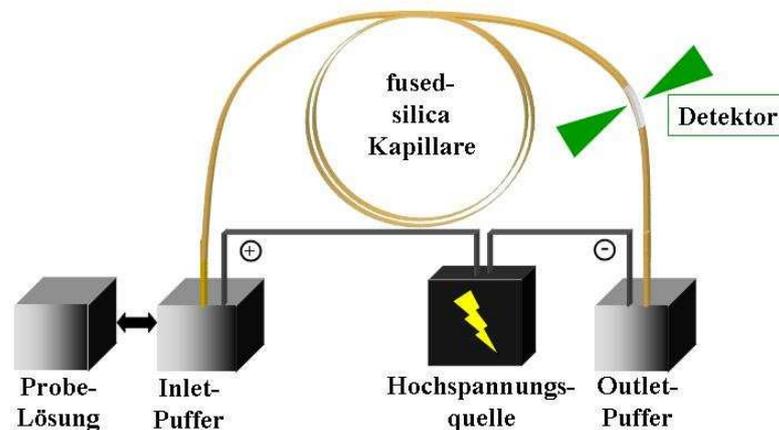


Abbildung 3.4.1: Schematische Aufbau einer Kapillarelektrophorese

Die Trennung findet in einer mit Puffer gefüllten Glaskapillare statt. Bei den meisten Applikationen verwendet man 30 bis 100 cm lange, mit Polyimid beschichtete, fused-silica Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 25 bis 100 μm . Nach der Probenaufgabe am Kapillarinlet tauchen beide Kapillarenden in die Puffergefäße ein. Zwischen den Kapillarenden wird dann eine Spannung bis zu 30 KV angelegt. Die Probenkomponenten migrieren im elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Richtung Outlet und durchqueren dabei einen Detektor, mit dem eine qualitative und quantitative Auswertung erfolgen kann.

3.5 Statische Lichtstreuung (SLS)

Die grundlegende Theorie für die Streuung von sichtbarem Licht an Gasen wurde von Lord Rayleigh entwickelt ^[7]. Er entdeckte, dass durch Einwirkung von Lichtwellen auf Gasmoleküle oszillierende Dipole in den Elektronenhüllen der Gasmoleküle induziert werden, die elektromagnetische Strahlung in alle Raumrichtungen (Streustrahlung) aussenden. Smucholski und Einstein erweiterten diese Theorie auf Flüssigkeiten und Lösungen (Fluktuationstheorie) ^[8,9]. Auf die Streuung von Polymerlösungen wurde diese Theorie schließlich von Debye übertragen ^[10]. Für Lösungen mit einem Trägheitsradius kleiner 10 nm gilt für das Rayleighverhältnis:

$$R(\theta) = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_L} \left[\rho n_0^2 \left(\frac{dn}{d\rho} \right)^2 RT\beta + \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 RT \frac{M_0}{\rho_0} \left(\frac{-d\Delta\mu}{dc} \right) \right] \quad (3.5.1)$$

$R(\theta)$: Rayleighverhältnis

λ_0 : Wellenlänge des Primärstrahls

N_L : Avogardokstante

ρ : Dichte der Lösung

n_0 : Brechungsindex des Lösungsmittels

n : Brechungsindex der Lösung

ρ : Dichte 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)

Experimentell kalibriert man die Lichtstreuanlage mit der absoluten Streuintensität eines bekannten Stoffes (z.B. Toluol) und des verwendeten Lösungsmittels. Damit erhält man das Rayleighverhältnis nach Gleichung 3.5.2:

$$R(\theta) = \frac{I(\theta)_P - I(\theta)_{LM}}{I(\theta)_{St.}} I(\theta)_{St. absolut} \quad (3.5.2)$$

Zwei Anteile tragen zum Rayleighverhältnis bei: ein Streubetrag der durch Dichteschwankungen hervorgerufen wird und ein weiterer Betrag der die Konzentrationsschwankungen der Probe beschreibt. Für verdünnte Lösungen kann man annehmen, dass sich die Dichteschwankungen des reinen Lösungsmittels sich nicht von den Dichteschwankungen der Lösung unterscheiden. Das Brechungsindexinkrement der Dichte wird unter dieser Annahme null, wodurch sich Gleichung 3.5.1 zu Gleichung 3.5.2 vereinfacht:

$$R(\theta) = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_L} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{RTM_0 c}{\rho_0 \left(\frac{-d\Delta\mu}{dc} \right)} \quad (3.5.3)$$

Die konzentrationsabhängige Änderung des chemischen Potentials kann durch die konzentrationsabhängige Änderung des osmotischen Drucks beschrieben werden. Unter realen Bedingungen gilt für die Änderung des chemischen Potentials mit der Konzentration:

$$-\left(\frac{d\Delta\mu}{dc} \right) = \frac{M_0}{\rho_0} \left(\frac{d\Pi}{dc} \right) = \frac{M_0}{\rho_0} RT \left(\frac{1}{M} + 2A_2 c + \dots \right) \quad (3.5.4)$$

A_2 : zweiter Virialkoeffizient

M : Molekulargewicht des gelösten Stoffs

Π : Osmotischer Druck

Durch Einsetzen von Gleichung 3.5.3 in Gleichung 3.5.2 und anschließendem Umformen, erhält man:

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M} + 2A_2 c \quad (3.5.5)$$

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

Diese Gleichung beschreibt das Streuverhalten von Partikeln mit einem Trägheitsradius kleiner 10 nm (Punktstreuer). Besitzen die zu untersuchenden Moleküle eine größere Ausdehnung, ist es nicht mehr möglich, sie als Punktstreuer zu beschreiben. In diesem Fall müssen zusätzlich die intrapartikulären Interferenzen (Überlagerung von elektromagnetischen Wellen innerhalb eines Partikels) berücksichtigt werden. Dies geschieht durch die Erweiterung von Gleichung 3.5.4 mit dem Partikelformfaktor, der die Winkelabhängigkeit der Streuintensität beschreibt.

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{MP(q)} + 2A_2c \quad (3.5.6)$$

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

$$q = |q| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) : \text{Streuvektor}$$

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

N : Anzahl der Streuzentren

θ : Streuwinkel

Eine Taylorentwicklung des Partikelformfaktors liefert für kleine q :

$$P(q) = 1 - \frac{q^2}{3! N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle r_{ij}^2 \rangle + \dots \quad (3.5.7)$$

Des Weiteren gilt für das Quadrat des Trägheitsradius:

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_i^N \langle r_i^2 \rangle = \frac{1}{2N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle r_{ij}^2 \rangle \quad (3.5.8)$$

Einsetzen von Gleichung 3.5.7 in Gleichung 3.5.6 liefert für $P(q)$:

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle + \dots \quad (3.5.9)$$

Diese Gleichung gilt nur streng für monodisperse Proben. Polymere unterliegen in der Regel aber einer Verteilung bezüglich ihres Molekulargewichts und ihrer Größe. Unter Berücksichtigung der Polydispersität gilt für das Quadrat des Trägheitsradius:

$$\langle R_g^2 \rangle_z = \frac{\sum_i m_i M_i \langle R_g^2 \rangle_i}{\sum_i m_i M_i} \quad (3.5.10)$$

und somit für $P(q)$:

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z + \dots \quad (3.5.11)$$

Durch Verwendung folgender Beziehung:

$$1 - x = \frac{1}{1 + x} \quad (3.5.12)$$

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

und anschließendem Einsetzen von $P(q)$ in Gleichung 3.5.5 erhält man die Zimmgleichung für polydisperse Systeme ^[11]:

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z \right) + 2A_2 c \quad (3.5.13)$$

Mit Hilfe dieser Gleichung können Lichtstremessungen ausgewertet werden, indem man bei verschiedenen Konzentrationen $\frac{Kc}{R(\theta)}$ gegen $q^2 + c$ aufträgt. Extrapolation gegen $c \rightarrow 0$

liefert das z-Mittel des Trägheitsradienquadrat und das Gewichtsmittel der Molmasse. Die Extrapolation $q \rightarrow 0$ liefert wiederum das Gewichtsmittel der Molmasse und den zweiten Virialkoeffizienten.

Gleichung 3.5.12 kann nur auf stark verdünnte Systeme angewandt werden. Bei konzentrierten Proben verliert sie ihre Gültigkeit, weil in diesem Fall die interpartikulären Interferenzen (Strukturfaktor) nicht mehr vernachlässigt werden können.

3.6 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Im Gegensatz zur statischen Lichtstreuung wird bei der dynamischen Lichtstreuung nicht die gemittelte Streuintensität gemessen, sondern ihre zeitliche Fluktuation. Diese Fluktuation wird durch die Brownsche Bewegung der Partikel im Streuvolumen hervorgerufen. Nach dem Wiener-Khintchine-Theorem ^[12,13] gibt es zu jedem Intensitätsspektrum im Frequenzraum eine fouriertransformierte Funktion im Zeitraum, die sogenannte Autokorrelationsfunktion der

Streuintensität $g_2(t)$ ^[14]. Sie beschreibt die zeitliche Fluktuation der Streuintensität, die durch die Teilchenbewegung im Streuvolumen hervorgerufen wird. Experimentell erhält man sie durch Autokorrelation der gemessenen Intensitätsfluktuationen:

$$g_2(t) = \langle I(0)I(t) \rangle \quad (3.6.1)$$

$I(0)$: Streuamplitude zum Zeitpunkt 0

$I(t)$: Streuamplitude zum Zeitpunkt t

t : Zeitabstände der Kanäle des Autokorrelators

$\langle \dots \rangle$: zeitliches Mittel

Mit Hilfe der Siegert-Relation ist es möglich, $g_2(t)$ in die Autokorrelationsfunktion des Streufeldes zu überführen ($g_1(t)$), welche als Quotient aus dynamischen und statischen Strukturfaktor definiert ist ^[15]:

$$g_1(t) = \frac{S(q, t)}{S(q)} = \sqrt{\frac{g_2(t) - A}{A}} \quad (3.6.2)$$

$S(q, t)$: dynamischer Strukturfaktor

$S(q)$: statischer Strukturfaktor

A : experimentell bestimmte Basislinie

Für kleine, monodisperse Teilchen kann man $g_1(t)$ als exponentiell abfallende Funktion ausdrücken:

$$g_1(t) = B \exp(-q^2 D t) \quad (3.6.3)$$

B : Signal-Rauch-Verhältnis

D : translatorischer Diffusionskoeffizient

Handelt es sich allerdings um eine polydisperse Probe, so muss $g_1(t)$ als ein z-Mittel von Exponentialfunktionen der Teilchensorte i beschrieben werden:

$$g_1(t) = B \frac{\sum_i m_i M_i \exp(-q^2 D_i t)}{\sum_i m_i M_i} \quad (3.6.4)$$

D_i : translatorischer Diffusionskoeffizient der Teilchensorte i

m_i : Massenanteil der Teilchensorte i

M_i : Molmasse der Teilchensorte i

Trägt man $d(\ln(g_1(t)))/dt$ gegen q^2 auf, so erhält man aus der Anfangssteigung das z- Mittel des Diffusionskoeffizienten:

$$\left[\frac{d(\ln(g_1(t)))}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = q^2 \frac{\sum_i m_i M_i D_i}{\sum_i m_i M_i} = q^2 D_z \quad (3.6.5)$$

Bei diesem Wert handelt es sich nicht um den wahren Diffusionskoeffizienten der Probe, weil D_z sowohl Winkel als auch Konzentrationsabhängig ist.

$$D_{app}(q, c) = D_z \left(1 + C \langle R_g^2 \rangle_z q^2 + \dots \right) (1 + k_d c + \dots) \quad (3.6.6)$$

C : dimensionslose Größe, von der Molekülstruktur abhängig

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

$$k_f = f_0 (1 + k_1 c + \dots)$$

f_0 : Reibungskoeffizient

v_p : partielles Molvolumen des Polymers

Um das wahre z-Mittel des Diffusionskoeffizienten der Probe zu erhalten, müssen diese bei verschiedenen Winkeln bestimmt werden und gegen $q^2 \rightarrow 0$ extrapoliert werden. Dieser Diffusionskoeffizient kann immer noch eine Konzentrationsabhängigkeit besitzen, die durch die Wiederholung des oben beschriebenen Experiments bei einer anderen Konzentration überprüft werden muss. Ist eine Konzentrationsabhängigkeit vorhanden, muss der Diffusionskoeffizient bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt werden. Eine Auftragung der winkelunabhängigen Diffusionskoeffizienten gegen die Konzentration, gefolgt von einer Extrapolation gegen $c \rightarrow 0$ ergibt den winkel- und konzentrationsunabhängigen Diffusionskoeffizienten der Probe.

Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung kann man mit diesen Diffusionskoeffizienten den hydrodynamischen Radius der Probe berechnen:

$$R_H = \frac{KT}{6\pi\eta_0 D_z} = \left\langle \frac{1}{R_H} \right\rangle_z^{-1} \quad (3.6.7)$$

R_H : hydrodynamischer Radius

3.7 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die größten erreichbaren q -Werte in der Lichtstreuung liegen bei etwa $3 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$. Mit der Röntgenkleinwinkelstreuung hingegen können q -Werte bis zu $3 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-1}$ erreicht werden aufgrund der kleineren Wellenlänge dieser Strahlung. Aus diesem Grund können mit dieser Methode Informationen auf kleineren Längenskalen (2-10 nm) gewonnen werden.

Der Kontrast hängt nicht wie bei der Lichtstreuung von der Polarisierbarkeit der Probe ab, sondern von der Elektronendichtedifferenz zwischen Probe und Lösungsmittel. Aus diesem Grund wird häufig bei der Untersuchung von Polymeren Synchrotronstrahlung verwendet, die eine wesentlich höhere Intensität besitzt als andere Röntgenquellen.

Neugebauer ^[16] konnte zeigen, dass sich der Formfaktor eines unendlich dünnen Stäbchens nach Gleichung 3.7.1 berechnen lässt:

$$P(q) = \frac{1}{x} \left[\int_0^{2x} \frac{\sin x}{x} dx \right] - \left(\frac{\sin x}{x} \right)^2 \quad (3.7.1)$$

$$x = 2\pi \cdot \frac{l}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Für große q -Werte läuft der Formfaktor proportional zu q^{-1} . Daraus folgt:

$$\lim_{q \rightarrow \infty} P(q) = \frac{\pi}{Lq} \quad (3.7.2)$$

L : Konturlänge

Guinier und Fournet ^[17] haben die Streufunktion eines nicht unendlich dünnen Zylinders als Produkt zweier unabhängiger Formfaktoren ausgedrückt. Der erste Term beschreibt den Formfaktor eines unendlich dünnen Stäbchens im hohen q -Bereich. Der zweite Formfaktor bezieht sich auf den Querschnittsträgheitsradius des Zylinders:

$$P_{\text{Zyl.}}(q) \approx \frac{\pi}{Lq} \cdot P_c(q) \quad (3.7.3)$$

$P_c(q)$: Formfaktor des Querschnitts

Unter der Annahme $R_{g,c} \cdot q < 1$ kann $P_c(q)$ durch Gleichung 3.7.4 beschrieben werden:

$$P_c(q) \approx \exp\left(\frac{-q^2 R_{g,c}}{2}\right) \quad (3.7.4)$$

$R_{g,c}$: Trägheitsradius des Zylinderquerschnitts

Durch Auftragung von $\ln [q \cdot P_{Zyl}(q)]$ gegen q^2 erhält man als Steigung $-R_{g,c}^2/2$, wodurch man den Trägheitsradius des Zylinderquerschnitts bestimmen kann. Im Falle einer kreisförmigen Querschnittsfläche mit dem Radius r entspricht der Querschnittsträgheitsradius:

$$R_{g,c} = \frac{r}{\sqrt{2}} \quad (3.7.5)$$

Diese Formel kann allerdings nur angewendet werden, wenn der Zylinderquerschnitt eine homogene Dichte besitzt [18].

3.8 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) [19-20]

Eine besondere Art der Absorptionsspektroskopie ist die Kernspinresonanzspektroskopie, kurz als NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance) bezeichnet. Das Resonanzspektrum entsteht dabei durch Absorption elektromagnetischer Strahlung durch magnetische Atomkerne, die sich in einem statischen äußeren Magnetfeld befinden. Ein magnetisches Moment besitzen solche Atomkerne, die eine ungerade Anzahl von Neutronen oder Protonen aufweisen (z.B. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si etc.).

Befindet sich ein magnetischer Kern in einem statischen Magnetfeld, so hat er auf Grund seines magnetischen Kernmomentes verschiedene Orientierungsmöglichkeiten, die durch die magnetische Kernspinzahl m_I bestimmt werden.

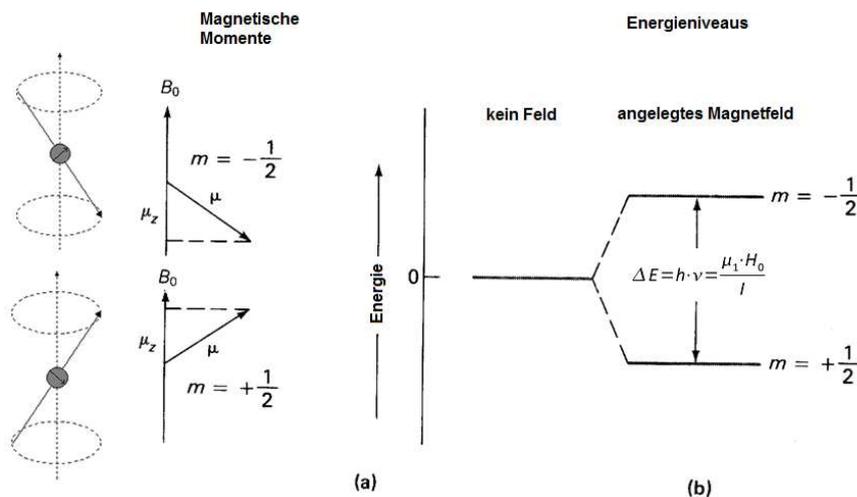


Abbildung 3.8.1: Schematische Darstellung der Energieniveauaufspaltung bei Atomen mit einem Kernspin $\neq 0$, durch anlegen eines äußeren Magnetfeldes

Durch ein elektromagnetisches Wechselfeld dessen magnetischer Vektor senkrecht auf dem statischen Magnetfeld steht, kann eine Uorientierung der Kernmomentachsen erzwungen werden, wobei die Energie aus dem Hochfrequenzfeld aufgenommen wird (Kernresonanz).

Diese Energie (ΔE) und die ihr entsprechende Frequenz der absorbierten Strahlung hängt von den magnetischen Eigenschaften des Atomkerns ab und ist der Stärke des äußeren Magnetfeldes H_0 proportional:

$$\Delta E = h\nu = \frac{\mu_1 H_0}{i} \quad (3.8.1)$$

ΔE : Energiedifferenz

h : Plancksche Wirkungsquantum

μ_1 : magnetisches Kernmoment

i : Kernspin

Besonders günstig erweisen sich für die NMR-spektroskopische Untersuchungen Kerne, bei denen das Verhältnis μ_1/h und damit der Wert von ΔE relativ groß sind. Dazu gehören Kerne mit einem Kernspin $i = \frac{1}{2}$, wie ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Nicht nachweisbar sind dagegen die in der organischen Chemie häufig vorkommenden Elemente ^{12}C , ^{16}O und ^{32}S , da ihr Kernspin null ist.

Zur Messung des Resonanzfalles bringt man eine Probe der zu untersuchenden Substanz (flüssig oder in Lösung) in das statische Magnetfeld. Die Substanz ist von einer Induktionsspule umgeben, in der ein hochfrequentes Wechselfeld erzeugt wird. Die Feldstärke wird so lange variiert, bis der Resonanzfall eintritt. In diesem Moment nimmt die Probe die Energie aus dem Wechselfeld auf, was sich in einer Änderung des Stromes, der zur Erzeugung des Wechselfeldes gebraucht wird, auswirkt. Diese Stromänderung (Resonanzsignal) lässt sich messen und registrieren. Man erhält das kernmagnetische Resonanzspektrum.

Die bisherigen Feststellungen bezogen sich auf Atomkerne ohne Elektronenhülle. Wird der Kern jedoch von einer Elektronenhülle abgeschirmt, so wird das äußere Magnetfeld in der Umgebung des Kerns geschwächt (diamagnetische Abschirmung).

$$H_{\text{eff}} = H_0 - \sigma \cdot H_0 \quad (3.8.2)$$

H_{eff} : effektives Magnetfeld

H_0 : statisches Magnetfeld

σ : magnetische Abschirmung

Das Resonanzsignal erscheint also erst bei einer gegenüber dem nicht abgeschirmten Kern größeren äußeren Feldstärke. Dieser Effekt wird als chemische Verschiebung (chemical shift) bezeichnet, weil er von der elektronischen, d.h. chemischen Umgebung des Kerns abhängt.

Um eine von der Feldstärke des angewandten Magnetfeldes bzw. von der Senderfrequenz unabhängige Maßzahl für die chemische Verschiebung zu erhalten, teilt man die Feldstärke bzw. Frequenzdifferenzen noch durch H_0 bzw. ν_0 und erhält:

$$\delta = \frac{H_s - H_i}{H_0} = \frac{\nu_s - \nu_i}{\nu_0} \quad (3.8.3)$$

H_s : Resonanzfeldstärken des Standards

H_i : Resonanzfeldstärken der Probe

H_0 : statisches Magnetfeld

ν_s : Resonanzfrequenzen des Standards

ν_i : Resonanzfrequenzen der Probe

ν_0 : Sendefrequenz

δ ist dimensionslos und liegt in der Größenordnung von 10^{-5} bis 10^{-7} . Aus diesem Grund wird diese Größe in ppm (parts per million) angegeben. Für die NMR-spektroskopische Untersuchung von ^1H - und ^{13}C -Kernen wird Tetramethylsilan (TMS) als innerer Standard benutzt, da es nur eine Resonanzfrequenz hat, die von der Konzentration und der chemischen Zusammensetzung der Lösung weitgehend unabhängig ist.

3.9 Zirkulardichroismus (CD) ^[21-25]

Bei der CD-Spektroskopie handelt es sich um eine optische Messmethode, bei der die Chiralität von Molekülen ausgenutzt wird. Voraussetzung für die CD-Spektroskopie ist die optische Aktivität der Probe, d.h. die unterschiedliche Wechselwirkung mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht. Gemessen wird die Differenz der Absorption zwischen rechts und links zirkular polarisiertem Licht, was auch als zirkularer Dichroismus bezeichnet wird (Gleichung 3.9.1).

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (3.9.1)$$

ΔA : zirkularer Dichroismus

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

In der Praxis wird bei modernen CD-Spektrometern die Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die Einheit der Elliptizität in diesem Fall beträgt [Rad].

$$\Theta_r = \frac{2.303}{4} (A_L - A_R) \quad (3.9.2)$$

Θ_r : Elliptizität in der Einheit [Rad]

Durch Multiplikation mit $180/\pi$ erhält man die Elliptizität in der Einheit [Grad]

$$\Theta_d = \frac{2,303}{4} (A_L - A_R) \frac{180}{\pi} = 32,998 (A_L - A_R) \quad (3.9.3)$$

Um in der Lage zu sein, die Elliptizitäten unterschiedlicher chiraler Proben zu vergleichen, ist es notwendig sie zu normieren. Die physikalische Größe welche traditionell dafür verwendet wird, ist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure, welche durch Gleichung 3.9.4 definiert ist und die Einheit [Grad·cm²·dmol⁻¹·residue⁻¹] besitzt.

$$\Theta_{mr} = \Theta_d \left(\frac{M}{c \cdot S_D \cdot n_r \cdot 10} \right) \quad (3.9.4)$$

Θ_{mr} : molare Elliptizität pro Aminosäure

c : Konzentration der Probe in g/l

S_D : Schichtdicke der Küvette

n_r : Anzahl der Aminosäurebausteine

M : Molekulargewicht der Probe

Der schematische Aufbau eines CD-Spektrometers ist in Abbildung 3.9.1 gezeigt:

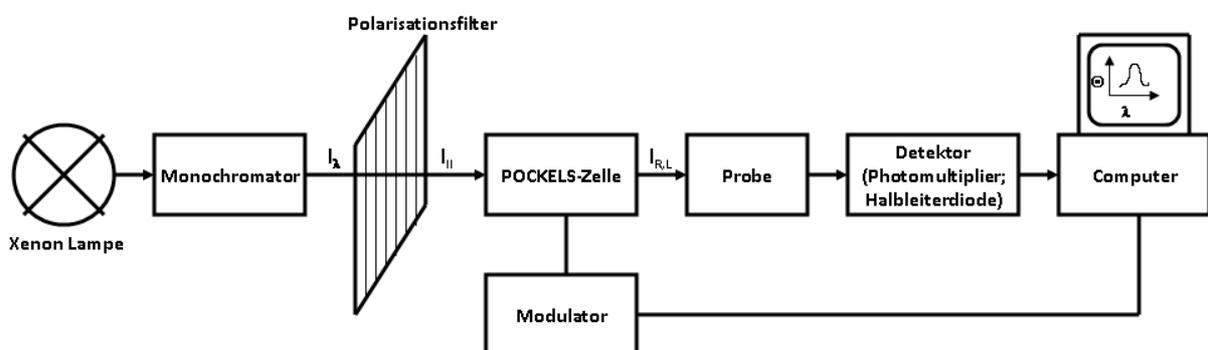


Abbildung 3.9.1: Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers

Unpolarisiertes monochromatisches Licht, erzeugt durch eine Xenonlampe und einen Monochromator (optisches Gitter oder Prisma), wird mittels eines Polarisationsfilters linear polarisiert und anschließend durch eine POCKELS-Zelle in rechts- bzw. links zirkular polarisiertes Licht umgewandelt. Das rechts- bzw. links zirkular polarisierte Licht wird wellenlängenabhängig abwechselnd auf die Probe eingestrahlt und die Absorption mit Hilfe eines Photomultipliers bzw. einer Halbleiterdiode detektiert. Anschließend wird mittels eines Computers die Differenz der Absorption zwischen rechts- und links zirkular polarisiertem Licht bestimmt (Elliptizität) und diese in Abhängigkeit der Wellenlänge aufgetragen.

Für die CD-Spektroskopie ist von Bedeutung, welche Chromophore optische Aktivität zeigen. Zunächst kann dies jedes absorbierende Molekül sein, das keine Symmetrieebene oder Symmetriezentrum aufweist. Dazu gehören z.B. alle in der Natur vorkommenden Aminosäuren (bis auf Glycin), da ihre α -Kohlenstoffatome jeweils vier verschiedene Substituenten tragen. Optische Aktivität kann jedoch auch hervorgerufen werden, wenn ein planares Chromophor sich in einer asymmetrischen Mikroumgebung befindet. So kann z.B. Helicen nicht eben gebaut sein, sondern muss die Gestalt einer Schraubenfläche haben. Damit ist aber auch das π -System chiral geworden, was wiederum eine optische Aktivität induziert. Die optische Aktivität vieler Biopolymere ergibt sich somit nicht nur durch die Bindung ihrer chromophoren Gruppen an asymmetrische Kohlenstoffatome (symmetrisch gestörte Chromophore), sondern auch durch die Ausbildung von Überstrukturen wie z.B. α -Helices oder β -Faltblätter. Die Kopplung von Chromophoren führt dazu, dass die optische Aktivität ein empfindlicher Monitor der Sekundärstruktur von Biomolekülen ist und entsprechend gerne zur Strukturanalyse genutzt wird. Im Fall von Proteinen unterscheidet man bei der CD-Spektroskopie zwischen zwei Spektralbereichen, dem Nah UV-Bereich (250-300 nm), welcher Informationen über die Tertiärstruktur beinhaltet und dem Fern UV-Bereich (170-250 nm), mit dem Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins getroffen werden können. Bezüglich des Fern UV-Bereichs dienen als Chromophore bei Proteinen die Amidgruppen. Ihre π -Elektronen sind über die C-, N- und O-Atome delokalisiert.

Liegt das Polypeptid in der random-coil-Konformation vor, ist im CD-Spektrum ein stark negatives Minimum bei etwa 195 nm zu beobachten ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) und ein schwach positives Maximum bei 212 nm ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang).

Ist die α -Helix die dominierende Überstruktur des Proteins, ist der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang entartet. Er besteht aus zwei Komponenten, mit Wellenlängen von 191 nm bzw. 208 nm. Sie sind einem senkrecht bzw. parallel zur Helixachse liegendem Betrag zuzuschreiben. Der $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang liegt hier bei etwa 222 nm.

Besteht die Überstruktur des Proteins hauptsächlich aus einem β -Faltblatt wird ein Maximum bei 196 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) und ein Minimum bei 212 nm ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang) im CD-Spektrum detektiert.

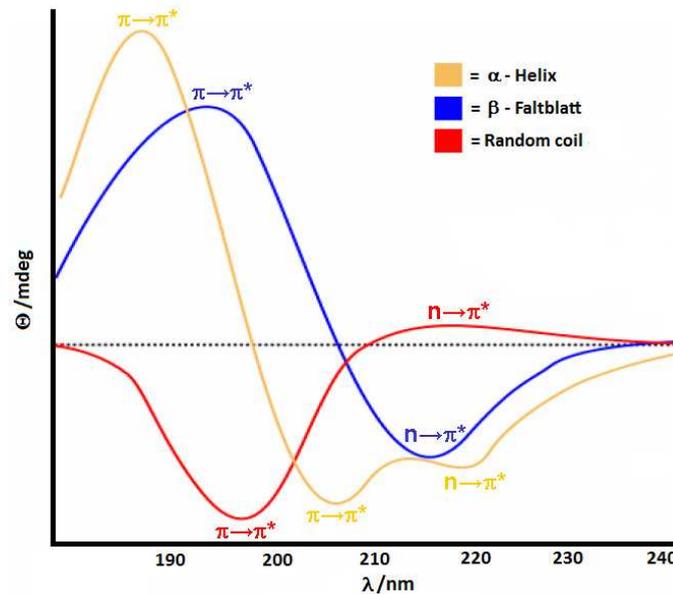


Abbildung 3.9.2: Basisspektren der CD-Spektroskopie

Neben der qualitativen Betrachtung der CD-Spektren aus den man meistens mit bloßem Auge den dominierenden Anteil der Sekundärstruktur bestimmen kann, ist man natürlich auch daran interessiert, aus den Spektren von Proteinen qualitativ die Anteile der jeweiligen Sekundärstruktur zu ermitteln. Dazu macht man einen halbempirischen Ansatz, bei dem man davon ausgeht, dass sich ein Protein als Aneinanderreihung von Regionen mit α -Helices, β -Faltblättern und ungeordneten Knäuelstrukturen beschreiben lässt, und sich das CD-Spektrum aus den Beiträgen der einzelnen Strukturen additiv zusammensetzt, wobei Seitenketteneffekte vernachlässigt werden. Als Basis für die Rechnungen benutzt man die Elliptizität, die sich aus den CD-Spektren von Modellsubstanzen für die Strukturmerkmale ergibt. Die Sekundärstrukturanteile der Modellsubstanzen wurden durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Für die Berechnung der Anteile wird folgender Ansatz gewählt:

$$\Theta_{mr} = f_{\alpha} \Theta_{mr}^{\alpha} + f_{\beta} \Theta_{mr}^{\beta} + f_{rc} \Theta_{mr}^{rc} \quad (3.9.5)$$

Θ_{mr}^{α} : Elliptizitäten der α -helikalen Strukturmerkmale

Θ_{mr}^{β} : Elliptizitäten der β -Faltblatt Strukturmerkmale

Θ_{mr}^{rc} : Elliptizitäten der random coil Strukturmerkmale

$f_{\alpha}, f_{\beta}, f_{rc}$: Anteile der Sekundärstrukturmerkmale im Protein

Zum einen lassen sich nach dieser Gleichung die CD-Spektren für verschiedene Gehalte an α -Helix, β -Faltbalgt und Zufallsknäuel berechnen zum anderen aber auch gemessene Spektren anpassen. Mit Hilfe eines Computerprogramms können die Parameter f_i solange variiert werden, bis die berechneten Punkte auf dem gemessenen Spektrum liegen. Gängige Computerprogramme um die Sekundärstrukturanteile zu berechnen, sind z.B. CONTIN von Provencher und Glöckner, SELCON von Sreerama und Woody oder CDSSTR von Johnson. Programmpakete welche die oben genannten Programme verwenden um die Sekundärstrukturanteile zu berechnen sind z.B. CD-Pro oder Dichroweb. Beide Pakete sind kostenlos im Internet erhältlich.

3.10 UV-VIS-Spektroskopie ^[26]

Die meisten organischen Verbindungen, die Doppelbindungen und/oder freie Elektronenpaare enthalten, absorbieren elektromagnetische Strahlung oberhalb einer Wellenlänge von 180 nm. Die für die Lichtabsorption verantwortlichen Gruppierungen werden auch als Chromophore bezeichnet. Bei der Lichtanregung entsteht aus dem Grundzustand des Moleküls ein angeregter Zustand, der gewissermaßen ein neues Molekül mit veränderter Struktur (Bindungsabstände, Bindungswinkel und Elektronenverteilung) darstellt. Er ist energiereich und hat gewöhnlich eine Lebensdauer im Nanosekundenbereich. Angeregte Zustände können auch chemische Reaktionen eingehen (Photochemie). Die mitangeregten Molekülschwingungen werden vor allem aufgrund von Schwingungswechselwirkungen mit dem Lösungsmittel meistens nicht aufgelöst. Stattdessen beobachtet man Absorptionsbanden, die in unpolaren Lösungsmitteln durch Feinstrukturen überlagert sein können. Nach einem einfachen qualitativen, quantenchemischen Modell ist die Lichtanregung mit dem Übergang eines Elektrons von einem besetzten Molekülorbital des Grundzustandes in ein antibindendes Molekülorbital verbunden. Die antibindenden Orbitale werden gewöhnlich durch ein Sternchen gekennzeichnet.

Die unterschiedliche Intensität der Absorptionsbanden beruht darauf, dass die Elektronenübergänge Symmetriebedingungen unterliegen. Man unterscheidet zwischen „erlaubten“ Übergängen (Absorptionskoeffizient $\epsilon > 10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) und mehr oder weniger stark „verbotenen“ Übergängen (Absorptionskoeffizient $\epsilon < 10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$).

Anhand der Energieabsorption erhält man Informationen über die Probe, wie z.B. die Anwesenheit bestimmter Moleküle oder Bindungsverhältnisse in Molekülen. Nach entsprechender Kalibrierung ist auch eine Konzentrationsbestimmung möglich. Die Lichtquelle des Spektrometers strahlt Licht mit Wellenlängen im UV/VIS-Bereich aus. Im

Monochromator wird während der Messung nach und nach jede einzelne Wellenlänge (im möglichen Bereich von 200 nm bis 800 nm) selektiert. Ein Sektorspiegel leitet das Licht abwechselnd durch die Probenküvette und durch die Vergleichsküvette mit reinem Lösungsmittel. Im Detektor werden die beiden Strahlintensitäten verglichen und anschließend am PC das Intensitätsspektrum der Probe in Abhängigkeit der Wellenlänge aufgetragen.

3.11 Rasterkraftmikroskopie (AFM) ^[27-28]

Die Atomic Force Microscopy (deutsch: Rasterkraftmikroskopie) ist eine Technik, die sich innerhalb kürzester Zeit zur Untersuchung von Oberflächen durchgesetzt hat. Insbesondere in Arbeiten über Bürstenpolymere hat sich das AFM als eine gute Methode bewiesen, um anschauliche Bilder von zylindrischen Nanopartikeln zu erhalten, Konformationsänderungen zu zeigen und darüber hinaus einzelne Moleküle zu manipulieren.

Des Weiteren können auch Verteilungen und Molmassen von Nanostrukturen abgeschätzt werden, in dem man die AFM-Technik mit Langmuir-Blodgett-Techniken kombiniert.

Das Messprinzip dieser nicht optischen Methode ist relativ einfach zu verstehen. Ein Träger wird durch Schleuderbeschichtung (spin coating) mit den zu untersuchenden Nanopartikeln beschichtet und mit Hilfe einer sehr feinen Spitze abgetastet. Der Träger befindet sich auf einem 3D-piezoscanner und die Spitze ist an einem Federbalken (Cantilever) befestigt, der eine Länge von mehreren 100 nm besitzt. Die Kraftkonstante des Cantilevers ist so gering, dass die Änderung der Wechselwirkung in der Nähe der Oberfläche detektiert werden kann. Durch Bewegung der Probe mit Hilfe des 3D-Piezoscanners unterhalb der feinen Spitze, kann ein 2D-Höhenprofil der Oberfläche gemessen werden und somit Bilder von Nanopartikeln aufgenommen werden. Die Informationen für diese Bilder werden aus der elektrischen Regelung der Piezokristalle am Scanner entnommen, (x,y-Information) und aus der Auslenkung des Federbalkens (Höheninformation).

Je nach Mode wird eine unterschiedliche Regelung verwendet. Im contact-mode bewegt sich die Nadel mit ständigem Kontakt zur Oberfläche. Das z-Signal ergibt sich aus der Federauslenkung oder bei konstantem Fotodiodenstrom aus der z-Position des Scanners. Im tapping-mode schwingt die Spitze mit der Cantileverresonanzfrequenz (ca. 300 kHz) knapp über die Oberfläche, auf der sich die zu untersuchenden Nanopartikel befinden. Eine Höhenänderung wird in diesem Fall über die Änderung der Amplitude bzw. Phase der Schwingung ermittelt, die wie im contact-mode durch das Photodiodensignal gemessen wird. Insbesondere zur Analyse weicher Materie (Polymere etc.) hat sich der tapping-mode als vorteilhaft gegenüber dem contact-mode erwiesen. Verunreinigungen der feinen Nadelspitze

können mit diesem Modus eher vermieden werden, weil die Spitze nicht im dauerhaften Kontakt mit der Probe steht.

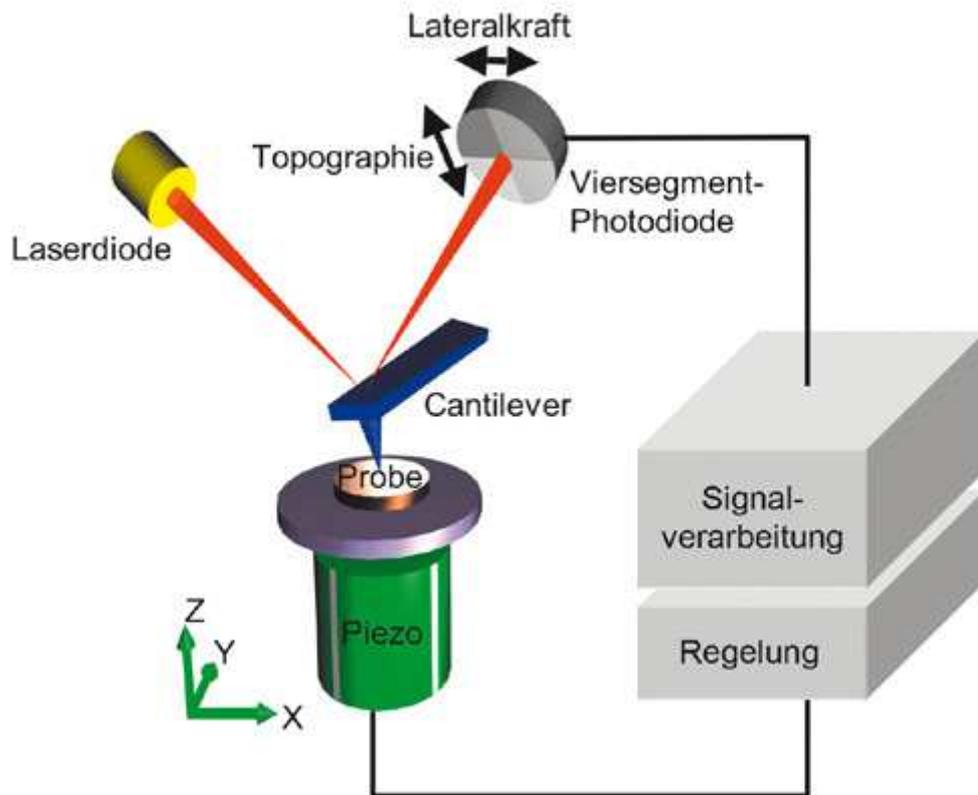


Abbildung 3.11.1: Schematische Abbildung eines Rasterkraftmikroskops

Der Probenträger besteht normalerweise aus Graphit oder Mica und muss höchsten Ansprüchen genügen. Er muss atomar glatt und frei von Fehlstellen sein, die andernfalls die Qualität der Abbildungen verschlechtern würden. Stellt sich heraus, dass Mica bzw. Graphit nicht zur Abbildung von einer Sorte Nanopartikeln geeignet ist, kann man die Oberflächen durch Auftragung von Metallionen, Silanierung bzw. Thiolierung entsprechend modifizieren.

Literatur zu Kapitel 3

- [1] S. Mori, H. G. Barth; *Size Exclusion Chromatography*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1999)
- [2] H. Engelhardt; *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, New York, Heidelberg (1977)
- [3] V. R. Meyer; *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Verlag Moritz Diesterweg, Otto Salle Verlag, Verlag Sauerländer, Frankfurt/Main (1990)
- [4] W. Gottwald; *GC für Anwender*. - VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1995)
- [5] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt; *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten*, Vieweg-Verlag, Braunschweig/Wiesbaden (1994)
- [6] H. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn; *Capillary Electrophoresis: Principles and Practise*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1993)
- [7] J. W. S. Rayleigh; *Philos. Mag.*, **47**, 375 (1899)

-
- [8] M. Smoluchowski; *Ann. Phys.*, **25**, 205 (1908)
- [9] A. Einstein, *Ann. Phys.*, **33**, 1275, (1910)
- [10] P. Debye, *J. Phys. & Colloid. Chem.*, **51**, 18 (1910)
- [11] B. Zimm, *J. Chem. Phys.*, **16**, 1099 (1948)
- [12] N. Wiener; *Acta Math.*, 118 (1930)
- [13] A. Kintchine; *Math. Ann.*, **109**, 604 (1934)
- [14] M. Schmidt, *Dynamic Light Scattering*, W. Brown (Ed.), Clarendon Press, Oxford, 372 (1993)
- [15] J. F. Siegert, *MIT Rap. Lab. Rep.*, 465 (1943)
- [16] T. Neugebauer; *Ann. Physik*, **42**, 509 (1943)
- [17] A. Guinier, G. Fournet; *Small Angle Scattering of X-Rays*, Wiley, New York (1955)
- [18] O. Glatter, O. Gratky; *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London (1982)
- [19] E. Breitmayer; *Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen*, B. G. Teubner, Stuttgart, (1992)
- [20] H. Friebolin; *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, Wiley-VCH, Weinheim (1999).
- [21] G.D. Fasman; *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York (1996)
- [22] N. Berova, K. Nakanishi; *Circular Dichroism*, Wiley-VCH (2000)
- [23] N. Sreerama, R. W. Woody; *Anal. Biochem.*, **209**, 32 (1994)
- [24] S. W. Provencher, J. Glöckner; *Biochemistry*, **20**, 33 (1981).
- [25] W. C. Johnson; *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **35**, 307 (1999)
- [26] G. Gauglitz; *Praxis der UV-VIS-Spektroskopie*, Attempto Verlag, Tübingen (1983).
- [27] S. S. Sheiko; M. Moeller, *Chem. Rev.*, **101**, 4099 (2001)
- [28] S. S. Sheiko, M. da Silva, D. Shirvantiants, I. LaRue, S. Prokhorova, M. Moeller; K. Beers, K. Matyjaszewski; *Journal of American Chemical Society*, **125**, 6725 (2003)

Kapitel 4: Herstellung von Polypeptidbürsten

Wie schon in Kapitel 2 beschrieben, gibt es grundsätzlich 3 verschiedene Methoden um Polymerbürsten zu synthetisieren. Dr. Bin Zhang ein ehemaliger Mitarbeiter der Schmidtgruppe versuchte während seiner Doktorarbeit, Polypeptidbürsten mit Hilfe der grafting-from-Methode herzustellen^[1]. Es gelang ihm ein Poly-L-lysin-Makromonomer herzustellen, allerdings war es ihm nicht möglich, Bürsten mit einem langen Rückgrat aus diesem Makromonomer zu synthetisieren. Er konnte lediglich kugelförmige Nanostrukturen herstellen, was darauf schließen lässt, dass die radikalische Polymerisation des Makromonomers nach Verknüpfung weniger Makromonomereinheiten zum Abbruch kam. Aus diesem Grund wurde die grafting-from-Methode gewählt, um die gewünschten Polypeptidbürsten herzustellen.

4.1 Monomersynthese zur Herstellung des Makroinitiatorprecursors

Bei dem Monomer welches zur Herstellung des Makroinitiators gewählt wurde, handelt es sich um N-Boc-N'-methacrylamid-1,6-diaminohexan. Das gewünschte Molekül wurde in einer zweistufigen Synthese ausgehend von 1,6-Diaminohexan synthetisiert. Im ersten Schritt wurde nach einer abgewandelten Vorschrift von Stahl et. al. 1,6-Diaminohexan selektiv mit einer Boc-Schutzgruppe versehen^[2] (Abb. 4.1.1).

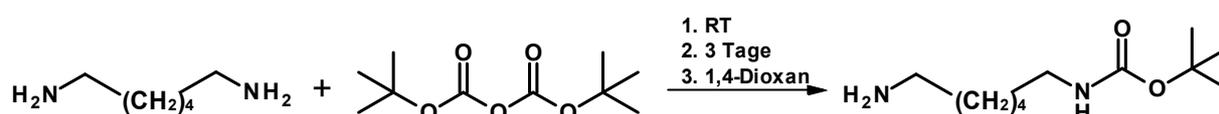


Abbildung 4.1.1: Reaktionsschema zur Herstellung von Mono-N-boc-1,6-diaminohexan

Die Reinheit des Mono-N-boc-1,6-diaminohexan's wurde mit ¹H-NMR-Spektroskopie (Abb. 4.1.2), sowie einer gaschromatographischen Untersuchung (Abb. 4.1.3) überprüft. Im Protonenspektrum sind keine Signale zu erkennen, die nicht dem gewünschten Produkt zugeordnet werden können. Aus dem Gaschromatogramm lässt sich schließen, dass das Produkt eine Reinheit größer 98% besitzt. Als Vergleich wurde für diese Untersuchung das kommerziell erhältliche und sehr teure Mono-N-boc-1,6-diaminohexan verwendet. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Qualität des synthetisierten und kommerziellen Produkts sich nicht wesentlich unterscheidet.

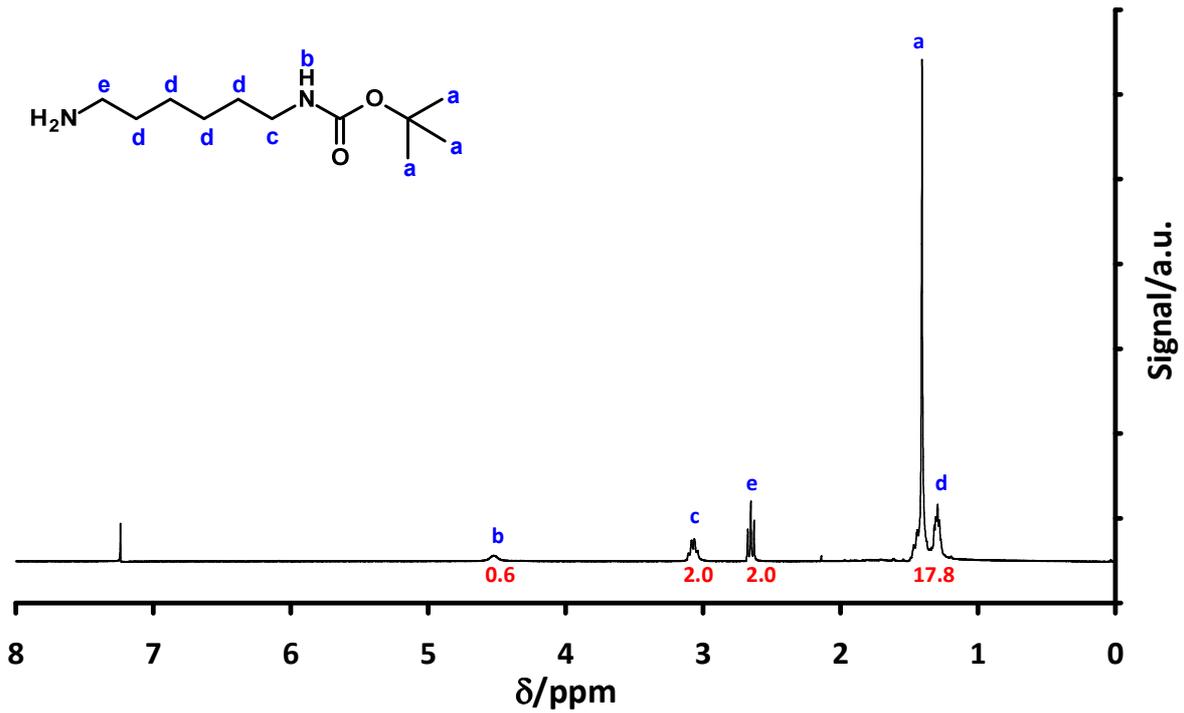


Abbildung 4.1.2: ¹H-NMR von Mono-N-boc-1,6-diaminohexan (300 MHz, T=293 K, LM: CDCl₃, c=20 g/l)

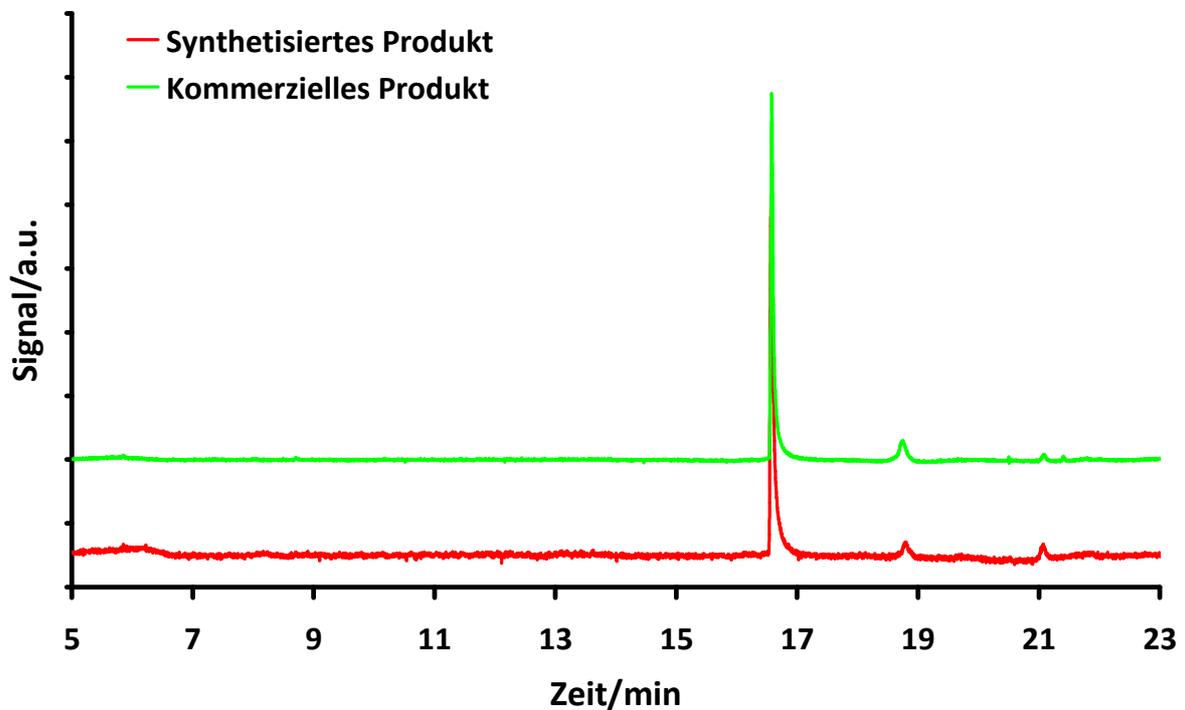


Abbildung 4.1.3: Gaschromatogramm von kommerziellen und selbst hergestellten Mono-N-boc-1,6-diaminohexan

Im zweiten Schritt wurde das Mono-N-boc-1,6-diaminohexan mit Methacrylsäurechlorid wiederum nach einer Vorschrift von Stahl et. al. umgesetzt ^[2] (Abb. 4.1.4).

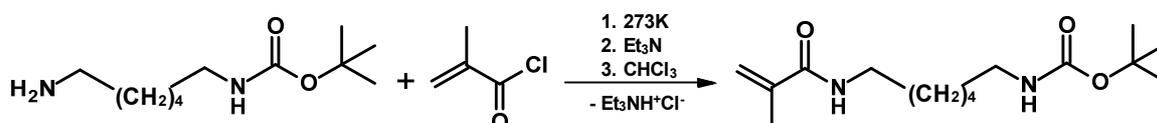


Abbildung 4.1.4: Reaktionsschema zur Herstellung von *N*-Boc-*N'*-methacrylamid-1,6-diaminohexan

Das Monomer wurde durch zweifache Flashchromatographie aufgereinigt und mit ¹H-NMR-Spektroskopie (Abb. 4.1.5) analysiert. Verunreinigungen konnten mit dieser Methode nicht detektiert werden.

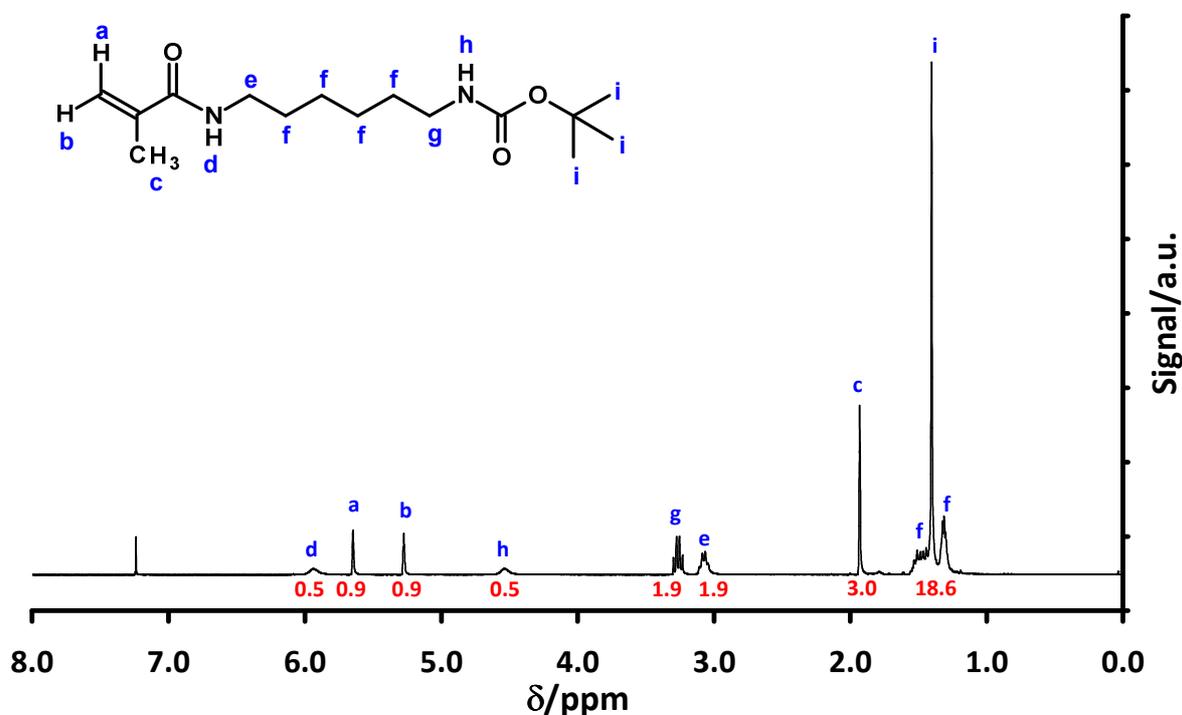


Abbildung 4.1.5: ¹H-NMR von *N*-Boc-*N'*-methacrylamid-1,6-diaminohexan
(300 MHz, $T=293$ K, LM: CDCl_3 , $c=20$ g/l)

Zur genaueren Überprüfung der Reinheit wurde das Monomer mit HPLC (Abb. 4.1.6) weitergehend untersucht. Auch mit Hilfe dieser Analysemethode konnten keine Verunreinigungen nachgewiesen werden, die anschließende radikalische Polymerisationen verhindern könnten.

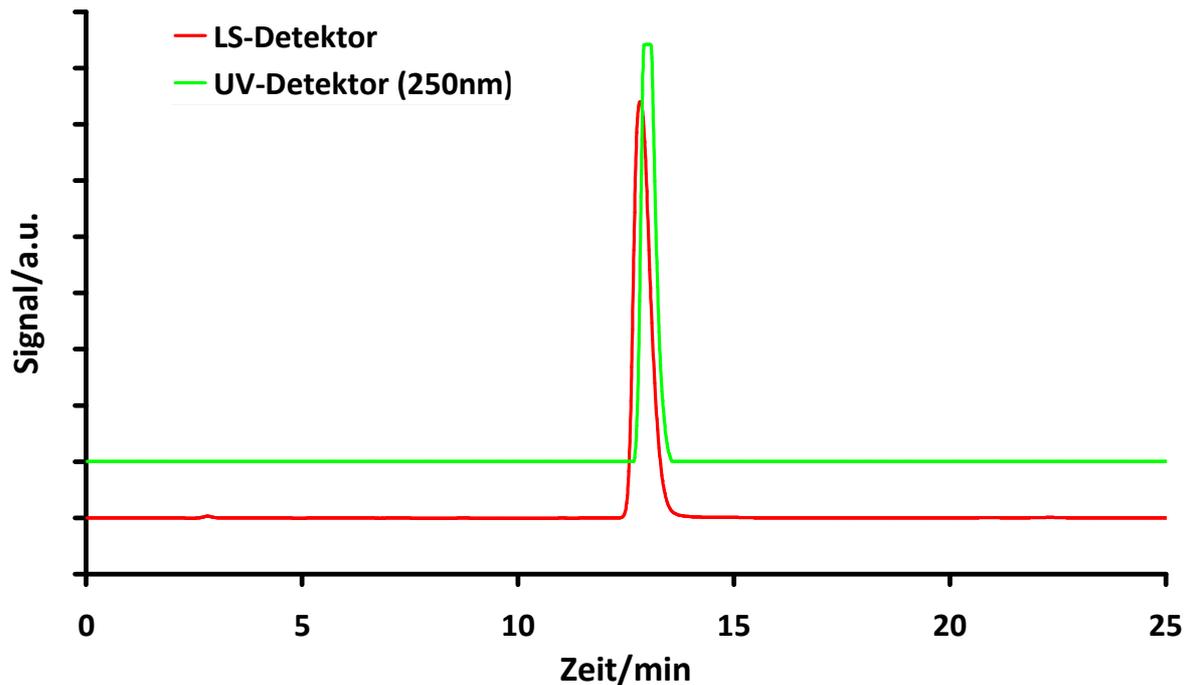


Abbildung 4.1.6: HPLC-Chromatogramm von *N*-Boc-*N'*-methacrylamid-1,6-diaminohexan
T=293 K, LM: ACN/H₂O (50:50), Säulenmaterial: RP18, Säulenlänge: 25 cm, *c*=0.5 g/l

4.2 Herstellung des Makroinitiators

Die Polydispersität einer Polymerbürste wird generell durch die Polydispersität des Rückgrats bestimmt. Ist sie größer als zwei, kann es zu Schwierigkeiten bei der Interpretation der statischen und dynamischen Lichtstreuungsmessungen kommen.

Aus diesem Grund wurde die RAFT-Polymerisationstechnik zur Herstellung des Makroinitiatorprecursors gewählt. Verschiedene RAFT-Reagenzien wurden ausprobiert, um *N*-Boc-*N'*-methacrylamid-1,6-diaminohexan kontrolliert radikalisch zu polymerisieren. Die 4-Cyano-4-methyl-4-thiobenzoylsulfanyl-buttersäure erwies sich dabei als beste Alternative. Das RAFT-Reagenz wurde in einer zweistufigen Synthese nach einer abgewandelten Vorschrift von Amer et. al. hergestellt^[3]. Der erste Schritt beinhaltet die Synthese von Bis-thio-benzoyl-disulfid, was nach dem Reaktionsschema in Abbildung 4.2.1 dargestellt wurde.

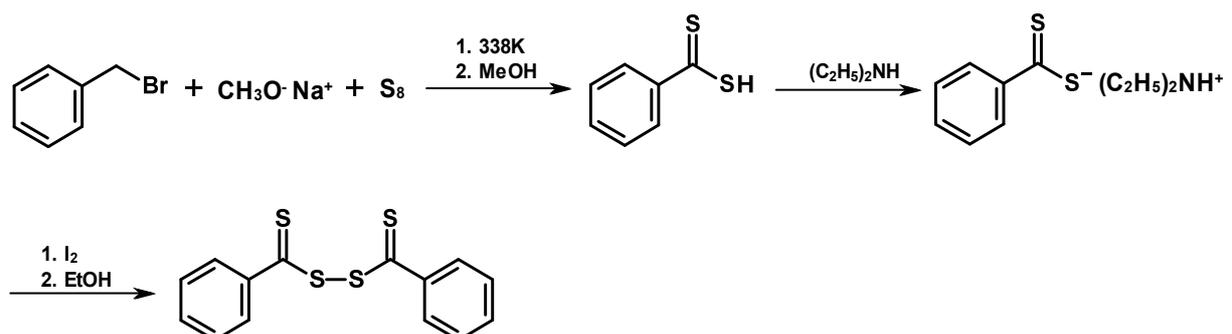


Abbildung 4.2.1: Reaktionsschema zur Herstellung von Bis-thio-benzoyl-disulfid

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 4.2.2) können nicht nur die Signale des Produkts erkannt werden. Es sind auch Verunreinigungen im aliphatischen Bereich zu sehen, die allerdings im zweiten Schritt der Synthese nicht weiter stören.

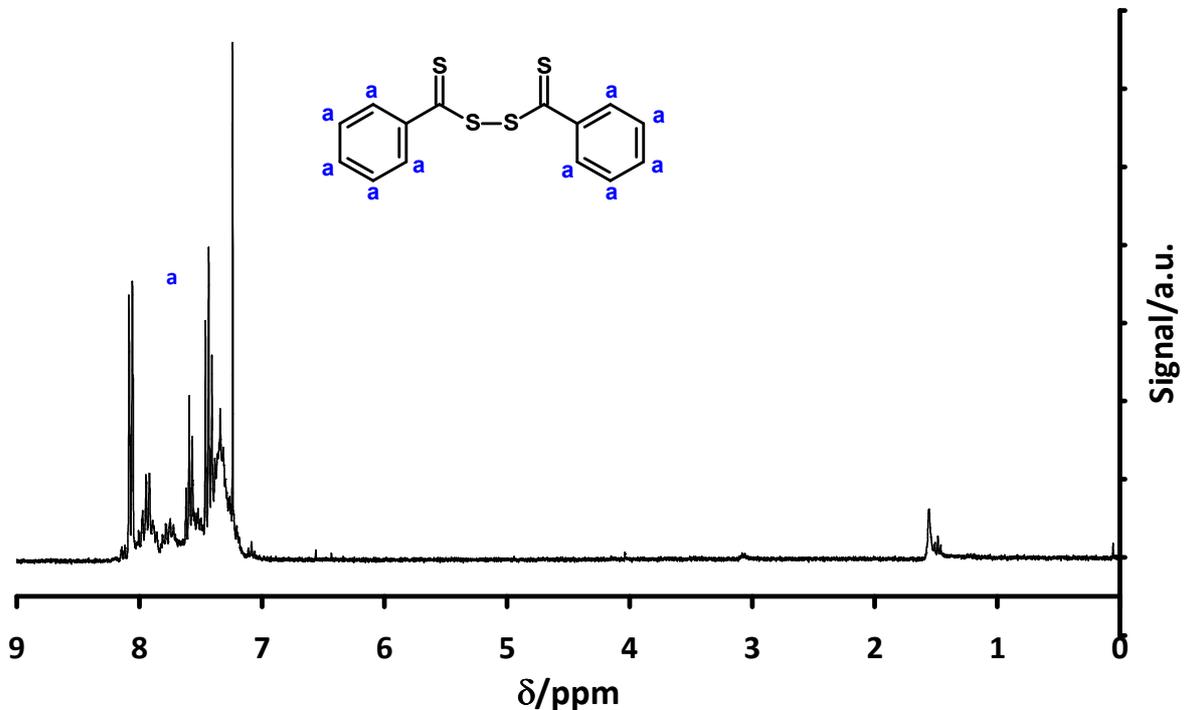


Abbildung 4.2.2: $^1\text{H-NMR}$ von Bis-thio-benzoyl-disulfid (300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3 , $c=20\text{ g/l}$)

Anschließend wurde das Bis-thio-benzoyl-disulfid zusammen mit 4,4'-Azobis(4-cyanovaleriansäure) zur 4-Cyano-4-methyl-4-thiobenzoylsulfanyl-buttersäure umgesetzt (Abb. 4.2.3).

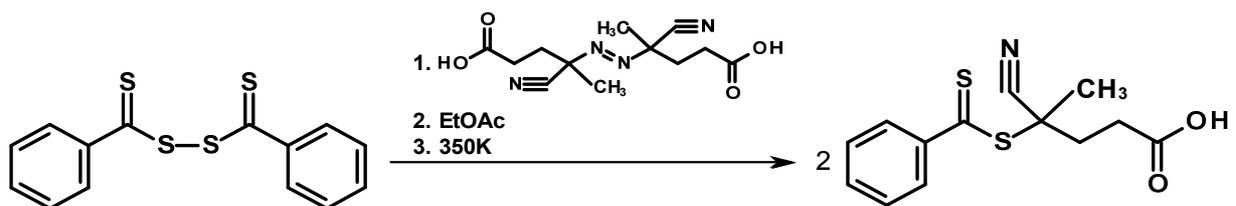


Abbildung 4.2.3: Reaktionsschema zur Herstellung von 4-Cyano-4-methyl-4-thiobenzoylsulfanyl-buttersäure

Die Isolierung des Produkts erfolgte durch zweifache Flashchromatographie mit einem Gemisch aus n-Hexan und Ethylacetat als mobile Phase. Die Reinheit des Produkts wurde auch in diesem Fall durch Aufnahme eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums überprüft (Abb. 4.2.4), in dem keine weiteren Verunreinigungen zu erkennen sind.

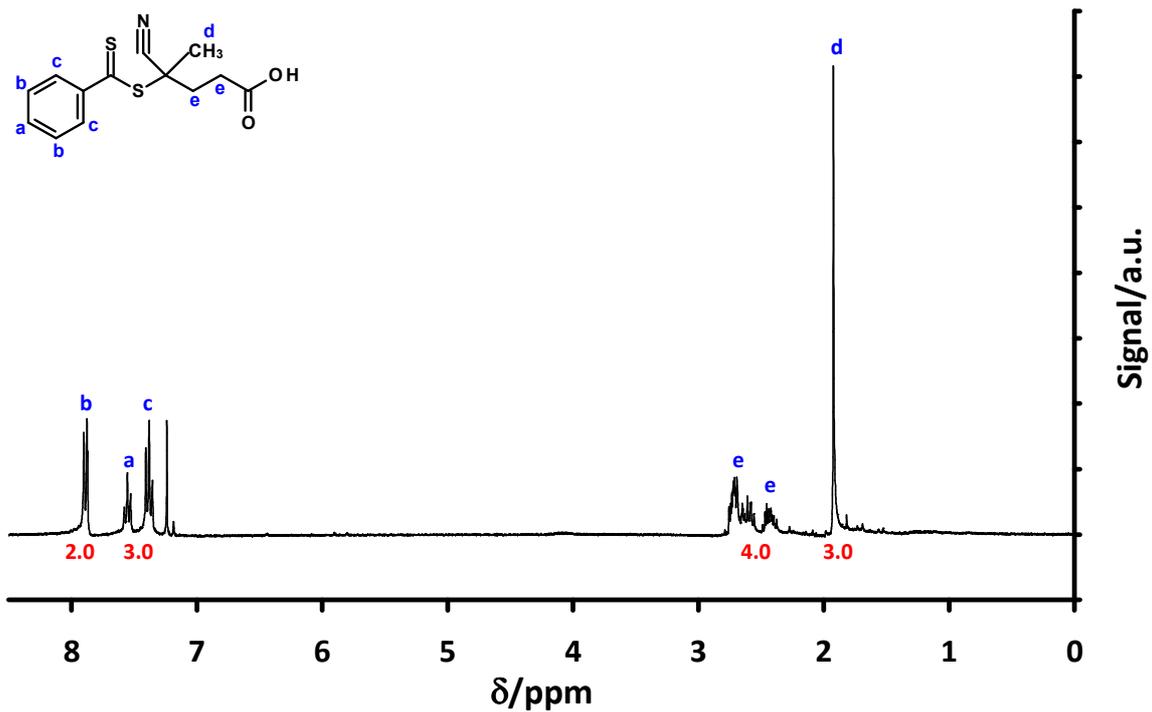


Abbildung 4.2.4: $^1\text{H-NMR}$ von 4-Cyano-4-methyl-4-thiobenzoylsulfanyl-buttersäure
(300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3 , $c=20\text{ g/l}$)

Die Polymerisation von N-Boc-N'-methacrylamid-1,6-diaminohexan wurde in Substanz, bei einer Temperatur von 363 K durchgeführt (Abb. 4.2.5).

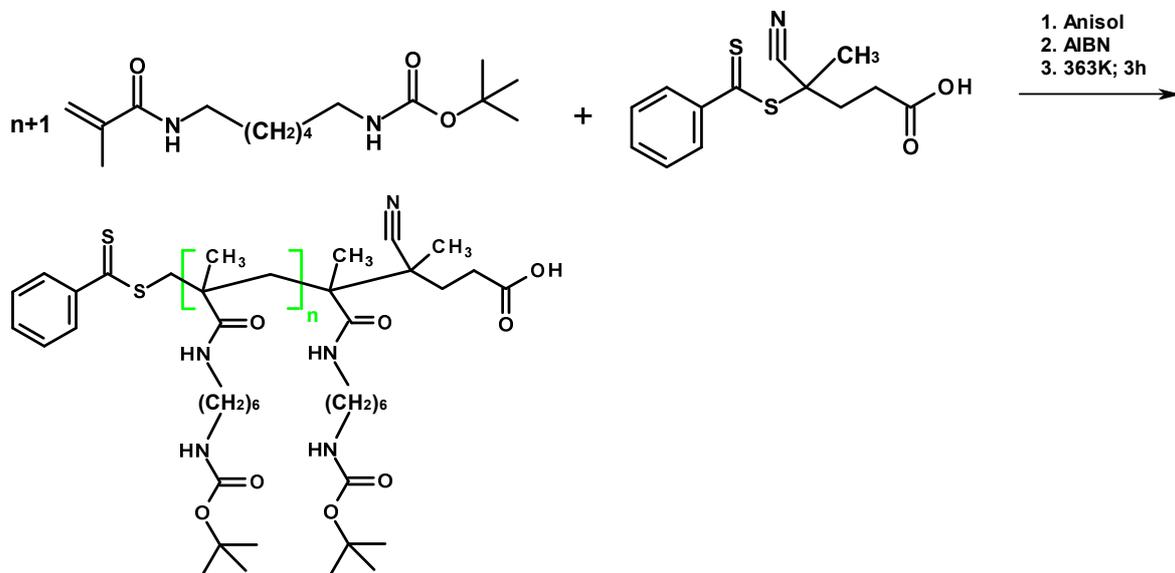


Abbildung 4.2.5: Reaktionsschema zur Herstellung des Makroinitiatorprecursors

Lediglich der Radikalinitiator (AIBN) und das RAFT-Reagenz wurden vorher in wenig Anisole gelöst und zum Monomer (weißer Feststoff; Schmelzpunkt: 340 K) hinzugegeben. Die Polymerisation wurde nach exakt 3 Stunden abgebrochen und das Polymer durch Fällen in Diethylether isoliert.

Abbildung 4.2.6 zeigt das Gelpermeationschromatogramm des Polymers in DMF. Man erkennt eine monomodale Verteilung. Weitere Peaks, die auf Rekombinationsprodukte hinweisen könnten, sind nicht zu erkennen. Die apparente Polydispersität wurde mit Hilfe einer Polystyrolkalibrierung ermittelt und beträgt 1.5.

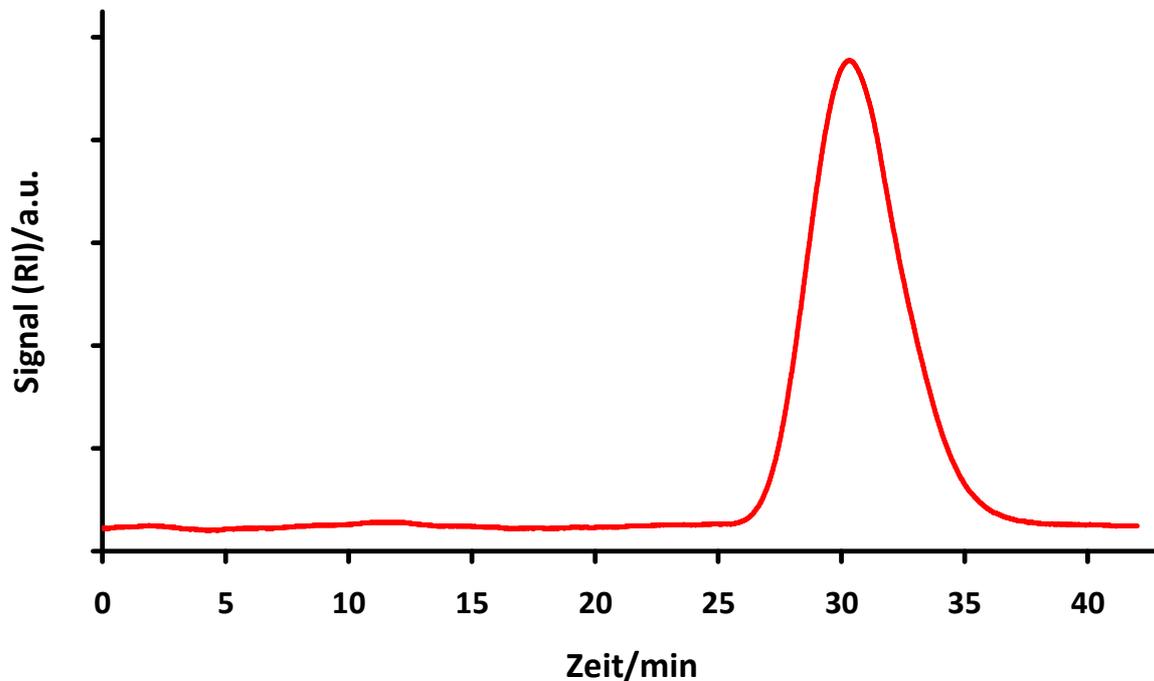


Abbildung 4.2.6: Gelpermeationschromatogramm des Makroinitiatorprecursors in DMF (LiBr 1g/l, T=333K)

Das Molekulargewicht (M_w) wurde mittels statischer Lichtstreuung in THF bestimmt (Abb. 4.2.7) und besitzt einen Wert von 260000 g/mol, was einer mittleren Anzahl von 900 Wiederholungseinheiten pro Polymerkette entspricht. Dieses Ergebnis liegt deutlich über den durchschnittlichen Molekulargewichten, die normalerweise mit der RAFT-Technik erreicht werden und erklärt gleichzeitig die hohe Polydispersität des Polymers. Der Trägheitsradius (R_g) des Polymers liegt bei 15.7 nm. Der zweite Virialkoeffizient (A_2) ist schwach positiv, was darauf hinweist, dass THF ein gutes Lösungsmittel für dieses Polymer ist.

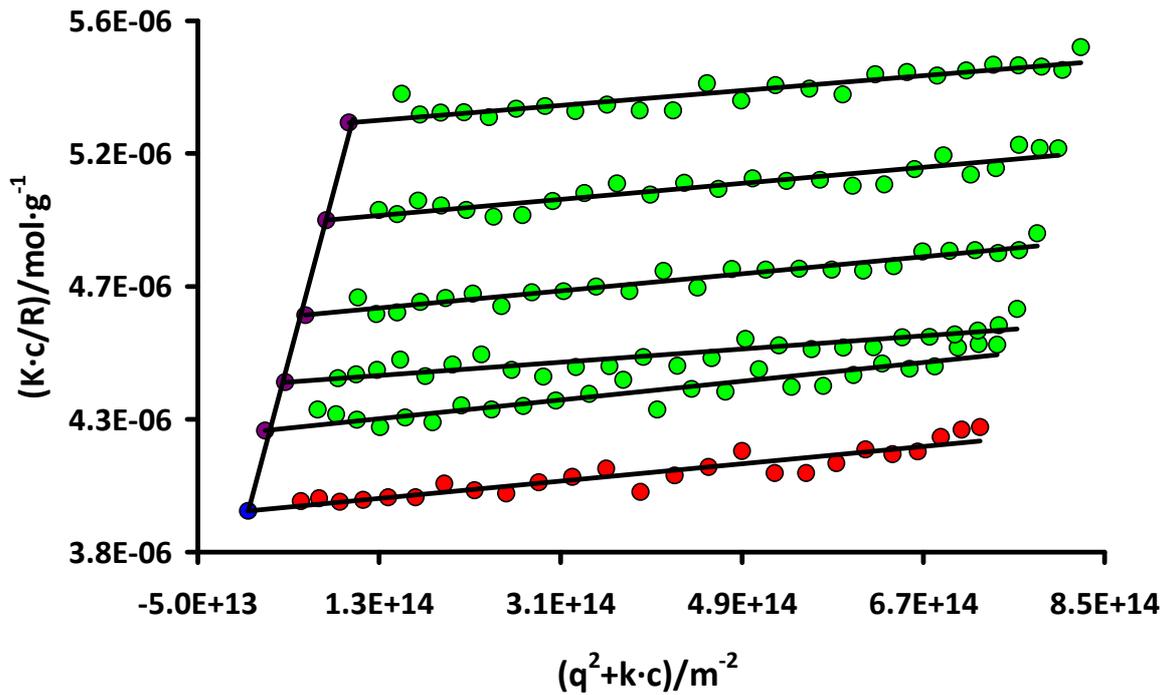


Abbildung 4.2.7: Zimmplot des Makroinitiatorprecursors in THF bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)

$$c_1=4.00 \text{ g/l}; c_2=3.10 \text{ g/l}; c_3=2.27\text{E} \text{ g/l}; c_4=1.47\text{E}-02 \text{ g/l}; c_5=6.74\text{E}-01 \text{ g/l}$$

$$M_w=2.60\text{E}05 \text{ g/mol}; R_g=15.7 \text{ nm}; A_2=1.59\text{E}-07 \text{ mol}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{g}^{-2}; dn/dc=0.054 \text{ cm}^3/\text{g}$$

Der Hydrodynamische Radius (R_H), welcher durch konzentrationsabhängige dynamische Lichtstreuung bestimmt wurde, hat einen Wert von 10.6 nm (Abb. 4.2.8).

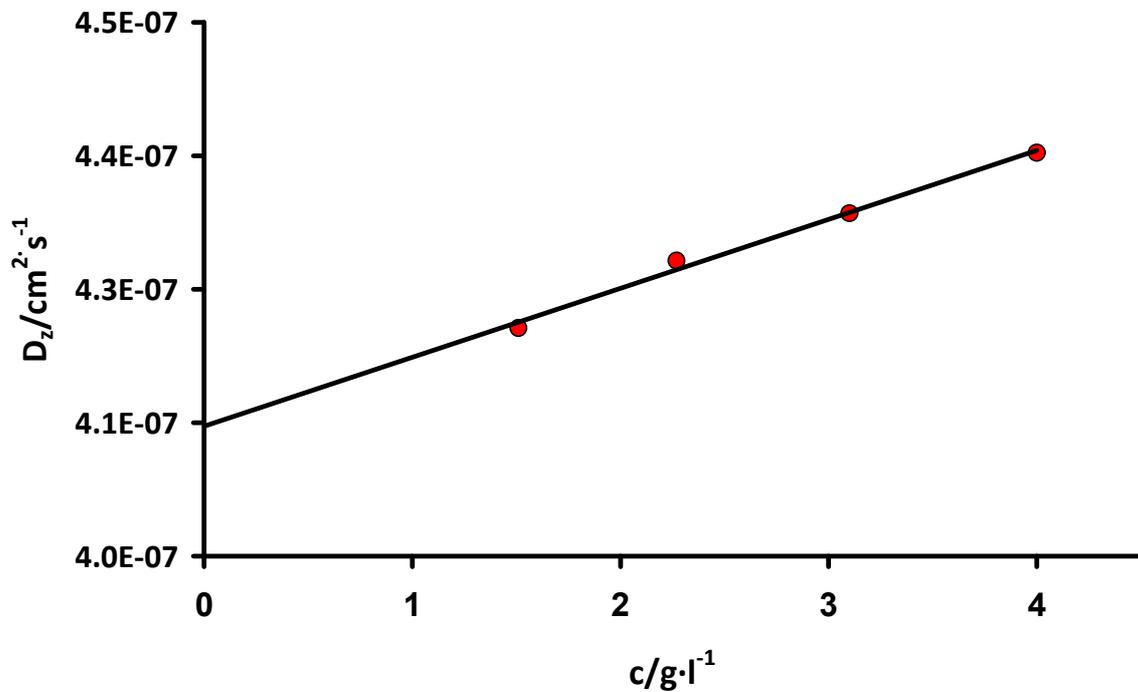


Abbildung 4.2.8: Konzentrationsabhängiger Plot der Diffusionskoeffizienten für $q^2=0$

$$c_1=4.00 \text{ g/l}; c_2=3.10 \text{ g/l}; c_3=2.27\text{E} \text{ g/l}; c_4=1.47\text{E}-02 \text{ g/l}; c_5=6.74\text{E}-01 \text{ g/l}$$

$$D_z=4.117\text{E}-08 \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}; \eta=0.486 \text{ cp}; R_H=10.6 \text{ nm}$$

Das ρ -Verhältnis des Polymers beträgt somit 1.48, was einen typischen Wert für ein ideal flexibles verteiltes Knäuel in einem guten Lösungsmittel widerspiegelt.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen (Abb. 4.2.9) erfolgte durch Zugabe von Trifluoressigsäure zur Precursorlösung in Dichlormethan nach einer Vorschrift von R.A. Houghten et. al. [4].

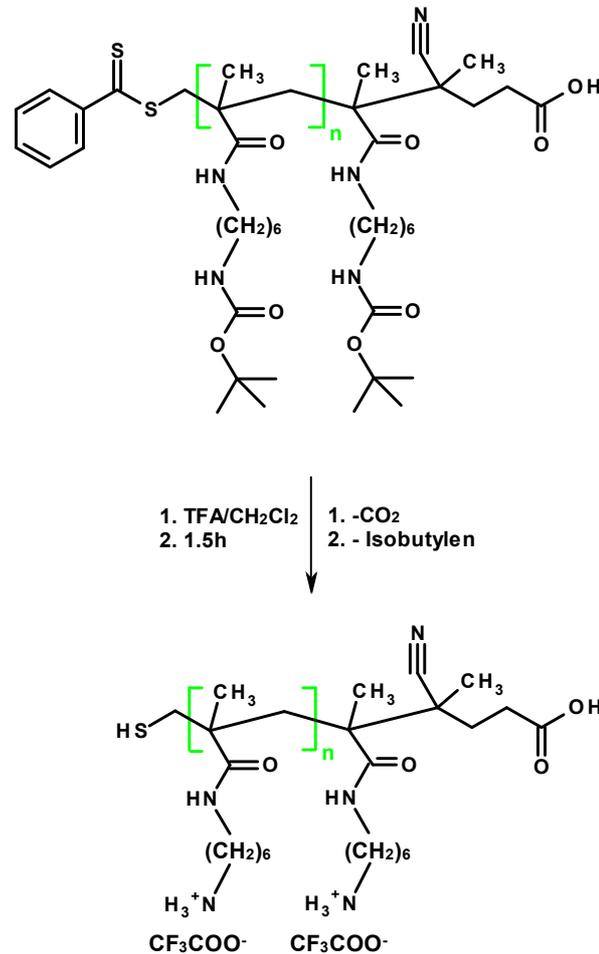


Abbildung 4.2.9: Reaktionsschema zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppen am Makroinitiatorprecursor

Der Nachweis, dass die Boc-Schutzgruppen abgespalten wurden, wurde durch Aufnahme von ¹H-NMR-Spektren des Precursors und des Makroinitiators erbracht. Abbildung 4.2.10 zeigt eindeutig den Peak der Boc-Schutzgruppe im Spektrum des Makroinitiatorprecursors bei einer chemischen Verschiebung von 0.7 ppm. Im Spektrum des Makroinitiators ist dieser Peak nicht mehr vorhanden.

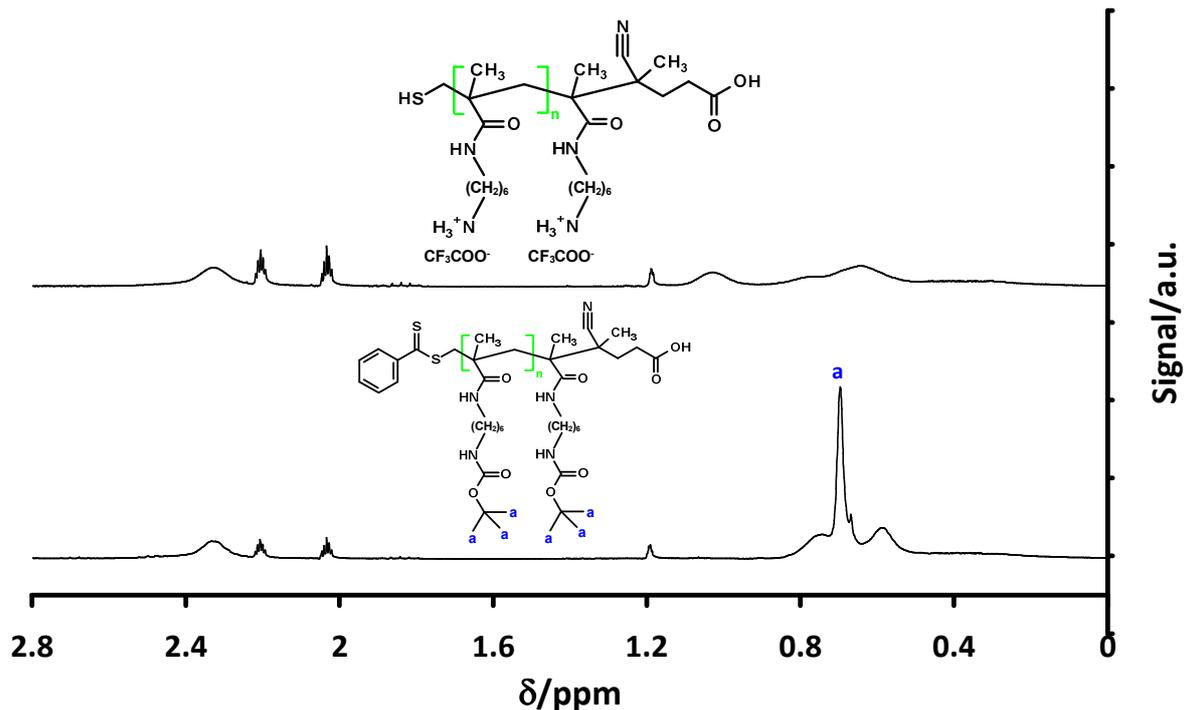


Abbildung 4.2.10: Unten: $^1\text{H-NMR}$ des Makroinitiatorprecursors (LM: CDCl_3 , $T=293\text{ K}$, $c=40\text{ g/l}$)
 Oben: $^1\text{H-NMR}$ des Makroinitiators (LM: D_2O , $T=293\text{ K}$, $c=40\text{ g/l}$)

4.3 Synthese und Charakterisierung von Leuchs'schen Anhydriden

Die Monomere welche zur ringöffnenden Polymerisation der geschützten Polypeptidseitenketten verwendet wurden, bezeichnet man als Leuchs'sche Anhydride. Benannt wurden sie nach ihrem Entdecker Herrmann Leuchs, der diese Verbindungsklasse erstmals 1906 synthetisierte ^[5].

Ein Ziel dieser Doktorarbeit ist es, Polymerbürsten herzustellen, die positive bzw. negative Ladungen tragen. Aus diesem Grund wurden Leuchs'sche Anhydride verwendet, deren Ringstruktur mit einer geschützten Carbonsäurefunktionalität bzw. einem geschützten Amin verknüpft ist, um die Ladungen nach der Polymerisation durch Abspaltung der Schutzgruppen zu entwickeln. Möchte man Leuchs'sche Anhydride von Aminosäuren synthetisieren, die neben der α -ständigen Carbonsäure bzw. Aminogruppe weitere funktionelle Gruppen besitzen, müssen diese mit Schutzgruppen versehen werden, um zu verhindern, dass eine Reaktion zwischen diesen Funktionalitäten und der Ringstruktur eintritt. Aus diesem Grund wurden als Edukte für die Herstellung der benötigten Leuchs'schen Anhydride geschützte Aminosäurederivate des L-lysins, L-ornithins, der L-glutaminsäure bzw. L-asparaginsäure verwendet (Abb. 4.3.1).

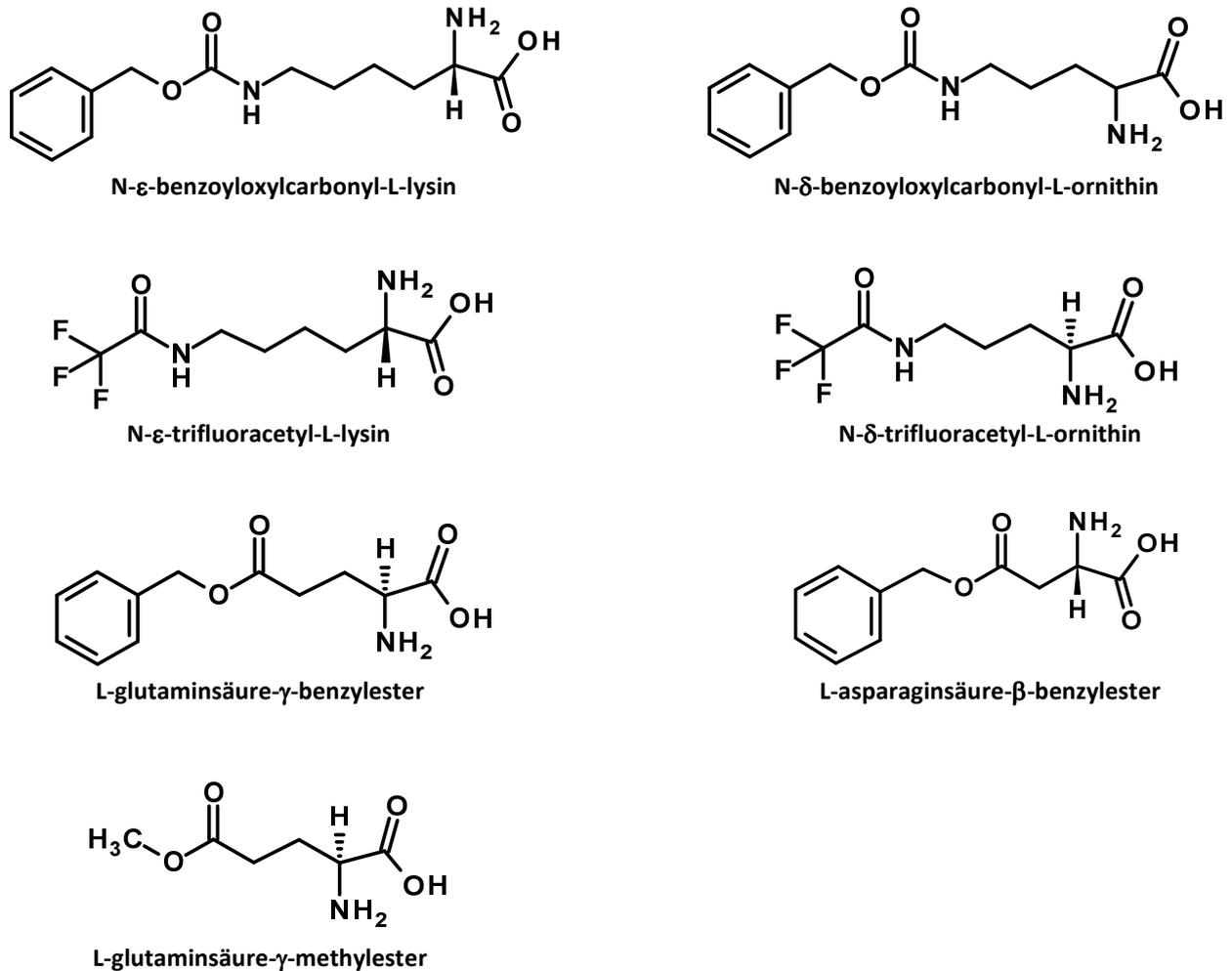


Abbildung 4.3.1: *Verwendete Aminosäurederivate zur Herstellung von Leuchs'schen Anhydriden*

Alle in Abbildung 4.3.1 gezeigten Aminosäurederivate sind kommerziell erhältlich bis auf N-ε-trifluoroacetyl-L-lysine und N-δ-trifluoroacetyl-L-ornithin. Diese Verbindungen wurden aus den entsprechenden freien Aminosäuren nach einer Vorschrift von M.S. Cherevin et. al. hergestellt (Abb. 4.3.2) [6].

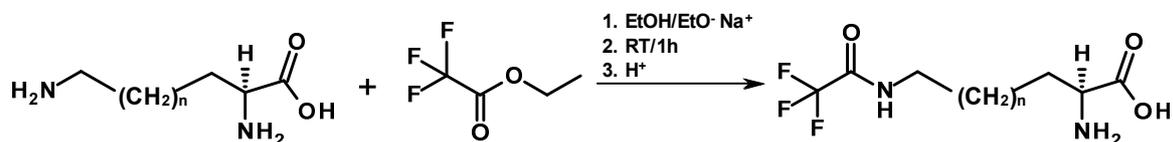


Abbildung 4.3.2: *Reaktionsschema zur Herstellung von N-δ-trifluoroacetyl-L-ornithin (n=1) bzw. N-ε-trifluoroacetyl-L-lysine (n=2)*

Die Aufreinigung der TFA-geschützten Aminosäurederivate erfolgte in beiden Fällen durch Umkristallisation aus einer Wasser-Ethanol-Mischung [7]. Die erfolgreiche Umsetzung wurde durch Aufnahme von ¹³C-NMR-Spektren bestätigt (Abb. 4.3.3).

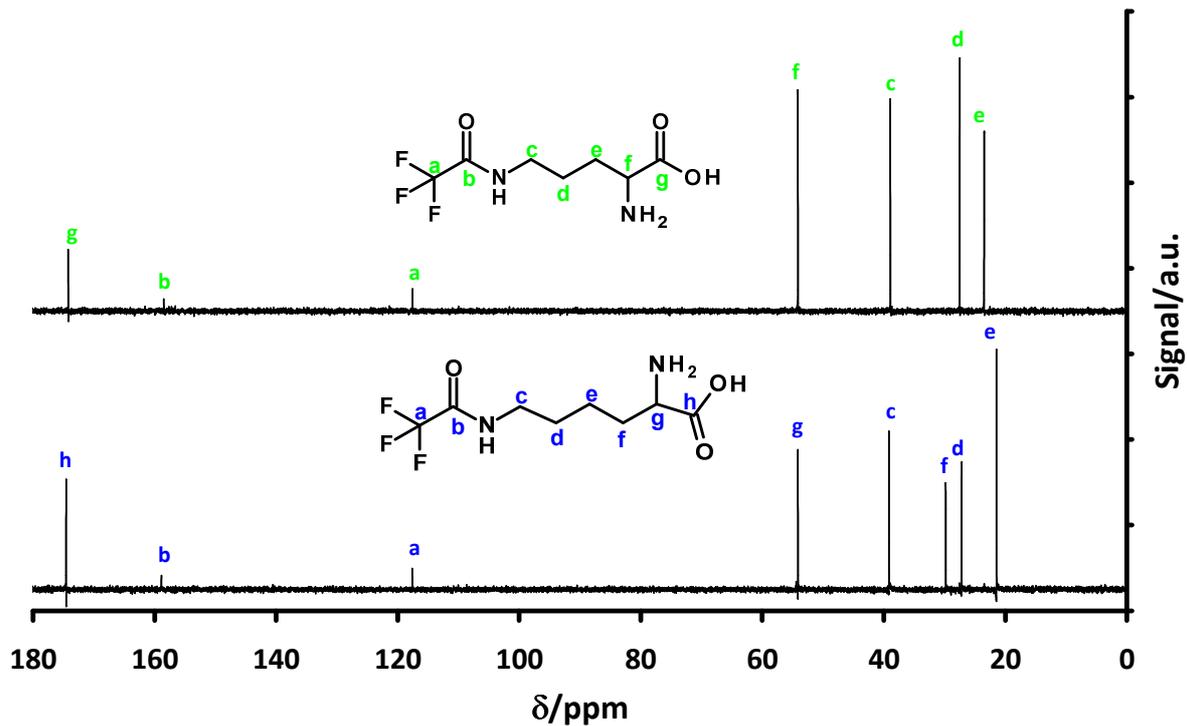


Abbildung 4.3.3: Unten: ^{13}C -NMR des N - ϵ -trifluoroacetyl-L-lysins (LM: D_2O , $T=293\text{ K}$, $c=20\text{ g/l}$)

Oben: ^{13}C -NMR des N - δ -trifluoroacetyl-L-ornithins (LM: D_2O , $T=293\text{ K}$, $c=20\text{ g/l}$)

Im nächsten Schritt wurden die Leuchs'schen Anhydride durch Phosgenierung der geschützten Aminosäurederivate synthetisiert. Für die Reaktion wurde kein Phosgengas, sondern das leichter handhabbare Triphosgen verwendet (Abb. 4.3.4).

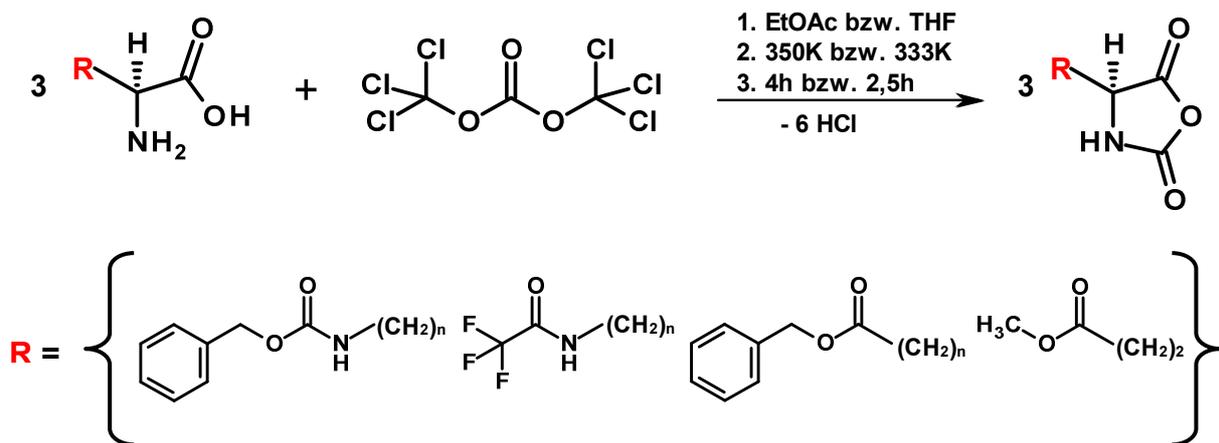


Abbildung 4.3.4: Reaktionsschema zur Herstellung von Leuchs'schen Anhydriden ($n=1$ bzw. 2)

Die Aufreinigung erfolgte entweder direkt durch mehrfache Umkristallisation aus Ethylacetat und n -Hexan nach einer Vorschrift von W.H. Daly et. al. bzw. durch Waschen der organischen Phase mit Wasser bei 275 K und anschließender Umkristallisation aus Ethylacetat / n -Hexan ^[8-9]. Genauere Details können im Experimentellen Teil nachgelesen werden.

Aufgrund der Empfindlichkeit der Leuchs'schen Anhydride gegenüber Zersetzungen, ist es unmöglich, chromatographische Methoden zu verwenden, um ihre Reinheit zu überprüfen. Ihre Reinheit wurde aus diesem Grund mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermittelt. In Abbildung 4.3.5 ist das Protonenspektrum von N - ϵ -trifluoracetyl-L-lysin und dem korrespondierenden Leuchs'schen Anhydrid zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Proton am asymmetrischen C-Atom durch die Formierung des Rings zu höheren chemischen Verschiebungen verschoben wurde. Der Grund für diese Verschiebung ist die zusätzliche Carbonylfunktion in der Ringstruktur des Leuchs'schen Anhydrids, was die Elektronendichte in Nachbarschaft zum Fünfring weiter absenkt. Der Shift dieses Signals zu chemischen Verschiebungen in den Bereich von 4.2 bis 4.6 ppm, kann allgemein als Beweis für den Erfolg der Phosgenierung verschiedenster Aminosäurederivate verwendet werden. Die Protonenspektren der anderen Leuchs'schen Anhydride sind im Anhang ersichtlich.

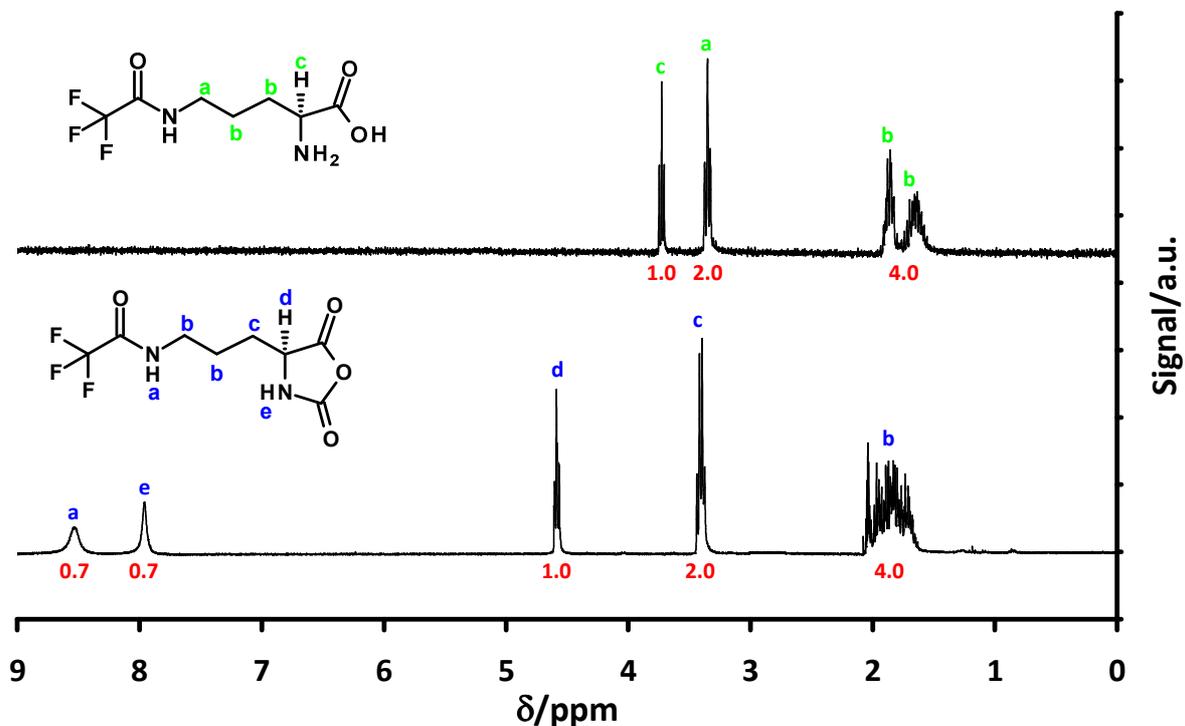


Abbildung 4.3.5: Unten: $^1\text{H-NMR}$ des Leuchs'schen Anhydrids von N - ϵ -trifluoracetyl-L-ornithin (LM: Aceton d_6 ; 250 Scans, 300 MHz, $T=293$ K); Oben: $^1\text{H-NMR}$ von N - δ -trifluoracetyl-L-ornithin (LM: D_2O ; 250 Scans, 300 MHz, $T=293$ K)

4.4. Synthese und Charakterisierung von geschützten Peptidbürsten

Die ringöffnende Polymerisation der Leuchs'schen Anhydride wurde durch den in Kapitel 4.3 beschriebenen Makroinitiator initiiert. Es wurde bewusst das Ammoniumsalz des Makroinitiators gewählt und nicht seine neutrale Form, um den aktivierten Monomermechanismus zu unterdrücken, welcher die Entstehung von linearem Polymer als Nebenprodukt hervorruft^[10] (siehe auch Kapitel 2: Theoretische Grundlagen). Die in dieser Arbeit vorgestellten geschützten Bürstenstrukturen wurden immer bei einer Temperatur von 333 K, für 3 Tage in einer Argonatmosphäre polymerisiert (Abb. 4.4.1).

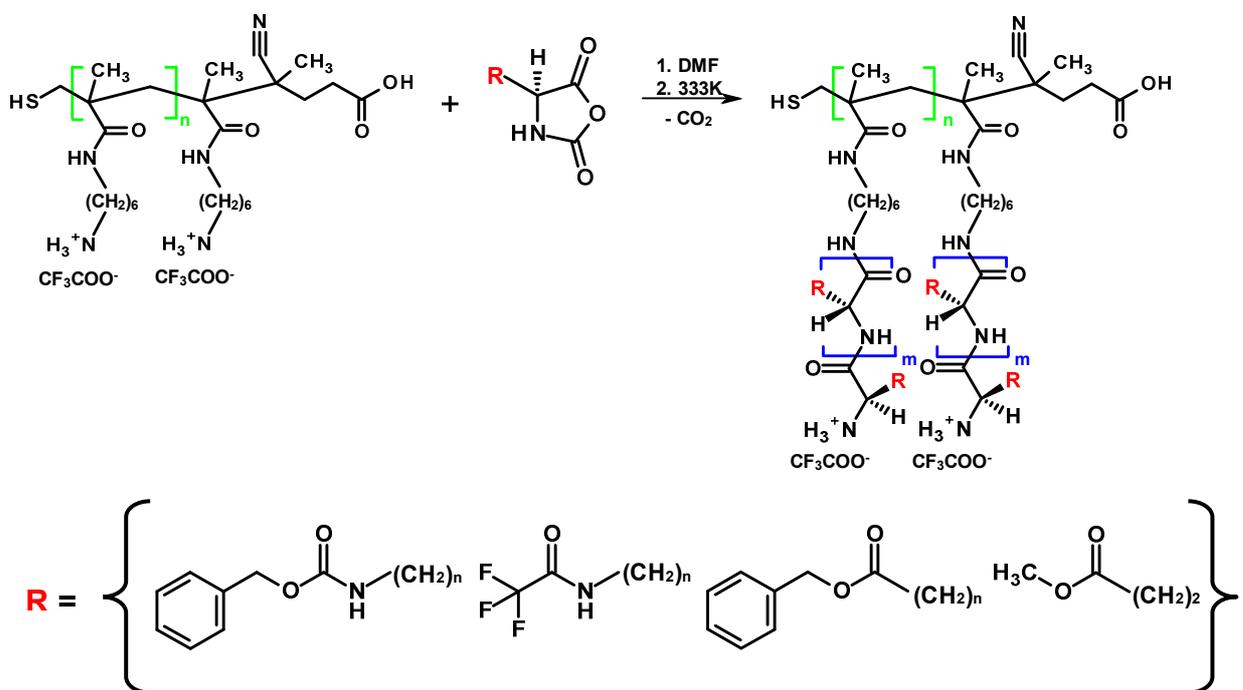


Abbildung 4.4.1: Reaktionsschema zur Synthese der geschützten Polypeptidbürsten ($n=1$ bzw. 2)

Als Lösungsmittel für die Polymerisation diente DMF, welches durch 24-stündiges Rühren über Bariumoxid aufgereinigt wurde^[11]. Die Aufreinigung des DMF's ist für die ringöffnende Polymerisation der Bürsten von entscheidender Bedeutung, weil Verunreinigungen wie z.B. Diethylamin ebenfalls die Polymerisation initiieren können. Reinigt man das DMF nicht auf, würden auf jeden Fall lineare Ketten am Ende der Polymerisation als Nebenprodukt vorliegen.

Unabhängig von den sieben unterschiedlichen Monomeren konnte in jedem Fall, aufgrund der Entstehung von Kohlendioxid bzw. dem starken Anstieg der Viskosität, eine Polymerisation beobachtet werden. Die Isolation der Polymere erfolgte durch Fällern in Diethylether.

In Tabelle 4.4.1 sind Lösungseigenschaften der Bürsten nach der Fällung zusammengefasst.

Die Löslichkeit der erhaltenen Polymere beschränkt sich auf HFIP bzw. DMF. HFIP wird als Lösungsmittel für geschützte Peptidstrukturen in vielen Fällen eingesetzt und ist in der Lage alle Bürsten bis auf zwei Derivate wieder in Lösung zu bringen. DMF hingegen kann nur in einzelnen Fällen als Lösungsmittel eingesetzt werden.

Tabelle 4.4.1: Löslichkeiten der geschützten Polypeptidbürsten

Bezeichnung	M/I	Aminosäure	Schutzgruppe	Lösungsmittel
Z-Lys 55-3	55	Lysin	Z	HFIP bzw. DMF
Z-Lys 25-1	25	Lysin	Z	HFIP
TFA-Lys 20-1	20	Lysin	Trifluoracetat	HFIP bzw. DMF
Bn-Glu 55-1	55	Glutaminsäure	Benzylester	HFIP bzw. DMF
Me-Glu 55-1	55	Glutaminsäure	Methylester	HFIP
Bn-Asp 55-1	55	Asparaginsäure	Benzylester	HFIP
Z-Orn 55-1	55	Ornithin	Z	-
TFA-Orn 55-1	55	Ornithin	Trifluoracetat	-

M/I: Verhältnis von Monomer zu Initiator, welches für die Polymerisation angesetzt wurde

Neben diesen beiden Lösungsmitteln kann auch Trifluoressigsäure verwendet werden, um die Polymere in Lösung zu bringen. Allerdings ist der Einsatz dieser aggressiven Säure gleichzeitig mit dem partiellen Abbau der verwendeten Schutzgruppen verbunden, weshalb diese Chemikalie nicht als Lösungsmittel für diese Strukturen angesehen werden kann. Im Fall der geschützten L-ornithinderivate konnten keine Lösungsmittel gefunden werden, die die Bürsten nach der Isolierung wieder in Lösung brachten. Weitere Charakterisierungen durch dynamische bzw. statische Lichtstreuung oder GPC waren deswegen nicht möglich. Alle Bürsten die auch nach ihrer Fällung in DMF löslich waren, wurden mit Gelpermeationschromatographie untersucht. Abbildung 4.4.2 zeigt exemplarisch das Chromatogramm von Z-Lys 55-3. Es ist nur der Peak der Bürstenstruktur zu erkennen und keine weiteren Signale, die auf lineare Verunreinigungen hinweisen. Ein eindeutiger Hinweis, dass mit der Polymerisationsmethode nach Schlaad der aktivierte Monomermechanismus erfolgreich unterdrückt werden kann.

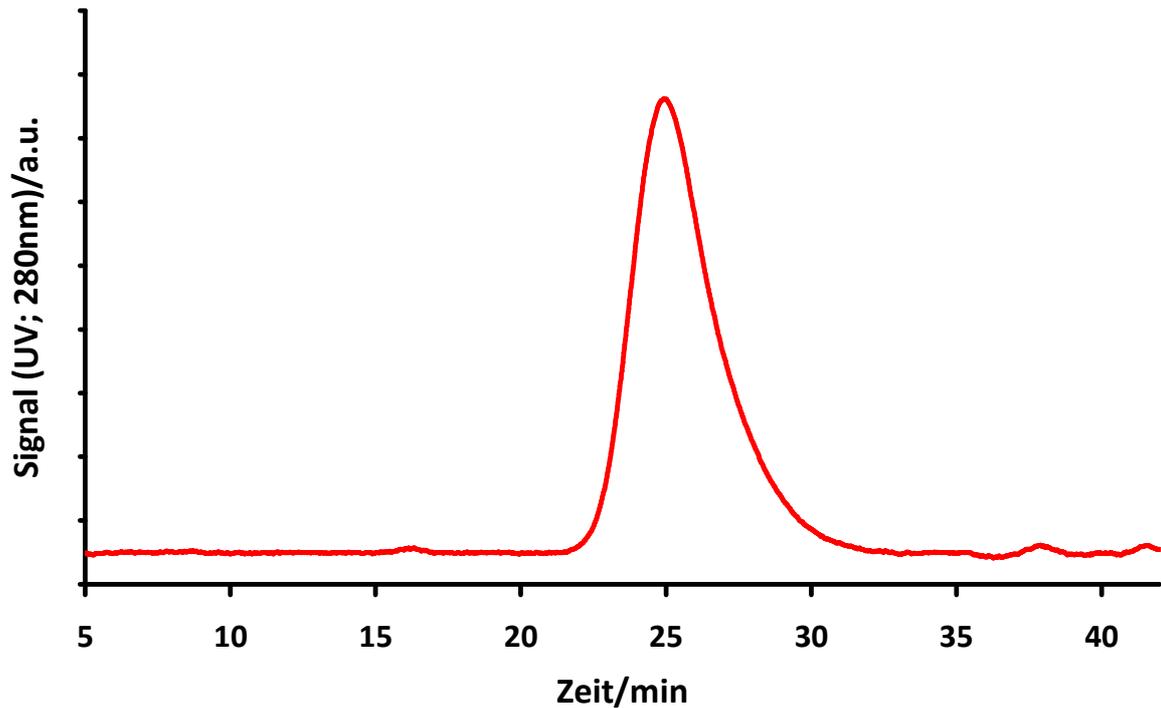


Abbildung 4.4.2: Gelpermeationschromatogramm von Z-Lys 55-3 in DMF (LiBr 1g/l, T=333 K)

Des Weiteren wurden fast alle Bürsten, die in HFIP löslich waren, mit dynamischer und statischer Lichtstreuung untersucht. Exemplarisch sind in diesem Kapitel der Zimplot und das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuung von Z-Lys 25-1 gezeigt (Abb. 4.4.3 und Abb. 4.4.4).

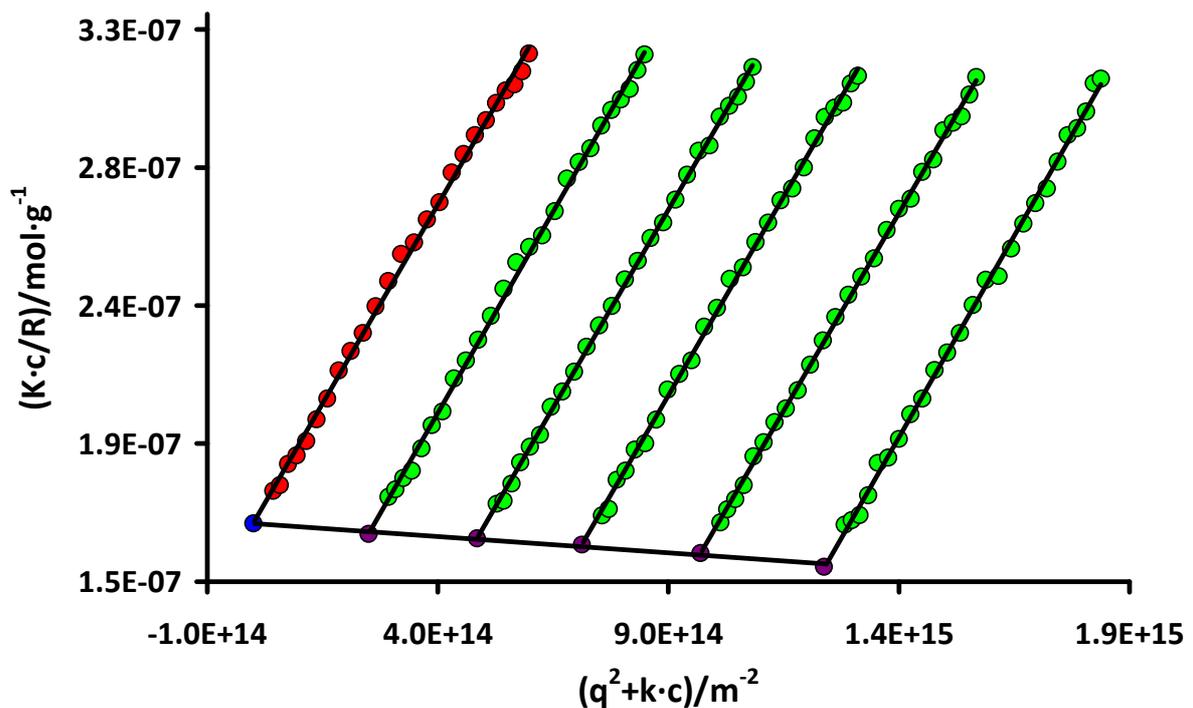


Abbildung 4.4.3: Zimplot von Z-Lys 25-1 in HFIP bei T=293K zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=4.95E-02$ g/l; $c_2=3.38E-02$ g/l; $c_3=2.85E-02$ g/l; $c_4=1.94E-02$ g/l; $c_5=1.00E-02$ g/l
 $M_w=6.06E06$ g/mol; $R_g=68.9$ nm; $A_2=-1.34E-07$ mol·dm³·g⁻²; $dn/dc=0.228$ cm³/g
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5E-03$ mol/l)

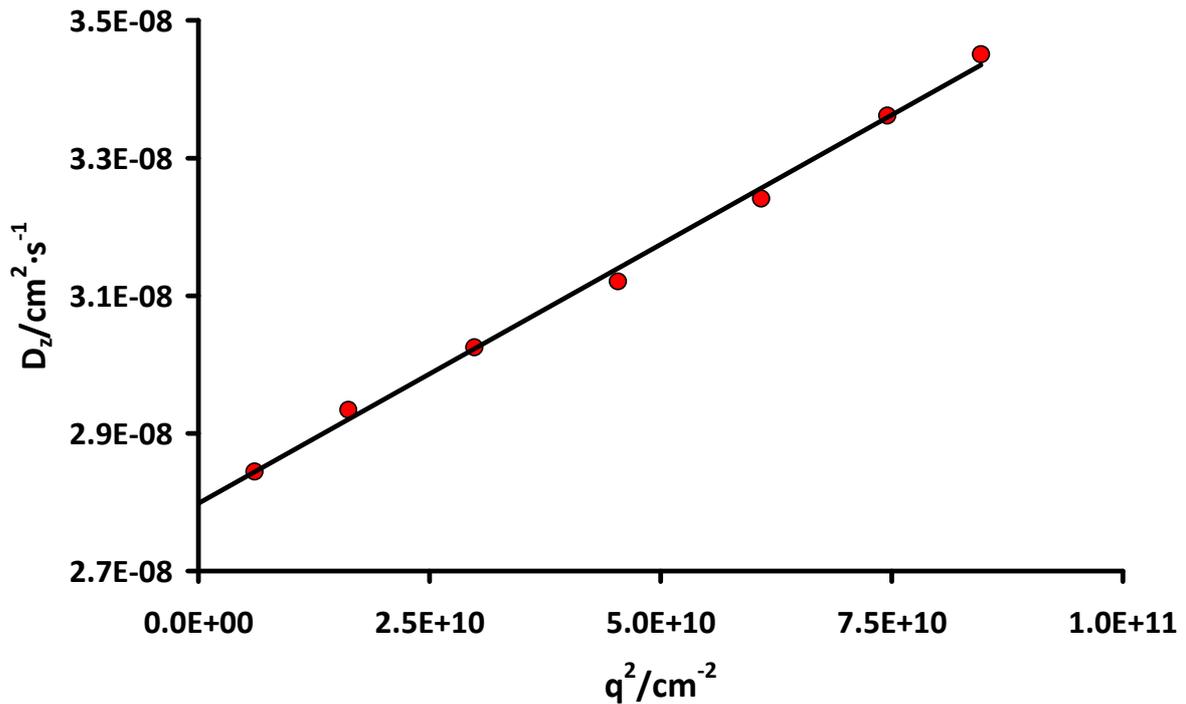


Abbildung 4.4.4: DLS von Z-Lys 25-1 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad (24 Gradschritte)
 $c=4.95\text{E-}02 \text{ g/l}$; $D_z=2.798\text{E-}08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1,962\text{cp}$; $R_H=39.1 \text{ nm}$
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03 \text{ mol/l}$)

Eine Übersicht über die statischen und dynamischen Lichtstremessungen der geschützten Polypeptidbürsten in HFIP ist in Tabelle 4.4.2 ersichtlich. Die Benzyl-geschützte Asparaginbürste (Bn-Asp 55-1) wurde nur mit dynamischer Lichtstreuung untersucht. Sie wurde gegen Ende dieser Dissertation synthetisiert und konnte aus Zeitgründen nicht mehr mittels statischer Lichtstreuung vermessen werden. Die zu den Werten in Tabelle 4.4.2 dazugehörigen Graphen, die nicht in diesem Kapitel gezeigt werden, sind im Anhang ersichtlich.

Tabelle 4.4.2: Ergebnisse der dynamischen und statischen Lichtstreuung für die HFIP-löslichen, geschützten, Polypeptidbürsten

Bezeichnung	R_g/nm	R_H/nm	ρ -Verhältnis	$M_w/\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	dn/dc
Z-Lys 55-3	79.7	47.4	1.68	1.36E07	0.228
Z-Lys 25-1	68.9	39.1	1.76	6.06E06	0.228
TFA-Lys 25-1	74.1	45.6	1.63	5.67E06	0.167
Bn-Glu 55-1	67.9	44.8	1.51	1.05E07	0.222
Me-Glu 55-1	65.1	40.6	1.61	8.36E06	0.188
Bn-Asp 55-1	-	41.7	-	-	-

Die Trägheitsradien der geschützten Polypeptidbürsten liegen zwischen 65 und 80 nm, während die hydrodynamischen Radien zwischen 40 und 50 nm schwanken. Die ρ -Verhältnisse der Proben liegen zwischen 1.5 und 1.8.

Der starke Anstieg des R_g beweist, dass sich die Topologie der Polymerstrukturen verändert haben muss, was darauf hinweist, dass Polymerbürsten erfolgreich hergestellt worden sind. Besonders interessant sind die ermittelten Molekulargewichte der Bürsten. Aus diesen Ergebnissen kann man Rückschlüsse auf den Umsatz und den Anteil an linearem Nebenprodukt ziehen. Geht man davon aus, dass die Leuchs'schen Anhydride bei der Polymerisation der Seitenketten zu 100% umgesetzt worden sind, ist es möglich, das theoretische Molekulargewicht der Bürste zu berechnen. Für die grafting-from-Methode können diese mit Hilfe von Formel 4.4.1 berechnet werden. In Tabelle 4.4.3 sind experimentell bestimmten Werte und die theoretischen Werte (berechnet nach Formel 4.4.1) aufgelistet.

$$M_{w,theo} = \frac{M}{I} \cdot P_w^{Makroini.} \cdot M^{Mono} \cdot M_w^{Makroini.} \quad (4.4.1)$$

$M_{w,theo}$: theoretisches Gewichtsmassenmittel der geschützten Polypeptidbürste

M/I : Monomer/Initiator Verhältnis

$P_w^{Makroini.}$: Gewichtsmittel des Polymerisationsgrad des Makroinitiators

M^{Mono} : Molekulargewicht des Monomers

$M_w^{Makroini.}$: Gewichtsmassenmittel des Makroinitiators

Tabelle 4.4.3: Auflistung von experimentell bestimmten und theoretisch berechneten Molekulargewichten verschiedener geschützter Polypeptidbürsten

Bezeichnung	M/I	$M^{Mono}/g \cdot mol^{-1}$	$P_w^{Makroini.}$	$M_w^{Makroini.}/g \cdot mol^{-1}$	$M_w/g \cdot mol^{-1}$	$M_{w,theo}/g \cdot mol^{-1}$
Z-Lys 55-3	55	262	900	2.6E05	1.36E07	1.32E07
Z-Lys 25-1	25	262	900	2.6E05	6.06E06	6.01E06
TFA-Lys 25-1	20	236	900	2.6E05	5.67E06	5.42E06
Bn-Glu 55-1	55	219	900	2.6E05	1.03E07	1.11E07
Me-Glu 55-1	55	143	900	2.6E05	8.36E06	7.35E06

Man erkennt direkt, dass die experimentellen und theoretischen Werte nur sehr gering voneinander abweichen. Daraus lässt sich schließen, dass es nicht zur Entstehung von linearen Nebenprodukten während der Polymerisation der Seitenketten kommt.

Als abbildende Methode wurde die Rasterkraftmikroskopie (AFM) gewählt. Abbildung 4.4.5 zeigt beispielhaft die Probe Z-Lys 55-1, welche durch spin coaten auf eine Graphitoberfläche aufgebracht wurde. Die Aufnahme bestätigt eindeutig die stäbchenförmige Topologie der Bürsten, welche schon durch statische und dynamische Lichtstreuung vorausgesagt wurde. Die Bürsten haben eine mittlere Konturlänge von etwa 160 nm, was der Konturlänge des Makroinitiators entspricht. Allerdings sind auch kleinere Strukturen auf dem Bild zu erkennen.

Dies kann zum einen durch die Polydispersität des Makroinitiators begründet werden und durch die Tatsache, dass Polymerbürsten durch spin coating aufgrund der starken Scherkräfte zur Fragmentierung neigen.

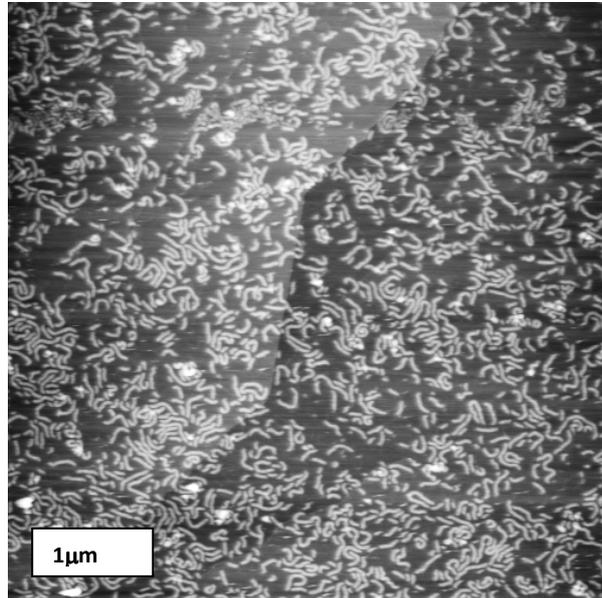


Abbildung 4.4.5: trockene AFM-Aufnahme von Z-Lys 55-3 durch spin coating (3000 U/min; 5 s) auf Graphit
 $C_{Probe}=0.01$ g/l; LM: DMF

4.5. Synthese von kationisch geladenen Polypeptidbürsten

Um aus den geschützten L-lysin- bzw. L-ornithinbürsten positiv geladene Bürsten herzustellen, müssen die Schutzgruppen der Seitenketten entfernt werden. Die Z-Schutzgruppen (Abb. 4.5.1) wurden mit einer 35 %igen Wasserstoffbromidlösung in Eisessig nach einer Vorschrift von D. Ben-Ishai et. al. entfernt ^[12].

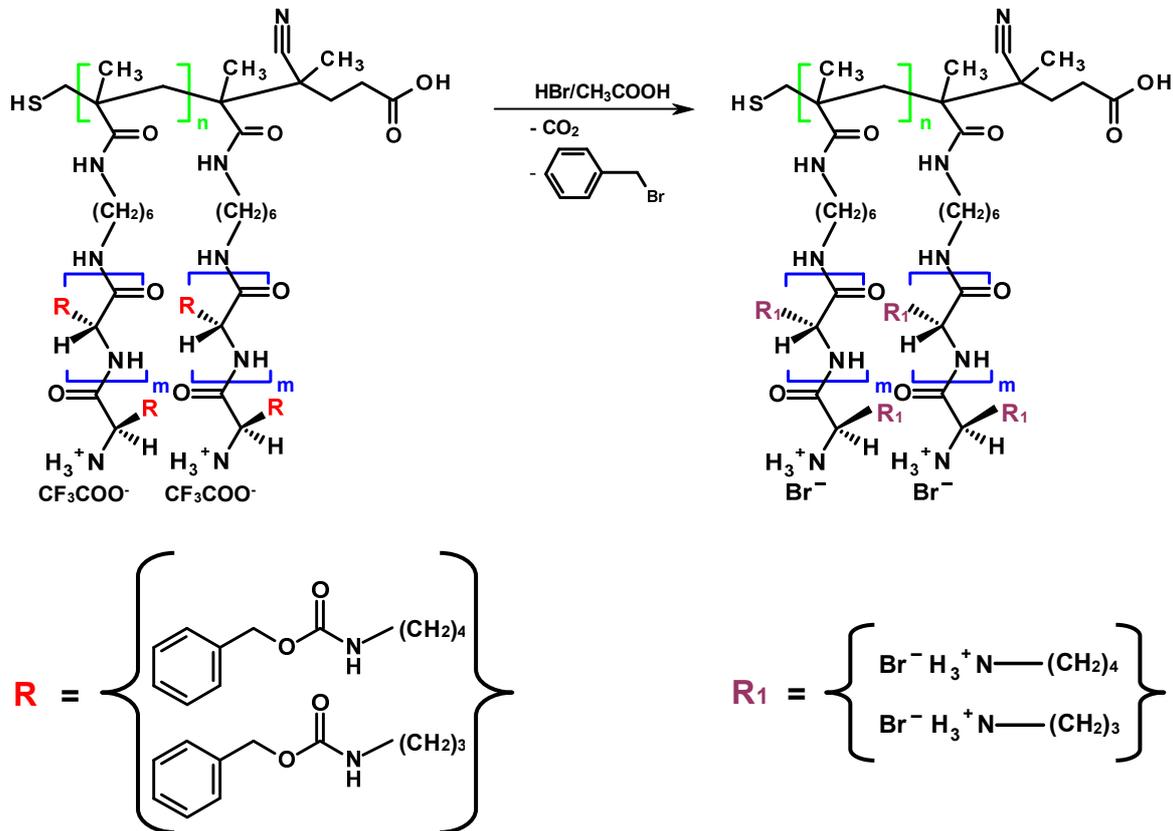


Abbildung 4.5.1: Reaktionsschema bezüglich der polymeranalogen Abspaltung der Z-Schutzgruppe

Im Fall des Z-geschützten Poly-L-ornithins wurde ein Feststoff erhalten, der wie das Edukt in keinem Lösungsmittel gelöst werden kann. Eine weiterführende Charakterisierung dieses Stoffes ist aus diesem Grund unmöglich.

Bezüglich der Z-geschützten Poly-L-lysinderivate wurden nach der Behandlung mit HBr/Eisessig in beiden Fällen weiße Feststoffe erhalten, die sich ausgezeichnet in Wasser lösen. Nach der Aufreinigung durch Dialyse und anschließender Gefriertrocknung wurden beide Bürsten mit statischer und dynamischer Lichtstreuung untersucht (Abb. 4.5.2 - 4.5.5).

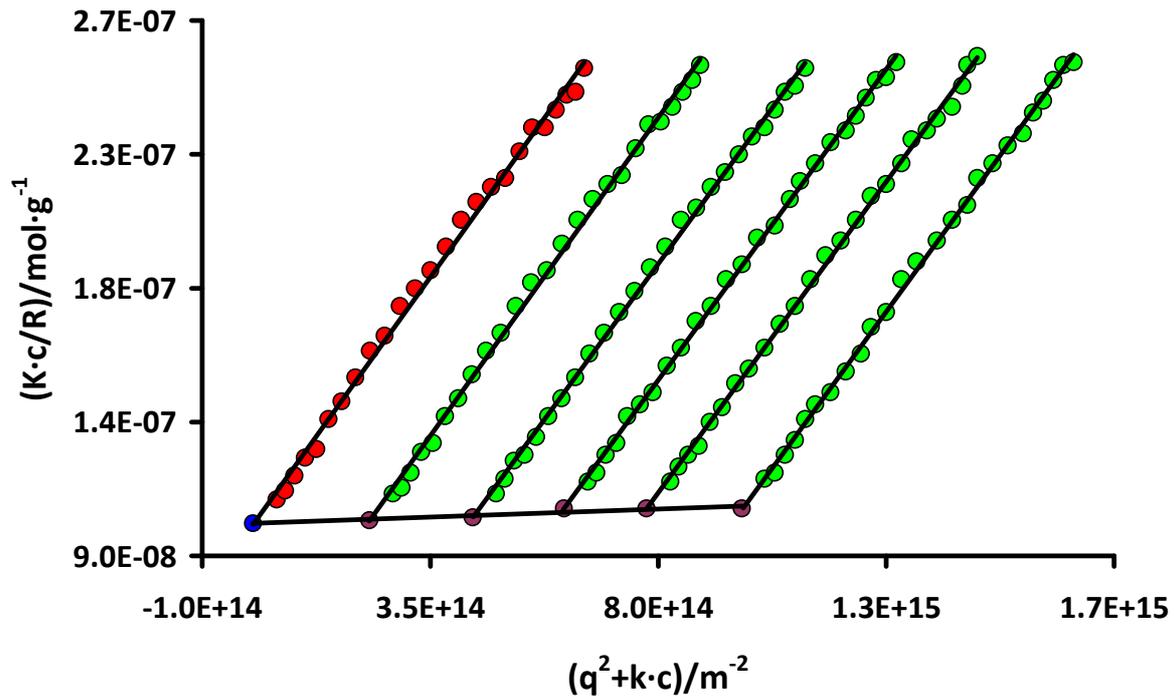


Abbildung 4.5.2: Zimmplot von Lys 55-3 in H_2O bei $T=293$ K zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=6.43E-02$ g/l; $c_2=5.18E-02$ g/l; $c_3=4.10E-02$ g/l; $c_4=2.89E-02$ g/l; $c_5=1.53E-02$ g/l
 $M_w=1.03E07$ g/mol; $R_g=84.1$ nm; $A_2=4.78E-08$ mol·dm³·g⁻²; $dn/dc=0.164$ cm³/g
 Salz: LiBr ($c=5E-03$ mol/l)

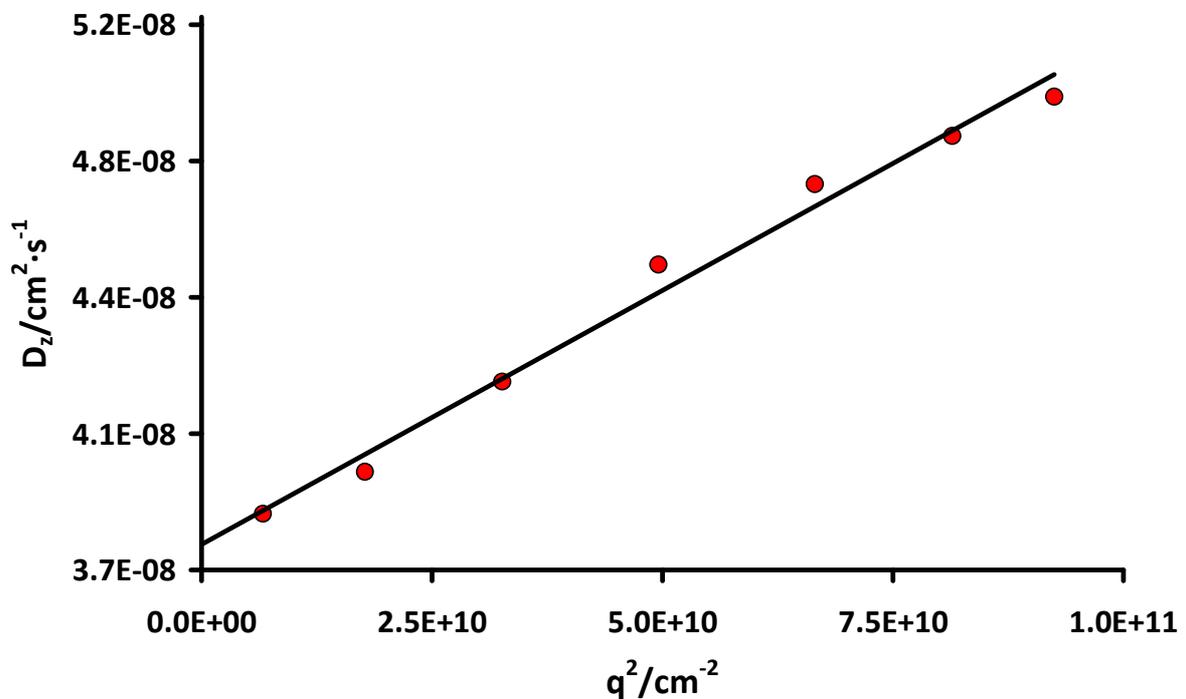


Abbildung 4.5.3: DLS von Lys 55-3 in H_2O bei $T=293$ K zwischen 30 und 150 Grad (24 Gradschritte)
 $c=5.18E-02$ g/l; $D_z=3.770E-08$ cm²·s⁻¹; $\eta=1.002$ cp; $R_H=56.7$ nm
 Salz: LiBr($c=5E-03$ mol/l)

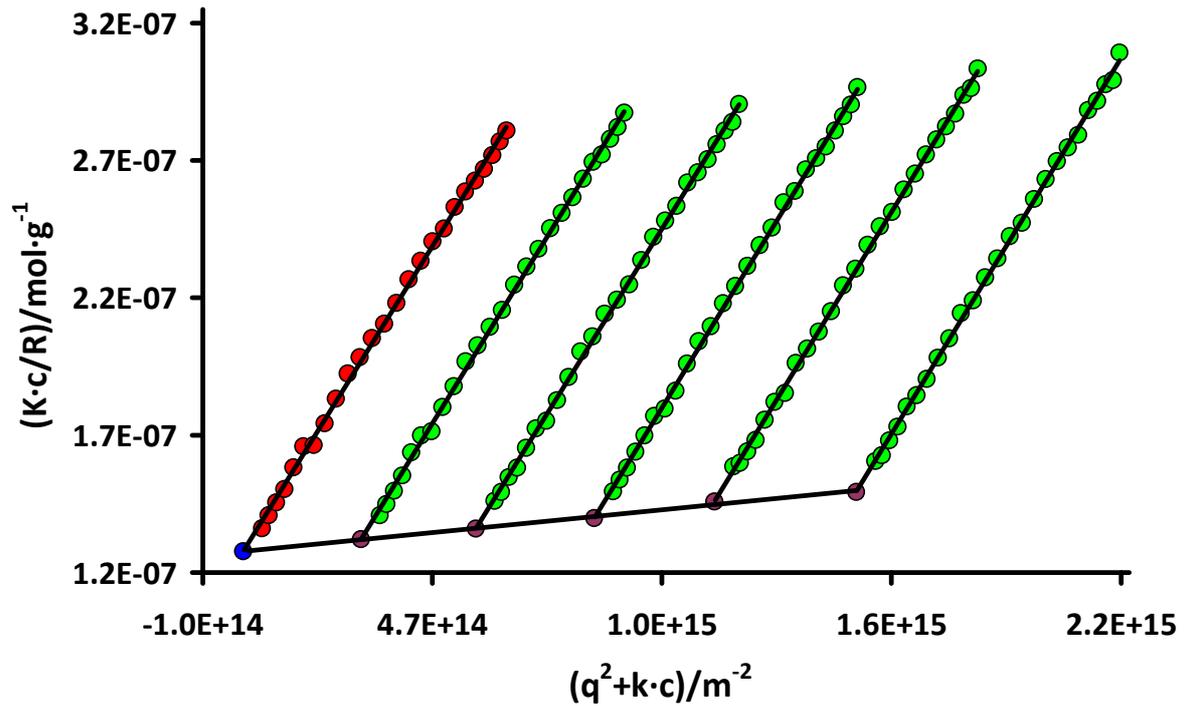


Abbildung 4.5.4: Zimmplot von Lys 25-1 in H_2O bei $T=293 \text{ K}$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=1.02\text{E-}01 \text{ g/l}$; $c_2=7.80\text{E-}02 \text{ g/l}$; $c_3=5.81\text{E-}02 \text{ g/l}$; $c_4=3.85\text{E-}02 \text{ g/l}$; $c_5=1.95\text{E-}02 \text{ g/l}$
 $M_w=8.14\text{E}06 \text{ g/mol}$; $R_g=75.9 \text{ nm}$; $A_2=1.089\text{E-}07 \text{ mol} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{g}^{-2}$; $dn/dc=0.164 \text{ cm}^3/\text{g}$
 Salz: LiBr ($c=5\text{E-}03 \text{ mol/l}$)

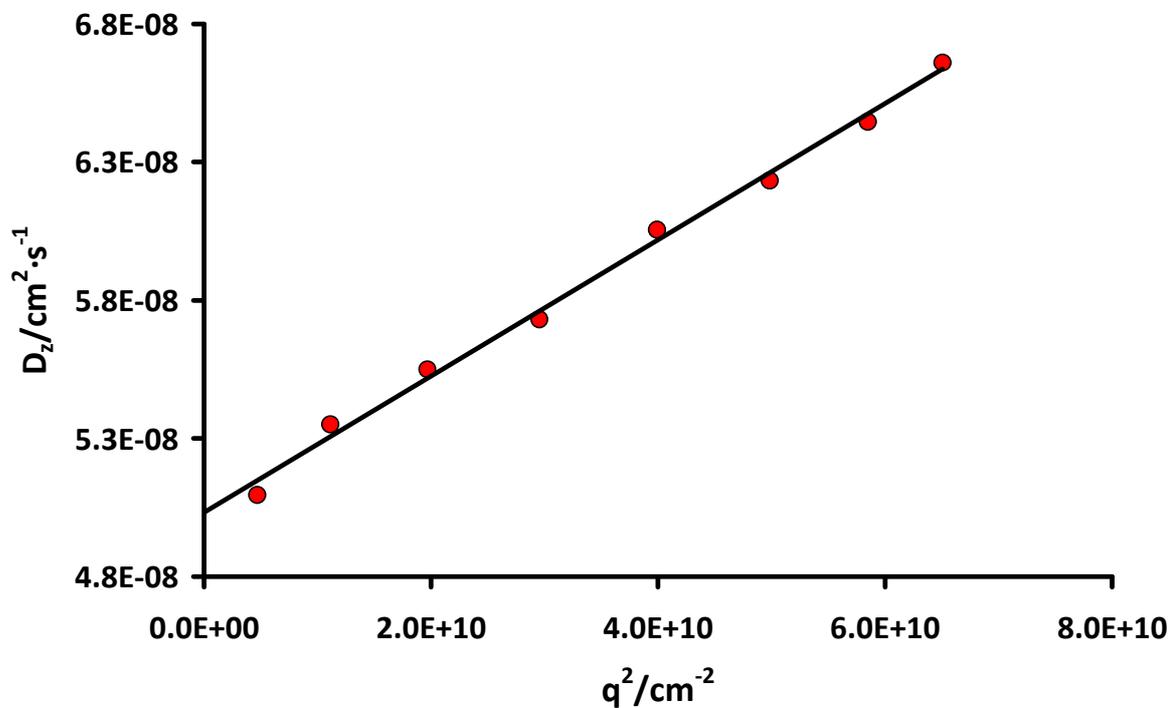


Abbildung 4.5.5: DLS von Lys 25-1 in H_2O bei $T=293 \text{ K}$ zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)
 $c=7.80\text{E-}02 \text{ g/l}$; $D_z=5.023\text{E-}08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1.002 \text{ cp}$; $R_H=42.0 \text{ nm}$
 Salz: LiBr ($c=5\text{E-}03 \text{ mol/l}$)

Das Molekulargewicht der großen Poly-L-lysinbürste (Lys 55-3) sollte um 10 % größer sein, wenn man das Molekulargewicht des geschützten Precursors in Betracht zieht. Berücksichtigt man allerdings, dass Poly-L-lysin ein sehr hygroskopisches Polymer ist, können durchaus Einwaagefehler im Bereich von 10 % in Erscheinung treten.

Diese Fehlerquelle erklärt jedoch nicht das Molekulargewicht, welches für die kleine Poly-L-lysinbürste (Lys 25-1) bestimmt worden ist. In diesem Fall ist das Molekulargewicht um mehr als 30 % größer, im Vergleich mit dem theoretischen Wert, den die Bürste nach der Abtrennung der Schutzgruppen haben sollte. Dieser Massenunterschied kann nur durch Fraktionierungseffekte erklärt werden, die während der Aufreinigung (Fällung, Dialyse) der Bürste auftreten können.

Die Molekulargewichte der Bürsten geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Poly-L-lysinseitenketten unter den erwähnten Abspaltbedingungen stabil blieben und keine Hydrolyse der Seitenketten eintritt. Einen eindeutigen Beweis liefert allerdings erst eine chromatographische Methode, mit der es möglich wäre, die Bürstenstrukturen und lineares Poly-L-lysin voneinander zu trennen. Es stellte sich jedoch sehr schnell heraus, dass dieser Nachweis mit Standardmethoden wie GPC und HPLC nicht erbracht werden kann. Lineares Poly-L-lysin kann zwar mit diesen Methoden untersucht werden, allerdings ist es bis jetzt nicht möglich die Bürstenstrukturen damit zu analysieren, da es am Säulematerial adsorbiert. Aus diesem Grund wurde die Kapillarelektrophorese als chromatographische Methode gewählt, um die Poly-L-lysinbürsten zu untersuchen. Abbildung 4.5.6 zeigt das Elektropherogramm von Lys 25-1 und einer Mischung aus Lys 25-1 und linearem Poly-L-lysin ($M_w=24000$ g/mol).

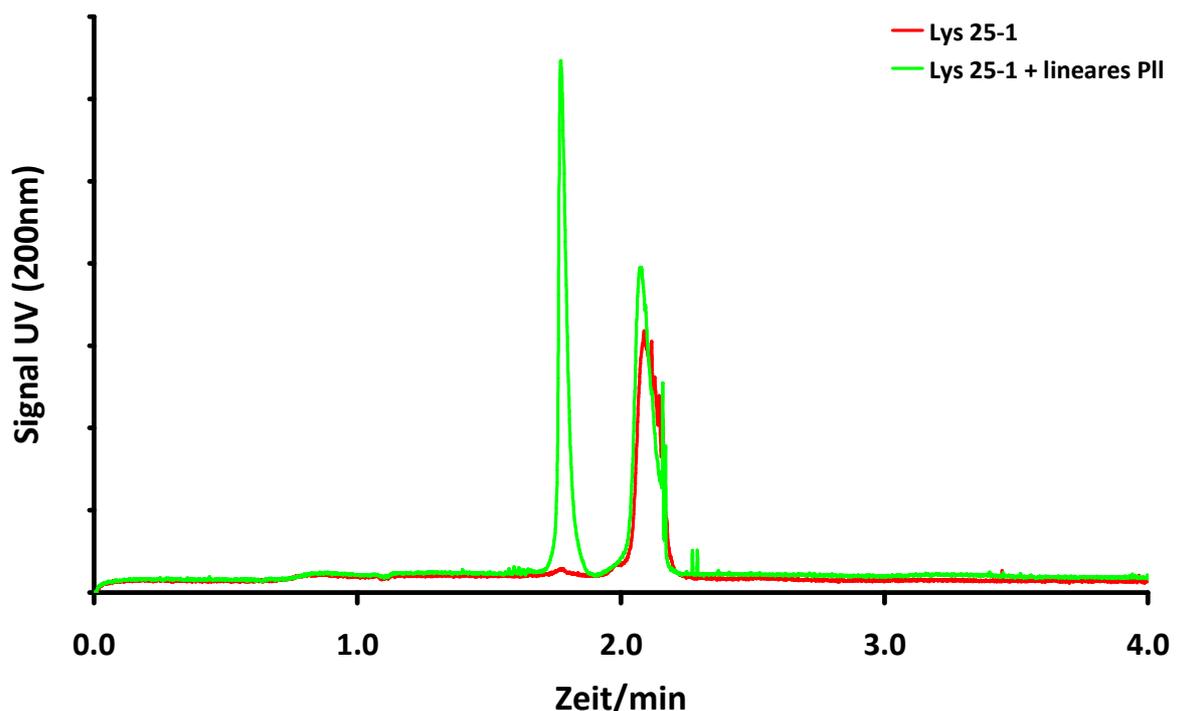


Abbildung 4.5.6: Elektropherogramm von Lys 25-1 ($c=0.5$ g/l) und Lys 25-1+ lin. PII ($c=0.5$ g/l)
Puffer: 100 mM Phosphat (pH=2.0); Spannung: 20 KV; Länge der Kapillare: 35 cm
Effektive Länge der Kapillare: 26.5 cm; Injektionszeit: 10 ms; Injektionsdruck: 30 mbar

Man erkennt eindeutig, dass es mit dieser Technik möglich ist, eine Trennung zwischen linearem Poly-L-lysin und den korrespondierenden Bürstenstrukturen zu erreichen (grüne Kurve). Die rote Kurve beweist zudem, dass die Bürste keine nennenswerten Anteile an linearen Verunreinigungen enthält. Die gleiche Schlussfolgerung kann man auch für Lys 55-3 ziehen (Abb. 4.5.7). Ein Anteil an linearem Polymer ist in diesem Fall zwar zu erkennen, jedoch ist diese Verunreinigung kleiner 3 %.

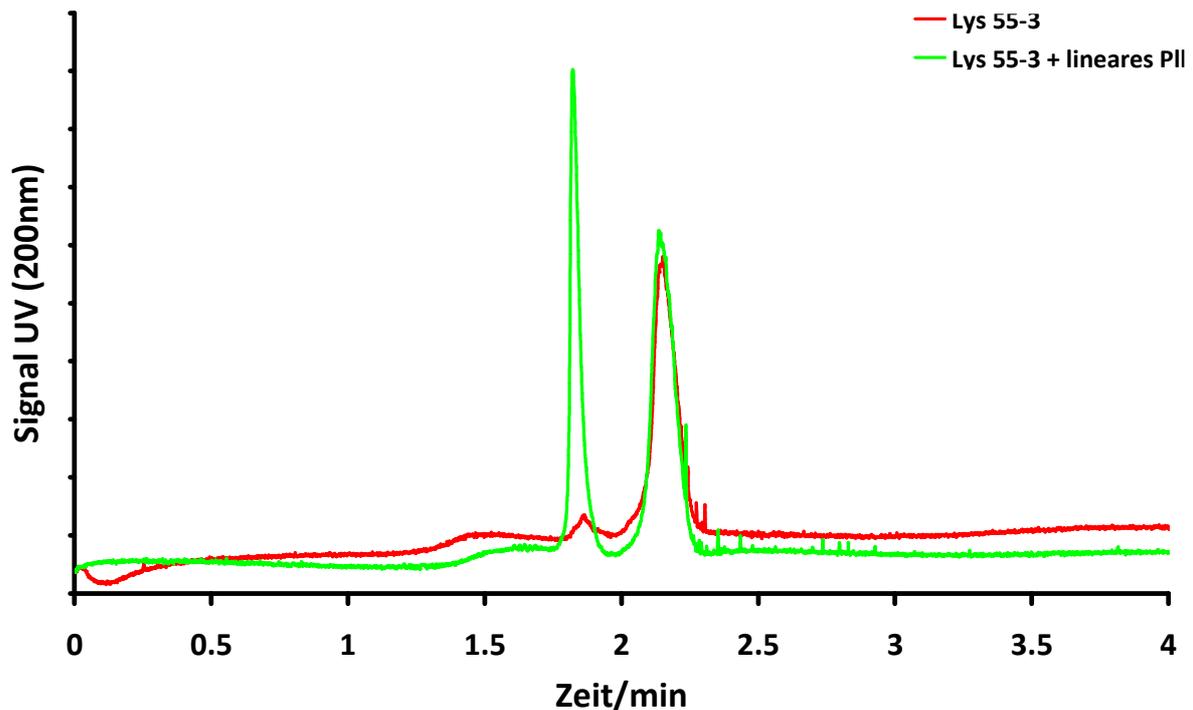


Abbildung 4.5.7: Elektropherogramm von Lys 55-3 ($c=0.5$ g/l) und Lys 55-3 + lin. PII ($c=0.5$ g/l)
Puffer: 100 mM Phosphat (pH=2.0); Spannung: 20 KV; Länge der Kapillare: 35 cm
Effektive Länge der Kapillare: 26.5 cm; Injektionszeit: 10 ms; Injektionsdruck: 30 mbar

Aufgrund der positiven zweiten Virialkoeffizienten die für die Poly-L-lysinbürsten in beiden Fällen vorliegen, kann man davon ausgehen, dass die meisten Schutzgruppen entfernt wurden. Allerdings ist es wichtig zu wissen, ob noch verbleibende Schutzgruppen an den Bürsten vorhanden sind. Für die Quantifizierung der Abspaltungseffizienz bezüglich der Z-Schutzgruppe wurden UV-Spektren der geschützten und der entschützten Bürsten aufgenommen (Abb. 4.5.8). Für die geschützten Derivate erkennt man sehr gut die Absorptionsbande des Benzolrings der Z-Schutzgruppe bei einem Maximum von 254 nm. Diese Bande ist in den Spektren der entschützten Derivate nicht mehr zu beobachten. Die Schutzgruppen wurden somit im Fall der Poly-L-lysinbürsten zu nahe 100 % abgebaut.

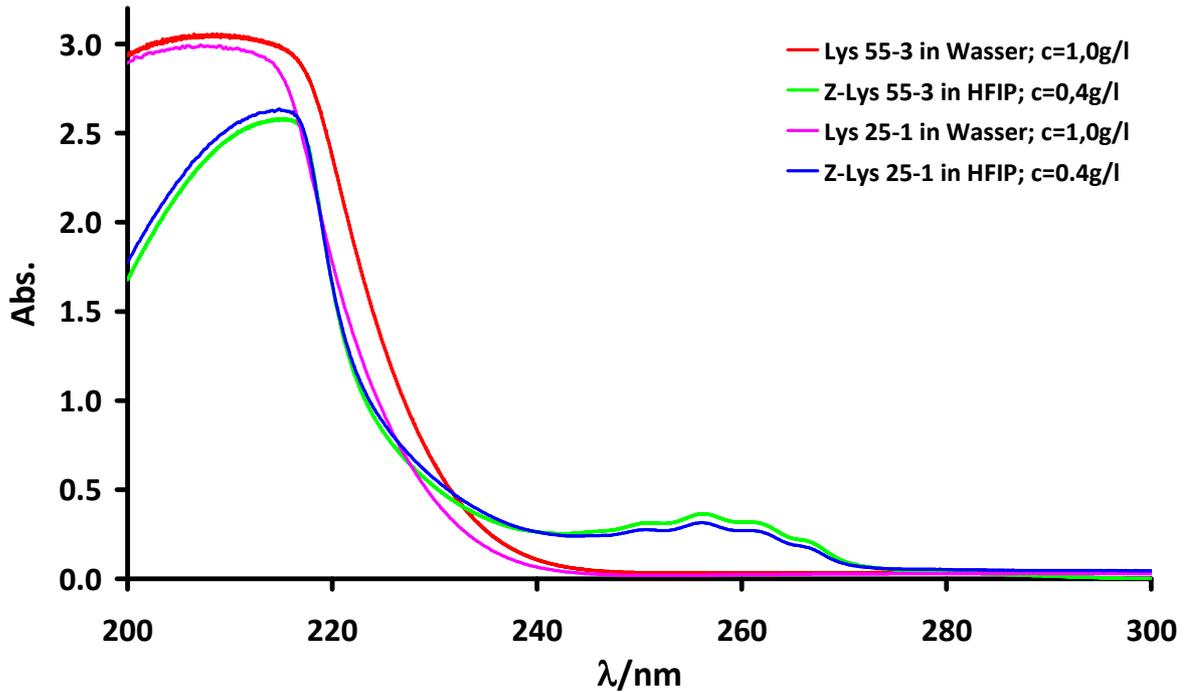


Abbildung 4.5.8: UV-Absorptionsspektrum von Z-Lys 55-3, Z-Lys 25-1, Lys 55-3 und Lys 25-1
 $T=293\text{ K}$; Scangeschwindigkeit.: 20 nm/min ; Küvettendurchmesser: 1 cm

Im Fall der TFA-geschützten Poly-L-ornithinbürste bzw. Poly-L-lysinbürste wurden alkalische Bedingungen gewählt, um die Schutzgruppe zu entfernen (Abb. 4.5.9). Als Base diente Piperidin, welches schon bei linearen TFA-geschützten Poly-L-lysin von M. Sela erfolgreich zur Abspaltung der Schutzgruppen eingesetzt wurde ^[13].

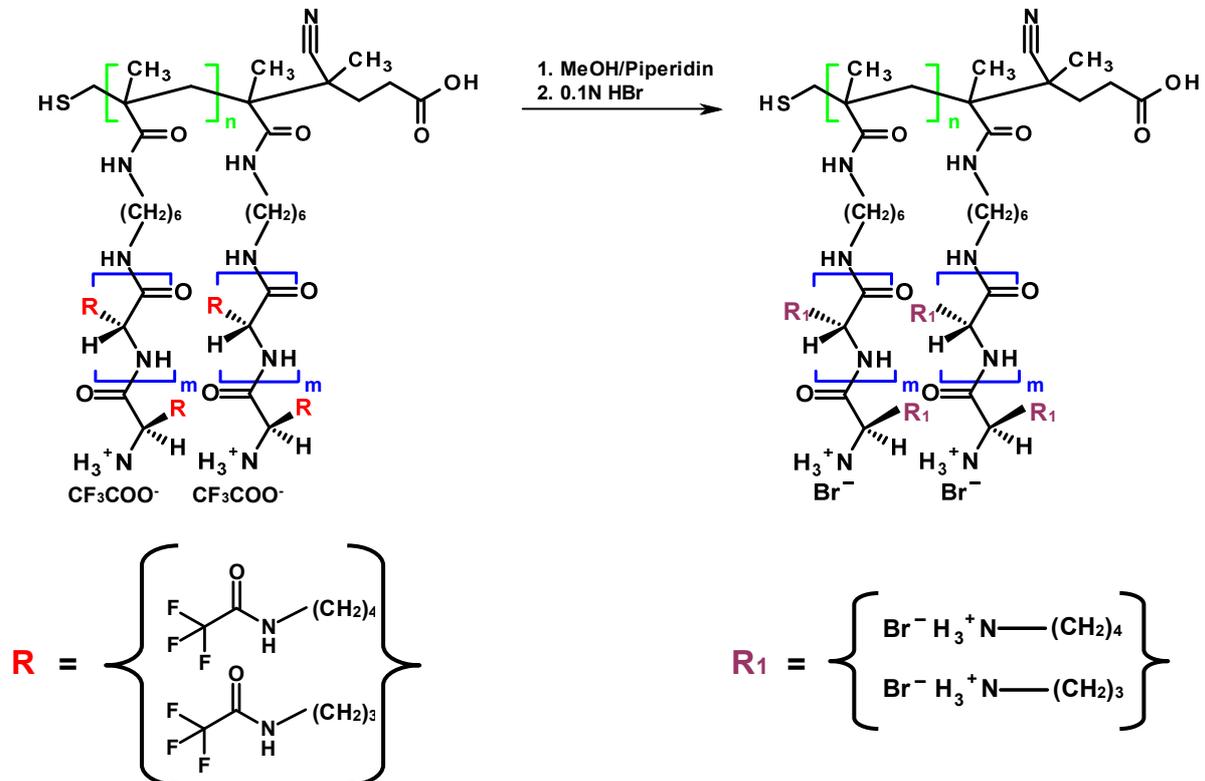


Abbildung 4.5.9: Reaktionsschema bezüglich der polymeranalogen Abspaltung der TFA-Schutzgruppe

Während der Entschützung der TFA-geschützten Poly-L-lysinbürste kam es zur Precipitation eines weißen Feststoffes, der nicht mehr in Lösung gebracht werden konnte. Der Austausch von Piperidin als Base gegen Ammoniak, 0.1 N NaOH bzw. K_2CO_3 änderte nichts an dem Ergebnis.

Anders sieht das Ergebnis für die geschützte Poly-L-ornithinbürste aus. Diese konnte zwar nach ihrer Herstellung nicht mehr in Lösung gebracht werden, allerdings war es möglich, sie mit einer 1 N methanolischen Piperidinlösung zu entschützen. Der weiße Feststoff der am Ende der Reaktion gewonnen wurde, konnte aggregatfrei in Wasser gelöst werden und mit Kapillarelektrophorese bzw. dynamischer und statischer Lichtstreuung charakterisiert werden. Abbildung 4.5.10 zeigt den Zimplot der Poly-L-ornithinbürste.

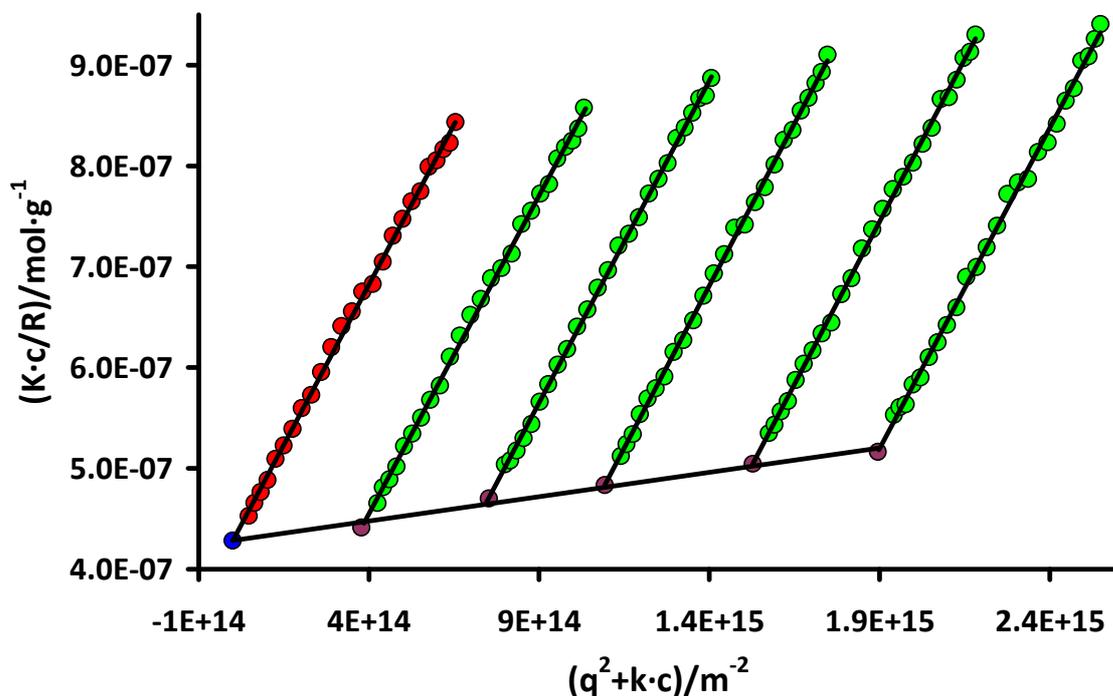


Abbildung 4.5.10: Zimplot von Orn 55-1 in H_2O bei $T=293$ K zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=1.90E-01$ g/l; $c_2=1.53E-01$ g/l; $c_3=1.09E-01$ g/l; $c_4=7.52E-02$ g/l; $c_5=3.78E-02$ g/l
 $M_w=2.34E06$ g/mol; $R_g=66.7$ nm; $A_2=2.401E-07$ mol·dm³·g⁻²; $dn/dc=0.177$ cm³/g
 Salz: LiBr ($c=5E-03$ mol/l)

Wie im Fall der sauer entschützten Poly-L-lysinbürsten ist Wasser aufgrund des positiven A_2 -Werts ein gutes Lösungsmittel für die Poly-L-ornithinbürste. Der Trägheitsradius hat vergleichbare Werte bezüglich der anderen geschützten und entschützten Bürstenderivate. Allerdings ist das Molekulargewicht dieser Bürste wesentlich kleiner als das theoretische Molekulargewicht. Aus diesem Grund wurde durch Analyse mit Kapillarelektrophorese überprüft, ob lineare Verunreinigungen in dieser Probe enthalten sind. Abbildung 4.5.11 beweist, dass es sich in Wahrheit um eine Mischung aus linearem Poly-L-ornithin und der korrespondierenden Bürstenstruktur handelt.

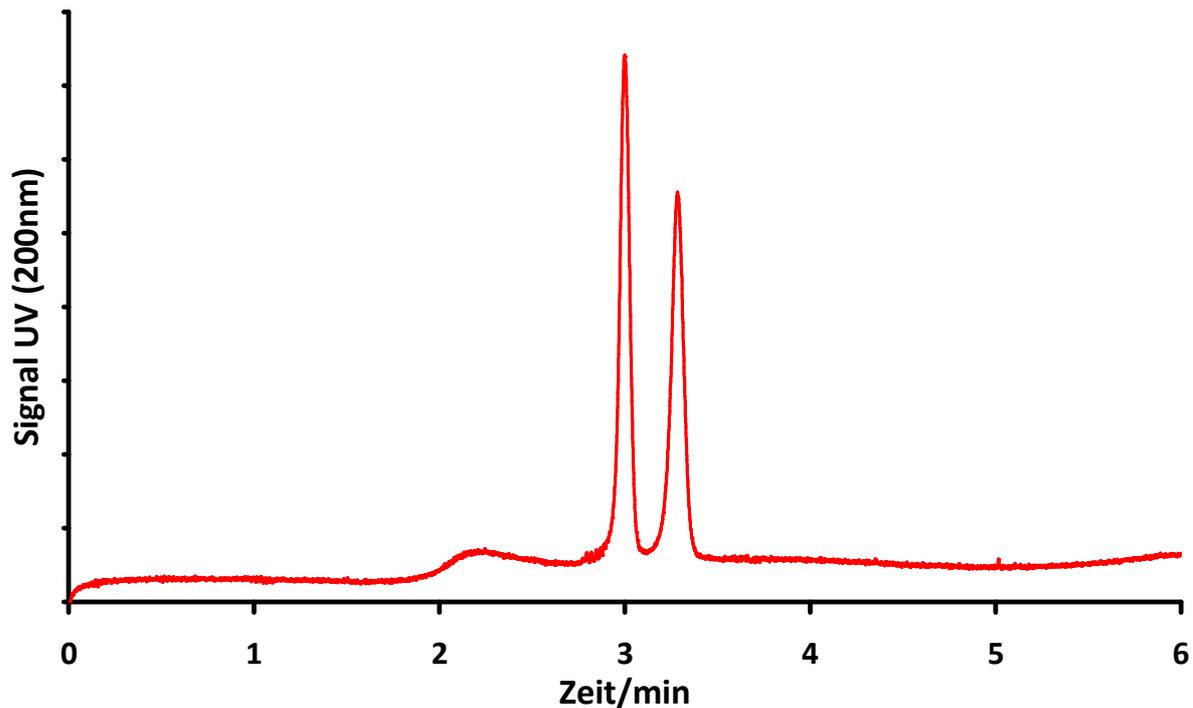


Abbildung 4.5.11: *Elektropherogramm von Orn 55-1 (c=0.5 g/l)*
Puffer: 200 mM Phosphat (pH=2.0); Spannung: 15 KV; Länge der Kapillare: 35 cm
Effektive Länge der Kapillare: 26.5 cm; Injektionszeit: 10 ms; Injektionsdruck: 30 mbar

Für die Entstehung des linearen Poly-L-ornithins kann es zwei verschiedene Erklärungen geben. Zum einen ist es möglich, dass während der Polymerisation der Seitenketten Verunreinigungen in Form von Diethylamin die Polymerisation von linearen Ketten initiierte. Die zweite Möglichkeit besteht in der partiellen Hydrolyse der Seitenketten, aufgrund der basischen Bedingungen, die für die Abspaltung dieser Schutzgruppe gewählt wurde.

Die Aufreinigung des DMF für die ringöffnende Polymerisation der Seitenketten erfolgte wie bei der Herstellung der anderen geschützten Derivate. Aus diesem Grund ist es relativ unwahrscheinlich, dass die linearen Verunreinigungen schon vor der Abspaltung der Schutzgruppen vorhanden waren.

Es hat eher den Anschein, dass die stark alkalischen Bedingungen während der Entfernung der Schutzgruppen dafür verantwortlich sind, dass es zur Entstehung von linearem Polymer kommt. Ein eindeutiger Beweis kann allerdings an dieser Stelle nicht gegeben werden, weil es aufgrund der Lösungseigenschaften des geschützten Precursors unmöglich ist, sein Molekulargewicht zu bestimmen.

Wie auch im Fall der sauer entschützten Poly-L-lysinbürsten konnte mittels statischer Lichtstreuung ein positiver zweiter Virialkoeffizient bestimmt werden. Dieses Ergebnis gibt eindeutige Hinweise darauf, dass die Abspaltung der TFA-Schutzgruppen nahezu vollständig abgelaufen ist. Ein eindeutiger Beweis konnte für diese Probe jedoch nicht erbracht, da sie aufgrund ihrer linearen Verunreinigungen in weiteren Untersuchungen keine Verwendung fand.

4.6. Synthese von anionisch geladenen Polypeptidbürsten

Wie schon in Kapitel 4.4 erläutert, wurden 2 verschieden geschützte Poly-L-glutaminsäurederivate synthetisiert. Hierbei handelt es sich um eine Benzyl-geschützte (Bn-Glu 55-1) und eine Methyl-geschützte Bürste (Me-Glu 55-1). Beide Strukturen wurden vollständig mit dynamischer und statischer Lichtstreuung charakterisiert. Zu dem wurde eine Benzyl-geschützte Poly-L-asparaginsäurebürste (Bn-Asp 55-1) hergestellt, die allerdings nur mit dynamischer Lichtstreuung untersucht wurde.

Die Benzyl-geschützten Derivate wurden wie im Fall der Z-geschützten Poly-L-lysinbürsten unter stark sauren Bedingungen mit einer Wasserstoffbromidlösung in Eisessig entschützt. (Abb. 4.6.1).

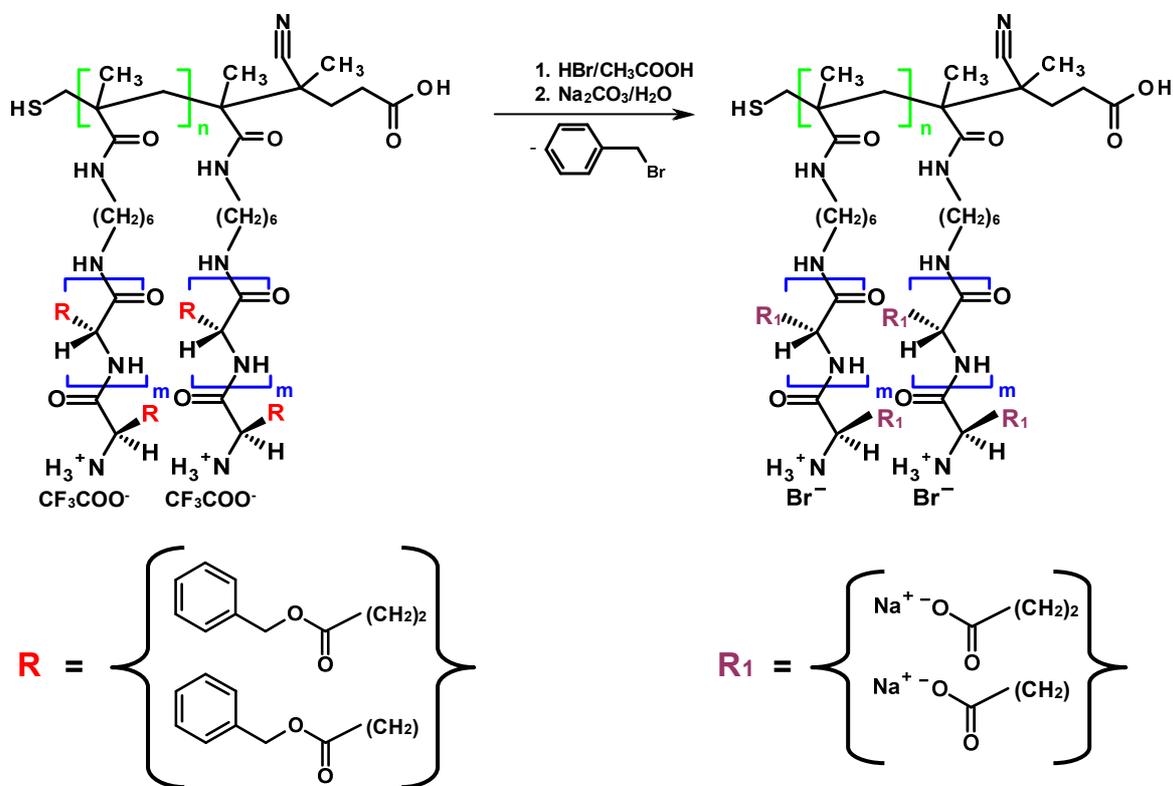


Abbildung 4.6.1: Reaktionsschema bezüglich der polymeranalogen Abspaltung der Benzylschutzgruppe

Für beide Spezies konnte mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Abspaltung der Benzylschutzgruppe nahe 100 % liegt. In Abbildung 4.6.2 ist eindeutig zu erkennen, dass die Absorptionsbande bei 254 nm für die entschützten Bürsten vollständig verschwunden ist.

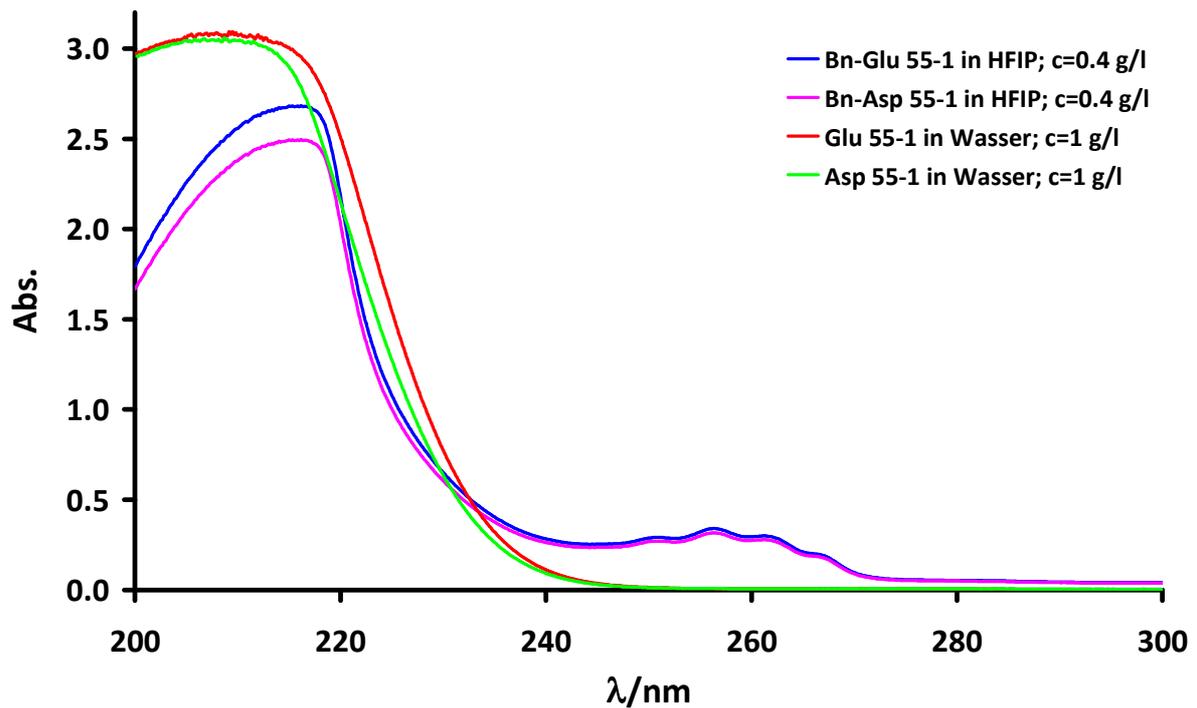


Abbildung 4.6.2: UV-Absorptionsspektrum von Bn-Glu 55-1, Bn-Asp 55-1, Glu 55-1 und Asp 55-1
 $T=293\text{ K}$; Scangeschwindigkeit.: 20 nm/min; Küvettendurchmesser: 1 cm

Des Weiteren können sie beide aggregatfrei in Milli-Q-Wasser aufgelöst und mit Lichtstreuungsmethoden untersucht werden. Die Abbildungen 4.6.3 und 4.6.4 zeigen beispielhaft den Zimplot und das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuung für die sauer entschützte Poly-L-glutaminsäurebürste.

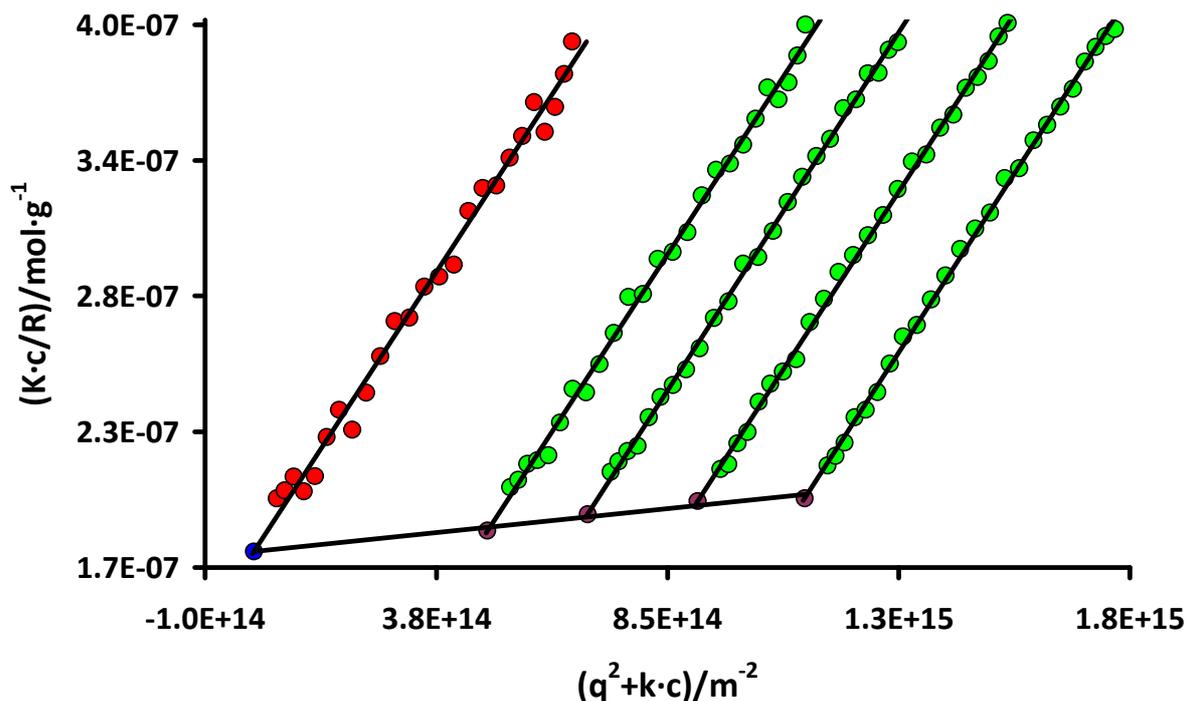


Abbildung 4.6.3: Zimplot von Glu 55-1 in H_2O bei $T=293\text{ K}$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=1.13\text{E-}01\text{ g/l}$; $c_2=9.12\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_3=6.86\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_4=4.80\text{E-}02\text{ g/l}$
 $M_w=5.66\text{E}06\text{ g/mol}$; $R_g=72.9\text{ nm}$; $A_2=1.58\text{E-}07\text{ mol}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{g}^{-2}$; $dn/dc=0.156\text{ cm}^3/\text{g}$
 Salz: NaOH ($c=5\text{E-}03\text{ mol/l}$)

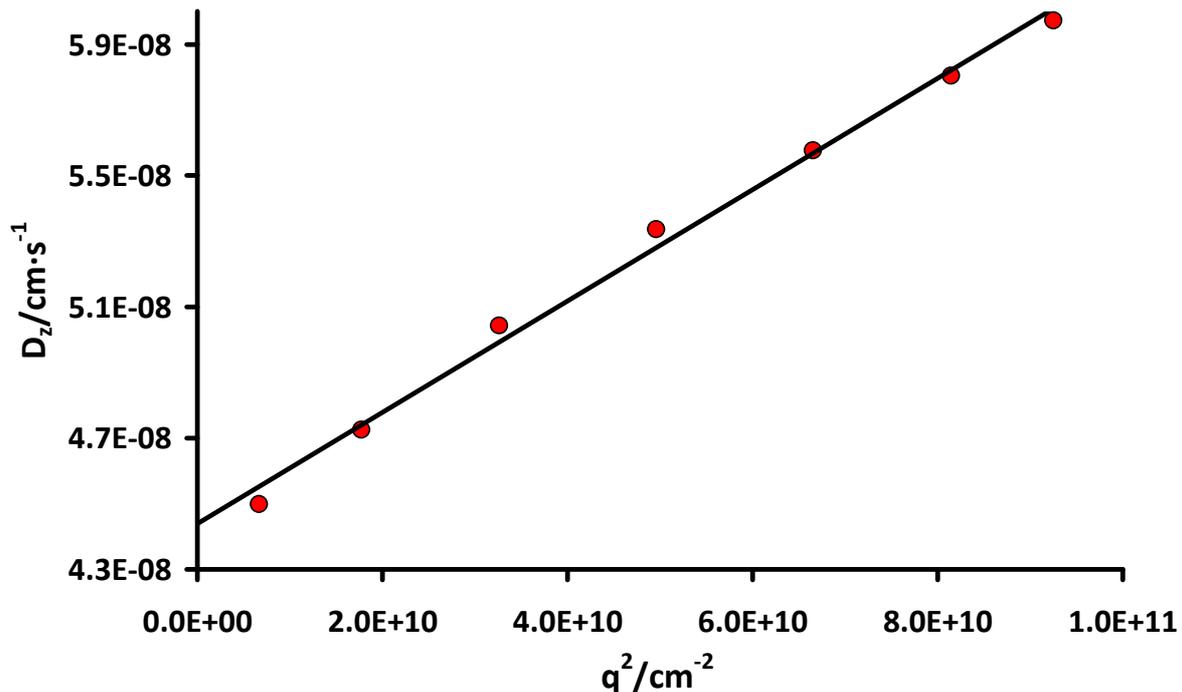


Abbildung 4.6.4: DLS von Glu 55-1 in H_2O bei $T=293 \text{ K}$ zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)
 $c=1.13\text{E-}01 \text{ g/l}$; $D_z=4.44\text{E-}08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1.002 \text{ cp}$; $R_H=54.3 \text{ nm}$
 Salz: NaOH ($c=5\text{E-}03 \text{ mol/l}$)

Der Trägheitsradius (72.9 nm) und der hydrodynamische Radius (54.3 nm) befinden sich im gleichen Bereich, wie im Fall der Poly-L-lysinbürsten. Allerdings ist das gemessene Molekulargewicht zu klein. Es beträgt 5660000 g/mol und weicht somit um 25 % vom theoretischen Molekulargewicht (7550000 g/mol) ab.

Der Grund für dieses Ergebnis konnte auch in diesem Fall durch den Einsatz der Kapillarelektrophorese gefunden werden. Abbildung 4.6.5 zeigt das Elektropherogramm der sauer entschützten Poly-L-glutaminsäurebürste sowie das Elektropherogramm von linearer Poly-L-glutaminsäure.

Es deutlich zu erkennen, dass die Bürste lineare Verunreinigungen beinhaltet, was eindeutig beweist, dass wie im Fall der Poly-L-ornithinbürste es zur Hydrolyse der Amidbindungen während der Entfernung der Schutzgruppen kam. Die Peaks der linearen Referenz und der linearen Verunreinigungen der Bürste besitzen unterschiedliche Retentionszeiten, weil es sich bei den Verunreinigungen der Bürste um Oligomere handelt, deren elektrophoretische Mobilität generell immer größer ist als von Polymeren der gleichen Struktur. Durch Berechnung der Fläche unter den Peaks der Bürste und des linearen Polymers kann der prozentuale Anteil an linearer Verunreinigung bestimmt werden. Er liegt bei etwa 25 %, was sich sehr gut mit dem ermittelten Molekulargewicht aus der statischen Lichtstreuung deckt. Das gemessene Molekulargewicht der Bürste beträgt 75 % des theoretischen Werts. Unter Vernachlässigung der Streuintensitäten der linearen Anteile sind die Ergebnisse identisch.

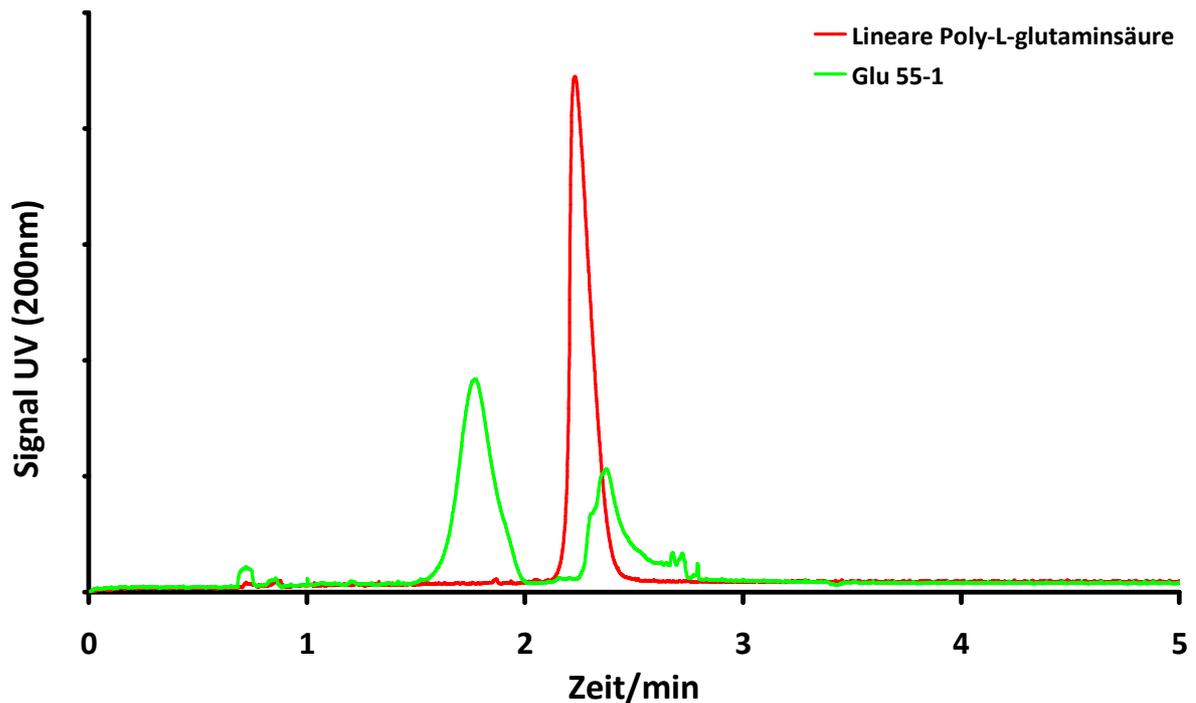


Abbildung 4.6.5: Elektropherogramm von Glu 55-1 ($c=1.0 \text{ g/l}$)

Puffer: 200 mM Borat (pH=9.2); Spannung: 25 KV; Länge der Kapillare: 35 cm

Effektive Länge der Kapillare: 26.5 cm; Injektionszeit: 20 ms; Injektionsdruck: 30 mbar

Die entschützte Poly-L-asparaginsäurebürste wurde wie der geschützte Precursors nur mit dynamischer Lichtstreuung charakterisiert (Abb. 4.6.6). Es wurde ein R_H von 39.4 nm gefunden, der vergleichbar mit den R_H 's der andern entschützten Bürsten ist.

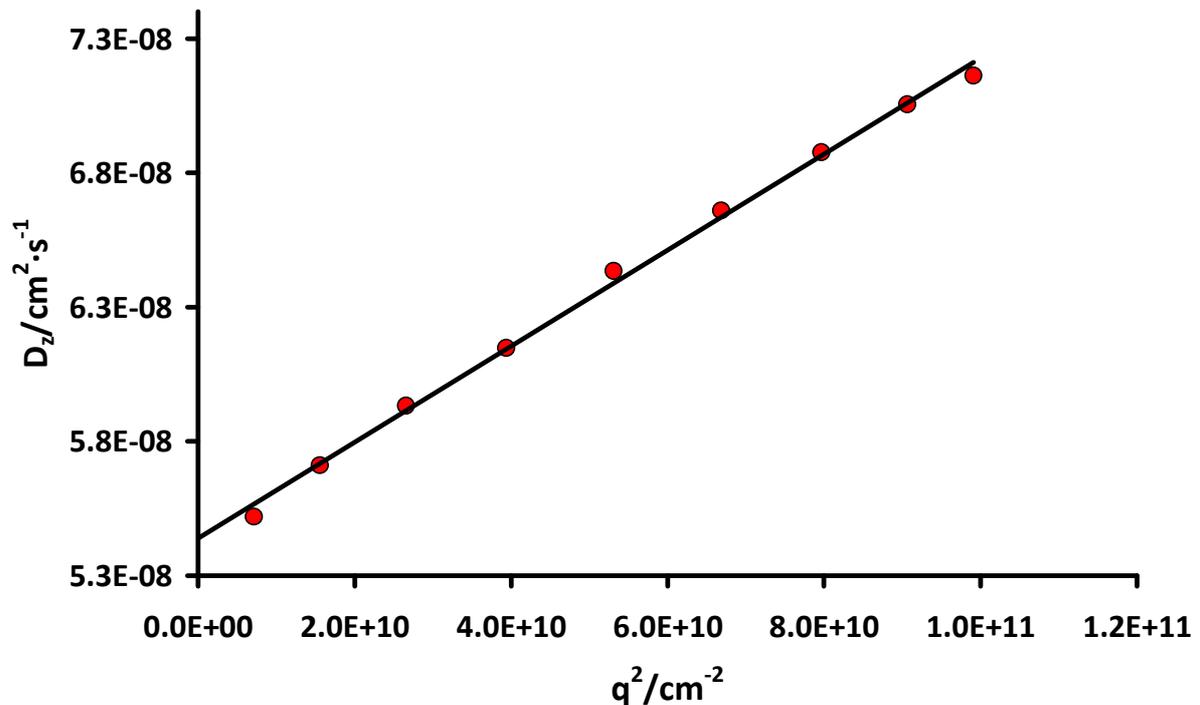


Abbildung 4.6.6: DLS von Asp 55-1 in H_2O bei $T=293 \text{ K}$ zwischen 30 und 150 Grad (15 Gradschritte)

$c=1.04\text{E-}01 \text{ g/l}$; $D_z=5.44\text{E-}08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1.002 \text{ cp}$; $R_H=39.4 \text{ nm}$

Salz: NaOH ($c=5\text{E-}03 \text{ mol/l}$)

Auch bei dieser Probe wurde durch Analyse mittels Kapillarelektrophorese lineares Polymer detektiert (Abb. 4.6.7). Der lineare Anteil liegt auch hier im Bereich von 25 %.

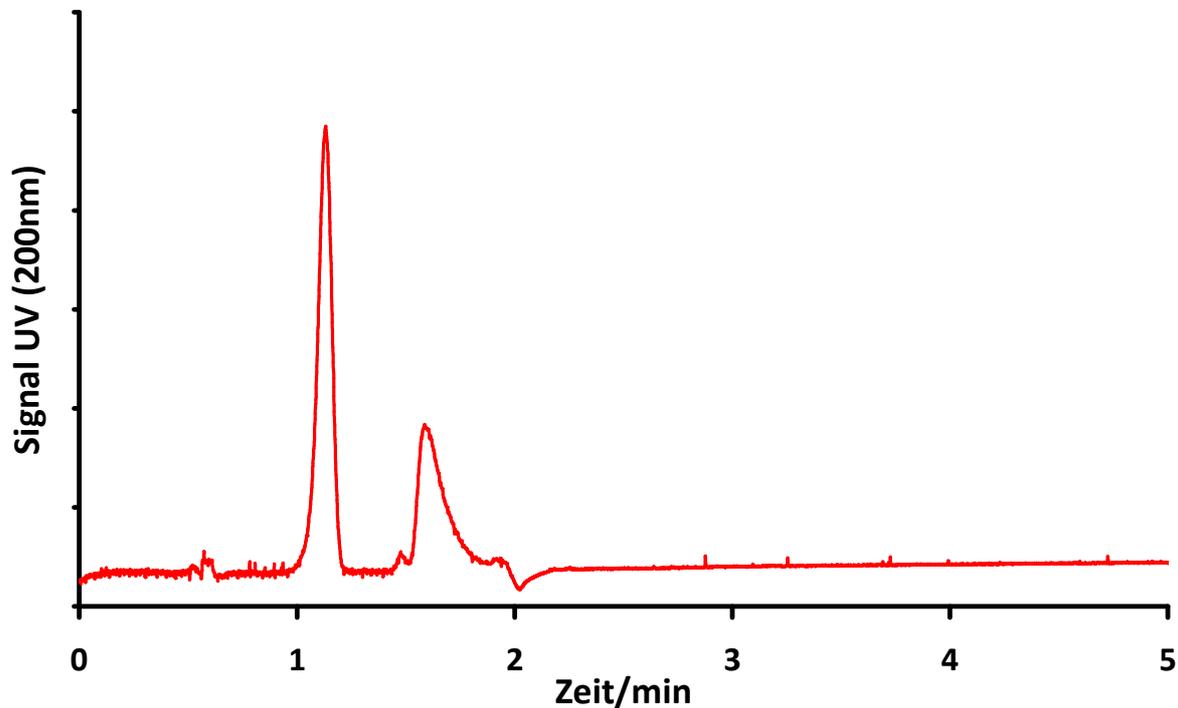


Abbildung 4.6.7: *Elektropherogramm von Asp 55-1 (c=1.0 g/l)*
Puffer: 150 mM Borat (pH=9.2); Spannung: 30 KV; Länge der Kapillare: 35 cm
Effektive Länge der Kapillare: 26.5 cm; Injektionszeit: 20ms; Injektionsdruck: 30 mbar

Aufgrund der Tatsache, dass der Benzyl-geschützte Precursor nicht mit statischer Lichtstreuung charakterisiert wurde, ist es wie im Fall der TFA-geschützten Poly-L-ornithinbürste nicht möglich, eine klare Aussage über die Entstehung des linearen Polymers zu machen. Es kann sowohl während der Polymerisation der Seitenketten entstanden sein oder während der Entfernung der Schutzgruppen. Es ist jedoch sehr naheliegend, dass auch diesem Fall die Seitenketten während der Abspaltung der Schutzgruppen partiell fragmentiert wurden. Insbesondere in der Literatur gibt es einige Veröffentlichungen, die dieses Phänomen auch für lineare Poly-L-glutaminsäure bzw. Poly-L-asparaginsäure beschreiben ^[14-15].

Neben diesen Veröffentlichungen gibt es eine Publikation von Deming, in der die Abtrennung der Z-Schutzgruppe von Poly-L-glutaminsäure durch Einsatz von Trimethylsilyliodid ohne das Auftreten von linearen Fragmenten realisiert wurde ^[16].

Diese Reaktion wurde 1973 von George Olah ^[17] gefunden und als erstes von Deming zur Entschützung von linearer Benzyl-geschützter Poly-L-glutaminsäure verwendet (Abb. 4.6.8). Als Lösungsmittel wird normalerweise Acetonitril oder Dichlormethan verwendet. Aufgrund der Tatsache, dass die Benzyl-geschützte Poly-L-glutaminsäurebürste sich in diesen Lösungsmitteln nicht löst, wurde DMF als Lösungsmittel verwendet. Der isolierte Feststoff

kann nach der Reaktion nicht mehr in Lösung gebracht werden, was daran liegen könnte, dass DMF kein geeignetes Lösungsmittel für diese Reaktion ist und die eigentliche Reaktion inhibierte.

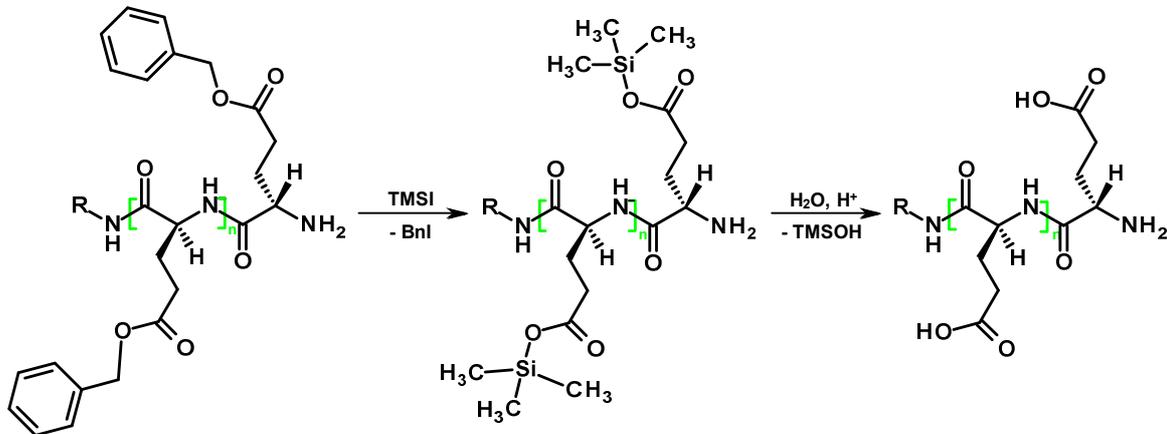


Abbildung 4.6.8: Reaktionsschema zur polymeranalogen Abspaltung der Z-Schutzgruppe mit TMSI

Neben dieser Variante kann in den oben zitierten Artikel von T. Deming nachgelesen werden, dass die alkalische Entschützung von geschützten Poly-L-glutaminsäurederivaten ebenfalls ohne Fragmentierung ablaufen soll. Aus diesem Grund wurde die in Kapitel 4.4 beschriebene Methyl-geschützte Poly-L-glutaminsäure synthetisiert. Die Abspaltung der Methylschutzgruppe erfolgte mit 0.2 N NaOH (Abb. 4.6.9).

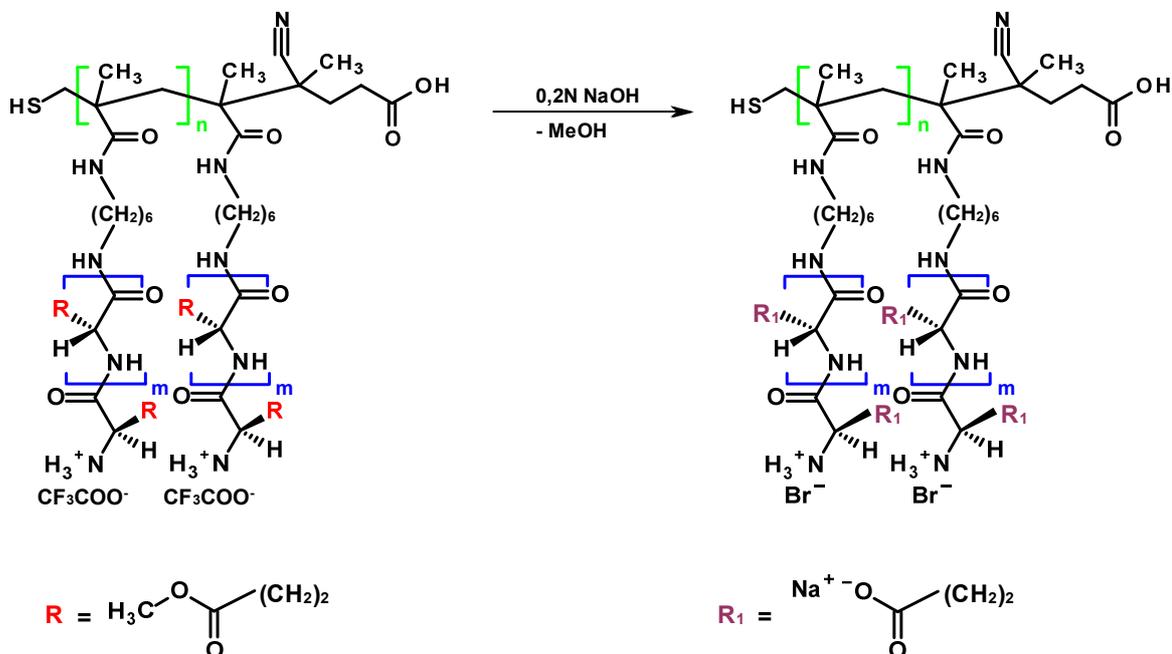


Abbildung 4.6.9: Reaktionsschema bezüglich der polymeranalogen Abspaltung der Methylschutzgruppe

Abbildung 4.6.10 zeigt das Ergebnis der statischen Lichtstreuung für eine Konzentration. Das Molekulargewicht beträgt 1820000 g/mol und weicht gegenüber dem theoretischen

Molekulargewicht um 77 % ab. In diesem Fall handelt es sich um eine apparente Masse, die nicht A_2 -korrigiert ist. Allerdings würde auch die tatsächliche Masse der Bürste niemals in der Nähe des theoretischen Molekulargewichts liegen. Auch die Kapillarelektrophorese bestätigt dieses Ergebnis. Mit dieser Technik konnten lineare Verunreinigungen im Bereich von 70 % detektiert werden (Abb. 4.6.11).

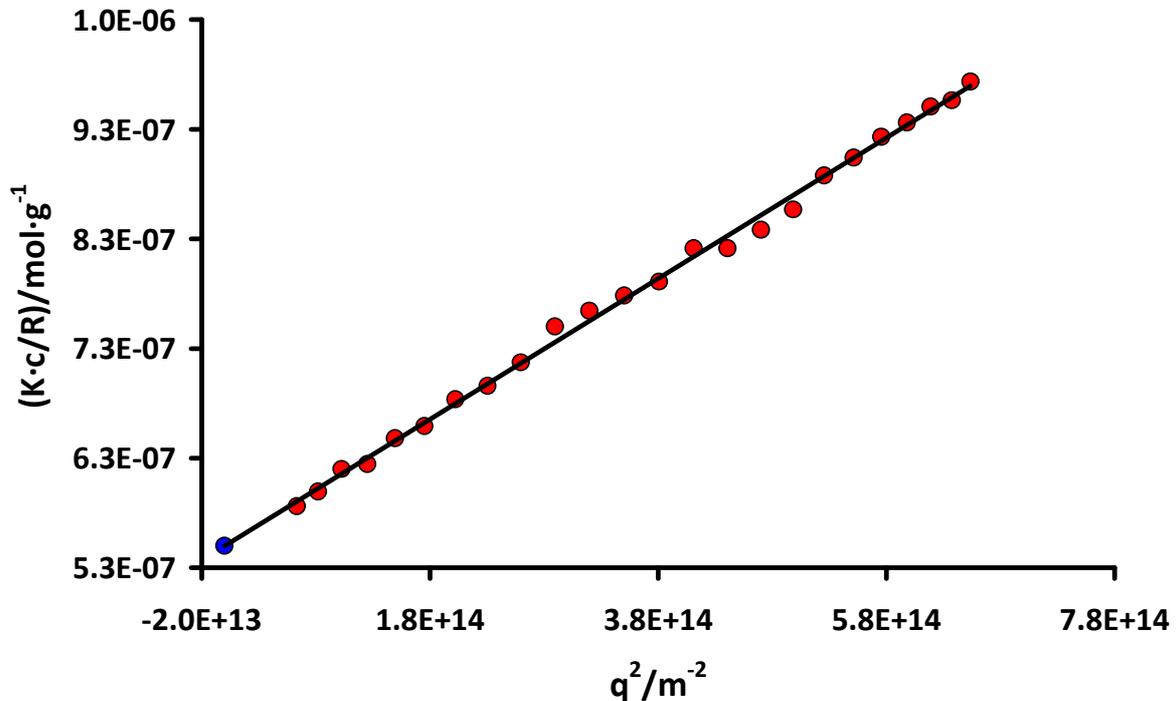


Abbildung 4.6.10: SLS der alkalisch entschützten Poly-L-glutaminsäurebürste in H_2O bei $T=293$ K zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte); $c=3.12E-02$ g/l
 $M_w=1.82E06$ g/mol; $R_g=59.3$ nm; $dn/dc=0.156$ cm³/g; Salz: NaOH ($c=5E-03$ mol/l)

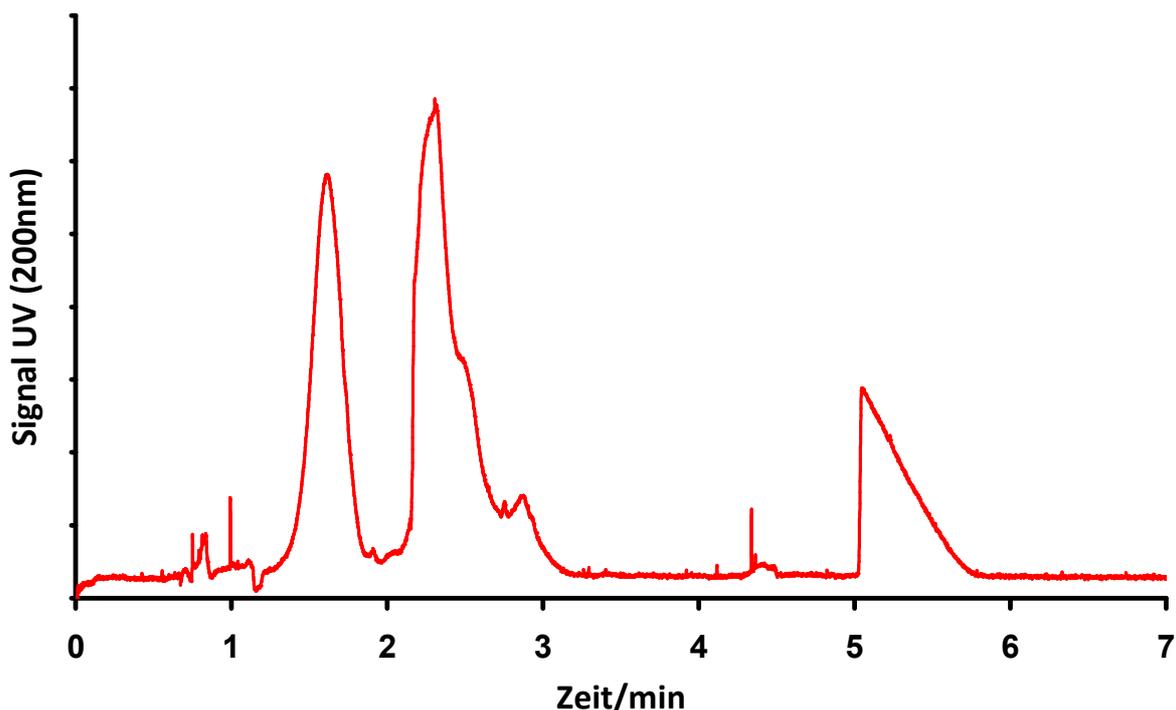


Abbildung 4.6.11: Elektropherogramm der alkalisch entschützten Poly-L-glutaminsäurebürste ($c=1.0$ g/l)
 Puffer: 200 mM Borat (pH=9.2); Spannung: 25 KV; Länge der Kapillare: 35 cm
 Effektive Länge der Kapillare: 26.5 cm; Injektionszeit: 20 ms; Injektionsdruck: 30 mbar

4.7: Zusammenfassung von Kapitel 4

Die grafting-from-Methode kann verwendet werden, um verschieden geschützte Polypeptidbürsten basierend auf L-glutaminsäure, L-asparaginsäure, L-lysin und L-ornithin herzustellen.

Zur Verwirklichung dieses Prinzips wurde durch eine mehrstufige Synthese ein Makroinitiator auf Basis von N-methacrylamid-1,6-diaminohexan hergestellt, der im darauffolgenden Schritt verwendet wurde, um die ringöffnende Polymerisation von Leuchs'schen Anhydriden zur Entwicklung der geschützten Polypeptidseitenketten einzuleiten.

Durch Analyse mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung wurden die Trägheitsradien, die hydrodynamischen Radien und die Molekulargewichte der geschützten Poly-L-lysinbürsten und Poly-L-glutaminsäurebürsten bestimmt. Aufgrund der Molekulargewichte konnte zweifelsfrei bewiesen werden, dass die geschützten Lysin- und Glutaminsäurebürsten keine Verunreinigungen in Form von Aggregaten oder linearen Verunreinigungen beinhalten. Die geschützten Ornithinderivate konnten aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht vermessen werden. Bezüglich der Benzyl-geschützten Asparaginsäurebürste wurde aus Zeitgründen nur der hydrodynamische Radius der Probe bestimmt, der dieselbe Größenordnung besitzt wie die anderen Bürsten. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Synthese auch in diesem Fall erfolgreich war.

Durch stark saure bzw. alkalische Abspaltbedingungen war es möglich, die Schutzgruppen bei allen geschützten Bürsten bis auf die TFA-geschützte Poly-L-lysinbürste erfolgreich zu entfernen.

Weitergehende Untersuchungen an diesen positiv bzw. negativ geladenen Polyelektrolytbürsten mittels statischer Lichtstreuung und Kapillarelektrophorese zeigten jedoch, dass lediglich die Z-geschützten Poly-L-lysinbürsten von ihren Schutzgruppen befreit werden konnten, ohne dass gleichzeitig eine partielle Fragmentierung der Seitenketten auftrat. In allen anderen Fällen wurden nach Abspaltung der Schutzgruppen lineare Verunreinigungen zwischen 30 bis 70 % detektiert.

Literatur zu Kapitel 4

- [1] Dissertation Bin Zhang Mainz 2004
- [2] G. L. Stahl, R. Walter, C. W. Smith; *J. Org. Chem.*, **43**, 2285, (1978)
- [3] K. A. Aamer, G. N. Tew; *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*; **45**, 5618 (2007)
- [4] R. A. Houghten, A. Beckman, J. M. Ostresh; *Int. J. Pept. Protein Res.*, **27**, 653 (1986)
- [5] H. Leuchs; *Chemische Berichte*, **39**, 857 (1906)
- [6] Cherevin, T. G. Gulevich, L. A. Popova, Z. P. Zubreichuk, V. A. Knizhnikov; *Russian Journal of Organic Chemistry*, **43**, 1427 (2007)
- [7] Elmer E. Schallenberg, M. Calvin; *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2779 (1955)
- [8] W. H. Daly and D. Poché; *Tetrahedron Letters*, **29**, 5859, (1988)

-
- [9] D. S. Poche, M. J. Moore, J. L. Bowles; *Synthetic Communications*, **29**, 843 (1999)
- [10] Ivaylo Dimitrov, Helmut Schlaad; *Chem. Commun.*, 2944 (2003)
- [11] Persönliche Aufzeichnungen von Dr. Karl Fischer; Institut für physikalische Chemie; Mainz
- [12] D. Ben-Ishai, A. Berger; *J. Org. Chem.*, **17**, 1564 (1952)
- [13] M. Sela, R. Arnon, and I. Jacobson; *Biopolymers*, **1**, 517 (1963)
- [14] T. J. Deming; *Adv. Polym. Sci.*; **202**, 1 (2006)
- [15] M. Delporte-Leroy, M. H. Loucheux; *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **4**, 1529 (1972)
- [16] G. Subramanian, R. P. Hjelm, T. J. Deming, G. S. Smith, Y. Li, C. R. Safinya; *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 26 (2000)
- [17] T. L. Ho und G. A. Olah; *Angew. Chem.*, **88**, 847 (1976)

Kapitel 5: Sekundärstrukturen von Poly-L-lysinbürsten

Aufgrund der Tatsache, dass lediglich die Synthese von Poly-L-lysinbürsten ohne nennenswerte lineare Verunreinigungen in dieser Dissertation realisiert werden konnte, konzentriert sich dieses Kapitel ausschließlich auf das Sekundärstrukturverhalten dieser Moleküle.

Wie schon in Kapitel 2 erwähnt, war es Dr. Yang Cong möglich, die Seitenketten von Dr. Bin Zhang's Poly-L-lysinbürsten in eine β -Faltblattkonformation zu zwingen, was zur Entstehung von supramolekularen Helices führte ^[1].

Eine bisher nicht beantwortete Frage beschäftigt sich mit der Änderung der Topologie einer Poly-L-lysinbürste, deren Seitenketten von einer flexiblen Knäuel in eine α -helikale Sekundärstruktur gezwungen werden.

Zum Nachweis der Sekundärstrukturen wurde in dieser Arbeit die CD-Spektroskopie gewählt (siehe auch Kapitel 2). Es ist die am weitesten verbreitete Technik um Sekundärstrukturen verschiedenster Art zu detektieren und hat den Vorteil, dass in einem Konzentrationsbereich gemessen werden kann, der in etwa auch in den Lichtstreuexperimenten verwendet wird.

Andere Methoden zum Nachweis der Sekundärstruktur wie z.B. die NMR- oder IR-Spektroskopie können für dieses System nicht angewandt werden. Das hohe Molekulargewicht der Poly-L-lysinbürsten macht es unmöglich, Sekundärstrukturen mittels der NMR-Technologie zu bestimmen, aufgrund starker Peakverbreiterung.

Für die IR-Spektroskopie würde eine enorme Menge an Probe benötigt werden, um die Sekundärstrukturen der Bürste zu analysieren. Es müsste in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 – 20 g/l gearbeitet werden, was einen Vergleich mit den Lichtstreudaten unmöglich macht, weil in diesem hohen Konzentrationsbereich die interpartikulären Wechselwirkungen nicht mehr vernachlässigt werden können, die wiederum auch Auswirkungen auf das Sekundärstrukturverhalten von Molekülen haben können.

Bezüglich des linearen Poly-L-lysin gibt es verschiedene Möglichkeiten eine α -helikale Sekundärstruktur zu erzwingen. Gängige Methoden sind die Erhöhung des pH-Wertes auf Werte größer 10,6 (dem pK_s -Wert von linearem Poly-L-lysin), bzw. die Zugabe von Methanol oder NaClO_4 zu wässrigen Poly-L-lysinlösungen ^[2-4].

Die erste Methode hat den Nachteil, dass Poly-L-lysin in einem basischen Milieu zur Aggregation neigt. Dies hat zur Folge, dass die mögliche Änderung der Topologie nicht mehr mit statischer bzw. dynamischer Lichtstreuung verfolgt werden kann. Des Weiteren sollte angemerkt werden, dass sich unter diesen Bedingungen der Nachweis einer α -helikalen Struktur mittels CD-Spektroskopie als schwierig erweist, weil Basen wie Natriumhydroxid etc. eine starke Absorption ab einer Wellenlänge von 210 nm aufweisen.

Methanol bzw. NaClO_4 sind jedoch bei einer Verwendung einer 1 mm Küvette bis zu einer Wellenlänge von 190 nm optisch transparent.

Die nun folgenden Unterkapitel beschäftigen sich aus diesem Grund nur mit den Sekundärstrukturverhalten der Poly-L-lysinbürsten, induziert durch die Zugabe von NaClO_4 bzw. Methanol.

5.1 Sekundärstrukturen von Poly-L-lysinbürsten durch Zugabe von NaClO_4

Abbildung 5.1.1 zeigt die CD-Spektren der kleinen Poly-L-lysinbürste (Lys 25-1) in verschiedenen konzentrierten NaClO_4 -Lösungen und reinem Wasser. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Seitenketten der Bürste in dest. H_2O sich anfangs in einer random coil Konformation befinden und durch Erhöhung der Perchloratkonzentration eine α -helikale Konformation ausbilden.

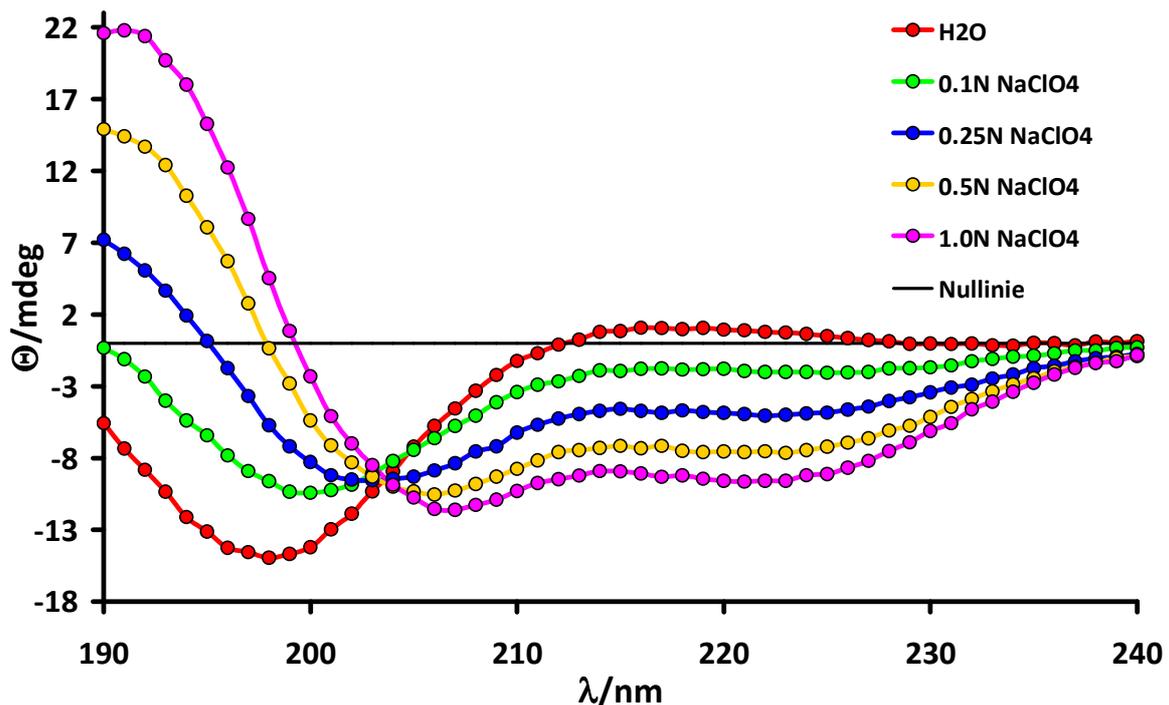


Abbildung 5.1.1: CD-Spektren von Lys 25-1 in Wasser und verschiedenen konzentrierten NaClO_4 -Lösungen; $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm;

Die quantitativen Anteile der Sekundärstrukturen sind zudem durch Simulation der gemessenen Spektren berechnet worden. Hierzu wurde das im Internet erhältliche Programmpaket Dichroweb verwendet ^[5-6]. Als Simulationsprogramm wurde CDSSTR gewählt, weil mit diesem Programm die beste Übereinstimmung von simulierten und gemessenen Spektren erzielt wird. Tabelle 5.1.1 zeigt eine Auflistung der prozentualen

Anteile der Überstrukturen für die in Abbildung 5.1.1 dargestellten Spektren. Die Simulationen der Spektren sind in diesem Kapitel nicht dargestellt, können aber im Anhang nachgeschlagen werden.

Tabelle 5.1.1: Quantitative Bestimmung der Überstrukturen von Lys 25-1 in verschiedenen konzentrierten NaClO_4 -Lösungen

Lösungsmittel	α -Helix/%	β -Faltblatt/%	Turn/%	Ungeordnet/%
H_2O	0	22	18	60
0.1 N NaClO_4	6	7	11	67
0.25 N NaClO_4	19	6	16	31
0.5 N NaClO_4	53	12	11	25
1.0 N NaClO_4	67	6	9	18

Die quantitative Analyse der Sekundärstrukturen ergibt einen α -helikalen Anteil von bis zu 70 % bei einer finalen Perchloratkonzentration von 1 mol/l.

Das gleiche Experiment wurde mit der großen Poly-L-lysinbürste (Lys 55-3) durchgeführt (Abb. 5.1.2)

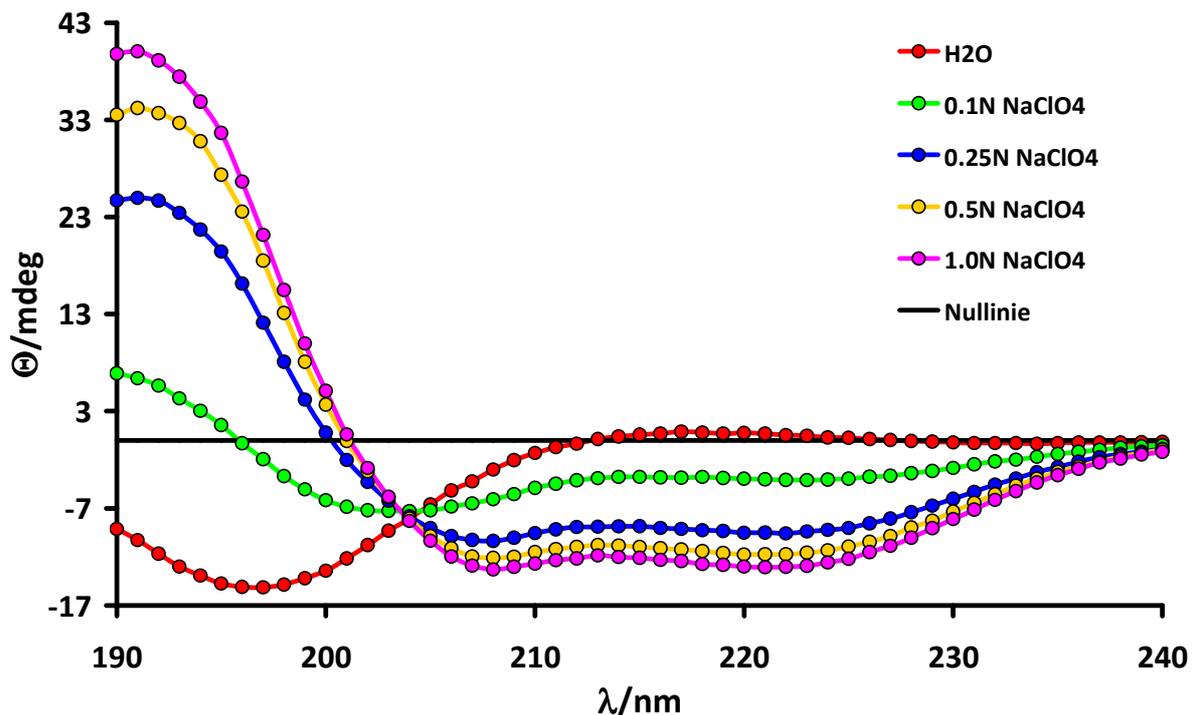


Abbildung 5.1.2: CD-Spektren von Lys 55-3 in Wasser und verschiedenen konzentrierten NaClO_4 -Lösungen; $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm;

Auch in diesem Fall nimmt der α -helikale Sekundärstrukturanteil mit steigender Perchloratkonzentration zu. Wie aber schon anhand der Spektren (Abb. 5.1.2) qualitativ zu erkennen ist, findet die Ausbildung der Helices schon bei einer niedrigeren Perchlorationkonzentration statt und besitzt einen Endwert von knapp 90 % bei einer

Perchloratkonzentration von 1 mol/l. Dieser Endwert übersteigt den Endwert im Fall von Lys 25-1 um 20 % (Tab. 5.1.2).

Tabelle 5.1.2: Quantitative Bestimmung der Überstrukturen von Lys 25-1 in verschiedenen konzentrierten NaClO_4 -Lösungen

Lösungsmittel	α -Helix/%	β -Faltblatt/%	Turn/%	Ungeordnet/%
H_2O	0	17	14	68
0.1 N NaClO_4	24	16	14	45
0.25 N NaClO_4	67	11	8	13
0.5 N NaClO_4	86	6	2	6
1.0 N NaClO_4	89	3	2	6

Abbildung 5.1.3 verdeutlicht dies noch mal, durch das Auftragen der prozentualen α -helikalen Anteile gegen die Perchlorationenkonzentration für beide Proben.

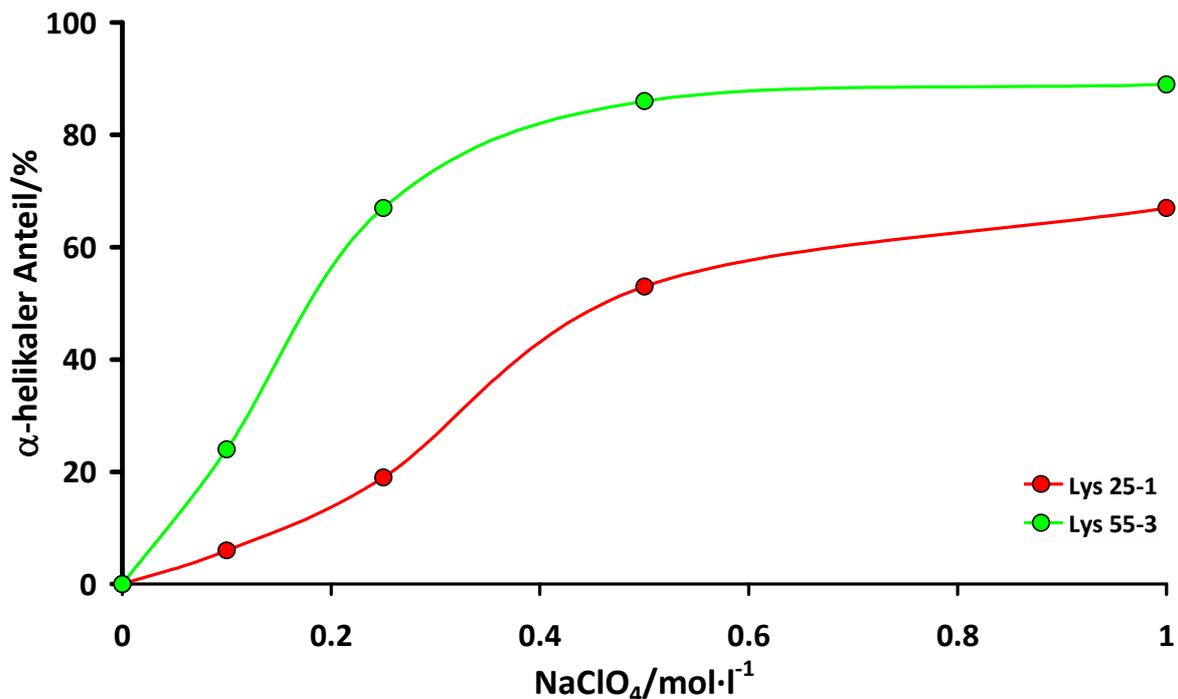


Abbildung 5.1.3: Auftragung des prozentualen helikalen Anteils in Abhängigkeit der NaClO_4 -Konzentration für Lys 25-1 und Lys 55-3

Geht man davon aus, dass die Proben Lys 25-1 und Lys 55-3 eine ähnliche Propfdichte besitzen, hat Lys 55-3 die längeren Seitenketten. Unter dieser Annahme zeigen die Seitenketten der Poly-L-lysinbürsten das gleiche Überstrukturverhalten wie die korrespondierenden linearen Strukturen, bei denen bekannt ist, dass mit steigender Anzahl an Monomereinheiten die Ausbildung von α -helikalen Strukturen leichter realisierbar ist ^[7-8].

5.2 Bestimmung der Topologie von Poly-L-lysinbürsten im α -helikalen Zustand, induziert durch die Zugabe von NaClO_4

Im Gegensatz zur Induzierung von α -helikalen Strukturen durch Erhöhung des pH-Wertes, ist es möglich, die Poly-L-lysinbürsten im helikalen Zustand durch Zugabe von NaClO_4 mit statischer und dynamischer Lichtstreuung zu untersuchen. Die Abbildung 5.2.1 zeigt beispielhaft für die Probe Lys 55-3 den Zimplot in einer 0.5 N NaClO_4 -Lösung.

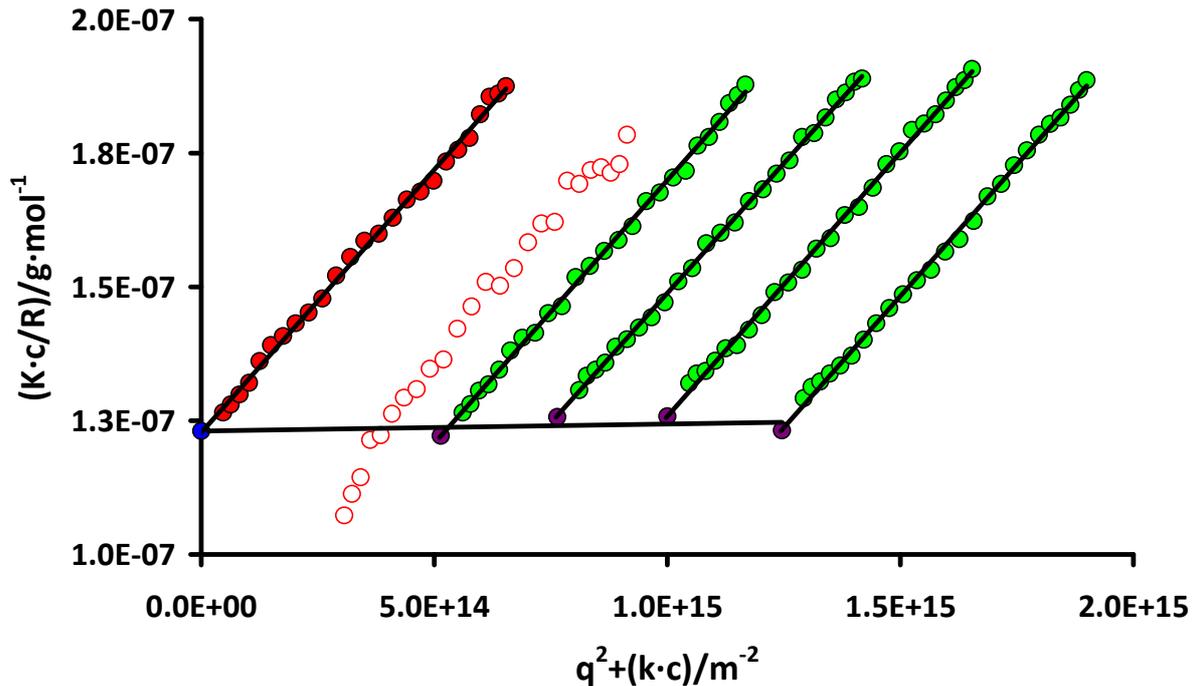


Abbildung 5.2.1: Zimplot von Z-Lys 55-3 in H_2O bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=6.23\text{E-}02$ g/l; $c_2=5.00\text{E-}02$ g/l; $c_3=3.82\text{E-}02$ g/l; $c_4=2.57\text{E-}02$ g/l; $c_5=1.31\text{E-}02$ g/l
 $M_w=8.13\text{E}06$ g/mol; $R_g=49.0$ nm; $A_2=1.291\text{E-}08$ mol·dm³·g⁻²; $dn/dc=0.164$ cm³/g
 Salz: NaClO_4 (0.5 mol/l)

Durch die Zugabe von NaClO_4 hat sich der Trägheitsradius der Bürste stark verkleinert. Statt eines R_g 's von 84.4 nm in 0.005 N NaBr-Lösung ist der Trägheitsradius um 35 nm auf 49 nm abgefallen. Des Weiteren ist zu erkennen, dass das Molekulargewicht der Bürste sich verändert hat. In 0.005 N NaBr-Lösung beträgt es 9.95E06 g/mol. Das in diesem Fall bestimmte Molekulargewicht ist um 20 % kleiner. Filtrationsverluste können diese Veränderung nicht erklären, weil beide Messungen mit der gleichen Polymerstammlösung durchgeführt worden sind. Eine Änderung des dn/dc -Wertes durch die Zugabe von NaClO_4 ist ebenfalls auszuschließen, weil die dn/dc -Werte von Poly-L-lysin unter beiden Bedingungen gemessen wurden und identisch sind. Eine partielle Aggregation der Poly-L-lysinbürsten in 0.005 N NaBr-Lösung ist unwahrscheinlich, weil Polyelektrolyte tendenziell in Medien mit großer Ionenstärke anfangen zu aggregieren. Einen weiteren Hinweis, dass die Probe in 0.005 N NaBr-Lösung nicht partiell aggregiert vorliegt, liefern die A_2 -Werte für

Lys 55-3. Der A_2 -Wert für Lys 55-3 in 0.005 N NaBr-Lösung (Abb. 4.5.2) ist größer als in 0.5 N NaClO₄-Lösung, was darauf hinweist, dass in diesem Lösungsmittel eine größere Aggregationstendenz zu erwarten ist.

Die einzige Erklärung für die unterschiedlichen Molekulargewichte ist eine erhöhte Adsorption der Probe in 0.5 N NaClO₄-Lösung an der Glaswand der Küvette. Aufgrund des hohen Molekulargewichts der Probe sowie des relativ großen dn/dc -Wertes wurden relativ geringe Konzentrationen in den Lichtstreuexperimenten verwendet. Die Änderung des Molekulargewichts durch partielle Adsorption der Polymerprobe an der Glaswand der Küvette ist unter solchen Bedingungen niemals völlig auszuschließen. In weitergehenden Studien sollten aus diesem Grund die Experimente in einer hydrophobisierten Küvette durchgeführt werden bzw. bei erhöhter Probenkonzentration unter Verwendung eines abgeschwächten Lasers.

Der hydrodynamische Radius der Probe ist ebenfalls kleiner geworden und ist von 56.4 nm in 0.005 N NaBr-Lösung auf 38.4 nm gesunken (Abb. 5.2.2). Der Abfall ist prozentual gesehen nicht so stark wie im Fall des R_g 's.

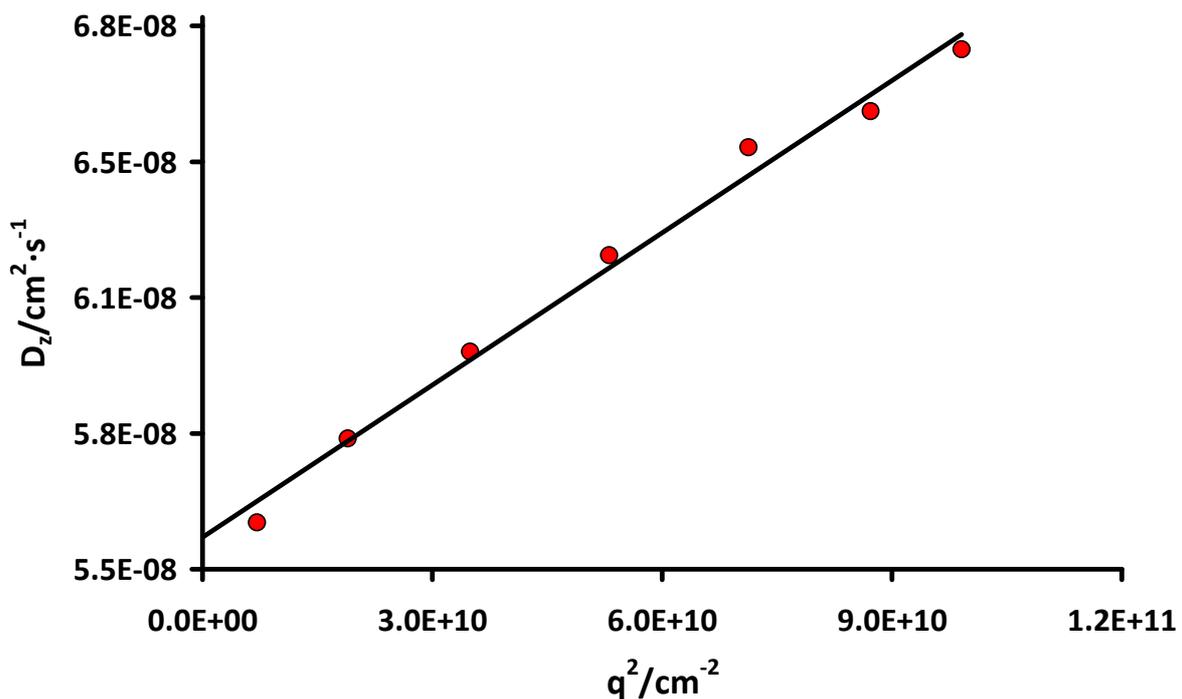


Abbildung 5.2.2: DLS von Lys 55-3 in H₂O bei T=293K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)
 $c=5.00E-02$ g/l; $D_z=5.575E-08$ cm²·s⁻¹; $\eta=1,009$ cp; $R_H=38.4$ nm
 Salz: NaClO₄ (0.5 mol/l)

Das ρ -Verhältnis hat sich im Gegensatz zu den Lichtstreuergebnissen in 0.005 N NaBr-Lösung verkleinert, was erste Hinweise auf die Änderung der Topologie offenbart.

Es ist allerdings anzumerken, dass ein Vergleich zwischen diesen beiden Systemen äußerst schwierig ist, weil die Ionenstärke des Lösungsmittels dramatische Effekte auf die Topologie

von Polyelektrolyten haben kann. Aus diesem Grund wurden dieselben Experimente noch einmal in einer 0.5 N NaCl-Lösung wiederholt. In diesem Lösungsmittel sind die Seitenketten der Poly-L-lysinbürste in der random-coil-Konformation angeordnet. Die Ionenstärke dieses Lösungsmittels ist nun aber dieselbe wie der einer 0.5 N NaClO₄-Lösung. Die Ergebnisse der statischen Lichtstreuung von Lys 55-3 in 0.5 N NaCl-Lösung sind in Abbildung 5.2.3 zu sehen.

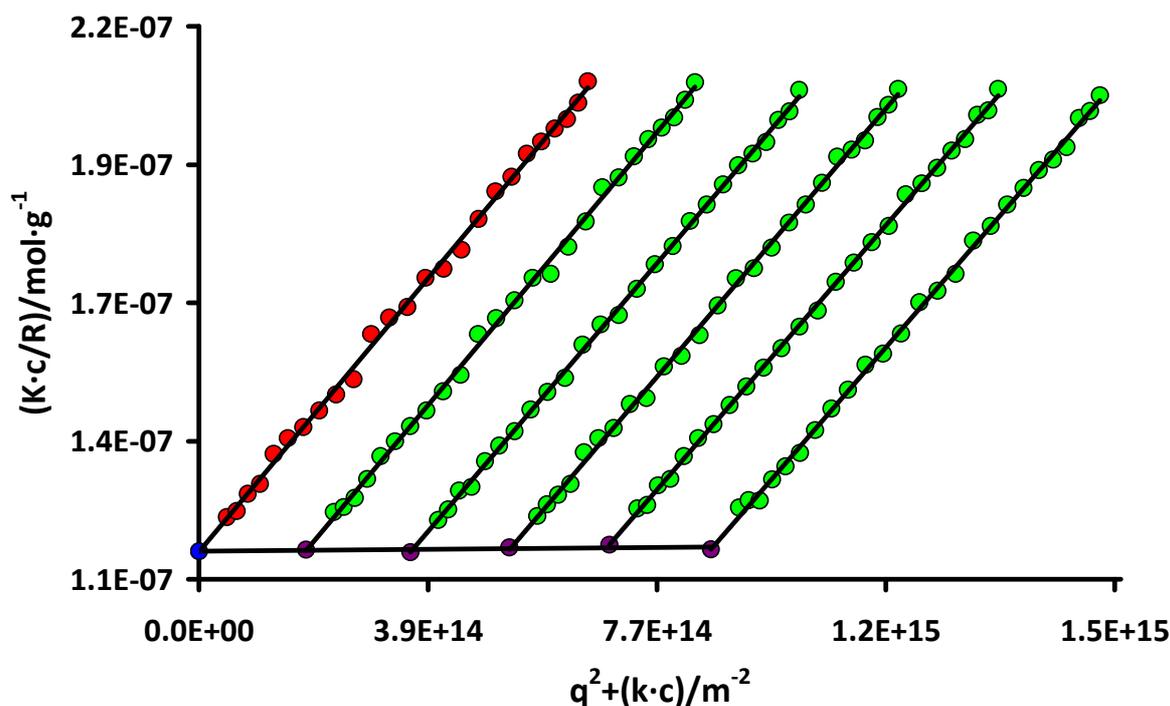


Abbildung 5.2.3: Zimplot von Z-Lys 55-3 in H₂O bei T=293K zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=5.74E-02$ g/l; $c_2=4.60E-02$ g/l; $c_3=3.48E-02$ g/l; $c_4=2.37E-02$ g/l; $c_5=1.20E-02$ g/l
 $M_w=8.68E06$ g/mol; $R_g=60.4$ nm; $A_2=7.729E-09$ mol·dm³·g⁻²; $dn/dc=0.164$ cm³/g
 Salz: NaCl (0.5 mol/l)

Auch durch die Zugabe von NaCl wird der R_g der Probe abgesenkt. Der Grund für diesen Effekt liegt in der Abschwächung der intramolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den positiven Ladungen entlang der Seitenketten. Die Verringerung des R_g 's von Lys 55-3 durch Zugabe von NaCl, ist jedoch nicht so stark wie bei der Zugabe von NaClO₄. Das Molekulargewicht der Probe besitzt im Rahmen des Fehlers den gleichen Wert wie im Fall des helikalen Zustands. Es weicht wieder von der Masse ab, die für dieselbe Probe in niedrig konzentrierter Salzlösung gemessen worden ist. Der Grund für diese Abweichung kann wie im Fall der Probe Lys 55-3 in NaClO₄-Lösung nur durch Adsorptionseffekte an der Glaswand der Küvette erklärt werden.

Ein ähnliches Ergebnis wie in der statischen Lichtstreuung weist auch die dynamische Lichtstreuung auf. Der hydrodynamische Radius in 0.5 N NaCl-Lösung fällt ab, wie auch in 0.5 N NaClO₄-Lösung. Allerdings ist die Änderung geringer als in 0.5 N NaClO₄-Lösung (Abb. 5.2.4).

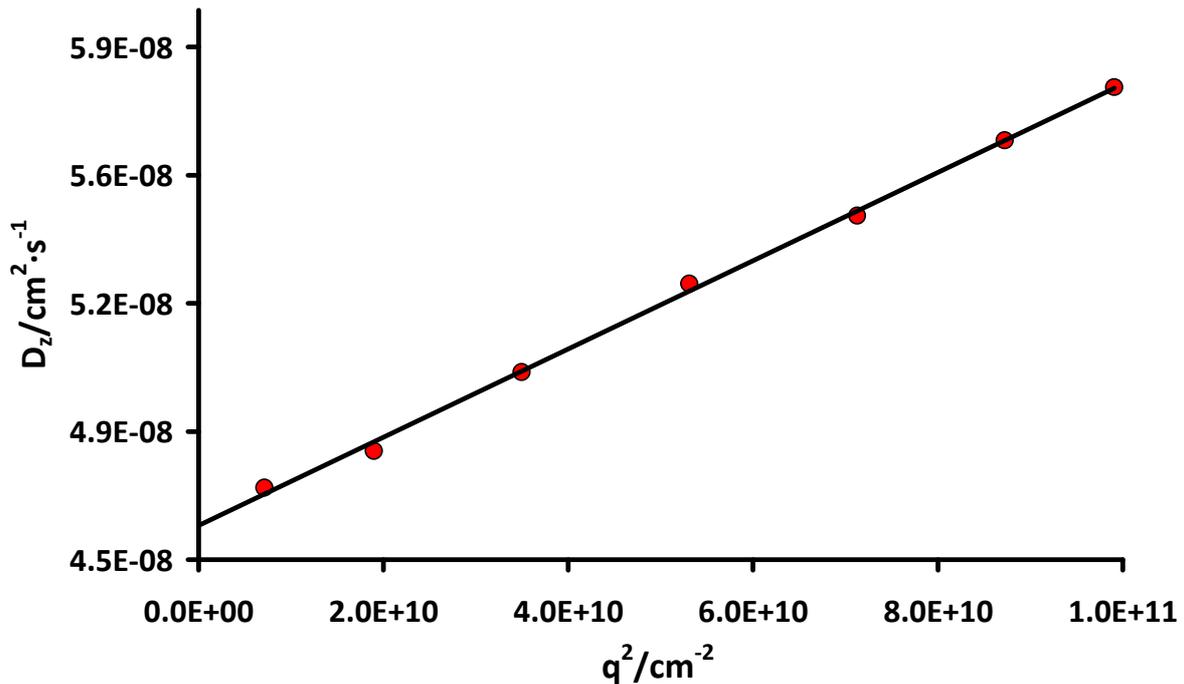


Abbildung 5.2.4: DLS von Lys 55-3 in H_2O bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)
 $c=5.74\text{E-}02 \text{ g/l}$; $D_z=4.560\text{E-}08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1,040 \text{ cp}$; $R_H=44.8 \text{ nm}$
 Salz: NaCl (0.5 mol/l)

Tabelle 5.2.1 fasst die Ergebnisse der statischen und dynamischen Lichtstreuung für die Probe Lys 55-3 in verschiedenen Salzkonzentrationen noch einmal zusammen .

Tabelle 5.2.1: Zusammenfassung der Lichtstreuungsergebnisse für Lys 55-3 in verschiedenen Salzlösungen

Probe	LM	R_g/nm	R_H/nm	$A_2/\text{mol} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{g}^{-2}$	$M_w/\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	ρ -Verh.	Struktur
Lys 55-3	0.005 N NaBr	84.4	56.4	4.781E-08	9.95E+06	1.50	Knäuel
Lys 55-3	0.5 N NaClO ₄	49.0	38.4	1.291E-08	8.13E+06	1.28	helikal
Lys 55-3	0.5 N NaCl	60.4	44.8	7.729E-09	8.86E+06	1.35	Knäuel

Konzentriert man sich auf die ρ -Verhältnisse, erkennt man, dass sie durch die Zugabe von Salz verkleinert werden. Der Grund für die Verkleinerung ist in beiden Fällen ein starker Abfall von R_g , währenddessen R_H nur mäßig kleiner wird. Es hat somit den Anschein, dass die Änderung der Topologie der Bürste durch die Erhöhung der Ionenstärke hervorgerufen wird und die helikale Konformation der Seitenketten keinen Einfluss auf die Topologie hat.

Die Änderung des ρ -Verhältnis von Nanostrukturen gibt Informationen über Änderungen der Topologie. Es ist jedoch meistens nicht möglich, eine Auskunft darüber zu geben, welche Topologie genau vorliegt. Um weitere Informationen über die genauen Formen der Poly-L-lysinnanostrukturen zu erhalten, ist es nötig, sie mit abbildenden Methoden zu untersuchen.

Grundsätzlich kommen zur Lösung dieses Problems zwei Mikroskopiertechniken in Frage, die Strukturen im Größenbereich mehrerer Nanometer in Lösung abbilden können. Dabei handelt es sich zum einen um die Cryo-TEM-Technik bzw. um AFM-Aufnahmen in Lösung. Die Aufnahme von Bildern im trockenen Zustand ist in diesem Fall keine Alternative, weil alle anderen physikalischen Experimente zur Bestimmung der Topologie in Lösung durchgeführt wurden.

Cryo-Tem-Aufnahmen sind aufgrund der chemischen Struktur der Bürsten äußerst schwierig zu realisieren. Poly-L-lysin sowie auch das Rückgrat der Bürste sind aus Atomen aufgebaut (C,N,O und H), die eine geringe Elektronendichte besitzen. Aus diesem Grund würde es äußerst schwierig werden, sie sichtbar zu machen.

Die AFM-Technologie in Lösung hingegen, ist eine relativ junge aber äußerst vielversprechende Methode, um Nanostrukturen auf Polymerbasis in Lösung abzubilden.

Abbildung 5.2.5 zeigt das Phasenbild einer AFM-Aufnahme der Probe Lys 55-3 in 0.005 N NaBr-Lösung.

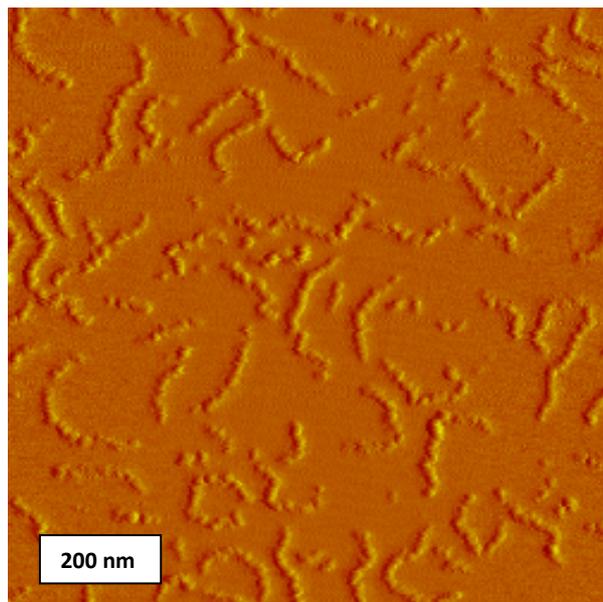


Abbildung 5.2.5: AFM-Aufnahme von Lys 55-3 in 0.005N NaBr auf Mica
 $c_{Probe}=0.01$ g/l; LM: 0.005N NaBr; Phasenbild

Es ist gut zu erkennen, dass die Poly-L-lysinbürsten relativ gestreckt vorliegen und zylinderförmige Strukturen darstellen. Des Weiteren konnten anhand des Phasen- bzw. Amplitudenbildes Ondulationen entlang der Polymerbürsten sichtbar gemacht werden, für die bis jetzt noch keine sinnvolle Erklärung gegeben werden kann. Die gleichen Ondulationen sind auch im Amplitudenbild sichtbar (Abb. 5.2.6).

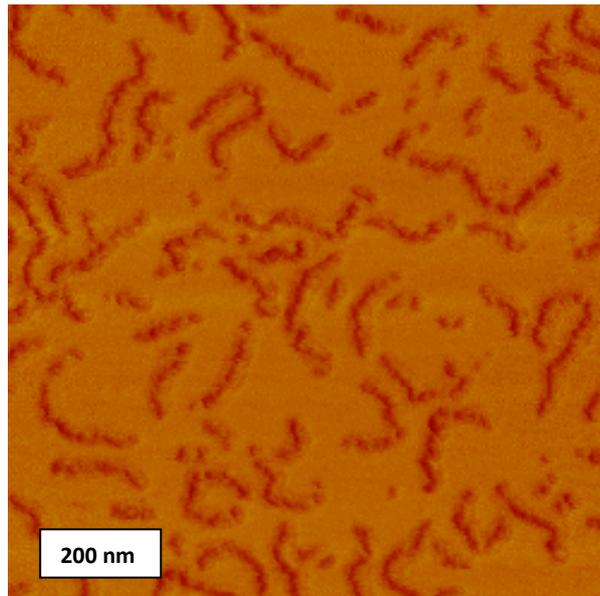


Abbildung 5.2.6: AFM-Aufnahme von Lys 55-3 in 0.005N NaBr auf Mica
 $c_{Probe}=0.01$ g/l; LM: 0.005N NaBr; Amplitudenbild

In 0.5 N NaClO₄-Lösung geht die eher gestreckte Form der Poly-L-lysinbürsten verloren. Unter diesen Bedingungen schnürt sich die Bürste zu regelmäßig gekrümmten Strukturen (Hufeisen, Ringe, Mäander) zusammen (Abb. 5.2.7).

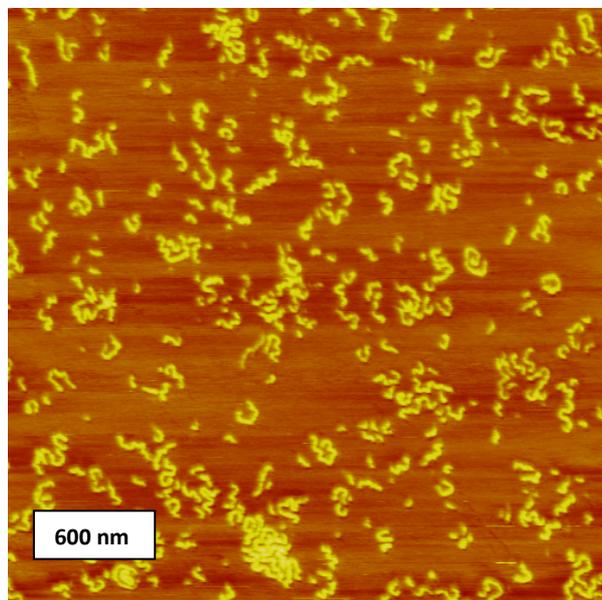


Abbildung 5.2.7: AFM-Aufnahme von Lys 55-3 in 0.5N NaClO₄ auf Mica
 $c_{Probe}=0.01$ g/l; LM: 0.5N NaClO₄; Höhenbild

Dieses Ergebnis erklärt warum das ρ -Verhältnis von 1.50 in 0.005 N NaBr-Lösung auf einen Wert von 1.25 bei großen Ionenstärken abnimmt. Aufgrund der Tatsache, dass unter diesen Bedingungen die Bürsten ihre gestreckte Form verlieren und eine kompakte Topologie aufweisen, muss das ρ -Verhältnis der Probe Lys 55-3 kleinere Werte annehmen.

Weiterhin ist in Abbildung 5.2.7 zu erkennen, dass die Bürsten eine größere Tendenz zeigen, sich zusammen zu lagern. Es hat also den Anschein, dass die Qualität des Lösungsmittels durch die Zugabe von NaClO_4 schlechter geworden ist. Auch diese Erkenntnis wird durch die Lichtstreuungsmessungen unterstützt, weil der A_2 -Wert von Lys 55-3 in 0.5 N NaClO_4 -Lösung kleiner ist, als in 0.005 N NaBr -Lösung. Vergrößerungen von Abbildung 5.2.7 zeigen zu dem, dass die Ondulationen der Bürsten auch in 0.5 N NaClO_4 -Lösung weiterhin vorhanden sind und deren Ausdehnung zunimmt (Abb. 5.2.8).

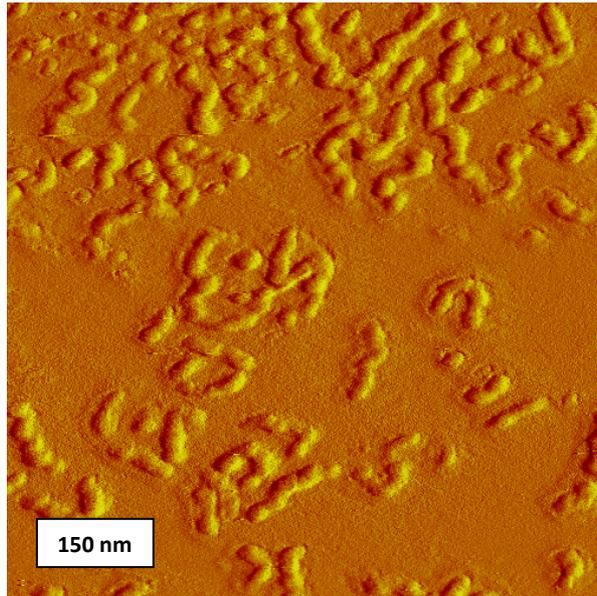


Abbildung 5.2.8: AFM-Aufnahme von Lys 55-3 in 0.5N NaClO_4 auf Mica
 $c_{\text{Probe}}=0.01$ g/l; LM: 0.5N NaClO_4 ; Höhenbild

AFM-Bilder der Probe Lys 55-3 in 0.5 N NaCl -Lösung konnten bis zum Ende der Dissertation nicht aufgenommen werden, weil Vibrationen verursacht durch anhaltende Bautätigkeiten in Nachbarschaft des Institut für physikalische Chemie, die Messungen zeitweise unmöglich machten.

Aufgrund des ρ -Verhältnis ist allerdings anzunehmen, dass eine ähnliche Situation wie in 0.5 N NaClO_4 -Lösung vorliegt. Die Bürsten werden in diesem Lösungsmittel auch eine Tendenz zur Bildung zu regelmäßig gekrümmten Partikeln haben. Vergleicht man allerdings das ρ -Verhältnis mit dem der Probe in 0.5 N NaClO_4 -Lösung sollten die Einschnürungen nicht ganz so stark ausgeprägt sein.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die kleine Poly-L-lysinbürste (Lys 25-1) gefunden. Tabelle 5.2.2 zeigt eine Zusammenfassung der Lichtstreuungsergebnisse für diese Probe in 0.005 N NaBr -Lösung, 0.5 N NaClO_4 -Lösung, und 0.5 N NaBr -Lösung. Die dazugehörigen Graphen können im Anhang nachgeschlagen werden. Das ρ -Verhältnis dieser Bürste ist generell etwas größer, als das der Probe Lys 55-3, weil die Länge der Seitenketten kleiner als bei der Probe Lys 55-3 ist und dadurch der R_H der Probe kleinere Werte annehmen muss. Nichts desto trotz ist der gleiche Trend erkennbar. Durch die Zugabe hoher

Salzkonzentrationen, verkleinert sich das ρ -Verhältnis der Bürste. Genau wie im Fall der Probe Lys 55-3 wird dieser Effekt durch eine deutliche Verkleinerung des Trägheitsradius hervorgerufen, währenddessen sich der hydrodynamische Radius der Probe nur wenig verändert.

Tabelle 5.2.2: Zusammenfassung der Lichtstreuergebnisse für Lys 25-1 in verschiedenen Salzlösungen

Probe	LM	R_g /nm	R_H /nm	A_2 /mol·dm ³ ·g ⁻²	M_w /g·mol ⁻¹	ρ -Verh.	Struktur
Lys 25-1	0.005 N NaBr	75.9	42.2	1.089E-07	8.14E+06	1.80	Knäuel
Lys 25-1	0.5 N NaClO ₄	56.4	37.1	-6.530E-08	5.01E+06	1.52	helikal
Lys 25-1	0.5 N NaBr	64.8	42.0	5.853E-08	6.90E+06	1.54	Knäuel

Die AFM-Bilder der Probe Lys 25-1 in 0.005 N NaBr-Lösung sind in Abbildung 5.2.9 und 5.2.10 dargestellt.

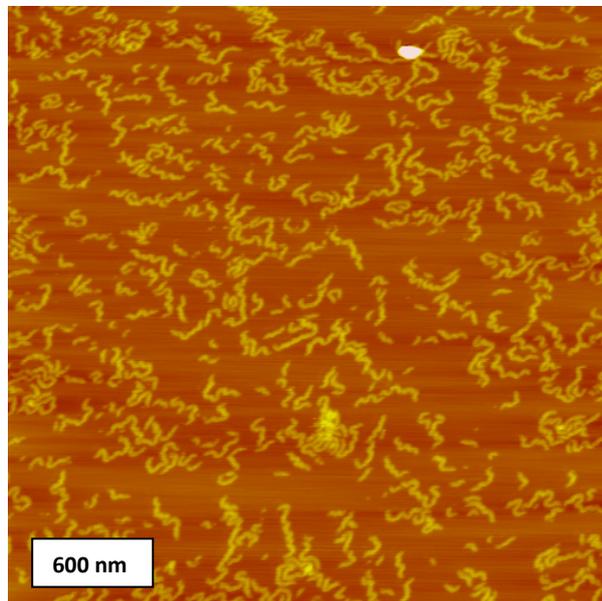


Abbildung 5.2.9: AFM-Aufnahme von Lys 25-1 in 0.005N NaBr auf Mica
 $c_{\text{Probe}}=0.01$ g/l; LM: 0.005N NaBr; Höhenbild

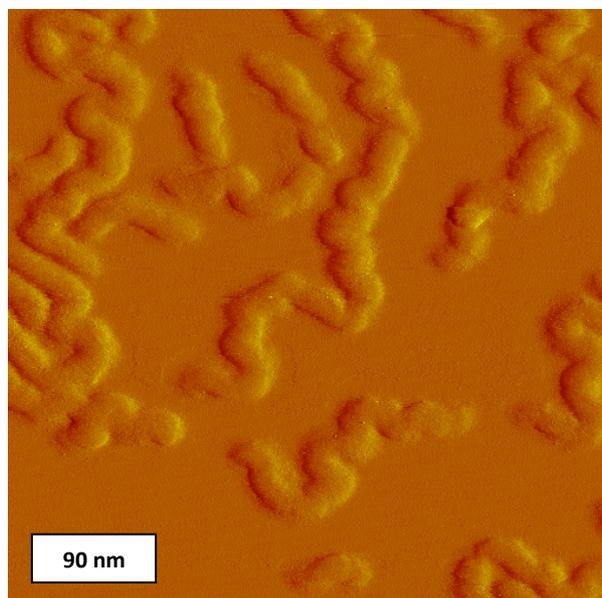


Abbildung 5.2.10: AFM-Aufnahme von Lys 25-1 in 0.005N NaBr auf Mica
 $c_{\text{Probe}}=0.01$ g/l; LM: 0.005N NaBr; Höhenbild

Wie auch im Fall der großen Poly-L-lysinbürste liegen diese Nanostrukturen überwiegend in einer gestreckten Form vor. Des Weiteren sind in Abbildung 5.2.10 wieder Ondulationen entlang der Zylinder zu erkennen, wie sie auch schon bei der großen Bürste (Lys 55-3) vorliegen.

Die Zugabe von Salz bewirkt auch in diesem Fall einen Verlust der gestreckten Form, zugunsten der Ausbildung von regelmäßig gekrümmten Strukturen (Abb. 5.2.11). Ob auch unter diesen Bedingungen die Ondulationen weiterhin vorliegen, konnte bei dieser Probe nicht festgestellt werden, weil es nicht möglich war, Vergrößerungen von Abbildung 5.2.11 zu erhalten.

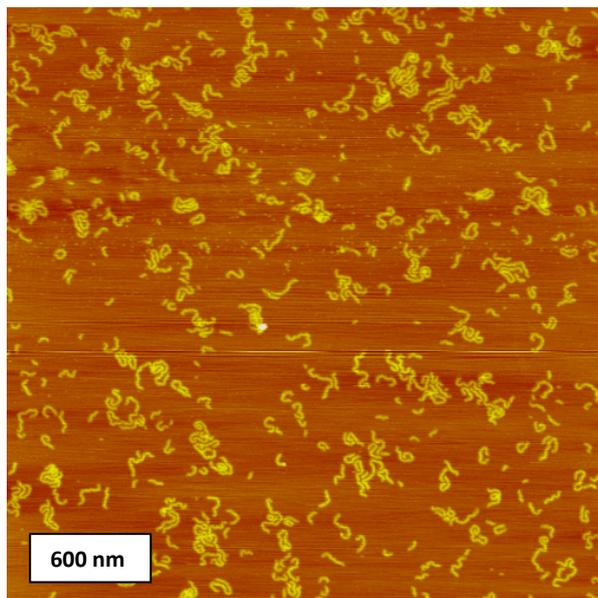


Abbildung 5.2.11: AFM-Aufnahme von Lys 25-1 in 0.5N NaClO₄ auf Mica
c_{Probe}=0.01 g/l; LM: 0.5N NaClO₄; Höhenbild

Im Gegensatz zur Probe Lys 55-3 konnten für diese Probe auch Abbildungen bei großen Salzkonzentration erlangt werden, in denen die Seitenketten der Poly-L-lysinbürste nicht in einer α -helikalen Struktur vorliegen (0.5 N NaBr-Lösung; Abb. 5.2.12).

Man kann deutlich erkennen, dass auch unter diesen Bedingungen ein Verlust der stäbchenförmigen Topologie eintritt. Dieses Ergebnis untermauert die Annahme, dass die Änderung der Topologie von zylinderförmigen Strukturen zur Ausbildung von eher sphärischen Nanopartikeln nichts mit der Änderung der Sekundärstruktur in den Seitenketten zu tun hat, sondern mit der Erhöhung der Ionenstärke des Lösungsmittels.

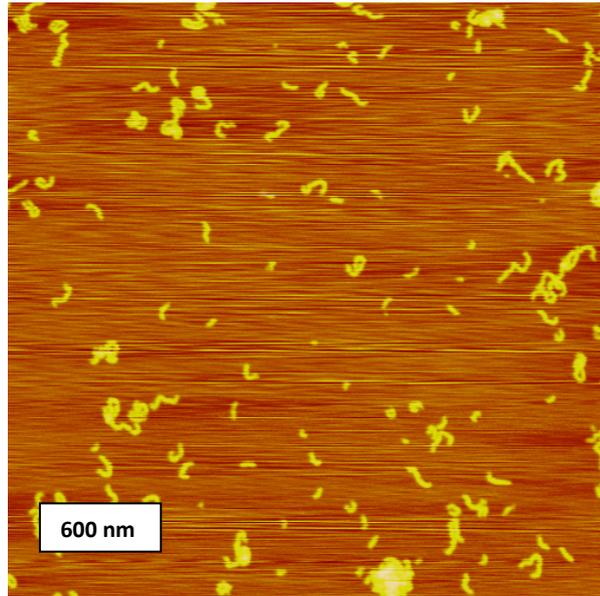


Abbildung 5.2.12: AFM-Aufnahme von Lys 25-1 in 0.5N NaBr auf Mica
 $c_{\text{Probe}}=0.01 \text{ g/l}$; LM: 0.5N NaBr; Höhenbild

5.3 Sekundärstrukturen von Poly-L-lysinbürsten durch Zugabe von Methanol

In Abbildung 5.3.1 sind die CD-Spektren der Probe Lys 55-3 in unterschiedlichen Wasser/Methanol-Mischungen zu sehen.

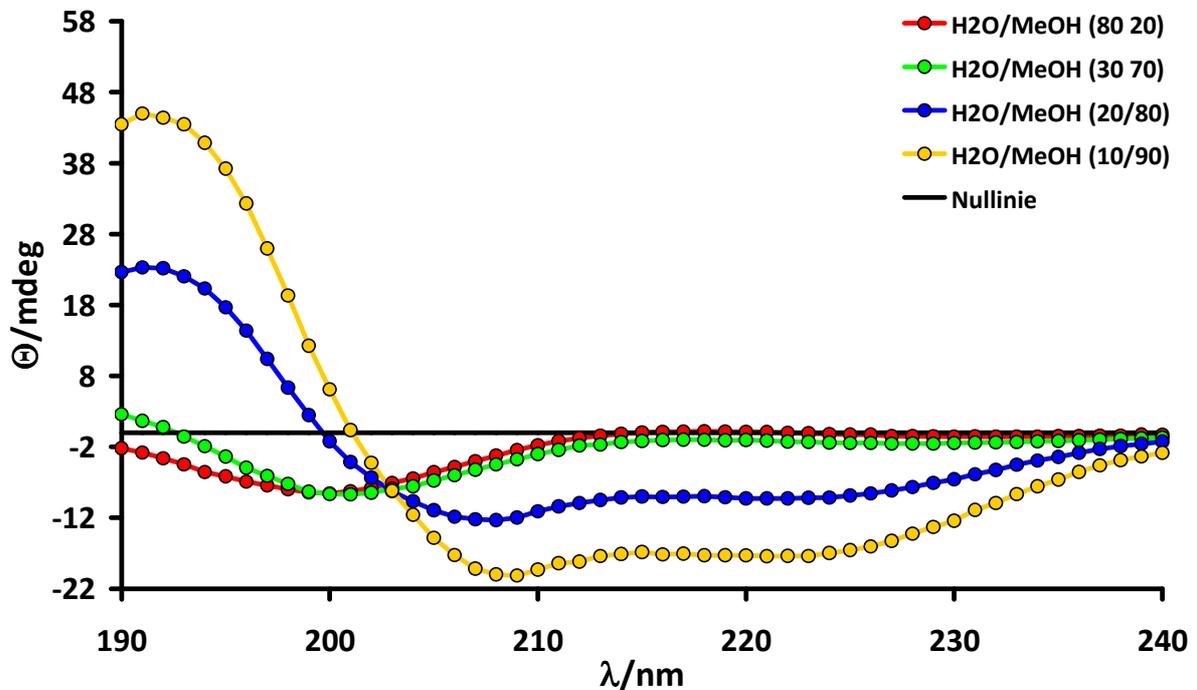


Abbildung 5.3.1: CD-Spektren von Lys 55-3 in verschiedenen Wasser/Methanol-Mischungen;
 $c=0.1 \text{ g/l}$; Küvettendicke: 1 mm;

Auffällig ist, dass es keinen kontinuierlichen Übergang vom flexiblen Knäuel zur α -helikalen Konformation gibt. Dies wurde schon von Scheraga und Mitarbeiter ^[3] bei linearem Poly-L-lysin festgestellt. Die Probe Lys 55-3 verhält sich also wie die korrespondierenden linearen Analoga.

Wie auch in Kapitel 5.2 wurden die CD-Spektren einer quantitativen Analyse unterzogen, um die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen zu ermitteln. Tabelle 5.3.1 zeigt die prozentualen Anteile von Lys 55-3 in verschiedenen Methanol/Wasser-Mischungen. In dieser Tabelle sind zusätzlich Ergebnisse für Lösungsmittelzusammensetzungen zu sehen, die nicht in Abbildung 5.3.1 gezeigt sind. Die Spektren sowie alle Simulationen können im Anhang nachgeschlagen werden.

Tabelle 5.3.1: Quantitative Bestimmung der Überstrukturen von Lys 25-1 in verschiedenen Wasser/Methanol-Mischungen

Probe	Lösungsmittel	α -Helix/%	β -Faltblatt/%	Turn/%	Ungeordnet/%
Lys 55-3	H ₂ O	3	25	20	52
Lys 55-3	H ₂ O/MeOH (90/10)	3	24	15	59
Lys 55-3	H ₂ O/MeOH (80/20)	2	24	18	54
Lys 55-3	H ₂ O/MeOH (70/30)	3	24	18	55
Lys 55-3	H ₂ O/MeOH (60/40)	4	27	19	49
Lys 55-3	H ₂ O/MeOH (50/50)	5	22	17	55
Lys 55-3	H ₂ O/MeOH (40/60)	7	22	17	53
Lys 55-3	H ₂ O/MeOH (30/70)	6	18	18	48
Lys 55-3	H ₂ O/MeOH (20/80)	78	6	6	8
Lys 55-3	H ₂ O/MeOH (10/90)	86	5	3	5

Auch die quantitative Analyse der CD-Spektren von Lys 55-3 in verschiedenen Wasser/Methanol Mischungen zeigt, dass bis zu einer Volumenfraktion von 70 % Methanol keine nennenswerten α -helikalen Strukturen in den Seitenketten der Bürste vorliegen. Gibt man allerdings über diesen Wert hinaus Methanol hinzu, kommt es schlagartig zur Ausbildung von Helices mit prozentualen Anteilen bezüglich der Gesamtkonformation von etwa 80 %.

Die kleine Poly-L-lysinbürste hingegen weicht von diesem Verhalten ab. (Abb. 5.3.2). Bei dieser Probe kommt es direkt zur Ausbildung von α -helikalen Strukturen, deren maximale Ausbildung schon bei einem Volumenanteil von 30 % Methanol erreicht ist. Gibt man noch mehr Methanol hinzu, nimmt der Anteil an helikaler Konformation ab und es kommt zusätzlich zur Ausbildung von β -Faltblattstrukturen (Abb. 5.3.2). Quantitativ wird dies auch noch mal in Tabelle 5.3.2 gezeigt, in der die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen in Abhängigkeit des Methanolanteils aufgelistet sind.

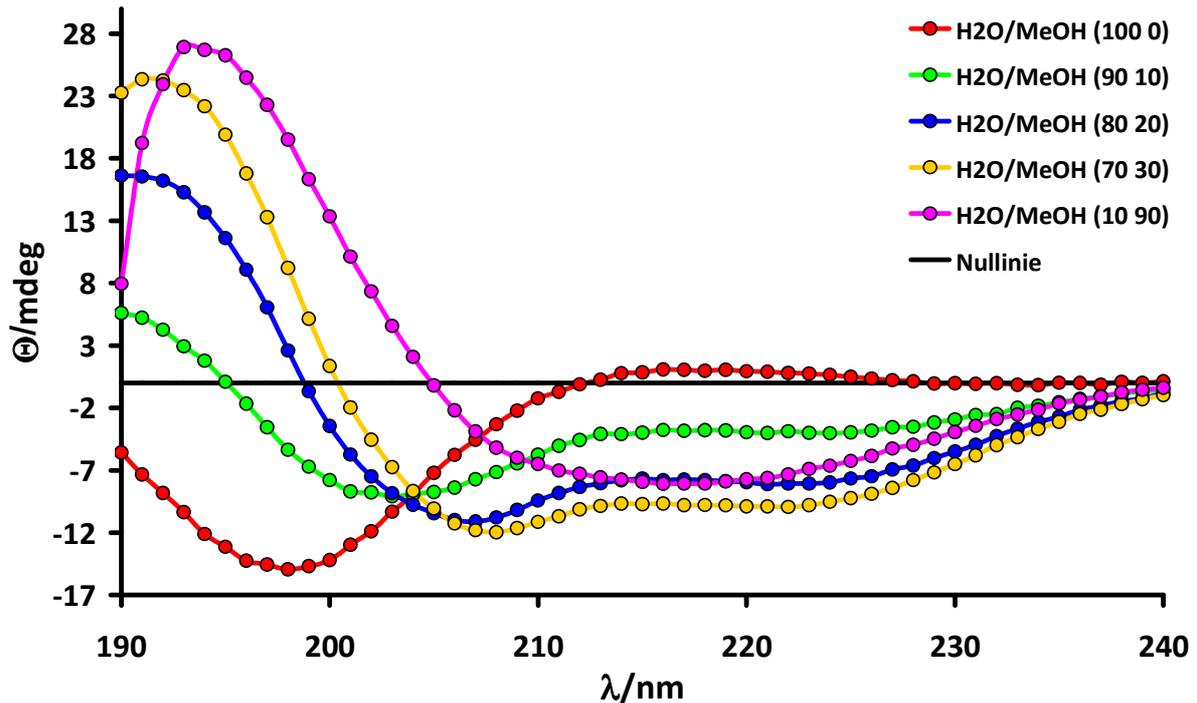


Abbildung 5.3.2: CD-Spektren von Lys 25-1 in verschiedenen Wasser/Methanol-Mischungen; $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm;

Tabelle 5.3.2: Quantitative Bestimmung der Überstrukturen von Lys 25-1 in verschiedenen Wasser/Methanol-Mischungen

Probe	Lösungsmittel	α -Helix/%	β -Faltblatt/%	Turn/%	Ungeordnet/%
Lys 25-1	H ₂ O/MeOH (90/10)	34	16	15	35
Lys 25-1	H ₂ O/MeOH (80/20)	62	10	7	21
Lys 25-1	H ₂ O/MeOH (70/30)	80	4	5	11
Lys 25-1	H ₂ O/MeOH (60/40)	64	10	11	15
Lys 25-1	H ₂ O/MeOH (50/50)	61	14	12	13
Lys 25-1	H ₂ O/MeOH (40/60)	58	16	9	17
Lys 25-1	H ₂ O/MeOH (30/70)	58	16	12	14
Lys 25-1	H ₂ O/MeOH (20/80)	57	20	8	15
Lys 25-1	H ₂ O/MeOH (10/90)	53	22	8	17

Vergleicht man die Ergebnisse von diesem Kapitel mit den Ergebnissen von Kapitel 5.1 sieht es so aus, dass das Sekundärstrukturverhalten von Poly-L-lysinbürsten zum einen abhängig von der Länge der Seitenketten ist, aber auch die Bedingungen zur Induzierung der Sekundärstruktur eine entscheidende Rolle spielt.

Poly-L-lysinbürsten mit langen Seitenketten verhalten sich wie ihre linearen Analoga, unabhängig ob die Sekundärstruktur durch die Zugabe von Methanol oder NaClO₄ induziert wird. Es kommt lediglich zur Ausbildung von helikalen Strukturen.

Bei der Poly-L-lysinbürste mit den kleinen Seitenketten hängt es von dem Lösungsmittel ab, ob ausschließlich Helices oder auch andere Sekundärstrukturen gebildet werden. Gibt man NaClO₄ zu den wässrigen Polymerlösungen, zeigen sie das gleiche Verhalten wie lineares

Poly-L-lysin. Wird Methanol zu den wässrigen Lösungen gegeben, tritt sofort die Bildung von Helices ein, was bei den linearen Strukturen erst durch die Zugabe von weit größeren Methanolkonzentrationen realisiert werden kann. Das Ergebnis für die Probe Lys 25-1 bezüglich der Zugabe von Methanol weicht somit stark von dem Verhalten der linearen Analoga ab, weil in diesem Fall helikale Strukturen von kurzen Seitenketten bei deutlich kleinerer Methanolfraction gebildet werden können als von langen Ketten. Des Weiteren können durch weitere Methanolzugabe auch β -Faltblätter zu einem geringen Anteil erzeugt werden, was ebenfalls im Widerspruch zu dem Verhalten von linearen Poly-L-lysinketten steht, da Taniguchi und Mitarbeiter gezeigt haben, dass ein α -Helix- β -Faltblatt-Übergang bei langen linearen Poly-L-lysinketten leichter stattfindet als bei kurzen Poly-L-lysinketten^[9]. Eine Begründung für das abweichende Verhalten der Probe Lys 25-1 kann bis zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben werden.

5.4 Bestimmung der Topologie von Poly-L-lysinbürsten im α -helikalen Zustand, induziert durch die Zugabe von Methanol

Wie auch bei der Zugabe von NaClO_4 konnten die Poly-L-lysinbürsten in Methanol/Wasser-Mischungen mit statischer und dynamischer Lichtstreuung vermessen werden. Es ist allerdings anzumerken, dass die Charakterisierung von einzelnen Molekülen mit Streumethoden nur in Methanol/Wasser-Mischungen mit hohem Methanolgehalt (≥ 90 Volumenprozent) durchführbar ist (Abb. 5.4.1).

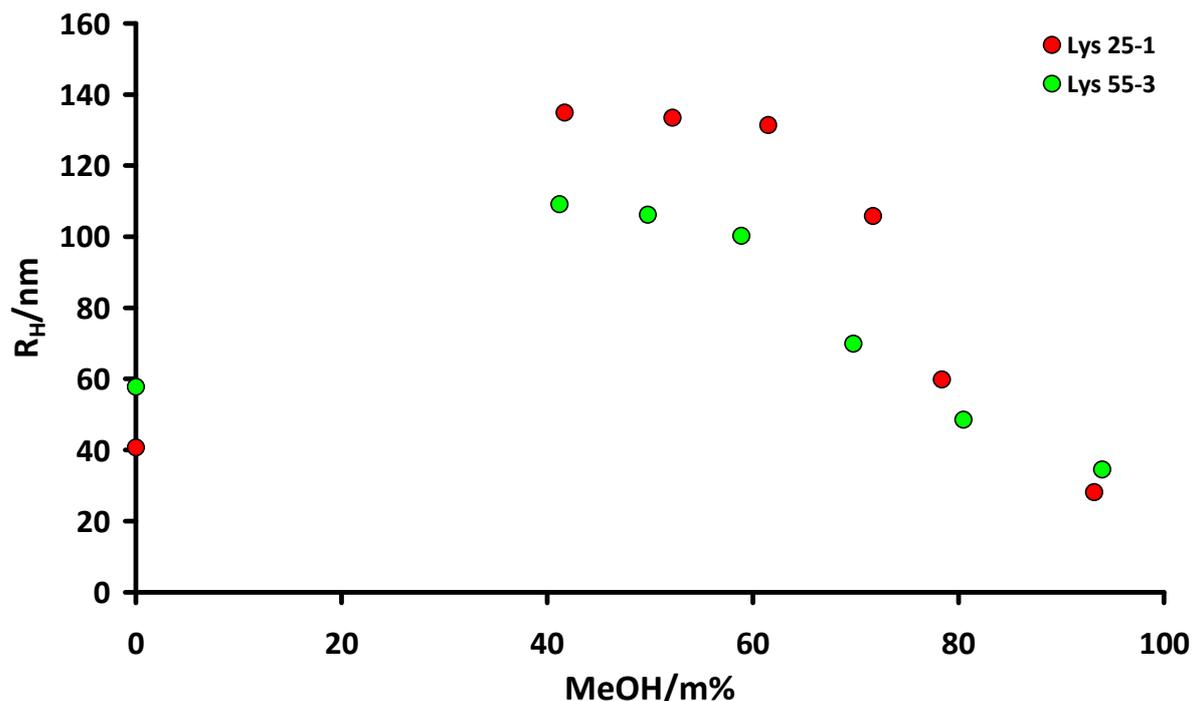


Abbildung 5.4.1: Hydrodynamische Radien von Lys 25-1 und Lys 55-3 in Abhängigkeit der $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ -Zusammensetzung

Bei anderen Methanol/Wasser-Zusammensetzungen aggregieren die Poly-L-lysinbürsten. Bewiesen wurde diese Tatsache durch Bestimmung der hydrodynamischen Radien bei verschiedenen Wasser/Methanol-Mischungen.

Im Bereich zwischen 0 und 40 m% Methanol ist es nicht möglich, die hydrodynamischen Radien zu ermitteln. Unterhalb von 40 m% Methanol wird in beiden Fällen ein sehr starker Anstieg der hydrodynamischen Radien detektiert. Eine Bestimmung der R_H 's kann aus diesem Grund nicht mehr durchgeführt werden, ohne Gefahr zu laufen, die Detektoren der Lichtstreuanlage ernsthaft zu beschädigen.

Die Analyse mittels dynamischer Lichtstreuung liefert keinen eindeutigen Beweis, ob die Bürsten in Methanol/Wasser-Mischungen mit einem Methanolanteil größer 90 m% aggregiert vorliegen oder nicht. Dieser Beweis kann jedoch durch die Messung von Zimplots unter den angesprochenen Bedingungen erbracht werden. Das Molekulargewicht der Bürsten sollte Auskunft darüber geben, ob Aggregate vorhanden sind oder nicht. Abbildung 5.4.2 und Abbildung 5.4.3 zeigen die Zimplots von Lys 55-3 und Lys 25-1 bei einem Methanolgehalt von 95 m%. Die Molekulargewichte beider Proben sind mit den Molekulargewichten in 0.5 N NaClO₄-Lösung vergleichbar. Es ist somit eindeutig, dass keine signifikante Fraktion an Aggregaten unter diesen Bedingungen vorhanden ist.

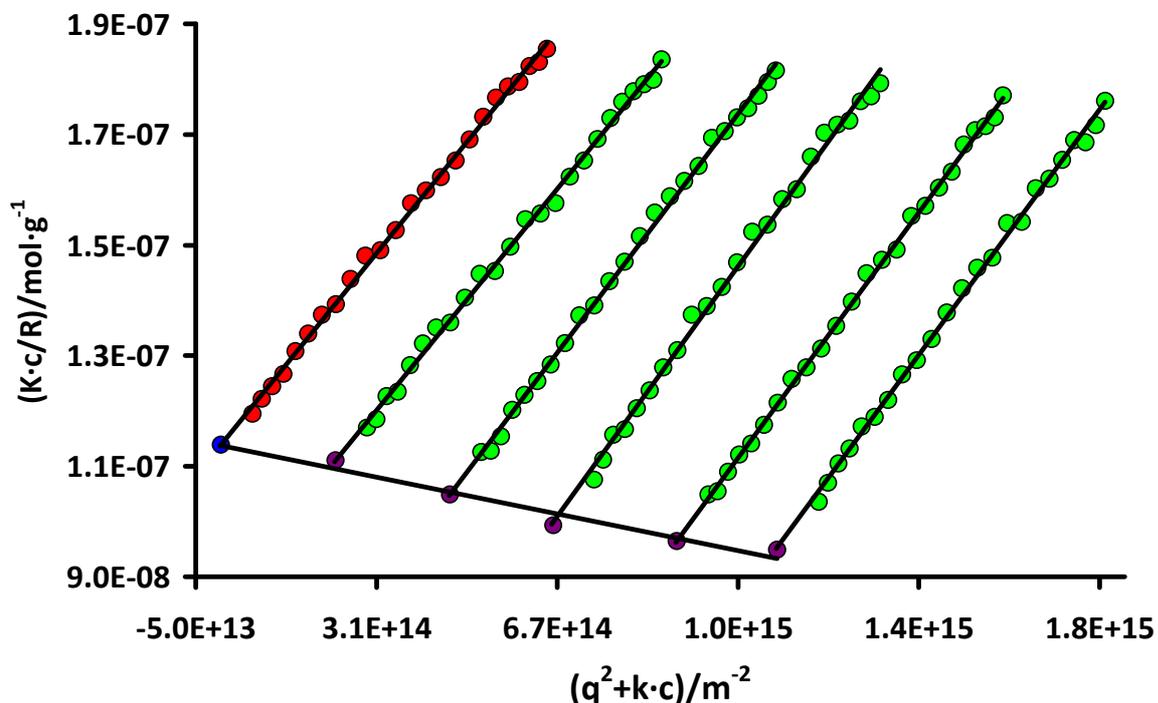


Abbildung 5.4.2: Zimplot von Z-Lys 55-3 in MeOH/H₂O (95:5) bei T=293K zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)

$c_1=5.624E-02$ g/l; $c_2=4.54E-02$ g/l; $c_3=3.40E-02$ g/l; $c_4=2.28E-02$ g/l; $c_5=1.14E-02$ g/l
 $M_w=8.78E06$ g/mol; $R_g=54.26$ nm; $A_2= -1.812E-07$ mol·dm³·g⁻²; $dn/dc=0.164$ cm³/g
 Salz: LiBr (5E-03 mol/l)

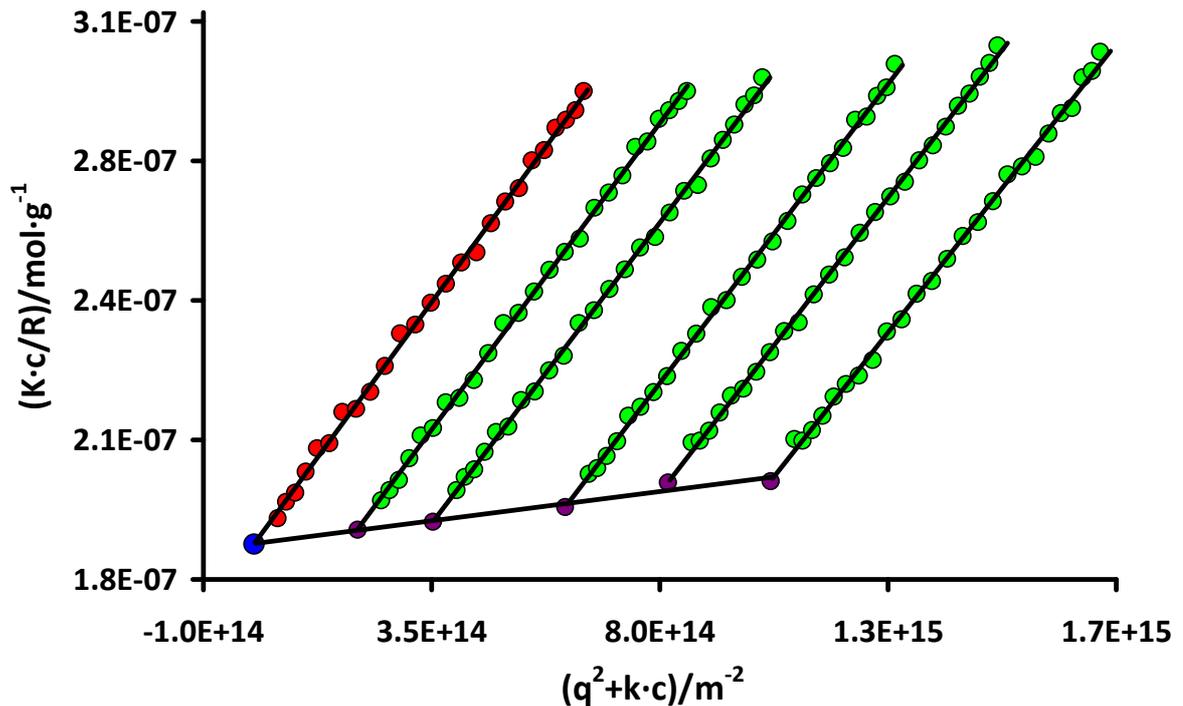


Abbildung 5.4.3: Zimmplot von Z-Lys 25-1 in MeOH/H₂O (95:5) bei T=293K zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=6.79E-02$ g/l; $c_2=5.44E-02$ g/l; $c_3=4.09E-02$ g/l; $c_4=2.35E-02$ g/l; $c_5=1.36E-02$ g/l
 $M_w=5.32E06$ g/mol; $R_g=50.20$ nm; $A_2= 1.122E-07$ mol·dm³·g⁻²; $dn/dc=0.164$ cm³/g
 Salz: LiBr (5E-03 mol/l)

Sehr ungewöhnlich sind die unterschiedlichen A_2 -Werte, die Lys 55-3 und Lys 25-1 unter den gleichen Bedingungen haben. Für Lys 55-3 scheint die Wasser/Methanol-Mischung ein sehr gutes Lösungsmittel zu sein, währenddessen es ein schlechtes Lösungsmittel für die große Poly-L-lysinbürste ist. Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung hingegen deuten auf das genaue Gegenteil, weil die Aggregationstendenz für die kleine Poly-L-lysinbürste größer zu sein scheint, als für die Probe Lys 55-3. Aus diesem Grund müssen weitere Experimente mit den Bürsten unter diesen Bedingungen durchgeführt werden, um das scheinbar widersprüchliche Verhalten erklären zu können.

Nichts desto trotz beweisen Abbildung 5.4.2 und 5.4.3 eindeutig, dass es auch bei der Zugabe von Methanol zur Induzierung der helikalen Sekundärstruktur in den Seitenketten der Trägheitsradius deutlich abnimmt.

Die Änderungen der hydrodynamischen Radien durch die Zugabe von Methanol sind verschieden im Vergleich zur Zugabe von NaClO₄ (Abb. 5.4.4 und Abb. 5.4.5).

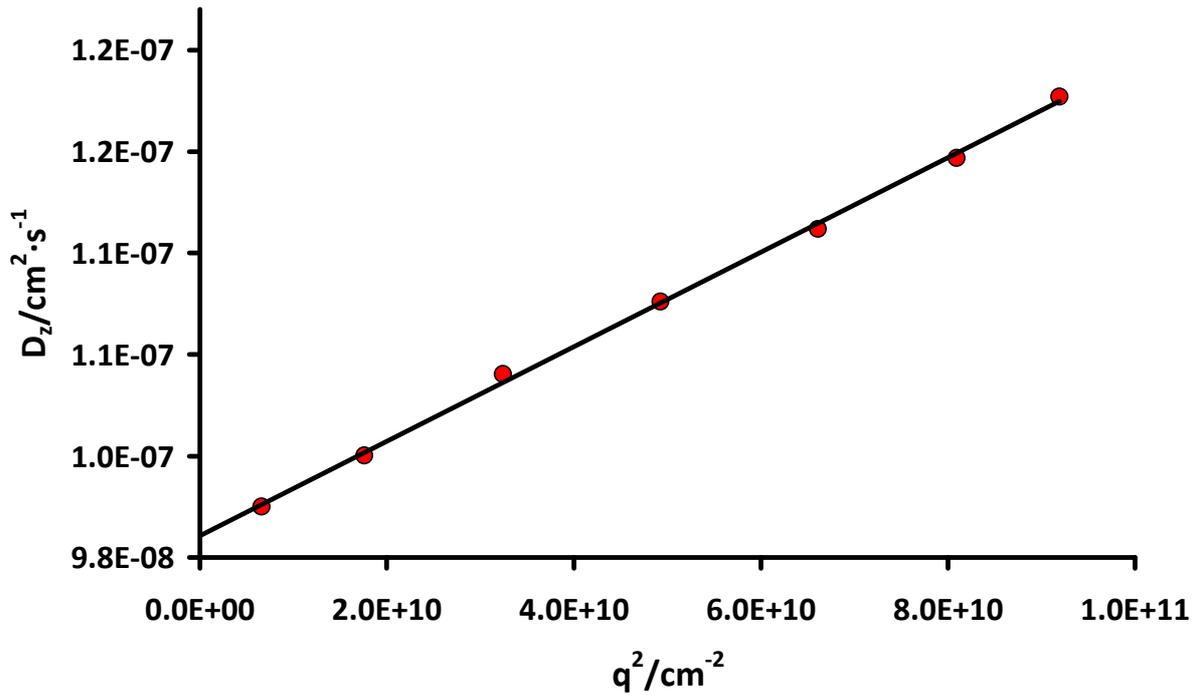


Abbildung 5.4.4: DLS von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (95:5) bei T=293K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)
*c=5.44E-02 g/l; $D_z=1.010E-07 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=0,770 \text{ cp}$; $R_H=28.1 \text{ nm}$
 Salz: LiBr (5E-03 mol/l)*

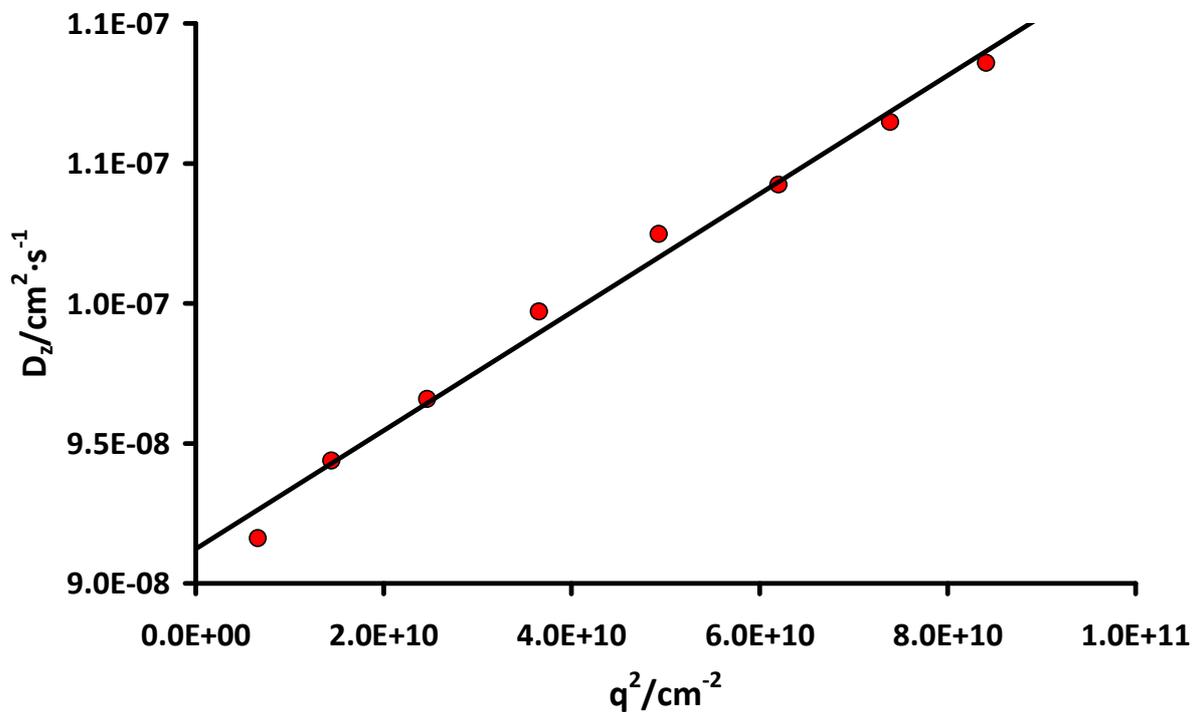


Abbildung 5.4.5: DLS von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (95:5) bei T=293K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)
*c=5.86E-02 g/l; $D_z=9.123E-08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=0,770 \text{ cp}$; $R_H=35.5 \text{ nm}$
 Salz: LiBr (5e-03 mol/l)*

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in 0.5 N NaClO₄-Lösung nehmen auch die hydrodynamischen Radien in Wasser/Methanol (95:5) stark ab. Tabelle 5.4.1 fasst die Ergebnisse der weiter oben gezeigten dynamischen und statischen Lichtstreuergebnisse noch einmal zusammen und vergleicht sie mit den Lichtstreuergebnissen von Kapitel 5.3 sowie den Lichtstreuergebnissen von Lys 25-1 und Lys 55-3 in niedrig konzentrierten Salzlösungen.

Tabelle 5.4.1: Zusammenfassung der Lichtstreuergebnisse von Lys 25-1 und Lys 55-3

Probe	LM	R_g /nm	R_H /nm	A_2 /mol·dm ³ ·g ⁻²	M_w /g·mol ⁻¹	ρ -Verh.	Struktur
Lys 25-1	0.005 N NaBr	75.9	42.2	1.09E-07	8.14E+06	1.80	Knäuel
Lys 25-1	MeOH/H ₂ O (95:5)	50.2	28.1	1.12E-07	5.32E+06	1.79	helikal
Lys 25-1	0.5 N NaClO ₄	56.4	37.1	-6.53E-08	5.01E+06	1.52	helikal
Lys 25-1	0.5 N NaBr	64.8	42.0	5.85E-08	6.90E+06	1.54	Knäuel
Lys 55-3	0.005 N NaBr	84.4	56.4	4.78E-08	9.95E+06	1.50	Knäuel
Lys 55-3	MeOH/H ₂ O (95:5)	54.2	35.5	-1.81E-07	8.68E+06	1.53	helikal
Lys 55-3	0.5 N NaClO ₄	49.0	38.4	1.29E-08	8.13E+06	1.28	helikal
Lys 55-3	0.5 N NaCl	60.4	44.8	7.73E-09	8.86E+06	1.35	Knäuel

Anhand der Ergebnisse in dieser Tabelle ist eindeutig erkennbar, dass die Krümmung der Bürsten zu regelmäßig gekrümmten Strukturen nicht mit dem Anteil helikaler Konformationen in den Seitenketten korrelierbar ist.

Daraus folgt, dass primär die Erhöhung der Ionenstärke im System dafür sorgt, dass der R_H nur relativ wenig abnimmt bei gleichzeitig starker Abnahme von R_g . Dies ist qualitativ dadurch erklärbar, dass sich die Bürsten zu gekrümmten Strukturen zusammenrollen, unabhängig davon ob sich die Seitenketten in einer helikalen Konformation befinden oder nicht.

Die AFM-Bilder beider Proben in Methanol/Wasser (95:5) zeigen keine regelmäßig gekrümmten Strukturen (Abb. 5.4.6 und 5.4.7). In diesem Fall liegen die Seitenketten der Bürsten in einer helikalen Konformation vor, sind aber weiterhin gestreckt. Sie bestätigen somit das Ergebnis der Lichtstreuung unter diesen Bedingungen, welches besagt dass sich aufgrund des konstanten ρ -Verhältnisses die Topologie der Bürste unverändert bleibt.

Die geringen Radien für die Proben Lys 25-1 und Lys 55-3 in Methanol/Wasser (95:5) sind nur durch eine Verringerung der Konturlänge oder durch eine Erhöhung der Flexibilität der zylindrischen Bürsten zu erklären.

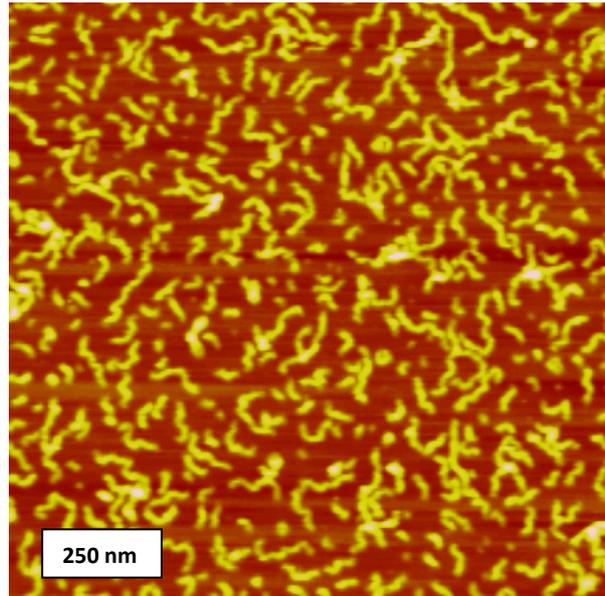


Abbildung 5.4.6: AFM-Aufnahme von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (95:5); 5e-03 M LiBr auf Mica
 $c_{\text{Probe}}=0.01$ g/l; LM: MeOH/H₂O (95:5); 5e-03 M LiBr; Höhenbild

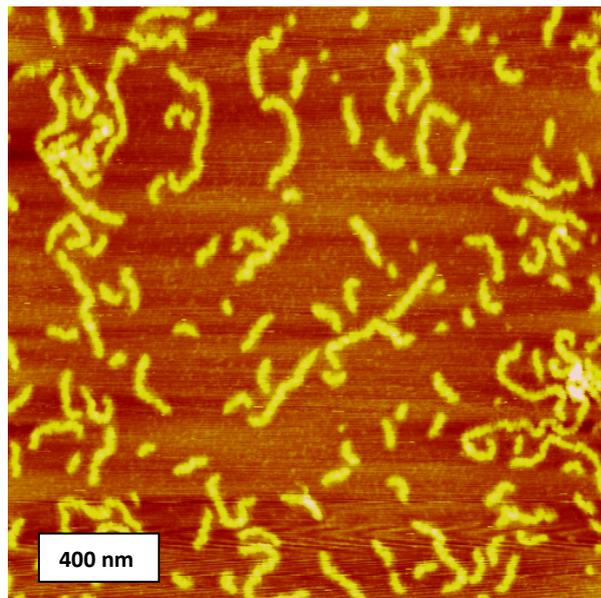


Abbildung 5.4.7: AFM-Aufnahme von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (95:5); 5e-03 M LiBr auf Mica
 $c_{\text{Probe}}=0.01$ g/l; LM: MeOH/H₂O (95:5); 5e-03 M LiBr; Höhenbild

Durch Vergrößerung von Abbildung 5.4.7 (Abb. 5.4.8) kann gezeigt werden, dass die schon angesprochenen Ondulationen auch unter diesen Bedingungen weiterhin vorhanden sind. Für die sehr schwierig zu messende Probe Lys 25-1 in MeOH/Wasser (95:5) konnten bisher keine vergrößerten Aufnahmen mit akzeptabler Qualität erhalten werden, so dass das Ausmaß der Ondulationen nicht detektierbar ist.

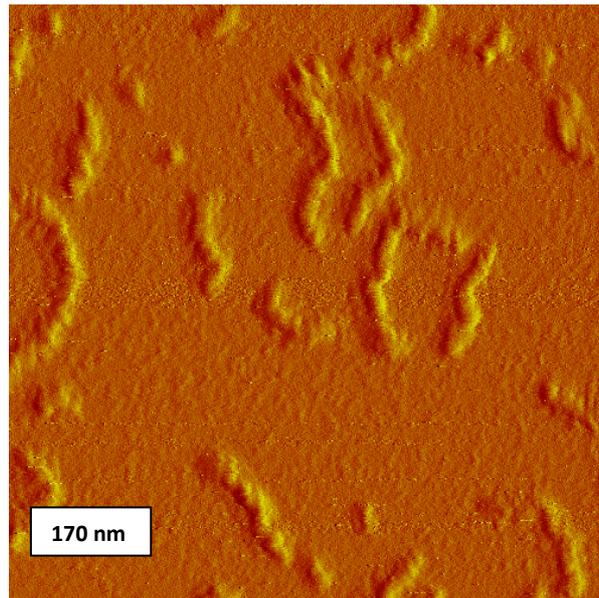


Abbildung 5.4.8: AFM-Aufnahme von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (95:5); 5e-03 M LiBr auf Mica
 $c_{\text{Probe}}=0.01$ g/l; LM: MeOH/H₂O (95:5); 5e-03 M LiBr; Amplitudenbild

5.5 Änderung der Querschnittsträgheitsradien der Bürsten durch die helikale Konformation der Seitenketten

Wie in Kapitel 5.3 und 5.4 gezeigt, hat die helikale Konformation der Seitenketten keinen Einfluss auf die Konformation des Rückgrats. Lediglich bei der Induzierung der helikalen Strukturen mit NaClO₄ ändert sich die Topologie der Polymere, was allerdings nicht mit der helikalen Konformation der Seitenketten korrelierbar ist, sondern auf die Erhöhung der Ionenstärke im System zurückgeführt werden muss.

Durch die Bestimmung des Querschnittsträgheitsradius ($R_{g,c}$) mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) kann jedoch gezeigt werden, dass sich die Querschnittsträgheitsradien der Bürsten verkleinern, wenn die Seitenketten in eine helikale Konformation gezwungen werden.

Die Abbildungen 5.5.1 und 5.5.2 zeigen die $R_{g,c}$'s der Proben Lys 25-1 und Lys 55-3 unter den selben Bedingungen, die auch für die anderen Analysetechniken (SLS, DLS, AFM, CD-Spektroskopie) verwendet wurden.

Die $R_{g,c}$'s in Methanol/Wasser (95:5) konnten mit der Röntgenkleinwinkelstreuung nicht bestimmt werden, weil für die Präparation dieser Lösungen die Bürste zunächst in reinem Wasser gelöst werden muss, bevor die Zugabe von Methanol erfolgt. Die Probenkonzentration für die SAXS-Messungen beträgt 1 g/l. Das heißt, dass eine wässrige Lösung von 20 g/l hergestellt werden muss, um eine Probe mit einer Konzentration von 1 g/l in Methanol/Wasser (95:5) zu erhalten. Aufgrund der komplizierten Synthese der

Poly-L-lysinbürsten konnten die benötigten Mengen an Probe nicht aufgebracht werden, um eine so hochkonzentrierte wässrige Lösung herzustellen.

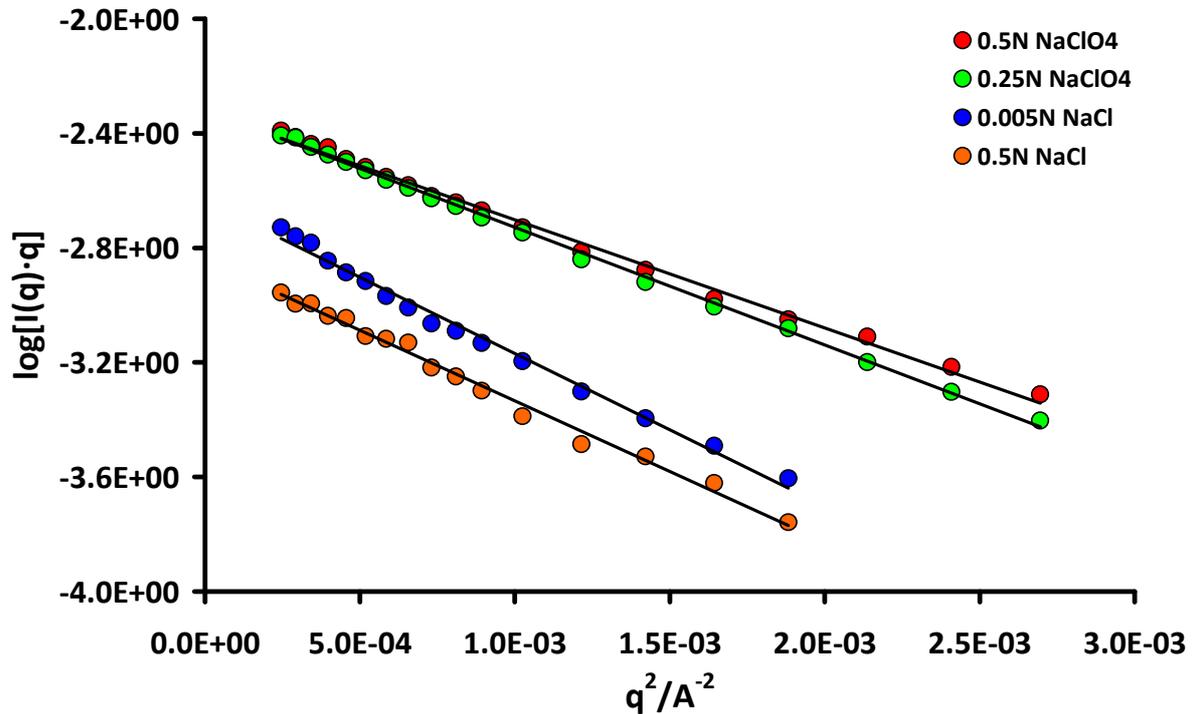


Abbildung 5.5.1: $R_{g,c}$'s der Probe Lys 25-1 unter verschiedenen Bedingungen; $c_{\text{Proben}}=1\text{g/l}$; $T=293\text{ K}$

$R_{g,c}$ (0.005 N NaCl) = 3.26 nm (random-coil-Konformation);

$R_{g,c}$ (0.5 N NaBr) = 3.14 nm (random-coil-Konformation);

$R_{g,c}$ (0.25 N NaClO₄) = 2.86 nm (Übergangsbereich);

$R_{g,c}$ (0.5 N NaClO₄) = 2.74 nm (helikale Konformaton)

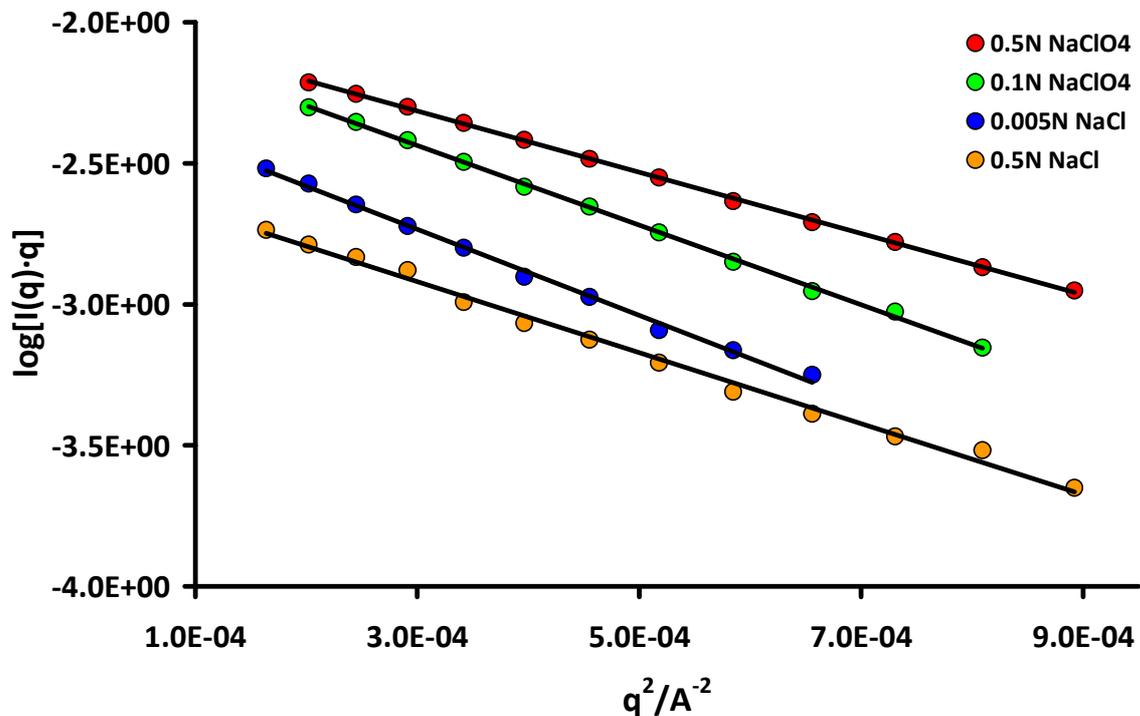


Abbildung 5.5.2: $R_{g,c}$'s der Probe Lys 55-3 unter verschiedenen Bedingungen; $c_{\text{Proben}}=1\text{g/l}$; $T=293\text{ K}$

$R_{g,c}$ (0.005 N NaCl) = 5.52 nm (random-coil-Konformation);

$R_{g,c}$ (0.5 N NaCl) = 5.02 nm (random-coil-Konformation);

$R_{g,c}$ (0.1 N NaClO₄) = 5.32 nm (Übergangsbereich);

$R_{g,c}$ (0.5 N NaClO₄) = 4.66 nm (helikale Konformaton)

Die SAXS-Resultate werden auch durch cross-section-Analyse der schon in Kapitel 5.4 gezeigten AFM-Bilder bestätigt. Mit dieser Analysemethode ist es möglich, den Querschnitt der Bürsten zu bestimmen. In diesem Fall ist es auch möglich, Ergebnisse in Methanol/Wasser-Mischungen zu erhalten, weil die benötigte Probenmenge für diese Messungen sehr gering ist. Die Tabelle 5.5.1 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse für diese Analyse. Man erkennt eindeutig bei beiden Proben, dass in der helikalen Konformation der Seitenketten die Querschnitte um mindestens 25 % abnehmen. Die Bilder welche für die cross-section-Analyse verwendet wurden, können im Anhang nachgeschlagen werden.

Tabelle 5.5.1: Querschnitt und Höhendurchmesser von Lys 25-1 und Lys 55-3 durch cross-section-Analyse in der helikalen- und random-coil-Konformation

Probe	LM	Querschnitt/nm	Höhendurchmesser/nm	Struktur
Lys 55-3	0.005 N NaBr	61.8	5.4	Knäuel
Lys 55-3	0.5 N NaClO ₄	31.8	2.9	helikal
Lys 55-3	MeOH/H ₂ O (95:5)	46.6	2.5	helikal
Lys 25-1	0.005 N NaBr	38.8	4.4	Knäuel
Lys 25-1	0.5 N NaClO ₄	27.2	1.5	helikal
Lys 25-1	MeOH/H ₂ O (95:5)	16.9	2.8	helikal
Lys 25-1	0.5 N NaBr	37.6	2.2	Knäuel

Die Auswirkung des Knäuel-Helix-Übergangs der Seitenketten auf die Querschnittsdimension der zylindrischen Struktur ist nicht ganz eindeutig vorherzusagen. Zum einem verringert sich die Länge der Helix deutlich im Vergleich zu der Konturlänge der Knäuelstruktur (0.15 nm pro Wiederholungseinheit für die Helix; 0.375 nm pro Wiederholungseinheit für das flexible Knäuel), zum anderen ist der mittlere Fadenendenabstand einer stäbchenförmigen Helix mit $\langle R^2 \rangle_{Helix}^{0.5} = L_{Helix}$ deutlich größer als der eines Knäuels $\langle R^2 \rangle_{Knäuel}^2 = I_k^{0.5} \cdot L_{Knäuel}^{0.5}$. Für 55 Wiederholungseinheiten ergibt sich $\langle R^2 \rangle_{Helix}^{0.5} = 8.25$ nm im Vergleich zu $\langle R^2 \rangle_{Knäuel}^{0.5} = 9.42$ nm für das Knäuel, wenn die Kuhnlänge der Knäuelstruktur zu $I_k=2$ nm abgeschätzt wird. In dieser Rechnung bleibt aber unberücksichtigt, dass durch die sterische Wechselwirkung der dicht gepropften Seitenketten die Knäulexpansion deutlich größer ist, als im Fall des ideal flexiblen Knäuels und dadurch die Kuhnlängen deutlich größere Werte annehmen. Deshalb sollte der Querschnittsradius der Knäuelstruktur größer sein als der der Helix in qualitativer Übereinstimmung mit den gemessenen Werten.

Weiterhin ist für beide Messmethoden (AFM und SAXS) zu erkennen, dass die Probe Lys 55-3 einen größeren Querschnitt besitzt als die Probe Lys 25-1. Ein weiterer Beweis,

dass die in diesem Kapitel untersuchten Proben in der Tat unterschiedlich lange Seitenketten besitzen, was auch schon durch Lichtstremessungen und CD-spektroskopische Analysen bewiesen worden ist.

Neben der Bestimmung der horizontalen Durchmesser durch cross-section-Analyse von AFM-Bildern kann auch die Konturlänge der Bürsten ausgemessen werden. Tabelle 5.5.2 zeigt eine Zusammenfassung bezüglich der Konturlänge für die Proben Lys 25-1 und Lys 55-3. Wie schon in Kapitel 4.2 gezeigt, besteht das Rückgrat der Bürsten aus etwa 900 Monomereinheiten. Jede dieser Monomereinheiten besitzt eine Konturlänge von 0.25 nm. Die mittlere Konturlänge des Rückgrats muss somit 225 nm betragen. Bei dieser Länge handelt es sich allerdings um ein Massenmittel, weil die Anzahl der Monomereinheiten des Rückgrats durch das Molekulargewicht aus der statischen Lichtstreuung des Makroinitiatorprecursors bestimmt worden ist. Um diesen Wert mit den Werten in Tabelle 5.5.2 zu vergleichen, muss die mittlere Konturlänge des Rückgrats durch die dazugehörige Polydispersität (1.5) geteilt werden, da es sich bei den Tabellenwerten um Zahlenmittelwerte handelt. Das Zahlenmittel der Konturlänge des Rückgrats hat somit einen Wert von 150 nm.

Tabelle 5.5.2: Konturlängen von Lys 25-1 und Lys 55-3 bei unterschiedlichen Bedingungen durch Auszählung von AFM-Bildern in Lösung

Probe	LM	Konturlänge/nm	Anzahl der ausgezählten Bürsten
Lys 55-3	0.005 N NaBr	181.0	309
Lys 55-3	0.5 N NaClO ₄	159.8	245
Lys 55-3	MeOH/H ₂ O (95:5)	45.1	587
Lys 25-1	0.005 N NaBr	149.0	276
Lys 25-1	0.5 N NaClO ₄	149.0	359
Lys 25-1	MeOH/H ₂ O (95:5)	76.1	217
Lys 25-1	0.5 N NaBr	126.1	84

Zieht man den Mittelwert aus den durchschnittlichen Konturlängen der Probe Lys 25-1 (unter Vernachlässigung der MeOH/Wasser-Messung), erhält man einen Wert von 141 nm, der nur um 6 % Prozent von der Konturlänge aus der statischen Lichtstreuung abweicht.

Für die Probe Lys 55-3 ergeben sich ähnliche Werte, wenn man auch in diesem Fall die Wasser/Methanol-Mischung vernachlässigt. Der Mittelwert von 170 nm ist ein wenig größer als für die Probe Lys 25-1, was zum einen durch Fraktionierungseffekte während der Synthese erklärt werden kann und/oder durch die längeren Seitenketten dieser Bürste im Vergleich mit der Probe Lys 25-1.

Trotz dieser Abweichungen ist jedoch eindeutig zu erkennen, dass bezüglich der Konturlänge die AFM- und Lichtstremessungen ein übereinstimmendes Ergebnis im Rahmen des Fehlers liefern.

5.6 Berechnung der Kuhlänge von Poly-L-lysinbürsten auf Basis des Wurmkettenmodells von Kratky und Porod

Die Kuhlänge von zylindrischen Polymeren können nach dem Wurmkettenmodell von Kratky und Porod berechnet werden ^[10-11].

Dieses Modell kann nicht auf die Poly-L-lysinbürsten in Lösungsmitteln mit hoher Ionenstärke angewandt werden, weil unter diesen Bedingungen keine statistische Krümmung der Bürsten mehr vorliegt. Aus diesem Grund wurden die Kalkulationen nur auf die Poly-L-lysinproben angewandt, bei denen weiterhin eine stäbchenförmige Topologie vorliegt.

Die Berechnungen wurden mit einem von Prof. Dr. Manfred Schmidt eigens entworfenen Programm durchgeführt ^[12]. Bei diesen Kalkulationen wurden die Konturlängen (L_w) vorgegeben und die Durchmesser (D), sowie die Kuhlängen (l_k) der Bürsten solange variiert, bis die berechneten R_g 's bzw. R_H 's mit den experimentell bestimmten Werten übereinstimmten. Für die Polydispersität wurde ein Wert von 1.5 angenommen. Tabelle 5.6.1 zeigt die Auflistung der Ergebnisse für beide Poly-L-lysinbürsten sowie der geschützten Precursor.

Tabelle 5.6.1: Kuhlängen der geschützten und entschützten Poly-L-lysinbürsten

Probe	LM	L_w/nm	D/nm	l_k/nm	$R_{g,ger.}/nm$	$R_{H,ger.}/nm$	$R_{g,exp.}/nm$	$R_{H,exp.}/nm$
Z-Lys 55-3	HFIP	225	30	400	80.3	46.0	79.9	47.7
Lys 55-3	0.005 N NaBr	225	50	600	84.8	57.3	84.4	56.4
Lys 55-3	MeOH/H ₂ O (95:5)	225	20	85	54.4	35.0	54.2	35.5
Z-Lys 25-1	HFIP	225	20	180	68.2	38.3	68.9	39.1
Lys 25-1	0.005 N NaBr	225	20	300	76.4	39.5	75.9	42.2
Lys 25-1	MeOH/H ₂ O (95:5)	225	10	70	50.7	28.3	50.2	28.1

Anhand der Kuhlängen erkennt man, dass es sich bei den Poly-L-lysinbürsten und den geschützten Precursor um äußerst kettensteife zylinderförmige Nanostrukturen handelt. Eine Ausnahme stellen die Messungen der entschützten Bürsten in Methanol/Wasser dar, wobei sich bei diesen Rechnungen die Frage stellt, ob die richtigen Konturlängen vorgegeben wurden. Die AFM-Bilder der Poly-L-lysinbürsten geben Hinweise darauf, dass unter diesen Bedingungen die Konturlänge der Bürsten kleiner wird. Würde man bei den Rechnungen eine kleinere Konturlänge vorgeben, hätte dies zur Folge, dass die Kuhlänge größer werden würde, womit die Poly-L-lysinbürsten in Methanol/Wasser dem gleichen Trend folgen würden, wie die restlichen Proben. Aus diesem Grund stellt sich bei den Poly-L-lysinproben in Methanol/Wasser die Frage, ob die Bürsten wirklich an Flexibilität gewinnen oder ob sich ihre Konturlängen in diesem Lösungsmittel verkleinern und die Kettensteifigkeit unter diesen Bedingungen keine Änderung aufweist. Eine endgültige Klärung kann an dieser Stelle nicht gegeben werden. Es müssen weitere AFM-Bilder der Proben in Methanol/Wasser

aufgenommen werden, um die Konturlänge genau zu bestimmen, damit diese Problemstellung beantwortet werden kann.

Neben diesen Informationen erhält man aus dem Vergleich der Kuhlängen für die Proben mit den kurzen bzw. langen Seitenketten die Erkenntnis, dass die Kettensteifigkeit mit der Seitenkettenlänge zunimmt, was zu erwarten ist, da mit zunehmender Länge die repulsiven Kräfte entlang des Rückgrats stärker werden.

Für die große Poly-L-lysinbürste ist zudem der Durchmesser im entschützten Zustand wesentlich größer als für den korrespondierenden Precursor. Der Grund hierfür liegt in der elektrostatischen Abstoßung der positiven Ladungen, die den Durchmesser im Vergleich zum Precursor vergrößert. Weiterhin sollte beachtet werden, dass die vorgegebene Konturlänge von Lys 55-3 ($L_w=225$ nm) möglicherweise ein wenig zu klein gewählt worden ist. Hinweise für diese Annahme liefern die AFM-Bilder dieser Probe, bei der die Konturlängenauswertung ein L_n von 180 nm ergab, was einem L_w von 270 nm entspricht. Dieser Wert weicht um 55 nm von der Konturlänge ab, die durch die statische Lichtstreuung des Makroinitiatorprecursors ermittelt worden ist. Der Grund für diesen Unterschied liegt höchstwahrscheinlich in der zusätzlichen Ausdehnung der Seitenketten am Ende der Bürste, die bei der Konturlänge des Makroinitiatorprecursors nicht berücksichtigt ist. Würde man die Rechnung für die Probe Lys 55-3 mit dem Massenmittel der Konturlänge aus den AFM-Bildern durchführen, würde sich der Durchmesser auf etwa Werte von 40 bis 45 nm verkleinern. Bei der kleinen entschützten Bürsten bzw. deren Precursor ist dieser Effekt nicht zu beobachten, weil die Länge der Seitenketten wesentlich kleiner ist und dadurch die elektrostatische Abstoßung der positiven Ladungen den Durchmesser kaum beeinflusst.

5.7 Zusammenfassung von Kapitel 5

Durch die Zugabe von NaClO_4 zu den wässrigen Lösungen der Poly-L-lysinbürsten (Lys 55-3 und Lys 25-1) konnte mittels CD-Spektroskopie bewiesen werden, dass die Seitenketten von einer ungeordneten Konformation in eine α -helikale Konformation übergehen. Die Konformationsänderung fand dabei umso leichter statt, je länger die Seitenketten der Bürsten waren. Eine Analyse der Poly-L-lysinbürsten in einer 0.5 N NaClO_4 -Lösung durch Rasterkraftmikroskopie, statischer Lichtstreuung und dynamischer Lichtstreuung zeigte, dass die Bürsten unter diesen Bedingungen ihre stäbchenförmige Topologie verlieren und die Form von regelmäßig gekrümmten Nanoobjekten annehmen.

Durch Vergleichsmessungen der Poly-L-lysinbürsten in Lösungsmitteln gleicher Ionenstärke, die jedoch keine helikalen Konformationen induzieren können, wurde zweifelsfrei bewiesen, dass die Entstehung der regelmäßig gekrümmten Strukturen nichts mit der Konformationsänderung der Seitenketten zu tun hat, sondern das vielmehr die große Ionenstärke der hochkonzentrierten Salzlösungen für die Änderung der Topologie verantwortlich ist.

Die Konformationsänderung der Seitenketten in NaClO_4 -Lösungen sorgt lediglich dafür, dass sich der Querschnitt der Bürsten (ermittelt durch cross-section-Analyse der AFM-Bilder in Lösung) drastisch verkleinert. Untermuert wurde dieses Ergebnis zusätzlich durch die Ermittlung der Querschnittsträgheitsradien. Durch SAXS-Messungen konnte festgestellt werden, dass die Querschnittsträgheitsradien der Poly-L-lysinbürsten in 0.5 N NaClO_4 -Lösung kleiner sind, als in Lösungsmitteln die keine α -helikale Sekundärstruktur induzieren können.

Neben der Änderung der Seitenkettenkonformation durch Zugabe von NaClO_4 konnte auch durch Mischen der wässrigen Polymerlösungen mit Methanol α -helikale Sekundärstrukturen in den Seitenketten der Lysinbürsten induziert werden. Das Sekundärstrukturverhalten der Seitenketten weicht unter diesen Bedingungen stark von dem Sekundärstrukturverhalten der freien linearen Analoga ab. Mittels CD-Spektroskopie wurde gezeigt, dass die kürzeren Seitenketten leichter α -Helices ausbilden als die langen Seitenketten, was im Widerspruch zum Sekundärstrukturverhalten von linearen Poly-L-lysinen steht.

Des Weiteren war es bei der Bürste mit den kürzeren Seitenketten möglich, zu einem geringen Anteil β -Faltblatt Strukturen zu erzeugen, die bei linearen Poly-L-lysinbürsten durch Zugabe von Methanol nicht induziert werden können.

Die Topologie- und Größenbestimmung der Poly-L-lysinbürsten in Methanol/Wasser-Mischungen erfolgte bis auf die SAXS-Messungen mit den gleichen Methoden wie bei der Induzierung der α -helikalen Seitenkettenkonformation durch die Zugabe von NaClO_4 . Auch in diesem Fall wurde festgestellt, dass die Änderung der Sekundärstruktur die stäbchenförmige Topologie der Bürsten nicht ändert, die Querschnitte sich allerdings stark verkleinern.

Zusätzlich zur Ermittlung der Querschnitte konnten die AFM-Bilder verwendet werden, um das Ergebnis der Konturlänge (ermittelt durch statische Lichtstreuung) zu bestätigen.

Durch die Anpassung der Lichtstreuergenergebnisse an die Wurmketten-Theorie von Kratky und Porod war es außerdem möglich, die Kuhlängen der Bürsten abzuschätzen. Sie belaufen sich auf mehrere hundert Nanometer und nehmen mit steigender Seitenkettenlänge zu.

Literatur zu Kapitel 5:

- [1] N. Gunari, Y. Cong, B. Zhang, K. Fischer, A. Janshoff, M. Schmidt; *Macromol. Rapid Commun.*, **29**, 821 (2009)
- [2] Y. P. Myer; *Macromolecules*, **2**, 624 (1969)
- [3] R. F. Epand, H. A. Scheraga; *Biopolymers*, **6**, 1383 (1968)
- [4] Ch. Ebert, G. Ebert; *Colloid & Polymer Sci.*, **255**, 1041 (1977)
- [5] L. Whitmore, and B. A. Wallace; *Biopolymers*, **89**, 392 (2008)
- [6] L. Whitmore, and B. A. Wallace; *Nucleic Acids Research*, **32**, 668 (2004)
- [7] K.E. van Holde, W. C. Johnson, P. S. Ho; *Principles of Physical Biochemistry*, Pearson Education, New York (2006)
- [8] S. Y. M. Lau, A. K. Taneja, and R. S. Hodges; *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 13253 (1984)
- [9] W. Dzwolak, T. Muraki, M. Kato, Y. Taniguchi; *Biopolymers*, **73**, 463 (2004)
- [10] O. Kratky, G. Porod; *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **68**, 1106 (1949)
- [11] H. E. Daniels; *Proc.-R. Soc. Edinburgh, Sect. A: Math., Phys. Sci.*, **63**, 290 (1952)
- [12] M. Schmidt; *Macromolecules*, **17**, 553 (1984)

Kapitel 6: Bestimmung der effektiven Ladung von Poly-L-lysinbürsten

Aufgrund der Ergebnisse von Kapitel 5 konzentriert sich dieser Abschnitt nur auf die Bestimmung der effektiven Ladung von linearem und verzweigten Poly-L-lysin, weil lediglich die Poly-L-lysinbürsten ohne nennenswerte lineare Verunreinigungen hergestellt werden konnten.

Die Kapillarelektrophorese kann nicht nur verwendet werden, um die linearen Verunreinigungen der Bürstenproben zu ermitteln. Mit dieser Technik ist es außerdem möglich in Kombination mit Lichtstreuexperimenten, die effektive Ladung von Polyelektrolyten zu bestimmen.

Bei der mobilen Phase die für die Untersuchung der Poly-L-lysin-derivate verwendet wurde, handelt es sich um einen Phosphatpuffer, mit einem pH -Wert von zwei. Unter diesen Bedingungen kann der elektroosmotische Fluss in der Kapillare vernachlässigt werden, weil die Kapillarwand vollständig protoniert ist (Abb. 6.1).

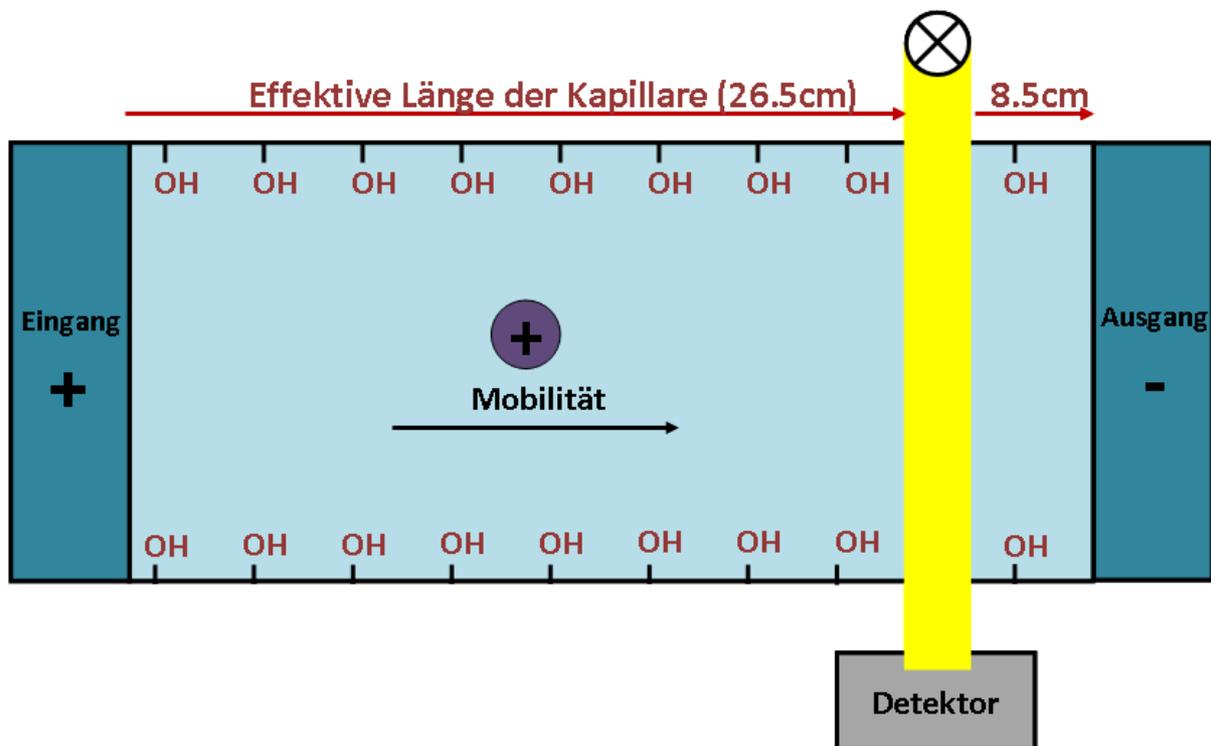


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung des Trennprozesses von kationischen Polyelektrolyten bei $pH=2$

Aus diesem Grund ist die Retentionszeit nur von der elektrophoretischen Mobilität der Probe abhängig, die durch Gleichung 6.1 beschrieben wird.

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \quad (6.1)$$

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität

E : elektrische Feldstärke

v_{ep} : Wanderungsgeschwindigkeit der Probe

Die elektrische Feldstärke berechnet sich aus der angelegten Spannung und der Gesamtlänge der Kapillare:

$$E = \frac{U}{l_{ges.}} \quad (6.2)$$

U : angelegte Spannung

$l_{ges.}$: Gesamtlänge der Kapillare

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Probe wird durch Gleichung 6.3 ermittelt:

$$v_{ep} = \frac{l_{eff}}{t_{ret}} \quad (6.3)$$

l_{eff} : effektive Länge der Kapillare (siehe Auch Abbildung 6.1)

t_{ret} : Retentionszeit der Probe

Setzt man Gleichung 6.2 und Gleichung 6.3 in Gleichung 6.1 ein, ergibt sich für die elektrophoretische Mobilität:

$$\mu_{ep} = \frac{l_{ges.} \cdot l_{eff}}{U \cdot t_{ret}} \quad (6.4)$$

Vor der Bestimmung der elektrophoretischen Mobilitäten von linearem und verzweigten Poly-L-lysin wurde unter denselben Bedingungen (gleiche Kapillare bzw. Temperatur, gleicher Puffer) die elektrophoretische Mobilität von Bromid bestimmt. Abbildung 6.2 zeigt das Elektropherogramm einer NaBr-Lösung bei negativer Polarisierung (negativer Pol am Inlet; positiver Pol am Outlet). Es wurde eine Migrationszeit von 0.991 Industrieminuten gemessen, die einer elektrophoretischen Mobilität von $8.48E-08 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ entspricht. Der Literaturwert beträgt $8.09E-08 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [1]. Es besteht somit nur eine geringe Abweichung von 4 %, was die Zuverlässigkeit der Messungen untermauert.

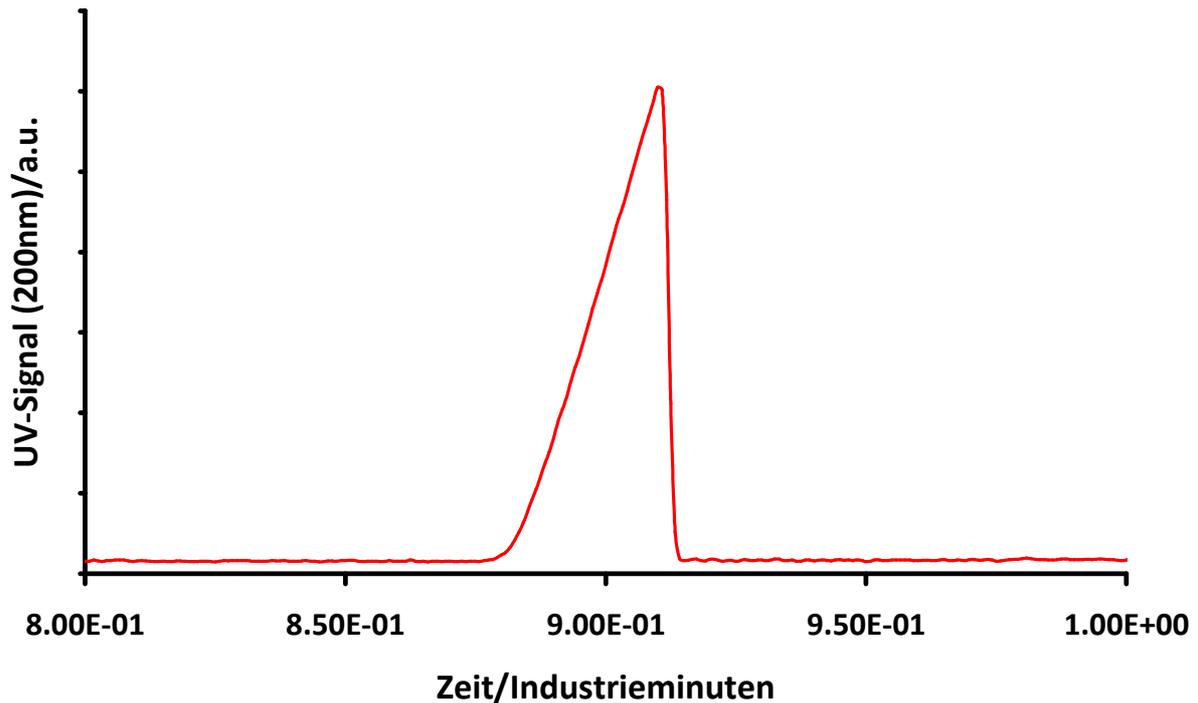


Abbildung 6.2: Elektropherogramm einer wässrigen NaBr-Lösung ($c=0.1 \text{ g/l}$)

Puffer: 100 mM Phosphat (pH=2.0); Spannung: 20 KV; Länge der Kapillare: 35 cm

Effektive Länge der Kapillare: 26,,5 cm; Injektionszeit: 10 ms; Injektionsdruck: 30 mbar

Es ist anzumerken, dass die Bedingungen dieser Messung nicht den Bedingungen entsprechen, unter denen der Literaturwert ermittelt worden ist. Der Literaturwert wurde in reinem Wasser gemessen, währenddessen bei dieser Messung ein 0.1 M Phosphatpuffer als Lösungsmittel diente. Dieser Umstand verändert allerdings nicht den hydrodynamischen Radius der Bromidionen. Auch die Anwesenheit der Dihydrogenphosphationen, sowie die erhöhte H^+ Ionenkonzentration sollte die Wanderungsgeschwindigkeit der Bromidionen im Rahmen der Messgenauigkeit nicht beeinflussen.

Die Abbildungen 4.5.6 und 4.5.7 zeigen die Elektropherogramme von Lys 25-1 und Lys 55-3. Die Migrationszeiten für das lineare Poly-L-lysin und der Bürsten können direkt aus den Abbildungen entnommen werden. Sie sind mit allen weiteren benötigten Größen in Tabelle 6.1 aufgelistet.

Tabelle 6.1: elektrophoretische Mobilitäten von linearem und verzweigten Poly-L-lysin

Probe	t_{ret}/s	UV	I_{ges}/m	I_{eff}/m	$\mu_{\text{ep}}/\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Lys 55-3	128.4	20000	0.35	0.265	3.612E-08
Lys 25-1	126.0	20000	0.35	0.265	3.681E-08
Lys-lin.	109.4	20000	0.35	0.265	4.237E-08

Wie schon in Kapitel 3.4 angesprochen, kann die effektive Ladung in Abhängigkeit von der elektrophoretischen Mobilität nach Gleichung 3.4.5 berechnet werden. Sie kann unter diesen

Messbedingungen allerdings nicht verwendet werden, weil wie schon angesprochen, diese Gleichung nur für sphärische Partikel in unendlich verdünnten Lösungen Gültigkeit besitzt.

Murugappan Muthukumar war es jedoch möglich, eine Formel für die elektroforetische Mobilität herzuleiten, die die effektive Ladung, die Partikelform, die Salzkonzentration und die Konzentration der Probe berücksichtigt [2]:

$$Q_{\text{eff}} = \mu_{\text{ep}} \cdot \left(\frac{e}{6\pi \cdot \eta_0 \cdot R_g} \cdot \frac{1}{\pi} \cdot \left(\frac{3}{2\nu} \right)^{\frac{1}{2\nu}} \cdot \Gamma\left(\frac{3\nu-1}{2\nu}\right) \cdot \Gamma\left(\frac{1-\nu}{2\nu}\right) \cdot \frac{1}{(\kappa^{-1} \cdot R_g)^{\frac{1}{\nu}-1}} \right)^{-1} \quad (6.5)$$

e : Elementarladung

R_g : Trägheitsradius des Polyelektrolyten

η_0 : Viskosität des Lösungsmittels

κ : Debye'sche Abschirmlänge

ν : Molmassen-Radien-Exponent

Γ : Gammafunktion

Q_{eff} : effektive Ladung

Gleichung 6.5 ist abhängig von der Debyeschen Abschirmlänge (κ), die nach Gleichung 6.6 berechnet werden kann.

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{2e^2 \cdot I \cdot N_L}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot k_B \cdot T}} \quad (6.6)$$

I : Ionenstärke

N_L : Avogadrokonstante

ε_r : Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels

ε_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums

k_B : Boltzmannkonstante

T : Temperatur

Die Ionenstärke, die man zur Berechnung von κ benötigt, lässt sich nach Gleichung 6.7 ermitteln:

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2 \quad (6.7)$$

c_i : Konzentration der ionischen Spezies i

z_i : Ladung der ionischen Spezies i

Wie schon am Anfang des Kapitels erwähnt, wurde ein Phosphatpuffer ($pH=2$) mit einer Konzentration von 0.1 mol/l für die Messungen verwendet. Ausgehend von diesen Parametern kann ihre H^+ Ionenkonzentration berechnet werden.

Für schwache bis mittelstarke Säuren ist es möglich den pH in Abhängigkeit der molaren Konzentration nach Gleichung 6.8 zu bestimmen:

$$pH = pk_s - \log\left(c \cdot \frac{mol}{g}\right) \quad (6.8)$$

c : molare Konzentration der Säure

Für eine 0.1 M Phosphorsäurelösung mit einem pk_s von 2.1 ergibt sich nach Gleichung 6.6 ein pH -Wert von 1.55, was einer H^+ Ionenkonzentration von 0.028 mol/l entspricht. Verwendet man diese Lösung, um durch Titration mit NaOH einen pH -Wert von zwei zu erreichen, sollte sich die Gesamtkonzentration aller Kationen nicht verändern. Durch Titration mit NaOH verändert sich zwar die Konzentration an H^+ Ionen, allerdings entsteht durch Neutralisation eines H^+ Ions ein NaH_2PO_4 Molekül und somit ein Na^+ Ion. Betrachtet man weiterhin die pk_s -Werte der 3 Dissoziationsstufen von Phosphorsäure ^[3] (Abbildung 6.3), ist die Konzentration an HPO_4^{2-} und PO_4^{3-} Ionen bei einem pH -Wert von 2 zu vernachlässigen, wodurch die Gesamtkonzentration der Kationen gleich der Gesamtkonzentration der Anionen entspricht.

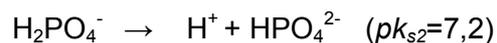
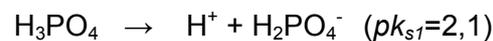


Abbildung 6.3: Dissoziationsstufen und pk_s -Werte von Phosphorsäure

Nach Gleichung 6.7 ergibt sich somit eine Gesamtionenstärke von 28 mol/m³, was nach Gleichung 6.6 einer inversen Debye'schen Abschirmlänge von 5,45E08 m⁻¹ entspricht.

Die durch statische Lichtstreuung bestimmten Trägheitsradien können nicht direkt zur Berechnung der elektrophoretischen Mobilitäten verwendet werden, weil es sich um z-Mittelwerte handelt. Sie müssen zuvor in Zahlenmittelwerte umgerechnet werden. Die Formeln um das z-Mittel des Trägheitsradius eines Schulz-Zimm verteilten Polymer in das Zahlenmittel umzurechnen ist durch Gleichung 6.9 - 6.11 gegeben ^[4].

$$\langle S^2 \rangle_n = q_{\langle S^2 \rangle_n}^{(sz)} \cdot \langle S^2 \rangle_z \quad (6.9)$$

$q_{\langle S^2 \rangle_n}^{(sz)}$: Polymolekularitäts-Korrektur-Faktor

$\langle S^2 \rangle_n = R_{g,n}^2$: Zahlenmittel des Trägheitsradienquadrat

$\langle S^2 \rangle_z = R_{g,z}^2$: Z-Mittel des Trägheitsradienquadrat

$$q_{\langle S^2 \rangle_n}^{(sz)} = \frac{k(k+1)}{[(3k + 2a_{[\eta]} + 2)/3] \cdot (3k + 2a_{[\eta]} + 5)/3} \quad (6.10)$$

k : Kopplungsparameter

$a_{[\eta]}$: Molmassen-Viskositäts-Exponent

$$a_{[\eta]} = 3\nu - 1 \quad (6.11)$$

ν : Molmassen-Radien-Exponent

Aufgrund der Tatsache, dass das für diese Messungen verwendete lineare Poly-L-lysin nur ein Molekulargewicht (M_n) von 16 KDa (77 chemische Ladungen) hat und der Trägheitsradius aus diesem Grund kleiner 10 nm ist, kann man diese Größe nicht mit statischer Lichtstreuung bestimmen. Deswegen wurde der hydrodynamische Radius mit dynamischer Lichtstreuung ermittelt (2 nm) und ausgehend von diesem Wert der Trägheitsradius abgeschätzt. Geht man davon aus, dass lineares Poly-L-lysin als ideal flexibles Knäuel in wässriger Lösung vorliegt, sollte es ein ρ -Verhältnis (R_g/R_H) von etwa 1.5 besitzen, woraus sich ein z-Mittel des Trägheitsradius ($R_{g,z}$) von 3 nm ergibt. Die Polydispersität des linearen Poly-L-lysin beträgt 1.5 ($k=2$), wodurch sich nach Formel 6.9 ein $R_{g,n}$ von etwa 2.0 nm errechnet. Der Molmassen-Radien-Exponent (ν) für ein ideal flexibles Knäuel liegt im Bereich von 0.5 bis 0.6.

Für die Poly-L-lysinbürsten wurden mittels statischer Lichtstreuung Trägheitsradien von 75.9 nm (Lys 25-1) bzw. 84.1 nm (Lys 55-3) gemessen. Diese Werte beziehen sich allerdings auf wässrige Lösungen mit einer Salzkonzentration von 0.005 mol/l. Bei der Bestimmung der elektrophoretischen Mobilitäten wurde jedoch ein Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 0.1 mol/l verwendet. Die Trägheitsradien sind unter diesen Bedingungen kleiner, weil durch Erhöhung der Salzkonzentration die elektrostatischen Abstoßungen

zwischen den positiven Ladungen der Bürste verringert werden. Aus Zeitgründen konnten diese Werte bis zum Ende der Dissertation nicht experimentell bestimmt werden. Deswegen wurden für die Proben Lys 55-3 bzw. Lys 25-1 ein $R_{g,z}$ von 75 nm bzw. 70 nm geschätzt. Diese Werte müssen wie im Fall des linearen Poly-L-lysin noch in die Zahlenmittelwerte umgerechnet werden. Mit Hilfe der Gleichungen 6.9 – 6.11 ergibt sich in Abhängigkeit des Molmassenradienexponent ein $R_{g,n}$ von 44 bis 46 nm für die Probe Lys 55-3 und ein $R_{g,n}$ von 41 – 43 nm für die Probe Lys 25-1.

Als Lösungsmittelviskosität (η_0) wurde in allen Fällen die Viskosität von Wasser verwendet (0.00089 pa·s). Die Temperatur betrug bei allen Messungen 298 K.

Tabelle 6.2 beinhaltet die Ergebnisse für die Berechnung der effektiven Ladung von linearem Poly-L-lysin und den korrespondierenden Bürstenstrukturen

Tabelle 6.2: Effektive Ladungen der von linearem und verzweigten Poly-L-lysin

Probe	ν	$R_{g,n}/\text{nm}$	χ/m^{-1}	$\mu_{ep}/\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	Q_{eff}	Q_{eff}/Q_{chem}
Lys 25-1	0.75	43.20	5.45E+08	3.68E-08	153.20	0.0058
Lys 25-1	0.8	42.14	5.45E+08	3.68E-08	95.58	0.0037
Lys 25-1	0.85	41.12	5.45E+08	3.68E-08	54.54	0.0021
Lys 55-3	0.75	46.29	5.45E+08	3.61E-08	168.0	0.0053
Lys 55-3	0.8	45.14	5.45E+08	3.61E-08	104.2	0.0032
Lys 55-3	0.85	44.05	5.45E+08	3.61E-08	58.01	0.0018
Lin. Lys	0.5	2.12	5.45E+08	4.24E-08	3.15	0.041
Lin. Lys	0.55	2.06	5.45E+08	4.24E-08	3.39	0.044
Lin. Lys	0.6	2.00	5.45E+08	4.24E-08	3.27	0.042

Ein Vergleich zwischen dem Prozentsatz der dissoziierten Ladungen zwischen dem linearen Poly-L-lysin und den verzweigten Strukturen zeigt eindeutig, dass die Anzahl der dissoziierten Ladungen im Fall der Poly-L-lysinbürsten mindestens um einen Faktor 10 kleiner ist.

Dieses Ergebnis bestätigt qualitativ die Resultate von Dr. Peter Dziezok, der in seiner Dissertation den Diffusionskoeffizienten von linearen und verzweigten Polyvinylpyridin (PVP; quaternisiert mit Benzylbromid) in Abhängigkeit vom c_p/c_s -Verhältnis bestimmte (c_p =Polyionenkonzentration bei 100 %igem Dissoziationsgrad; c_s =Salzkonzentration) [5]. Dziezok fand heraus, dass die Aufspaltung des Diffusionskoeffizienten in einen fast- und slow-mode für lineares quaternisiertes PVP bei wesentlich kleineren c_p/c_s -Verhältnissen stattfindet als im Fall der quaternisierten PVP-Bürste (Abb.: 6.3). Dieses Ergebnis gibt entscheidende Hinweise darauf, dass die Anzahl der effektiven Ladungen im Fall der Bürste wesentlich kleiner ist als für die korrespondierenden linearen Strukturen.

Des Weiteren konnte Dziezok durch Leitfähigkeitsmessungen die effektive Ladung von linearen und verzweigten PVP (quaternisiert mit Ethylbromid) bestimmen. Die Ergebnisse

dieser Messungen zeigen, dass der Dissoziationsgrad der PVP-Bürste um einen Faktor 4 kleiner ist im Verhältnis zum linearen PVP.

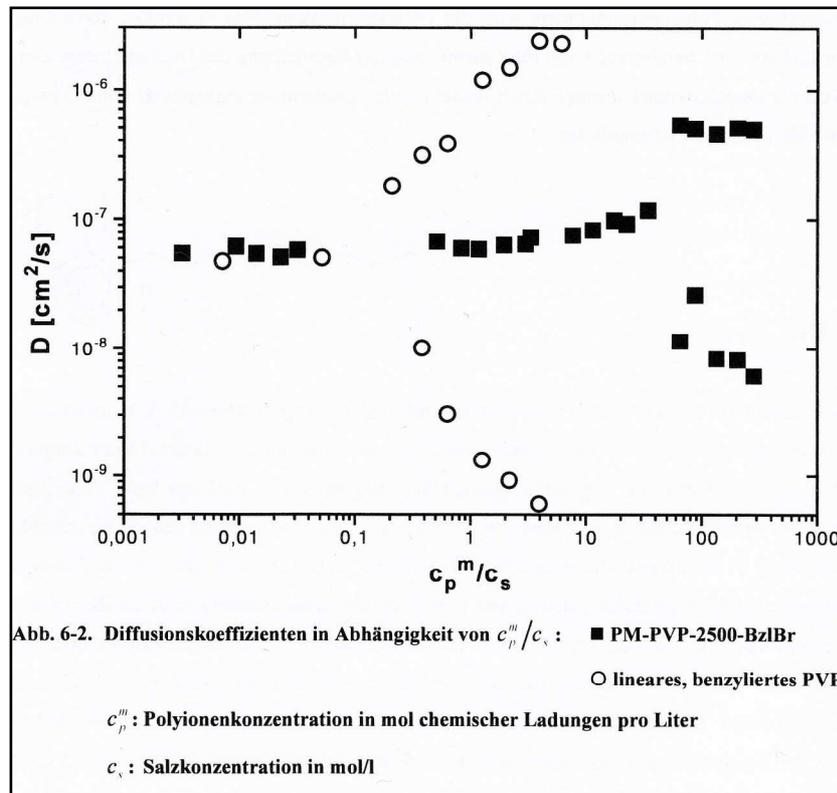


Abbildung 6.3: Aufspaltung des Diffusionskoeffizienten von quaternisierten PVP in einen slow- und fast-mode in Abhängigkeit des c_p/c_s -Verhältnisses (Dissertation Peter Dziezok; Mainz 1999)

Ähnliche Resultate sind in dieser Dissertation durch die Bestimmung der effektiven Ladung von linearem und verzweigten Poly-L-lysin mittels statischer Lichtstreuung und Kapillarelektrophorese erlangt worden. Allerdings ist das Verhältnis zwischen den effektiven Ladungen der Bürste und der korrespondierenden linearen Struktur kleiner als in Dziezok's Arbeit. Des Weiteren sind die Absolutwerte der Dissoziationsgrade kleiner als die von Dziezok bestimmten Werte (lineares PVP: 28.0 %; PVP-Bürste: 7.9 %).

Diese Unterschiede können mehrere Ursachen haben. Zum einen sollte beachtet werden, dass zwei völlig unterschiedliche Systeme miteinander verglichen worden sind. Dziezok verwendete quaternisiertes PVP und Bromid als Gegenion. Bromid zählt nach dem HSAB-Prinzip (Hard and Soft Acids and Bases) zu den weichen Gegenionen, währenddessen eine quaternisiertes Ammoniumion als hartes Kation angesehen wird. Diese hart-weich-Wechselwirkung fördert die Dissoziation.

Im Falle der Poly-L-lysinderivate war das Gegenion während der Elektrolyse H_2PO_4^- , was ein hartes Gegenion ist. Seine Interaktion mit einem primären Ammoniumkation repräsentiert eine hart-hart-Wechselwirkung und wirkt der Dissoziation entgegen.

Weiterhin sollte beachtet werden, dass die Kationen des quaternisierten PVP's aufgrund des aromatischen Pyridinrings besser stabilisiert werden können als beim Poly-L-lysin.

Neben den oben genannten strukturellen Unterschieden sollten auch die verschiedenen Messbedingungen diskutiert werden. Dziezok bestimmte die effektive Ladung seiner Polymere in salzfreiem Wasser. Außerdem schätzte er die elektroforetische Mobilität der Polymere, die er benötigte, um aus den Leitfähigkeitsmessungen die Anzahl an dissoziierten Ladungen zu errechnen.

In dieser Arbeit konnte die elektroforetische Mobilität mit Kapillarelektrophorese experimentell bestimmt werden, allerdings nur durch Verwendung eines Phosphatpuffers (0.1 M), der wahrscheinlich eine Änderung der Dissoziation zwischen Gegenionen und Polyelektrolyt hervorruft im Vergleich zu salzfreien Konditionen.

Des Weiteren ist es fragwürdig, ob Muthukumar's Theorie wirklich zur quantitativen Berechnung der effektiven Ladungen verwendet werden kann, da es bis heute keine experimentellen Arbeiten gibt, mit denen diese Theorie verifiziert wurde.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass Dziezok's Methode den Nachteil besitzt, dass die elektroforetische Mobilität der Polymere abgeschätzt werden muss, die Bestimmung der Leitfähigkeit allerdings eine etablierte Theorie darstellt, mit der man die effektive Ladung von Molekülen bestimmen kann.

Dem gegenüber steht die in diesem Kapitel vorgestellte Methode, deren großer Vorteil die sehr genaue Bestimmung der elektroforetischen Mobilität ist, die jedoch auf eine Theorie zurückgreifen muss, die nicht experimentell verifiziert wurde.

Die ideale Lösung wäre aufgrund der oben genannten Argumente die Kombination der Vorteile beider Methoden, also die Bestimmung der Leitfähigkeit von Polyelektrolyten, sowie die Messung der elektroforetischen Mobilität durch Kapillarelektrophorese unter gleichen Bedingungen.

Das Problem dieser Strategie besteht in der Ermittlung der Bedingungen, bei denen beide Experimente zufriedenstellend durchführbar sind.

Die Bestimmung der Leitfähigkeit von Polymeren kann nur in Lösungsmitteln durchgeführt werden, die eine geringe Grundleitfähigkeit besitzen, weil ansonsten exakte Messungen aufgrund schlechter Signal-Rausch-Verhältnisse nicht durchgeführt werden können.

Bei Untersuchungen mittels Kapillarelektrophorese hingegen, sollte das Lösungsmittel eine gewisse Grundleitfähigkeit besitzen, weil ansonsten reproduzierbare Messungen schwierig zu realisierbaren sind.

Das Problem in der Verwirklichung dieser Strategie besteht somit in der Ermittlung der idealen Salzkonzentration, bei der Leitfähigkeits- und Kapillarelektrophoreseexperimente zufriedenstellende Ergebnisse liefern.

Abschließend sollte bezüglich der oben erwähnten Strategie erwähnt werden, dass Dziezok eine Leitfähigkeitstheorie verwendete, die die Abhängigkeit der Leitfähigkeit der Polyionen von ihren Gegenionen nicht berücksichtigt. In wie fern dieser Kreuzterm die Leitfähigkeit von Polymeren und somit ihre effektive Ladung beeinflusst, kann bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht abgeschätzt werden. Aus diesem Grund ist es auch mit einer Kombination aus Leitfähigkeitsmessungen und Untersuchungen mittels Kapillarelektrophorese fragwürdig, ob die effektive Ladung von Polymeren wirklich bestimmt werden kann.

6.1 Zusammenfassung von Kapitel 6

Neben der Quantifizierung von linearen Verunreinigungen konnten die Elektropherogramme der Poly-L-lysinbürsten und der linearen Analoga verwendet werden, um die elektrophoretische Mobilität dieser Moleküle zu ermitteln.

Durch Kombination mit den jeweiligen Trägheitsradien wurde durch Anwendung einer Theorie von Muthukumar die effektive Ladung der Polymere bestimmt, die für die Poly-L-lysinbürste mindestens um einen Faktor 10 niedriger liegt als für lineares Poly-L-lysin.

Diese Rechnungen bestätigen qualitativ die Ergebnisse von Peter Dziezok, der durch Leitfähigkeitsmessungen herausfand, dass die effektive Ladung einer PVP-Bürste deutlich kleiner ist als von linearem PVP.

Literatur zu Kapitel 6

- [1] P.W. Atkins; *Physikalische Chemie*, VCH Weinheim (1990)
- [2] M. Muthukumar; *J. Chem. Phys.*, **107**, 7, 2619 (1997)
- [3] E. Wiberg, A. F. Holleman, N. Wiberg; *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG; 10785 Berlin (2009)
- [4] *Polymer Handbook*
- [5] P. Dziezok; *Dissertation*, Mainz (1999)

Zusammenfassung

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die grafting-from-Methode verschiedene geschützte Polypeptidbürsten basierend auf L-glutaminsäure, L-asparaginsäure, L-lysin und L-ornithin synthetisch zugänglich sind.

Zur Verwirklichung dieser Synthesestrategie wurde mehrstufig ein Makroinitiator auf Basis von N-methacrylamid-1,6-diaminohexan hergestellt, der die ringöffnende Polymerisation von Leuchs'schen Anhydriden zur Entwicklung der geschützten Polypeptidseitenketten initiieren kann.

Durch statische und dynamische Lichtstremessungen wurden die Trägheitsradien, die hydrodynamischen Radien und die Molekulargewichte der geschützten Poly-L-lysinbürsten und Poly-L-glutaminsäurebürsten bestimmt. Anhand der Molekulargewichte konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass die geschützten Lysin- und Glutaminsäurebürsten keine Verunreinigungen in Form von Aggregaten oder linearen Verunreinigungen beinhalten. Die geschützten Ornithinderivate konnten aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht vermessen werden. Bezüglich der Benzyl-geschützten Asparaginsäurebürste wurde aus Zeitgründen nur der hydrodynamische Radius der Probe bestimmt.

Durch stark saure bzw. alkalische Abspaltbedingungen war es möglich, die Schutzgruppen bei allen geschützten Bürsten bis auf die TFA-geschützte Poly-L-lysinbürste erfolgreich zu entfernen.

Weitergehende Untersuchungen an diesen positiv bzw. negativ geladenen Polyelektrolytbürsten mittels statischer Lichtstreuung und Kapillarelektrophorese zeigten jedoch, dass lediglich die Z-geschützten Poly-L-lysinbürsten ohne Kettenabbau entschützt werden konnten. In allen anderen Fällen wurden nach Abspaltung der Schutzgruppen lineare Kettenfragmente von 25 bis 70 % Massenanteil detektiert.

Durch die Zugabe von NaClO_4 zu den wässrigen Lösungen der Poly-L-lysinbürsten (Lys 55-3 und Lys 25-1) konnte mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Seitenketten von einer ungeordneten Konformation in eine α -helikale Konformation übergehen. Bei gleicher Salzkonzentration war der Helix-Anteil der langen Seitenketten größer als bei den kurzen Seitenketten in Analogie zu den Ergebnissen an linearem Poly-L-lysin. Eine Analyse der Poly-L-lysinbürsten in einer 0.5 N NaClO_4 -Lösung durch Rasterkraftmikroskopie, statischer Lichtstreuung und dynamischer Lichtstreuung zeigte, dass die Bürsten unter diesen Bedingungen ihre stäbchenförmige Topologie verlieren und die Form von regelmäßig gekrümmten Strukturen annehmen.

Durch Vergleichsmessungen der Poly-L-lysinbürsten in Lösungsmitteln gleicher Ionenstärke die jedoch keine helikalen Konformationen induzieren können, wurde zweifelsfrei bewiesen, dass die Entstehung der regelmäßig gekrümmten Strukturen nichts mit der

Konformationsänderung der Seitenketten zu tun hat, sondern das vielmehr die große Ionenstärke der hochkonzentrierten Salzlösungen für die Änderung der Topologie verantwortlich ist.

Die Konformationsänderung der Seitenketten in NaClO_4 -Lösungen sorgt lediglich dafür, dass sich der Durchmesser der Bürsten (ermittelt durch cross-section-Analyse der AFM-Bilder in Lösung) deutlich verkleinert. Untermauert wurde dieses Ergebnis zusätzlich durch die Ermittlung der Querschnittsträgheitsradien. Durch SAXS-Messungen konnte festgestellt werden, dass die Querschnittsträgheitsradien der Poly-L-lysinbürsten in 0.5 N NaClO_4 -Lösung kleiner sind als in Lösungsmitteln, die keine α -helikale Sekundärstruktur induzieren können. Neben der Änderung der Seitenkettenkonformation durch Zugabe von NaClO_4 konnte auch durch Mischen der wässrigen Polymerlösungen mit Methanol α -helikale Sekundärstrukturen in den Seitenketten der Lysinbürsten induziert werden. Das Sekundärstrukturverhalten der Seitenketten weicht unter diesen Bedingungen stark von dem Sekundärstrukturverhalten der freien linearen Analoga ab. Mittels CD-Spektroskopie wurde gezeigt, dass die kürzeren Seitenketten einen höheren α -helikalen Anteil bilden als die langen Seitenketten, was im Widerspruch zum Sekundärstrukturverhalten von linearen Poly-L-lysinen steht.

Des Weiteren wurde bei der Bürste mit den kürzeren Seitenketten ein geringer Anteil β -Faltblatt Strukturen erzeugt, der bei linearen Poly-L-lysinbürsten durch Zugabe von Methanol nicht induziert werden kann.

Die Topologie- und Größenbestimmung der Poly-L-lysinbürsten in Methanol/Wasser-Mischungen erfolgte bis auf die SAXS-Messungen mit den gleichen Methoden wie bei der Induzierung der α -helikalen Seitenkettenkonformation durch die Zugabe von NaClO_4 . Auch in diesem Fall wurde festgestellt, dass die Sekundärstruktur die stäbchenförmige Topologie der Bürsten nicht beeinflusst, die Durchmesser sich allerdings deutlich beim Übergang zur Helix verkleinern.

Zusätzlich konnten die AFM-Bilder der Bürsten verwendet werden, um die Konturlänge der Bürsten zu bestimmen und die durch statische Lichtstreuung ermittelte Konturlänge zu verifizieren.

Durch die Anpassung der Lichtstreuergebnisse an die Wurmchentheorie von Kratky und Porod war es außerdem möglich, die Kuhlängen der Bürsten zu berechnen. Sie belaufen sich auf mehrere hundert Nanometer und nehmen mit steigender Seitenkettenlänge zu.

Neben der Quantifizierung von linearen Verunreinigungen konnten die Elektropherogramme der Poly-L-lysinbürsten und der linearen Analoga verwendet werden, um die elektrophoretische Mobilität dieser Moleküle zu ermitteln.

Damit war es in Kombination mit den Trägheitsradien der Polymere möglich, die effektive Ladung von linearem und verzweigten Poly-L-lysin nach einer Theorie von Muthukumar zu berechnen. Das Ergebnis dieser Rechnungen bestätigt die Ergebnisse früherer

Untersuchungen von Peter Dziezok, der in seiner Dissertation durch Leitfähigkeits- und Lichtstreuungsmessungen an linearem PVP und PVP-Bürsten herausfand, dass die effektive Ladung von Polymerbürsten mindestens um einen Faktor 10 kleiner ist als bei den korrespondierenden linearen Analoga.

Ausblick

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit ist es relativ unwahrscheinlich, dass anionische Polypeptidbürsten ohne lineare Verunreinigungen hergestellt werden können, da die Spaltung der Schutzgruppen unter den bekannten Abspaltbedingungen eine partielle Fragmentierung der Seitenketten hervorruft. Nichts desto trotz sollte es möglich sein, die linearen Verunreinigungen durch fraktionierende Fällung abzutrennen. Sind die richtigen Bedingungen für die Fraktionierung erst einmal gefunden, sollte es äußerst einfach sein anionische Polyelektrolytbürsten mit der in dieser Arbeit vorgestellten Synthesestrategie und einem anschließendem Fraktionierungsschritt zu erhalten.

Des Weiteren sollten weitergehende Untersuchungen bezüglich der Ergebnisse aus Kapitel 6 vorgenommen werden. Wie schon am Ende dieses Kapitels angesprochen, stimmen die Ergebnisse bezüglich der effektiven Ladung von linearen und verzweigten Polymeren mit den Ergebnissen anderer Arbeiten qualitativ überein. Für zukünftige Untersuchungen muss jedoch die Theorie von Muthukumar experimentell verifiziert werden.

Weiterhin bieten sich die kationischen Poly-L-lysinbürsten zur Komplexbildung von anionisch geladenen Polyelektrolyten wie z.B. DNA an. Erste Untersuchungen von Dr. Frauke Kühn zeigten, dass die Transfektionseffizienz dieser Komplexe deutlich größer ist, als von Komplexen zwischen DNA und den korrespondierenden linearen Strukturen.

Kapitel 7: Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Für alle Reaktionen wurden Lösungsmittel in p.a.-Qualität von der Firma Fisher-Scientific verwendet. Tabelle 7.1.1 zeigt eine Auflistung der Chemikalien, die für die Herstellung der Stoffe in dieser Dissertation verwendet wurden.

Tabelle 7.1.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Firma	Bestellnummer	weiterführende Aufreinigung	Verwendungszweck
1,6 Diaminohexan	Sigma-Aldrich	H11696	keine	Herstellung des Makroinitiatorprecursormonomers
Pyrokohlensäureditert.butylester	Sigma-Aldrich	205249	keine	Herstellung des Makroinitiatorprecursormonomers
Methacrylsäurechlorid	Sigma-Aldrich	64120	Kolonnendestillation	Herstellung des Makroinitiatorprecursormonomers
Triethylamin	Sigma-Aldrich	90340	Kolonnendestillation	Herstellung des Makroinitiatorprecursormonomers
Trockenes Chloroform	Sigma-Aldrich	372978	keine	Herstellung des Makroinitiatorprecursormonomers
Schwefel	Sigma-Aldrich	84683	keine	Herstellung des RAFT-Reagenz
25 %ige Natriummethanolatlösung	Sigma-Aldrich	156256	keine	Herstellung des RAFT-Reagenz
Benzylbromid	Sigma-Aldrich	B17905	keine	Herstellung des RAFT-Reagenz
Diethylamin	Sigma-Aldrich	31730	keine	Herstellung des RAFT-Reagenz

Chemikalie	Firma	Bestellnummer	weiterführende Aufreinigung	Verwendungszweck
Iod	Sigma-Aldrich	207772	keine	Herstellung des RAFT-Reagenz
Anisol	Sigma-Aldrich	123226	Kolonnendestillation über AIBN	Polymerisation des Makroinitiatorprecursors
AIBN	Sigma-Aldrich	441090	Umkristallisation aus Methanol	Polymerisation des Makroinitiatorprecursors
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich	T6508	keine	Herstellung des Makroinitiators/Tetramethylammoniumtriflats
L-ornithin	Sigma-Aldrich	75440	keine	Herstellung der TFA-geschützten L-ornithin- bzw. L-lysinderivate
L-lysin	Sigma-Aldrich	62840	keine	Herstellung der TFA-geschützten L-ornithin- bzw. L-lysinderivate
Trifluoressigsäureethylester	Sigma-Aldrich	E50000	keine	Herstellung der TFA-geschützten L-ornithin- bzw. L-lysinderivate
Elementares Natrium	Sigma-Aldrich	13401	keine	Herstellung der TFA-geschützten L-ornithin- bzw. L-lysinderivate
Trockenes Ethanol	Sigma-Aldrich	32294	keine	Herstellung der TFA-geschützten L-ornithin- bzw. L-lysinderivate
Trockenes Ethylacetat	Sigma-Aldrich	45765	keine	Herstellung und Aufreinigung von Leuchs'schen Anhydriden
Trockenes THF	Sigma-Aldrich	87371	keine	Herstellung und Aufreinigung von Leuchs'schen Anhydriden
Trockenes n-hexan	Sigma-Aldrich	52766	keine	Herstellung und Aufreinigung von Leuchs'schen Anhydriden
Triphosgen	Sigma-Aldrich	330752	keine	Herstellung und Aufreinigung von Leuchs'schen Anhydriden
N- ϵ -Benzoyloxycarbonyl-L-lysin	Sigma-Aldrich	96840	keine	Herstellung und Aufreinigung von Leuchs'schen Anhydriden
N- ϵ -Benzoyloxycarbonyl-L-ornithin	Sigma-Aldrich	C6779	keine	Herstellung und Aufreinigung von Leuchs'schen Anhydriden

Chemikalie	Firma	Bestellnummer	weiterführende Aufreinigung	Verwendungszweck
L-glutaminsäure- γ -benzylester	Sigma-Aldrich	49510	keine	Herstellung und Aufreinigung von Leuchs'schen Anhydriden
L-glutaminsäure- γ -methylester	Sigma-Aldrich	49610	keine	Herstellung und Aufreinigung von Leuchs'schen Anhydriden
L-asparaginsäure- γ -benzylester	Sigma-Aldrich	B2129	keine	Herstellung und Aufreinigung von Leuchs'schen Anhydriden
DMF	Acros	61032	siehe Aufreinigung von DMF	Lösungsmittel für die ringöffnende Polymerisation
Tetramethylammoniumhydroxid	Acros	42052	keine	Herstellung von Tetramethylammoniumtriflat
HFIP	Acros	14754	Kolonnendestillation	Lösungsmittel für SLS und DLS von geschützten Bürstenderivaten
HBr/Eisessig	Acros	12318	keine	Abspaltung der Z- und Benzylschutzgruppe
Piperidin	Sigma-Aldrich	411027	keine	Abspaltung der TFA-Schutzgruppe
Natriumperchlorat	Merck	1065640	keine	α -helikaler Übergang
Kieselgel 60	Merck	115111	keine	Flashchromatographie

7.2 Synthesevorschriften

7.2.1 Herstellung von Mono-N-boc-1,6-diaminohexan

In einen 500 ml Rundkolben (bestückt mit einem Magnetrührer) werden 28.3 g (0.243 mol) Hexamethyldiamin in 250 ml 1,4-Dioxan suspendiert. Danach tropft man 7.09 g (0.033 mol) Pyrokohlensäure-di-tert-butylester gelöst in 80 ml 1,4-Dioxan über 3 Tage in das Reaktionsgemisch hinein. Nach Ablauf dieser Zeit wird der entstandene Feststoff (doppelt geschütztes Derivat) abfiltriert (Fritte) und das Filtrat von 1,4-Dioxan durch Abdampfen befreit. Der Rückstand wird in 300 ml Wasser gegeben und der dabei entstandene Feststoff erneut abfiltriert. Danach wird das Filtrat mit 3 mal 200 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit 3 mal 200 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird anschließend über MgSO_4 getrocknet, filtriert und evaporiert. Der Rückstand wird durch eine Flashchromatographie vorgereinigt.

Säulendurchmesser: 5.5 cm

Säulenhöhe: 25 cm

Laufmittel: Methanol/Chloroform (30:70) + 1 % Essigsäure

Anfärbemittel: KMnO_4 gelöst in H_2O

R_f -Wert: 0,3

Das durch Flashchromatographie erhaltene Produkt wird anschließend durch eine Destillation weiter aufgereinigt.

Druck: $2.5 \cdot 10^{-2}$ mbar ; Siedepunkt: 363 K

Eigenschaften: farblose viskose Flüssigkeit (aminartiger Geruch)

Ausbeute: 4.24 g (0.0196 mol; 60 % der Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS; δ in ppm): 1.30 (m, 8H); 1.41 (s, 9H); 1.70 (s; 2H); 2.65 (t, 2H); 3.06 (q, 2H); 4.51 (s, 1H)

7.2.2 Herstellung von N-Boc-N'-methacrylamid-1,6-diaminohexan

In einen ausgeheizten 50 ml Schlenkolben gibt man unter Schutzgas 25 ml trockenes Methylenchlorid, 2.9 g (0.0134 mol) N-boc-1,6-diaminohexan und 1.63 g (0.0161 mol) Triethylamin. Das Reaktionsgemisch wird mit einer Eis-Kochsalzmischung auf 268 K abgekühlt und im Argongegenstrom mittels eines Tropftrichters 1.6 g (0.015 mol)

Methacrylsäurechlorid gelöst in 10 ml Methylenchlorid, hinzugegeben. Der Kolben wird anschließend mit einem Argonballon verschlossen und das Reaktionsgemisch bei 268 K für 2 Stunden gerührt, sowie weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Ablauf dieser Zeit wird mit 2 mal 15 ml dest. H₂O extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und evaporiert. Der Rückstand (gelbes Öl) wird zweimal unter den gleichen Bedingungen durch Flashchromatographie aufgereinigt.

Säulendurchmesser: 5.5 cm

Säulenhöhe: 25 cm + 5 cm Al₂O₃

Laufmittel: Toluol : Essigester (50:50)

Ausbeute: 3.23 g (0,0114 mol; 85 % der Theorie)

Eigenschaften: farbloser Feststoff (Smp.: 339 K-340 K); geruchslos

¹H-NMR (CDCl₃, TMS; δ in ppm): 1.30 (m, 8H); 1.41 (s, 9H); 1.93 (s, 3H); 3.06 (q, 2H); 3.25 (q, 2H); 4.53(s, 1H); 5.28(s, 1H); 5.65 (s, 1H); 5.93 (s, 1H)

7.2.3 Herstellung von Bis-thio-benzoyl-disulfid

In einen 500 ml Einhalskolben gibt man 142 ml (0.622 mol) NaOCH₃ in Methanol (25 %), eine Hantel und 21.6 g (0.67 mol) Schwefel. Danach wird unter Rühren 26 ml (0.22 mol) Benzylbromid in das Reaktionsgemisch hineingetroffen (Tropfdauer: eine Stunde). Anschließend wird der Reaktionskolben mit einem Trockenrohr verschlossen und das Reaktionsgemisch 18 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Ablauf der Zeit wird auf Raumtemperatur abgekühlt, das ausgefallene NaBr abfiltriert, und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand (braunes Öl) wird in 500 ml Wasser gelöst und mit 800 ml Diethylether versetzt. Es wird mit 32 %iger HCl angesäuert, bis die organische Phase eine rote Farbe angenommen hat. Die Etherphase Phase wird mit 3 mal 300 ml Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und mit 600 ml Diethylamin versetzt. Es fällt sofort ein roter Feststoff aus, der nach einer Stunde abfiltriert und an der Luft getrocknet wird.

Ausbeute: 38 g (0.167 mol; 76 % der Theorie, bezogen auf Benzylbromid)

Eigenschaften: roter Feststoff (riecht nach Schwefelwasserstoff)

Der rote Feststoff (Diethylammonium-dithiobenzoat) 38 g (0.167 mol) wird in 200 ml Ethanol gelöst und auf 268 K abgekühlt. Danach tropft man über einen Zeitraum von 1.5 Stunden

42 g (0.33 mol) Iod gelöst in 500 ml Ethanol in die Lösung hinein. Nach etwa zehn Minuten beginnt das Produkt auszufallen (weinroter Feststoff). Nach Zugabe der ethanolischen Iodlösung, wird der Feststoff abfiltriert und über Nacht bei Raumtemperatur im Hochvakuum getrocknet. Der Feststoff ist nicht ganz rein (DC). Die Reinheit reicht allerdings für die Herstellung des RAFT-Reagenz aus.

Ausbeute: 16.8 g (0.055 mol; 66 % der Theorie)

Eigenschaften: Weinroter Feststoff, geruchslos.

¹H-NMR (CDCl₃, TMS; δ in ppm): 7.1-8.2 (m, 10H); 1.55 (m, Verunreinigungen)

7.2.4 Herstellung von 4-Cyano-4-thio-benzyl-valeriansäure

In einen 100 ml Erlenmeyerkolben bestückt mit einem Magnetrührer, gibt man 1.53 g (0.005 mol) Bis-thio-benzoyl-disulfid, 2.32 g (0.0083 mol) Azo-bis-cyan-valeriansäure und 40 ml Ethylacetat. Die Mischung wird für 18 Stunden unter Rückfluss gekocht und anschließend am Rotationsverdampfer evaporiert. Der Rückstand (dunkles Öl) wird durch Flashchromatographie aufgereinigt.

Säulendurchmesser: 5.5 cm

Säulenhöhe: 27 cm

Laufmittel: Hexan/Essigester (60:40)

R_f-Wert: 0,2

Ausbeute: 1.46 g (0.005 mol); 50 % der Theorie)

Eigenschaften: purpurner Feststoff (geruchslos)

¹H-NMR (CDCl₃, TMS; δ in ppm): 1.92 (s, 3H); 2.44 (m, 1H); 2.55-2.75 (m, 3H); 7.38 (t, 2H),
7.55 (t, 1H); 7.88 (d, 2H)

7.2.5 Polymerisation des Makroinitiator-precursors

In einen 50 ml Spitzkolben gibt man 39.39 mg (0.00014 mol) 4-Cyano-4-thio-benzyl-valeriansäure und 4.63 mg (0.000028 mol) AIBN. Die beiden Stoffe werden anschließend in 25 ml Anisol gelöst. Nach der Herstellung der Initiator-Mischung gibt man 2 g (0.0071 mol) N-Boc-N'-methacrylamid-1,6-diaminohexan und einen sauberen Magnetrührer in einen 50 ml Schlenkkolben, und fügt 0.25 ml der Initiatormischung mit einer Spritze hinzu. Der

Schlenkkolben wird mit einem Glasstopfen verschlossen und durch 4 Freeze-pump-zyklen von Sauerstoff befreit. Nach der Durchführung des letzten Freeze-pump-zyklus wird der Polymerisationskolben mit Argon geflutet und für 3 Stunden in ein auf 363 K temperiertes Ölbad gestellt. Nach Ablauf der Zeit wird das Reaktionsgemisch aus dem Ölbad entfernt und mit flüssigem Stickstoff abgekühlt. Danach wird der Kolben geöffnet und 4-5 ml THF hinzu gegeben. Nach dem der Inhalt des Reaktionskolbens vollständig in Lösung gegangen ist, wird das Polymer in 200 ml Diethylether gefällt und durch Zentrifugation vom Lösungsmittel und dem restlichen Monomer abgetrennt. Das Produkt wird anschließend bei 333 K im Vakuumtrockenschrank über Nacht getrocknet. Die organische Phase mit dem Rest des nicht umgesetzten Monomers, sollte nicht verworfen werden. Durch eindampfen des Diethylethers bei Raumtemperatur und anschließender Aufreinigung des Rückstands durch Flashchromatographie (siehe Herstellung von N-Boc-N'-methacrylamid-1,6-diaminohexan) kann der Größte Teil an nicht umgesetztem Monomer zurück erhalten werden.

Ausbeute: 0.54 g (27 % der Theorie)

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit rosa Farbe

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS; δ in ppm): 0.69 (s, Protonen der Boc-Schutzgruppe)

7.2.6 Aufreinigung von AIBN

In 20 ml Methanol wird bei Raumtemperatur, unter Rühren in kleinen Portionen soviel AIBN hineingegeben bis eine Sättigung eintritt. Das nicht gelöste AIBN wird mittels einer Glasfritte (Porengröße 3) abfiltriert, und das Filtrat bei 273 K, über Nacht im Gefrierfach gelagert. Das ausgefallene AIBN wird über einen vorgekühlten Büchnertrichter abgenutscht und nach dem gleichen Verfahren ein zweites Mal umkristallisiert. Die Trocknung des aufgereinigten AIBN's erfolgt bei Raumtemperatur, unter Lichtausschluss, für 24 Stunden im Hochvakuum. Gelagert wird es unter Lichtausschluss bei 253 K im Gefrierfach.

7.2.7 Herstellung des Makroinitiators

In einen 50 ml Rundkolben gibt man einen sauberen Magnetrührer, 2 g des Makroinitiatorprecursors und 20 ml einer Mischung aus Dichlormethan und Trifluoressigsäure (50:50). Die Suspension wird eine Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittelgemisch vom gequollenen Polymer entfernt. Das gelartige Produkt wird mehrmals mit Dichlormethan und Benzol gewaschen und durch Zugabe von

25 ml Wasser gefriergetrocknet. Die Gefrier Trocknung wird noch zweimal wiederholt, bevor der Initiator zur Herstellung von Polypeptidbürsten verwendet wird.

Ausbeute: 1.88 g (90 % der Theorie)

Eigenschaften: spröder, rosa Feststoff

7.2.8 Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von N- ϵ -Trifluoracetyl-L-lysins bzw. N- δ -Trifluoracetyl-L-ornithin

In einen ausgeheizten 1 l Dreihalskolben, bestückt mit einer Hantel, gibt man im Argongegenstrom 400 ml trocknen Ethanol und 9.22 g (400 mM) Natrium. Der Kolben wird mit einem Argonballon verschlossen und es wird bei Raumtemperatur gerührt, bis sich das Natrium vollständig aufgelöst hat. Anschließend werden 200 mM des Aminosäurehydrochlorids dazugegeben und das Reaktionsgemisch für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Zeit ist ein Feststoff ausgefallen, der mit Hilfe einer Fritte abfiltriert (Stickstoffgegenstrom) wird. Die Lösung wird bei diesem Prozess direkt in einen ausgeheizten 1 l Dreihalskolben mit Hantel überführt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 278 K abgekühlt und 41.6 g (300 mM) Ethyltrifluoracetat langsam dazugetropt. Es wird für weitere 2 Stunden bei 278 K gerührt, sowie 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Zeit wird das Produkt durch Zugabe von 12.12 g (200 mM) Essigsäure gefällt, mit Hilfe eines Büchnertrichters abfiltriert und mit Ethanol bzw. Aceton gewaschen. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Wasser/Ethanol aufgereinigt. Im Fall des N- ϵ -Trifluoracetyl-L-lysins werden 1.81 g Rohprodukt in 10 ml dest. H₂O aufgekocht und danach 15 ml kochendes Ethanol hinzugegeben. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht bei 277 K im Kühlschrank gelagert. Für das N- δ -Trifluoracetyl-L-ornithin wird die Menge an kochendem Ethanol auf 10 ml reduziert.

Durchschnittliche Ausbeute: 130 mM (65 % der Theorie)

Eigenschaften: farbloses, geruchloses Pulver

¹H-NMR des N- δ -trifluoracetyl-L-ornithin (D₂O; δ in ppm):

1.52-1.91 (m, 4H); 3.36 (t, 2H); 3.73 (t, 1H)

¹³C-NMR des N- ϵ -trifluoracetyl-L-ornithin (D₂O; δ in ppm):

23.5; 27.5; 38.9; 54.1; 117.6; 157.8; 174.2

$^1\text{H-NMR}$ des N- ϵ -trifluoracetyl-L-lysin (D_2O ; δ in ppm):

1.32-1.92 (m, 6H); 3.33 (t, 2H); 3.71 (t, 2H)

 $^{13}\text{C-NMR}$ des N- ϵ -trifluoracetyl-L-lysin (D_2O ; δ in ppm):

21.5; 27.2; 29.8; 39.1; 54.1; 117.6; 158.9; 174.5

7.2.9 Allgemeine Vorschrift zur Synthese von Leuchs'schen Anhydriden

Methode 1

In einen ausgeheizten 1 l Dreihalskolben, der mit einem KPG-Rührer und einem Rückflusskühler inklusive Trockenrohr ausgestattet ist, suspendiert man (0.089 mol) des zu phosgenierenden Aminosäurederivats in 600 ml trockenem Ethylacetat. Man verschließt den Kolben und erhitzt, bis das Reaktionsgemisch unter Rückfluss kocht. Anschließend gibt man 8.82 g (0.030 mol) Triphosgen auf einmal hinzu, verschließt den Kolben wieder und kocht für 4 bis 5 Stunden unter Rückfluss. Hat sich nach 4 Stunden keine klare Lösung entwickelt, gibt man ein weiteres Gramm Triphosgen hinzu. Nach Ablauf der Zeit wird mit Hilfe eines Eis-Kochsalzbades auf 268 K abgekühlt und 200 ml dest. H_2O (277 K) in das Reaktionsgemisch hinein geschüttet. Nach einer Minute intensiven Röhren schüttet man das 2-Phasengemisch in einen auf 275 K vorgekühlten Scheidetrichter und trennt die wässrige Phase ab. Anschließend wird die organische Phase noch mit 200 ml 0.5 %iger NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt, die wässrige Phase abgetrennt, und die organische Phase mit reichlich MgSO_4 getrocknet. Das Ausschütteln und Trocknen der organischen Phase mit den oben angegebenen wässrigen Lösungen sollte nicht länger als 15 Minuten dauern, damit Zersetzungen des Produkts vermieden werden. Nach dem Abtrennen des Trockenmittels durch Filtration wird die Ethylacetat-Lösung mit einem sauberen Rotationsverdampfer bei 293 K auf ein Drittel des ursprünglichen Volumens eingeeengt. Die restliche Lösung wird anschließend in 700 ml trockenes n-Hexan gegeben. Es wird für 12 Stunden bei 277 K gekühlt und das Rohprodukt (farbloser Feststoff) mit einem Büchnertrichter abgesaugt. Das noch verunreinigte Leuchs'sche Anhydrid wird durch dreifaches umkristallisieren aus Ethylacetat/n-Hexan aufgereinigt.

Bei der ersten Umkristallisation ist zu beachten, dass das zu aufreinigende Produkt sich meistens nicht vollständig in Ethylacetat löst, selbst wenn es für längere Zeit unter Rückfluss gekocht wird. Es ist zu empfehlen das Rohprodukt in etwa 200 bis 250 ml Ethylacetat zu suspendieren, für etwa 5 Minuten unter Rückfluss zu kochen und anschließend langsam mit derselben Menge an Nichtlösungsmittel zu versetzen. Nach der Zugabe des n-Hexans wird

für weitere fünf Minuten unter Rückfluss gekocht. Anschließend wird die Suspension über eine Glasfritte mit der Porengröße 3, durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuums, direkt in einen 1 l Dreihalskolben filtriert. Die Kristallisation aus der klaren Lösung tritt normalerweise spätestens 2 Stunden nach dem Filtrationsprozess bei Raumtemperatur ein. Haben sich keine Kristalle nach Ablauf dieser Zeit gebildet, sollte der gut verschlossene Kolben über Nacht im Kühlschrank bei 277 K aufbewahrt werden. Es ist nicht zu empfehlen die Kristallisation, durch Lagern im Gefrierfach bei Temperaturen unter 263 K zu erzwingen, weil durch diese Vorgehensweise das Produkt inklusive Verunreinigungen ausfallen wird. Haben sich nach 24 Stunden Lagerung im Kühlschrank keine Kristalle gebildet, muss man die Lösung unter Wasserausschluss noch mal für fünf Minuten unter Rückfluss erhitzen und soviel n-Hexan hinzugeben, bis sich eine Trübung einstellt. Die trübe Lösung muss anschließend wieder durch eine Glasfritte mit der Porengröße 3 in einen 1 l Dreihalskolben filtriert werden. Nach dem Abkühlen der Mutterlauge auf Raumtemperatur bzw. Lagerung für 24 Stunden bei 277 K, sollte der Kristallisationsprozess eingetreten sein. Das Produkt wird durch abnutschen über einen sauberen und trockenen Büchnertrichter isoliert. Das Leuchs'sche Anhydrid sollte innerhalb von 30 Minuten aus dem Büchnertrichter entfernt werden, um Zersetzungsreaktionen zu vermeiden. Die Trocknung des Produkts erfolgt im Hochvakuum für 24 Stunden.

Das Produkt was bei der ersten Umkristallisation erhalten wird, löst sich in der Regel ohne Schwierigkeiten in 200 ml Ethylacetat, wenn die Lösung unter Rückfluss erhitzt wird. In der Siedehitze wird anschließend langsam so viel n-Hexan hinzugegeben, bis eine dauerhafte Trübung eintritt. Die Mutterlauge wird wie bei der ersten Umkristallisation in einen 1 l Dreihalskoblen filtriert und bei Raumtemperatur gut verschlossen und für 2 Stunden gelagert. Die meisten Kristalle haben sich in der Regel nach Ablauf dieser Zeit schon gebildet. Zur Vergrößerung der Ausbeute wird die Mutterlauge, weitere 24 Stunden im Kühlschrank, bei 277 K gelagert.

Bei der dritten Umkristallisation sollte mit einem Startvolumen an Lösungsmittel zwischen 100 und 150 ml begonnen werden. Die Umkristallisation wird nach der gleichen Verfahrensweise durchgeführt, wie oben beschrieben.

Diese Methode ist für die Herstellung der Leuchs'schen Anhydride des Z-geschützten Poly-L-lysins, sowie der Benzyl-geschützten Poly-L-glutaminsäure zu empfehlen. Sie sollte nicht zur Herstellung der anderen Leuchs'schen Anhydriden verwendet werden, weil sich während der Phosgenierung in Ethylacetat keine klare Lösung bildet.

Durchschnittliche Ausbeute: (0.031 mol; 35 % der Theorie)

Eigenschaften: farbloser Feststoff; stark hydrolyseempfindlich

Methode 2

In einen ausgeheizten 1 l Dreihalskolben, der mit einem KPG-Rührer und einem Rückflusskühler inklusive Trockenrohr ausgestattet ist, suspendiert man (0.089 mol) des zu phosgenierenden Aminosäurederivats in 250 ml trockenem THF. Man verschließt den Kolben und erhitzt, auf 328 K. Anschließend gibt man 8.82 g (0.030 mol) Triphosgen auf einmal hinzu, verschließt den Kolben mit einem Septum und kocht das Reaktionsgemisch bei einer Temperatur von 328 K für 2.5 Stunden. Nach Ablauf der Zeit sollte eine klare Lösung entstanden sein, die auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Anschließend wird das Trockenrohr am Rückflusskühler durch eine Kernolive ersetzt, die mit einem Argonanschluss verbunden ist. Mit Hilfe einer Kanüle wird die Reaktionslösung, durch anlegen eines Argonstroms, in einen Kolben mit 1 l trockenem n-Hexan überführt. Der Kolben wird über Nacht bei 277 K im Kühlschrank gelagert und das ausgefallene Produkt anschließend über einen Büchnertrichter abgenutscht und an der Ölpumpe getrocknet.

Die Umkristallisation des Rohprodukts erfolgt wie in Methode 1 beschrieben. Es ist allerdings zu beachten, dass die erste Umkristallisation schwieriger ist, als unter den Voraussetzungen in Methode 1. Durch das Waschen der organischen Phase mit wässrigen Lösungen werden in Methode 1 die meisten Salze, die während der Reaktion entstehen, aus dem Rohprodukt entfernt. In Methode 2 müssen diese Verunreinigungen während der ersten Umkristallisation beseitigt werden, was zur Folge hat, dass sich das Rohprodukt unter keinen Umständen in kochendem Ethylacetat vollständig lösen wird. Es ist zu empfehlen die Mengenangaben, die in Methode 1 beschrieben werden strikt einzuhalten, damit nicht zu viel Produkt während des Filtrationsprozesses verloren geht. Des Weiteren ist es wichtig, dass Fritte und 3-Halskolben vorgeheizt werden, weil andernfalls die Gefahr besteht, dass das Produkt schon während der Filtration in der Fritte zusammen mit den Verunreinigungen auskristallisiert. Diese Vorgehensweise ist auch für die Umkristallisationen in Methode 1 empfehlenswert. Im Gegensatz zu Methode 1, kann diese Vorschrift für die Herstellung aller Leuchs'schen Anhydride verwendet werden, die in dieser Arbeit hergestellt wurden.

Durchschnittliche Ausbeute: (0.04 mol; 45 % der Theorie)

Eigenschaften: farbloser Feststoffe; stark hydrolyseempfindlich

¹H-NMR des Anhydrid von N-ε-benzoyloxycarbonyl-L-lysin (CDCl₃, TMS; δ in ppm):

1.21-1.54 (m, 4H); 1.55-2.05 (m, 2H); 3.16 (q, (2H)); 4.23 (t, 1H); 4.90 (s, 1H); 5.07 (s, 1H); 6.85 (s, 1H); 7.33 (m, 5H)

¹H-NMR des Anhydrid von N-δ-benzoyloxycarbonyl-L-ornithin (CDCl₃, TMS; δ in ppm):

1.47-1.98 (m, 4H); 3.18 (q, 2H); 4.27 (t, 1H); 5.06 (s, 2H); 7.17 (s, 1H); 7.31 (m, 5H)

¹H-NMR des Anhydrid von N-ε-trifluoracetyl-L-lysin (Aceton d₆, TMS; δ in ppm):

1.41-1.70 (m, 4H); 1.75-1.96 (m, H); 3.37 (q, 2H); 4.56 (t, 1H); 7.94 (s, 1H); 8.47 (s, 1H)

¹H-NMR des Anhydrid von N-δ-trifluoracetyl-L-ornithin (Aceton d₆, TMS; δ in ppm):

1.47-2.06 (m, 4H); 3.42 (q, 2H); 4.56 (t, 1H); 7.94 (s, 1H); 8.52 (s, 1H)

¹H-NMR des Anhydrid von L-glutaminsäure-γ-benzylester (CDCl₃, TMS; δ in ppm):

2.04-2.29 (m, 2H); 2.58 (t, 2H); 4.34 (m, 1H); 5.12 (s, 2H); 6.57 (s, 1H); 7.34 (m, 5H)

¹H-NMR des Anhydrid von L-glutaminsäure-γ-methylester (Aceton d₆, TMS; δ in ppm):

2.02-2.26 (m, 2H); 2.53 (t, 2H); 3.63 (s, 3H); 4.59 (m, 1H); 7.92 (s, 1H)

¹H-NMR des Anhydrid von L-asparaginsäure-γ-benzylester (Aceton d₆, TMS; δ in ppm):

3.10 (m, 2H); 4.80 (m, 1H); 5.16 (s, 1H); 7.37 (m, 5H); 7.84 (s, 1H)

7.2.10 Aufreinigung von DMF für die ringöffnende Polymerisation von Leuchs'schen Anhydriden

In einen unter Schutzgas ausgeheizten 250 ml Schlenkkolben gibt man im Argongegenstrom 140 ml DMF, welches über Molekularsieb getrocknet wurde, einen Magnetrührer und 15 g Bariumoxid. Der Kolben wird mit einem Argonballon verschlossen und das Ganze über Nacht bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Nach Ablauf der Zeit wird das aufgereinigt DMF im Argongegenstrom in einen anderen, zuvor ausgeheizten Schlenkkolben (inklusive Magnetrührer), filtriert und mit 15 g trockenem Magnesiumsulfat versetzt. Anschließend wird dieser Kolben unter Schutzgas mit einer ausgeheizten Destillationsapparatur, bestehend aus einer Kolonne (25 cm), Kühler und Spinne mit 3 Schlenkkolben, verbunden. Der Vorlagekolben wird mit Hilfe eines thermostatisierten Wasserbads konstant auf 25 °C gehalten (auf keinen Fall eine höhere Temperatur einstellen) und das DMF im Hochvakuum ($1 \cdot 10^{-2}$ mbar) überkondensiert. Der Kolben in dem das DMF hineinkondensiert wird, wird mit Aceton/Trockeneis (253 K) gekühlt. Für die Polymerisation sollten etwa 25 ml überkondensiert werden, wobei die ersten 5 ml verworfen werden. Nach Abschluss der Destillation wird der Kolben mit der Hauptfraktion im Argongegenstrom mit einem Septum verschlossen und in Alufolie eingewickelt (Lichtausschluss).

Das DMF sollte noch am gleichen Tag für die Polymerisation verwendet werden, weil ansonsten Verunreinigungen durch Zersetzung des DMF's entstehen, die lineare Verunreinigungen während der Polymerisation erzeugen können.

7.2.11 Herstellung einer geschützten Polypeptidbürste nach der grafting-from-Methode

In ein Rollrandzentrifugenglas inklusive sauberen Magnetrührer gibt man die benötigte Menge Makroinitiator zur Herstellung der Polypeptidbürste. Das Glas wird mit dem dafür vorgesehenen Deckel verschlossen, indem vorher mehrere Löcher mit einer Nadel hineingestochen werden. Anschließend wird das verschlossene Rollrandzentrifugenglas in einen Schlenkkolben platziert und bei Raumtemperatur über Nacht im Hochvakuum ($1 - 2.5 \cdot 10^{-2}$ mbar) getrocknet. Nach Ablauf der Zeit wird in einem sehr sauberen Schlenkkolben, inklusive Magnetrührer die benötigte Menge an Leuchs'schen Anhydrid gegeben, der Kolben anschließend mit einem Septum verschlossen und für 1 Stunde im Hochvakuum evakuiert. Danach wird dieser Kolben und der Kolben mit dem Makroinitiator unter Schutzgas gesetzt und das verschlossene Rollrandzentrifugenglas unter einen Argontrichter platziert. Es wird die benötigte Menge an aufgereinigtem DMF (1 ml DMF für 17.5 mg Makroinitiator) durch die Löcher des Deckels mit einer Spritze hinzugegeben und heftig gerührt, bis der Makroinitiator vollständig in Lösung gegangen ist (1-2 Stunden). Anschließend wird der Kolben mit dem Monomer mit der benötigten Menge an DMF versetzt (2 ml für 1 g Monomer) und die Lösung des Makroinitiators dazugespritzt, nach dem sich das Monomer vollständig aufgelöst hat (ca. 1 Minute). Nach der Zugabe des Initiators wird der Schlenkkolben in ein vortemperiertes Ölbad (333 K) platziert und mit Alufolie abgedeckt. Es wird für 3 Tage bei konstanter Temperatur polymerisiert und danach das gelartige Reaktionsgemisch durch Zugabe von DMF bei Raumtemperatur gelöst. Ist das Polymer vollständig in Lösung gegangen, wird es in Diethylether (10-facher Überschuss) gefällt und durch Zentrifugation isoliert. Danach wird es in Wasser suspendiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. In den meisten Fällen ist es nicht möglich, das Polymer wieder durch Zugabe von DMF in Lösung zu bringen. In diesem Fall wird trotzdem etwa 50-100 ml DMF zur gelartigen Masse hinzugegeben und solange gerührt, bis sich die Probe von der Kolbenwand abgelöst hat. Die Verwendung eines Spatels ist hierbei äußerst empfehlenswert. Anschließend wird weiter verfahren, wie oben beschrieben. Die unten stehende Tabelle zeigt die Polymerisationsansätze und die Ausbeuten, die für die verschiedenen Polypeptidderivate erzielt wurden.

Tabelle 7.2.11.1: Ansätze zur Herstellung von geschützten Polypeptidbürsten

Probe	Makroinitiator/mg	Leuchs'sches Anhydrid/g	DMF/ml	Ausbeute/g
Z-Lys 55	35	2	6	1.55
Z-Lys 25	35	0.91	3.82	0.68
Z-Orn 55	35	1.91	5.82	1.46
TFA-Lys 25	35	0.79	3.58	0.59
TFA-Orn 55	35	1.66	5.32	1.17
Bn-Glu 55	35	1.72	5.44	1.22
Bn-Asp 55	35	1.63	5.26	1.51
Me-Glu 55	35	1.16	4.32	0.82

7.2.12 Abspaltung der Z-Schutzgruppe zur Herstellung einer entschützten Poly-L-lysinbürste

In ein 50 ml Rollrandzentrifugenglas gibt man 300 mg der Z-geschützten Poly-L-lysinbürste, einen sauberen Magnetrührer und 3 ml Trifluoressigsäure. Das Gefäß wird mit einem Uhrglas abgedeckt und die Mischung solange gerührt, bis die Bürste in Lösung gegangen ist (ca. 1-2 Stunden). Anschließend werden 40 ml HBr/Eisessig hinzugefügt und das Gefäß wieder mit dem Uhrglas abgedeckt. Nach der Zugabe der Säuremischung entsteht zu Anfang eine klare Lösung, in der nach etwa 30 min ein weißer Feststoff ausfällt. Nach einer weiteren Stunde, wird das Ganze mit Hilfe einer Pipette in 500 ml Diethylether gegeben und der Feststoff durch Zentrifugation abgetrennt. Der Feststoff wird mehrere Male mit Diethylether gewaschen und anschließend in 30 ml dest. H₂O aufgelöst. Die Lösung wird in einen Dialysebeutel gegeben und 5 Tage gegen 5 l dest. H₂O dialysiert. Das Wasser wird während dieser Zeit zweimal pro Tag ausgetauscht. Nach Abschluss der Aufreinigung durch Dialyse wird das Produkt gefriergetrocknet.

Ausbeute: 129 mg (54 % der Theorie)

Eigenschaften: weißer, hygroskopische Feststoff

7.2.13 Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe zur Herstellung einer entschützten Poly-L-glutaminsäurebürste bzw. Poly-L-asparaginsäurebürste

Die Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe erfolgt nach der gleichen Vorgehensweise wie im Fall der Z-Schutzgruppe. Die Reaktionszeit nach Zugabe von HBr/Eisessig wird jedoch auf 2.5 Stunden erhöht. Die Ausbeuten sind vergleichbar mit denen in 7.2.12.

7.2.14 Abspaltung der TFA-Schutzgruppe zur Herstellung einer entschützten Poly-L-ornithinbürste

680 mg TFA-geschütztes Poly-L-lysin wird bei Raumtemperatur in 15 ml 1 M methanolischem Piperidin gelöst. Nach 2 Stunden werden 10 ml wässrige Piperidinlösung (1 M) dazugegeben. Die Reaktionslösung wird für weitere 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Zeit ist eine klare Lösung entstanden, die für 2 Tage in destilliertem Wasser, 3 Tage in 0.01 N HBr-Lösung und weitere 3 Tage in destilliertem Wasser dialysiert wird. Anschließend wird die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 293 mg (50 % der Theorie)

Eigenschaften: weißer hygroskopischer Feststoff

7.2.15 Abspaltung der Methylschutzgruppe zur Herstellung einer entschützten Poly-L-glutaminsäurebürste

300 mg der Methyl-geschützten Poly-L-glutaminsäurebürste werden in 50 ml 0.2 N NaOH gegeben. Nach etwa 30 Minuten hat sich der Feststoff vollständig gelöst. Die Lösung wird für weitere 48 Stunden gerührt und anschließend für 5 Tage gegen dest. H₂O dialysiert. Das Wasser sollte täglich zweimal gewechselt werden. Nach Ablauf der Zeit wird die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 150 mg (50 % der Theorie)

Eigenschaften: weißer hygroskopischer Feststoff

7.2.16 Herstellung von Tetramethylammoniumtriflat

30 ml einer 25 %igen Tetramethylammoniumhydroxidlösung werden in einen 100 ml Einhalskolben, inklusive Magnetprüher vorgelegt. Die Ganze wird mit einer Eis-Kochsalz-Mischung auf 273 K abgekühlt und portionsweise 9.5 g (0.083 mol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 1 Stunde bei 273 K gerührt und weitere 1.5 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wird die wässrige Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 15.3 g (0.081 mol; 99 % der Theorie)

Eigenschaften: weiße, geruchslose Kristalle

7.3 Verwendete Geräte

7.3.1 GPC-Messungen

Die in dieser Arbeit gezeigten GPC-Chromatogramme wurden in DMF + 1 g/l LiBr bei einer Temperatur von 333 K gemessen. Als Säulenmaterial wurde vernetztes Polystyrol (MZ-Analysentechnik; MZ-SDplus; 5 mm Material 300 x 8 mm) verwendet. Die Porengrößen der Säulen betragen 10, 10², 10³, 10⁴ und 10⁵ nm. Der Fluss hatte einen konstanten Wert von 1 ml/min während allen Messungen. Das UV-Signal wurde bei 280 nm detektiert.

Zur Signaldetektion wurde ein UV-Detektor der Firma Waters (486) und ein RI-Detektor der Firma Hitachi (L-2490) eingesetzt. Als Pumpe wurde für diese Anlage das Modell L-7110 von Hitachi verwendet. Der Degasser stammt von der Firma Waters (Modell AF).

7.3.2 HPLC-Messungen

Die HPLC-Messungen wurden an einer RP18-Säule (Mz-Analysentechnik; Mz-Lichrospher, Durchmesser: 4 mm, Länge 250 mm, Partikelgröße: 5µm) durchgeführt. Entgast wurde das Laufmittel mit einem Degasser EC3114 und befördert mit einer Pumpe der Firma Hitachi Modell L7100. Die Ofentemperatur betrug bei jeder Messung 323 K. Pro Messung wurden 20 µl eingespritzt.

7.3.3 GC-Messungen

Die GC-Messungen wurden an einem HP 5890A Gaschromatograph durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem FID-Detektor. Die Auftrennung erfolgte an einer universell einsetzbaren Kapillarsäule (HP-5, 30 m, 0.32 mm, 0.25 µm).

Das Einspritzvolumen betrug 2 µl, die Konzentration 1 g/l und die Einspritztemperatur 523 K. Der Ofen wurde mit folgendem Temperaturprogramm betrieben:

373 K $\xrightarrow{3 \text{ min}}$ 373 K $\xrightarrow{8 \text{ K/min}}$ 573 K $\xrightarrow{2 \text{ min}}$ 573 K

7.3.4 CE-Messungen

Die Analysen durch Kapillarelektrophorese wurden an einer Apparatur der Firma Agilent Technologies (7100 Capillary) durchgeführt. Die Detektion des Signals erfolgte mit einem

UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 200 nm. Die genauen Messbedingungen sind in den Bildunterschriften der Spektren vermerkt.

7.3.5 Statische und dynamische Lichtstremessungen

Die statischen Lichtstremessungen wurden an einer Anlage durchgeführt, die mit einem Helium-Neon-Laser (JDS Uniphase 1145p-3083, Wellenlänge 632,8 nm, Leistung 25 mW) betrieben wird. Die Detektionseinheit besteht aus einem Goniometer ALV-SP-86, einem ALV/High QEAPD Avalanche-Photodioden / Faseroptikdetektionssystem und dem Digital Korrelator / Strukturator ALV-3000, alles von der Firma ALV, Langen.

Für die dynamischen Lichtstremessungen wurde neben der beschriebenen Anlage eine weitere Anlage verwendet. Diese bestand aus einem Goniometer SP-125 mit ALV/SO-SIPD Single Photon Detector (Lichtwellenleiter-Optik), einem ALV-5000 / EPP / 60X0 Multitau Realtime Digital Correlator, alles von der Firma ALV, Langen, und wurde mit einem Argon-Ionen-Laser (Spectra Physics Stabilite 2060-4S, Wellenlänge 514,5 nm, Leistung 500 mW) betrieben.

Vermessen wurden die Lösungen in Küvetten aus Quarzglas der Firma Hellma, Müllheim, bei einer Messtemperatur von 20°C.

Bevor die filtrierte Polymerprobe in die Küvetten gegeben wurde, wurden diese mit Aceton staubfrei gespült. Die Porengröße des Filters betrug in allen Fällen 450 nm (GHP).

7.3.6 SAXS-Messungen

Die SAXS-Messungen wurden an einer selbstgebauten Anlage der Gruppe von Prof. Dr. Jan Skov Pedersen (Aarhus, Dänemark) durchgeführt.

7.3.7 NMR-Messungen

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem Bruker 300 Ultra Shield bei 293 K gemessen. Die Messzeit betrug 7 Minuten für die ^1H -Spektren und 3 Stunden für die ^{13}C -Spektren. Die Temperatur betrug bei allen Messungen 293 K.

7.3.8 CD-Messungen

Die CD-Messungen wurden mit dem Modell J-815 der Firma Jasco gemessen. Alle Messungen wurden ausnahmslos im step-scan-Mode durchgeführt. Als Detektor wurde ein

Halbleiterdetektor verwendet. Die genauen experimentellen Details sind in den Bildunterschriften einzusehen.

7.3.9 UV-VIS

Für die UV-Vis-Messungen wurde das Modell 100 Bio der Firma Cary verwendet. Die Scangeschwindigkeit betrug bei allen Messungen 20 nm/min. Die Basislinie wurde separat aufgenommen und von Hand abgezogen. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 298 K aufgenommen.

7.3.10 dn/dc-Messungen

Für die Bestimmung des Brechungsindexinkrements wurde in diesem Arbeitskreis ein Gerät verwendet, welches nach dem interferometrischen Prinzip bei einer Wellenlänge von 632.8 nm arbeitet. Vermessen wurden mindestens 5 Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

7.3.11 AFM-Messungen

Die AFM-Aufnahmen wurden mit einem MultiModeTM Scanning Probe Microscope, ausgestattet mit einem Nanoscope IIIa-Controller, der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, USA, im tappingTM-Modus erhalten. Die verwendeten Cantilever (Resonanzfrequenz ungefähr 300 kHz, Spitzenmaterial Silicium) wurden von der Firma Nanosensors, Wetzlar Blankenfeld, bezogen. Als Substrat diente frisch gespaltenes Mica bzw. Graphit, zugeschnitten auf eine Größe von ca. 1 cm².

8. Anhang

8.1 Zusätzliche Daten und Ergebnisse

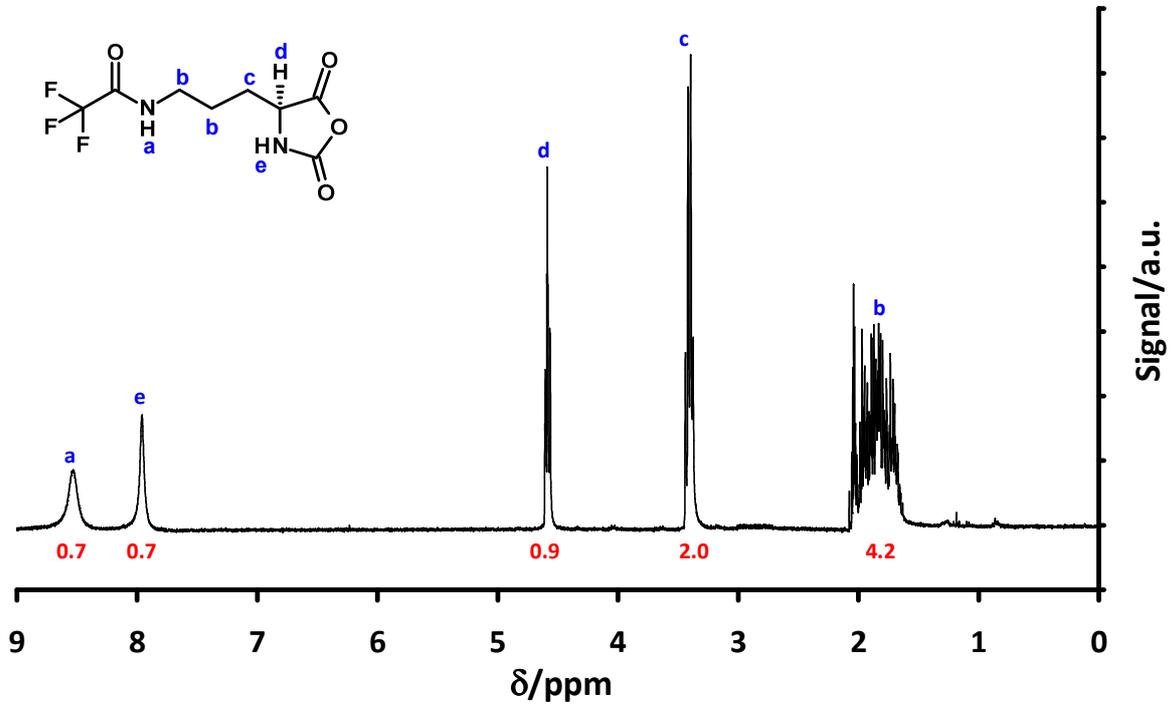


Abbildung 8.1.1: $^1\text{H-NMR}$ des Leuchs'schen Anhydrids von TFA-geschützten L-ornithin
(300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: Aceton d_6 , $c=20\text{ g/l}$)

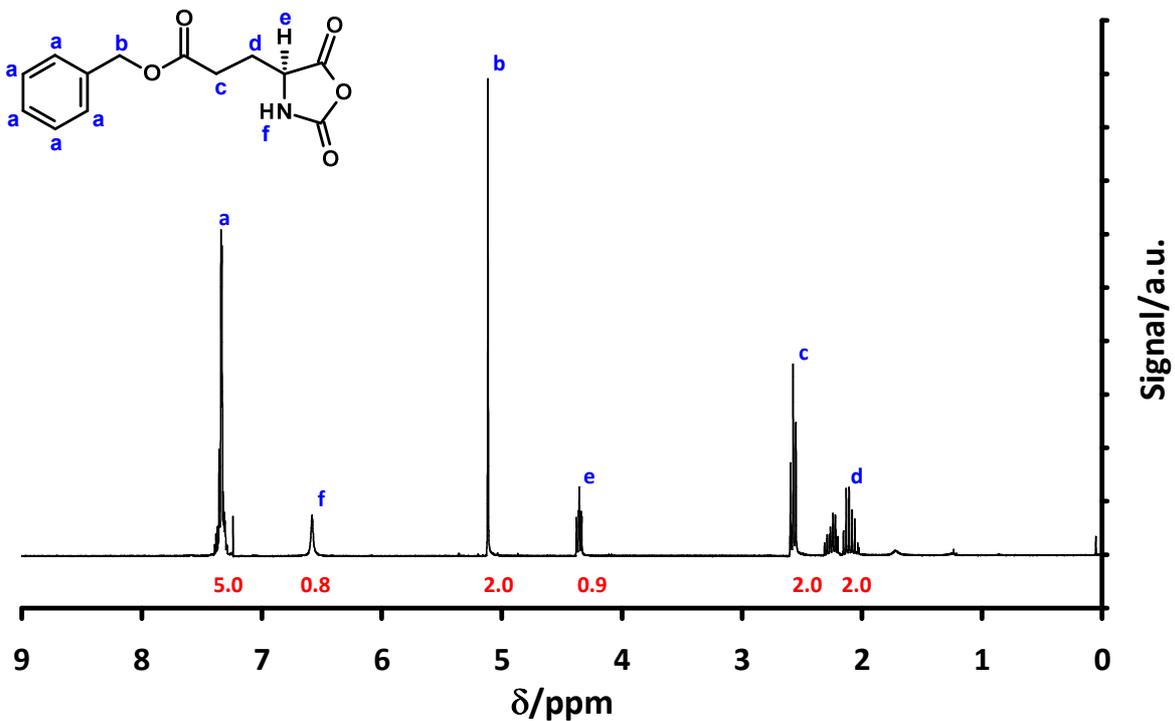


Abbildung 8.1.2: $^1\text{H-NMR}$ des Leuchs'schen Anhydrids von Benzyl-geschützter L-glutaminsäure
(300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3 , $c=20\text{ g/l}$)

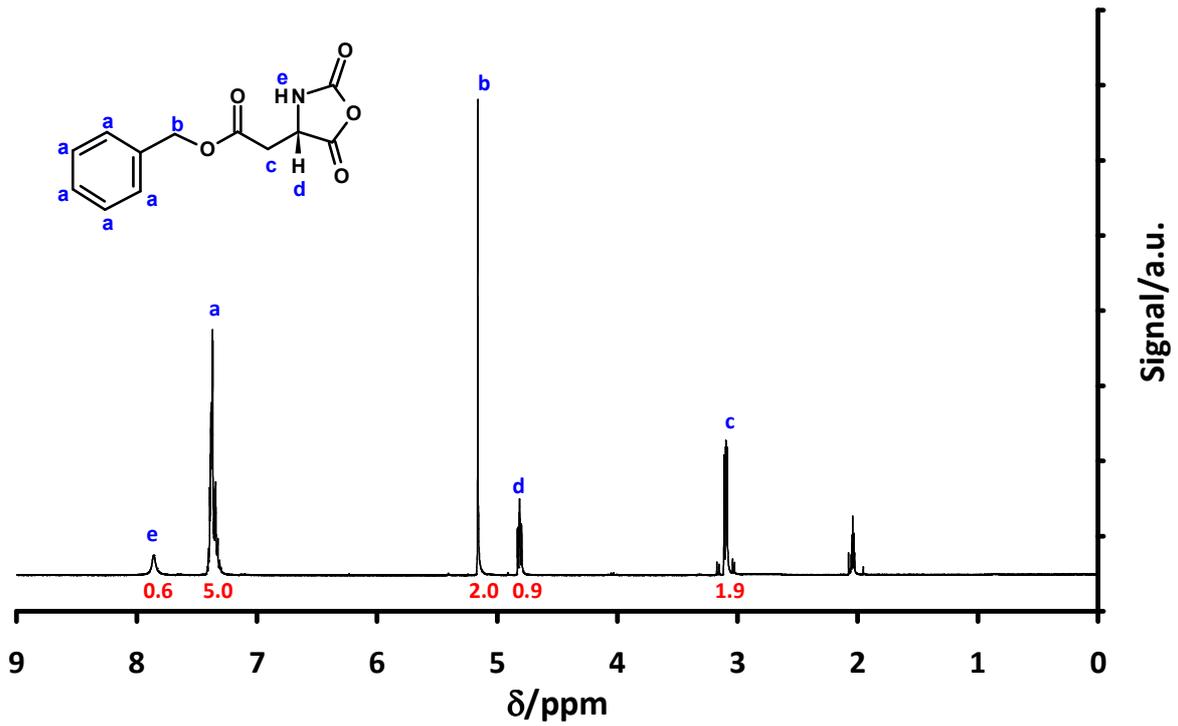


Abbildung 8.1.3: $^1\text{H-NMR}$ des Leuchs'schen Anhydrids von Benzyl-geschützter L-asparaginsäure (300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: Aceton d_6 , $c=20\text{ g/l}$)

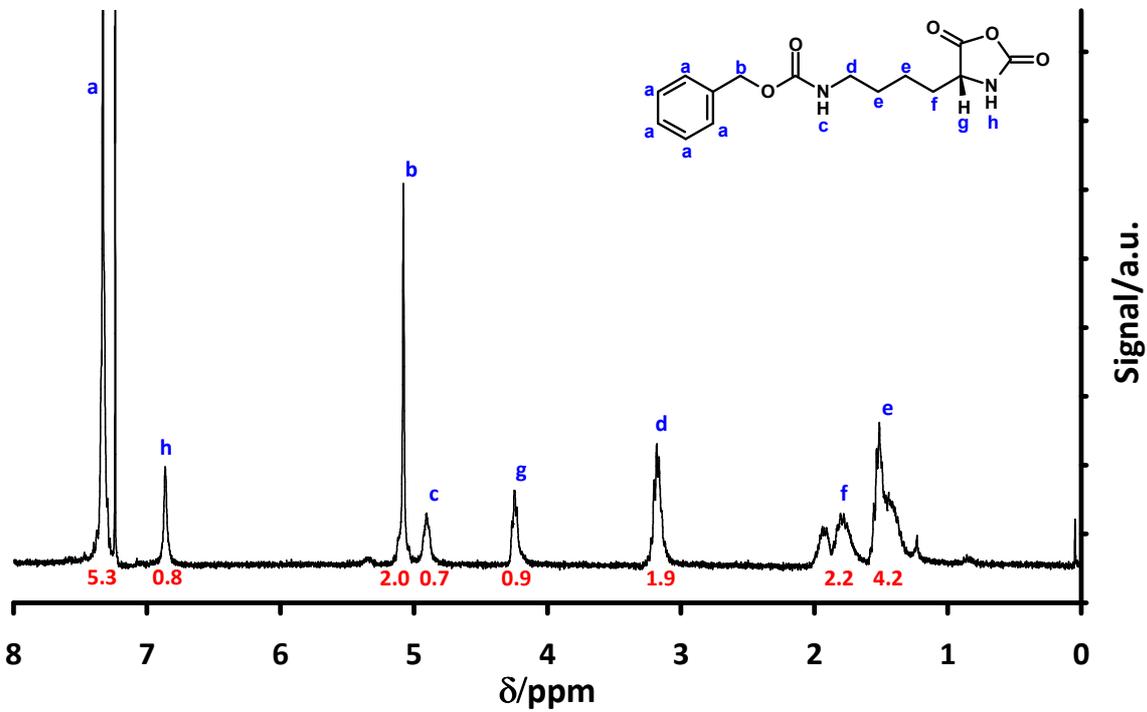


Abbildung 8.1.4: $^1\text{H-NMR}$ des Leuchs'schen Anhydrids von Z-geschütztem L-lysin (300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3 , $c=20\text{ g/l}$)

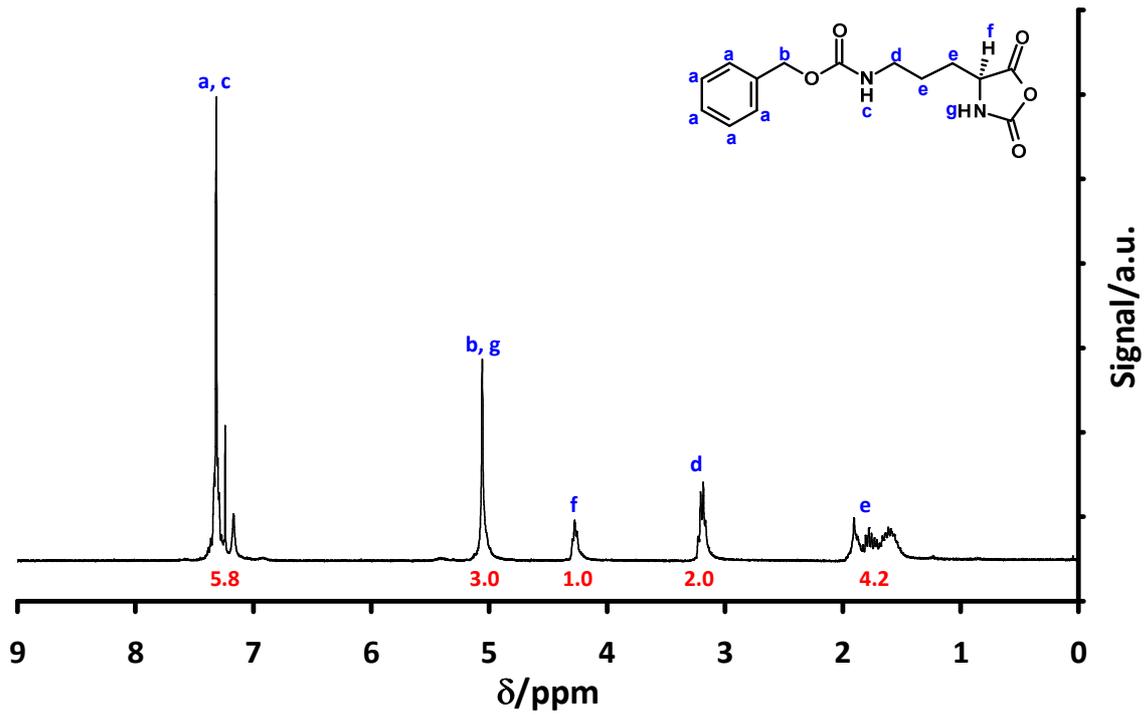


Abbildung 8.1.5: $^1\text{H-NMR}$ des Leuchs'schen Anhydrids von Z-geschütztem L-ornithin
(300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3 , $c=20\text{ g/l}$)

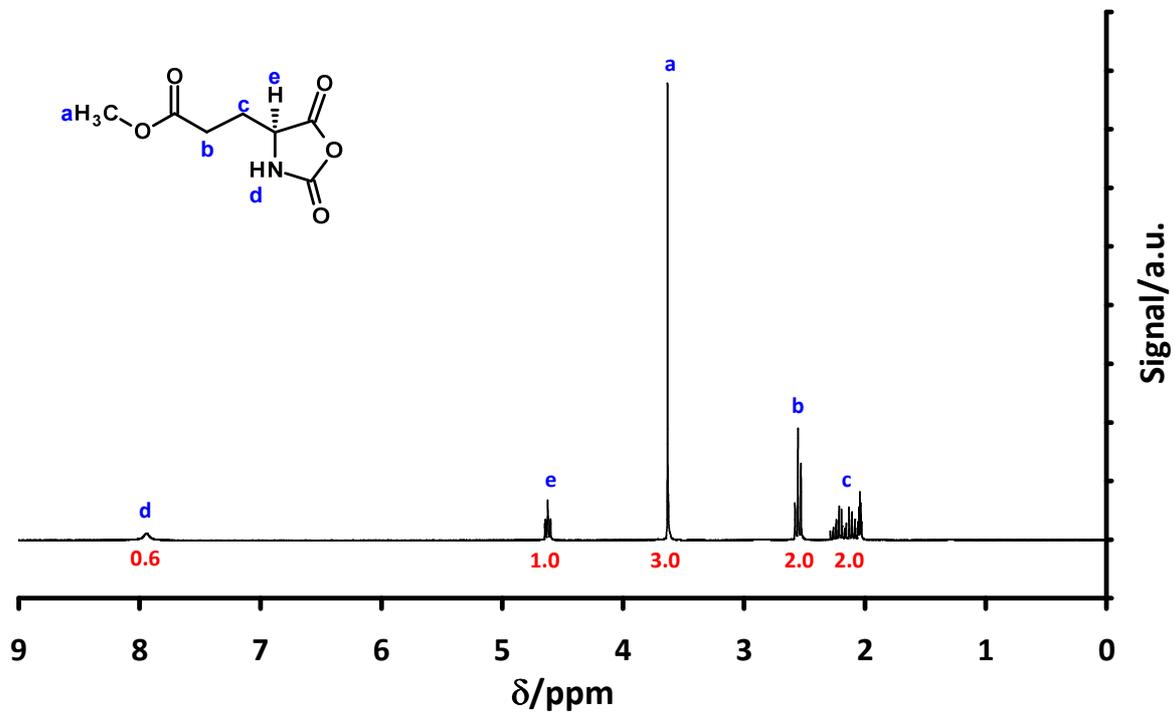


Abbildung 8.1.6: $^1\text{H-NMR}$ des Leuchs'schen Anhydrids von Z-geschütztem L-ornithin
(300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3 , $c=20\text{ g/l}$)

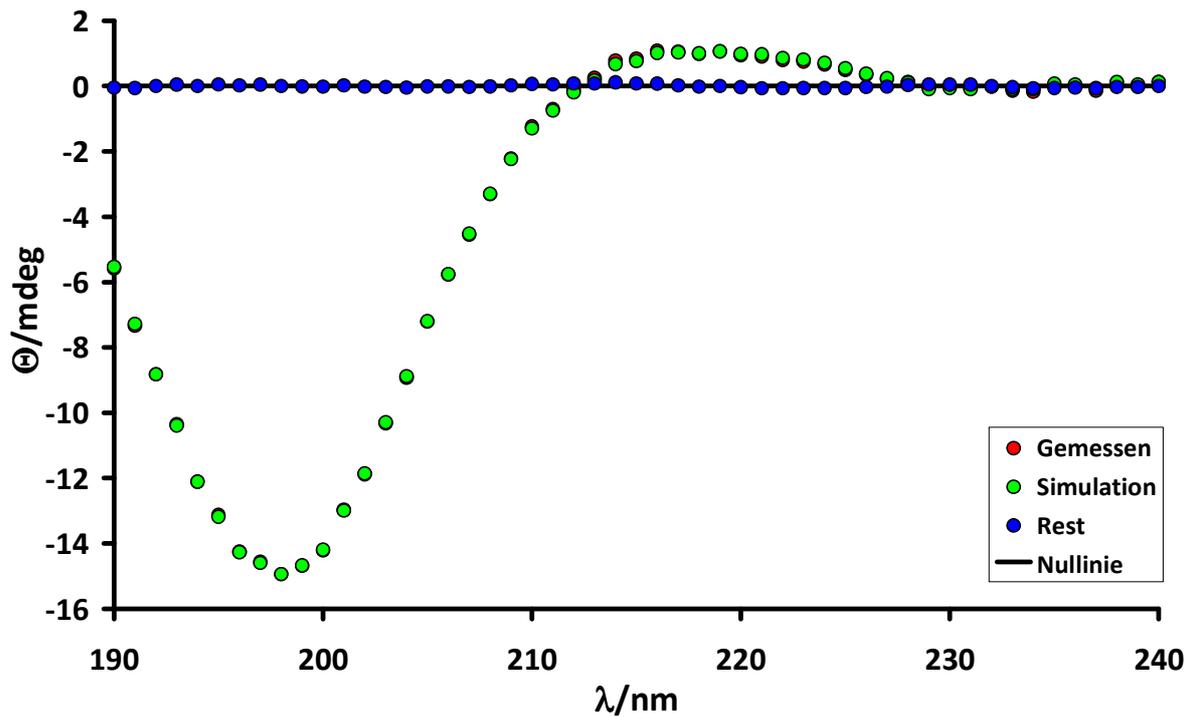


Abbildung 8.1.7: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in H_2O ; $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 0 %; β -Faltbalttanteile: 22 %; Turns: 18 %; ungeordnete Anteile: 60 %

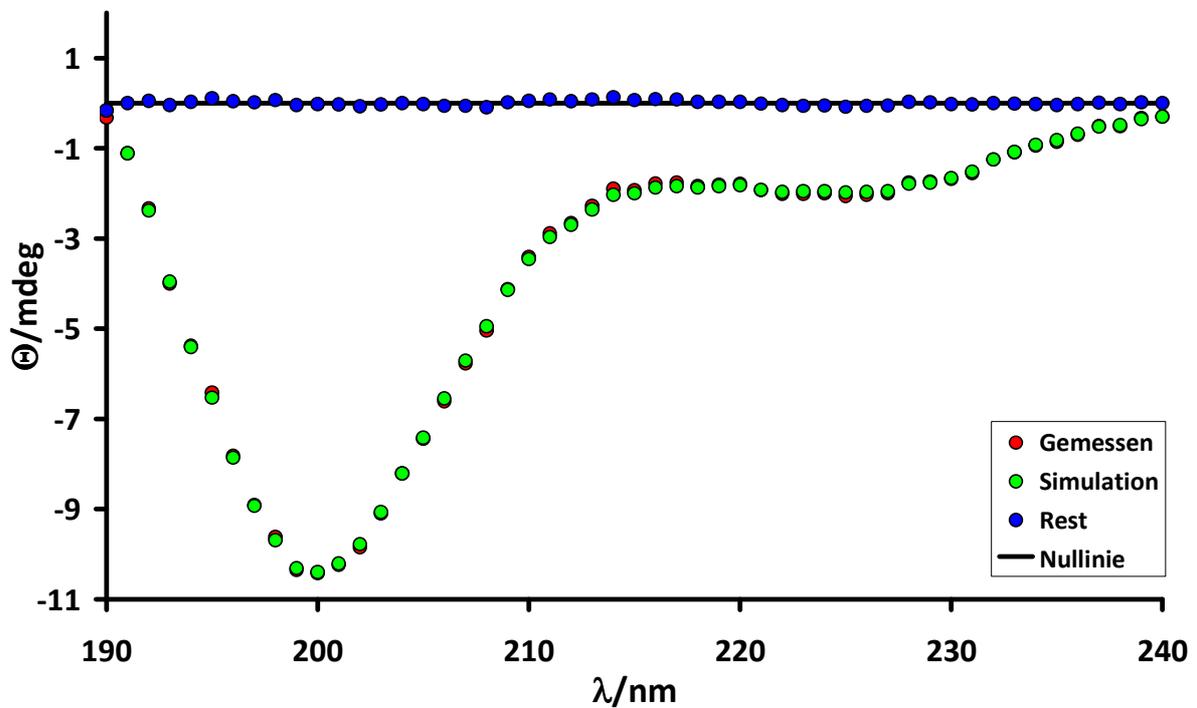


Abbildung 8.1.8: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in 0.1 N $NaClO_4$; $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 6 %; β -Faltbalttanteile: 7 %; Turns: 11 %; ungeordnete Anteile: 67 %

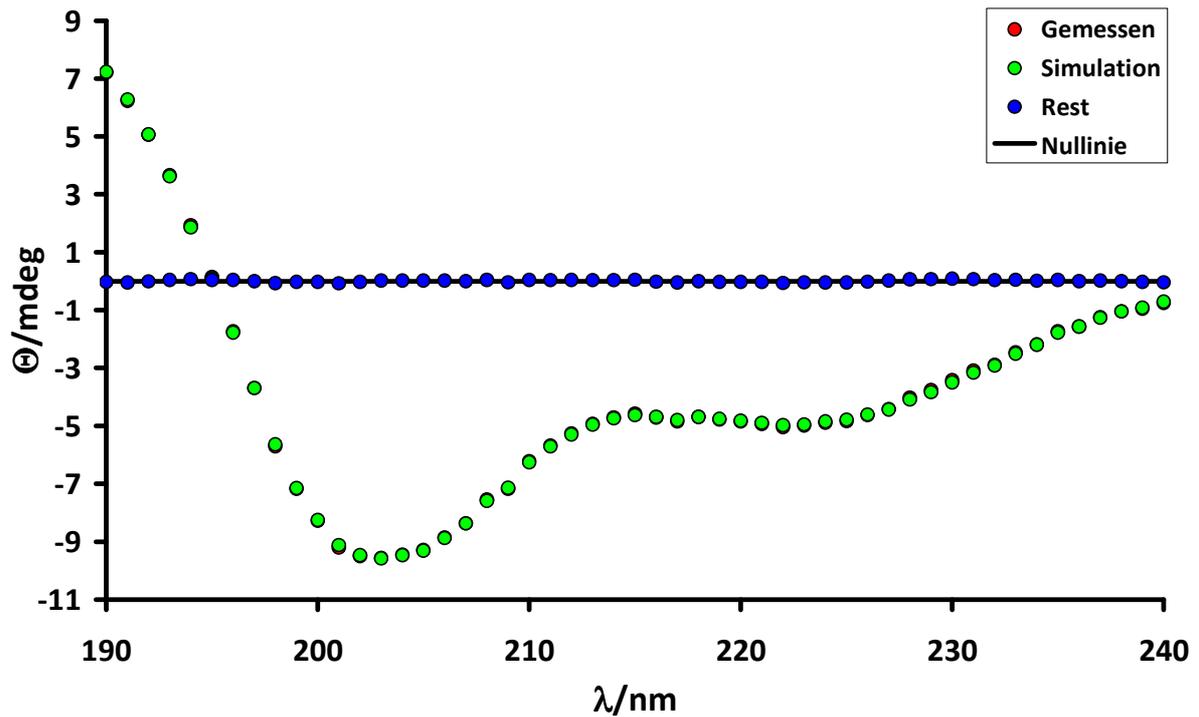


Abbildung 8.1.9: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in 0.25 N NaClO₄; c=0.1 g/l;
 Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α-Helikale Anteile: 20 %; β-Faltbalttanteile: 6 %; Turns: 16 %; ungeordnete Anteile: 31 %

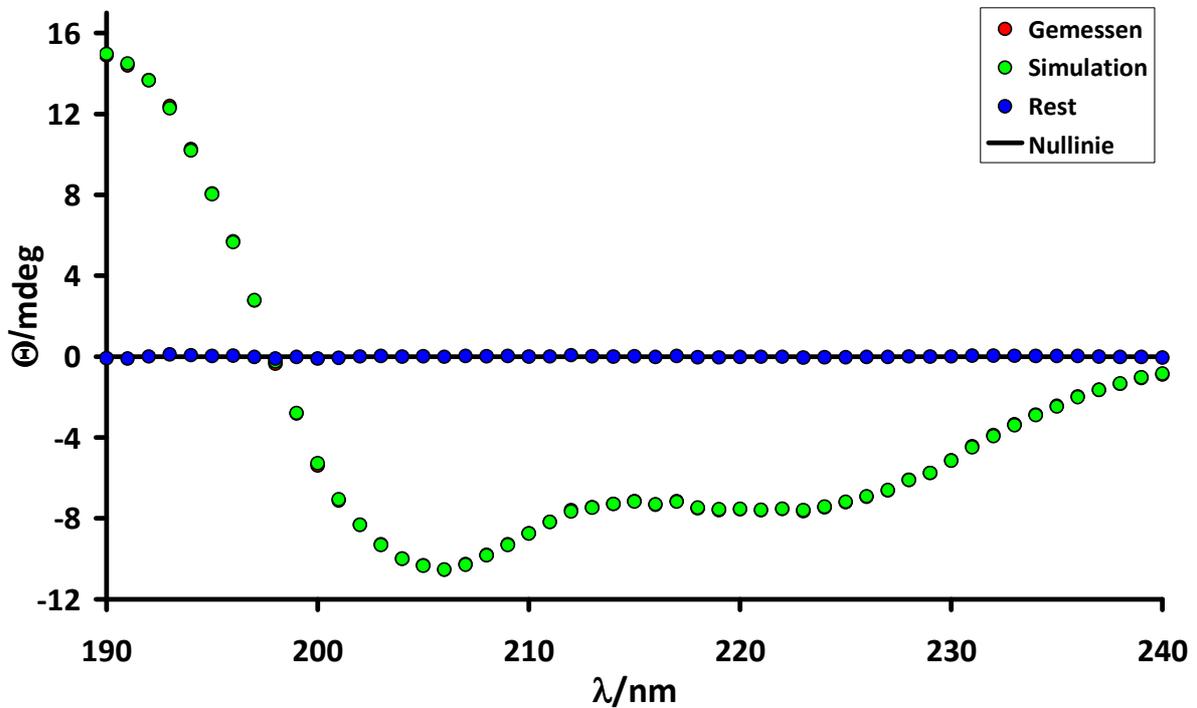


Abbildung 8.1.10: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in 0.5 N NaClO₄; c=0.1 g/l;
 Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α-Helikale Anteile: 53 %; β-Faltbalttanteile: 10 %; Turns: 11 %; ungeordnete Anteile: 25 %

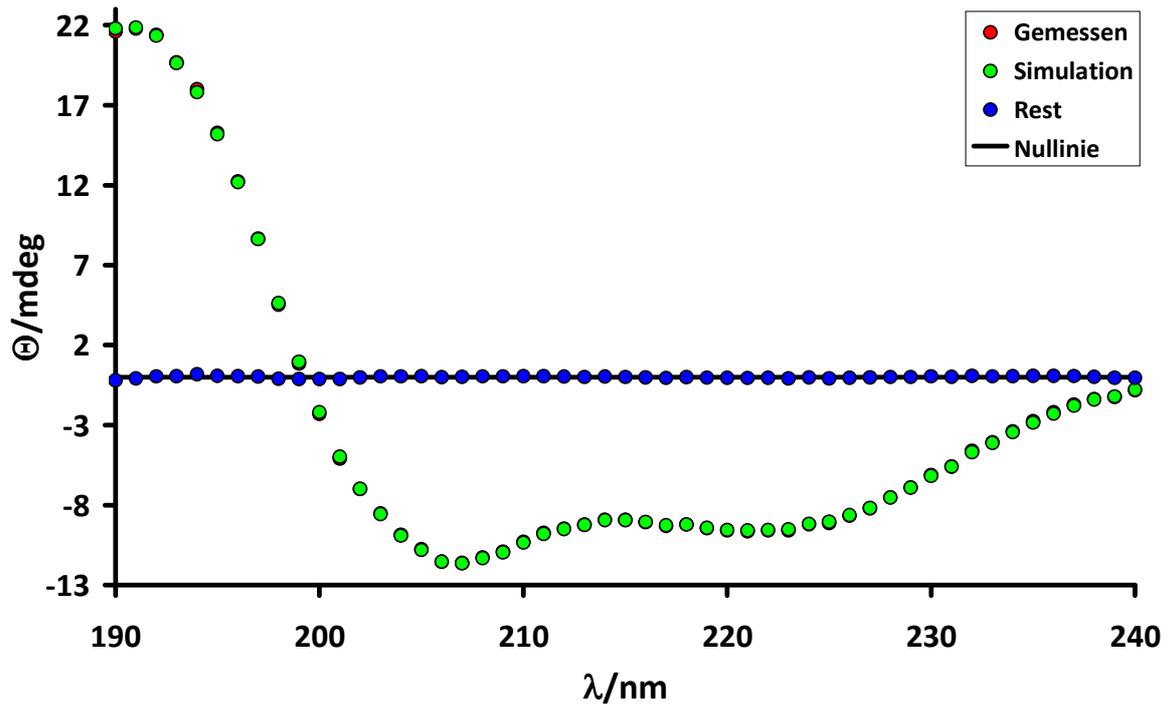


Abbildung 8.1.11: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in 1.0 N NaClO₄; c=0.1 g/l;
 Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 67 %; β -Faltbalttanteile: 6 %; Turns: 9 %; ungeordnete Anteile: 18 %

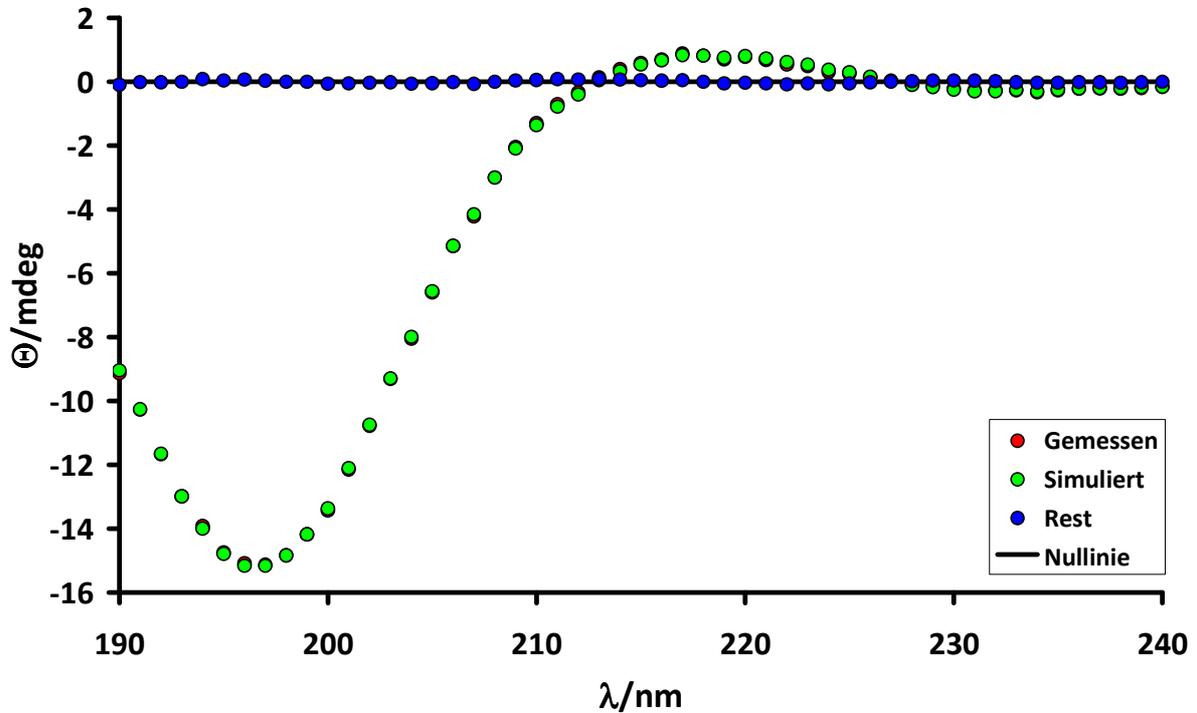


Abbildung 8.1.12: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in H₂O; c=0.1 g/l; Küvettendicke: 1 mm;
 Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 0 %; β -Faltbalttanteile: 17 %; Turns: 14 %; ungeordnete Anteile: 69 %

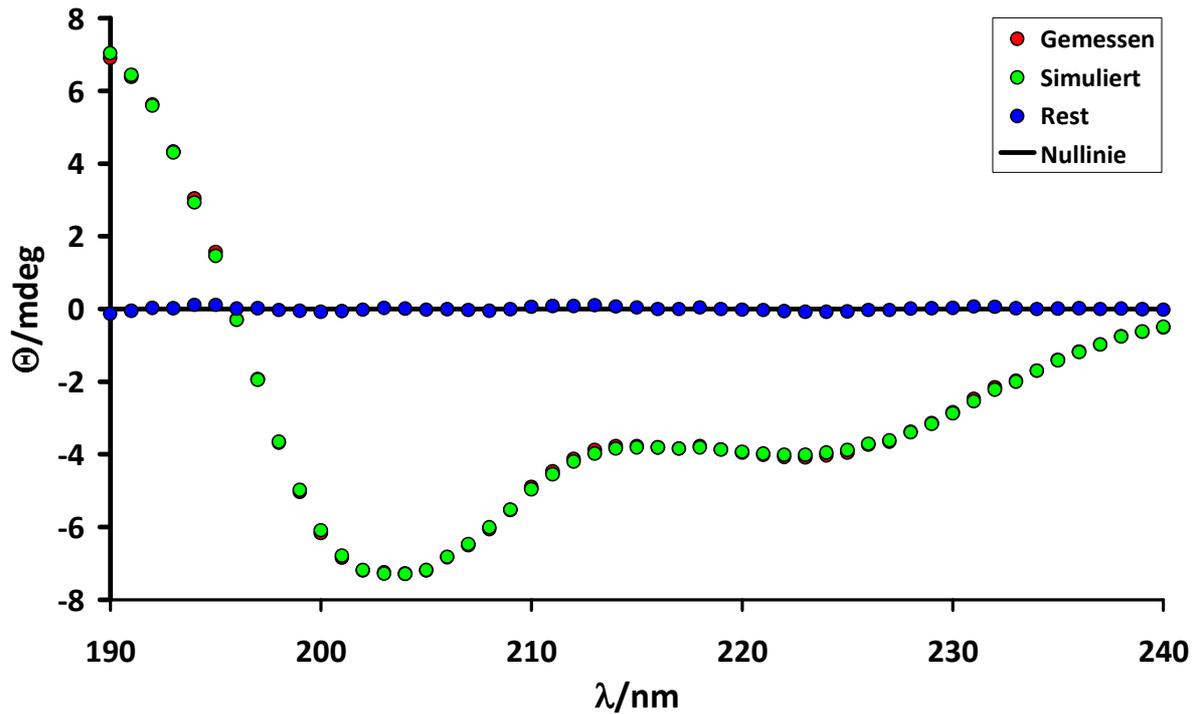


Abbildung 8.1.13: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in 0.1 N NaClO₄; c=0.1 g/l;
 Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α-Helikale Anteile: 24 %; β-Faltbalttanteile: 16 %; Turns: 15 %; ungeordnete Anteile: 45 %

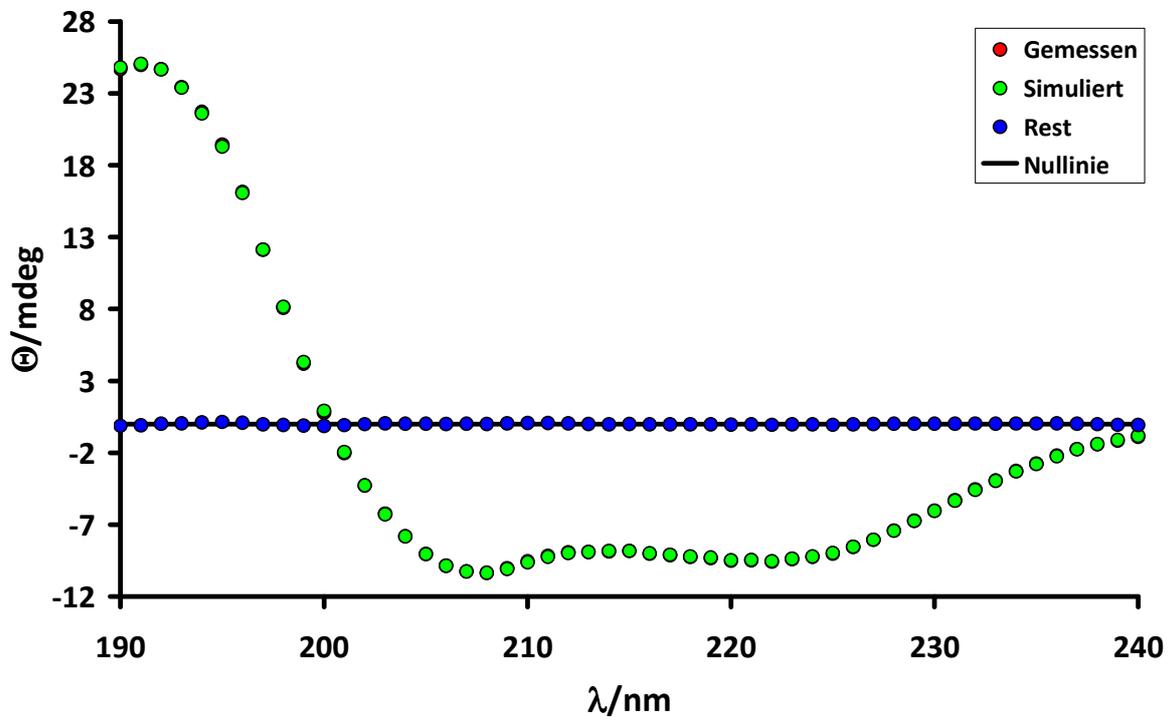


Abbildung 8.1.14: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in 0.25 N NaClO₄; c=0.1 g/l;
 Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α-Helikale Anteile: 68 %; β-Faltbalttanteile: 11 %; Turns: 8 %; ungeordnete Anteile: 13 %

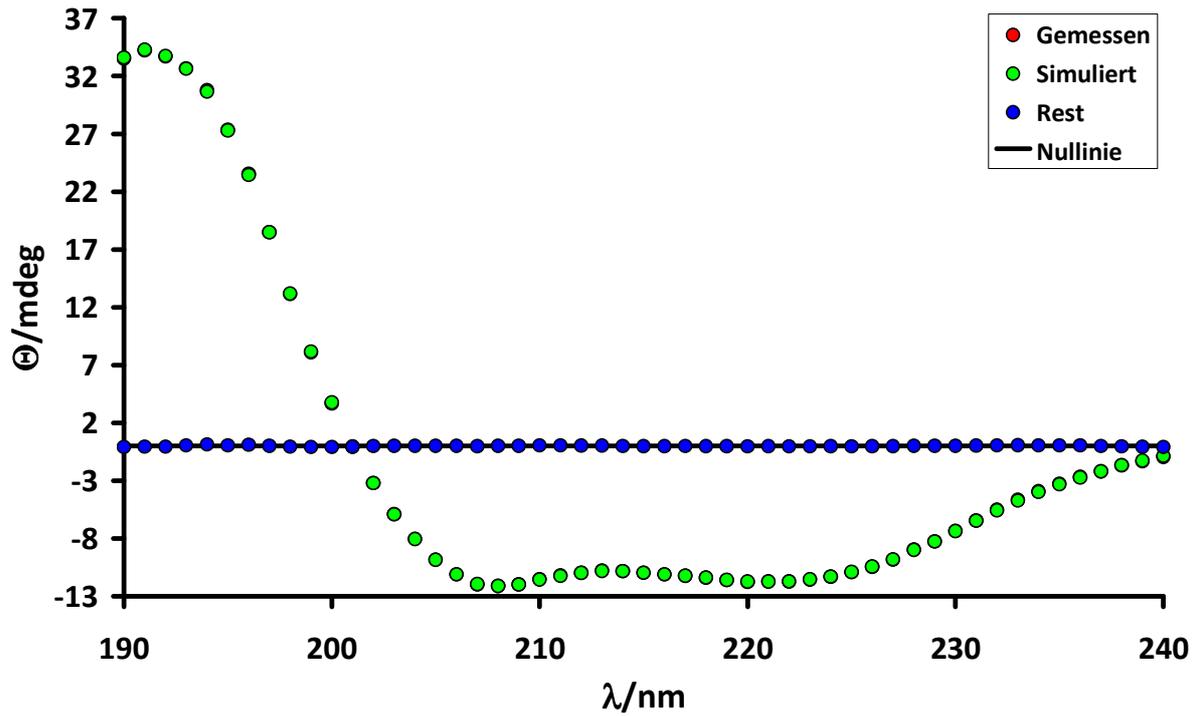


Abbildung 8.1.15: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in 0.5 N NaClO₄; c=0.1 g/l;
 Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α-Helikale Anteile: 86 %; β-Faltbalttanteile: 6 %; Turns: 2 %; ungeordnete Anteile: 6 %

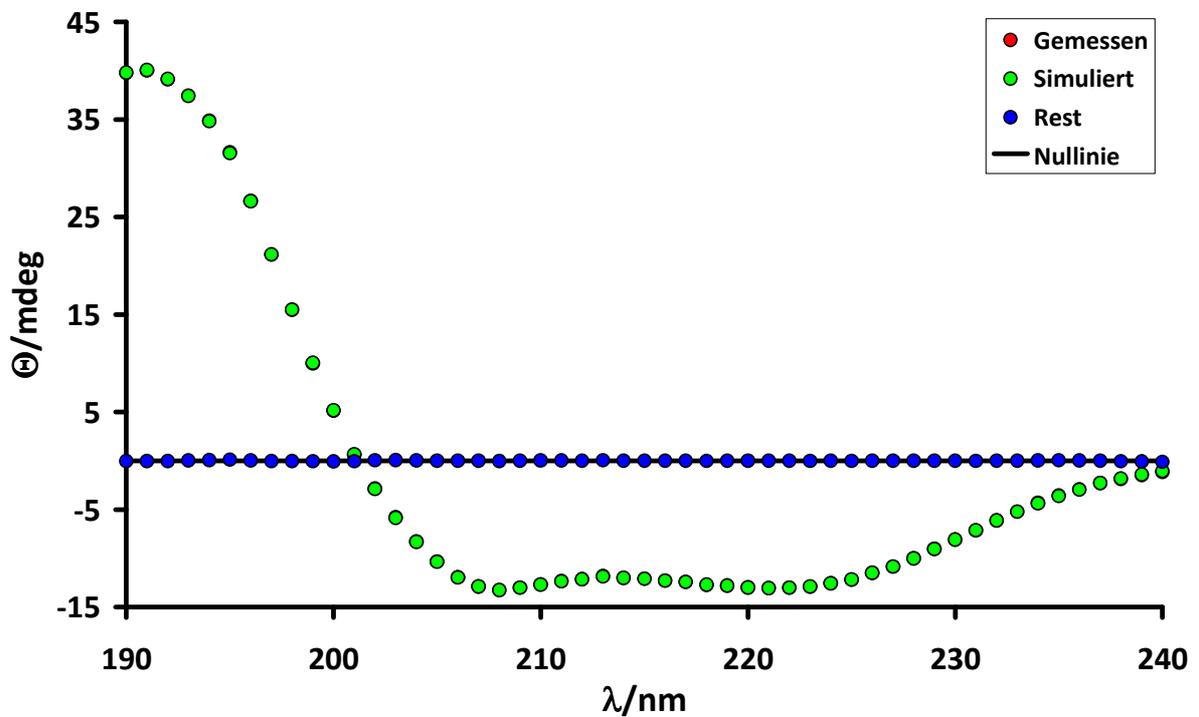


Abbildung 8.1.16: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in 0.5 N NaClO₄; c=0.1 g/l;
 Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α-Helikale Anteile: 89 %; β-Faltbalttanteile: 3 %; Turns: 2 %; ungeordnete Anteile: 6 %

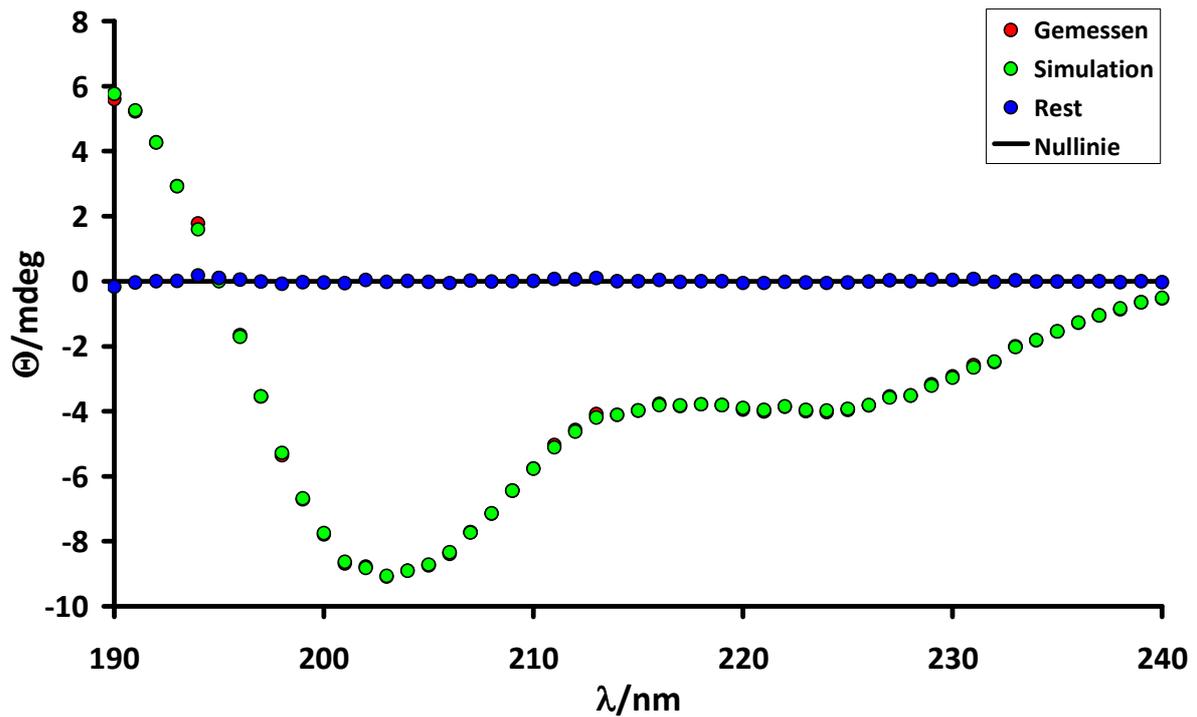


Abbildung 8.1.17: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (10:90); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 34 %; β -Faltbalttanteile: 16 %; Turns: 15 %; ungeordnete Anteile: 35 %

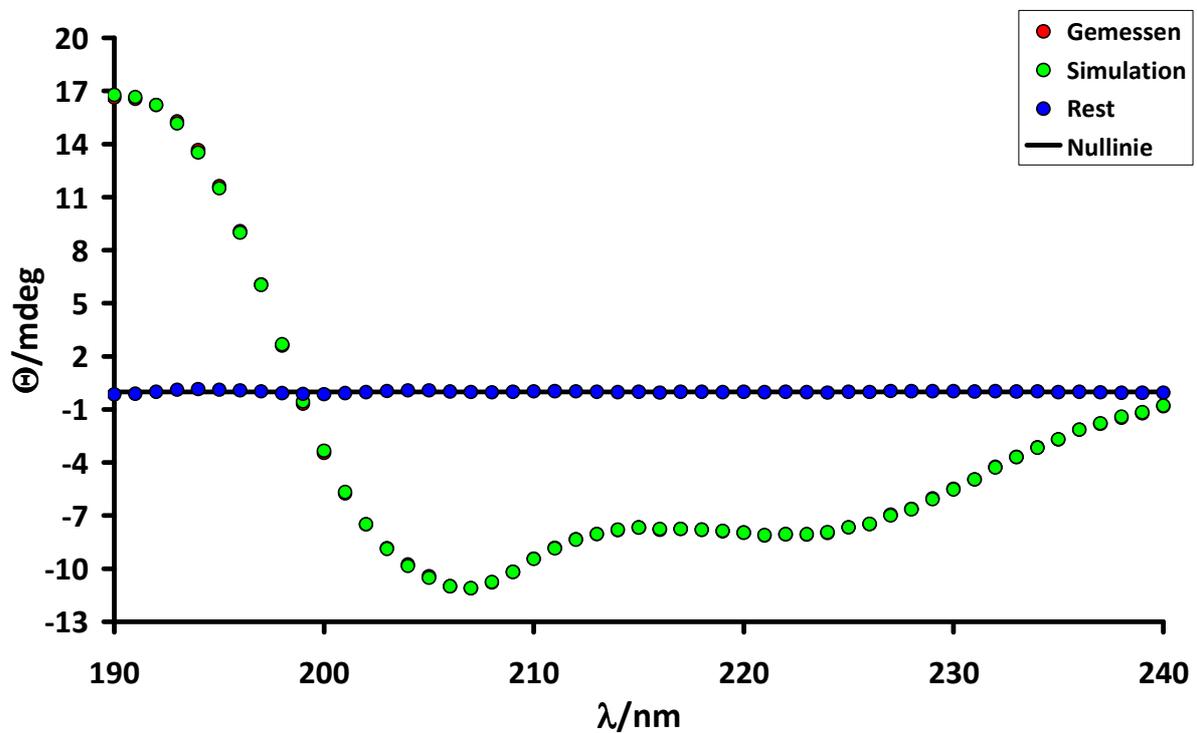


Abbildung 8.1.18: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (20:80); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 63 %; β -Faltbalttanteile: 10 %; Turns: 7 %; ungeordnete Anteile: 20 %

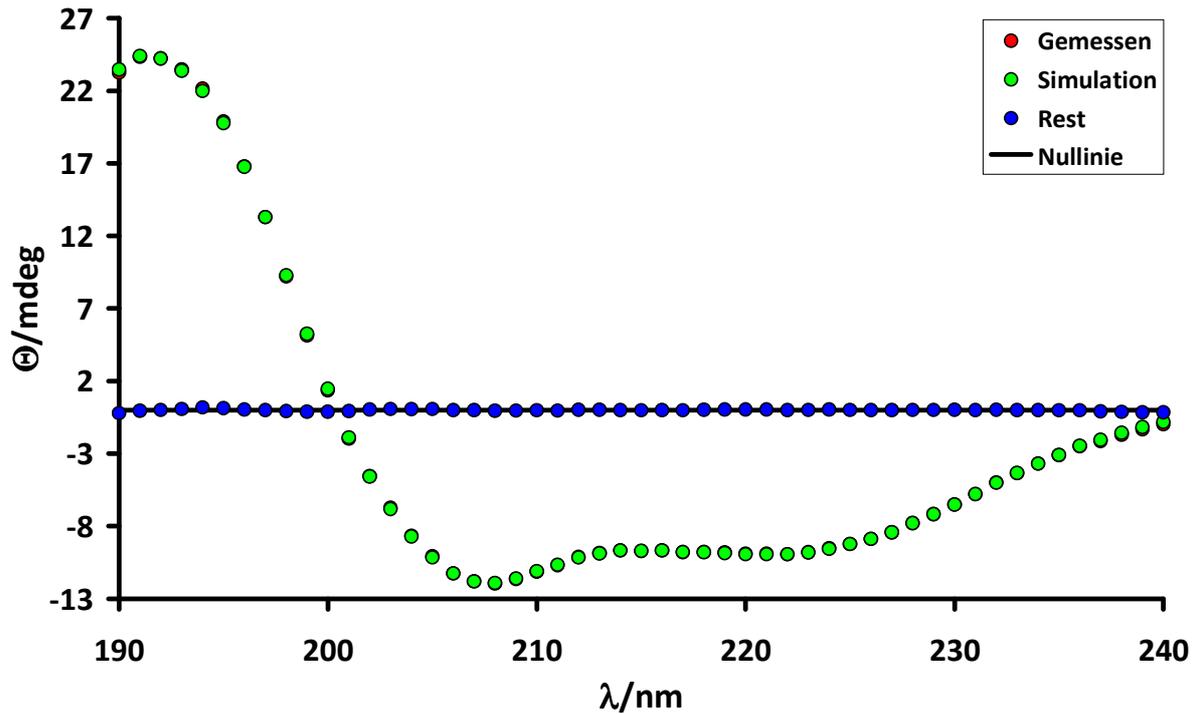


Abbildung 8.1.19: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (30:70); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 80 %; β -Faltbalttanteile: 5 %; Turns: 4 %; ungeordnete Anteile: 11 %

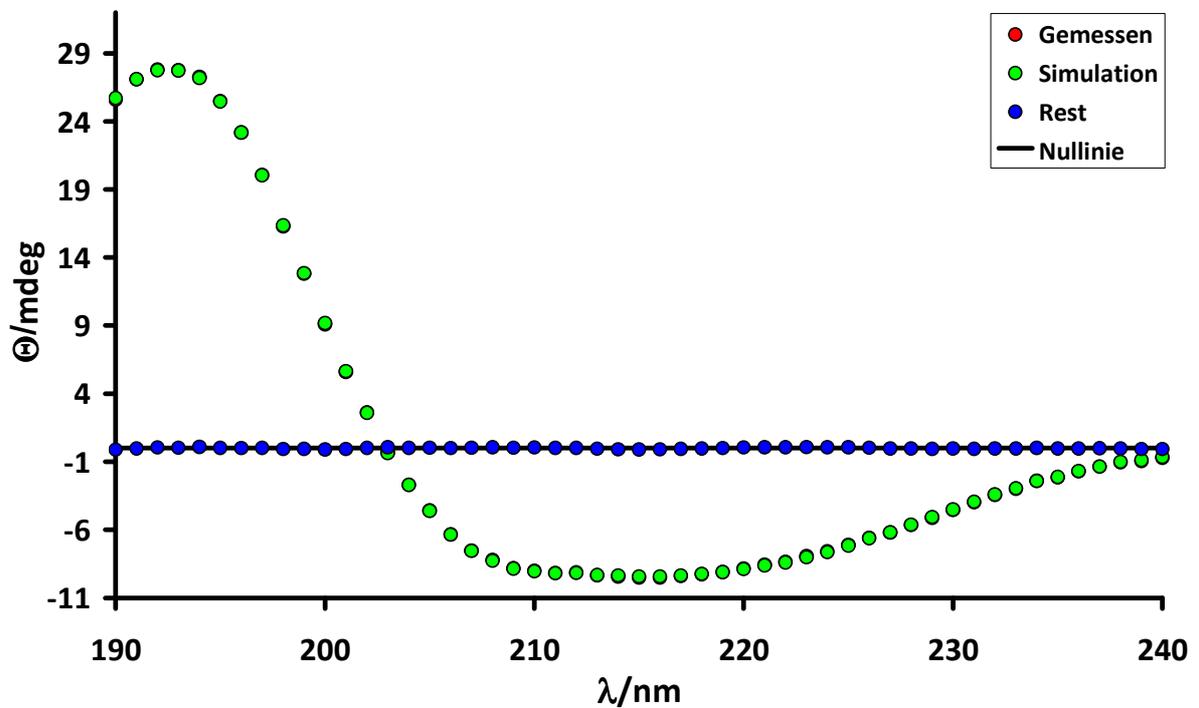


Abbildung 8.1.20: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (40:60); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 64 %; β -Faltbalttanteile: 10 %; Turns: 11 %; ungeordnete Anteile: 15 %

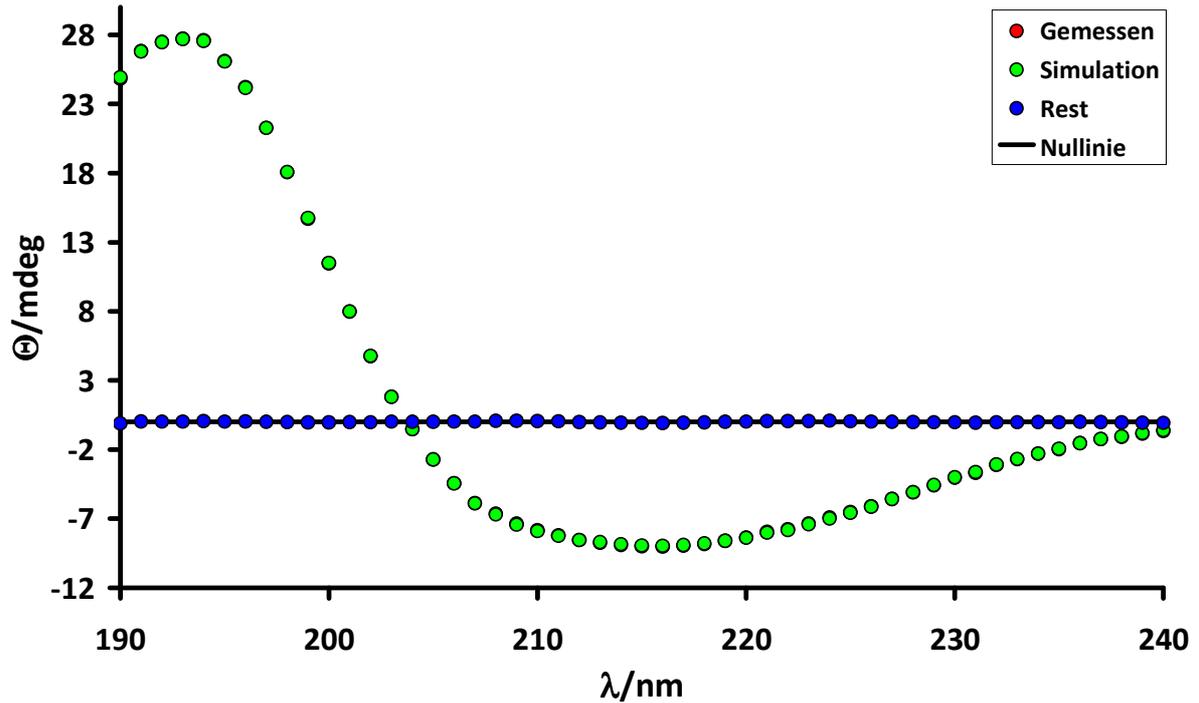


Abbildung 8.1.21: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (50:50); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 61 %; β -Faltbalttanteile: 14 %; Turns: 13 %; ungeordnete Anteile: 13 %

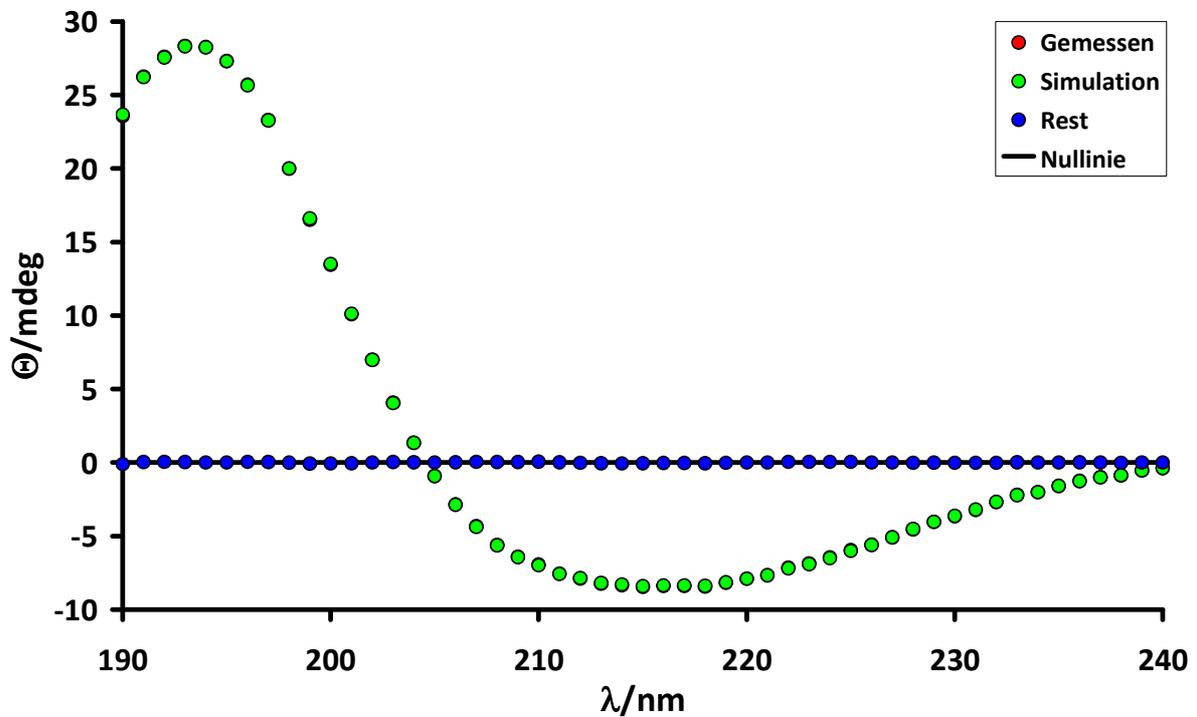


Abbildung 8.1.22: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (60:40); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 58 %; β -Faltbalttanteile: 16 %; Turns: 10 %; ungeordnete Anteile: 16 %

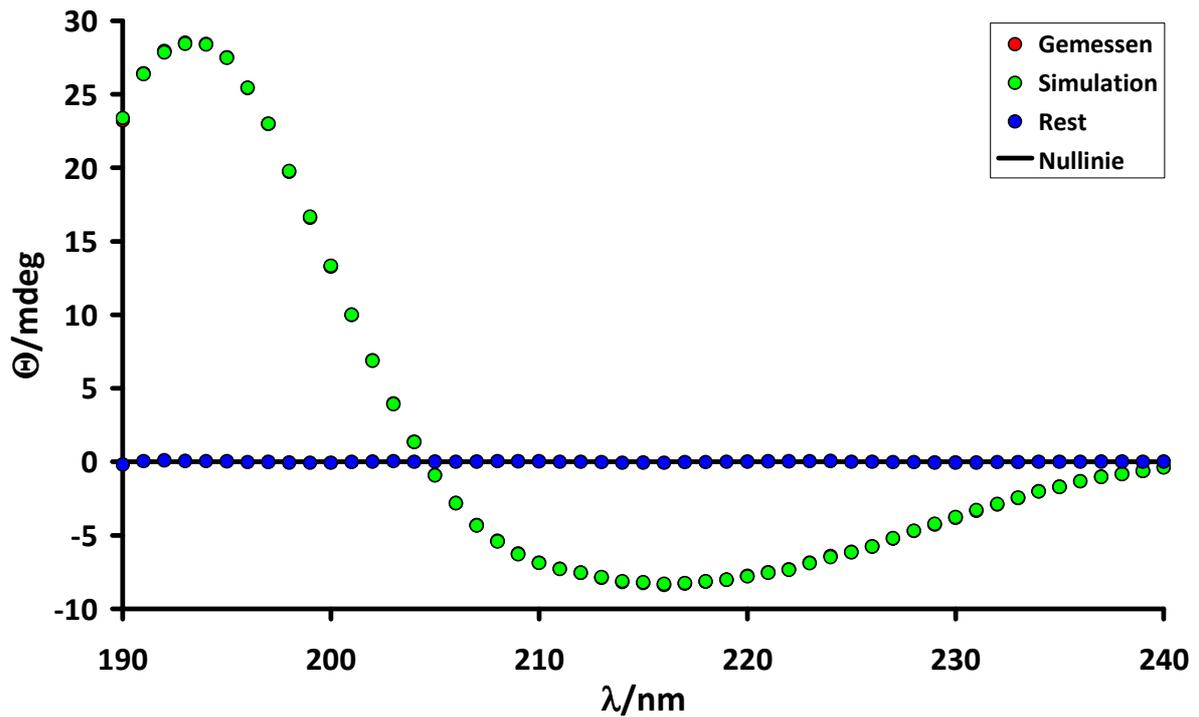


Abbildung 8.1.23: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (70:30); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 58 %; β -Faltbalttanteile: 16 %; Turns: 12 %; ungeordnete Anteile: 14 %

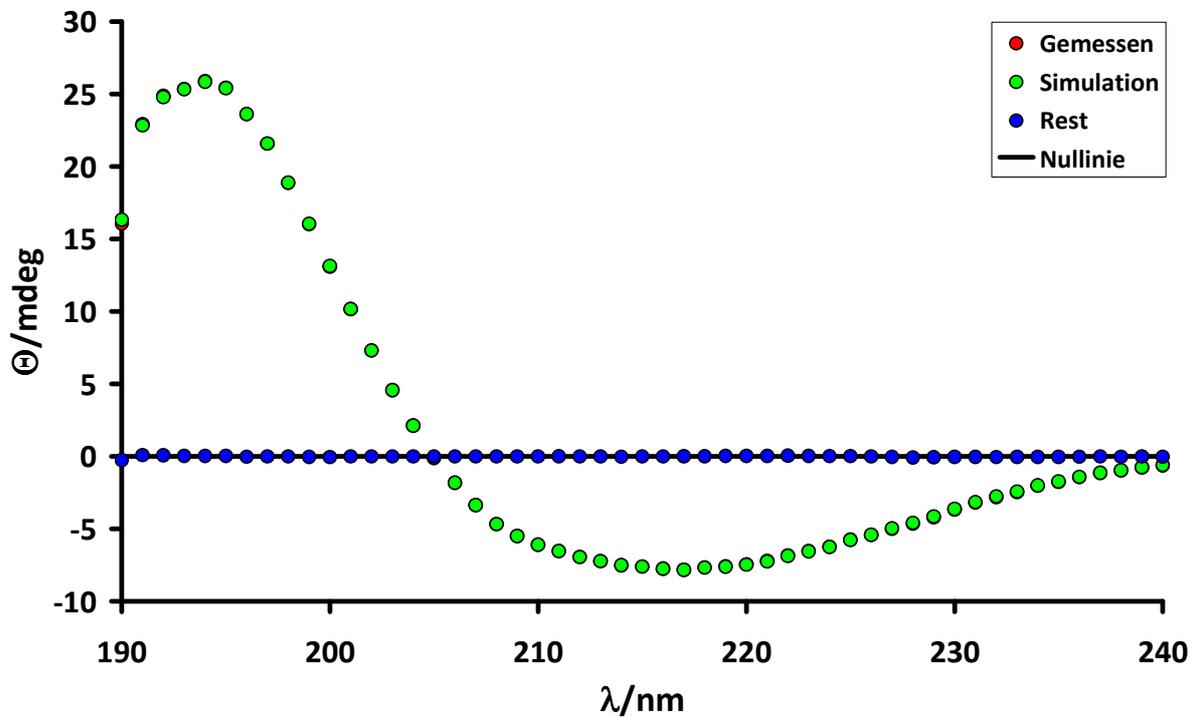


Abbildung 8.1.24: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (80:20); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 57 %; β -Faltbalttanteile: 20 %; Turns: 8 %; ungeordnete Anteile: 15 %

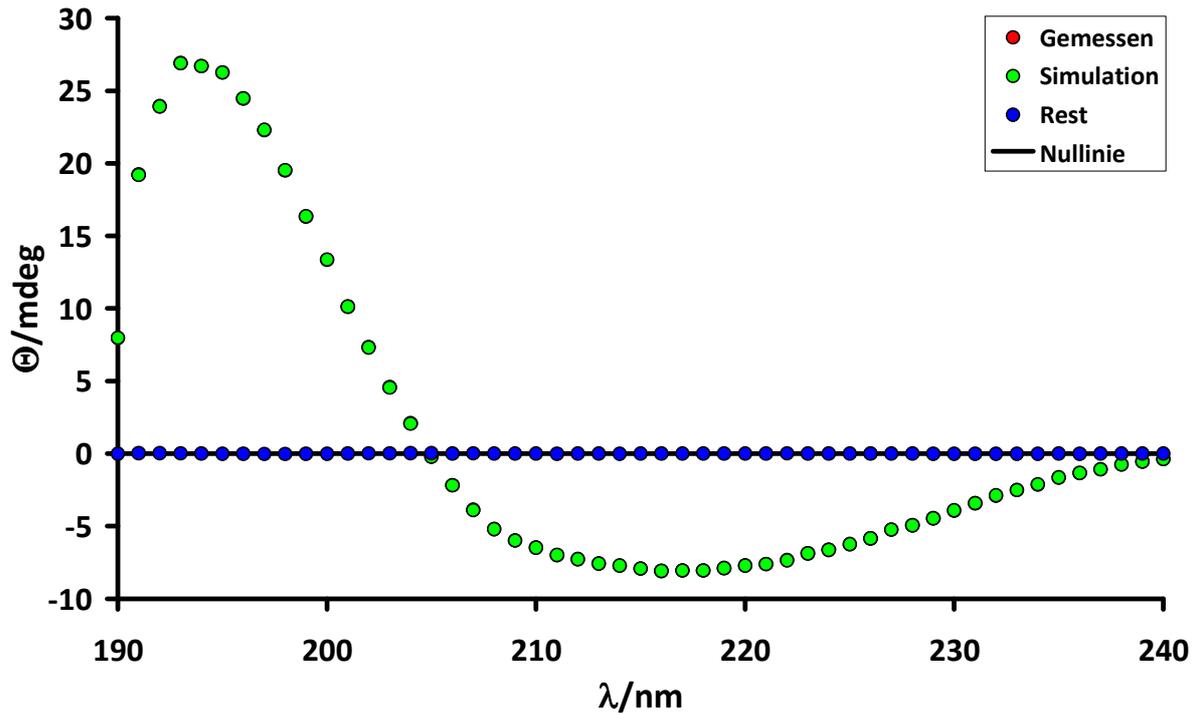


Abbildung 8.1.25: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (90:10); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 53 %; β -Faltbalttanteile: 12 %; Turns: 8 %; ungeordnete Anteile: 17 %

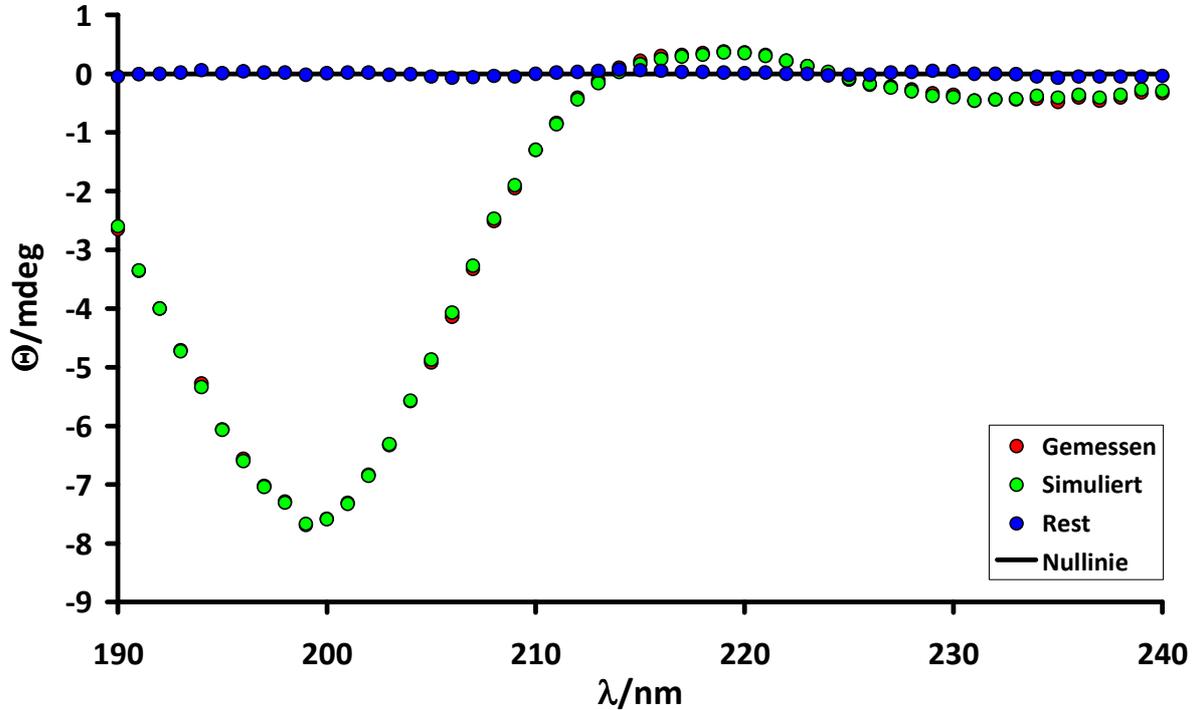


Abbildung 8.1.26: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (10:90); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 3 %; β -Faltbalttanteile: 22 %; Turns: 15 %; ungeordnete Anteile: 59 %

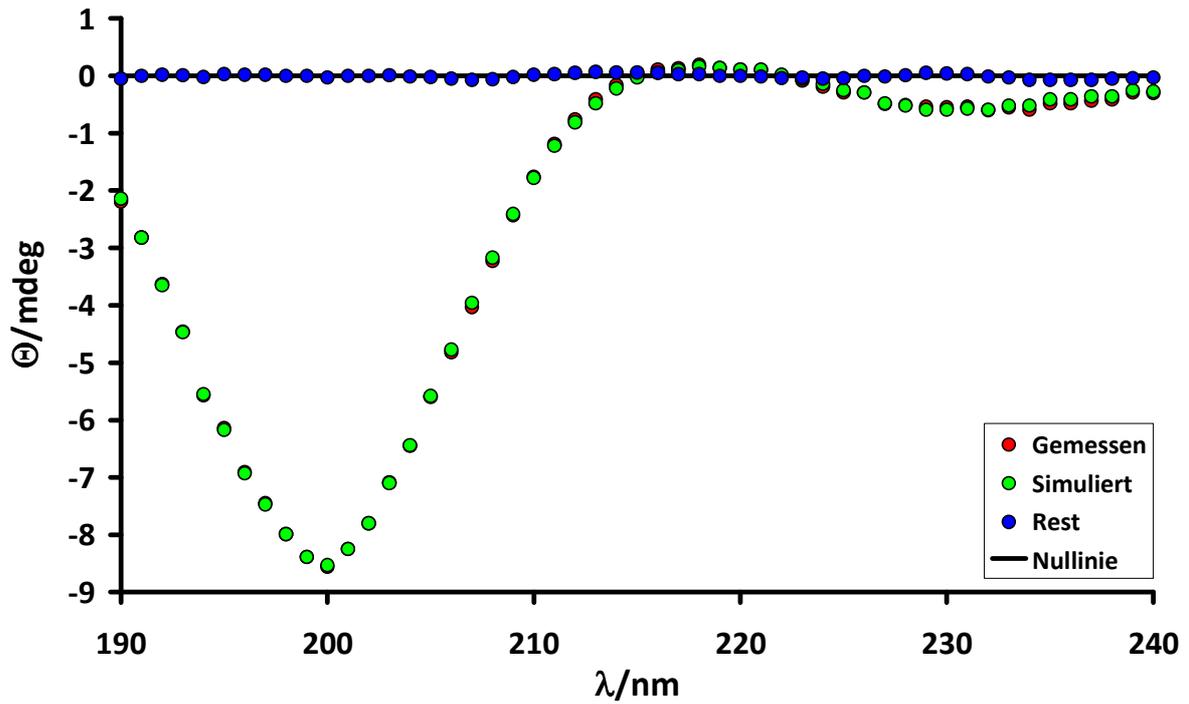


Abbildung 8.1.27: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (20:80); $c=0.1$ g/l;
 Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 2 %; β -Faltblattanteile: 26 %; Turns: 18 %; ungeordnete Anteile: 54 %

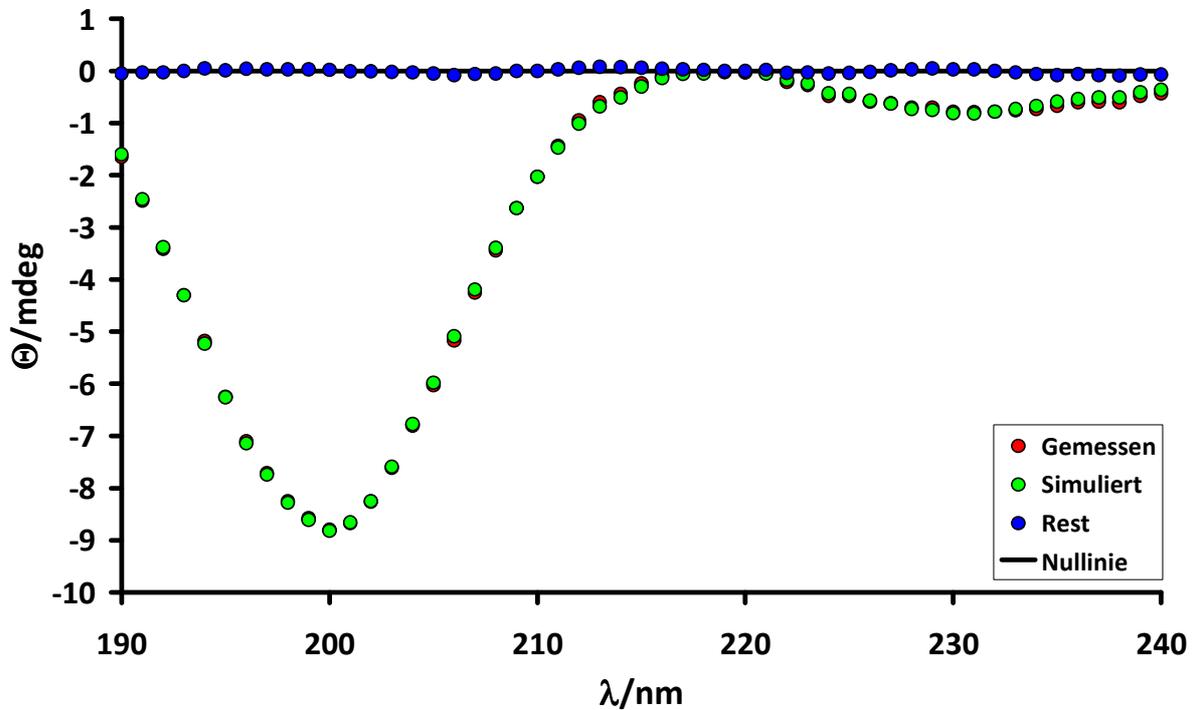


Abbildung 8.1.28: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (30:70); $c=0.1$ g/l;
 Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 3 %; β -Faltblattanteile: 24 %; Turns: 18 %; ungeordnete Anteile: 55 %

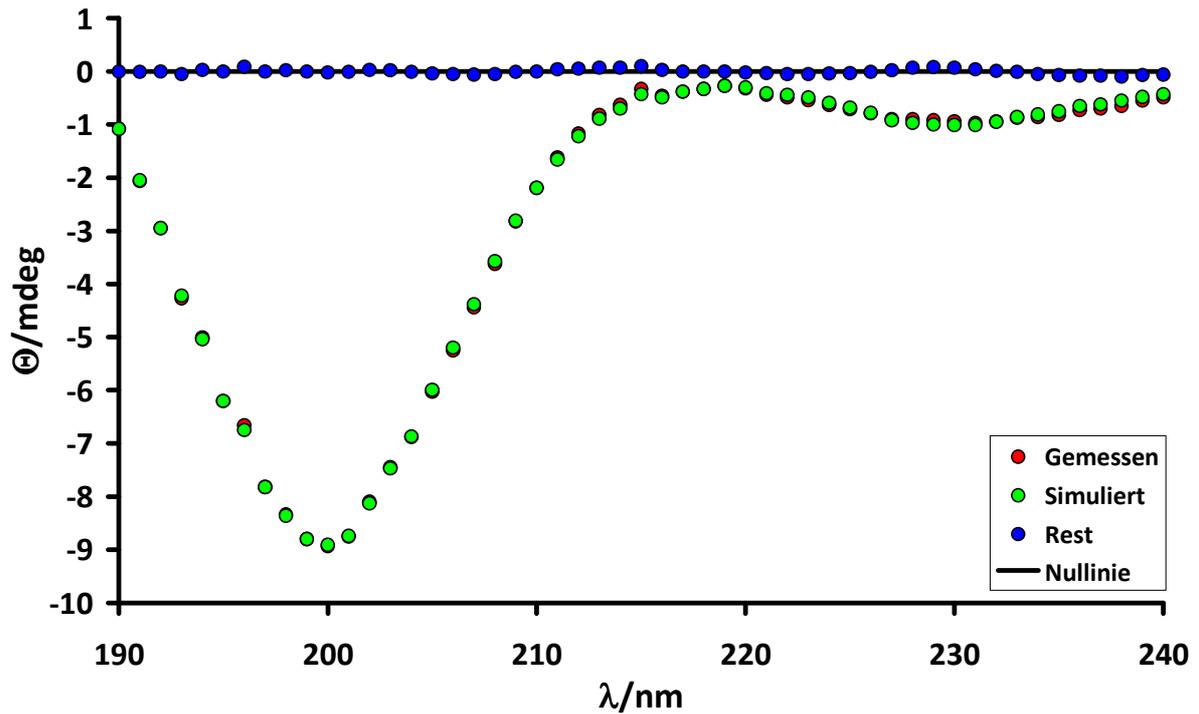


Abbildung 8.1.29: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (40:60); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 4 %; β -Faltblattanteile: 27 %; Turns: 9 %; ungeordnete Anteile: 50 %

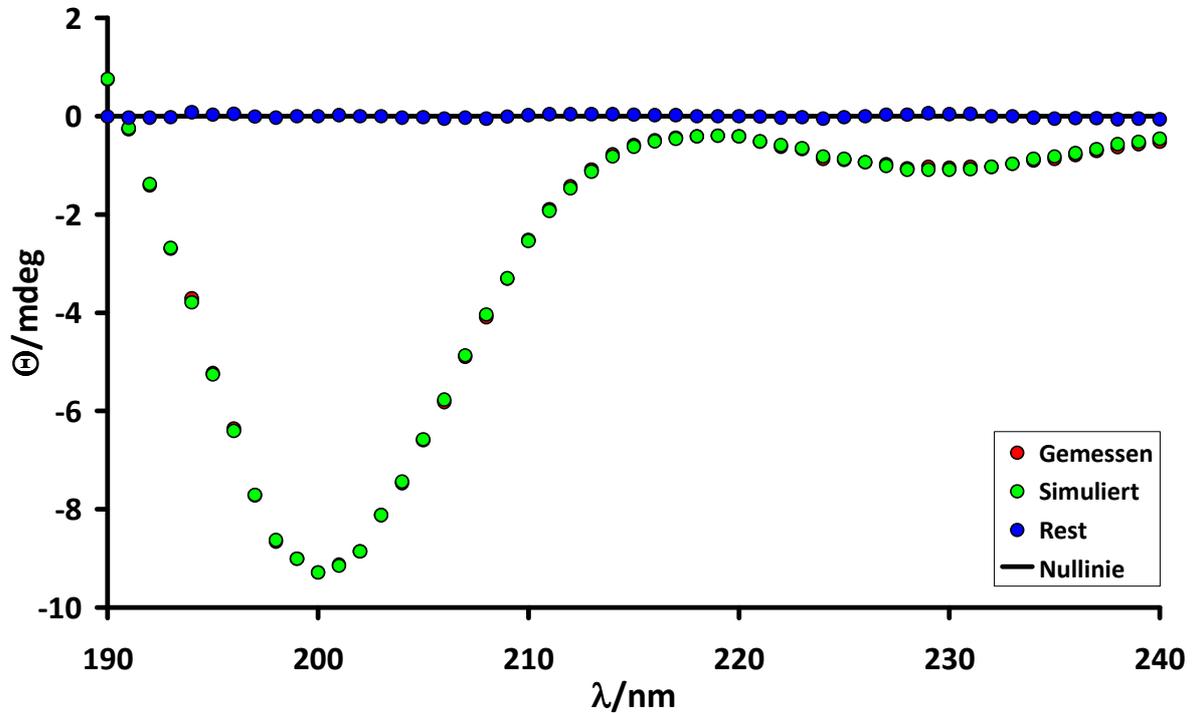


Abbildung 8.1.30: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (50:50); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 5 %; β -Faltblattanteile: 24 %; Turns: 17 %; ungeordnete Anteile: 54 %

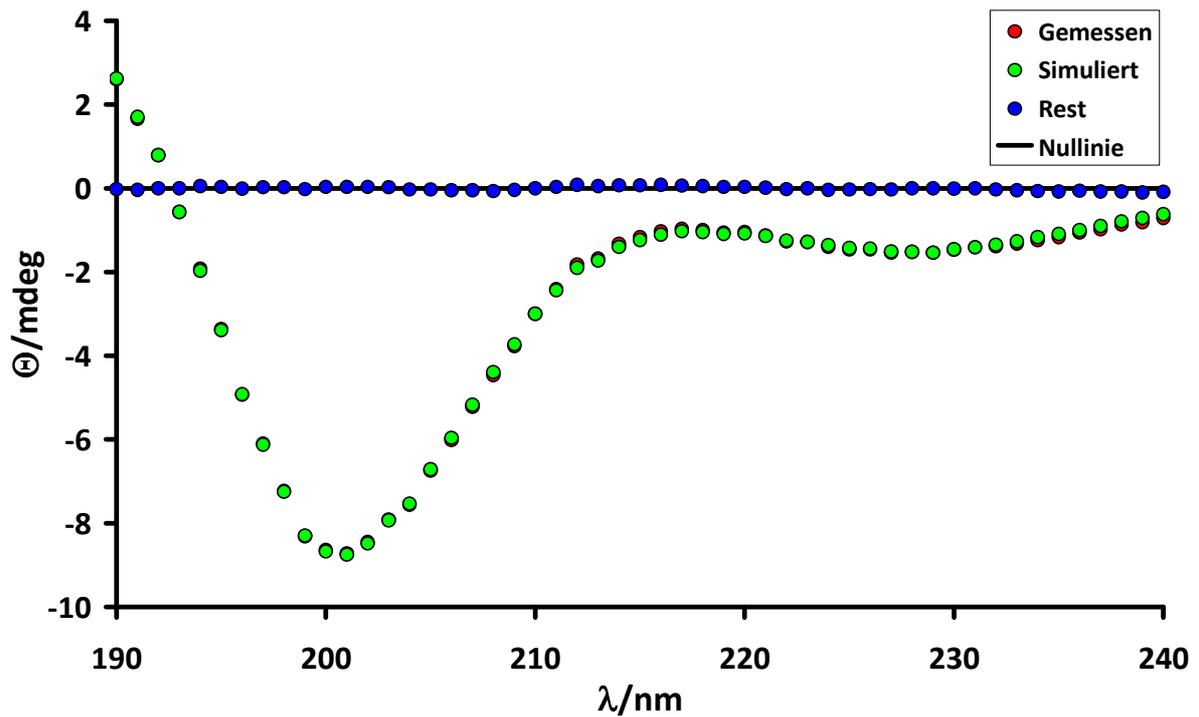


Abbildung 8.1.31: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (60:40); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 7 %; β -Faltblattanteile: 24 %; Turns: 17 %; ungeordnete Anteile: 52 %

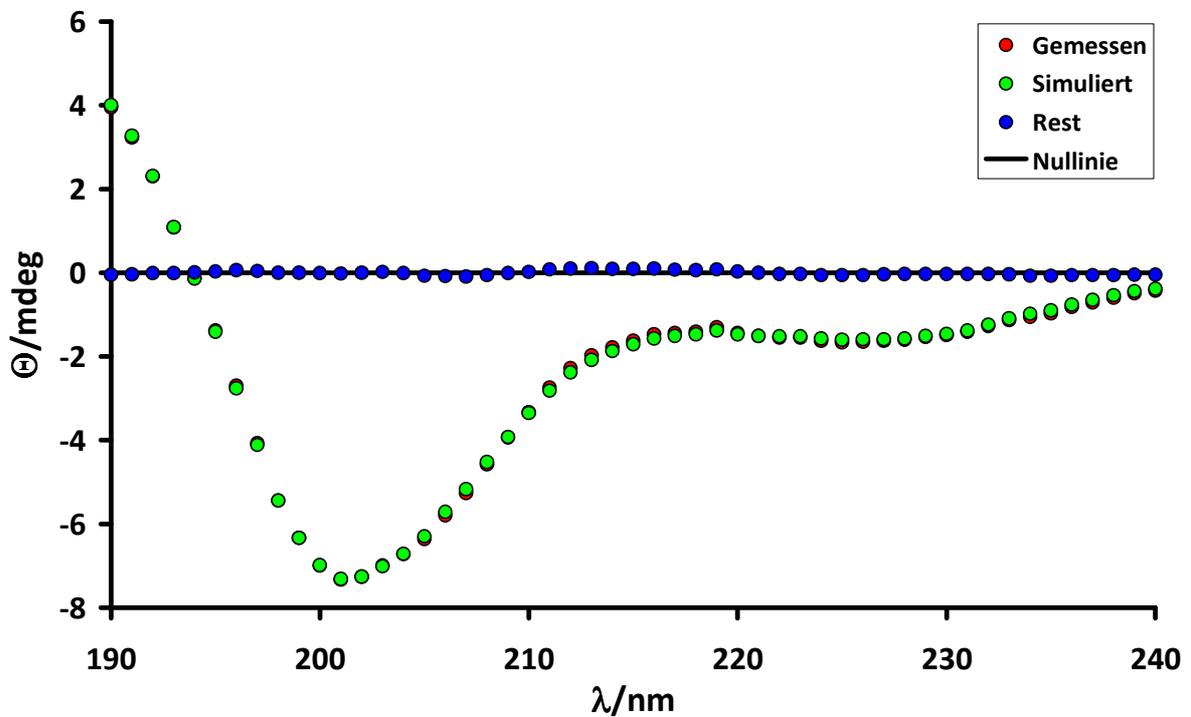


Abbildung 8.1.32: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (70:30); $c=0.1$ g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 6 %; β -Faltblattanteile: 18 %; Turns: 18 %; ungeordnete Anteile: 48 %

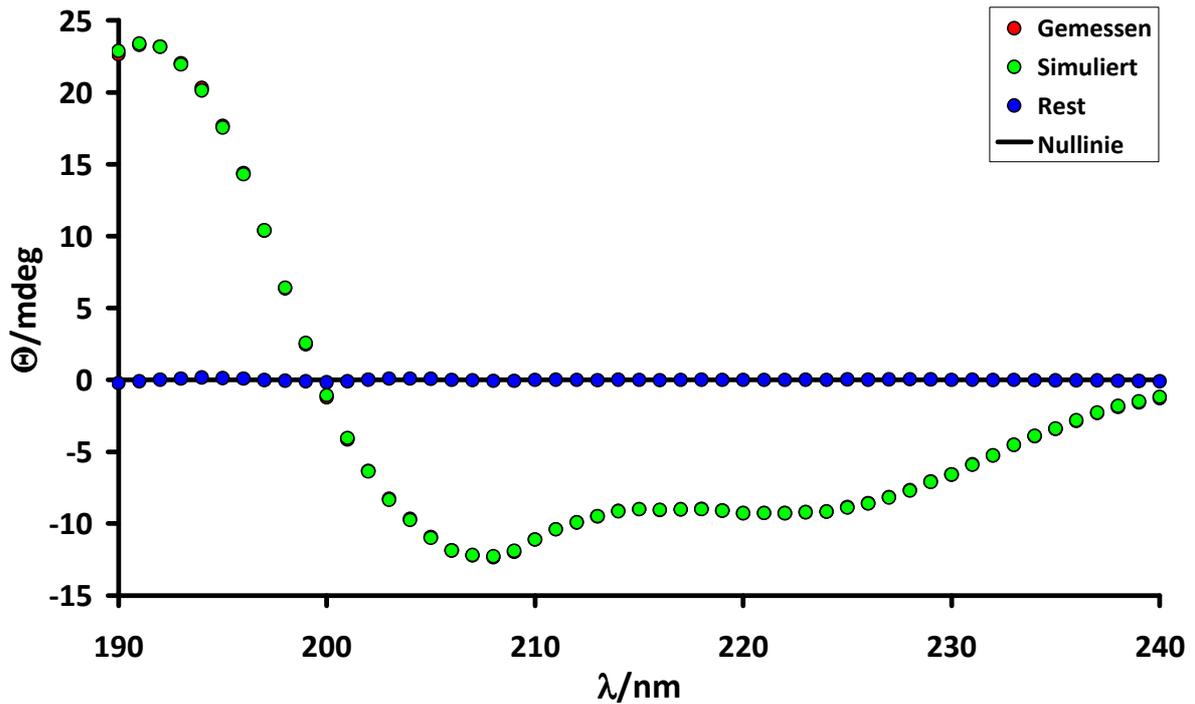


Abbildung 8.1.33: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (80:20); c=0.1 g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 78 %; β -Faltbaltanteile: 7 %; Turns: 7 %; ungeordnete Anteile: 8 %

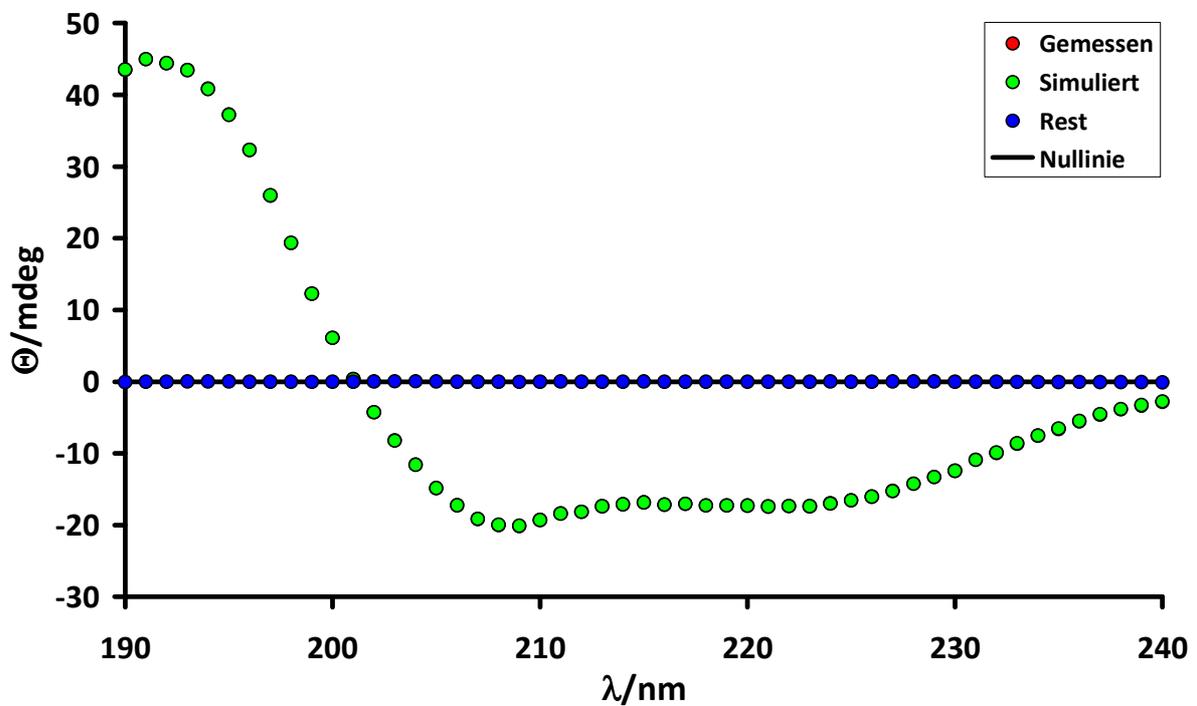


Abbildung 8.1.34: gemessenes und simuliertes Spektrum von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (80:20); c=0.1 g/l; Küvettendicke: 1 mm; Simulationsprogramm: CDSSTR; Set:7
 α -Helikale Anteile: 87 %; β -Faltbaltanteile: 5 %; Turns: 3 %; ungeordnete Anteile: 5 %

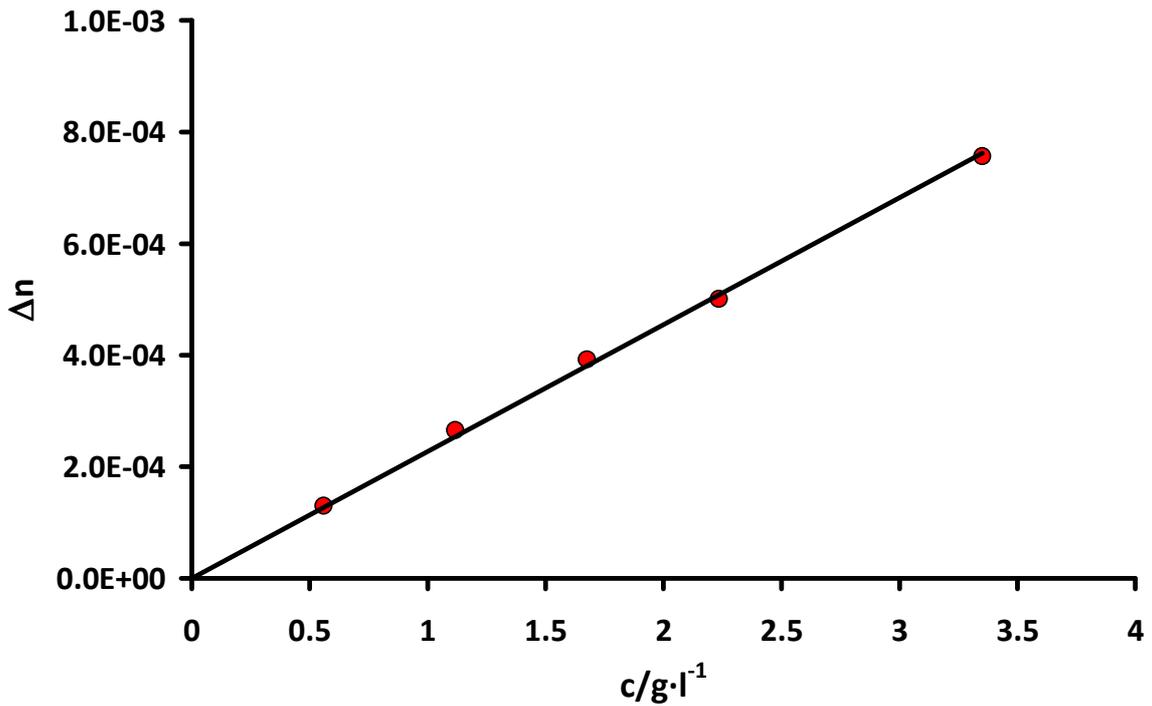


Abbildung 8.1.35: dn/dc -Bestimmung für Bn-Glu 55-1 in HFIP; Salz: $\text{CF}_3\text{COO}^- \text{NMe}_4^+$ (0.005 N); $T=293\text{ K}$; $\lambda=632.8\text{ nm}$; $dn/dc=0.2220\text{ ml/g}$

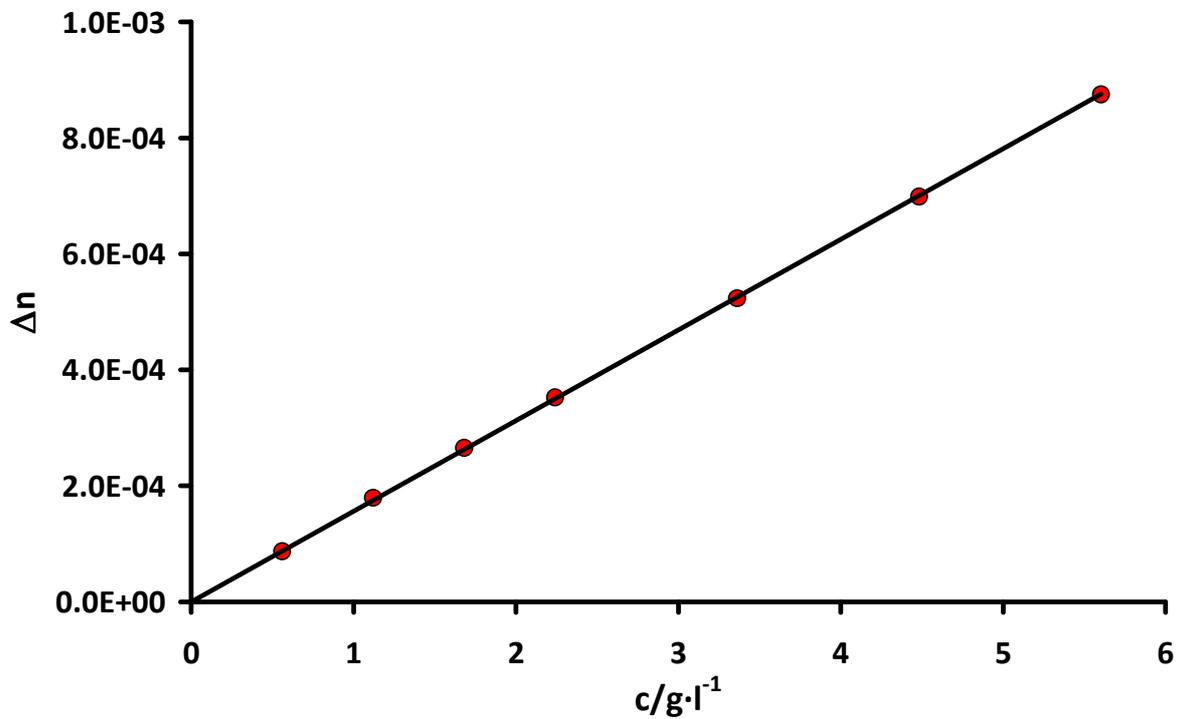


Abbildung 8.1.36: dn/dc -Bestimmung für Glu-Na-Salz in H_2O ; Salz: NaOH (0.005 N); $T=293\text{ K}$; $\lambda=632.8\text{ nm}$; $dn/dc=0.1555\text{ ml/g}$

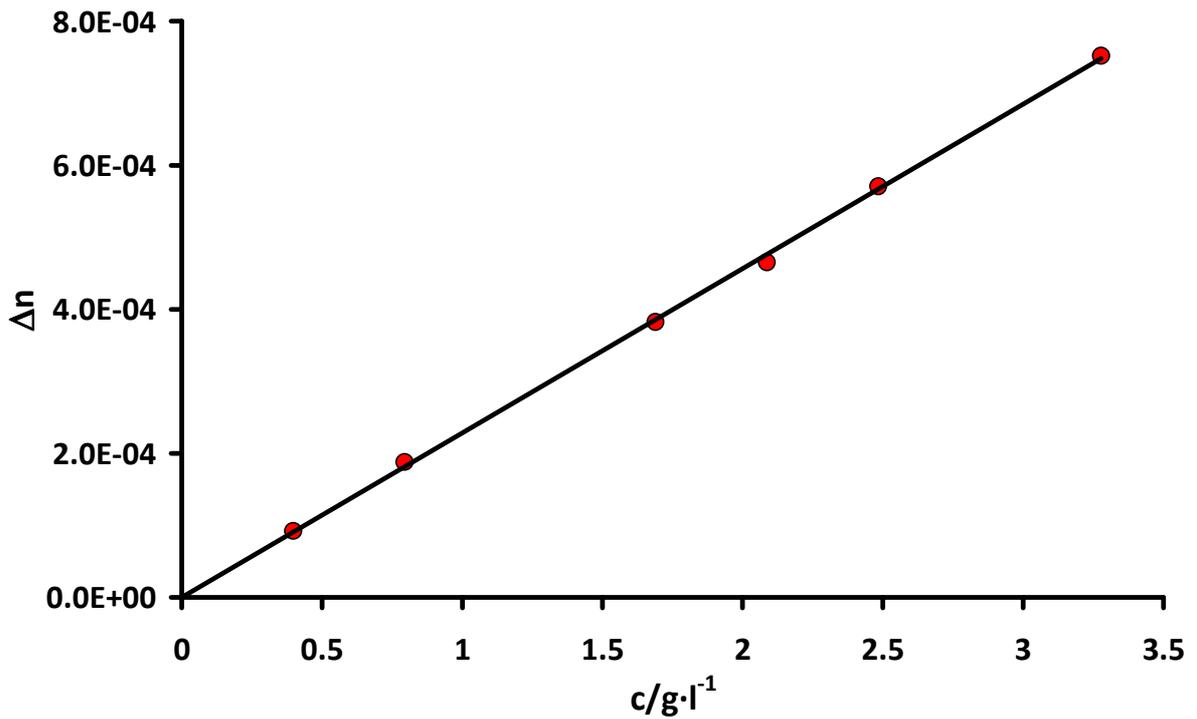


Abbildung 8.1.37: dn/dc -Bestimmung für Z-Lys 55-3 in HFIP; Salz: $\text{CF}_3\text{COO}^- \text{NMe}_4^+$ (0.005 N); $T=293\text{ K}$; $\lambda=632.8\text{ nm}$; $dn/dc=0.2280\text{ ml/g}$

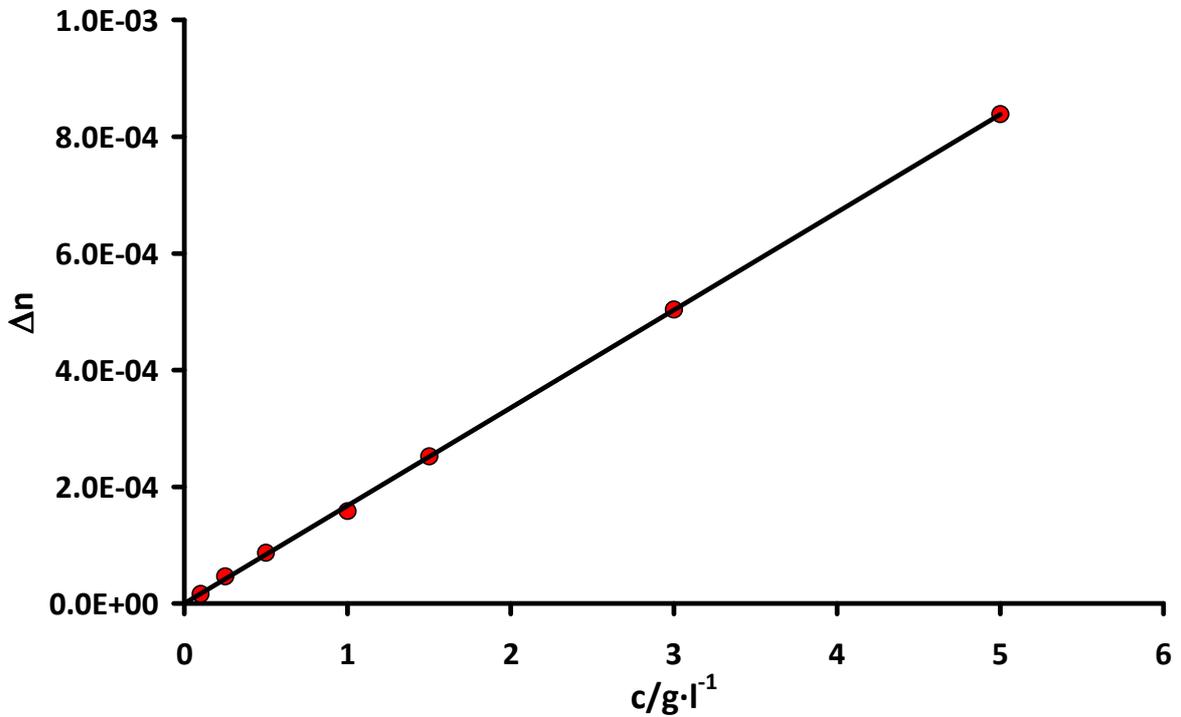


Abbildung 8.1.38: dn/dc -Bestimmung für Lys-lin. in H_2O ; Salz: NaClO_4 (0.5 N); $T=293\text{ K}$; $\lambda=632.8\text{ nm}$; $dn/dc=0.1670\text{ ml/g}$

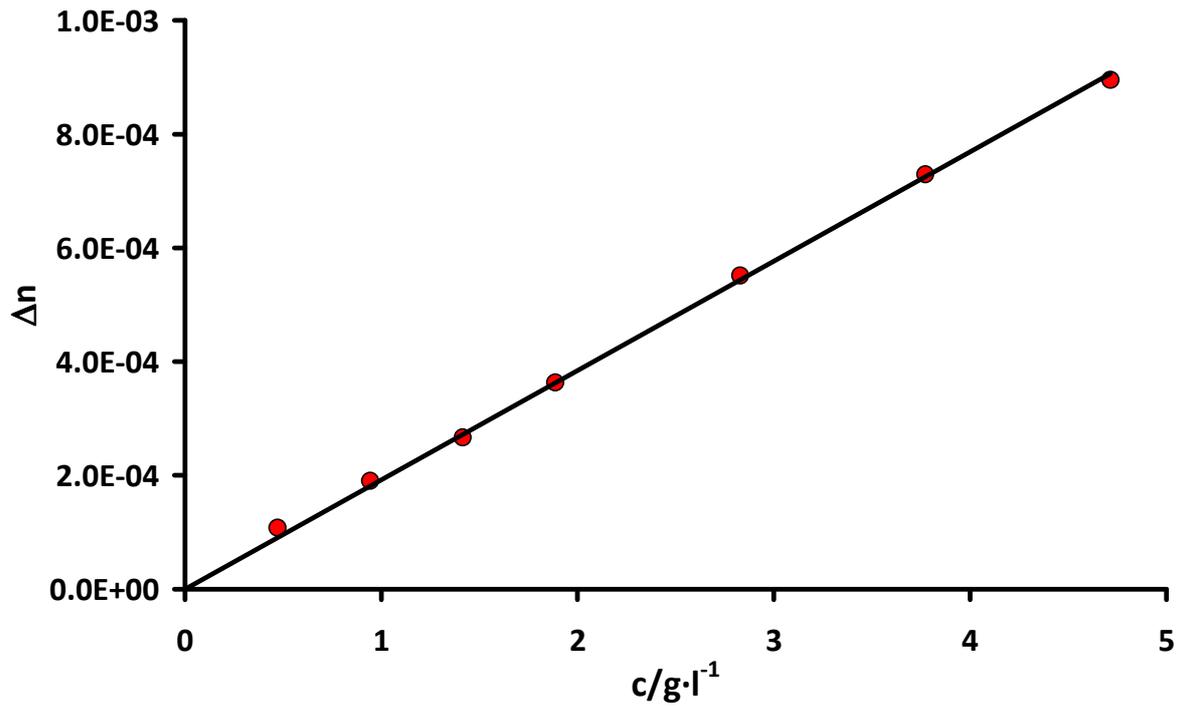


Abbildung 8.1.39: dn/dc -Bestimmung für Me-Glu 55-1 3 in HFIP; Salz: $\text{CF}_3\text{COO}^- \text{NMe}_4^+$ (0.005 N); $T=293 \text{ K}$; $\lambda=632.8 \text{ nm}$; $dn/dc=0.1884 \text{ ml/g}$

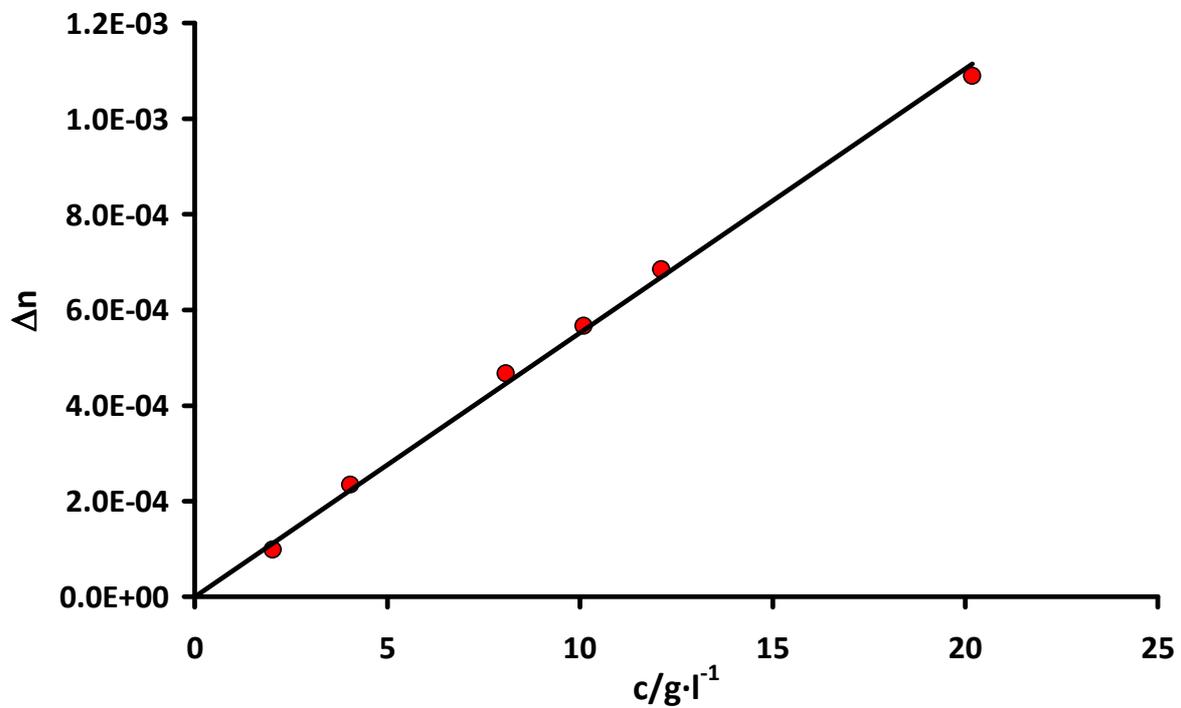


Abbildung 8.1.40: dn/dc -Bestimmung des Makroinitiatorprecursor's in THF; kein Salz; $T=293 \text{ K}$; $\lambda=632.8 \text{ nm}$; $dn/dc=0.0542 \text{ ml/g}$

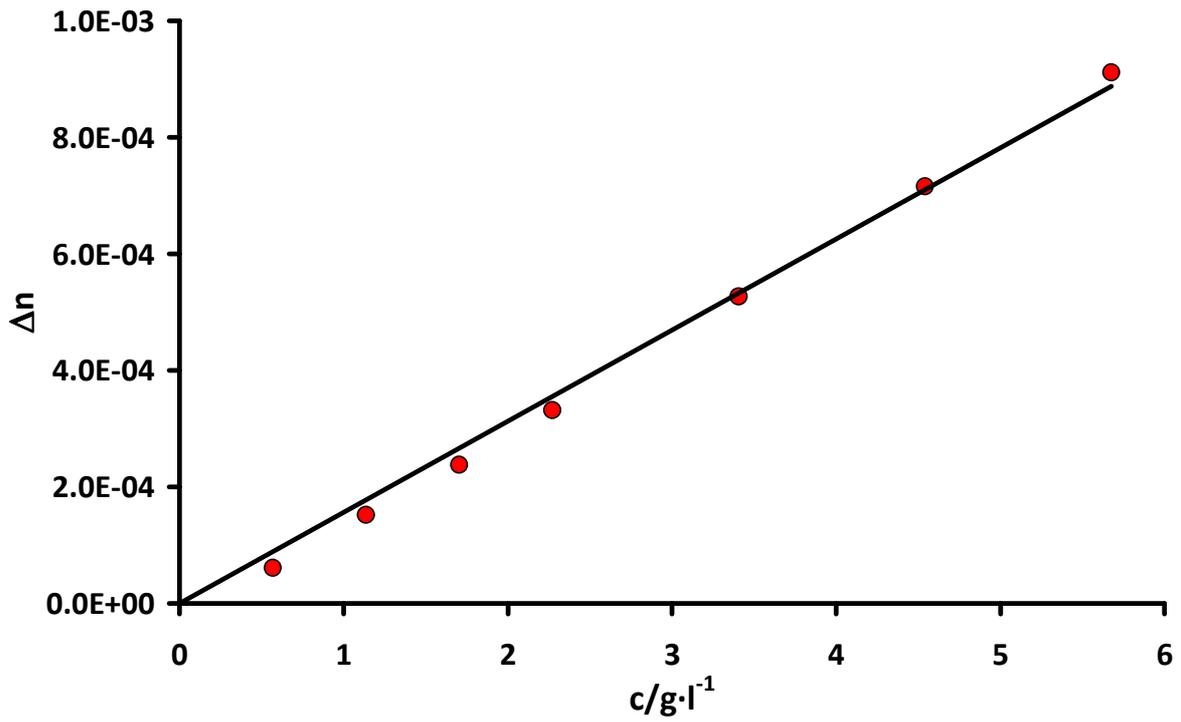


Abbildung 8.1.41: dn/dc -Bestimmung von TFA-Lys 25-1 in HFIP; Salz: $CF_3COO^- NMe_4^+$ (0.005 N); $T=293$ K; $\lambda=632.8$ nm; $dn/dc=0.1669$ ml/g

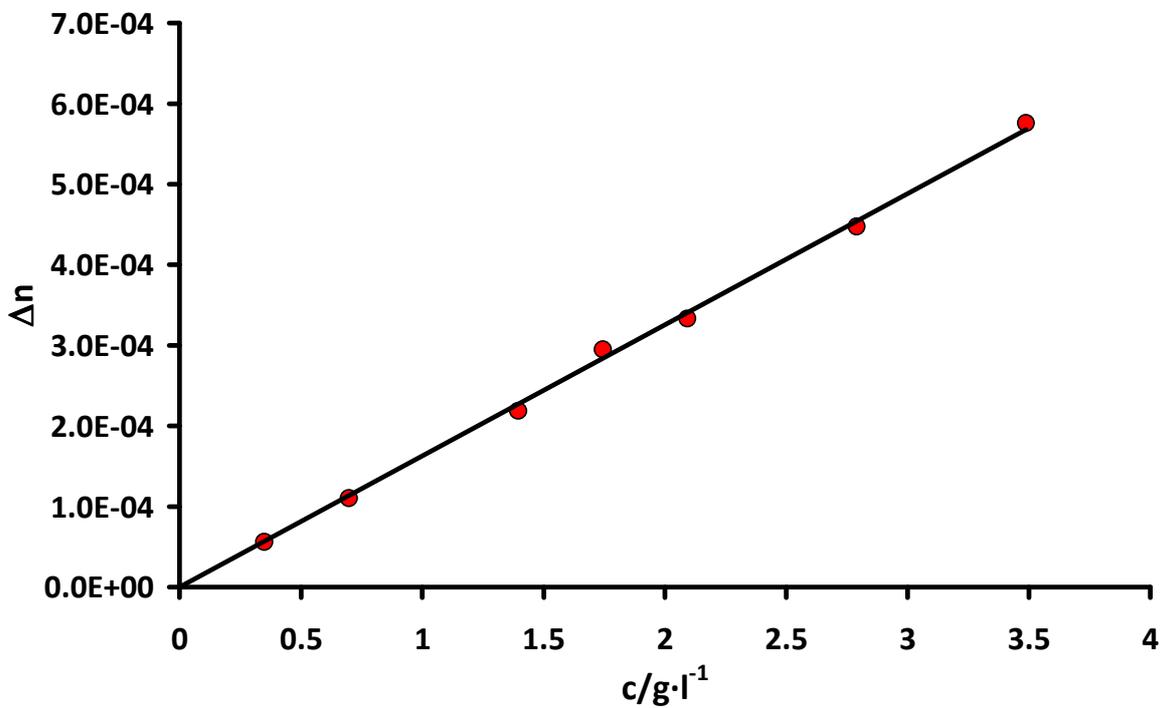


Abbildung 8.1.42: dn/dc -Bestimmung für Lys-lin. in H_2O ; Salz: NaBr (0.005 N); $T=293$ K; $\lambda=632.8$ nm; $dn/dc=0.1640$ ml/g

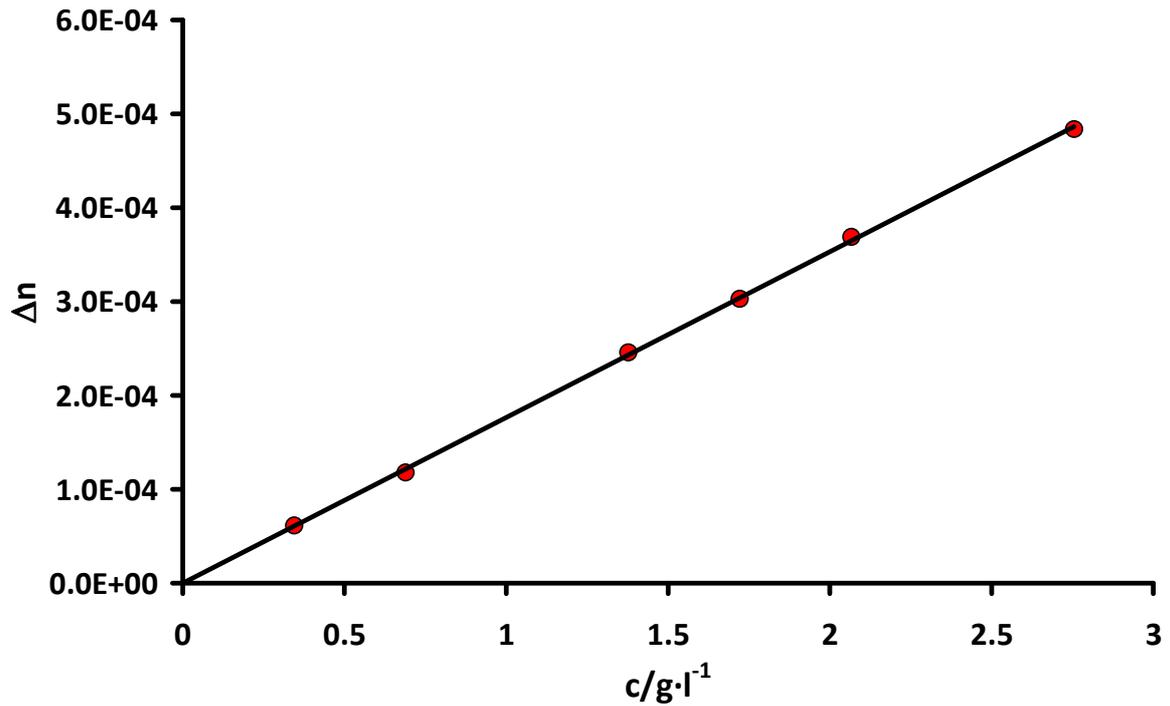


Abbildung 8.1.43: dn/dc -Bestimmung für Orn-lin. in H_2O ; Salz: NaBr (0.005 N); $T=293 \text{ K}$; $\lambda=632.8 \text{ nm}$; $dn/dc=0.1770 \text{ ml/g}$

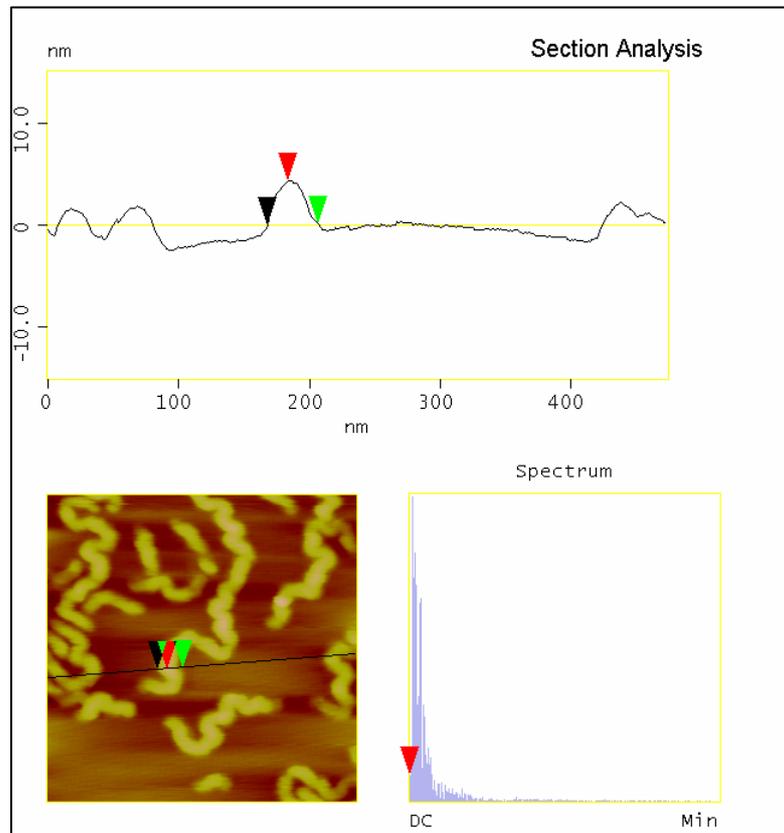


Abbildung 8.1.44: Cross-section-Analyse von Lys 25-1 in H_2O
horizontaler Durchmesser: 38.8 nm; vertikaler Durchmesser: 4.4 nm

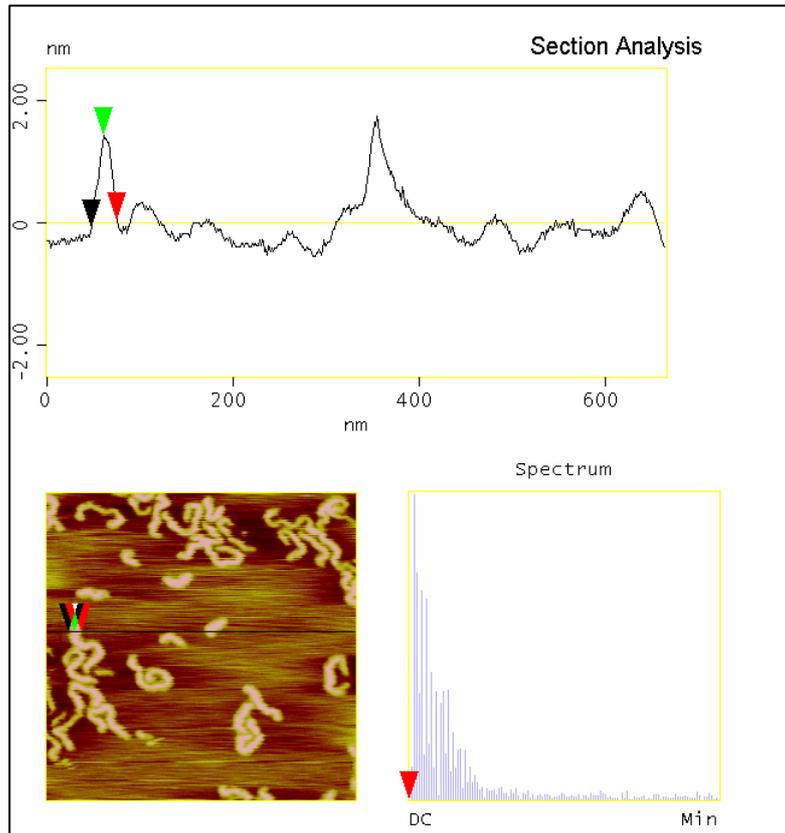


Abbildung 8.1.45: Cross-section-Analyse von Lys 25-1 in 0.5 N NaClO₄
horizontaler Durchmesser: 27.2 nm; vertikaler Durchmesser: 1.5 nm

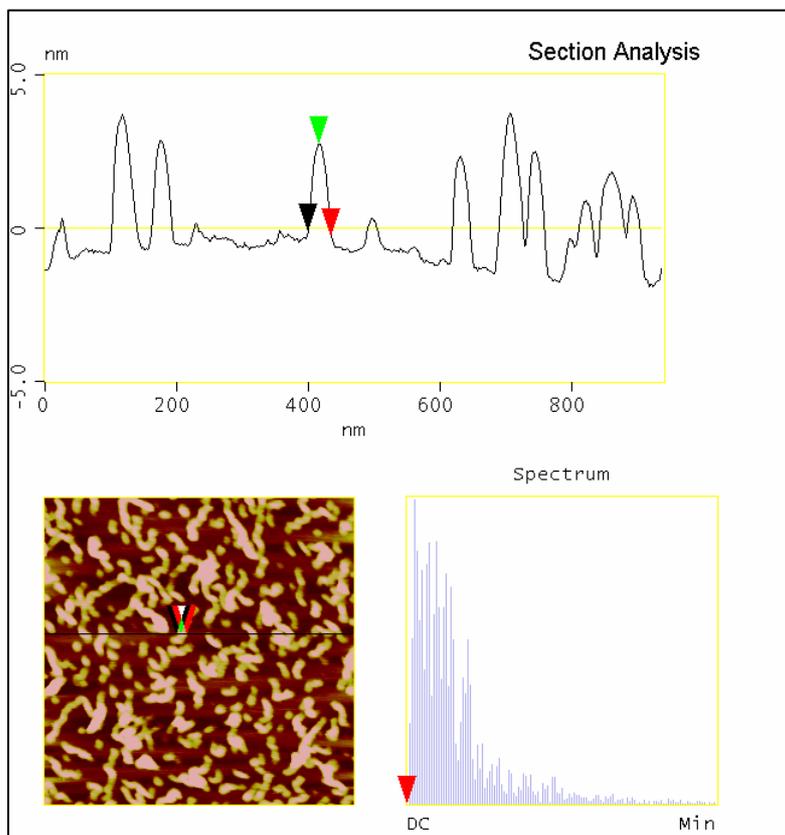


Abbildung 8.1.46: Cross-section-Analyse von Lys 25-1 in MeOH/H₂O (95:5)
horizontaler Durchmesser: 16.9 nm; vertikaler Durchmesser: 2.8 nm

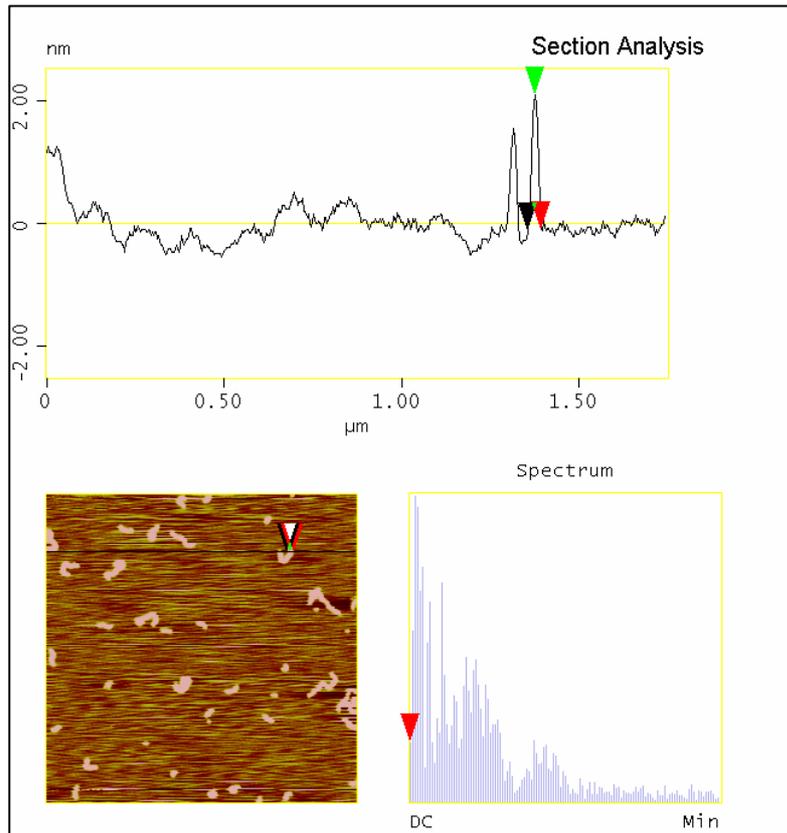


Abbildung 8.1.47: Cross-section-Analyse von Lys 25-1 in 0.5 N NaBr
horizontaler Durchmesser: 37.6 nm; vertikaler Durchmesser: 2.2 nm

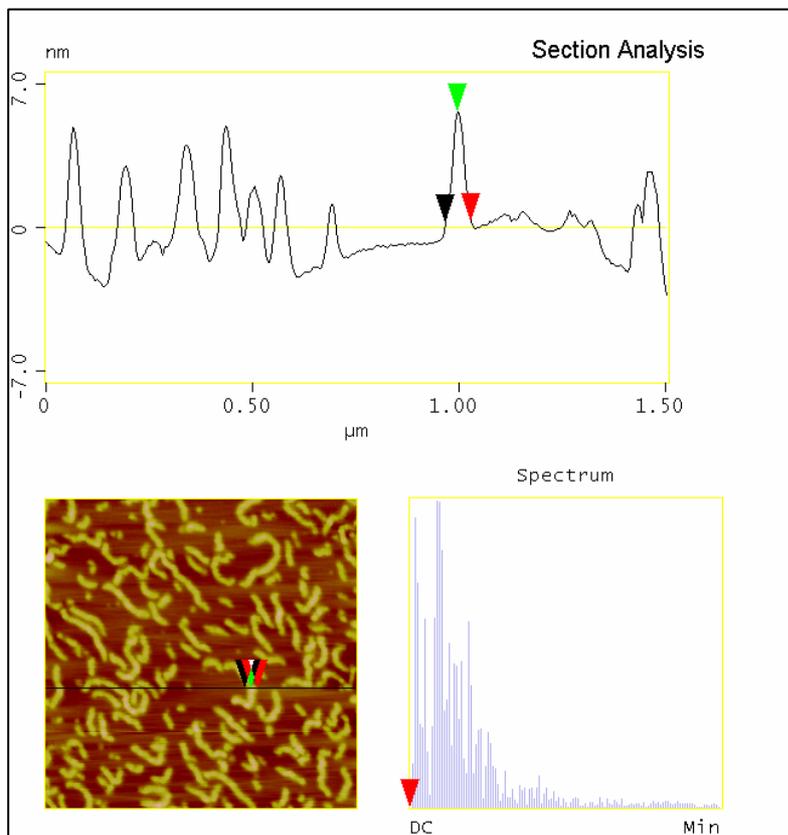


Abbildung 8.1.48: Cross-section-Analyse von Lys 55-3 in H₂O
horizontaler Durchmesser: 61.8 nm; vertikaler Durchmesser: 5.4 nm

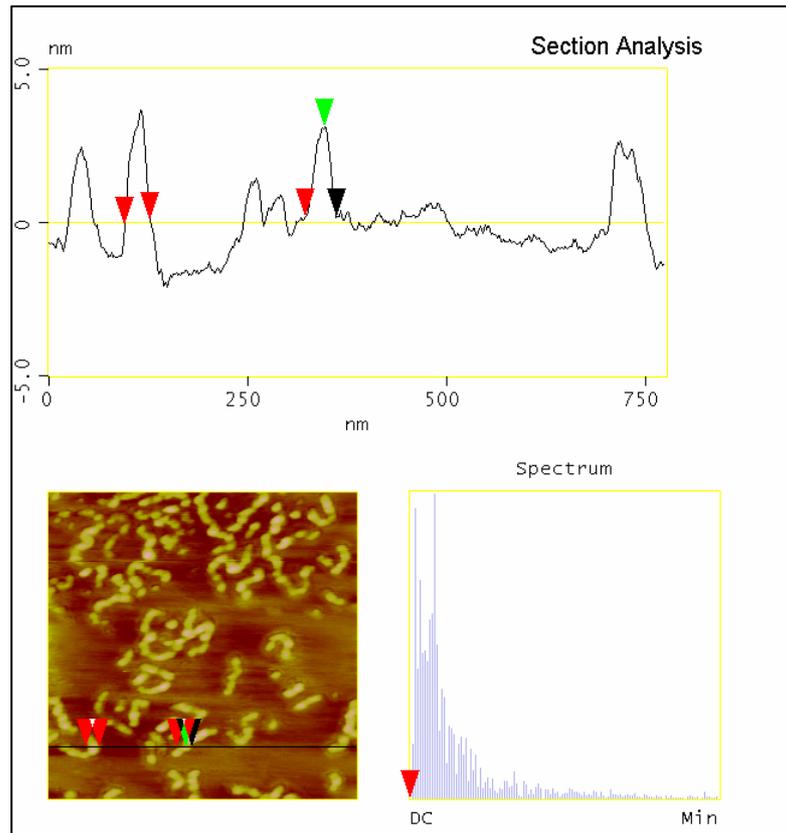


Abbildung 8.1.49: Cross-section-Analyse von Lys 55-3 in 0.5 N NaClO₄
horizontaler Durchmesser: 31.8 nm; vertikaler Durchmesser: 2.9 nm

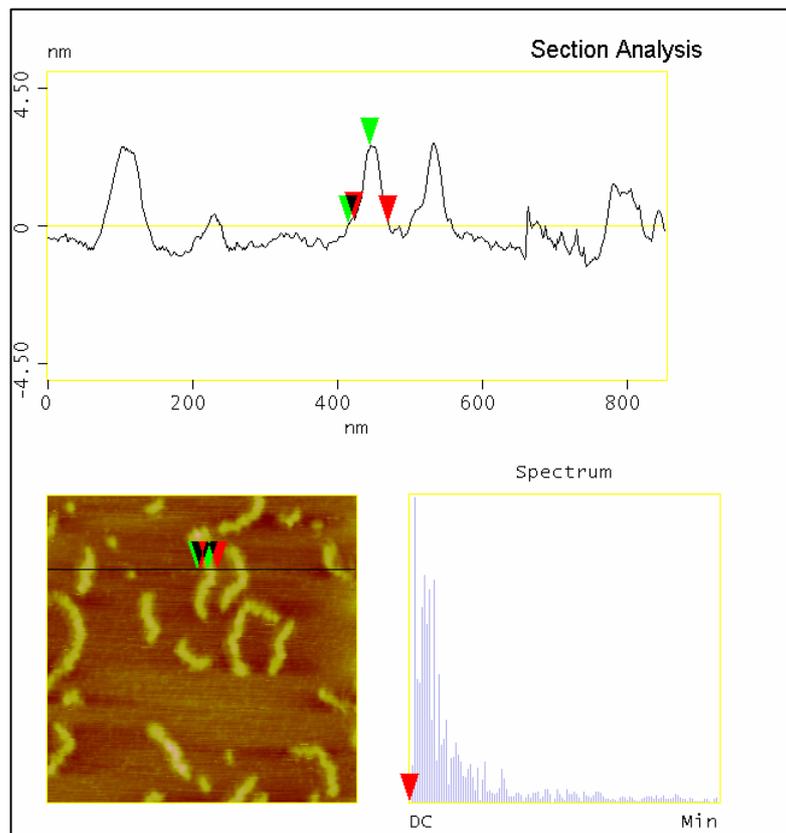


Abbildung 8.1.50: Cross-section-Analyse von Lys 55-3 in MeOH/H₂O (95:5)
horizontaler Durchmesser: 46.6 nm; vertikaler Durchmesser: 2.5 nm

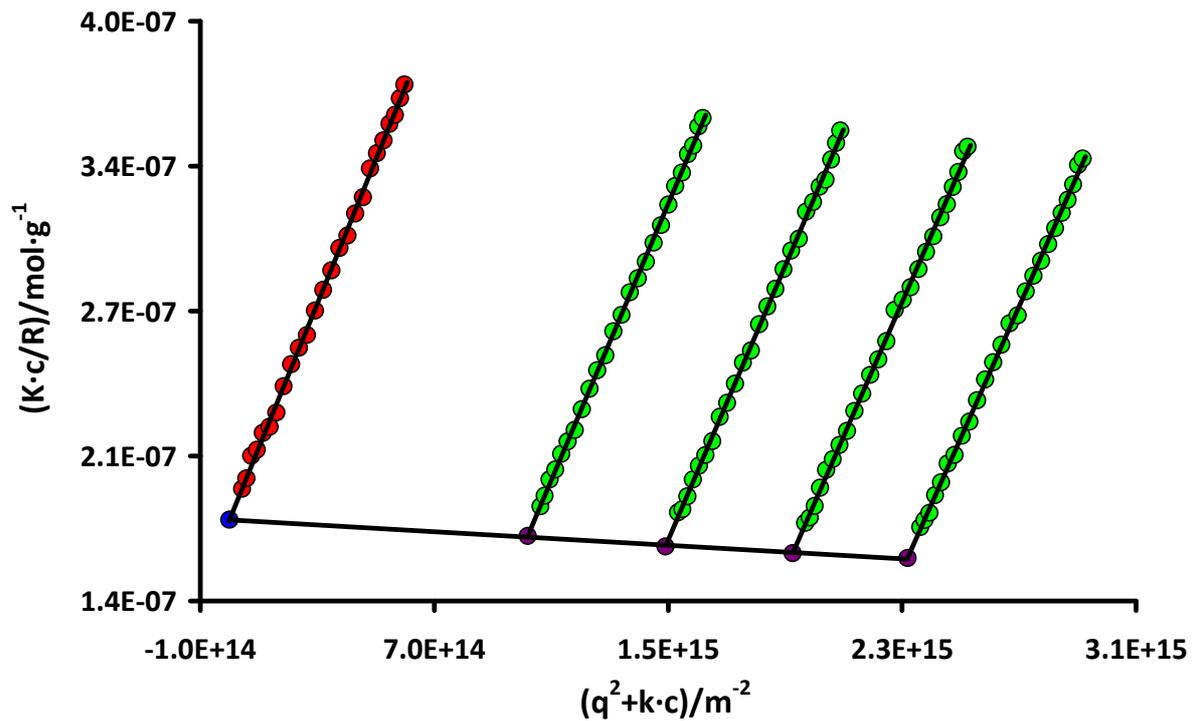


Abbildung 8.1.51: Zimmplot von TFA-Lys 25-1 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=7.73\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_2=6.42\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_3=4.97\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_4=3.40\text{E-}02\text{ g/l}$;
 $M_w=5.67\text{E}06\text{ g/mol}$; $R_g=74.1\text{ nm}$; $A_2=-2.11\text{E-}08\text{ mol}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{g}^{-2}$; $dn/dc=0.167\text{ cm}^3/\text{g}$
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03\text{ mol/l}$)

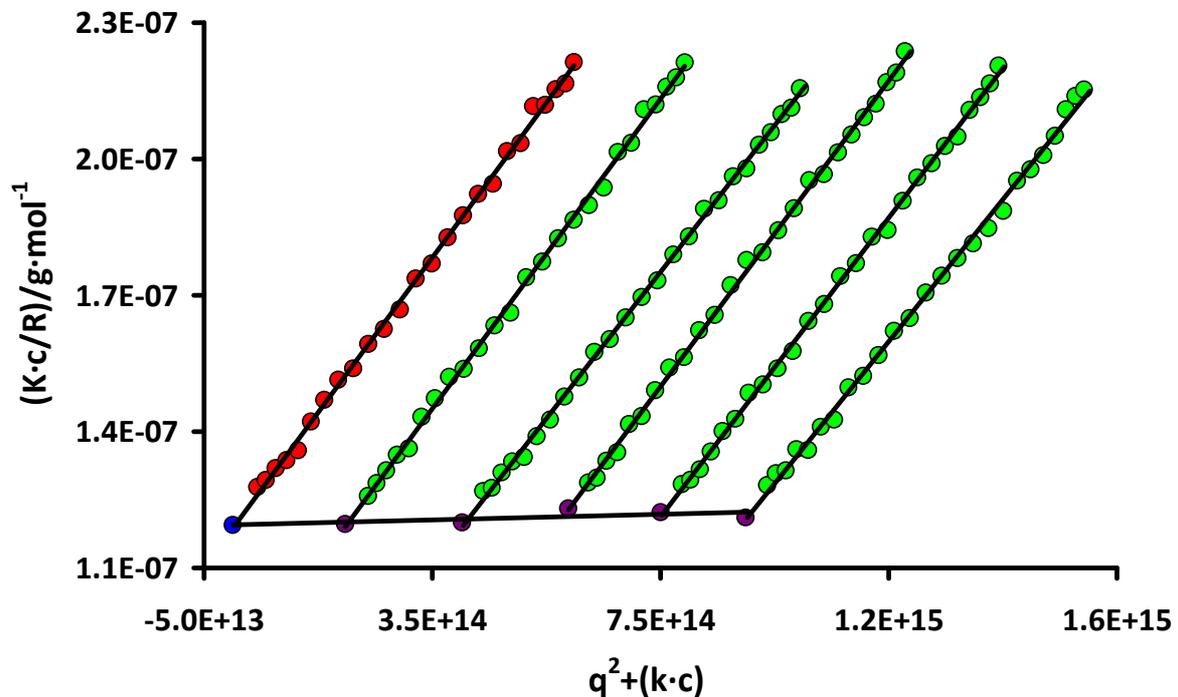


Abbildung 8.1.52: Zimmplot von Me-Glu 55-1 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=4.47\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_2=3.72\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_3=2.90\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_4=1.98\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_5=9.70\text{E-}03\text{ g/l}$
 $M_w=8.36\text{E}06\text{ g/mol}$; $R_g=65.1\text{ nm}$; $A_2=3.55\text{E-}08\text{ mol}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{g}^{-2}$; $dn/dc=0.188\text{ cm}^3/\text{g}$
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03\text{ mol/l}$)

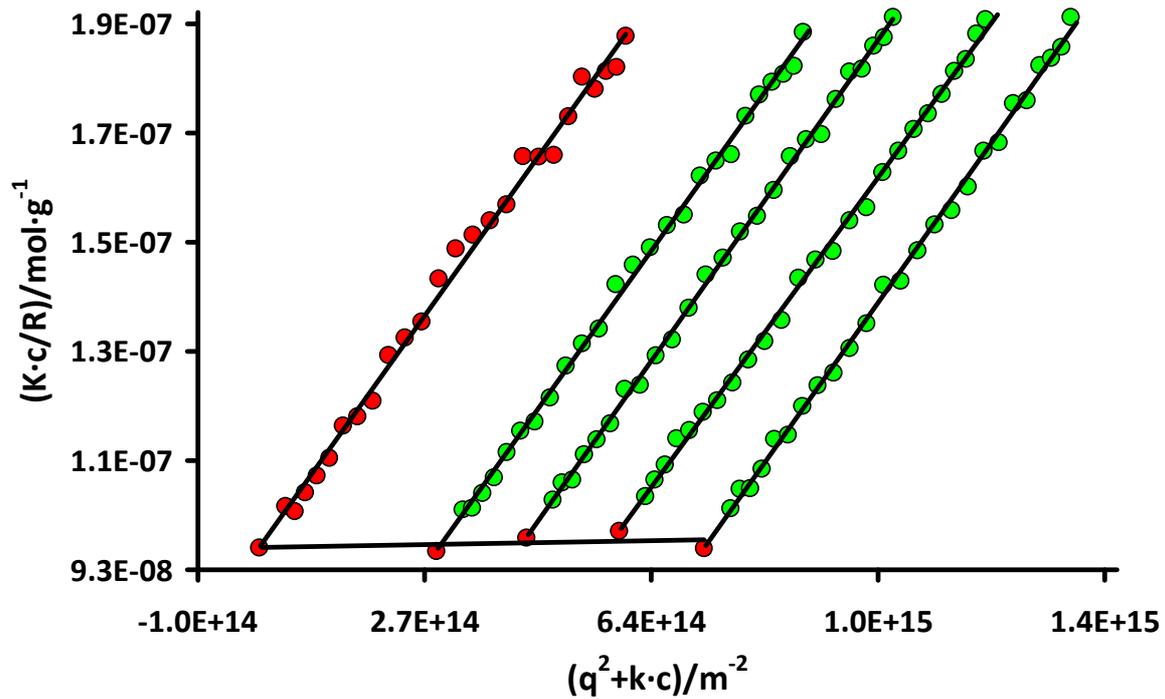


Abbildung 8.1.53: Zimmplot von Bn-Glu 55-1 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=2.42\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_2=1.94\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_3=1.45\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_4=9.64\text{E-}03\text{ g/l}$
 $M_w=10.33\text{E}06\text{ g/mol}$; $R_g=67.9\text{ nm}$; $A_2=1.36\text{E-}08\text{ mol}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{g}^{-2}$; $dn/dc=0.222\text{ cm}^3/\text{g}$
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03\text{ mol/l}$)

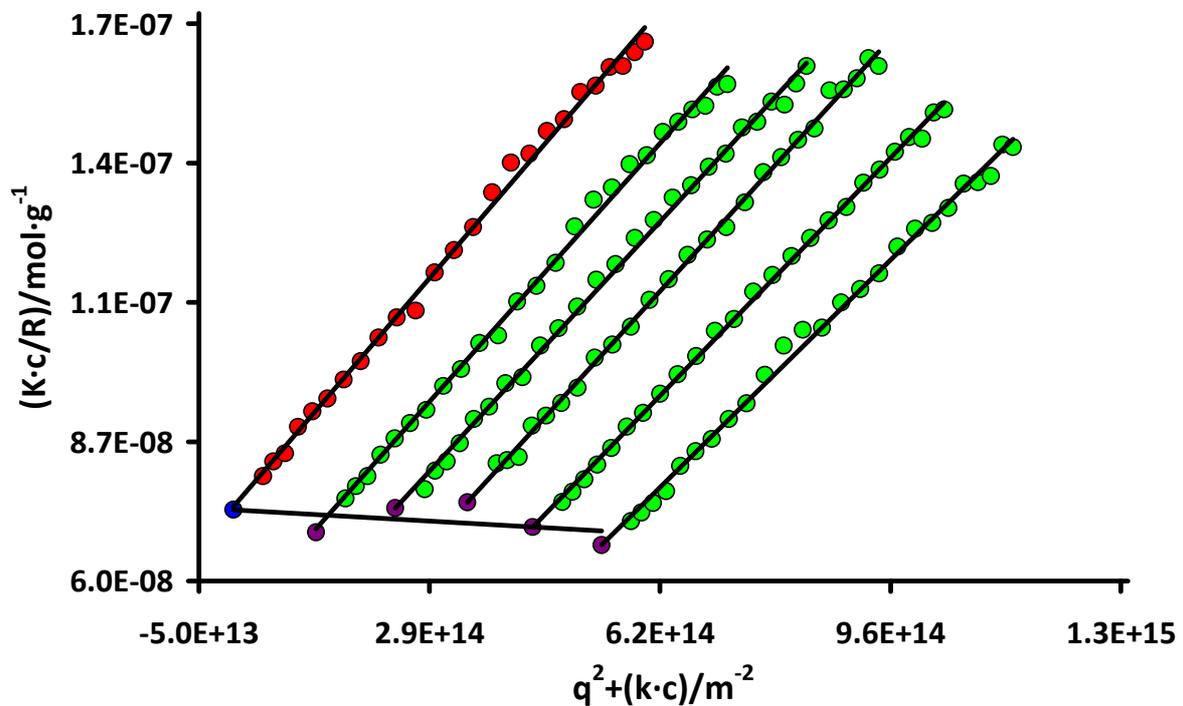


Abbildung 8.1.54: Zimmplot von Z-Lys 55-3 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=1.07\text{E-}02\text{ g/l}$; $c_2=8.70\text{E-}03\text{ g/l}$; $c_3=6.80\text{E-}03\text{ g/l}$; $c_4=4.70\text{E-}03\text{ g/l}$; $c_5=2.40\text{E-}03\text{ g/l}$
 $M_w=13.55\text{E}06\text{ g/mol}$; $R_g=79.8\text{ nm}$; $A_2=-1.911\text{E-}08\text{ mol}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{g}^{-2}$; $dn/dc=0.228\text{ cm}^3/\text{g}$
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03\text{ mol/l}$)

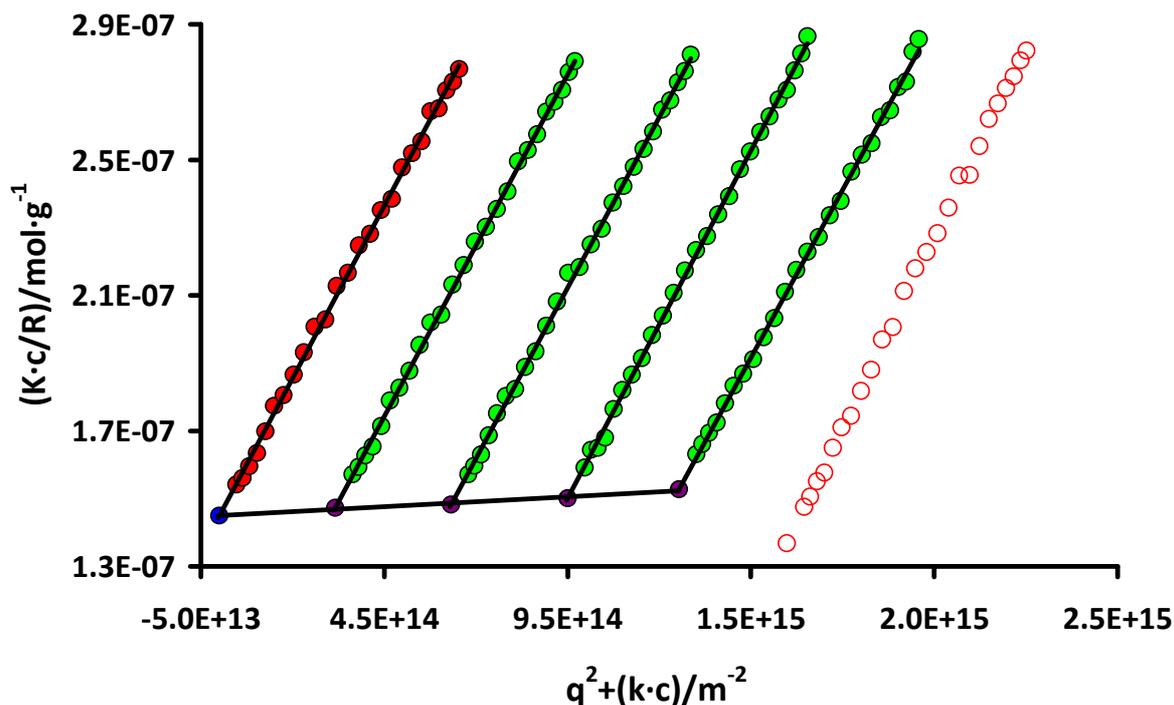


Abbildung 8.1.55: Zimmplot von Lys 25-1 in H_2O bei $T=293K$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=7.74E-02$ g/l; $c_2=6.27E-02$ g/l; $c_3=4.75E-03$ g/l; $c_4=3.16E-02$ g/l; $c_5=1.58E-02$ g/l
 $M_w=6.89E06$ g/mol; $R_g=79.8$ nm; $A_2=5.85E-08$ mol·dm³·g⁻²; $dn/dc=0.164$ cm³/g
 Salz: NaBr ($c=0.5$ mol/l)

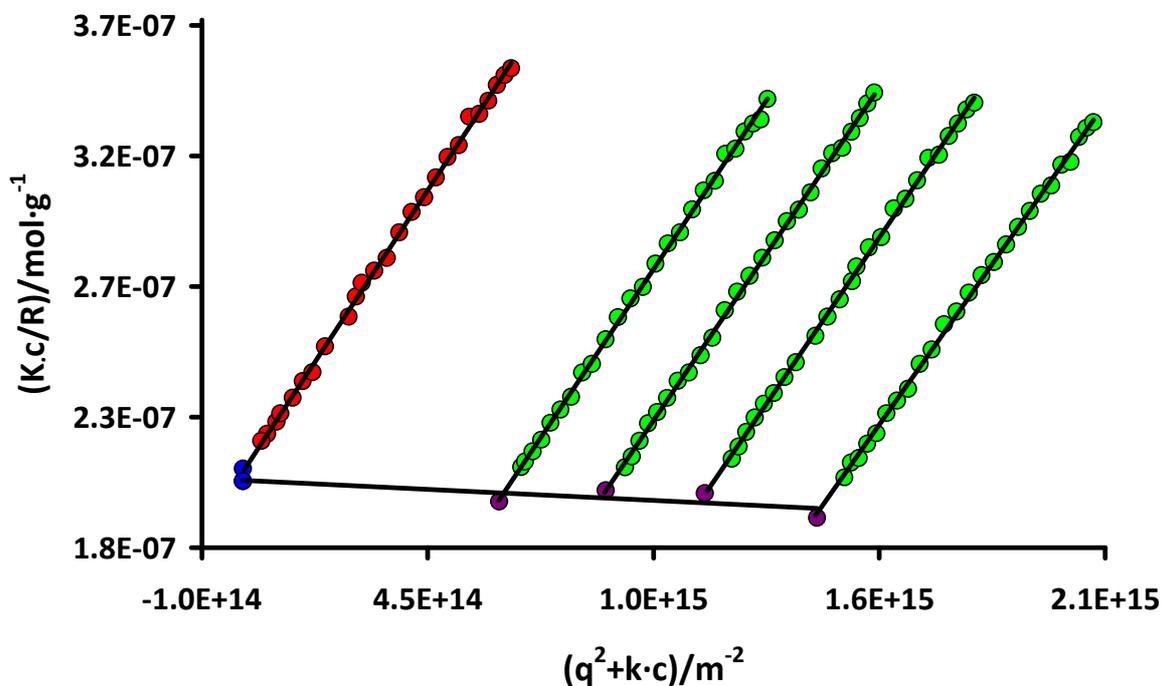


Abbildung 8.1.56: Zimmplot von Lys 25-1 in H_2O bei $T=293K$ zwischen 30 und 150 Grad; (5 Gradschritte)
 $c_1=8.09E-02$ g/l; $c_2=6.72E-02$ g/l; $c_3=5.42E-03$ g/l; $c_4=4.12E-02$ g/l
 $M_w=4.91E06$ g/mol; $R_g=56.9$ nm; $A_2=-6.53E-08$ mol·dm³·g⁻²; $dn/dc=0.164$ cm³/g
 Salz: NaClO₄ ($c=0.5$ mol/l)

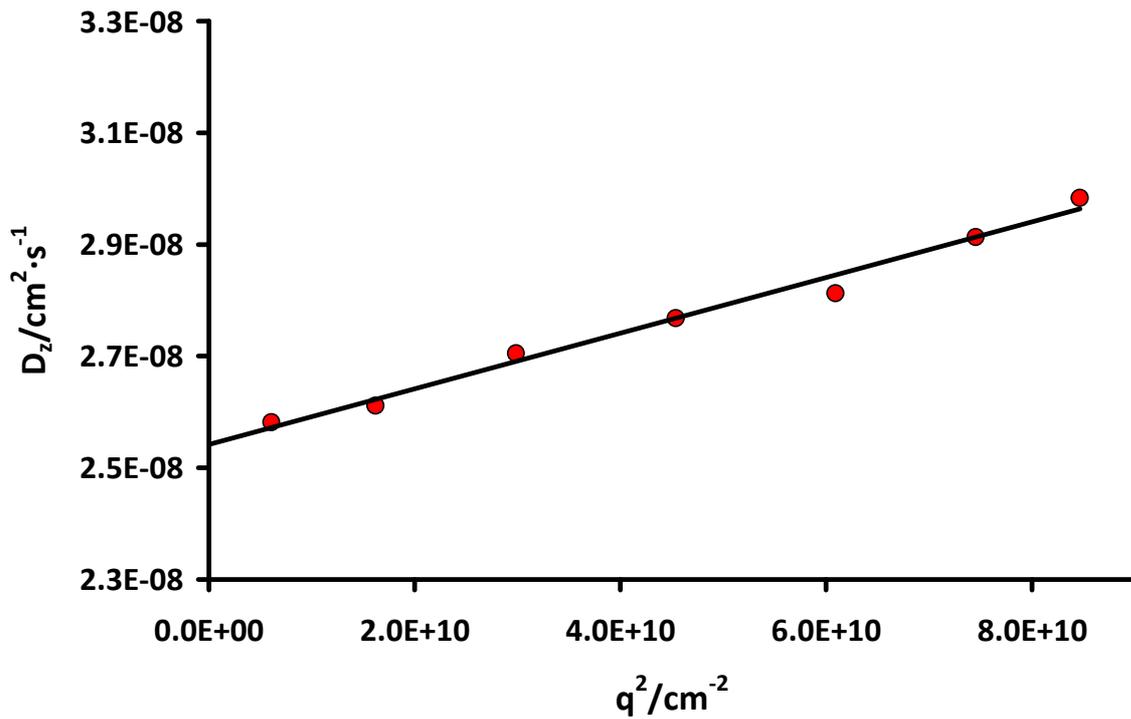


Abbildung 8.1.57: DLS von Bn-Glu 55-1 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad (24 Gradschritte)
 $c=4.83\text{E-}02 \text{ g/l}$; $D_z=2.492\text{E-}08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1,962 \text{ cp}$; $R_H=44.1 \text{ nm}$
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03 \text{ mol/l}$)

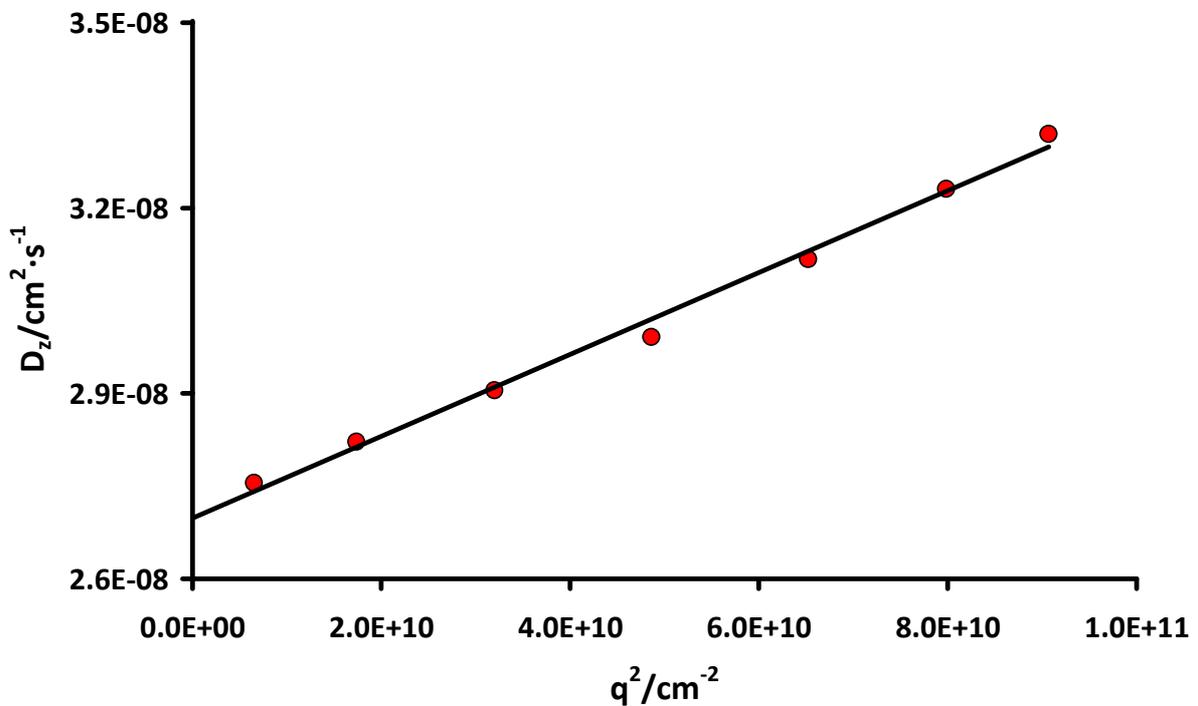


Abbildung 8.1.58: DLS von Me-Glu 55-1 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad (24 Gradschritte)
 $c=4.83\text{E-}02 \text{ g/l}$; $D_z=2.698\text{E-}08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1,962 \text{ cp}$; $R_H=40.6 \text{ nm}$
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03 \text{ mol/l}$)

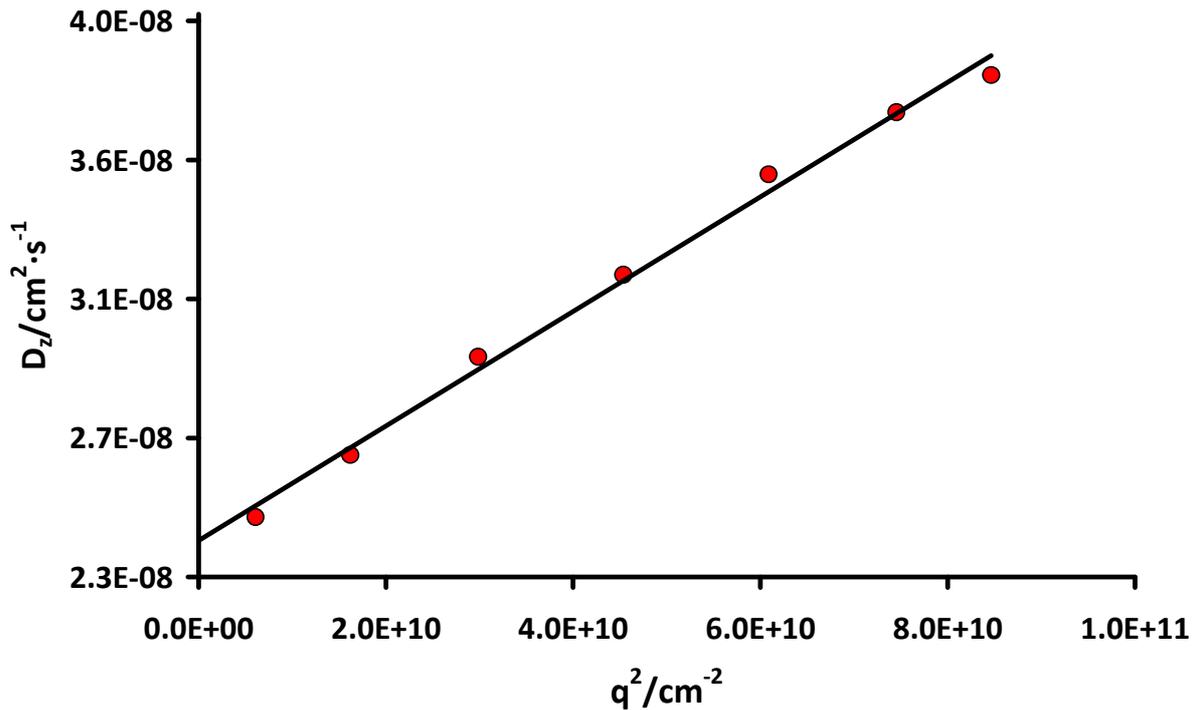


Abbildung 8.1.59: DLS von TFA-Lys 25-1 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad (24 Gradschritte)
 $c=5.21\text{E-}02\text{ g/l}$; $D_z=2.401\text{E-}08\text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1,962\text{ cp}$; $R_H=45.6\text{ nm}$
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03\text{ mol/l}$)

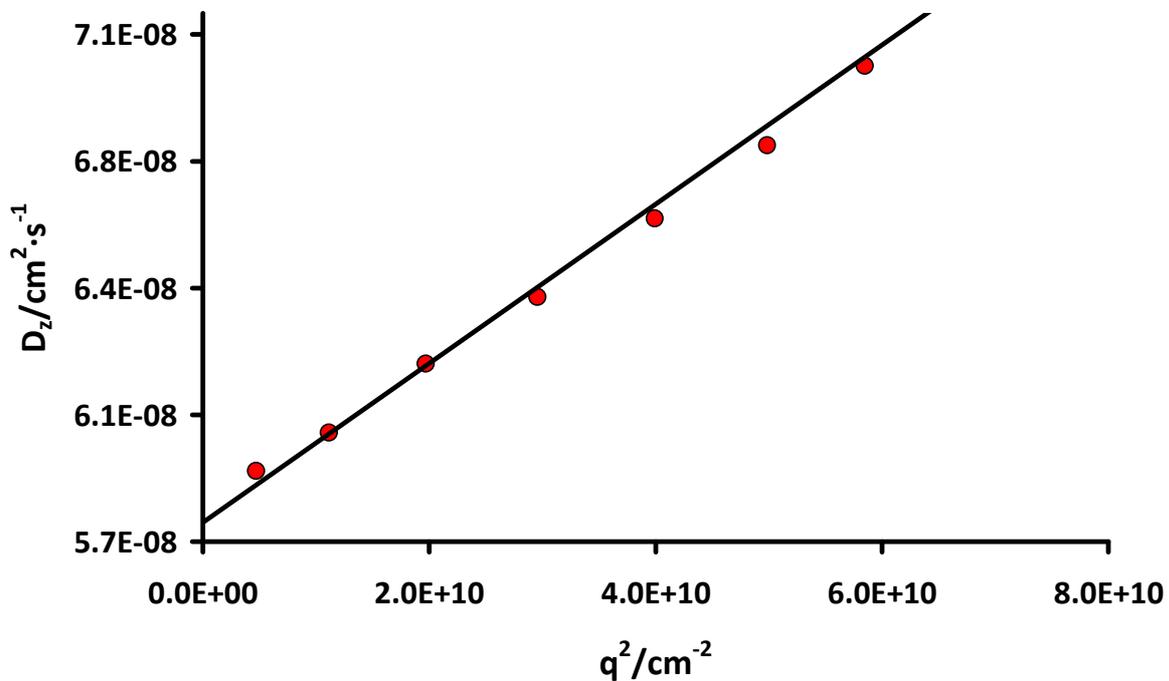


Abbildung 8.1.60: DLS von Lys 25-1 in H_2O bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad (24 Gradschritte)
 $c=3.45\text{E-}02\text{ g/l}$; $D_z=5.775\text{E-}08\text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1,009\text{ cp}$; $R_H=37.2\text{ nm}$
 Salz: NaClO_4 ($c=0.5\text{ mol/l}$)

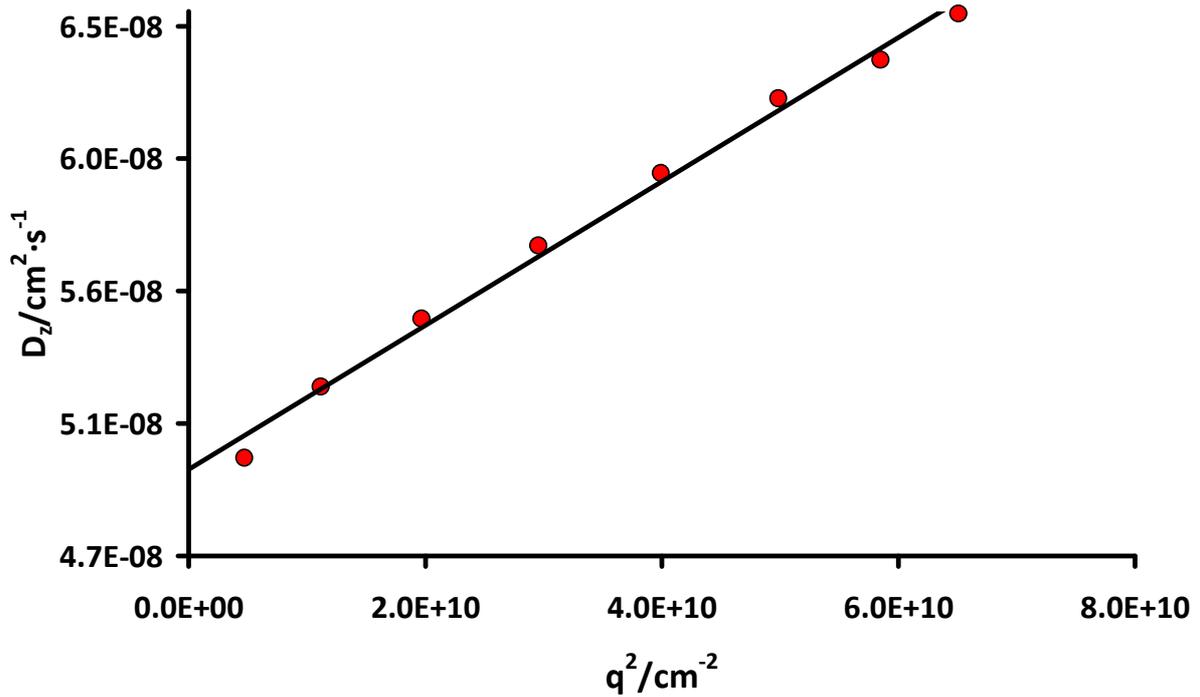


Abbildung 8.1.61: DLS von Lys 25-1 in H_2O bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad (24 Gradschritte)
 $c=3.23\text{E-}02 \text{ g/l}$; $D_z=4.943\text{E-}08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1,022 \text{ cp}$; $R_H=42.7 \text{ nm}$
 Salz: NaBr ($c=0.5 \text{ mol/l}$)

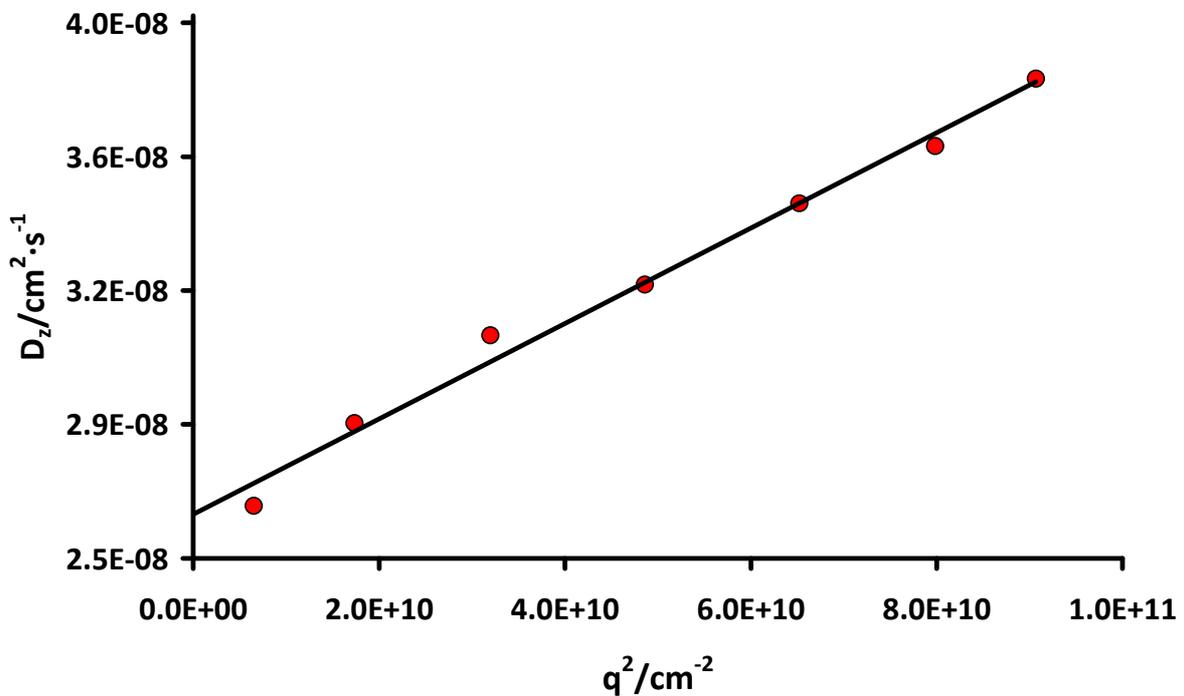


Abbildung 8.1.62: DLS von Asp 55-1 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad (24 Gradschritte)
 $c=3.71\text{E-}02 \text{ g/l}$; $D_z=2.622\text{E-}08 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $\eta=1,962 \text{ cp}$; $R_H=41.7 \text{ nm}$
 Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03 \text{ mol/l}$)

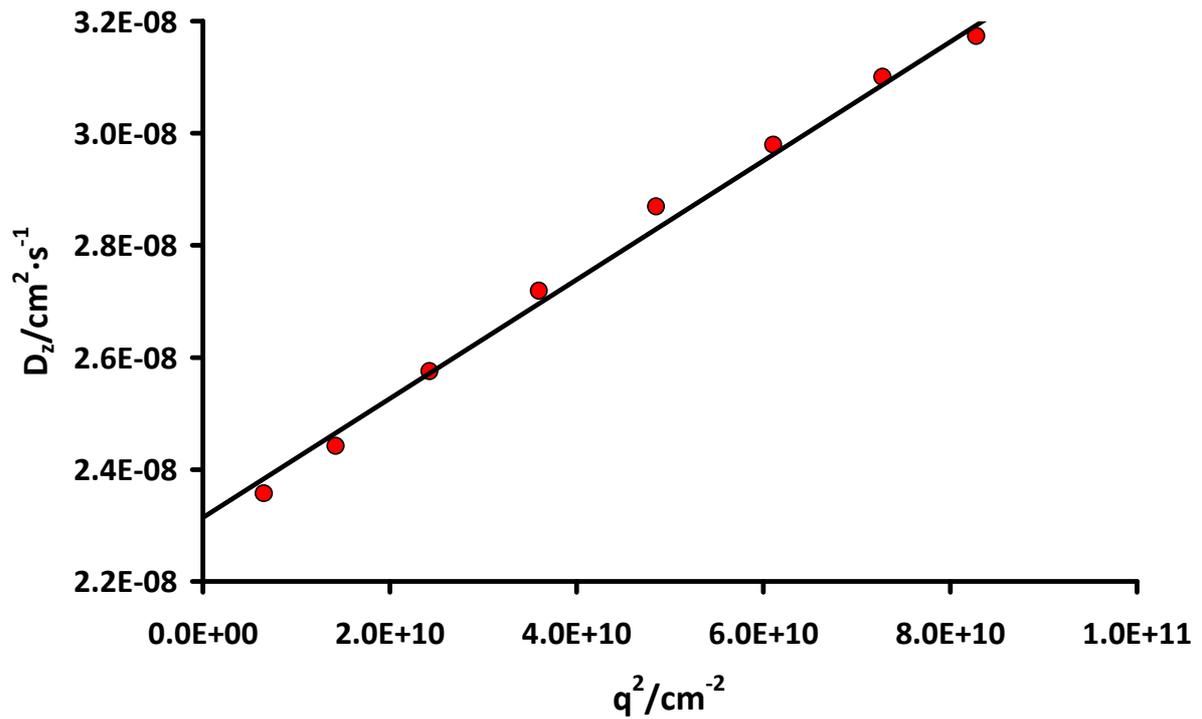


Abbildung 8.1.63: DLS von Lys 55-3 in HFIP bei $T=293\text{K}$ zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)
 $c=1.07\text{E-}02\text{ g/l}$; $D_z=2.312\text{E-}08\text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$; $\eta=1,962\text{ cp}$; $R_H=47.4\text{ nm}$
Salz: Tetramethylammoniumtriflat ($c=5\text{E-}03\text{ mol/l}$)

8.2 Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

V_e : Elutionsvolumen

M : Molekulargewicht

a, b : Konstanten

z_i : Ladungszahl des Teilchens

e : Elementarladung

E : elektrisches Feld

η : Viskosität der Probe

η_0 : Viskosität des Lösungsmittels

R_H : hydrodynamischer Radius

v_{ep} : Wanderungsgeschwindigkeit der Probe

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität

E : elektrische Feldstärke

v_{eof} : elektroosmotischer Fluss

ε : Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten

ε_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums

ζ : zeta Potential

ω : Ladungsdichte an der Wandoberfläche

F : Faradaykonstante

R : ideale Gaskonstante

P : Debye-Hückel Parameter

$R(\theta)$: Rayleighverhältnis

λ_0 : Wellenlänge des Primärstrahls

N_L : Avogardokonstante

ρ : Dichte der Lösung

n_0 : Brechungsindex des Lösungsmittels

n : Brechungsindex der Lösung

ρ : Dichte 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

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

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

A_2 : zweiter Virialkoeffizient

Π : Osmotischer Druck

K : Kontrastfaktor

N : Anzahl der Streuzentren

θ : Streuwinkel

r_{ij} : Abstandsvektor der Streuzentren i und j

q : Streuvektor

$I(0)$: Streuamplitude zum Zeitpunkt 0

$I(t)$: Streuamplitude zum Zeitpunkt t

t : Zeitabstände der Kanäle des Autokorrelators

$\langle \dots \rangle$: zeitliches Mittel

$S(q,t)$: dynamischer Strukturfaktor

$S(q)$: statischer Strukturfaktor

A : experimentell bestimmte Basislinie

B : Signal-Rauch-Verhältnis

D : translatorischer Diffusionskoeffizient

$g_1(t)$: Autokorrelationsfunktion des Streufeldes

$g_2(t)$: Autokorrelationsfunktion der Streuintensität

D_i : translatorischer Diffusionskoeffizient der Teilchensorte i

m_i : Massenanteil der Teilchensorte i

M_i : Molmasse der Teilchensorte i

C : dimensionslose Größe, von der Molekülstruktur abhängig

f_0 : Reibungskoeffizient

v_p : partielles Molvolumen des Polymers

D_{app} : apparenter Diffusionskoeffizient

R_H : hydrodynamischer Radius

R_g : Trägheitsradius

$R_{g,z}$: Z-Mittelwert des Trägheitsradius

$R_{g,n}$: Zahlenmittel des Molekulargewichts

L : Konturlänge

$P_c(q)$: Formfaktor des Querschnitts

$R_{g,c}$: Trägheitsradius des Zylinderquerschnitts (Querschnittsträgheitsradius)

ΔE : Energiedifferenz

h : Plancksche Wirkungsquantum

μ_1 : magnetisches Kernmoment

i : Kernspin

H_{eff} : effektives Magnetfeld

H_0 : statisches Magnetfeld

σ : magnetische Abschirmung

H_s : Resonanzfeldstärken des Standards

H_i : Resonanzfeldstärken der Probe

ν_s : Resonanzfrequenzen des Standards

ν_i : Resonanzfrequenzen der Probe

ν_0 : Sendefrequenz

ΔA : zirkularer Dichroismus

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

Θ_r : Elliptizität in der Einheit [Rad]

Θ_{mr} : molare Elliptizität pro Aminosäure

c : Konzentration der Probe in g/l

S_D : Schichtdicke der Küvette

n_r : Anzahl der Aminosäurebausteine

Θ_{mr}^α : Elliptizitäten der α -helicalen Strukturmerkmale

Θ_{mr}^β : Elliptizitäten der β -Faltblatt Strukturmerkmale

Θ_{mr}^{rc} : Elliptizitäten der random coil Strukturmerkmale

$f_\alpha, f_\beta, f_{rc}$: Anteile der Sekundärstrukturmerkmale im Protein

M/I : Monomer-Initiator-Verhältnis

M_n : Zahlenmittel des Molekulargewichts

M_w : Massenmittel des Molekulargewichts

$M_{w,theo}$: theoretisches Gewichtsmassenmittel der geschützten Polypeptidbürste

$P_w^{Makroini.}$: Gewichtsmittel des Polymerisationsgrad des Makroinitiators

M^{Mono} : Molekulargewicht des Monomers

$M_w^{Makroini.}$: Gewichtsmassenmittel des Makroinitiators

Q_{eff} : effektive Ladung

$a_{[\eta]}$: Molmassen-Viskositäts-Koeffizient

l_{eff} : effektive Länge der Kapillare (siehe Auch Abbildung 6.1)

t_{ret} : Retentionszeit der Probe

κ : Debye'sche Abschirmlänge

ν : Molmassen-Radien-Exponent

Γ : Gammafunktion

I : Ionenstärke

ϵ_r : Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels

k_B : Boltzmannkonstante

T : Temperatur

c_i : Konzentration der ionischen Spezies i

z_i : Ladung der ionischen Spezies i

$q_{\langle s^2 \rangle_n}^{(sz)}$: Polymolekularitäts-Korrektur-Faktor

k : Kopplungsparameter

U : angelegte Spannung

l_{ges} : Gesamtlänge der Kapillare

HFIP : 1,1,1,3,3,3 Hexafluoroisopropanol

DMF : *N,N*-Dimethylformamid

MeOH : Methanol

NaCl : Natriumchlorid

NaOH : Natriumhydroxid

NaClO₄ : Natriumperchlorat

K₂CO₃ : Kaliumcarbonat

NaBr : Natriumbromid

GPC : Gelpermationschromatographie

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

GC : Gaschromatographie

AFM : Atomic Force Microscopy

SAXS : Small Angle X-ray Scattering

DLS : Dynamic Light Scattering

SLS : Static Light Scattering

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

CE : Capillary Electrophoresis

TFA : Trifluoracetyl

Z : Benzyloxycarbonyl

Boc : tert-Butoxycarbonyl

Asp : Asparginsäure

Glu : Glutaminsäure

Orn : Ornithin

Lys : Lysin

TMSI : Trimethylsilyliodid

PVP : Polyvinylpyridin

HSAB : Hard and Soft Acids and Base