
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung

**Synthese monodisperser, multifunktionaler Poly(amidoamine)
und ihre Anwendung als nicht-virale Vektoren für die
Gentherapie**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Kolloidchemie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Laura Hartmann
aus Bochum

Potsdam, im Januar 2007

1.	Einleitung und Motivation.....	1
2.	Grundlagen.....	4
2.1	Polymere in der Medizin.....	4
2.1.1	Allgemeines.....	4
2.1.2	Polymere als Träger.....	5
2.1.3	Nicht-virale Gentransfektion.....	6
2.2	Poly(amidoamine) (PAA)s.....	11
2.2.1	Allgemeines.....	11
2.2.2	Synthese der PAAs.....	12
2.2.3	Anwendungen in der Medizin.....	13
2.3	Festphasensynthese.....	15
2.3.1	Festphasen-Peptid-Synthese.....	15
2.3.2	Festphasensynthese anderer Moleküle.....	19
3.	Methoden.....	22
3.1	Massenspektrometrie.....	22
3.1.1	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	22
3.1.2	ESI-Massenspektrometrie.....	23
3.2	Lichtstreuung.....	24
3.2.1	Allgemeines.....	24
3.2.2	Statische Lichtstreuung.....	25
3.2.3	Dynamische Lichtstreuung.....	26
3.3	Mikroskopie.....	28
3.3.1	Allgemeines.....	28
3.3.2	Rasterkraftmikroskopie.....	28
3.4	Gelelektrophorese.....	30
3.4.1	Allgemeines.....	30
3.4.2	Durchführung einer Gelelektrophorese.....	31
4.	Festphasengebundene Synthese der PAAs.....	32
4.1	Schrittweiser Aufbau an der Festphase.....	32
4.1.1	Allgemeines.....	32
4.1.2	Auswahl der Festphase.....	33
4.1.3	Alphabet der Bausteine.....	36
4.1.4	Addition der Bausteine.....	38

4.1.5	Einbau von Peptidsequenzen.....	40
4.1.6	Abspaltung vom Harz.....	41
4.1.7	Automatisierung der Synthese.....	42
4.2	Synthese der Peptid-PAA's.....	46
4.3	Synthese der PEO-PAA's.....	47
4.4	Spaltung einer Disulfid-Einheit zw. PEO- und PAA-Block.....	48
5.	Charakterisierung der PAA's.....	51
5.1	Analytik der Blockcopolymeren.....	51
5.1.1	Massenspektrometrische Untersuchungen.....	51
5.1.2	Vergleichende Ultrazentrifugation.....	53
5.1.3	Kernresonanzspektroskopie.....	54
5.1.4	Gelpermeationschromatographie.....	55
5.1.5	Aggregation in Lösung.....	57
5.2	Fragmentierung der Blockcopolymeren in der MS.....	59
6.	Herstellung und Charakterisierung der Polyplexe.....	65
6.1	Herstellung der Polyplexe.....	65
6.2	Struktur der Polyplexe.....	66
6.2.1	Strukturbildung der Polyplexe.....	66
6.2.2	Polyplexe mit PEI.....	68
6.2.3	Polyplexe mit PEO-PAA's.....	70
6.3	Stabilität in Lösung.....	81
6.3.1	Komplexbildung bei verschiedenen N/P-Verhältnissen.....	81
6.3.2	Ethidiumbromid Assay.....	85
7.	Zellbiologische Eigenschaften der Polyplexe.....	89
7.1	Toxizität der PEO-PAA's und PEO-PAA Polyplexe.....	89
7.2	Zell-Aufnahmestudien von PEO-PAA Polyplexen.....	91
7.3	Transfektion mit PEO-PAA Polyplexen.....	94
8.	Zusammenfassung und Ausblick.....	102
9.	Anhang.....	104
10.	Danksagung.....	121
11.	Literatur.....	123

Kapitel 1

Einleitung und Motivation

Synthetische Makromoleküle bieten eine große Vielfalt an Funktionen und Eigenschaften und ein nahezu unerschöpfliches Potenzial für Anwendungen in den verschiedensten Bereichen. Sie sind z. B. variabel in ihren optischen, mechanischen und elektrischen Eigenschaften und können hochkomplexe Strukturen und Aggregate ausbilden. Die Eigenschaften der synthetischen Makromoleküle werden dabei vor allem durch die Wahl der Monomere bestimmt, deren große Zahl die Vielfalt und Variabilität der Polymereigenschaften ermöglicht.

Im Gegensatz dazu ist der Baukasten der Natur eher beschränkt: natürliche Proteine sind aus 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut, die Desoxyribonukleinsäure (DNS) als Molekül der Informationsübertragung sogar aus nur vier verschiedenen Nukleinsäuren. Dennoch besitzen auch die biologischen Makromoleküle eine große Vielfalt an Funktionen und Eigenschaften. Sie können vielfältige, funktionale Strukturen realisieren und somit verschiedene Aufgaben als Katalysator, Botenstoff oder Strukturelement erfüllen. Dabei sind sie jedoch im Gegensatz zu den synthetischen Makromolekülen hoch-definiert und durch jeden Baustein perfekt an ihre Funktion angepasst. Dies wird hauptsächlich durch die Nutzung einer weiteren Regulierungsmöglichkeit bedingt: Der Monomersequenz. Durch die Kontrolle der Sequenz können monodisperse Polymerketten realisiert werden, d. h. lineare Ketten, die an jeder Monomerposition präzise definierte Eigenschaften besitzen und somit den Aufbau hoch definierter, multifunktionaler Systeme ermöglichen.

Für synthetische Makromoleküle war eine solche Sequenzkontrolle bisher häufig zu aufwendig. Die zunehmende Anwendung im Bereich der Medizin stellt jedoch neue Anforderungen an die Eigenschaften und die Definiertheit der synthetischen Makromoleküle. Biologische Systeme wie Zellen oder höhere Organismen sind meist sehr komplex und in ihren Prozessen oft noch nicht vollständig erforscht. Zur gezielten Beeinflussung solcher Biosysteme, etwa im Sinne einer Therapie, bedarf es daher hoch definierter Makromoleküle, nicht nur um ungewollte Nebenwirkungen zu verhindern, sondern auch um Struktur-Wirkungsbeziehungen besser zu verstehen und so eine Optimierung der Bioantwort zu ermöglichen. So ist für viele Polymere z. B. die Polydispersität problematisch, da niedermolekulare Fraktionen toxisch wirken bzw. hochmolekulare Fraktionen vom Organismus nicht abgebaut werden können.

Alternativ zu den Polymeren werden daher in der Medizin oft synthetische Peptide oder Proteine eingesetzt, da diese definiert hergestellt werden können und aus körpereigenen Biobausteinen aufgebaut sind. Allerdings zeigen viele dieser Stoffe inhärente Immunogenizität, d. h. sie lösen im Organismus Abwehrreaktionen aus, die zur schnellen Entfernung aus dem Organismus führen oder diesen sogar schädigen können. Somit sind sie nur schlecht für einen Einsatz etwa als Wirkstoffträger geeignet. Im Gegensatz dazu ist das Immunsystem erstaunlich tolerant gegenüber synthetischen Derivaten natürlicher Bausteine, wie z. B. Polymilchsäure oder den Pseudopeptiden. Die biokompatiblen synthetischen Polymere zeichnen sich vor allem durch ihre geringe Toxizität und Immunogenizität aus und werden bereits vielseitig in der Medizin als Trägermaterialien für den Wirkstofftransport eingesetzt. Diese biokompatiblen Polymere müssen während des Transports zum Wirkort stabil gegen physiologische Bedingungen sein, aber gleichzeitig auch instabil genug, um später abgebaut und aus dem Körper entfernt zu werden.

Die Kombination dieser beiden Eigenschaften sowie eine sehr gute Biokompatibilität ist der große Vorteil der Klasse der Poly(amidoamine). Diese Polymere besitzen im Rückgrat sowohl Amid- als auch Aminfunktionalitäten und finden als Dendrimere bereits zahlreiche Anwendungen in der Medizin. Lineare Poly(amidoamine) besitzen ein vergleichbares biomedizinisches Potenzial und zeigen gegenüber den Dendrimern den Vorteil einer geringeren hämolytischen Aktivität. Die bisherigen Synthesemethoden erlaubten aber nur den Zugang zu schlecht definierten, polydispersen Proben, die wie bei anderen synthetischen Makromolekülen auch eine definierte Darstellung von z. B. Polymer-Wirkstoff-Komplexen erschweren und zu ungewollten Nebenwirkungen etwa durch ungenügenden Abbau im Organismus führen können.

Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, für lineare Poly(amidoamine) einen definierten Sequenzaufbau auf eine einfache, schnelle und automatisierte Art zu etablieren, wie dieser für Oligopeptide bereits möglich ist. Dazu wird mit Hilfe von festphasengebundener Synthese ein sequenzierter Aufbau aus funktionalen Bausteinen durchgeführt. Diese Bausteine sind keine α -Aminosäuren, sondern Derivate natürlich vorkommender Bausteine wie dem Spermin. Diese zum Teil körpereigenen Bausteine belasten vom Konzept her den Organismus nicht und ermöglichen den Einbau verschiedener wichtiger Funktionalitäten, die z.B. zur Komplexierung des Wirkstoffs dienen oder einen selektiven Abbau ermöglichen. Dabei müssen die Bausteine so gewählt sein, dass sie einen fehlerfreien Sequenzaufbau garantieren und beliebig miteinander kombinierbar sind. Ein solches Monomer-Alphabet ermöglicht es dann, Poly(amidoamine) mit einer spezifischen Sequenz aufzubauen und damit die

Polymereigenschaften immer wieder neu an verschiedene Bedingungen anzupassen und zu optimieren.

Um das Potenzial der sequenzdefinierten Poly(amidoamine) zu untersuchen, sollen daher im Rahmen dieser Arbeit Systeme dargestellt werden, die sich für eine Anwendung als nicht-virale Vektoren in der Gentherapie eignen. Dazu müssen die Wechselwirkungen dieser Polymere mit Plasmid-DNS sowie mit verschiedenen Zelltypen charakterisiert und nach Möglichkeit optimiert werden. Im Gegensatz zu den bisher in der Gentherapie eingesetzten Polymerträgern besteht dabei die Möglichkeit, die Beziehung zwischen der Monomersequenz der Poly(amidoamine) und den resultierenden Eigenschaften gezielt zu untersuchen. Diese Systeme können somit dazu beitragen, neue grundlegende Erkenntnisse über die Wirkung von Polymeren in komplexen biologischen Systemen zu erlangen.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Polymere in der Medizin

2.1.1 Allgemeines

Polymere sind heute ein essentieller Bestandteil der modernen Medizin. Einen großen Bereich nehmen dabei die chirurgischen Anwendungen ein, z. B. für Implantate, Prothesen oder Nahtmaterialien.^[1] Künstliche Polymere bieten bei Veränderung ihres Molekulargewichts und ihrer chemischen Zusammensetzung ein breites Spektrum an verschiedenen Materialeigenschaften. Die mechanischen Eigenschaften, die Löslichkeit, die biologische Kompatibilität und andere Eigenschaften des Polymers können je nach Verwendung gewählt und spezifisch eingestellt werden. Die gezielte Nutzung dieser Materialeigenschaften bietet dabei viele Vorteile. Bei Prothesen z. B. entscheiden die Oberflächenbeschaffenheit und die mechanische Stabilität über die Wahl des geeigneten Polymers.^[2] Materialien für Wundgarn müssen elastisch und inert sein, sich nach einer definierten Zeit aber rückstandsfrei auflösen.^[3] Im Gegensatz zu biologischen Polymeren sind künstliche Polymere darüber hinaus weniger mikrobiell anfällig.

In den letzten Jahren bekam ein neuer Bereich zunehmend Bedeutung für die Anwendung von Polymeren in der Medizin, das so genannte *drug delivery*.^[4] Die Nutzung von z. B. mizellaren Systemen, Liposomen oder Mikro- und Nanokapseln für den Transport von pharmakologisch wirksamen Substanzen ermöglicht die gezielte Ansteuerung pathogener Strukturen und die selektive Freisetzung des Wirkstoffs am Wirkort.^[5] Dies ermöglicht die Erhöhung des Wirkungsgrads im Organismus. Durch diese Optimierung des Wirkstoffs können dann die Dosis und somit Nebenwirkungen reduziert werden.

Polymere werden auch in zahlreichen pharmazeutischen Formulierungen verwendet. Ein magensaftresistenter Polymethacrylat-Film (Eudragit[®]) einer Filmtablette z. B. schützt den Wirkstoff vor Zersetzung durch Magensäfte sowie den Magen vor evtl. Schleimhautschädigungen durch den Wirkstoff und bewirkt pH-abhängige Auflösung des Films und Freisetzung des Wirkstoffs im Darm.^[6] Neben den gewünschten mechanischen und chemischen Eigenschaften muss auch hier das Polymer biologisch verträglich sein und darf keine unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Organismus eingehen.

2.1.2 Polymere als Träger

Das Prinzip des *drug delivery* ermöglicht neben der Optimierung bekannter Wirkstoffe auch den Einsatz von Wirkstoffen, die sich aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit oder schlechten Membranpermeabilität bisher nur begrenzt einsetzen ließen.^[5] So wird z.B. das lipophile Zytostatikum Doxorubicin in Liposomen solubilisiert und ist unter dem Namen Doxosom[®] ein kommerziell erhältliches Chemotherapeutikum (Abb. 2.1c).^[7] Der Einsatz von z. B. Peptiden als Wirkstoff ist vor allem durch ihre Instabilität im Organismus limitiert. Sie werden vom Organismus durch den Stoffwechsel entfernt und wirken zum Teil aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen toxisch. Ein aktuelles Beispiel ist die Verkapselung von Insulin in Mikrokapseln durch die eine patientenfreundlichere Verabreichung nasal oder oral ermöglicht und die Injektion vermieden wird.^[8,9]

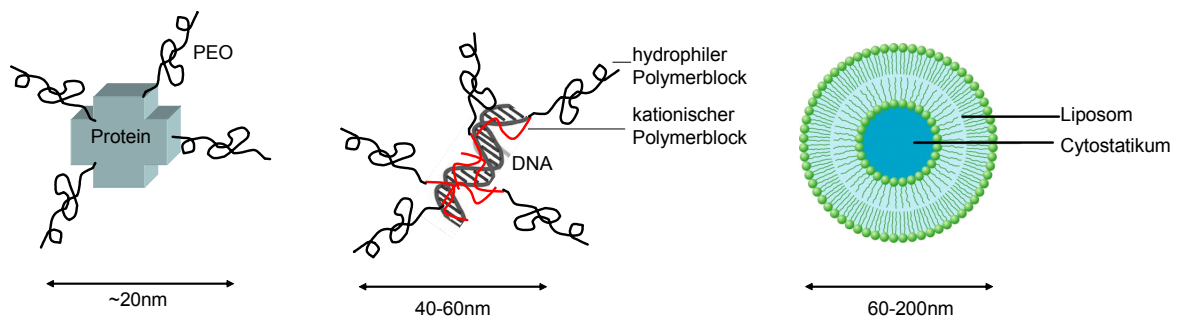


Abb. 2.1: Einige Beispiele für die Anwendung von Polymeren im Bereich des *drug delivery*: a) kovalente Modifizierung eines Peptids mit PEO, b) Komplexierung von Genmaterial mit Polymeren, c) Verkapselung von Cytostatika in Liposomen.

Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung und des gezielten Transports von Wirkstoffen bietet die kovalente Anbindung eines Polymers an den Wirkstoff, der Bildung so genannter Polymer-Wirkstoff-Konjugate (Abb. 2.1).^[5] Ein Beispiel ist die Modifizierung von Cytostatika mit Polyethylenoxid (PEO).^[10] Zum einen verbessert diese Modifizierung die Löslichkeit des Wirkstoffs, zum anderen ermöglicht sie einen gezielteren Transport zum Wirkort. Für diesen gezielteren Transport entscheidend ist hierbei die Größe des Konjugats. Das schneller nachwachsende Tumorgewebe besitzt eine löchrigere Blutgefäßwand als gesundes Gewebe. Konjugate einer bestimmten Größe (20-200 kDa) gelangen durch diese Gefäßwand in das Tumorgewebe und werden aufgrund der schlechteren Lymphdrainage des Tumors nicht wieder aus dem Gewebe entfernt. Es kommt zur selektiven Anreicherung des Konjugats im Tumorgewebe auch ohne die Verwendung eines spezifischen Rezeptors. Diese Form des passiven *drug delivery* ist bekannt als EPR-Effekt (Enhanced Permeability and

Retention).^[11] Kleinere Moleküle wie z. B. reines Doxorubicin würden sich gleichmäßig im ganzen Organismus verteilen und somit auch den ganzen Organismus schädigen.

Ein anderes Beispiel ist die kovalente Anbindung von Polymeren an Proteine (Abb. 2.1a). Dabei wird das Protein vor Abbau durch den Organismus geschützt und die Zirkulation verlängert. Außerdem vermindert das Polymer unerwünschte unspezifische Wechselwirkungen mit dem Organismus und vermindert so die Immunreaktion. Ein kommerziell erhältliches Produkt ist z. B. Pegasys[®], ein PEO-modifiziertes Interferon, das zur Behandlung von Hepatitis C eingesetzt wird.^[12]

Ein in den letzten 10 Jahren stark wachsender Einsatzbereich des *drug delivery* mit Polymeren ist die nicht-virale Gentherapie. Dabei muss Genmaterial wie DNS in den Zellkern eingeschleust werden um dort mit Hilfe der kodierten Information eine bisherige Fehlfunktion zu beheben oder eine selektive Abtötung der Zelle zu ermöglichen. Der Einsatz von Polymeren als Transportsystem beruht auf der Möglichkeit, das anionische Rückgrat der DNS mit Polykationen zu komplexieren und so einen stabilen Polymer-DNS-Komplex zu bilden (Abb.2.1b).^[13, 14] Die besondere Herausforderung an das Transportsystem besteht zum einen in der Größe des Genmaterials. Das z. B. für zellbiologische Untersuchungen der Gentherapie verwendete Plasmid GFP (Green Fluorescent Proteine) besteht aus 4.7 kB (kiloBasenpaaren), einer Molmasse von umgerechnet etwa 1.450.000 g/mol. Zum anderen muss das Genmaterial während des Transports vollständig vor Abbau geschützt sein, bei Erreichen des Wirkorts, also des Zellkerns, aber selektiv wieder freigesetzt werden. Viele Mechanismen des Transports der Gentherapie sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt, und trotz zahlreicher Arbeiten und auch klinischer Studien ist noch kein Produkt für die Gentherapie kommerziell erhältlich.^[42]

2.1.3 Nicht-virale Gentransfektion

2.1.3.1 Allgemeines

Die Anzahl der weltweit durchgeführten gentherapeutischen, klinischen Studien stieg von weniger als 10 Anfang der Neunziger auf etwa 100 im letzten Jahr (Abb. 2.2).^[15] Zu den ersten Erkrankungen die gentherapeutisch behandelt wurden, gehörten monogenetische Erkrankungen wie die Adenosin-Desaminase Defizienz und die Zystische Fibrose (CF; auch Mukoviszidose), die durch nur ein fehlerhaftes Gen verursacht werden. Neben der Therapie dieser monogenetischen Defekte ist zunehmend die Behandlung von Tumoren Schwerpunkt der Forschung. Derzeit haben etwa zwei Drittel aller gentherapeutischen Studien die

Behandlung von Tumoren zum Ziel, etwa 20% die Therapie von HIV-Infektionen und 8% der Studien zielen auf die Behandlung der zystischen Fibrose.^[15] Von besonderer Bedeutung für die klinische Anwendung ist die Verwendung von rekombinanten Viruspartikeln für den Transport des Genmaterials. In das virale Genom werden fremde Gensequenzen eingebracht, die später in der Zielzelle exprimiert werden sollen und dort therapeutisch wirken.^[16, 40]

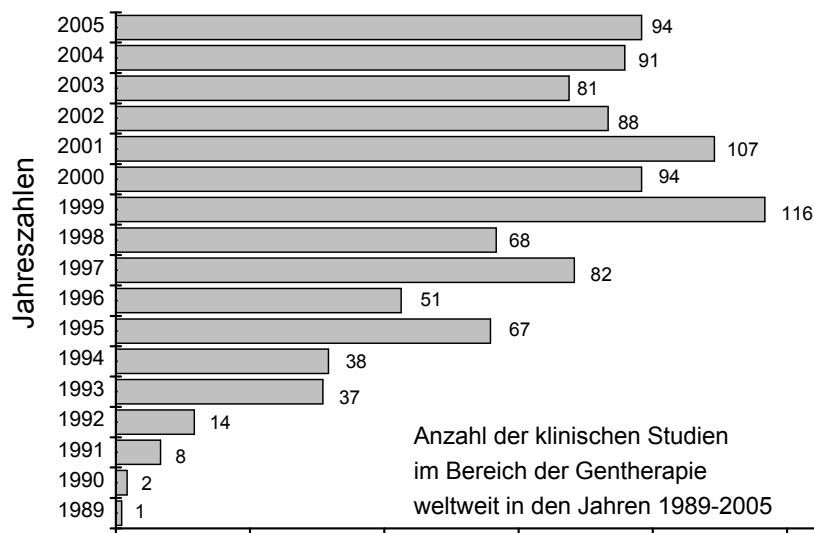


Abb. 2.2: Durchgeführte klinische Studien im Bereich der Gentherapie weltweit in den Jahren 1989 bis 2005.^[15]

Problematisch bei dieser sogenannten viralen Gentransfektion ist vor allem die Entwicklung einer spezifischen Immunantwort gegen die Hüllproteine des Virus. Bereits durchgeführte klinische Studien führten zu systemischen Reaktionen wie schweren Entzündungen bis hin zu Todesfällen.^[17, 18] Dabei sind die Ursachen dieser Nebenwirkungen häufig noch nicht genau bekannt und lassen sich daher schwer ausschließen. Insgesamt lassen die notwendigen umfangreichen zellbiologischen und medizinischen Vorarbeiten und die aufwendigen Sicherheitsvorkehrungen hohe Kosten bei der klinischen Anwendung der viralen Gentransfektion erwarten. Dabei ist ein Erfolg nicht sicher.

2.1.3.2 Systeme für die nicht-virale Gentransfektion

Für die nicht-virale Gentransfektion haben sich in den letzten Jahren vor allem drei Klassen der Vektoren als vielversprechend herauskristallisiert: kationische Polymere, kationische Dendrimere und kationische Lipide.^[19]

Bei der Verwendung kationischer Lipide als Vektoren wird die DNS über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran der Liposomen, künstlicher Membranvesikel, die sich

spontan aus Phospholipidmolekülen in wässriger Lösung bilden, assoziiert. Ein solcher Komplex aus Liposom und Genmaterial wird als Lipoplex bezeichnet. Die Transfektionseffizienz ist dabei *in vitro* in Abhängigkeit der Zelllinie mit der Effizienz der viralen Gentransfektion vergleichbar. Es befinden sich bereits erste Lipoplexe in der klinischen Phase.^[20] Ein Nachteil der Verwendung von Liposomen liegt in der mechanischen Belastung des Genmaterials bei der Herstellung (z.B. durch Extrusion) und der ungenügenden Freisetzung des Genmaterials in der Zelle.

Die Verwendung von Polykationen zur Gentransfektion *in vitro* ist nicht neu. Bereits 1965 fanden Vaheri und Mitarbeiter, dass sich mit Hilfe des Polykations Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) die Gentransfereffizienz von Polio-Virus-RNA erheblich steigern lässt.^[21] Allerdings kommt diese Methode aufgrund der hohen Toxizität des Polykations nicht für eine klinische Anwendung in Frage.

Von wachsender Bedeutung sind dagegen synthetische Vektoren auf der Basis von Polymeren wie Polyethylenimin (PEI), Polydimethylaminoethylmethacrylat (PDMAEMA) oder die so genannten Starbust-Polyamidoamin (PAA)-Dendrimere.^[22] In Analogie zu den Lipoplexen werden Komplexe aus Polymeren und Genmaterial als Polyplex und Komplexe aus Dendrimeren und Genmaterial als Dendriplex bezeichnet. Da es noch keine erfolgreiche klinische Studie mit diesen Polykationen gibt, ist vor allem auf ihre geringe Gentransfereffizienz zurückzuführen. Aber es gibt zahlreiche Ansätze, die Effektivität polymerer Vektoren zu steigern. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung muss es aber sein, die Mechanismen der Gentransfektion weiter zu verstehen, um die verwendeten Systeme besser anzupassen und zu höheren Effektivitäten und einer größeren Spezifizierung zu gelangen.

2.1.3.3 Mechanismen der Gentransfektion

Der nach bisherigen Kenntnissen angenommene Mechanismus der Transfektion kann als Abfolge verschiedener Transportschritte beschrieben werden.^[23, 24, 35] Zunächst erfolgt Adhäsion des Polyplexes an die Zellmembran, die durch eine kationische Überschussladung des Polyplexes begünstigt wird. Dann wird der Polyplex durch den Prozess der Endozytose internalisiert. Es gibt verschiedene Wege der Internalisierung, die durch mehrere Faktoren selektiv angesteuert werden können. So können spezifische Rezeptoren angesprochen werden, z. B. in Form von Antikörpern die an der Polyplex-Oberfläche angebunden werden. Aber auch die Größe des Polyplex spielt eine entscheidende Rolle: Zu kleine Polyplexe werden nicht ausreichend internalisiert, wohingegen zu große Polyplexe unspezifisch internalisiert werden und ins Lysosom gelangen, in dem der Polyplex und damit auch das Genmaterial

verdaut werden. Bei erfolgreicher Endozytose wird der Polyplex im sogenannten Endosom intrazellulär weitertransportiert. Für eine erfolgreiche Transfektion ist es nun wichtig, dass der Polyplex aus dem Endosom wieder freigesetzt wird, bevor es zum Abbau des Polyplexes durch lysosomale Enzyme und somit zum Verlust des Genmaterials kommen kann. Nach erfolgreicher Freisetzung des Polyplex aus dem Endosom muss sich der Polyplex kontrolliert auflösen um das Genmaterial intakt freizusetzen. Das freie Plasmid muss nun durch die Zellkernmembran in den Zellkern gelangen, den Wirkort des Genmaterials. Erst hier kann das Genmaterial die erwünschte Wirkung z. B. zur Behebung einer Fehlfunktion der Zelle erzielen.

Viele dieser Schritte des Mechanismus sind noch nicht vollständig verstanden. Zu dem hier beschriebenen Weg der Endozytose gibt es noch zahlreiche andere Möglichkeiten der Zellinternalisierung auf die hier nicht eingegangen werden kann. Eine Methode den Aufnahmeprozess der Polyplexe in der Zelle zu untersuchen, ist die Markierung des Polyplexes mit Fluoreszenz-Farbstoffen und Lokalisierung in der Zelle mit Hilfe eines Confocal Mikroskops.^[25] Das Plasmid und das Polymer können selektiv mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert werden und auch die einzelnen Zellregionen sind durch unterschiedliche Anfärbungen voneinander zu unterscheiden. Mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops kann dann versucht werden, den Transport des Polyplex, bzw. seiner Komponenten in der Zelle zu verfolgen.

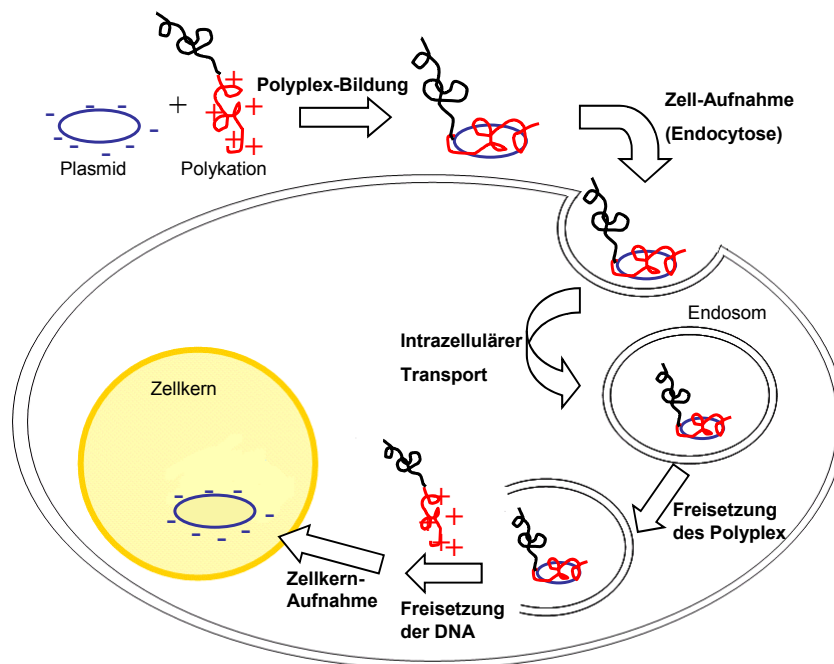


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Gentransfermechanismus der Internalisierung von Polyplexen.^[23, 35]

2.1.3.4 Der „goldene“ Standard PEI

Zur Zeit ist PEI das am meisten genutzte Polykation für die Gentransfektion, da es sehr gute Transfereffizienz *in vitro* und gute Transfereffizienz *in vivo* zeigt. Man verwendet sowohl verzweigtes als auch lineares PEI in verschiedenen Molmassen. PEI ist in seinen verschiedenen Formen günstig und in großen Mengen kommerziell erhältlich.^[22, 26]

Polyplexe mit PEI werden mit einer kationischen Überschuss-Ladung hergestellt und ermöglichen Zellaufnahme durch Adhesion an die negativ geladenen Transmembran-Heparanproteoglycane. Im Gegensatz z.B. zu Polylysin zeigen PEI-Polyplexe außerdem gesteigerte Freisetzung des Genmaterials aus dem Endosom durch den sogenannten Protonenschwamm-Effekt.^[26, 27, 28] Das Endosom besitzt im Gegensatz zur umgebenden Zelle einen niedrigeren pH-Wert. Das Polymer puffert durch Binden der Protonen über die Amin-Funktionen den pH-Wert ab und bewirkt durch weiteres Einströmen der Chlorid-Gegenionen eine Erhöhung des osmotischen Drucks, der zum Aufbrechen des Endosoms und damit zur Freisetzung des Plasmids führen kann.

Der große Nachteil des PEI ist seine Toxizität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und zahlreiche unerwünschte unspezifische Wechselwirkungen mit der biologischen Umgebung.

Die Art des verwendeten PEIs (linear oder verzweigt, Molekulargewicht) hat entscheidenden Einfluss auf die Transfereffizienz und die Toxizität. So zeigen z.B. durch Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) aufgereinigte PEI-Polyplexe ein deutlich reduzierte Toxizität, da freies PEI auf diese Weise entfernt wurde. Gleichzeitig reduziert man aber auch die Transfereffizienz, da anscheinend freies PEI an der Freisetzung aus dem Endosom maßgeblich beteiligt ist. Ähnlich verhält es sich mit der Größe der PEI-Polyplexe. Größere Polyplexe (mehrere 100 nm) sind zwar deutlich effizienter aber auch stark toxisch. Kleinere Polyplexe (50-100 nm) hingegen zeigen eine reduzierte Toxizität aber auch starke Einbußen bei der Transfereffizienz.^[26, 29]

Eine inzwischen standardisierte Methode, unspezifische Wechselwirkung im biologischen System auszuschließen, ist die Modifizierung mit PEO. Zu diesem Zweck wurde PEI-PEO Blockcopolymer synthetisiert und auf ihre Eigenschaften als polymere Vektoren untersucht. Tatsächlich kann der kationische PEI-Teil auch weiterhin das Genmaterial komplexieren während der PEO-Teil eine schützende Hülle bildet. Diese Polyplexe zeigen eine reduzierte Toxizität und verlängerte Zirkulationszeiten im Blut.^[30, 31]

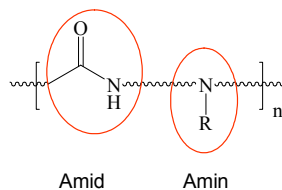
2.2 Poly(amidoamine)

2.2.1 Allgemeines

Ein ganz neuer Bereich für hoch funktionalisierte Polymere ist ihre Anwendung in der Medizin als Polymer-Therapeutika (siehe Kapitel 2.1).^[5] Dabei spielt vor allem ihre Biokompatibilität und geringe Toxizität eine entscheidende Rolle. Das Polymer dient nicht nur als Transportvehikel sondern muss selbst biologisch aktiv sein. Gleichzeitig darf es aber keine unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Organismus eingehen, die zu Nebenwirkungen oder störenden Nebeneffekten führen können.

Eine viel versprechende Klasse, vor allem für die Entwicklung neuer Polymer-Therapeutika, sind die Poly(amidoamine) (PAAs).^[13, 32] Sie kommen hauptsächlich als lineare Polymere oder als Dendrimere vor, besitzen sowohl Amid- als auch Aminfunktionalitäten in der Hauptkette und gehören daher zur Gruppe der Peptidomimetika (Abb.2.4). Im Gegensatz zu den Polypeptiden besitzen PAAs jedoch keine inhärente Immunogenizität. Im Vergleich zu etablierten Polykationen wie Poly(L-Lysin) (PLL) und Polyethylenimin (PEI) zeigen sie darüber hinaus eine stark reduzierte Cyto- und Hemotoxizität. Diese viel versprechenden biologischen Eigenschaften begründen das wachsende Interesse an PAAs in den letzten Jahren. Darüber hinaus bietet ihre einfache Synthese aus Aminen und Bisacrylamiden schnellen Zugang zu multifunktionalen Polymeren und somit ein breites Spektrum an möglichen medizinischen Anwendungen z. B. im Bereich des *drug delivery* oder *gene delivery* (Abb.2.4).^[33]

Definition PAA:



Synthese PAAs:

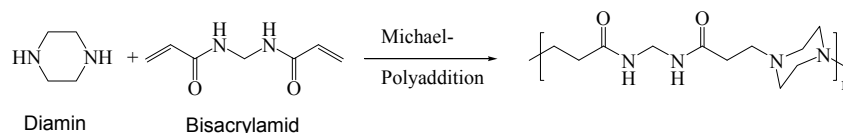


Abb. 2.4: Lineare Poly(amidoamine) und Poly(amidoamine)-Dendrimere

2.2.2 Synthese der PAAs

Bisher finden PAAs vor allem als Dendrimere, zunehmend aber auch als lineare Polymere Anwendung in der Biomedizin. Die Synthese geht dabei meist von primären oder sekundären Aminen und Bisacrylamiden als Monomeren aus (Abb. 2.4).^[34, 35] Der schrittweise Aufbau der Polymerkette erfolgt nach einer Michael-Polyaddition in protischen Lösungsmitteln wie Wasser oder Alkohol bei niedrigen Temperaturen und ohne Zusatz von Katalysatoren. Für lineare PAAs werden dabei zahlengemittelte Molmassen um die 30.000 g/mol erreicht. Für eine solche Michael-Polyaddition kann theoretisch eine Polydispersität von 2 erreicht werden, aber die Literatur zeigt meist Polydispersitäten von größer als 2.

Die Verwendung von Monomeren mit weiteren Funktionalitäten oder polymer-analoge Umsetzung der Amin-Funktionalitäten ermöglicht die Synthese von PAAs mit weiteren funktionellen Gruppen. Es können z. B. Hydroxy-, Ether-, Allyl- oder Amid-Gruppen bereits durch das Monomer mit eingeführt werden, da sie an der Polymerisationsreaktion nicht teilnehmen und so die Synthese nicht behindern (Abb.2.5).^[35]

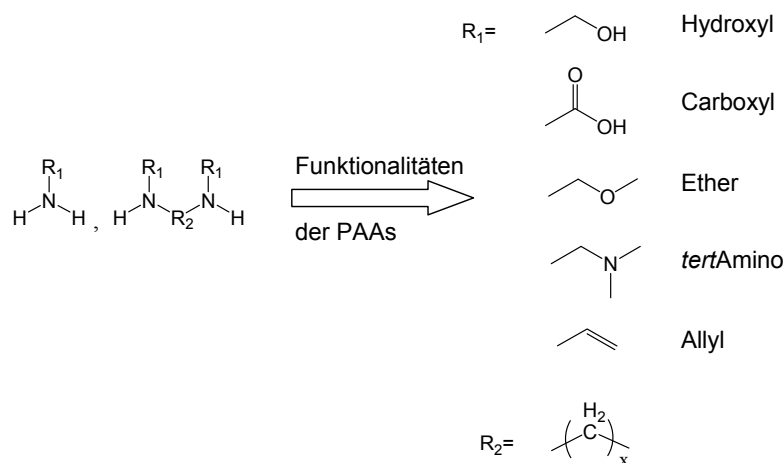


Abb. 2.5: Amin-Bausteine der PAA-Synthese und mögliche Funktionalitäten^[35]

Die Synthese der Dendrimere beginnt mit einem Diamin, meist Ethylendiamin, und der ersten Addition von Metacrylat-Bausteinen, die durch zweifache Addition an die primären Amine zur ersten Verzweigung führen. In einem zweiten Schritt erfolgt Addition eines Diamin-Bausteins, dessen quantitative Addition zu einem Dendrimer der Generation 0 führt (Abb. 2.6). Durch Wiederholen dieser Additionsschritte kann ein Dendrimer definierter Struktur bis durchschnittlich zur Generation 4 synthetisiert werden. PAA-Dendrimere sind unter dem Namen Starbust bereits kommerziell erhältlich.^[36]

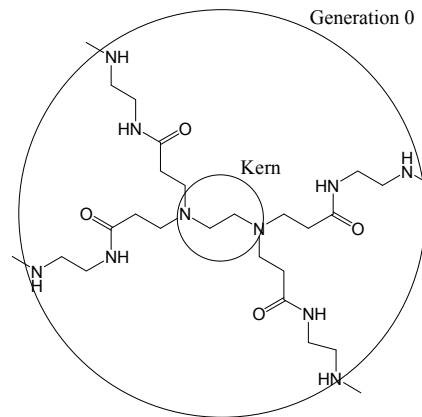


Abb. 2.6: Beispiel eines PAA-Dendrimers der Generation 0

2.2.3 Anwendungen in der Medizin

Die erste biomedizinische Anwendung von PAAs beruhte auf ihrer Fähigkeit als Polykationen stabile Komplexe mit dem anionischen Zucker Heparin zu bilden (Abb. 2.6).^[32, 37] Heparin vermag die Blutgerinnung zu hemmen und wird daher zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen eingesetzt. In Lösung neutralisiert die Komplexbildung mit PAAs also die Aktivität von Heparin. Durch Oberflächenmodifizierungen mit PAAs können also z.B. nicht-thrombogene Oberflächen für künstliche Arterien hergestellt werden, die das Risiko von Gefäßverschlüssen deutlich reduzieren.

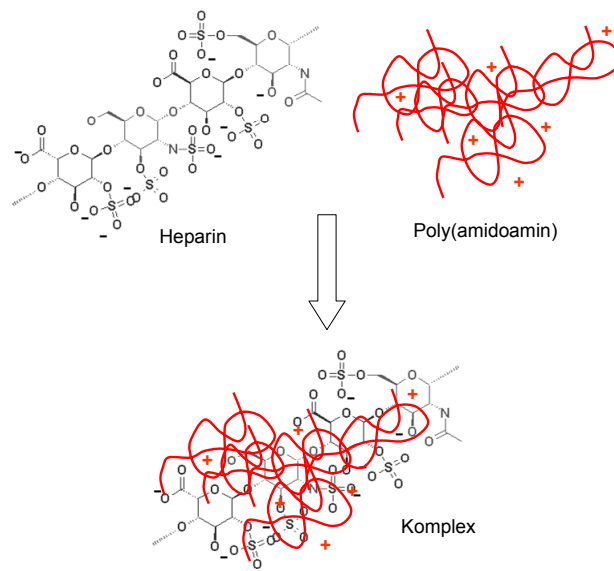


Abb. 2.7: Komplexbildung von Heparin mit Poly(amidoamin)en^[37]

Vielfältigere Anwendung finden PAAs aber als Polymer-Wirkstoff-Konjugate in der Krebstherapie oder als polymere Vektoren für den intrazellulären Transport von Genmaterial (Kapitel 2.1.3).^[35, 38] Ein wichtiger Vorteil gegenüber anderen Polymeren ist dabei ihre stark

reduzierte Cyto- und Hemotoxizität. Der IC_{50} Wert beschreibt die Konzentration einer Substanz, die die Vitalität eines Organismus *in vitro* um 50% herabsetzt. Poly(L-lysin) als polyvalentes kationisches Polymer zeigt einen 100mal und PEI einen 20 mal niedrigeren IC_{50} Wert als PAAs.^[39] Aber auch bei den PAAs selbst gibt es Abstufungen: PAA-Dendrimere zeigen im Vergleich zu ihren linearen Analoga eine gesteigerte hämolytische Aktivität, d. h. sie können die Membran nativer Erythrocyten (roter Blutkörperchen) zerstören und sind somit nur begrenzt für einen Einsatz *in vivo* geeignet.^[32] Die niedrige Toxizität der PAAs ermöglicht eine längere Blutzirkulationszeit, da es zu keiner Schädigung des Organismus kommt. Darüber hinaus kommt es zu weniger Verlust des Wirkstoff-Konjugats z. B. durch enzymatischen Abbau oder unspezifische Wechselwirkungen wie Adsorption an Zellwänden. Für den Einsatz in der Krebstherapie wurden an lineare PAAs verschiedene Cytostatika wie Mitomycin C oder Cisplatin kovalent angebunden und auf ihre Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* getestet.^[41] Die erhöhte Blutzirkulationszeit ermöglicht ein passives *drug delivery* ins Tumorgewebe aufgrund des EPR-Effektes.^[11] Darüber hinaus zeigen PAA-Cisplatin Konjugate eine erhöhte Lagerstabilität z. B. im Gegensatz zu HPMA-Cisplatin (Poly-N-2-hydroxypropyl-methacrylamid) Konjugaten, die bereits nach 1-2 Wochen eine reduzierte Löslichkeit zeigen.^[32] Alle bisher *in vitro* oder *in vivo* verwendeten PAAs sind bioabbaubar und können daher auch mit höherem Molekulargewicht oder in größeren Mengen problemlos im Organismus eingesetzt werden. Der biologische Abbau erfolgt über die Hydrolyse der Amidbindungen mit Hilfe von Enzymen und verhindert auch bei Langzeitanwendungen eine Akkumulation des Polymers im Organismus.^[43]

Die erste Studien mit PAA-Cytostatika Konjugaten *in vivo* zeigten eine unerwartet gute Zellaufnahme der Konjugate, die auf Wechselwirkungen der Polymere mit der Phospholipidmembran der Zellen zurückgeführt wurde. Im Gegensatz zu anderen Polymeren in der Biomedizin wie HPMA oder Polylysin zeigen PAAs tatsächlich eine erhöhte Membranpermeabilität.^[44] Neben dem gezielteren Transport von toxischen Substanzen z. B. in ein Tumorgewebe, bieten PAAs daher auch die Möglichkeit Substanzen ins Zellinnere zu transportieren, die dort als Wirkstoff fungieren können, wie z. B. pharmakologisch wirksame Proteine und Peptide. Ein weiteres großes Potenzial eines kationischen Trägers mit verbesserter Membranpermeabilität wie den PAAs ist der Einsatz zum intrazellulären Transport von DNS im Bereich der Gentherapie (siehe Kapitel 2.1.3).^[45] Es wurden daher in den letzten zehn Jahren vermehrt Studien zum Einsatz von PAAs für die nicht-virale Gentherapie durchgeführt.^[32, 46] Wie bei anderen Polykationen auch ist die Transfereffizienz der PAAs bisher noch ungenügend für eine Anwendung *in vivo*. Es zeigen sich jedoch

deutliche Vorteile der PAAs im Gegensatz zu anderen Polykationen wie PEI oder PLL, z. B. im Bereich der Toxizität und der selektiven Freisetzung des Genmaterials.^[22, 46] An der Weiterentwicklung neuer PAAs für eine erfolgreiche nicht-virale Gentherapie wird daher weltweit geforscht.

2.3 Festphasensynthese

2.3.1 Festphasen-Peptid-Synthese

2.3.1.1 Prinzip der Festphasen-Peptid-Synthese

Bereits 1963 führt R. B. Merrifield das Prinzip der festphasengebundenen Synthese zur schnellen und einfachen Herstellung von kurzen Polypeptiden ein.^[47] An der Festphase, einem unlöslichen, quellbaren Träger (Harz), der funktionelle Gruppen trägt, werden schrittweise Aminosäuren in der gewünschten Sequenz addiert (Abb.2.8).

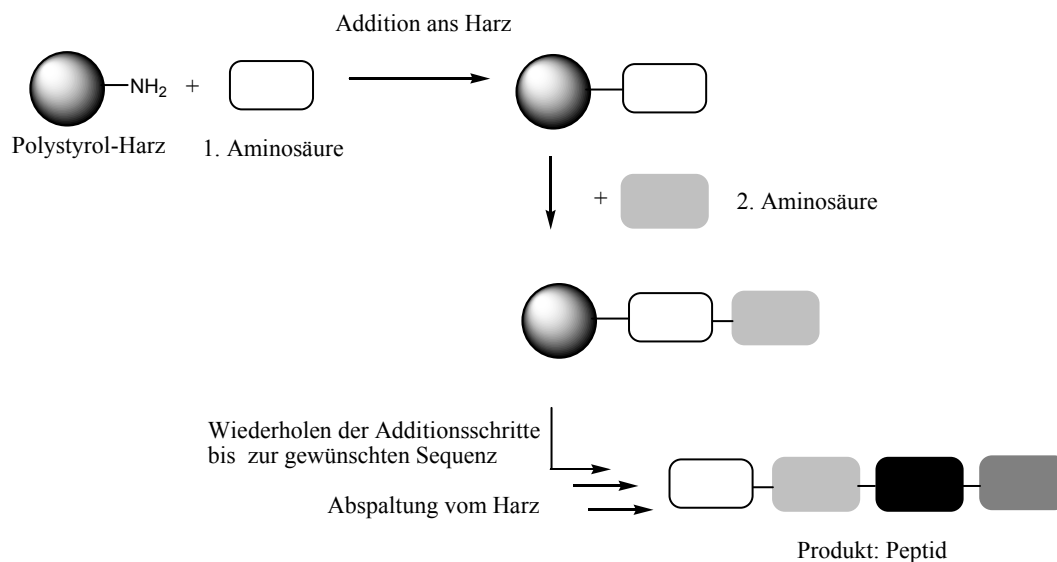


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Festphasen-Peptid-Synthese

Dabei werden meist große Überschüsse Aminosäuren eingesetzt, um eine quantitative Addition zu erreichen. Alle überschüssigen Reagenzien können anschließend durch einen Waschschrift vom Harz entfernt werden. Nun folgt die schrittweise Addition der nächsten Aminosäuren. Dieser schrittweise sequenzielle Aufbau ermöglicht die Kontrolle über die Aminosäuresequenz und die Synthese von Peptiden aus bis zu 100 Aminosäuren.^[48]

2.3.1.2 Schutzgruppen in der Festphasen-Peptid-Synthese

Während der Addition der Aminosäure an die Festphase ist die α -Amin-Funktion geschützt, um Polykondensation zu verhindern und Selektivität zu erzeugen. Erst nach vollständiger

Addition der ersten Aminosäure und dem Entfernen aller überschüssigen Komponenten wird diese temporäre Schutzgruppe entfernt und somit erneut eine terminale Aminfunktion an der Festphase gebildet. An dieser Gruppe kann nun die Addition der zweiten Aminosäure erfolgen. Viel verwendete Schutzgruppen für die α -Amin-Funktion von Aminosäuren sind die *t*Boc (*tert.*-*B*utoxy*c*arbonyl)- und die Fmoc (*F*luorenyl*m*ethoxy*c*arbonyl)-gruppe. In der modernen Festphasensynthese wird vor allem die Fmoc-Schutzgruppe verwendet, da die Abspaltung über ihr UV-Signal verfolgt und quantifiziert werden kann.^[49]

Neben der α -Amin-Funktion müssen während der Ketten-Aufbau-Reaktion aber auch die Seitenketten-Funktionalitäten der Aminosäuren geschützt sein um Nebenreaktionen zu vermeiden. Diese Schutzgruppen müssen im Gegensatz zur temporären Amin-Schutzgruppe so gewählt sein, dass sie weder durch die Additionsbedingungen noch durch die Abspaltbedingungen der α -Amin-Schutzgruppe abgespalten werden. Dieser parallele Einsatz temporärer Schutzgruppen, die bei verschiedenen Bedingungen selektiv entfernt werden können, wird als orthogonale Schutzgruppentechnik bezeichnet.^[50] Nach dem vollständigen Aufbau der gewünschten Peptidsequenz kann das Produkt vom Harz abgetrennt werden. Die Schutzgruppen der Seitenketten-Funktionalitäten können entweder im gleichen Schritt mit abgespalten werden oder das Peptid wird mit allen temporären Schutzgruppen, vollgeschützt, isoliert.

2.3.1.3 Aktivierungsarten in der Festphasen-Peptid-Synthese

Neben dem Einsatz eines großen Überschusses der Aminosäure gegenüber der festphasengebundenen Aminfunktion nutzt die Festphasen-Peptid-Synthese das Prinzip der Carboxyl-Aktivierung um Umsätze von mehr als 99% zu erreichen. Bei einer solchen Mehrstufensynthese addieren sich die Fehler der Einzelschritte auf und reduzieren so die Ausbeute des gewünschten Produkts drastisch. Bei einem Umsatz der Einzeladdition von 95% reduziert sich die Gesamtausbeute bei 10 Additionsschritten bereits auf 60%. Darüber hinaus sind die Nebenprodukte schlecht vom gewünschten Peptid zu trennen, da z. B. eine Auslassungssequenz mit nur einer fehlenden Aminosäure sowohl in Masse als auch Löslichkeit nur gering vom eigentlichen Produkt abweicht. In der Peptidchemie gibt es daher verschiedene Aktivierungsreagenzien, die zu einer schnelleren und vollständigeren Addition an die Festphase führen und einen Umsatz der Einzeladdition von über 99% ermöglichen.^[49]

Die gebräuchlichsten Aktivierungsreagenzien überführen die Carboxylfunktion in symmetrische Anhydride oder Aktivester. Aus der organischen Synthese bekannt ist die Gruppe der Carbodiimide wie z. B. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder

Diisopropylcarbodiimid (DIC).^[51] Sie besitzt aber zahlreiche Nachteile für den Einsatz in der Peptidsynthese, wie die Bildung schwer löslicher Nebenprodukte oder das Auftreten von Racemisierung der Aminosäuren. Daher wird in der modernen Peptidsynthese vor allem die Gruppe der sogenannten Phosphonium-Reagenzien verwendet. Die Aktivierung erfolgt *in situ* über die Generierung von Aktivestern. Ein Beispiel ist das in dieser Arbeit verwendete PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat) (Abb. 2.9).^[52] Der Zusatz von HOBt (1-Hydroxy-benzotriazol) (Abb. 2.9) beschleunigt die Aktivierung.

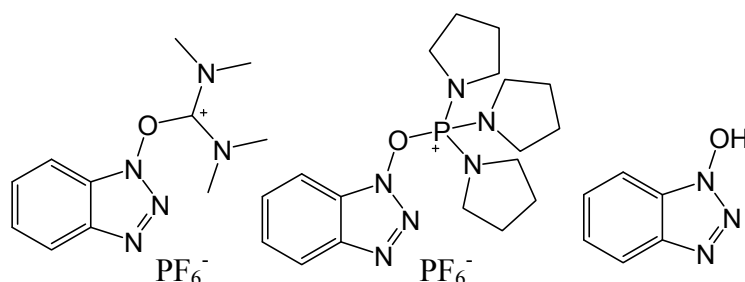


Abbildung 2.9: Beispiele für Aktivierungreagenzien der Festphasensynthese: HBTU (links), PyBOP (Mitte) und HOBt (rechts).

Eine weitere wichtige Klasse stellen die Guanidinium-/Uronium-Reagenzien dar. In der automatisierten Festphasenpeptidsynthese wird häufig HBTU (O-Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat) (Abb. 2.2) verwendet.^[53] Im Gegensatz zu PyBOP kann HBTU mit ungeschützten Amingruppen reagieren und irreversibel Guanidiniumderivate bilden, die zu einer Terminierung der wachsenden Peptidkette und somit zu einer Fehlsequenz führen. Daher muss HBTU immer im leichten Unterschuss eingesetzt werden, wohingegen bei der Verwendung von PyBOP Überschüsse bis zu 10 Äquivalenten pro Carboxylfunktion verwendet werden. Sowohl HBTU als auch PyBOP benötigen den Zusatz einer Base zur Aktivierung der Carboxylfunktion. Häufig wird das als „Hünigs Base“ bezeichnete Diisopropylethylamin (DIPEA) als nicht-nucleophile Base eingesetzt.

2.3.1.4 Festphasen

Bei den Festphasen für die Peptidsynthese handelt es sich um Mikrogele, die in den zu verwendenden Lösungsmitteln gut quellen aber nicht löslich sind. Merrifield verwendete zu diesem Zweck Harze aus Polystyrol, die mit Divinylbenzol quervernetzt wurde und so auch heute noch gebräuchlich ist. Das Polymerrückgrat der Festphase trägt dabei funktionelle Gruppen, die die Anbindung einer reversibel spaltbaren Ankergruppe, des so genannten Linkers, ermöglicht (Abb. 2.10). An dieser Ankergruppe wird dann die erste Aminosäure

kovalent angebunden. Während der Peptidsynthese ist der Linker stabil, aber nach der vollständigen Synthese kann durch selektives Spalten des Linkers das Peptid freigesetzt werden.^[47]

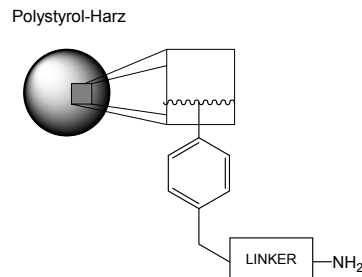


Abbildung 2.10: Merrifield-Harz für die Festphasen-Peptid-Synthese

2.3.1.5 Standard-Synthese nach der Fmoc-Strategie

In Abbildung 2.11 ist schematisch die Synthese eines Peptides nach der Fmoc-Strategie abgebildet. Als Lösungsmittel werden NMP oder DMF verwendet, die vor Verwendung auf freie Amine getestet werden müssen. Freie primäre oder sekundäre Amine in der Lösung würden zu einer frühzeitigen Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe führen und damit zu unerwünschten Nebenreaktionen führen.^[49]

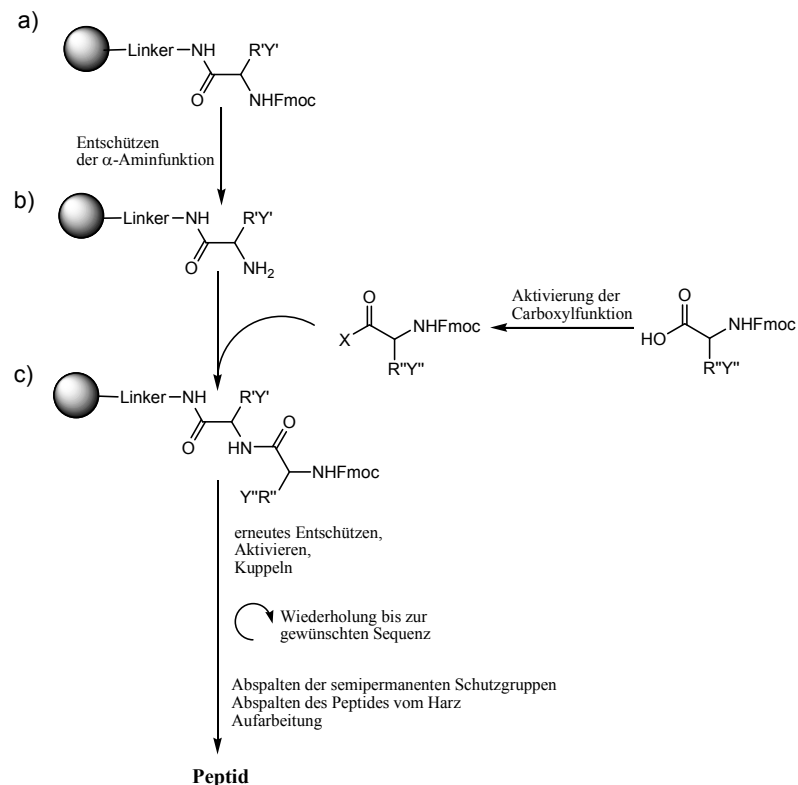


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Festphasensynthese von Peptiden nach der Fmoc-Strategie: a) Entschützen der α -Aminfunktion, b) Aktivierung und Addition einer Aminosäure, c) weitere Schritte zum Aufbau einer Peptidsequenz

Die erste Aminosäure wird kovalent an eine reversibel spaltbare Ankergruppe (Linker) eines Polystyrol-Harzes gebunden (Abb.2.10a). Dazu wird zunächst die Carboxylfunktion der ersten Aminosäure in Lösung aktiviert und dann auf das Harz gegeben. Die Kupplungszeit beträgt für leicht zu kuppelnde Aminosäuren wie Glycin nur wenige Minuten, kann aber auch bis zu mehreren Stunden betragen. Nach erfolgreicher Kupplung werden alle überschüssigen Reagenzien durch Waschen entfernt. Anschließend wird durch Zugabe von Piperidin in NMP oder DMF die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und über die UV-Absorption des abgespaltenen Dibenzofulven-Piperidin-Addukts die Vollständigkeit der Addition überprüft (Abb. 2.10b). Nach erneutem Waschen kann die zweite Aminosäure aktiviert und am Harz addiert werden (Abb. 2.10c). Dieser Zyklus aus Aktivierung der Carboxylfunktion, Addition der Aminosäure und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird bis zum Erreichen der gewünschten Sequenz wiederholt. Dieser Prozess ist inzwischen voll automatisiert und kann an einem sogenannten Peptid-Synthesizer durchgeführt werden.

2.3.2 Festphasensynthese anderer Makromoleküle

Die Verwendung einer Festphase wurde von Merrifield zunächst nur für die Synthese von Peptiden eingeführt. Bereits früh wurde aber ihr Nutzen auch für die Lösung anderer synthetischer Probleme erkannt und ausgenutzt. Die Vorteile liegen dabei in der einfacheren Schutzgruppentechnik, schnelleren Aufreinigung und damit dem möglichen Einsatz größerer Überschüsse zur Maximierung der Produktausbeute im Vergleich zur Synthese in Lösung. Die Festphasensynthese findet daher zahlreiche Anwendung in der organischen Chemie zur Synthese sowohl von niedermolekularen Verbindungen als auch Makromolekülen. Den größten Durchbruch brachte sie jedoch in der Synthese von Biomakromolekülen wie den Oligonucleotiden und Oligosacchariden.^[54, 55]

Ähnlich dem Prinzip der Synthese von Peptiden müssen im Fall der Oligonucleotid-Synthese die Bausteine, die Nucleinsäuren, während der Aufbau-Reaktion Schutzgruppen tragen, um die Selektivität der Reaktion aufrechtzuerhalten. Die Nucleinsäuren sind aus einer heterocyclischen Base der Pyrimidin- und Purinreihe, einer Pentose und Phosphorsäure aufgebaut. Die Pentose ist im Fall der DNS 2-Desoxy-D-Ribose (Abb. 2.12) und im Fall der RNS D-Ribose.^[56]

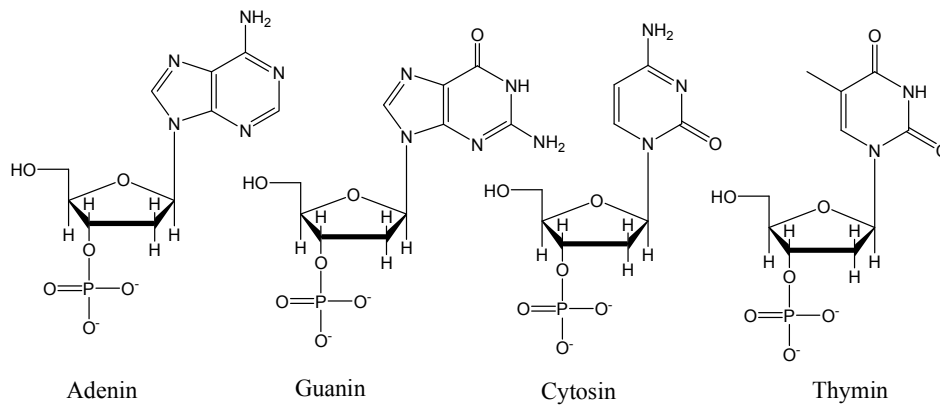


Abb. 2.12: Die vier Nucleinsäuren der DNS: Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C)

Der Aufbau der Oligonucleotide erfolgt durch Kupplung der 5'-Hydroxyl-Funktion einer festphasengebundenen Nucleinsäure an die Phosphatgruppe eines zweiten Bausteins. Um eine selektive und quantitative Umsetzung zu erzielen, wird die Phosphatgruppe z. B. in ein Phosphoramidit überführt. Diese so genannte Phosphoramidit-Methode (Abb. 2.13) wurde von Letsinger und Caruthers entwickelt und ist eine von zahlreichen Methoden zur Kupplung von Nucleinsäuren. In Analogie zu den Seitenkettenschutzgruppen der Peptidsynthese müssen die Stickstoffbasen der Nucleinsäuren bis zur Abspaltung des gewünschten Produkts geschützt sein.^[55]

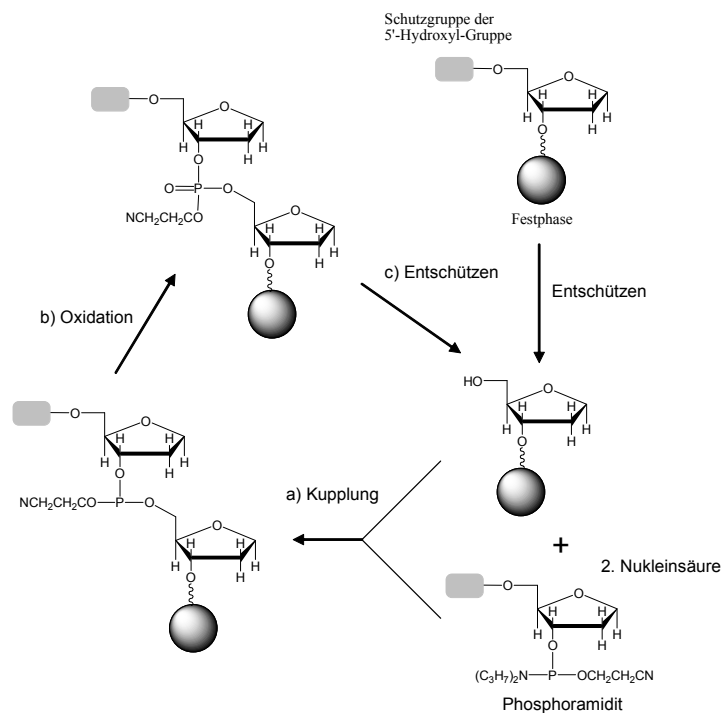


Abb. 2.13: Syntheszyklus einer Oligonucleotidsynthese nach der Phosphoramidit-Methode: a) Kupplung der Phosphoramidit-Nucleinsäure mit Schutzgruppe an der 5'-Hydroxyl-Funktion, b) Oxidation des Phosphitriesters, c) Entschützen der 5'-Hydroxyl-Funktion.

Während der Addition an das wachsende Kettenende trägt zusätzlich die 5'-Hydroxyl-Funktion der Pentose des zu addierenden Bausteins eine temporäre Schutzgruppe, so dass die Selektivität der Addition gewährleistet ist (Abb. 2.13a). Nach der quantitativen Umsetzung an der Festphase wird zunächst der entstandene Phosphitriester oxidiert (Abb. 2.13b) und anschließend die 5'-Hydroxyl-Schutzgruppe selektiv abgespalten (Abb. 2.13c). Durch schrittweise Wiederholung dieses Synthesesyklus wird so das Oligonucleotid aufgebaut. Erst nach der vollständigen Synthese der gewünschten Nucleotid-Sequenz werden die Basen-Schutzgruppen und das Produkt von der Festphase abgespalten. Als Festphase wird bei der Oligonucleotid-Synthese meistens so genanntes *Controlled Pore Glass* (CPG) verwendet, da es sich für die DNS-Festphasensynthese besser eignet als Polystyrol.^[55]

Kapitel 3

Methoden

3.1 Massenspektrometrie

3.1.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

3.1.1.2 Allgemeines

Die „matrix assisted laser desorption/ionisation“ (MALDI) Massenspektrometrie wurde in den 1980ern von Hillenkamp und Karas zur massenspektrometrischen Untersuchung von Makromolekülen entwickelt.^[57] Die bis dahin üblichen Methoden der Ionisation oder Desorption waren nicht geeignet z.B. für Proteine oder Polymere, da diese Prozesse oft zur Fragmentierung oder Umlagerung führten. Mit der neuen Methode ist es hingegen möglich Molekülmassen bis zu 500.000 Da (routinemäßig 5000 bis 100.000 Da) von Polymeren, Proteinen und anderen Biomolekülen zu messen.^[58, 59]

3.1.1.3 Durchführung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die zu analysierende Probe wird mit einer Matrix im 1.000 bis 100.000fachen Überschuss dispergiert, auf einer gereinigten Metallplatte aufgetropft und dort durch Entfernen des Lösungsmittels zur Kristallisation gebracht. Als Matrix verwendet man substituierte Aromaten wie z. B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder Zimtsäure (ACHC). Matrix und Probe müssen im gleichen Lösungsmittel gut löslich sein und gut kristallisieren. Die Matrix sollte eine geringe Molmasse haben und im Bereich der Wellenlänge des Lasers (z.B. Stickstofflaser: $\lambda = 337 \text{ nm}$) stark absorbieren.

Durch den Beschuss der Probe mit dem Laser kommt es zu einer Desorption und Ionisation der Matrix- und Probenmoleküle ins Vakuum. Zum genauen Mechanismus dieses Vorgangs gibt es zahlreiche Arbeiten. Eine mögliche Variante geht von einer Anregung der Elektronen im aromatischen π -System der Matrix aus. Diese Energie überträgt sich auf die Probenmoleküle und führt zu deren Desorption. Die so angeregten Matrixradikationen können auch Protonen auf nicht angeregte Moleküle übertragen. Darüber hinaus kann es während des Prozesses zur Adduktbildung mit vorhandenen Alkali- oder Übergangsmetallionen kommen.^[60]

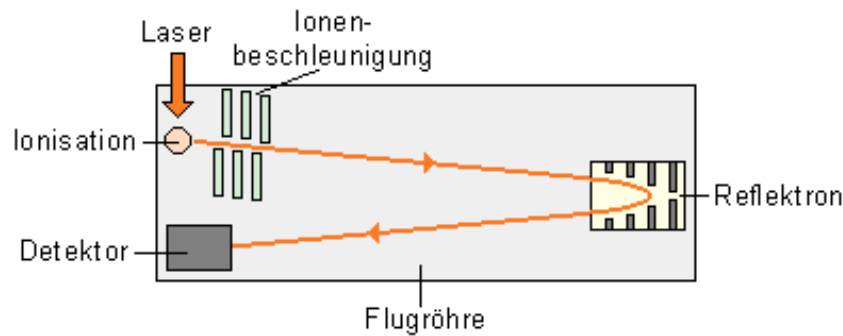


Abb. 3.1: Vereinfachte Darstellung eines MALDI-TOF-Spektrometers

Die so desorbierten Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und dann in einem Flugzeitdetektor (Time-Of-Flight, TOF) analysiert (Abb. 3.1). Die Moleküle besitzen unterschiedliche Masse zu Ladung (m/z) Verhältnisse und daher unterschiedliche Geschwindigkeiten im elektrischen Feld. Abhängig von ihrer Masse und Ladung erreichen sie daher den Detektor zu unterschiedlichen Zeiten. Eine Kalibrierung des Detektors mit bekannten Standardverbindungen ermöglicht die Zuordnung der Flugzeit zu bestimmten m/z -Verhältnissen. Als Standards werden zumeist monodisperse Biomoleküle im zu messenden Massenbereich verwendet.^[61]

3.1.2 ESI-MS

Die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) ist, ähnlich der MALDI-Massenspektrometrie, eine Methode zur Untersuchung von Proteinen und anderen Biomolekülen.^[62] Eine stark verdünnte Lösung ($10^{-3} - 10^{-7}$ mol/l) wird in einem elektrostatischen Feld fein dispergiert. Es bilden sich kleine geladene Tröpfchen, deren Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche durch Verdampfen des Lösungsmittels zunehmen. Dabei zerfallen die Tröpfchen spontan zu sogenannten Mikrotröpfchen, man spricht von der Coulomb-Explosion. Diese Mikrotröpfchen werden vollständig desolvatisiert und anschließend im Massenspektrometer analysiert.^[63]

Mit der ESI-MS werden nicht nur die Molekularionen mit einer einfachen Ladung detektiert, sondern auch mehrfach geladene Ionen der allgemeinen Formel $[M+nX]^{n+}$, wobei X für Begleitonen wie H^+ , Na^+ , K^+ oder Li^+ steht. Wie auch bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie ist eine quantitative Analyse der Massenspektren nicht möglich. Bei der Untersuchung von Substanzgemischen kann es sein, dass eine Komponente besser ionisiert wird als eine andere und dann das Spektrum dominiert, obwohl sie prozentual nicht vermehrt im Gemisch vorkommt.^[63]

Als Analysator wird häufig ein Quadrupol-Massendetektor verwendet (Abb. 3.2). Bei dieser Methode sind vier Metallstäbe parallel angeordnet und an den jeweils entgegengesetzten Stäben liegt eine Spannung U an, einer Überlagerung aus Gleich- und Wechselspannung.

$$U = U_g + U_0 \cdot (\omega t) \quad (\text{Gl. 3.1.1})$$

Die gegenüberliegenden Elektroden haben die gleiche Polarität, wodurch ein sogenanntes Quadrupolfeld erzeugt wird. Treten die ionisierten Teilchen in diese Feld ein, können nur Teilchen einer bestimmten Energie und mit einem bestimmten m/z -Verhältnis ungestört und mit einer stabilen Flugbahn durch das Feld beschleunigt und am Ende detektiert werden. Alle anderen Teilchen oszillieren im Quadrupolfeld mit einer instabilen Flugbahn und erreichen den Detektor nicht. Durch die Variation der Frequenz der Wechselspannung können nacheinander Ionen mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen detektiert werden. Aufgrund dieser selektiven Durchlässigkeit kann eine solche Anlage auch als Massenfilter verwendet werden. Dabei wird die Frequenz konstant gehalten und nur die Spannung variiert.

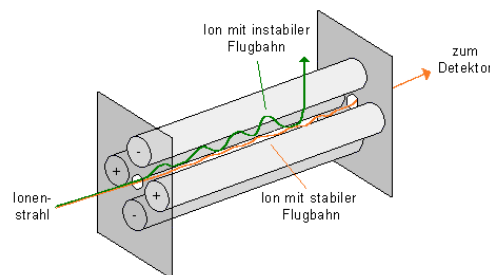


Abb. 3.2: Vereinfachte Darstellung eines Quadrupol-Massenspektrometers.^[64]

Sowohl MALDI- als auch ESI-Massenspektrometrie sind geeignete Methoden zur Untersuchung von biologischen und synthetischen Makromolekülen.^[65]

3.2 Lichtstreuung

3.2.1 Allgemeines

Die Größe und Interaktion von Makromolekülen in Lösung kann mit Hilfe der statischen Lichtstreuung untersucht werden. Polymere sind meist so groß, dass elektromagnetische Strahlung an verschiedenen Positionen desselben Moleküls gestreut werden und dann interferieren kann. Die Messung dieser Streuintensität liefert daher Informationen über die Struktur des gesamten Moleküls, aber z.B. auch über Aggregate in Lösung wie Micellen oder Vesikel.^[66]

3.2.2 Statische Lichtstreuung

Die statische Lichtstreuung ist eine Absolutmethode zur Bestimmung des Molekulargewichts M_w von Polymeren oder Micellen, dem Gyrationradius R_g und dem zweiten Virialkoeffizienten A_2 .^[67] Die gesuchte Größe erhält man durch die Auftragung sogenannter Zimm-Plots: Der Ausfallwinkel des gestreuten Lichts zum eingestrahlt Licht beträgt 2θ und bei kleinen Winkeln ergibt sich damit für die inverse Streuintensität:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + \frac{1}{M_w} \frac{16\pi^2}{3\lambda'^2} \sin^2 \theta R_g^2 + 2A_2c \quad (\text{Gl. 3.2.1})$$

Dabei ist c die Polymerkonzentration in Lösung, $\lambda' = \lambda/n_0$ ist die Wellenlänge des Lichts im Lösungsmittel mit dem Brechungsindex n_0 und K ist eine optische Konstante, die abhängig von Brechungsindex sowie Wellenlänge und Polarisation des eingestrahlt Lichts. Eine wichtige Größe der Lichtstreuung ist der Streuvektor q :

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{Gl. 3.2.2})$$

Die Auftragung Kc/R_θ gegen $\sin^2\theta + k'c$ für verschiedene Konzentrationen c und verschiedene Winkel θ nennt man Zimm-Plot (Abb. 3.3). Bei Extrapolation θ gegen Null kann aus dem y-Achsenabschnitt das Molekulargewicht M_w und aus der Steigung der Virialkoeffizient A_2 ermittelt werden. Die Extrapolation c gegen Null bei bekanntem M_w liefert den Gyrationradius R_g .

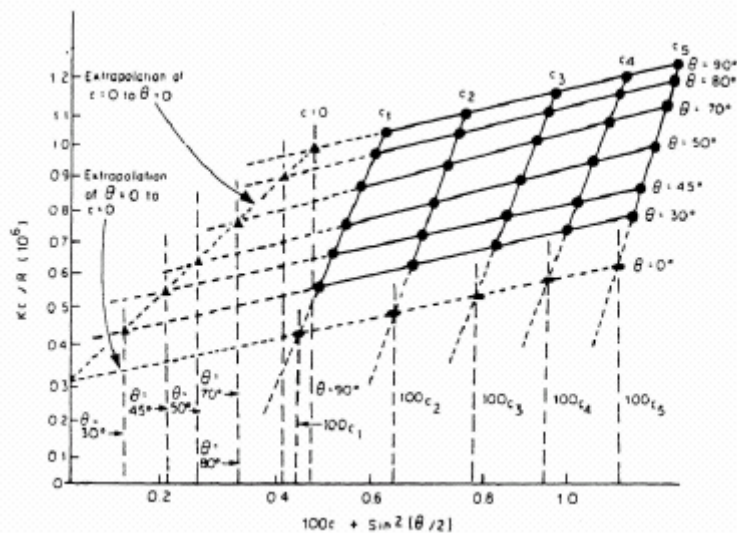


Abb. 3.3: Zimm-Plot: Aufgetragen wird Kc/R_θ gegen $\sin^2\theta + k'c$, aus der Extrapolation θ gegen Null können M_w und A_2 bestimmt werden, aus der Extrapolation c gegen Null bei bekanntem M_w kann R_g ermittelt werden.^[68]

Bei der Lichtstreuung an Makromolekülen oder Molekülaggregaten, deren Größe im Bereich der Wellenlänge des Lichts liegt, ist es nicht mehr möglich, das Molekül als Punktdipol anzusehen. Es enthält nun mehrere Streuzentren und die gestreuten Wellen interferieren. Es ist notwendig, einen Formfaktor einzuführen, der die Winkelabhängigkeit des Streulichts beschreibt. Eine Auftragung des reziproken Formfaktors gegen $(q \cdot R_g)^2$ liefert über den Kurvenverlauf Informationen über die Form des Moleküls, bzw. Aggregats in Lösung. In Abbildung 3.4 sind Beispiele für die Funktionen von Kugeln, Knäueln und Stäbchen dargestellt.

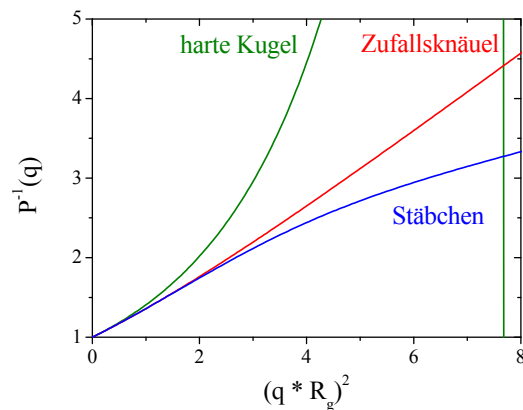


Abb.3.4: Inverser Formfaktor als Funktion der relativen Teilchengröße

3.2.3 Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung können Diffusions-, Rotations- und intermolekulare Bewegungen von Makromolekülen in Lösung untersucht werden. Diese Eigenschaften hängen sowohl von der Größe als auch der Form der Teilchen ab und liefern daher auch Hinweise auf strukturelle Eigenschaften.

Durch Interferenz aller an Streuzentren emittierten Sekundärwellen entsteht das Streulicht. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung bewegen sich die Streuzentren, so dass sich die Interferenzbedingungen kontinuierlich ändern. Dadurch fluktuiert wiederum die Zahl der im Winkel θ gestreuten Photonen. Kleine Teilchen bewegen sich schneller als große und so kann aus der mittleren Relaxationszeit der Intensitätsfluktuationen die Teilchengröße bestimmt werden. In einem Photonenkorrelationsexperiment wird die zeitliche Relaxation $C(t)$ des Streulichtsignals gemessen, die über eine Fouriertransformation mit dem Frequenzspektrum $I(\omega)$ verknüpft ist:

$$C(t) = \int_{-\infty}^{\infty} I(\omega) \exp(-i\omega t) d\omega \quad (\text{Gl. 3.2.3})$$

Bei kleinem t entspricht $C(t)$ der mittleren quadratischen Streuintensität $\langle I_S^2 \rangle$, bei großem t dem Quadrat der mittleren Intensität $\langle I_S \rangle^2$.

Das Dissipations-Fluktuations-Theorem erlaubt es, die Systemrelaxation anhand des statistischen Rauschens des Systems zu analysieren. Es gilt die Siegert Relation:

$$g_1(t) = \sqrt{\frac{g_2(t) - \langle I(0) \rangle^2}{\langle I(0) \rangle^2}},$$

$$\text{mit } g_2(t) \equiv \frac{\langle I(0)I(t) \rangle}{\langle I(0) \rangle^2} = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(Q, t') \cdot I(Q, t + t') dt'$$

(Gl. 3.2.4)

Für monodisperse Teilchen in unendlicher Verdünnung gilt eine abklingende Exponentialfunktion:

$$g_1(t) = \exp(-\Gamma_1 t) \quad \text{mit} \quad \Gamma_1 = D_{app} q^2 \quad \text{(Gl. 3.2.5)}$$

Γ_1 ist die Relaxationszeit des Diffusionsprozesses des Makromoleküls.^[69] Dadurch kann der apparente Translationsdiffusionskoeffizient D_{app} bestimmt werden. Die Extrapolation von D_{app} gegen eine unendliche Verdünnung und $q = 0$ liefert den Diffusionskoeffizienten D des freien Teilchens. Über die Stokes-Einstein-Beziehung steht D_{app} mit dem hydrodynamischen Radius R_h einer reibungsfreien äquivalenten Kugel in Verbindung:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D} \quad \text{(Gl. 3.2.6)}$$

Werden mehrere Populationen i betrachtet, ergibt sich für die Exponentialfunktion entsprechend:

$$g_1(t) = a_1 \exp(-\Gamma_1 t) + a_2 \exp(-\Gamma_2 t) + \dots \quad \text{(Gl. 3.2.7)}$$

Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius R_{hi} für die Population i erfolgt aus Γ_i . Der Koeffizient a_i gibt den Anteil der Gesamtintensität an, der durch die Population i gestreut wird.

Das charakteristische Verhältnis ρ ist definiert als der Quotient aus dem Trägheitsradius R_g (aus der statischen Lichtstreuung) und dem hydrodynamischen Radius R_h (aus der dynamischen Lichtstreuung) und liefert Informationen über die Form der streuenden Spezies in Lösung. Es gelten folgende Werte für ρ :

$$\rho \approx 3 \rightarrow \text{Stäbchen}$$

$$\rho \approx \frac{3}{2} \rightarrow \text{Gauß - Knäuel}$$

$$\rho \approx 0,775 \rightarrow \text{Kugel}$$

3.3 Mikroskopie

3.3.1 Allgemeines

Die Existenz von Zellen, ihr Aufbau aus Zellkern und Zellplasma sowie aus weiteren Untereinheiten sind durch lichtmikroskopische Untersuchungen entdeckt worden. Der Vergrößerung im Lichtmikroskop ist eine natürliche Grenze gesetzt, die ihren Grund in der Wellenlänge und der Beugung des Lichtes hat. Die maximale Auflösungsgrenze für blaues Licht ($\lambda = 400 \text{ nm}$) liegt bei etwa 200 nm . Durch Verwendung anderer Strahlung z.B. der Elektronenstrahlung können aber auch Objekte im Nanometerbereich abgebildet werden.

3.3.2 Rasterkraftmikroskopie

Eine besonders wichtige Methode bei der Abbildung biologischer Systeme ist die Rasterkraftmikroskopie (Atom Force Microscopy, AFM).^[70] Dabei wird eine sehr feine Spitze auf der Probe positioniert, die mit Hilfe eines piezoelektrischen Antriebs mit einer Stellgenauigkeit von bis zu $0,01 \text{ nm}$ in x- und y-Richtung verschoben werden kann. Die Spitze ist in unmittelbarem Kontakt mit der Oberfläche der Probe und folgt beim Abrastern dem Oberflächenprofil. Zum Nachweis der Bewegung der Nadel hat sich bei den modernen Geräten eine optische Methode durchgesetzt. Die Spitze befindet sich an einer mikroskopischen Blattfeder, auf die der Lichtstrahl eines Lasers positioniert ist (Abb. 3.5). Die Reflektion des Lasers wird mit Hilfe einer Photodiode detektiert. Bei einer Bewegung der Spitze in z-Richtung verändert sich der Reflektionswinkel α und dadurch die Position des Laserstrahls. Aus dieser Differenz kann mit Hilfe der Diode entweder eine Höheninformation berechnet werden oder die Auflagekraft wird so nachgeregelt, dass die Spitze eine konstante Höhe beibehält. Bei letzterer Methode ergibt sich aus der Stärke der Nachregelung die Oberflächentopographie.^[71]

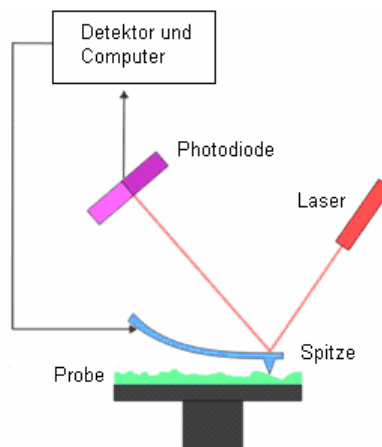


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops

Bei dieser Art der Messung spricht man vom Kontaktmodus. Sie bietet im Gegensatz z.B. zur Rastertunnelmikroskopie die Möglichkeit, auch nicht leitende Proben ohne das Bedampfen mit leitenden Substanzen zu betrachten. Darüber hinaus muss sie nicht im Vakuum durchgeführt werden, eine direkte und unverfälschte Beobachtung ist möglich. Ein Nachteil des Kontaktmodus besteht darin, dass die Spitzenradien bei 6 bis 20 nm liegen. Es werden meist durch Ätzprozesse hergestellte Silicium- oder Siliciumnitrid-Spitzen verwendet. Durch die Bewegung der großen Spitze über die Probe kommt es zur Verzerrung von topographischen Details. So werden Erhebungen tendenziell über- und Vertiefungen unterschätzt oder es werden Strukturen dargestellt, die als Abbildung der Spitze selbst identifiziert werden können.^[72]

Eine andere Art der Kraftmikroskopie erlaubt kontaktfreies Messen.^[73] Auch hier ist die Spitze federnd aufgehängt, allerdings in einem Abstand zur Probe von etwa 2 bis 20 nm. In diesem Abstand bestehen zwischen der Spitze und der Probe im allgemeinen anziehende van-der-Waals-Kräfte. Da die Größe des van-der-Waals-Potentials proportional ist zum Abstand zwischen Probe und Spitze, lässt sich aus Messungen dieses Potentials die Oberflächentopographie rekonstruieren.

3.4 Gel-Elektrophorese

3.4.1 Allgemein

Viele Makromoleküle tragen elektrische Ladungen und können daher im elektrischen Feld wandern. Die Elektrophorese nutzt diesen Effekt und ist eine wichtige Methode zur Trennung und Analyse von Proteinen und Nucleinsäuren.^[56, 66] Die Geschwindigkeit v , mit der das Molekül der Ladung q im elektrischen Feld der Feldstärke E wandert, hängt vom Reibungskoeffizienten f der umgebenden Lösung ab und ist der angelegten Spannung proportional. Die Mobilität des Moleküls lässt sich durch die elektrophoretische Beweglichkeit u wie folgt ausdrücken:

$$u = v/E = q/f \quad (\text{Gl. 3.4.1})$$

Eine exakte Berechnung von elektrophoretischen Beweglichkeiten ist im allgemeinen nicht möglich, da der effektive Wert der elektrischen Ladung eines Moleküls stark von den Solvatationsbedingungen und dem hydrodynamischen Verhalten sowie der genauen Form in Lösung abhängt. Die Elektrophorese bietet also nicht die Möglichkeit einer exakten Molmassenbestimmung, aber sie kann auf einfache und schnelle Weise Mischungen von Makromolekülen trennen und quantitativ analysieren.

3.4.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wird meist in Gelen und nicht frei in Lösung durchgeführt, da dadurch Konvektionsströme in Lösung verhindert werden und eine zusätzliche Verbesserung der Trennung bewirkt wird. Für die Protein-Analyse verwendet man zumeist Polyacrylamid-Gele, die je nach Konzentration des eingesetzten Quervernetzers unterschiedlich große Poren besitzen. Für die Analyse von Nucleinsäuren verwendet man im Allgemeinen Agarose-Gele mit unterschiedlichen Massenprozent Agarose, je nach Größe der zu untersuchenden DNS.^[74] Zur ungefähren Bestimmung der Molmassen wird eine Standardmischung verwendet, eine so genannte Ladder, die unter gleichen Bedingungen auf dem Gel mitläuft (Abb. 3.6).

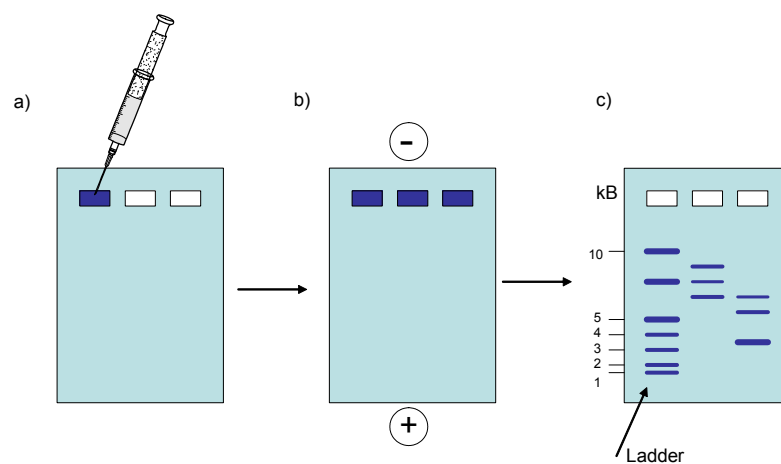


Abb. 3.6: Schema zur Durchführung eines Gelelektrophorese-Experiments: a) Auftragung der Ladder und Proben in die Geltaschen, b) Anlegen der Spannung und Auftrennung der Probe im Gel, c) Auswertung des Gels mit Hilfe der Ladder

Es gibt verschiedene Möglichkeiten um nach erfolgreicher Trennung auf dem Gel die verschiedenen Banden sichtbar zu machen. Bei Proteinen kann mit Coomassie-Blau selektiv die Protein-Bande angefärbt werden. Bei Nucleinsäuren verwendet man einen Fluoreszenzmarker wie Ethidiumbromid oder Bromphenol. Eine weitere Verbesserung der Auftrennung erhält man durch die Verwendung des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS). Die SDS-Moleküle umhüllen die Proteine, bzw. Nucleinsäuren und bilden Micellen. Dabei schirmen sie die Ladung im Inneren der Micelle ab. Die Anzahl der umhüllenden SDS-Moleküle ist proportional zur Größe des eingehüllten Proteins, bzw. der eingehüllten Nucleinsäure. Die resultierende stark negative Ladung der Micellen ist also proportional zur Größe des Proteins, bzw. der Nucleinsäure und die Trennung auf dem Gel erfolgt ausschließlich nach der effektiven Größe und nicht nach dem Verhältnis Größe und Ladung. Somit ist eine eindeutige Zuordnung der Banden mit Hilfe der Ladder leichter.^[65]

Kapitel 4

Festphasengebundene Synthese der PAAs

4.1 Schrittweiser Aufbau an der Festphase

4.1.1. Allgemein

Das Prinzip der klassischen Festphasen-Peptid-Synthese beruht auf der schrittweisen Addition von AB-Monomeren, den Aminosäuren, an eine Festphase.^[49, 50] Die Festphase, das sogenannte Harz, ist ein Mikrogel, das in den verwendeten Lösungsmitteln nicht löslich aber sehr gut quellbar ist und am Polymerrückgrat Amin-Funktionalitäten trägt. Während der Addition an das Harz ist die B-Funktionalität des Monomers, die Aminfunktionalität, temporär geschützt um die Selektivität der Reaktion zu erhalten (siehe Kapitel 2.3).

Die Festphasensynthese von PAAs verwendet das alternative Prinzip der schrittweisen Addition von AA- und BB-Monomeren, in dieser Arbeit den Disäure- und Diamin-Bausteinen. In diesem Fall muss die B-Funktionalität nicht geschützt werden, da es nicht zur unerwünschten Kondensation in Lösung kommen kann. Der erste Schritt der Synthese ist eine Kondensation der Carboxyl-Funktion des ersten Disäure-Bausteins an der festphasengebundenen Aminfunktionalität unter Ausbildung einer Amid-Bindung (Abb. 4.1, Schritt 1). Bei vollständiger Addition werden freie Carboxyl-Funktionen an der Festphase generiert, an die im zweiten Schritt die Amin-Funktion eines Diamin-Bausteins addiert werden kann. Dabei entsteht wiederum eine Amidbindung (Abb. 4.1, Schritt 2). Der Zyklus der alternierenden Addition von Disäuren und Diaminen wird bis zur gewünschten Kettenlänge wiederholt. Bei jeder Addition kann der Baustein neu gewählt werden und ermöglicht so den Aufbau einer definierten Monomersequenz entlang der Polymerkette. Um multifunktionale Polymere aufzubauen, können Bausteine mit weiteren Funktionalitäten eingesetzt werden. Diese müssen allerdings orthogonal geschützt werden um Nebenreaktionen wie z. B. Verzweigungen zu vermeiden.

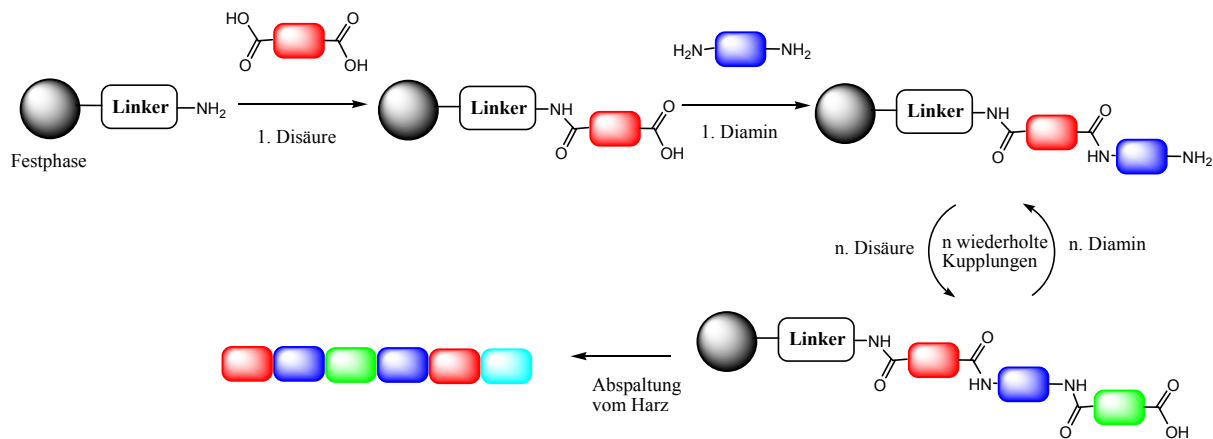


Abb. 4.1: Systematische Darstellung der festphasengebundenen Synthese von PAAs^[75]

Die Kontrolle über die Sequenz der Polymerkette geht einher mit der Kontrolle über den Umsatz jeder einzelnen Addition. Nur wenn jede Einzeladdition mit vollständigem Umsatz durchgeführt wird, kann am Ende der Synthese das gewünschte Polymer mit hoher Reinheit gewonnen werden. Unvollständige Additionen führen zu Fehlern in der Sequenz, so genannten Auslassungssequenzen, und damit zu einer Verteilung im Molekulargewicht. Bei erfolgreicher Synthese hingegen werden monodisperse PAAs mit definiertem Molekulargewicht und einheitlicher Monomersequenz gewonnen.

Die für die PAA-Synthese verwendete Chemie gewährleistet nicht nur eine hohe Ausbeute des gewünschten Produkts, sondern ermöglicht außerdem eine Automatisierung der Synthese. An einem Standard-Peptid-Synthesizer kann die schrittweise Addition der Monomere voll automatisch durchgeführt werden und ermöglicht so die schnelle und einfache Synthese auch längerer monodisperser PAA-Segmente. Darüber hinaus lässt sich die Chemie der PAA-Synthese mit der Standard-Festphasen-Peptid-Synthese kombinieren. Es ist möglich neben den PAA-Bausteinen auch Aminosäuren oder Peptidsegmente in die Polymerkette zu integrieren.

Nach erfolgreicher Synthese des Polymers an der Festphase muss dieses vom Harz abgespalten werden. Die zu verwendende Chemie hängt dabei von der Wahl der Ankergruppe (Linker) ab, die Harz und Polymer während der Synthese verbindet und nun gespalten werden muss. Das gewonnene Rohprodukt wird durch Umfällen und Dialyse weiter aufgereinigt.

4.1.2. Auswahl der Festphase

Auch heute noch werden standardmäßig die bereits von Merrifield eingeführten Polystyrol-Harze verwendet.^[47] Der Grad der Quervernetzung mit Divinylbenzol bestimmt dabei die mechanische Belastbarkeit und den Quellungsgrad der Harze. Die Wahl der reversibel

spaltbaren Ankergruppe (Linker), die die abschließende Abspaltung des Produkts vom Harz ermöglicht, hängt von verschiedenen Aspekten ab. Der Einsatz z. B. eines sehr stark säurelabilen Linkers basieren auf der 2-Chlor-Trityl-Gruppe (Abb. 4.2), ermöglicht das Produkt mit allen temporären Seitenschutzgruppen zu isolieren, da diese erst bei höheren Säurekonzentrationen abgespalten würden.^[49] Eine selektive Umsetzung der terminalen Funktionalität z. B. mit einem anderen funktionalen Polymer oder die Anbindung an eine Oberfläche ist so möglich. Darüber hinaus vermeidet die Verwendung stark säurelabiler Linker das Risiko der Hydrolyse z.B. von Ester-Gruppen oder auch aktivierten Amid-Gruppen während der Abspaltung vom Harz. Dabei bietet der 2-Chlor-Trityl-Linker zusätzlich vielfältige Möglichkeiten andere Funktionalitäten am Ende der Peptid- oder Polymerkette nach der Abspaltung freizusetzen. Durch Beladung mit Fmoc-Aminosäuren kann eine terminale Carboxylfunktion erzeugt werden, die bei der Peptidsynthese dem C-Terminus der Peptide entspricht. Ebenso ist es aber auch möglich das Harz z. B. mit Fmoc-Aminoethanol zu beladen und so bei Abspaltung eine terminale Hydroxylfunktionalität zu erzeugen (Abb. 4.2).

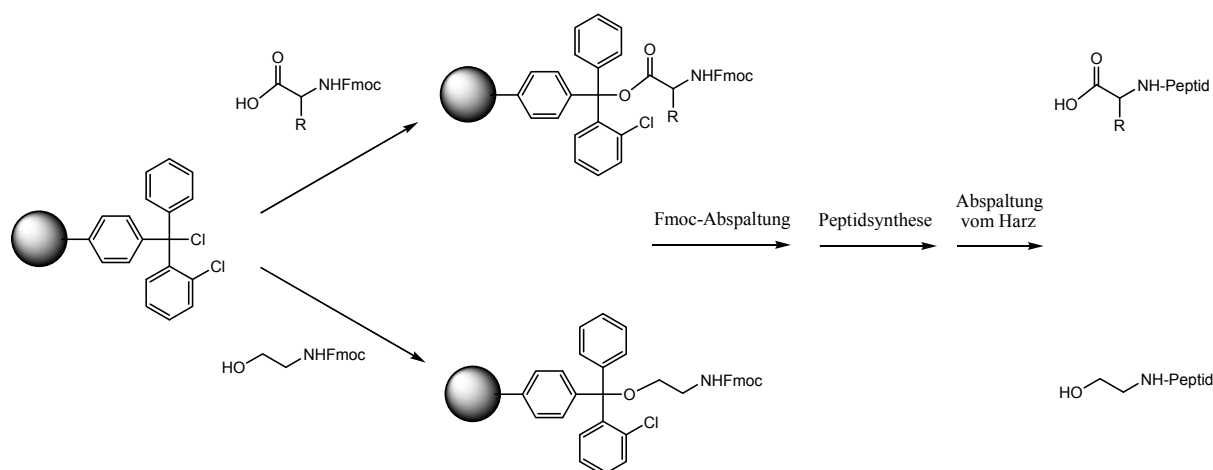


Abb. 4.2: Der Einsatz von 2-Chlor-Trityl-Harzen zur Freisetzung unterschiedlicher terminaler Funktionalitäten: Die Beladung mit Fmoc-Aminosäuren oder Fmoc-Aminoethanol

Ebenfalls aus der Peptid-Synthese bekannt sind die sogenannten Tentagel[®]-Harze.^[49] Sie tragen zusätzlich zum Linker einen PEO-Spacer (Abb. 4.3). Dabei kann das PEO entweder zwischen Harz und Linker positioniert sein und bei der Abspaltung nicht mit freigesetzt werden oder der Linker verbindet Harz und PEO und ermöglicht so die direkte Synthese von Blocksystemen. Zum einen dient der PEO-Spacer der besseren Quellbarkeit des Harzes. Zum anderen dient er als Schutz vor Micro-Aggregation der Peptid-Ketten auf dem Harz. Besonders bei Peptid-Sequenzen, die stark zur Aggregation neigen, aber auch bei der Synthese der PAA besteht die Gefahr, dass die wachsenden Ketten aggregieren und dadurch ein weiteres Kettenwachstum erschweren.

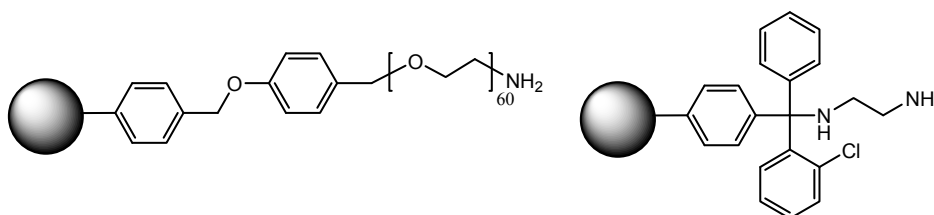


Abb. 4.3: Tentagel-Wang-Harz (links), EDA-Trityl-Harz (rechts)

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Harze verwendet. Für die Synthese von Peptid-PAA Blockcopolymeren wurde ein mit Ethylendiamin beladenes Trityl-Harz verwendet, das sich mit 2-5% TFA in DCM abspalten lässt (Abb. 4.2). Für die Synthese der PEO-PAA Blockcopolymeren wurde ein von Börner und Rapp entwickeltes Wang-PAP-Harz (PAP: PEO Attached Polystyrene) verwendet (Abb. 4.3).^[76] Der Wang-Linker (Hydroxymethylphenol-Linker) ermöglicht eine Abspaltung des Blockcopolymeren mit 5% TFA in DCM. Der PEO-Block wird durch anionische Polymerisation an einem Wang-Harz synthetisiert und mittels einer Gabrielsynthese am ω -Kettenende eine Aminfunktionalität erzeugt. Bei den verwendeten Wang-PAP-Harzen wurde das Molekulargewicht des PEO-Blocks durch Messungen der Größenausschlusschromatographie (GPC) bestimmt. Es wurde ein zahlengemittelttes Molekulargewicht von 2700 g/mol und eine Polydispersität von $M_w/M_n = 1.06$ bestimmt.

Die Standard-PAP-Harze zur Synthese von PEO-Blocksystemen tragen einen weniger aktivierten Benzylether-Linker, der nur unter stark sauren Bedingungen (99% TFA und 1% Trimethylsilylbromid für 6 bis 12 Stunden) gespalten werden kann. Die sanfte Abspaltung des Wang-Linkers ermöglicht die Synthese vollständig geschützter PEO-Blocksysteme und vermeidet das Risiko der Acidolyse.

4.1.3 Alphabet der Bausteine

Ähnlich dem Aminosäuren-Alphabet sollte auch für die Synthese von sequenzdefinierten PAAs eine Reihe verschiedener Bausteine eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde daher verschiedene Diamine und Disäuren auf ihre Verwendbarkeit als Bausteine in der PAA-Synthese untersucht und ein Alphabet möglicher Bausteine zusammengestellt. Da die hier hergestellten Polymere Anwendung als nicht-virale Vektoren zur Gentransfektion finden sollen, sind Amin-Gruppen die wichtigsten einzubauenden Funktionalitäten. Über diese kationischen Funktionen werden Wechselwirkungen mit dem zu transportierenden Genmaterial kontrolliert.

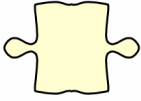
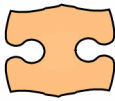
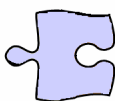
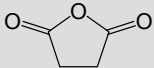

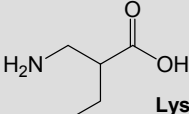
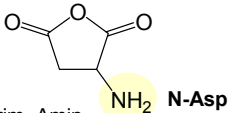
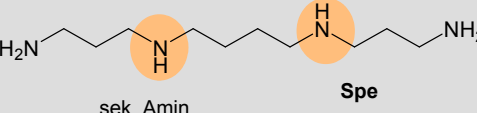

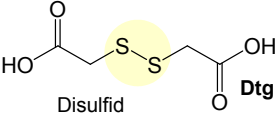
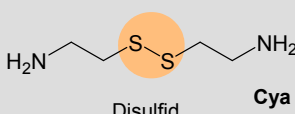
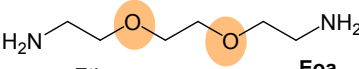
 Disäure	 Diamin	 Aminosäure
 Suc	 tert. Amin Damp	 Lys
 prim. Amin N-Asp	 sek. Amin Spe	 prim. Amin
 Disulfid Dtg	 Disulfid Cya	alle Aminosäuren
	 Ether Eoa	

Abb. 4.4: Das Alphabet der Monomere: Strukturformeln und Abkürzungen der verwendeten Bausteine. Die grau unterlegten Bausteine können für die automatisierte Synthese verwendet werden.

In Abbildung 4.4 wurde das Alphabet der untersuchten Disäure- und Diamin-Bausteine, ihre Strukturformeln und die verwendeten Abkürzungen, zusammengestellt. Die grau unterlegten Bausteine konnten dabei in der automatisierten Synthese der PAAs beliebig eingesetzt werden.

Mit den hier gezeigten Bausteinen ist es möglich PAA-Segmente mit primären, sekundären und tertiären Aminen zu synthetisieren. Für die Synthese von PAA-Segmenten mit tertiären

Amin-Gruppen wurde 3,3'-Diamino-N-methyldipropylamin (Damp, Abb. 4.4) verwendet. Dabei musste die tertiäre Aminfunktionalität nicht zusätzlich geschützt werden, da sie nicht mit Carboxylfunktionen oder anderen Reagenzien der PAA-Synthese reagieren und so Nebenprodukte bilden kann. Damp ist kommerziell erhältlich und wurde daher als Standard Diamin-Baustein verwendet, um die Kupplungschemie zu untersuchen und die PAA-Synthese zu optimieren.

Zum Einbau von sekundären Aminen wurde Spermin (Spe, Abb. 4.4) verwendet. Da die sekundären Aminfunktionalitäten nucleophil genug sind um durch Addition tertiäre Amine zu bilden, mussten diese Gruppen für den Einsatz in der PAA-Synthese orthogonal geschützt werden. Dazu wurden die sekundären Aminfunktionalitäten des Spermins selektiv mit ^tBoc-Schutzgruppen (*tert.* Butyl-oxy-carbonyl) geschützt.^[77] Zunächst wurden die primären Amin-Gruppen mit Benzaldehyd selektiv blockiert und dann die sekundären Amin-Gruppen mit ^tBoc-Gruppen geschützt. Nach dem selektiven Freisetzen der primären Amin-Gruppen wurde der Baustein in der Synthese eingesetzt. Die ^tBoc -Schutzgruppen können mit 30% TFA in Dichlormethan abgespalten werden

Zum Einbau von primären Aminen wurde Lysin in die Polymerkette eingebaut. Neben dem Einbau einzelner Aminosäuren können auch ganze Peptidsequenzen in das PAA-Rückgrat eingebaut werden. Peptidsegmente, die selektiv enzymatisch gespalten werden, dienen dann z. B. der gezielten Freisetzung des komplexierten Genmaterials und dem definierten Abbau des Polymers. Es gibt zahlreiche Enzyme, die nur in bestimmten Zellkompartimenten wie z. B. dem Endosom vorhanden sind und selektiv einfache Peptid-Sequenzen spalten können. Ein Beispiel hierfür ist die Sequenz Glycin-Phenylalanin-Lysin-Glycin (GFLG), die durch das Enzym Trypsin gespalten wird.^[78]

Eine andere Möglichkeit selektiv abbaubarer Funktionalitäten bietet der Einbau einer Disulfid-Gruppe in das PAA-Rückgrat. Durch die reduktive Umgebung im Endosom wird das Disulfid gespalten und somit das PAA selektiv abgebaut. Hierzu wurde als Baustein Cystamin verwendet (Cya, Abb. 4.4).^[79, 80]

Als Disäure-Baustein für die automatisierte PAA-Synthese wurde stets Bernsteinsäureanhydrid verwendet. Die nicht farbige unterlegten Bausteine in Abbildung 4.4 wurden als Monomere in der Synthese verwendet, sind aber aus verschiedenen Gründen nicht für die automatisierte PAA-Synthese geeignet. Dithiodiglycolsäure (Dtg, Abb. 4.4) kann mit PyBOP/HOBt in den Aktivester überführt und an die Festphase kondensiert werden. Allerdings erfolgt die anschließende Addition eines Diamin-Bausteins nicht mehr quantitativ. Dies könnte darauf hindeuten, dass die erneute Aktivierung der festphasengebundenen

Carboxylfunktion mit PyBOP/HOBt nach der erfolgreichen Aktivierung in Lösung nur noch unvollständig zum Aktivester führt und so die Umsetzung mit der Aminfunktion verhindert. Boc-Asparaginsäure wurde daher mit DIC in das Anhydrid überführt und mit der festphasengebundenen Aminfunktion umgesetzt. Allerdings bildete sich bei der Reaktion an der Festphase ein unlöslicher Niederschlag aus, der eine Übertragung an den Synthesizer unmöglich machte.

4.1.4 Addition der Bausteine

Für die Synthese monodisperser sequenzdefinierter PAA-Systeme ist es wie bei der Peptid-Synthese wichtig jede Einzeladdition mit möglichst 100% Umsatz durchzuführen. Die Fehler jeder Addition summieren sich über die gesamte Synthese und führen zu einem Gemisch von Auslassungssequenzen und Ketten unterschiedlicher Länge.

Es gibt verschieden Strategien möglichst hohe Umsätze zu erzielen, die bei der Synthese der PAAs miteinander kombiniert wurden. Zum einen bietet die Chemie der Peptidsynthese eine große Anzahl an Aktivierungsreagenzien, die die Carboxylfunktion in einen Aktivester überführen und somit zu einer schnelleren Kupplungskinetik führen, die eine vollständigere Addition an das Amin ermöglicht.^[49] Zum anderen werden die zu addierenden Bausteine in einem großen Überschuss im Bezug auf die festphasengebundene Funktion von bis zu 10 Äquivalenten eingesetzt. Darüber hinaus ist es üblich, die Kupplungen nicht nur einmal sondern zweimal als sogenannte Doppelkupplung durchzuführen.

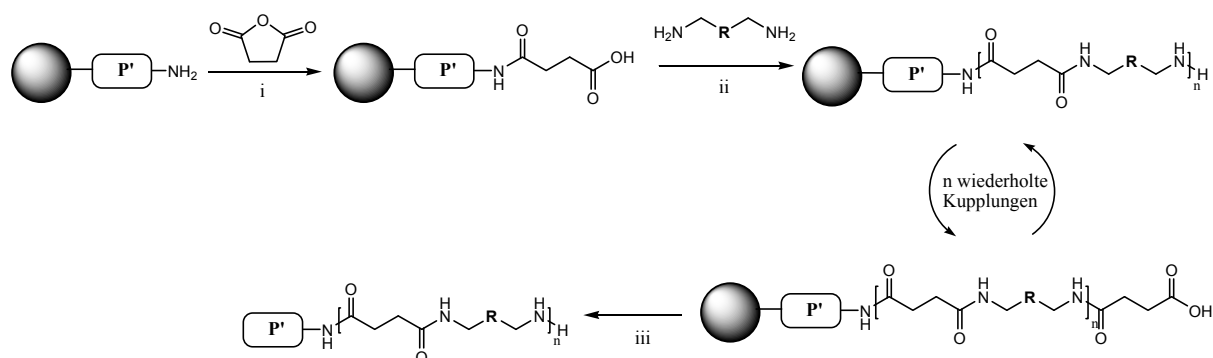


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der PAA-Synthese an der Festphase. Reaktionsbedingungen: i) DIPEA/NMP; ii) PyBOP/HOBt, DIPEA/DMF; iii) TFA/DCM

Die Addition des ersten Disäure-Bausteins erfolgt dementsprechend mit einem Überschuss von 10 Äquivalenten pro festphasengebundener Aminfunktion und als Doppelkupplung mit

einer Reaktionszeit von jeweils 20 min. Das als Disäure-Baustein verwendete Bernsteinsäureanhydrid muss als Anhydrid-Struktur nicht voraktiviert werden, da es bereits bei Raumtemperatur quantitativ mit Aminen unter Ausbildung einer Amidbindung reagiert (Abb. 4.5). Um die Vollständigkeit der Addition zu überprüfen, wurden die Zwischenprodukte mit Hilfe der ESI-MS und kolorimetrischen Tests untersucht. Für die massenspektrometrische Untersuchung wurde eine kleine Menge Harz dem Reaktionsgefäß entnommen, unter den entsprechenden Bedingungen das Produkt vom Harz abgespalten und mit Hilfe der ESI-MS analysiert. Die einfachere Möglichkeit der Umsatzkontrolle bieten kolorimetrische Tests wie der Kaisertest^[81] und der Malachitgrüntest^[82]. Der Kaisertest färbt vorhandene primäre Amin-Funktionen am Harz mittels Ninhydrin blau an. Bei einer Verfärbung der Harz-Kügelchen sind also primäre Amin-Gruppen am Harz vorhanden. Mit Hilfe des Malachitgrüntests lassen sich festphasengebundene Carboxyl-Funktionen dunkelgrün anfärben. Bei erfolgreicher Addition eines Disäure-Bausteins belegt ein negativer Kaisertest und ein positiver Malachitgrüntest die vollständige Umsetzung. Ein positiver Kaiser-Test hingegen würde die unvollständige Umsetzung der festphasengebundenen Aminfunktionalitäten anzeigen.

Bei der Umsetzung der festphasengebundenen Aminfunktion mit Bernsteinsäureanhydrid kann es zur Addition eines zweiten Anhydrids an die neu gebildete festphasengebundene Carboxylfunktion kommen. Das ESI-Massenspektrum zeigt neben dem Produktsignal ein Signal mit einer Masse +100 Da, was auf die Bildung eines linearen Anhydrids hindeutet. Dieses lineare Anhydrid kann vollständig durch einen basischen Waschschriff mit DIPEA gespalten werden. Das ESI-Massenspektrum zeigt nur noch das gewünschte Produkt der Kondensation von Bernsteinsäureanhydrid an der Aminfunktion.

Vor der Addition des ersten Diamin-Bausteins muss die Carboxyl-Funktion am Harz aktiviert werden. Dazu wurde das System PyBOP/HOBt in einem Überschuss von 10 Äquivalenten pro Carboxyl-Funktion verwendet (Abb. 4.6).

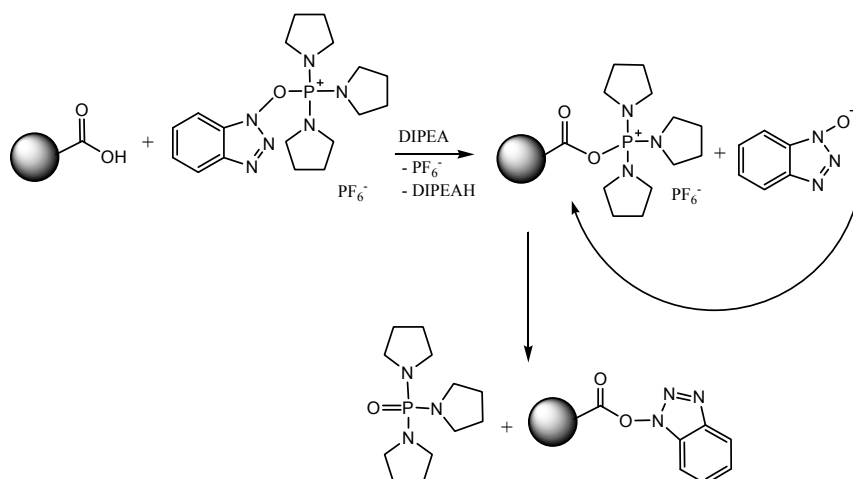


Abb. 4.6: Aktivierungsmechanismus einer festphasengebundenen Carboxylfunktion durch PyBOP/HOBt.

Diese Form der Aktivierung ist sehr sensitiv gegenüber Verunreinigungen. Die erste Addition eines Diamin-Bausteins sowie alle folgenden Additionen wurden daher in DMF durchgeführt. Das DMF wurde frisch destilliert und mit Hilfe eines Sanger-Tests auf seine Qualität überprüft. Auch diese Addition wurde als Doppelkupplung mit einem 10-fachen Überschuss an Diamin-Baustein pro festphasengebundener Carboxylfunktion und einer Reaktionszeit von 30 min durchgeführt. Lediglich beim Einbau des Spermin-Bausteins wurde ein Überschuss von 5 Äquivalenten verwendet, da dieser Baustein aufwendig in der Herstellung ist. Die vollständige Addition wurde mit Hilfe der colorimetrischen Tests überprüft: Ein positiver Kaiser- und ein negativer Malachit-Grün-Test zeigen die vollständige Umsetzung der Carboxyl-Funktionen mit dem Diamin-Baustein an. Die wiederholte abwechselnde Addition von Disäuren und Diaminen nach dieser Reaktionsvorschrift ermöglicht den Aufbau von PAA-Segmenten. Die PAA-Blöcke sind monodispers und besitzen eine definierte Monomersequenz entsprechend der Reihenfolge der addierten Bausteine.

4.1.5 Einbau von Peptid-Sequenzen

Nach dem Einbau eines Diamin-Bausteins in der PAA-Synthese ist es nun möglich einzelne Aminosäuren oder ganze Peptidsequenzen in das PAA-Rückgrat mit einzubauen. Dazu wurde die standardisierte Fmoc-Kupplungsstrategie der Peptidchemie verwendet (Abb. 4.7).^[49]

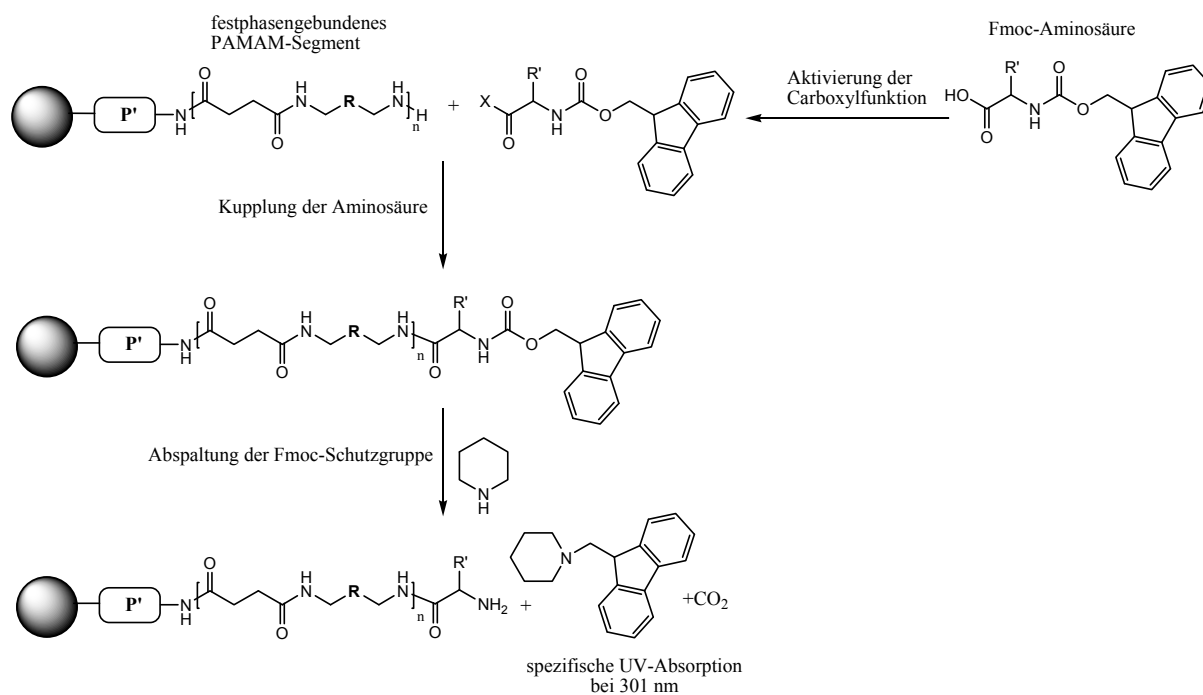


Abb. 4.7: Einbau von Aminosäuren oder Peptiden in die PAA-Kette

Die am N-Terminus Fmoc-geschützte und vollständig Seitenketten-geschützte Aminosäure wird in Lösung mit HBTU voraktiviert und in einem 10-fachen Überschuss pro festphasengebundener Aminfunktion für 20 min an das Harz gekuppelt (siehe Kapitel 2.3). Nach der erfolgreichen Kupplung der Aminosäure muss die terminale Amin-Funktion durch Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin freigesetzt werden. Das UV-Signal der Fmoc-Schutzgruppe kann mit Hilfe eines Spektrometers aufgezeichnet werden und liefert zusätzliche Informationen über die Vollständigkeit der Addition und der Abspaltung der Schutzgruppe (Abspaltdiagramm siehe Anhang).

Anschließend kann erneut ein Disäure-Baustein gekuppelt werden und durch wiederholte Durchführung der schrittweisen Addition eine PAA-Segment aufgebaut werden.

4.1.6 Abspaltung vom Harz

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Harze lassen sich mit 5% TFA in DCM abspalten. Bei der Verwendung von Bausteinen ohne temporäre Schutzgruppen wurde mit 5% TFA in DCM für 30 min abgespalten. Bei Bausteinen mit ^tBoc-Schutzgruppen wurde stattdessen mit 30% TFA in DCM für 30 min abgespalten. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen während der Abspaltung wie der Rückaddition von Schutzgruppenfragmenten an das Peptid oder der Reduzierung bzw. Umdisulfidierung von Disulfidfunktionalitäten werden der Abspatlösung

so genannte Abfangreagenzien („scavenger“) zugesetzt.^[49] Diese Zusätze zeigten allerdings keine Effekte bei der Abspaltung der PAA-Systeme und daher wurde ohne Zusätze gearbeitet. Nachdem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in Diethylether ausgefällt. Die Ausbeuten betragen für die Peptid-PAA Blockcopolymer ca. 45-60 % und für die PEO-PAA Blockcopolymer 30-50 %. Das so gewonnene Rohprodukt wurde durch Dialyse in Wasser weiter aufgereinigt. Allerdings reduzierte sich die Ausbeute durch die Dialyse um bis zu 75%. Für die Anwendung der Polymere in Zellversuchen ist jedoch sicherzustellen, dass keine Lösungsmittelrückstände in der Probe vorhanden sind. Die so gewonnenen Polymere wurden mit Hilfe der NMR- und IR-Spektroskopie sowie der Massenspektrometrie charakterisiert.

4.1.7 Automatisierung der Synthese

Die festphasengebundene Synthese von PAAs kann mit Hilfe eines Standard Peptidsynthesizers vollständig automatisiert werden. Zum einen ist die Synthese per Hand sehr zeitaufwendig, da für die Addition jedes Bausteins ein Waschschrift, die Aktivierung des Bausteins, die Überführung auf das Harz, die Reaktion am Harz und erneute Waschschrift sowie eine Wiederholung zur Verbesserung des Umsatz durchgeführt werden müssen (siehe Kapitel 4.1.4). Zum anderen erlaubt die Automatisierung eine bessere Reproduzierbarkeit.

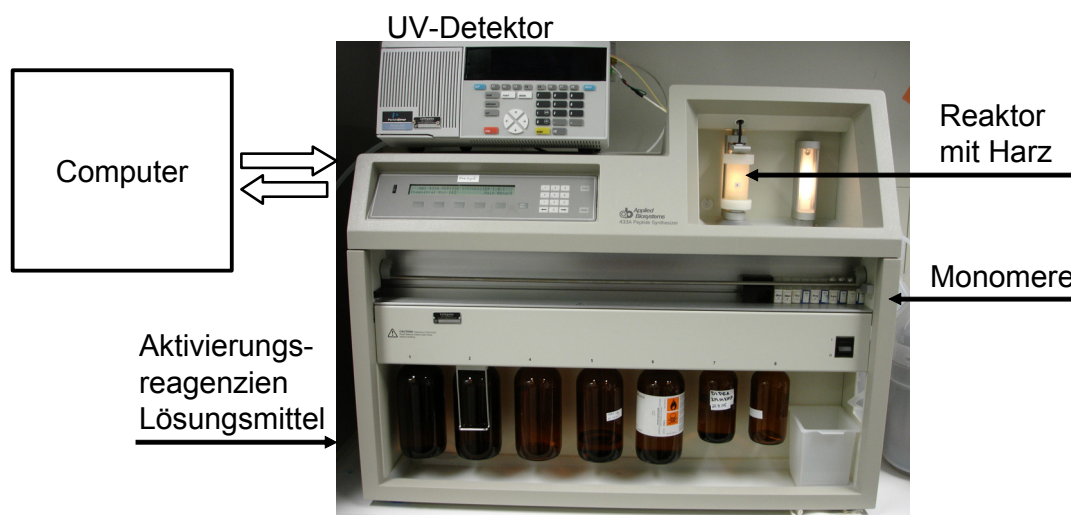


Abb. 4.8: Peptidsynthesizer ABI 433a der Firma Applied Biosystems®

In Abbildung 4.8 ist der in dieser Arbeit verwendete Peptidsynthesizer ABI 443a der Firma Applied Biosystems® dargestellt. Zur Synthese von PAAs wurde am Aufbau des Gerätes nichts verändert. Dagegen musste das Programm zur Steuerung der Synthese modifiziert und

die Standard-Peptidsynthese-Protokolle den Bedingungen der PAA-Synthese angepasst werden.

Das Harz befindet sich während der Reaktion im sogenannten Reaktor. Auf beiden Gefäßseiten befinden sich Filterpapiere und ein Lösungsmittelzu- und abfluss (Abb. 4.9). Durch diese Leitungen können Lösungsmittel zum Quellen des Harzes und die Reagenzien zur Addition der Bausteine in den Reaktor eingeleitet und nach Beendigung der Reaktion wieder entfernt werden. Die Lösungsmittel, die Aktivierungsreagenzien und alle weiteren Reagenzien befinden sich in Glasflaschen, die durch Leitungen mit dem Synthesizer verbunden sind.

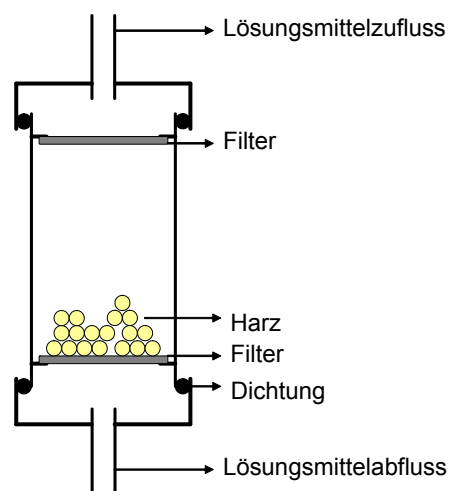


Abb. 4.9: Schematische Darstellung des Reaktors eines Peptidsynthesizers ABI 433a der Firma Applied Biosystems®

Die Bausteine werden in so genannten Kartuschen eingewogen, die mit einem Septum verschlossen werden. Am Synthesizer wird das Septum mit einer Kanüle durchstochen, durch die dann Lösungsmittel in die Kartusche eingeleitet und der gelöste Baustein anschließend aus der Kartusche in den Reaktor überführt werden kann.

Die einzelnen Gefäße sind durch Leitungen und Ventile miteinander verbunden. Zum Transport z. B. von Lösungsmittel in den Reaktor wird in der Lösungsmittelflasche ein Stickstoff-Überdruck aufgebaut und die Ventile zum Reaktor werden geöffnet. Über die Dauer dieser Schaltung wird das Volumen des transportierten Lösungsmittels bestimmt. Die Kombination der geschalteten Ventile für einen solchen Transport bezeichnet die Programmsprache des Synthesizers als Funktion.

Um einen Prozess, z. B. das Lösen eines Bausteins in der Kartusche, durchzuführen, werden verschiedene Funktionen zu einem sogenannten Modul zusammengefasst. Abbildung 4.10 zeigt das Modul „Lösen Amin“. Zuerst werden die Ventile und Leitungen mit dem

Lösungsmittel gespült, dann wird der Strichcode der Kartusche gelesen und mit dem vorgegebenen Protokoll verglichen. Anschließend wird das Lösungsmittel in die Kartusche transportiert und durch Einleiten von Stickstoff die Lösung gemischt. Das Volumen des transportierten Lösungsmittels wird nur durch die Transportdauer bestimmt. Es ist abhängig von der Viskosität des Lösungsmittels und dem Überdruck am Synthesizer. Mit Hilfe von sogenannten Durchflusstests muss die Flussrate jedes Lösungsmittels vor der Synthese bestimmt und die Zeiten der verschiedenen Funktionen angepasst werden.

Modul A: Loesen Amin

Funktionsnummer- und name			Zeit pro Funktion und gesamt		
Function Number	Name		Time	Add Time	Elapsed
1	1	Wait	1	0	1
2	98	Begin loop UPPER	2	0	1
3	11	Flush top valve block with DMF to waste	3	0	20
4	12	Flush bottom valve block with DMF to waste	3	0	23
5	9	Flush top valve block with gas to waste	5	0	28
6	10	Flush bottom valve block with gas to waste	5	0	33
7	99	End loop UPPER	1	0	33
8	4	Read cartridge	10	0	33
9	6	Needle up	10	0	43
10	7	Eject cartridge	10	0	53
11	8	Advance cartridge	10	0	63
12	5	Needle down	10	0	73
13	12	Flush bottom valve block with DMF to waste	1	0	74
14	64	Deliver DMF to cartridge	6	0	80
15	60	Mix cartridge	5	0	85
16	98	Begin loop UPPER	2	0	85
17	60	Mix cartridge	30	0	175
18	1	Wait	30	0	205
19	99	End loop UPPER	1	0	205
20					

Waschen der Ventilblöcke (Funktionsnummern 3 bis 6)

Registrierung des Strichcodes der Kartusche (Funktion 8)

Lösen des Diamins in der Kartusche (Funktionsnummern 14 bis 19)

Abb. 4.10: Das Programm der PAA-Synthese: Modul zum Lösen eines Diamin-Bausteins in der Kartusche

Die verschiedenen Module werden zu sogenannten Zyklen kombiniert. In Abbildung 4.11. ist der Zyklus „Diamin Kupplung“ dargestellt. Im ersten Modul wird der Baustein in der Kartusche gelöst. Dann wird die festphasengebundene Carboxylfunktion im Reaktor mit PyBOP/HOBt aktiviert. Anschließend wird das gelöste Diamin mit der Base in den Reaktor überführt. Nach einer definierten Reaktionszeit wird das Harz gründlich gewaschen.

Zyklus: Diamin Kupplung

Module Code	Module Name
A	Loesen Amin in Kartusche
E	Transfer PyBOP in Reaktor
G	Transfer DIPEA/ Amin in Reaktor
F	Rkts.zeit und anschl. Waschen des Harzes
D	DMF Waschen des Harzes

Abb. 4.11: Das Programm der PAA-Synthese: Zyklus zur Kupplung eines Diamin-Bausteins

Die Abfolge mehrere Zyklen und somit die vollständige Synthese eines PAAs wird im so genannten „Run“ festgelegt. In Abbildung 4.12 ist der „Run“ einer Standard-PAA-Synthese dargestellt. In der ersten Spalte wird die zu verwendende Kartusche vorgegeben. Die zweite Spalte zeigt die Namen der gewählten Zyklen und Spalte drei die entsprechenden Module. Da für die Standard-Peptidsynthese nur zwei Lösungsmittel-Anschlüsse vorgesehen sind, muss bei der PAA-Synthese nach dem Quellen des Harzes in DCM das DCM gegen DMF ausgetauscht werden. Dazu kann am Synthesizer eine sogenannter „Interrupt“, eine Unterbrechung, programmiert werden. Das Gerät stoppt an dieser Stelle die Synthese und kann wieder von Hand gestartet werden. Solche Unterbrechungen werden auch zur Entnahme von Harz zur Überprüfung der Reaktion mit Hilfe der kolorimetrischen Tests genutzt.

AA	Cycle	Modules
1 -	DCM wash	D
2 -	NMP wash	ddd
3 Asp	Kupplung Saeure NMP	aCFdf
4 Asp	Kupplung Saeure NMP	aCFdf
5 -	DMF wash	DDD
6 Asn	Diamin Kupplung	AEGFD
7 Asn	Diamin Kupplung	AEGFD
8 Asp	Kupplung Saeure DMF	HCFDc
9 Asp	Kupplung Saeure DMF	HCFDc

Kartuschennummer und -bezeichnung
Zyklus Name
Abfolge der Module im Zyklus

Abb. 4.12: Das Programm der PAA-Synthese: Ausschnitt eines Run zur Synthese von PAA-Segmenten

4.2 Synthese der Peptid-PAAs

Die Synthese der Peptid-PAA Blocksysteme wurde mit Hilfe des Synthesizers nach dem in Kapitel 4. 1 beschriebenen Syntheseweg an einem Ethylendiamin-Trityl-Harz durchgeführt. In Abbildung 4.12 ist das ESI-Massenspektrum eines Peptid-PAA Polymers dargestellt.

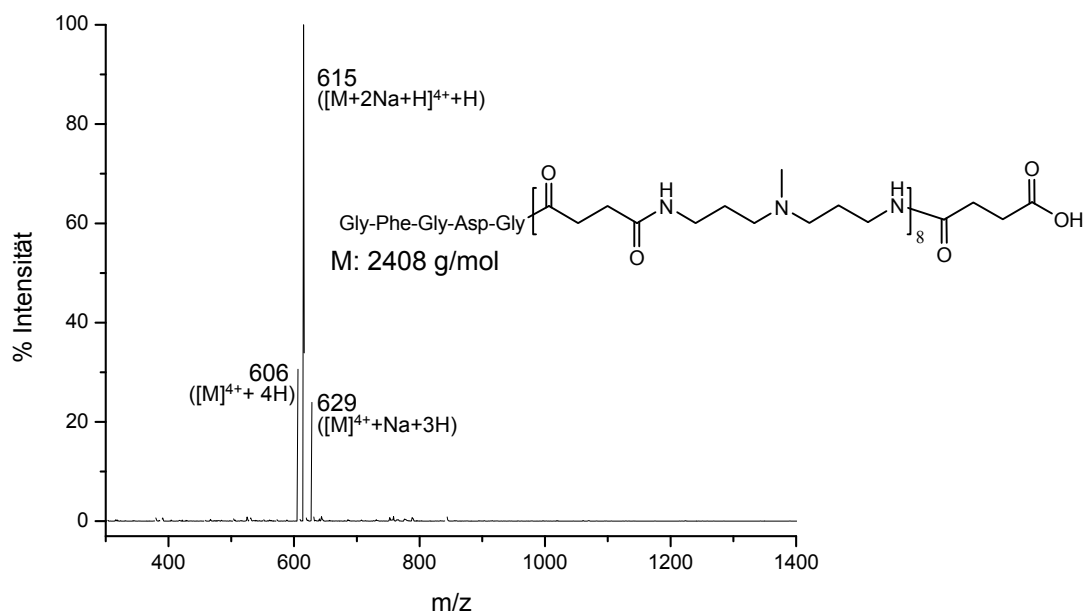


Abb. 4.12: ESI-MS eines Peptid-PAA Blockcopolymer: GFGDG-(Suc-Damp)₈-Suc-OH

Der Peptidblock besteht aus 5 Aminosäuren mit der Sequenz Glycin-Phenylalanin-Glycin-Asparaginsäure-Glycin (Gly-Phe-Gly-Asp-Gly), die sequenziell nach den Standard-Fmoc-Syntheseprotokollen an der Festphase aufgebaut wurden. Danach konnte ein PAA-Block aus Bernsteinsäureanhydrid (Suc) und 3,3'-Diamino-N-methyldipropylamin (Damp) mit 8 Wiederholungseinheiten synthetisiert und eine terminale Carboxylfunktion durch erneute Addition eines Bernsteinsäureanhydrids erzeugt werden. Die Abspaltung des Peptid-PAA Blockcopolymer erfolgte mit 30% TFA in DCM für 30 Minuten, und das Produkt wurde durch Umfällen aus Methanol/Diethylether aufgereinigt. Die theoretische Molmasse des Produkts beträgt 2408 g/mol. Das ESI-MS dieser Verbindung zeigt drei Signale, die dem vierfach geladenen Molekül-Ion des Produkts mit jeweils unterschiedlichen Begleit-Ionen zugeordnet werden können. Zum Beispiel kann das Signal bei 606 m/z dem 4fach geladenen Molekül-Ion mit 4 Protonen als Begleit-Ionen zugeordnet werden. Wichtig ist, dass das Massenspektrum keine Auslassungssequenzen oder andere Nebenprodukte zeigt, was auf einen sauberen Synthese-Verlauf hindeutet.

4.3 Synthese der PEO-PAAs

Die Synthese der PEO-PAA Blockcopolymer wurde an einem Wang-PAP-Harz nach den in Kapitel 4.1 beschriebenen Protokollen durchgeführt. Abbildung 4.13 zeigt das MALDI-TOF-MS eines PEO-PAA Blockcopolymer.

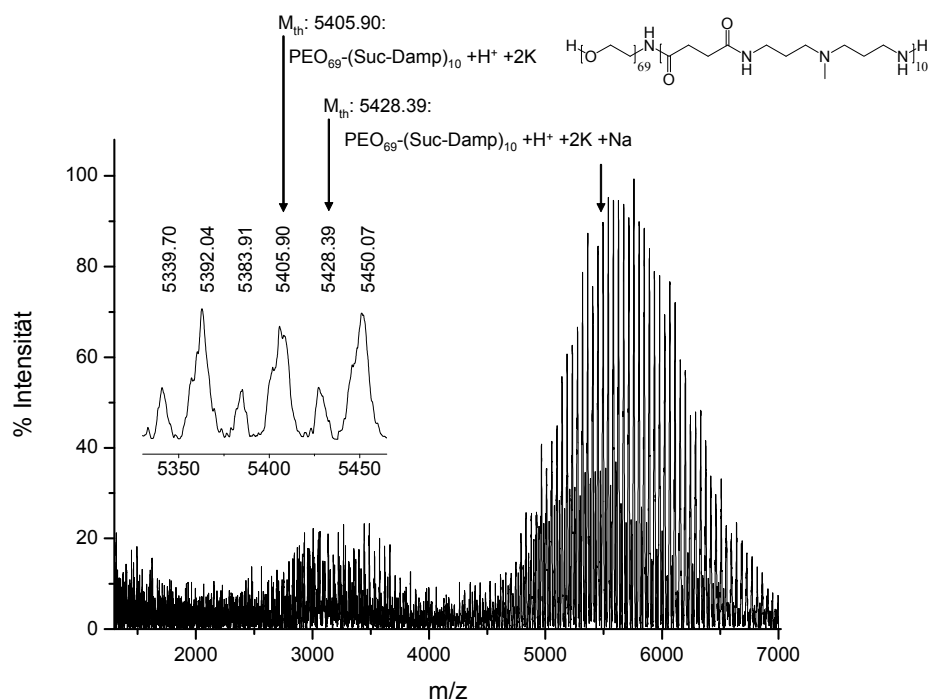


Abb. 4.13: MALDI-TOF-MS eines PEO-PAA Blockcopolymer: $PEO(2700)-(Suc-Damp)_{10}$

Als Bausteine für den PAA-Block wurden Bernsteinsäureanhydrid (Suc) und 3,3'-Diamino-N-methyldipropylamin (Damp) verwendet und 10 Wiederholungseinheiten synthetisiert. Die Abspaltung des Blockcopolymer vom Harz erfolgte mit 5% TFA in DCM. Das Produkt wurde durch Dialyse in Wasser (MWCO: 3000 g/mol) aufgereinigt, gefriergetrocknet und mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert.

Die Hauptverteilung im MALDI-TOF-MS um m/z 5800 lässt sich eindeutig dem Produkt zuordnen. Der Abstand der einzelnen Signale beträgt 44 Da, der Masse einer PEO-Wiederholungseinheit. Es lassen sich zwei Verteilungen unterscheiden, die zwei homologen Reihen des Blockcopolymer entsprechen. Jedes Signal kann n Wiederholungseinheiten EO (44.03 Da), den α - ω -Funktionalitäten des PEO-Blocks ($H-PEO-NH-$, 16.02 Da) und den 10 Wiederholungseinheiten des PAA-Blocks (2271.60 Da) sowie entsprechenden Begleit-Ionen zugeordnet werden. Die in Abbildung 4.13 markierten Signale entsprechen einem PEO-Block mit 69 Wiederholungseinheiten, dem PAA-Block und einem Proton sowie zwei Kalium, bzw. einem Proton, zwei Kalium und einem Natrium als Begleit-Ionen zugeordnet werden

(theoretische Masse: 5405.91 Da und 5428.89 Da). Diese Clusterbildung von komplexierenden Polymeren mit Begleit-Ionen wie Natrium und Kalium ist aus der Literatur bereits bekannt. Mögliche Auslassungssequenzen würden eine Verschiebung der Verteilung um die Masse einer Wiederholungseinheit des PAA-Blocks (227.16 Da) zur Folge haben. Eine solche Verschiebung wird nicht beobachtet.

Die zweite Verteilung bei m/z 2800 kann einem Fragment zugeordnet werden, dass durch Fragmentierung zwischen dem PEO- und dem PAA-Block während des Ionisierungsprozesses entsteht. Dieser Prozess wird ausführlich in Kapitel 5.1 besprochen.

Es wurde also erfolgreich ein monodisperser sequenzdefinierter PAA-Block synthetisiert und kovalent an einen PEO-Block angeknüpft. Die weitere Charakterisierung dieser PEO-PAA Blockcopolymeren wird in Kapitel 5 besprochen.

4.4 Spaltung der Disulfid-Einheit zwischen PEO- und PAA-Block

Die Synthese eines PEO-PAA Blockcopolymeren mit einer Disulfid-Einheit zwischen den beiden Blöcken wurde nach den Standardprotokollen der automatisierten PAA-Synthese (Kapitel 4.1) an einem Wang-PAP-Harz durchgeführt. Das Blockcopolymer wurde mit 5% TFA in DCM vom Harz abgespalten, in Wasser dialysiert (MWCO: 1000 g/mol), gefriergetrocknet und mit Hilfe der Massenspektrometrie charakterisiert (siehe Anhang). Das Massenspektrum zeigt wie bei den PEO-PAA Blockcopolymeren ohne Disulfid-Einheit das Produkt sowie die während der Messung entstandenen Fragmente.

Um die Spaltbarkeit der Disulfid-Einheit zu überprüfen wurde der PAA-Block durch Reduktion des Disulfids vom Harz getrennt und anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie charakterisiert (Abb. 4.15). Das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) wurde in einem Überschuss von 2.5 Äquivalenten pro Disulfid-Gruppe in entgastem DMF dem festphasengebundenen Blockcopolymer zugesetzt. Der PAA-Block sollte nun durch Reduktion des Disulfids von der Festphase getrennt werden und in Lösung mit einer terminalen Thiolfunktion vorliegen (Abb. 4.14). Nach einer Stunde wurde die Lösung durch Filtration vom Harz getrennt.

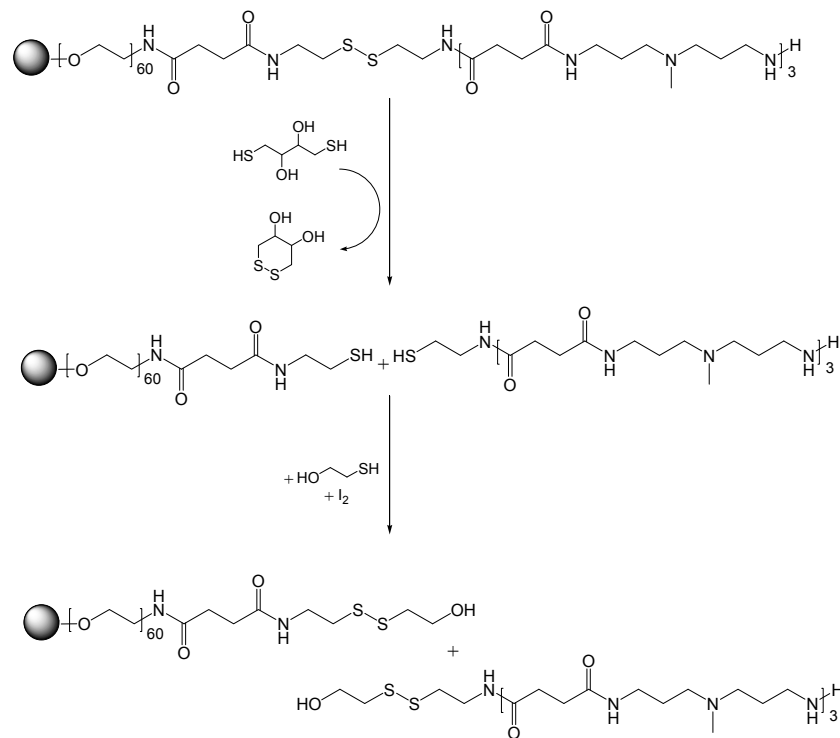


Abb. 4.15: Spaltung der Disulfid-Einheit eines PEO-PAA Blockcopolymeres an der Festphase und anschließende Oxidation der freien Thiolgruppen in Anwesenheit von Mercaptoethanol.

Um eine Oxidation der Thiofunktionen zweier PAA-Blöcke und damit eine Dimerisierung zu verhindern, wurde die Lösung mit einem Überschuss Mercaptoethanol umgesetzt. Dabei werden die freien Thiolgruppen selektiv mit Mercaptoethanol zu Disulfiden oxidiert (Abb. 4.14). Dazu wurden 10 Äquivalente Mercaptoethanol pro theoretisch vorliegender Thiofunktion hinzugefügt und bis zu einer konstanten Gelbfärbung der Lösung eine Mischung aus Iod in DMF zugetropft. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand aus Methanol/Diethylether umgefällt und anschließend in Wasser dialysiert (MWCO: 500 g/mol) und gefriergetrocknet.

In Abbildung 4.15 ist das ESI-MS des so gewonnenen PAA-Blocks dargestellt. Das Spektrum zeigt 4 Signale, von denen das Signal bei m/z 462 dem zweifach geladenen Molekülion des Produkts mit einem Proton und zwei Natrium als Begleitonen zugeordnet werden kann.

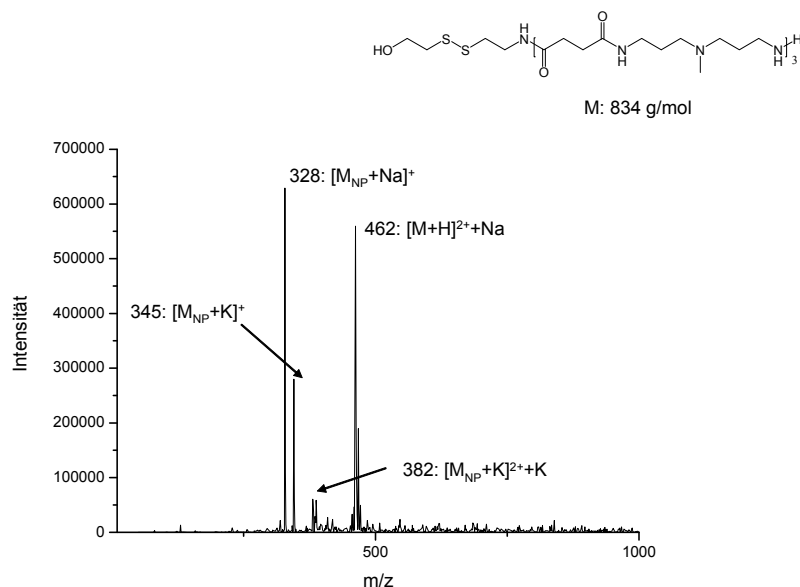


Abb. 4.15: ESI-MS des PAA-Blocks nach der Abspaltung mit DTT und anschließender Oxidation in Anwesenheit von Mercaptoethanol

Die weiteren Signale können einem Nebenprodukt der Reaktion zugeordnet werden, das durch die Oxidation von DTT mit Mercaptoethanol entsteht (Abb. 4.16). Da beide Reaktanden im Überschuss eingesetzt werden und während der Reaktion nicht aus dem Gemisch entfernt werden können, kann diese Nebenreaktion nicht unterbunden werden. Das Produkt der Nebenreaktion lässt sich aber eindeutig im ESI-MS zuordnen. Es zeigen sich die Signale des einfach geladenen Moleküliions mit unterschiedlichen Begleitonen.

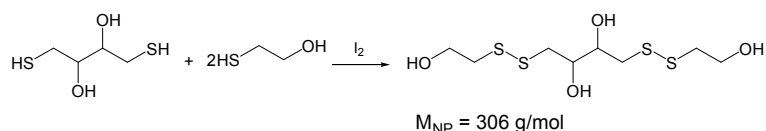


Abb. 4.16: Reaktionsschema der Nebenreaktion bei der Oxidation der freien Thiofunktion des PAA-Blocks in Anwesenheit von Mercaptoethanol: Oxidation von Mercaptoethanol und DTT unter Ausbildung einer Disulfid-Einheit.

Im Spektrum sind keine weiteren Nebenprodukte zu identifizieren. Sowohl der Aufbau des PAA-Blocks als auch seine Spaltung durch Reduktion der Disulfidgruppe funktionieren ohne Verlust der Monodispersität. Darüber hinaus erfolgt die Spaltung unter den hier beschriebenen Bedingungen quantitativ. Nach Umsetzung des festphasengebundenen PEO-Blocks mit Mercaptoethanol und Abspaltung vom Harz, zeigt die Untersuchung mit Hilfe der Massenspektrometrie nur den PEO-Teil des Polymers aber keine vollständigen PEO-PAA Blockcopolymeren mehr (siehe Anhang).

Kapitel 5

Charakterisierung der PAAs

5.1 Analytik der Blockcopolymerere

Mit Hilfe verschiedener analytischer Methoden wurden die PAA-Systeme auf ihre chemische Zusammensetzung und das Verhalten in Lösung untersucht. Dabei erwies sich die Charakterisierung besonders der PEO-PAA Blockcopolymerere als schwierig. Die beiden Blöcke des Copolymerere besitzen ganz unterschiedliche Eigenschaften, die nun kovalent verbunden sind. Der PAA-Block zeigt ähnliche Eigenschaften wie ein Peptid oder Polypeptid z. B. Aggregation in wässrigen Lösungen, die die Analytik mit klassischen Methoden der Polymercharakterisierung erschwert.^[83] Der PEO-Block hingegen besitzt klassische Polymer-Eigenschaften und erschwert so die Analytik mit Methoden der Peptidcharakterisierung wie ESI-MS.^[84] Im Folgenden wird exemplarisch an einem PEO-PAA System mit einem PEO-Block mit 60 Wiederholungseinheiten und einem PAA-Block mit tertiären Aminen und 10 Wiederholungseinheiten die Charakterisierung mit Hilfe verschiedener Methoden sowohl der Peptid- als auch der Polymeranalytik gezeigt.

5.1.1 Massenspektrometrische Untersuchung

Die massenspektrometrische Untersuchung der PEO-PAA Blockcopolymerere liefert ein komplexes Spektrum (Abb. 5.1). Auch die Optimierung der Messbedingungen wie Matrix, Lösungsmittel und Laserenergie verändert nicht die detektierten Signale sondern verbessert lediglich deren Auflösung.

Das MALDI-TOF-Spektrum des Blockcopolymerere PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀ zeigt eine Verteilung bei m/z 5500, die sich eindeutig zwei homologen Reihen des Produkts zuordnen, die sich nur in ihren Begleit-Ionen unterscheiden (Abb. 5.1). Die Differenz der einzelnen Signale beträgt 44 Da, entsprechend der Wiederholungseinheit des PEO-Blocks. Es können jedoch keine Auslassungssequenzen oder Nebenprodukte identifiziert werden. Mögliche Auslassungssequenzen im PAA-Block würden zu weiteren Verteilungen führen, die um die Masse einer Wiederholungseinheit, in diesem Fall von 227 m/z , verschoben wären.

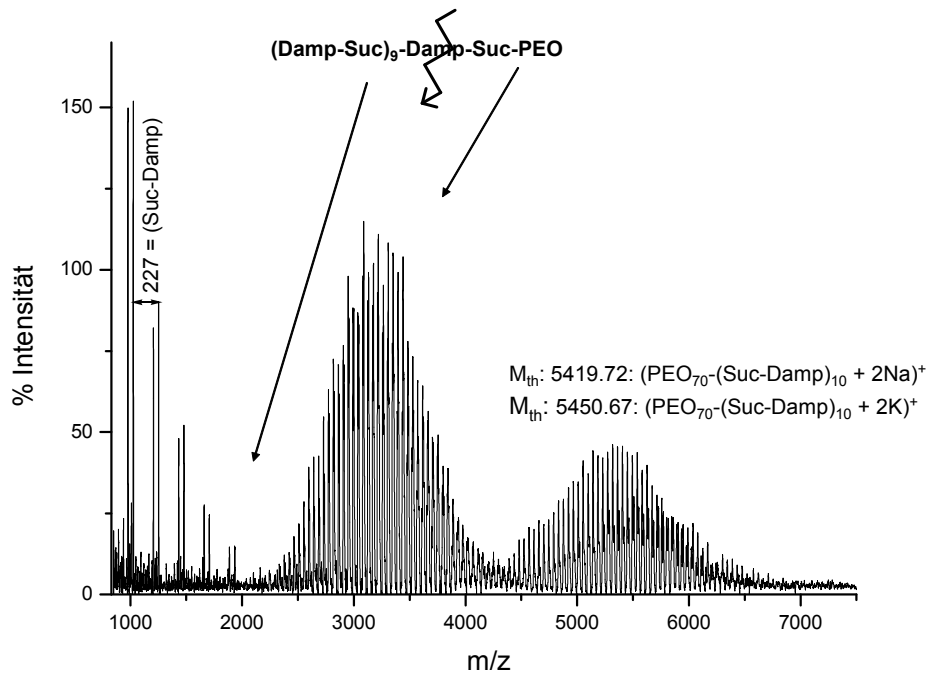


Abb. 5.1: MALDI-TOF-Spektrum von $\text{PEO}_{60}\text{-(Suc-Damp)}_{10}$ mit Zuordnung der Produktverteilung

Auch die Signale der Verteilung bei m/z 3200 des Spektrums zeigen eine Signaldifferenz von 44 Da. Diese Verteilung ist einem PEO-Block-Fragment zuzuordnen, das durch Fragmentierung zwischen dem PAA- und dem PEO-Block entsteht (Abb. 5.1). Die Verteilung unterhalb von m/z 2000 zeigt eine Differenz der Signale von 227 Da. Diese Differenz entspricht genau der Masse einer Wiederholungseinheit des PAA-Blocks. Die Verteilung stammt aus der Fragmentierungstreppe des PAA-Blocks, der zunächst vom PEO-Block abgetrennt wird und dann weiter in kleinere Fragmente zerfällt.

In der Literatur wurde bereits über die Fragmentierung verschiedener Polymere in der MALDI-TOF-MS berichtet, z.B. von Polyestern, Polyamiden und auch PAAs.^[95, 96] Dabei wurden bisher vor allem PAA-Dendrimere und ihre Fragmentierung während der Messung untersucht, da ihre definierte Ausgangsstruktur eine leichtere Zuordnung der Fragment-Ionen und so eine Aufklärung des Fragmentierungsmechanismus erlauben.

Im Folgenden soll nun zunächst gezeigt werden, dass die in der Massenspektrometrie beobachteten Fragmente nicht bereits während der Synthese oder Aufreinigung entstehen. Aufgrund der Komplexität wird der Fragmentierung des Blockcopolymeren ein eigenes Kapitel (5.2) dieser Arbeit gewidmet, in dem Mechanismen der Fragmentierung näher untersucht werden.

5.1.2 Vergleichende Ultrazentrifugation

Eine mögliche Erklärung für die Verteilung bei m/z 3200 im MALDI-TOF Massenspektrum ist die unvollständige Amin-Endfunktionalisierung des festphasengebundenen PEOs. In der PAA-Synthese käme es zu keiner Anbindung der PAA-Bausteine, und nach Abspaltung vom Harz wäre somit freies PEO im Produkt vorhanden. Zwar konnte dieses α - ω -Dihydroxy-PEO durch Zuordnung der Massensignale nicht bestätigt werden, dennoch wurde eine relative Messung der Sedimentationskoeffizienten von Blockcopolymer und freiem PEO-Block durchgeführt. Eine Absolutmessung der beiden Polymer-Proben ist nicht möglich, da ihre Sedimentationskoeffizienten kleiner als eins sind und die Messung somit stark durch Diffusion gestört wird. Bei der Differentialmethode wird nicht die absolute Sedimentation der Probe sondern die Differenz der Probe in einer Messzelle zu einer Referenz in einer zweiten Messzelle aufgezeichnet und ist somit nicht abhängig vom absoluten Sedimentationskoeffizienten.^[85]

In Abbildung 5.2 ist die Messung der relativen Sedimentationsgeschwindigkeit des PEO-PAA Blockcopolymers (Messzelle) zum PEO-Block (Referenzzelle) dargestellt.

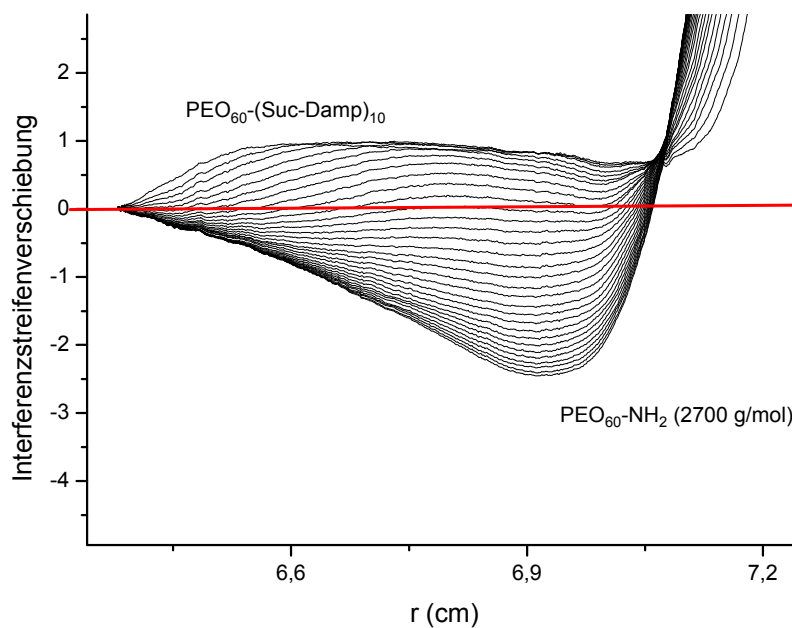


Abb. 5.2: Interferenzstreifenverschiebung der vergleichenden Ultrazentrifugation von $\text{PEO}_{60}\text{-(Suc-Damp)}_{10}$.

Zu Beginn der Messung ist das Signal, also die Differenz zwischen Messzelle und Referenzzelle, positiv. Das Blockcopolymer sedimentiert schneller als das PEO. Nachdem das Blockcopolymer vollständig sedimentiert ist, ist das Signal negativ. Es wird nur noch in der Referenzzelle Sedimentation gemessen, die vom Nullwert der Messzelle subtrahiert wird. Aus

dem Endwert der Interferenzstreifenverschiebung J kann die Konzentration des PEO in der Referenzzelle berechnet werden^[86, 87]:

$$\Delta n = \frac{J\lambda}{a} \quad : \text{Differenz des Brechungsindex}$$

$$a = \text{Durchmesser der Messzelle} = 12 \text{ mm}, \quad \lambda = 672 \text{ nm}, \quad \frac{dn}{dc}(\text{PEO}) = 0,134$$

Wenn in Messzelle und Referenzzelle eine Komponente mit dem gleichen Sedimentationskoeffizienten sedimentiert, ergibt sich in der Messung eine Differenz (Interferenzstreifenverschiebung) von Null. Freies PEO in der Messzelle würde also den Absolutwert der maximalen Interferenzverschiebung verkleinern. Die berechnete Konzentration müsste in diesem Fall kleiner sein als die ursprünglich eingesetzte Konzentration. Für die in Abbildung 5.2 gezeigte Messung wurde eine Konzentration von 1 mmol/L PEO eingesetzt. Aus der maximalen Interferenzstreifenverschiebung von $J = 2,393$ ergibt sich eine berechnete Konzentration von 1,1 mol/L mit einem Fehler von $\pm 0,1$ mmol/L. Da die beiden Konzentrationen im Rahmen der Fehlergrenze übereinstimmen, zeigt diese Messung kein freies PEO im Produkt.

5.1.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurde das Produkt nachgewiesen und kann nun mit Hilfe der NMR-Spektroskopie quantifiziert werden. Das ^1H -NMR-Spektrum der Blockcopolymeren mit tertiären Aminen im PAA-Segment in DMSO bei 100 °C zeigt die Resonanz des PEO-Blocks ($\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}$) bei einer Verschiebung von $\delta = 3.60$ ppm und das charakteristische Signal der $\underline{\text{C}}\text{H}_x-\text{N}_{\text{amin}}$ -Funktionen bei $\delta = 2.99$ ppm. Der Vergleich der Integralintensitäten liefert das Verhältnis des zahlengemittelten Polymerisationsgrads des PEO- zum PAA-Block. Die Struktur eines PEO-PAA Blockcopolymeren der Zusammensetzung $\text{PEO}_{60}-(\text{Suc-Damp})_{10}$ wird durch das Verhältnis von PEO zu PAA von 6/1 durch das ^1H -NMR-Spektrum bestätigt. Ebenso wurde die Zusammensetzung aller weiteren Blockcopolymeren mit Hilfe der spektroskopischen Daten untersucht (siehe Anhang). Das Verhältnis der Integralintensitäten der beiden Polymerblöcke ist sowohl Lösungsmittel- als auch temperaturabhängig. Ein solches Verhalten ist von z. B. amphiphilen Blockcopolymeren bekannt und deutet auf eine eingeschränkte Mobilität des PAA-Blocks im Gegensatz zu der des PEO-Blocks durch Aggregation in Lösung hin.^[88] Zum einen führt die veränderte chemische Umgebung der aggregierten PAA-Segmente zu einer Verbreiterung der Resonanzen. Zum anderen reduziert

die eingeschränkte Mobilität und damit Relaxation der Protonen die Intensität der Signale. Dieses Verhalten ist von Blockcopolymeren und Polypeptiden in Lösung bereits bekannt und kann zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens z. B. zur Bestimmung von kritischen Aggregations-Konzentrationen bzw. -temperaturen verwendet werden.

5.1.4 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Eine klassische Methode der Polymercharakterisierung ist die Größenausschlußchromatographie (GPC) zur Bestimmung von Molmassen.^[89] Die theoretischen Molmassen der PEO-PAA Blockcopolymeren liegen im Bereich von 5500 g/mol mit einem Gewichtsanteil des PEO-Blocks von durchschnittlich 50w%. Zur weiteren Untersuchung der chemischen Zusammensetzung wurde daher das Blockcopolymer PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀ in der GPC untersucht. Die Messung des Blockcopolymeren in reinem NMP zeigt ein bimodales Eluogramm (Abb. 5.3). Wie für die Massenspektrometrie diskutiert, könnte es durch unvollständige Endfunktionalisierung des PEO-Blocks am Harz zu einer Verunreinigung von freiem PEO im Produkt kommen. Vergleichsmessungen von freiem PEO und einer Mischung aus Blockcopolymer und freiem PEO zeigen jedoch, dass kein freies PEO im Produkt vorhanden ist (Daten nicht gezeigt).

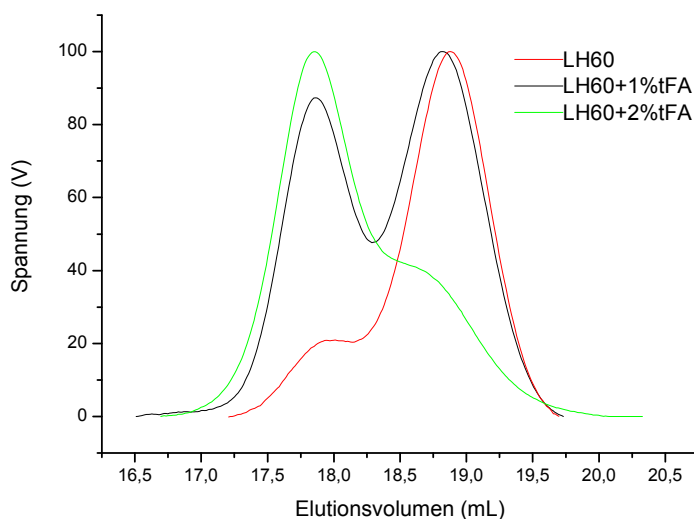


Abb 5.3: GPC-Eluogramm von PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀ in NMP, mit und ohne Zusatz von TFA

Um aus den Daten des GPC-Elugramms Molmassen zu berechnen, muss eine Kalibrierung des Systems durchgeführt werden. Hierfür stehen verschiedene Standards zur Verfügung, von denen für die Messungen der PEO-PAA Blockcopolymeren PEO-Standards geeignet sind. Eine Kalibrierung der Messung mit diesen PEO-Standards ist dennoch nicht absolut möglich, da

sich der PAA-Block in seinen Eigenschaften in Lösung (Dichte, hydrodynamischer Radius) und somit die Eigenschaften des Blockcopolymeren in der Chromatographie von reinem PEO unterscheiden. Der Vergleich liefert jedoch Aufschluss über die Verhältnisse der hydrodynamischen Volumina und damit der apparenten Molmassen der beiden Elutionsmaxima. Für PEO-PAA Blockcopolymeren mit unterschiedlichen Blocklängen entspräche das Elutionsmaximum bei größerem Elutionsvolumen in etwa der erwarteten Molmasse und das Maximum bei kleinerem Elutionsvolumen dem doppelten Wert (Abb. 5.4).

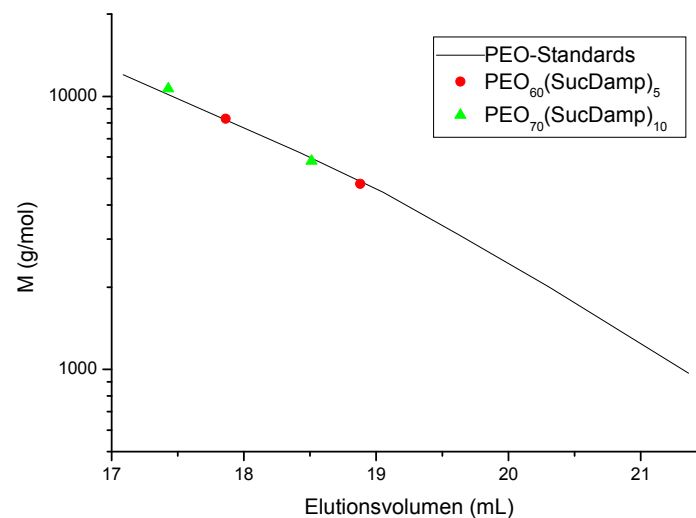


Abb 5.4: GPC-Eichkurve für PEO-Standards in NMP, apparente Molmassen von zwei PEO-PAA Blockcopolymeren

Eine Erklärung für die Bimodalität des Elugramms ist die Aggregation der Blockcopolymeren, auch während der chromatographischen Auftrennung. Das Elugramm zeigt in diesem Fall Unimere des Polymeren und Aggregate. Die GPC lässt jedoch keinen Rückschluss auf die Struktur der Aggregate oder die Zahl der aggregierenden Polymerketten zu.

Ein solches Verhalten in der GPC ist aus der Literatur für Polypeptide bekannt.^[90] PAAs sind so genannte Peptidomimetika. Aufgrund der Amid-Funktionalitäten im Polymerrückgrat zeigen sie eine starke Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die dem Verhalten von Peptiden in Lösung entspricht. Die Wechselwirkungen der Peptide bzw. PAAs untereinander bzw. mit der stationären Phase erschweren allgemein eine Charakterisierung mit klassischen Polymer-Analytik-Methoden wie GPC und ¹H-NMR. Aber auch die klassischen Peptid-Analytik-Methoden wie ESI-MS und HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) werden bei den PEO-PAAs erschwert. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Blockcopolymeren mit ESI-MS bedingt die Bildung von mehrfach geladenen Molekül-Ionen in Kombination mit der Molekulargewichtsverteilung des PEO-

Blockes eine Vielzahl an Signalen, die keine Aussage über das Produkt zulässt. Die Charakterisierung der Systeme mit Hilfe der HPLC wird wie bei der GPC durch das Aggregationsverhalten der Polymere und durch starke Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial erschwert.

Zur Charakterisierung des Aggregationsverhaltens in der GPC wurden mit Hilfe der statischen Lichtstreuung (SLS) die Blockcopolymere in NMP näher untersucht. In Analogie zu den GPC-Daten zeigt die Auswertung der Lichtstreudaten zwei Spezies. Neben den Unimeren gibt es größere Strukturen mit einem hydrodynamischen Radius von 266 ± 28 nm und einem R_g/R_h -Verhältnis von ca. 2. Dieses deutet auf Strukturen wie wurmartige Mizellen oder kurze zylinderförmige Aggregate hin.

Die Hofmeister-Serie für Peptide hat gezeigt, dass mit Hilfe von Zusätzen wie LiBr die zur Aggregation führenden Wechselwirkungen unterdrückt werden können.^[91] Der Zusatz von LiBr in NMP zeigt bei den PEO-PAA Blockcopolymeren jedoch keinen Effekt. Ein anderer Versuch die Aggregation zu unterbinden ist der Zusatz einer starken Säure. Vollständige Protonierung der Aminfunktionalitäten sollte die Hydrophilie des PAA-Blocks erhöhen und die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen verringern. Dieser Erwartung entsprechend verändert der Zusatz von TFA das GPC-Elugramm des Blockcopolymeren: Die Intensitäten der Elutionsmaxima verschieben sich zugunsten der kleineren Molmassen (Abb. 5.3) und zeigen die Zunahme an Unimeren in Lösung. Die Anlagerung von TFA-Anionen an das Polymer erklärt auch die unterschiedlichen UV/RI-Verhältnisse der beiden Verteilungen (Daten nicht gezeigt). Durch die Anlagerung von TFA-Anionen an die Unimere nimmt ihre UV-Absorption zu. Auch durch eine Optimierung der Messbedingungen wie Flussrate, Temperatur, TFA-Zusatz und Lösungsmittel war es aber nicht möglich alle Aggregate in Unimere zu überführen und eine unimodale Verteilung zu erhalten.

5.1.5 Aggregation in Lösung

Im Hinblick auf eine biomedizinische Anwendung der Polymere in physiologischen Medien, wurde das Aggregationsverhalten der Blockcopolymere in wässriger Lösung untersucht. Die Kleinwinkel-Röntgen-Streuung (SAXS, Small Ange X-Ray Scattering) an einer 4 w%-Lösung von PEO-PAA Blockcopolymeren mit tertiären Aminen in Wasser zeigt den charakteristischen q^{-1} Abfall der Streuintensität bei höheren Streuvektoren einer 1-dimensionalen Struktur mit einer großen Oberfläche wie z.B. wurmartigen Mizellen (Abb. 5.4).

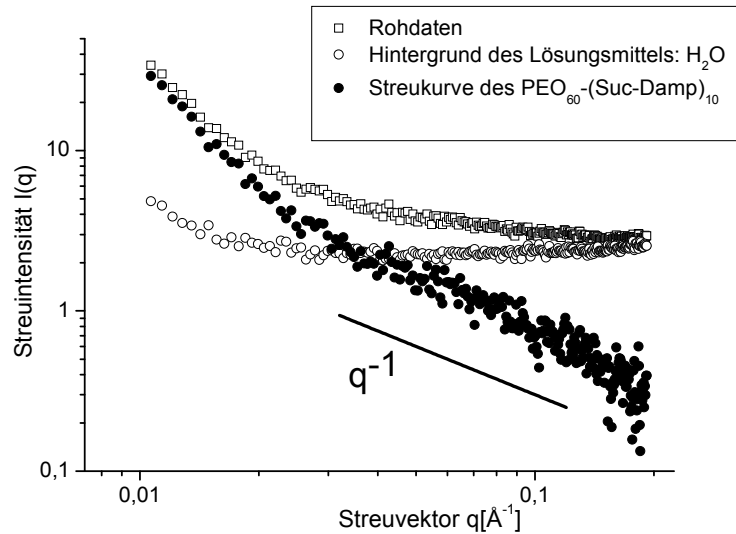


Abb. 5.4: Kleinwinkel-Röntgen-Streukurve einer 4w%igen Lösung von PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀ in Wasser

Beide Blöcke des Polymers sind hydrophil, die Ausbildung der Aggregate ist also nicht auf die unterschiedliche Löslichkeit der Blöcke zurückzuführen. Die Aggregation erfolgt durch die starke Tendenz des PAA-Blocks zur Bildung von H-Brückenbindungen, ein Verhalten das auch bei Biopolymeren wie Peptiden oder Zuckern beobachtet wird. Die ausgebildete Sekundär- und Tertiärstruktur wird durch die H-Brücken stabilisiert. Beim Einbau von sekundären oder primären Aminen im PAA-Block ist keine Aggregation in Wasser zu beobachten. Dieser Effekt ist auf die veränderte Hydrophilie des PAA-Blocks zurückzuführen. Die Polymere bilden nun bevorzugt intramolekulare H-Brückenbindungen und es kommt nicht zur Ausbildung einer höheren Struktur.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die chemische Struktur der PEO-PAA Blockcopolymer mit Hilfe der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen wurde. Es ist möglich einen sequenzdefinierten monodispersen PAA-Block ohne Nebenprodukte zu synthetisieren und kovalent an einen PEO-Block anzubinden. Die so dargestellten PEO-PAA Blockcopolymer zeigen Aggregation in wässrigen und organischen Lösungen, die durch Zusatz von starken Säuren wie TFA vermindert werden kann. In der massenspektrometrischen Untersuchung der Blockcopolymer wurde eine Fragmentierung des Systems während der Messung beobachtet und soll nun im Folgenden näher untersucht werden.

5.2 Fragmentierung der Blockcopolymeren in der MS

Die massenspektrometrische Untersuchung der PEO-PAA Blockcopolymeren zeigte im MALDI-TOF-Experiment ein Fragmentierungsmuster (Kapitel 5.1.1). Dieses Fragmentierungsmuster sowie der Mechanismus der Fragmentierung wurden nun mit Hilfe von MS/MS-Experimenten genauer untersucht. Bei einem solchen MS/MS-Experiment werden zuvor durch einen Selektor ausgewählte Ionen des Massenspektrums in einer Stoßzelle des Massenspektrometers durch Zusammenstöße mit Atomen oder Molekülen eines neutralen Gases zum Zerfall bzw. zur Fragmentierung gebracht und erzeugen so ein weiteres Massenspektrum, das sogenannte MS/MS (Abb. 5.5).^[92, 93]

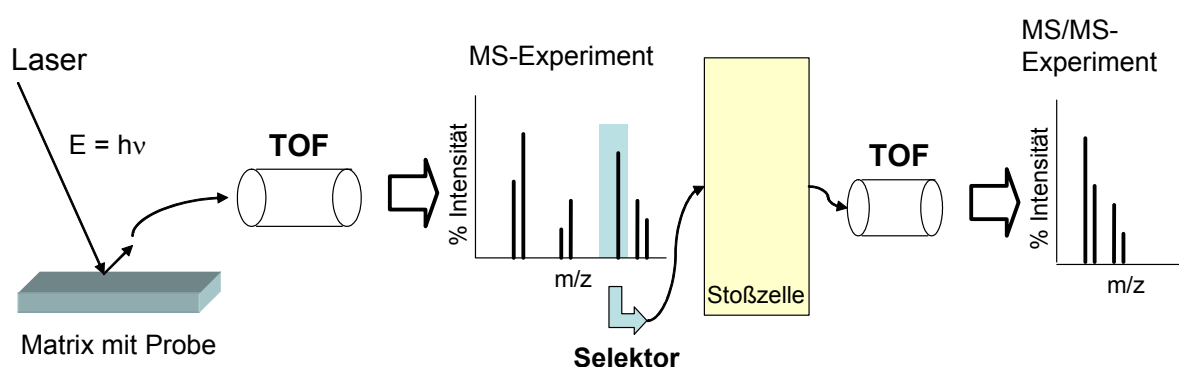


Abb. 5.5: Schematischer Aufbau eines MS/MS-Experiments

Abbildung 5.6 zeigt noch einmal das MALDI-TOF-Spektrum der Verbindung PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀. Die Verteilung mit einem Schwerpunkt bei m/z 5400 kann dem Molekül-Ion des Produkts und verschiedenen Begleit-Ionen zugeordnet werden. Alle weiteren Signale werden Fragment-Ionen zugeordnet, die im MALDI-TOF-Experiment entstehen. Sowohl die Ionisierung der Probe als auch die Überführung in die Gasphase sind ein Hochenergie-Prozess, bei denen es zu Fragmentierungen kommen kann. Bei der Ionisierung des Blockcopolymeren kommt es hierbei vermutlich zu einer so genannten „in source“ Fragmentierung innerhalb der ersten Wiederholungseinheit des PAA-Blocks.

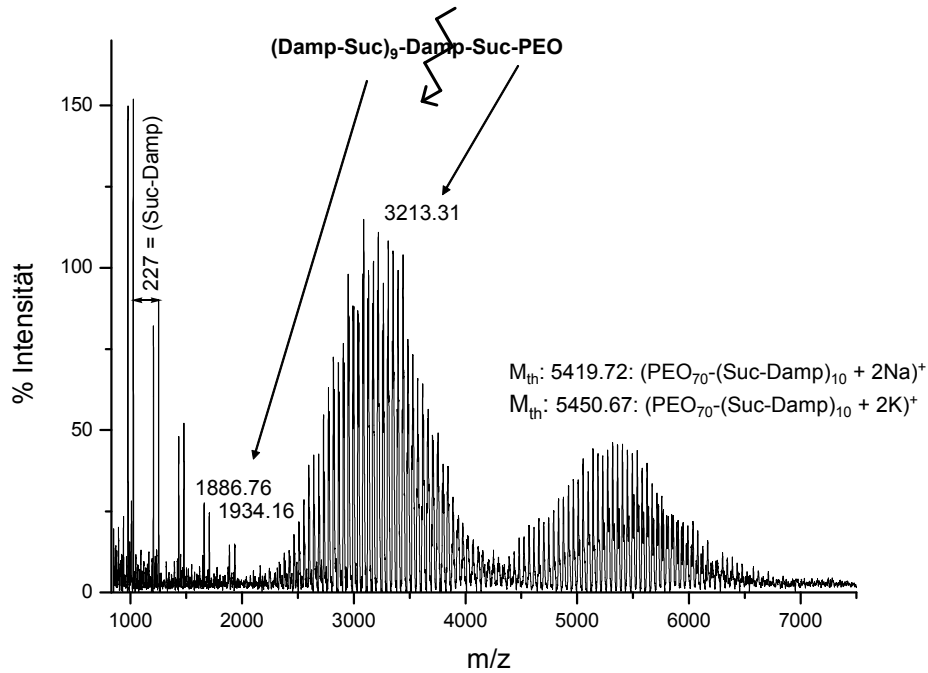


Abb. 5.6: MALDI-TOF-Massenspektrum der Verbindung $\text{PEO}_{60}\text{-(Suc-Damp)}_{10}$

Die Verteilung des Spektrums mit einem Schwerpunkt bei m/z 3213.31 kann dem Fragment mit PEO-Block der „in source“ Fragmentierung zugeordnet werden. Die Fragmentierung erfolgt vermutlich zwischen dem $C_{\alpha}(\text{O}=\text{C}-\text{NH}-C_{\alpha})$ - und dem $C_{\beta}(\text{C}_{\beta}-\text{CH}_2-\text{NHCH}_3)$ -Atom des ersten Diamin-Bausteins des PAA-Segments. Abbildung 5.7 zeigt den möglichen Mechanismus der Fragmentierung.

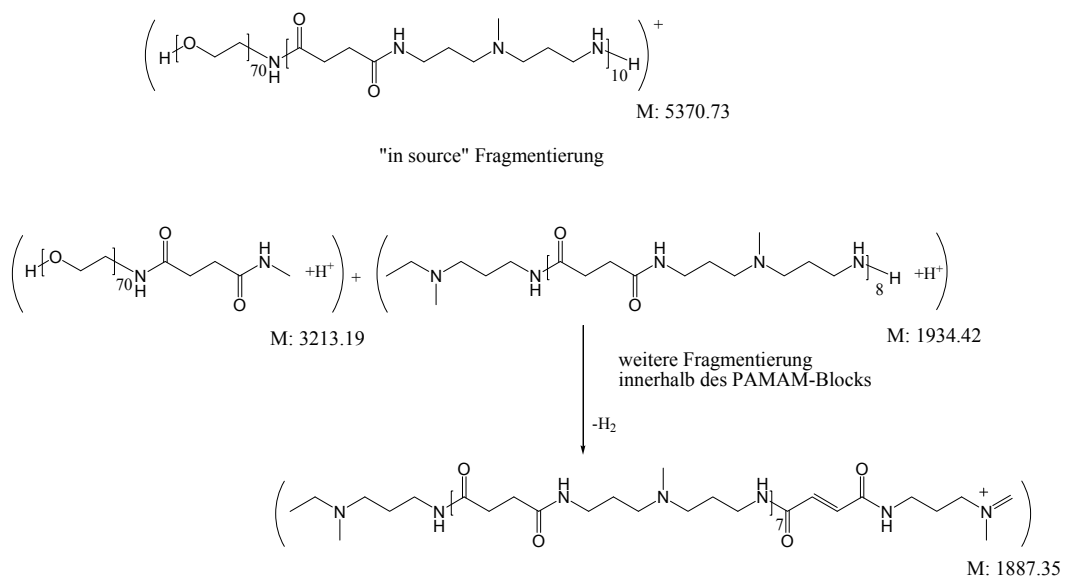


Abb. 5.7: Zuordnung der Signale des MALDI-TOF-Spektrums der Verbindung $\text{PEO}_{60}\text{-(Suc-Damp)}_{10}$

Das entstehende PAA-Fragment kann dem Signal bei m/z 1934.16 und den Signalen im Abstand einer PAA-Wiederholungseinheit mit 227 zugeordnet werden. Neben dem PAA-Fragment der „in source“ Fragmentierung gibt es eine zweite Fragmentierungsreihe des PAA-Segments. Diese Reihe stammt aus der weiteren Fragmentierung des PAA-Blocks nach der Trennung vom PEO-Block und wird im Spektrum dem Signal bei m/z 1886.76 und den Signalen im Abstand einer PAA-Wiederholungseinheit zugeordnet. Dabei wird in hier vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismus neben einer $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2)$ -Gruppe auch elementarer Wasserstoff in der Bernsteinsäure-Einheit abgespalten. Diese Eliminierung ist aus der Gaschromatographie bekannt und überführt z. B. Bernsteinsäureanhydrid in Maleinsäureanhydrid.^[94] Es ist wichtig an dieser Stelle festzuhalten, dass die Verteilung der PAA-Fragmente nicht die Uneinheitlichkeit des PAA-Segments reflektiert. Eine Unheitlichkeit aufgrund von Auslassungssequenzen müsste zu mehreren Produktverteilungen des PEO-PAA Blockcopolymers mit einer Differenz von 227 Da führen. Es wird aber ausschließlich das Signal des Produkts mit einem monodispersen PAA-Block detektiert. Die Fragmentierungsreihe ist auf eine statistische Fragmentierung an der immer gleichen Position im Baustein der 10 Wiederholungseinheiten zurückzuführen.

Mit Hilfe von CID-Messungen (Collision Induced Dissociation, Kollisionsinduzierte Dissoziation) über MALDI-TOF-TOF-MS können nun Hinweise auf die Zuordnung der Fragment-Ionen und den Fragmentierungsmechanismus gewonnen werden. Die erzwungene Fragmentierung eines Produktsignals bei m/z 5586.13 führt zu einer Verteilung mit einem Schwerpunkt bei m/z 2261.82 und Signalabständen von 44 Da (Abb.5.8). In Bereichen von m/z größer als 5000 nimmt die Auflösung der Precursor-Ionen Selektion stark ab. Daher wird im MS/MS-Spektrum sowohl eine Verteilung des selektierten Precursor-Ions als auch der erzeugten Fragment-Ionen detektiert. Die Verteilung der Fragment-Ionen ist also nicht auf eine Fragmentierung innerhalb des PEO-Blocks zurückzuführen, sondern auf die Selektion eines breiteren m/z -Bereichs anstelle der Selektion nur eines Signals.

Die durch die erzwungene Fragmentierung erzeugte Verteilung kann einem Fragment mit PEO-Block zugeordnet werden, dass durch eine Fragmentierung zwischen dem PEO- und dem PAA-Block entsteht. Zwar nimmt die in Abb. 5.8 getroffene Zuordnung der Fragmentverteilung eine andere Bruchstelle als für die Fragmentierung im MALDI-TOF an, aber dies kann auf die Unterschiede im Prozess der Ionisierung und der erzwungenen Fragmentierung zurückzuführen sein. Es ist also möglich das Blockcopolymer in der MS/MS

zwischen den Blöcken zu fragmentieren und daher wahrscheinlich, dass es auch in der MALDI-TOF-MS zu einer Fragmentierung an dieser Stelle kommt.

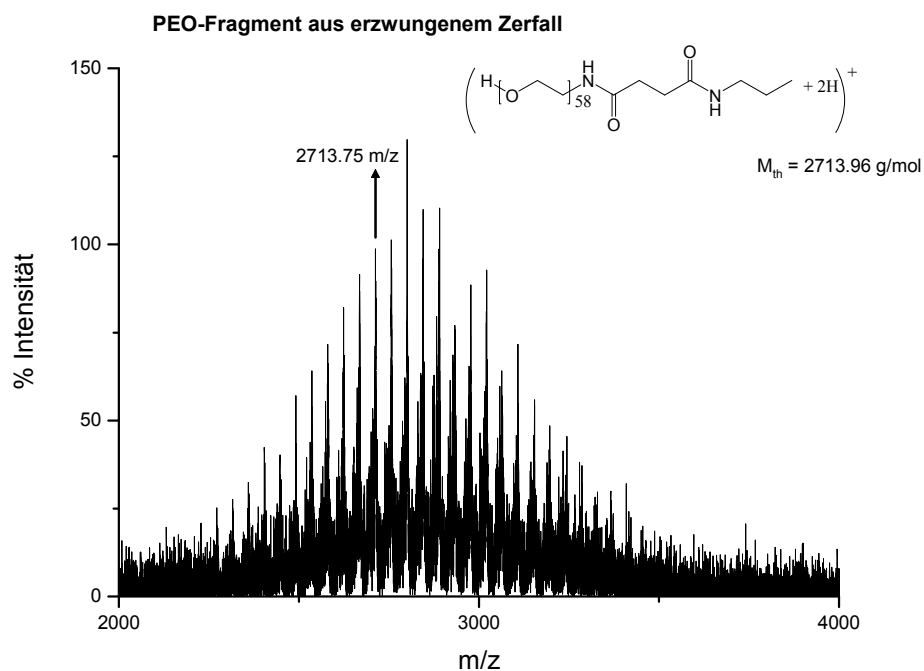


Abb. 5.8: MALDI-TOF-TOF Massenspektrum der Verbindung $\text{PEO}_{60}\text{-(Suc-Damp)}_{10}$ bei erzwungener Fragmentierung des Signals bei m/z 5586.

Durch die Fragmentierung zwischen dem PEO- und dem PAA-Block sollten auch Fragmente des PAA-Segments erzeugt werden. Es werden jedoch keine Signale im Bereich der PAA-Fragmente detektiert, da diese bei der Kollision als nicht-geladene Spezies entstehen und somit nicht mehr aufgezeichnet werden.

Die erzwungene Fragmentierung der PEO-Fragmente des MALDI-TOF-MS führt erwartungsgemäß zu keinen weiteren Fragmentensignalen, da es nicht zu einer Fragmentierung innerhalb des PEO-Blocks kommt und keine weiteren Fragmente abgespalten werden können.

Im MALDI-TOF-MS wurde bereits eine Fragmentierungskaskade des PAA-Segments durch Fragmentierung an zwei Positionen im Diamin-Baustein beobachtet. Der Versuch der erneuten Fragmentierung eines PAA-Fragment-Ions mit Hilfe der MS/MS kann weitere Hinweise liefern auf die Stabilität des PAA-Segments in der MS und den Mechanismus der Fragmentierung selbst. Dazu wurde ein PAA-Fragment-Signal mit der Masse m/z 798 durch den Ionenselektor isoliert und weiter fragmentiert. Das erhaltene Spektrum zeigt erneut eine Reihe von Fragment-Ionen (Abb. 5.9).

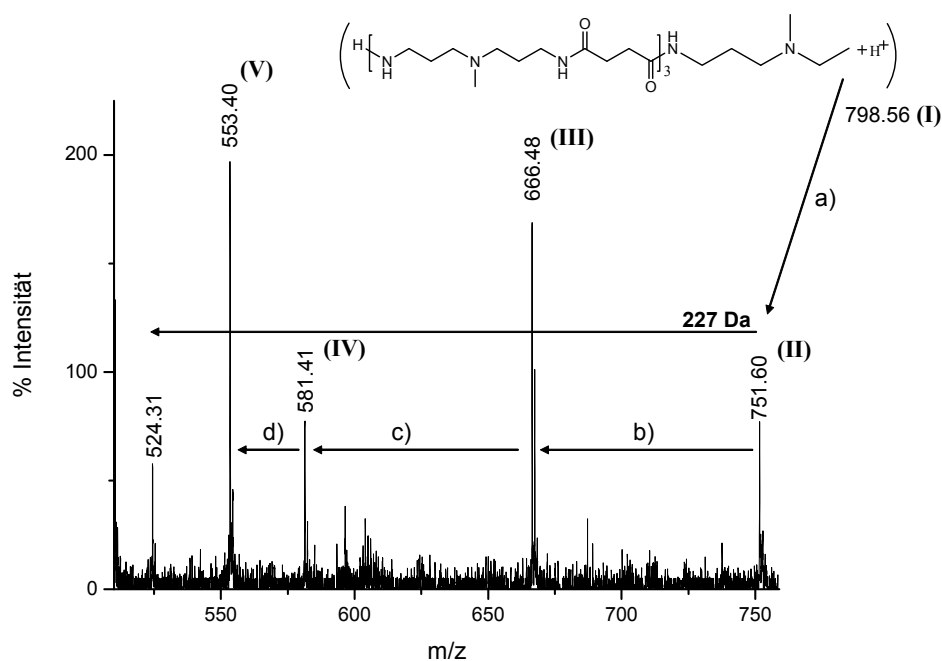


Abb. 5.9: MALDI-TOF-TOF Massenspektrum der Verbindung PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀ bei erzwungener Fragmentierung des Signals bei m/z 798.

Aus dem Signal m/z 798 des MALDI-TOF-Spektrums lässt sich durch die erzwungene Fragmentierung ein Signal bei m/z 751 erzeugen, das bereits im MALDI-TOF einer zweiten Reihe Fragment-Ionen zugeordnet wurde. Durch die Abspaltung einer (CH₂-CH₂-NH₂)-Gruppe und elementarem Wasserstoffs vom Fragment der Masse m/z 798 kann das Fragment bei m/z 751 gebildet werden (Abb.5.10). Die Entstehung des gleichen Fragment-Ions im MS/MS- wie im MALDI-TOF-Experiment ist ein wichtiger Beleg, dass es bereits im MALDI-TOF-Experiment eine Fragmentierung des PAA-Segments stattfindet.

In Abbildung 5.10 sind die weiteren PAA-Fragmente der MS/MS dargestellt. Es werden sowohl ionische als auch radikalische Mechanismen der Fragmentierung angenommen. Auch in der Literatur finden sich sowohl Beispiele für ionisch- als auch für radikalisch-verlaufende Fragmentierungsmechanismen von PAA-Dendrimeren. Dabei werden für eine ionische Fragmentierung Mechanismen vorgeschlagen, die z. B. einer Retro-Michael-Reaktion oder einer Hoffmann-Eliminierung entsprechen.^[95] Das Produkt einer Hoffmann-Eliminierung liefert eine Fragmentierung in α-Position zur tertiären Amingruppe, wie sie hier für die Entstehung des Fragments bei m/z 751 angenommen wurde. Die radikalische Fragmentierung von PAA-Dendrimeren führt hingegen meist zu einer Spaltung der Amidbindung selbst oder in α-Position zur Amidbindung.^[96] Eine solche Fragmentierung wird für die Bildung des Fragments bei m/z 666 angenommen (Abb. 5.10).

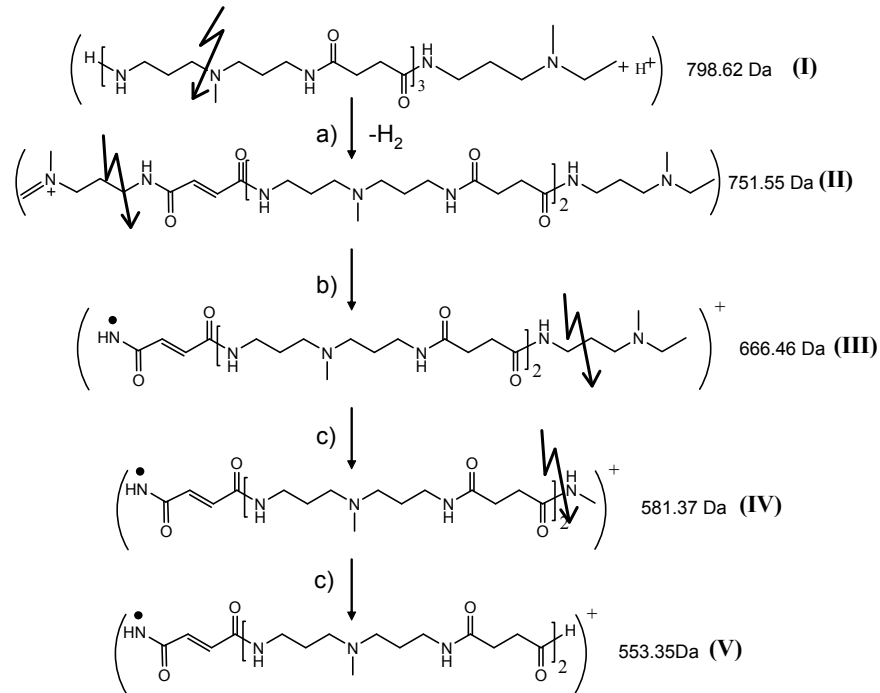


Abb. 5.10: Zuordnung der Signale des MALDI-TOF-TOF Massenspektrum der Verbindung PEO_{60} -(Suc-Damp) $_{10}$ bei erzwungener Fragmentierung des Signals bei m/z 798.

Die Fragmentierungskaskade des PAA-Segments wird nach dem Signal bei m/z 751 fortgesetzt durch die Abspaltung einer $(\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2)$ -Gruppe, die zur Bildung des Fragment-Ions der Masse m/z 666 führt. Von diesem Fragment wird nun eine $(\text{CH-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_3)$ -Gruppe abgespalten und bildet das Fragment-Ion der Masse m/z 581. Die Abspaltung einer (N-CH_3) -Gruppe bildet das Fragment-Ion bei m/z 553.

Die hier gezeigten Strukturen der Fragment-Ionen beruhen auf der Zuordnung der Signale der MALDI-TOF- und MS/MS-Experimente und sind als mögliche Produkte der Fragmentierung zu betrachten. Ihre Struktur sowie die Fragmentierungsmechanismen konnten bisher nicht durch weitere Experimente bestätigt werden.

Kapitel 6

Herstellung und Charakterisierung der Polyplexe

6.1 Herstellung der Polyplexe

Für die erfolgreiche Verwendung von nicht-viralen Vektoren zum intrazellulären Transport von Genmaterial ist nicht nur die Wahl des Vektors und des Genmaterials entscheidend, sondern auch die Art und Weise der Herstellung der Polyplexe aus diesen beiden Komponenten. Ein wichtiger Faktor für erfolgreiche Transfektion ist das Ladungsverhältnis der negativ-geladenen Phosphat-Gruppen im Rückgrat des DNS-Stranges zur Anzahl der positiv-geladenen Amin-Funktionen des Polymers, das so genannte N/P-Verhältnis.^[97] Studien mit verschiedenen Polykationen haben gezeigt, dass ein Kationen-Überschuss für die Bildung stabiler Polyplexe in Lösung notwendig ist und die Transfereffizienz erheblich steigert. Polyplexe aus linearem PEI zeigen z.B. höchste Transfereffizienz bei einem N/P-Verhältnis von 6/1.^[26] Die positive Netto-Ladung hat den zusätzlichen Vorteil, das sie zu einer Adsorption an der negativ geladenen Zellmembran beiträgt und so durch Aufkonzentration zur verstärkten Internalisierung der Polyplexe.^[98] Freie Amin-Funktionen dienen darüber hinaus als Protonen-Akzeptoren und sind somit wichtiger Bestandteil der Freisetzung des Genmaterials innerhalb der Zelle durch den Protonen-Schwamm Effekt (Kapitel 2.1.3.4).^[26,27,28]

Im Hinblick auf die Komplexität der Polyplex-Bildung und im Sinne einer zukünftigen pharmazeutischen Anwendung ist es außerdem wichtig, die Komplexbildung im höchsten Maße reproduzierbar durchzuführen. Eine Methode, die bereits zu Herstellung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten verwendet wird, ist die Mikrofluidik.^[99] Durch ein Y-Stück mit einem Durchmesser am breitesten Punkt von 400 µm werden die wässrigen Lösungen des Genmaterials und des Polymers im gewünschten Verhältnis gemischt (Abb. 6.1a). Da das Kanaldesign einen nicht turbulenten Fluss ermöglicht, findet die Mischung im Kanal durch Diffusion an der erzeugten Phasengrenze statt (Abb. 6.1b).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Sterilität der Proben. Für Versuche *in vitro* und *in vivo* ist es unerlässlich die Polyplex-Proben steril zu präparieren. Eine einfache aber effiziente Methode ist das Steril-Filtrieren. Hierzu wurden alle verwendeten Lösungen durch Nylon-Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Bei dieser Porengröße bleiben alle Mikroben und auch Staub im Filter hängen. Durch Messungen der UV-Absorption der filtrierten Proben wurde überprüft, dass weder Plasmid noch Polymer am Filter-Material adsorbieren und somit

die Konzentration bei der Filtration verfälscht wurde. Lediglich der Polyplex selbst darf nicht mehr filtriert werden, da er durch die Scherkräfte deformiert werden könnte und somit die Reproduzierbarkeit gefährdet wäre.

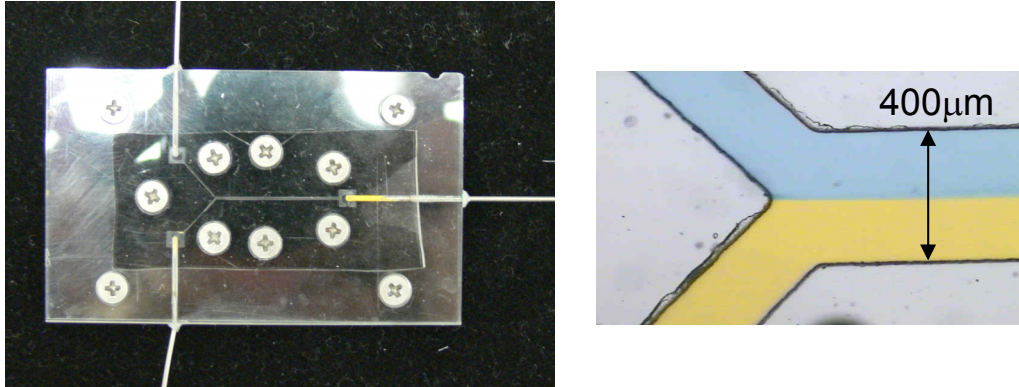


Abb. 6.1: **a)** links: Aufbau des verwendeten Y-Stück-Mikrofluidizers mit zwei Zuflüssen (oben und unten) für Plasmid- und Polymerlösung sowie dem Abfluss (rechts) für die Polyplexlösung. **b)** rechts: Nahaufnahme des Y-Stücks bei Verwendung zweier unterschiedlich eingefärbter Lösungen. Die Konstruktion des Y-Stücks ermöglicht eine nicht-turbulente Strömung der beiden Lösungen und so eine Mischung durch Diffusion an der erzeugten Phasengrenze.

6.2 Struktur der Polyplexe

6.2.1 Strukturbildung der Polyplexe

Der Einfluss der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen PAAs auf die Größe und Struktur der gebildeten Polyplexe wurde mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (AFM) und der Statischen Lichtstreuung (LS) untersucht. Als Trägermaterial für die AFM-Experimente wurde Mica, eine negativ geladene Oberfläche, gewählt, auf der die positiv geladenen Polyplexe adsorbieren können. Die Polyplexe wurden mit Hilfe des Mikrofluidizers und einer Plasmidkonzentration von 0.05 mg/mL in verschiedenen N/P-Verhältnissen dargestellt. Diese Lösungen wurden auf Mica-modifizierten Probenträgern aufgetragen und nach etwa 3 bis 5 Minuten Adsorptionszeit wurde die überschüssige Lösung durch Spincoating entfernt.

Reines Plasmid lässt sich mit dieser Methode nicht abbilden. Die elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ geladenen Oberfläche und dem negativ geladenen Plasmid verhindert die Adsorption auf dem Träger. Die Abbildung der Polyplexe mit dieser Methode deutet also bereits auf die kationische Überschussladung der Komplexe hin, die zu einer Adsorption auf dem Trägermaterial führt.

Das Prinzip der Polykationen als nicht-virale Vektoren beruht vor allem auf einer Komprimierung des Genmaterials.^[100, 101] Reine Doppelstrang-DNS besitzt eine gestreckte und sehr steife Konformation mit einer Persistenzlänge von 80 nm.^[102] Diese Konformation beruht auf der elektrostatischen Abstoßung der Phosphatgruppen des Rückgrats. Da durch die Basenpaarung bereits eine Positionierung der Phosphatgruppen vorgegeben und ihre Beweglichkeit stark eingeschränkt ist, kommt es durch die Abstoßung zu einer Streckung und Versteifung entlang der DNS-Kette (Abb. 6.2). Kommt es zum teilweisen Ladungsausgleich z. B. durch die Anlagerung eines Polykations, erhält der DNS-Strang mehr Flexibilität und bildet eine komprimierte Struktur.^[100, 101] In der Natur findet dieser Prozess mit Hilfe von globulären Proteinen mit einer kationischen Oberflächenladung, den Histonen, statt.^[56] Sie überführen die gestreckten DNS-Stränge in kompaktere Strukturen und ermöglichen so die Lagerung des sterisch anspruchsvollen Genmaterials im räumlich begrenzten Zellkern.

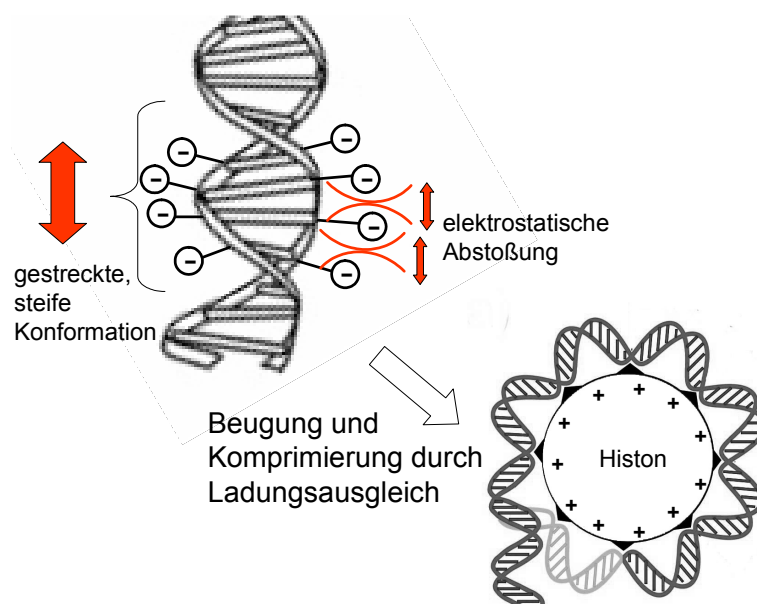


Abb. 6.2: Modell für die Struktur von DNS im nativen Zustand und die Komprimierung durch Histone.

Die treibende Kraft der Komprimierung von DNS ist die Entropie des Prozesses. Die komprimierte Form besitzt mehr Freiheitsgrade und bei der Komplexierung werden Gegenionen und Wasser freigesetzt, so dass sich die Entropie des Systems erhöht.^[103, 104] Die Struktur der gebildeten DNS-Polykationen-Komplexe lässt dabei Rückschlüsse auf die Effektivität des lokalen Ladungsausgleichs zu. Bei einem sehr effektiven Ladungsausgleich bildet die DNS Ringstrukturen, die so genannten „toroids“. Bei nur geringem Ladungsausgleich liegt die DNS immer noch in großen Bereichen gestreckt und nicht komprimiert vor. In den Bereichen zwischen diesen Extremen bleibt der Stäbchencharakter

erhalten, und es bilden sich so genannte „rods“. Diesen Prozess der Komprimierung von DNS durch Ladungsausgleich bezeichnet die Literatur häufig als DNS-Kondensation.^[105, 106] Die Effektivität des Ladungsausgleichs hängt dabei nicht nur von der Stärke der kationischen Gruppen ab, sondern auch von der Struktur des Polykations. Der Effekt der Kationenstärke und der Struktur des Polykations auf den gebildeten Polyplex wird im Folgenden anhand von PEI- und PAA-Polyplexen diskutiert.

Die hier diskutierten AFM-Aufnahmen zeigen Polyplexe unterschiedlicher N/P-Verhältnisse. Im Bereich von N/P-Verhältnissen von 10/1 bis 25/1 sind die gebildeten Strukturen der unterschiedlichen Polymersysteme reproduzierbar und unabhängig vom eingesetzten N/P-Verhältnis.

6.2.2 Polyplexe mit PEI

In Abbildung 6.3 ist das AFM-Bild eines PEI-Polyplexes dargestellt. Das verzweigte PEI besitzt eine Molmasse von $M_n = 50.000$ g/mol und wurde in einem N/P-Verhältnis von 10/1 eingesetzt.

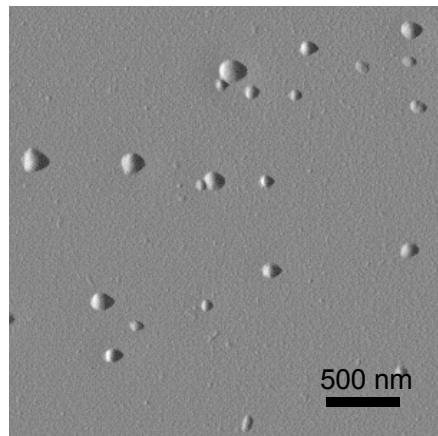


Abb. 6.3: AFM-Aufnahme eines PEI-Polyplex (N/P: 10/1) hergestellt mit Hilfe des Mikrofluidizers in TRIS-Puffer (10 mM, pH 8.0) abgebildet auf Mica, Höhendarstellung.

Die Mikroskop-Aufnahmen zeigen globuläre polydisperse Strukturen mit einem Durchmesser von 100 bis 300 nm, wie sie für PEI-Polyplexe aus der Literatur bereits bekannt sind.^[26, 107]

Die Daten der Lichtstreuung zeigen ähnliche Ergebnisse für die Struktur der Polyplexe in Lösung. Es werden zwei Verteilungen von globulären Strukturen mit einem mittleren hydrodynamischen Radius von 60 und 400 nm detektiert. Die Polyplexe sind nur schwach durch elektrostatische Abstoßung stabilisiert. Sie besitzen in wässriger Lösung ein Zetapotential von +19 mV. Erst Zetapotentiale von +35 mV würden eine rein elektrostatische Stabilisierung in Lösung gewährleisten.^[108] Zusätzlich zur elektrostatischen Stabilisierung

sind die Polyplexe jedoch durch die sterische Abstoßung der Polymerketten in Lösung stabilisiert.

Für die gebildeten Polyplex-Strukturen ist im Sinne des Modells der DNS-Kondensation (Abb. 6.2) vor allem die Struktur des PEIs entscheidend. Das verzweigte PEI liegt in Lösung als globuläres Polymerknäuel vor, an dessen Oberfläche freie kationische Ladungen vorliegen. Diese kationischen Funktionalitäten stehen zur Komplexierung des Plasmids zur Verfügung, so dass es zu einer Kondensation des DNS-Strangs auf dem Polymerknäuel kommen kann (Abb. 6.4). Die Knäuel-Konformation des Polymers ist durch die elektrostatische Abstoßung der kationischen Aminfunktionen, durch die sterische Abstoßung der Polymerketten und den Verzweigungsgrad bestimmt. Der DNS-Strang kann sich durch die gewonnene Kettenflexibilität dem Polymerknäuel strukturell anpassen und es bilden sich globuläre polydisperse DNS-Polymer-Komplexe.

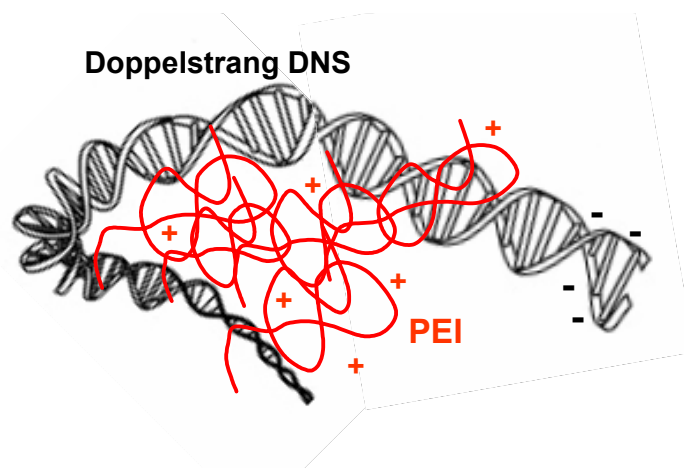


Abb. 6.4: Modell zur Komplexierung von DNS mit PEI

Dabei kommt es jedoch nicht zu einem vollständigen Ladungsausgleich. Zum einen verbleiben innerhalb des PEI Polymerknäuels Ladungen, die keinen Kontakt mit der DNS haben und eine kationische Gesamtladung des Polyplex erzeugen. Zum anderen ist der Prozess der Komplexierung nicht dynamisch, und es kann aus statistischen Gründen kein Ladungsausgleich jeder Phosphatgruppe mit einer Aminogruppe stattfinden. Die Einschränkung der Dynamik beruht vor allem auf der statistischen Struktur des polyvalenten verzweigten Kations und der harten Komprimierung des polyvalenten Anions. Zu Beginn der Komplexbildung sind noch alle Bindungspositionen unbesetzt, und es kommt zu einem ersten Bindungsereignis. Alle folgenden Bindungsereignisse sind durch die Fixierung des DNS-Strangs an einem Polymerknäuel bereits eingeschränkt. Darüber hinaus nimmt die Bindungsaffinität eines DNS-Strangs mit fortschreitendem Ladungsausgleich ab. Wenn, wie

bei der Herstellung von Polyplexen üblich, ein Überschuss an Polymer eingesetzt wird, kann es außerdem zur Vernetzung der DNS-Stränge kommen: Ein Polymerknäuel komplexiert an verschiedenen Positionen mehrere Plasmide und es bilden sich größere polydisperse Aggregate, wie sie auf der AFM-Aufnahme zu sehen sind (Abb. 6.2).

Aus den bisher gewonnenen Kenntnissen der Zellmechanismen und Versuchen des nicht-viralen Gentransports mit Polykationen, lässt sich eine Abhängigkeit der Transfektionseffizienz sowohl von der Ladung als auch der Größe des Polyplexes ableiten. Nur Komplexe im Größenbereich von 60 bis 800 nm ermöglichen eine spezifische Aufnahme durch die Zelle z. B. über Endocytose.^[109, 110] Kleinere und größere Aggregate werden entweder nicht oder unspezifisch aufgenommen und extra- oder intrazellulär zersetzt ohne das Genmaterial vorher wieder freigesetzt zu haben. Eine positive Ladung trägt zur Stabilisierung der Polyplexe in Lösung bei und ist maßgeblich verantwortlich für die effektive Freisetzung des Genmaterials nach dem erfolgreichen Transport in die Zelle (Protonen-Schwamm-Effekt, Kapitel 2.1.3.4).^[26, 27, 28] Es ist also von großem Interesse für die Entwicklung effektiverer nicht-viraler Vektoren den Prozess der DNS-Kondensation besser steuern und je nach Bedarf variieren zu können.

6.2.3 Polyplexe mit PEO-PAA

In Abbildung 6.5 ist das AFM-Bild eines Polyplex aus einem PEO-PAA mit ausschließlich tertiären Aminen dargestellt. Im Gegensatz zum PEI-Polyplex sind hier die einzelnen Plasmide als offene Ringstrukturen zu erkennen. Die Strukturen sind zum Teil ineinander verdreht, liegen aber meist vereinzelt vor.

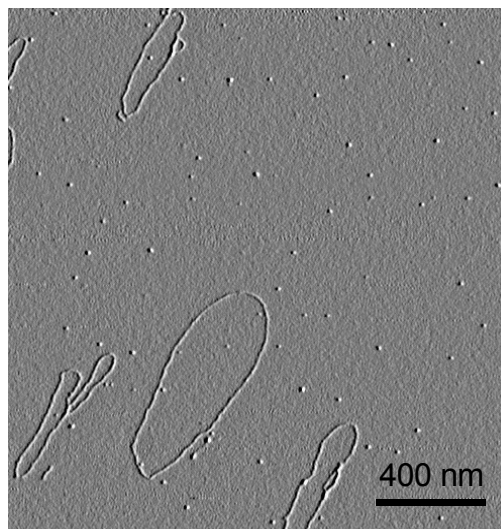


Abb. 6.5: AFM-Aufnahme eines Polyplex mit PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀ (N/P: 10/1) hergestellt mit Hilfe des Mikrofluidizers in TRIS-Puffer (10mM, pH 8.0) abgebildet auf Mica.

Die Lichtstreuung dieser Probe zeigt zwei Verteilungen mit hydrodynamischen Radien von 56 nm und 800 nm, deren R_g/R_h -Verhältnis von ungefähr eins auf kugelförmige oder verzweigte Aggregate in Lösung hindeutet. Die offenen Ringstrukturen auf dem AFM-Bild entstehen durch die Absorption auf dem Trägermaterial und der anschließenden Trocknung der Probe durch Spincoating. In Lösung liegen die Polyplexe vermutlich globulär vor. Das Zeta-Potential der Polyplexe in Lösung liegt bei Null. Dieser Effekt ist auf die Einführung des PEO-Blocks im Polymer zurückzuführen, da es zu einer Abschirmung der Oberflächenladung durch den PEO-Block kommt. Diese Eigenschaft des PEO ist bereits aus zahlreichen Beispielen der Literatur bekannt und wird z.B. bei der Modifizierung von Proteinen mit PEO zu deren Stabilisierung und zum Schutz gegen unspezifische Wechselwirkungen eingesetzt. Die Strukturbildung der Polyplexe mit den PEO-PAA Blockcopolymeren wird anhand des Modells in Abbildung 6.6 diskutiert.

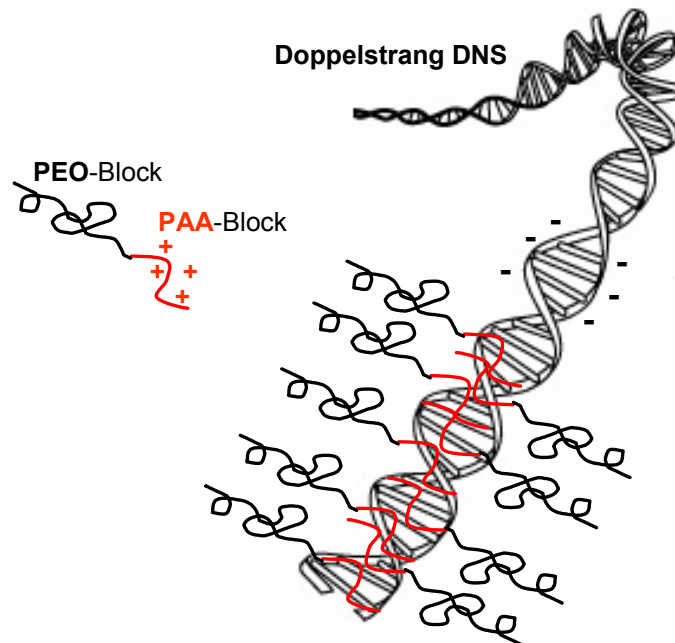


Abb. 6.6: Modell zur Komplexbildung von DNS mit PEO-PAA-Blockcopolymeren.

Im Gegensatz zum polyvalenten verzweigten PEI können sich die kurzen linearen PAA-Segmente bei der Komplexbildung besser der Struktur der DNS anpassen und bilden dabei eine Art Hülle um den DNS-Strang. So kann es zu einem effektiveren Ladungsausgleich kommen. Hier ist der Prozess der Bindung dynamischer als beim PEI und bietet so die Möglichkeit auch bei späteren Bindungsereignissen noch einen effektiven Ladungsausgleich zu erzielen, da die PAA-Segmente sich flexibler den noch unkomplexierten DNS-Segmenten anpassen können. Darüber hinaus kommt es durch die Einführung des PEO-Blocks zu einer sterischen Stabilisierung des Polyplexes. Durch diese sofortige Stabilisierung des Polyplexes

wird der Prozess der Komplexbildung noch flexibler, und es kommt kaum zur Vernetzung der Komponenten, wie sie bei der irreversiblen Komplexbildung des PEIs zu beobachten war. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Modifizierung von verzweigtem PEI mit PEO zwar eine Stabilisierung der Polyplexe in Lösung zur Folge hat, aber die Struktur des Polyplexes nicht verändert. Die hier beobachteten Strukturen der PEO-PAA-Polyplexe sind also auf das Zusammenspiel der flexiblen PAA-Segmente mit dem stabilisierenden PEO-Block zurückzuführen, die die Bildung eines definierten, stabilisierten Komplexes ermöglichen.

Um das Modell der Polyplexbildung mit PEO-PAA Blockcopolymeren näher zu untersuchen, wurde eine Polyplex-Probe im AFM mit unterschiedlicher Dämpfung der Messspitze gemessen. Bei einer höheren Amplitude treten härtere Bereiche der abgebildeten Probe deutlicher hervor. Bei kleinerer Amplitude werden auch weichere Bereiche abgebildet. Diese Methode wird z. B. zur Darstellung von Blockcopolymer-Aggregaten verwendet, deren Blöcke unterschiedliche Viskoelastizitäten besitzen wie ein Peptid-PEO-Blockcopolymer, dessen Peptid-Block eine α -Helix oder ein β -Faltblatt ausbildet.

In Abbildung 6.7 ist eine weitere AFM-Aufnahme eines Polyplexes mit ausschließlich tertiären Aminen abgebildet, die mit einer geringen Dämpfung gemessen wurde. Zwei Segmente eines Plasmid-Polymer-Komplexes (siehe Modell Abb. 6.6) kondensieren dabei von einer offenen Ringstruktur zu einer Stäbchenstruktur. Das Querschnittsprofil des einfachen DNS-Polymer-Segments zeigt eine Breite von etwa 22 nm und eine Höhe von 1 nm. Der theoretische Wert für den mittleren Durchmesser eines DNS-Doppelstrangs beträgt 2,37 nm. Die reduzierte gemessene Höhe der DNS im AFM ist vermutlich auf die Messmethode zurückzuführen. In der Literatur werden für die Höhe der DNS in Polyplexen durchschnittlich Werte zwischen 0,5 – 1,4 nm gemessen. Dies wird häufig auf eine elastische Deformation der Doppelhelix durch Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe sowie auf eine Komprimierung durch anziehende Wechselwirkung zwischen Träger und Probe zurückgeführt.^[111] Neuere Arbeiten zeigten außerdem, dass die Hochenergie-Oberfläche von Mica häufig mit einer dünnen Salzsicht belegt wird. Dies kann bei der Verwendung von Puffern zur Beobachtung von Objekten mit scheinbar reduzierten Höhen führen.^[112] Diese Vermutung wird durch die relativ hohe Rauigkeit des Hintergrunds bestätigt (vergl. Abb. 6.7 Höhenprofile).

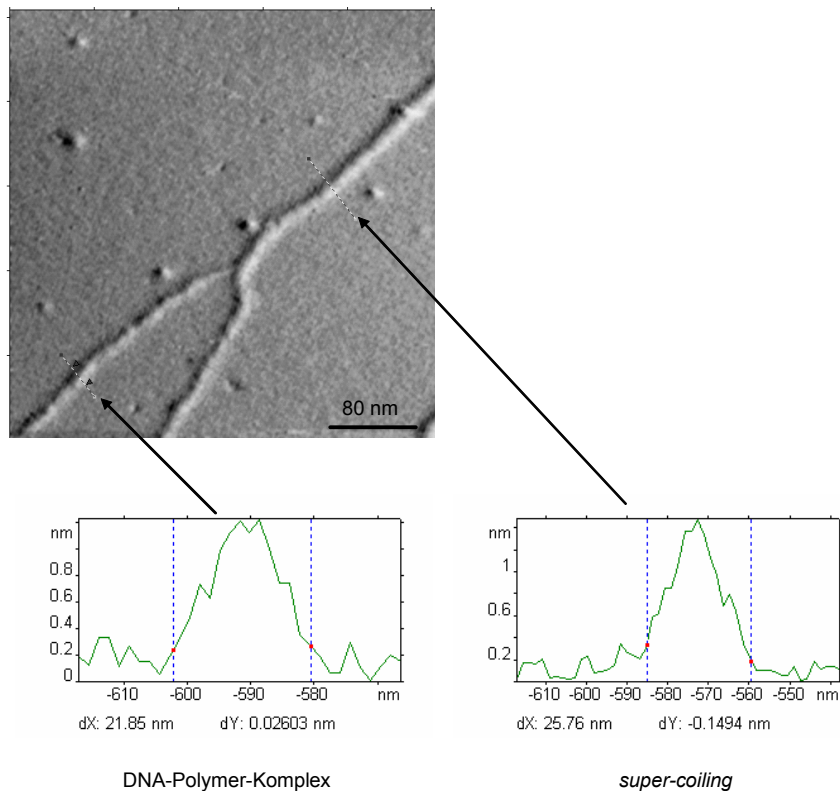


Abb. 6.7: Phasenbild eines Polyplexes mit PEO_{60} -(Suc-Damp) $_{10}$ (N/P: 10/1) und Querschnitte durch den Ring- und Stäbchen-Bereich des Polyplexes.

Der Bereich des stäbchenförmigen Polymer-DNS-Segments zeigt eine gemessene Breite von etwa 26 nm und eine Höhe von 1,3 nm. Auch hier kommt es also zu einer methodisch bedingten Reduzierung der Höhe. Aufgrund von so genannten Faltungseffekten ist nur eine eingeschränkte Bestimmung der Strukturbreiten im AFM möglich (Abb. 6.8). Die Spitzen für AFM-Standardaufnahmen haben einen Durchmesser von 6-10 nm, kleinere Objekte werden daher durch den Faltungseffekt vergrößert abgebildet, d. h. der wirkliche Durchmesser D entspricht nicht der gemessenen Breite B .^[113]

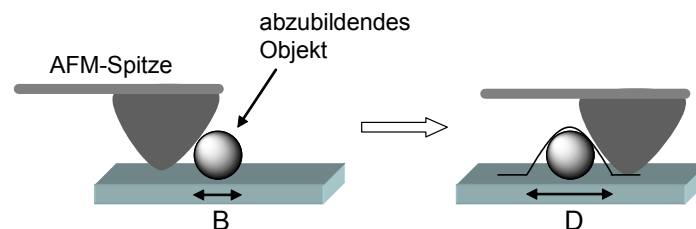


Abb. 6.8: Schematische Darstellung des Faltungseffekts: Haben AFM-Spitze und Probe eine ähnliche Größe, entspricht die gemessenen Breite B nicht dem wirklichen Durchmesser D , sondern erscheint größer.

Nichtsdestotrotz lässt der im Vergleich zum nicht kondensierten Segment geringe Zuwachs in der Breite von etwa 4 nm Rückschlüsse auf die Feinstruktur der Kondensation zu: Eine parallele Anordnung der beiden Segmente müsste zu einem deutlichen Breitenzuwachs der Probe führen. Es ist daher wahrscheinlich, dass die beiden Segmente durch den Prozess des so genannten *supercoilings* ineinander verdreht vorliegen und es so zu einer effektiveren Kondensation der DNS kommen kann.

Die Messung der gleichen Position dieser Probe mit einer höheren Dämpfung zeigt erwartungsgemäß ein Hervortreten des härteren DNS-Kerns der Polyplex-Segmente und eine Komprimierung der PEO-Schale (Abb. 6.8).

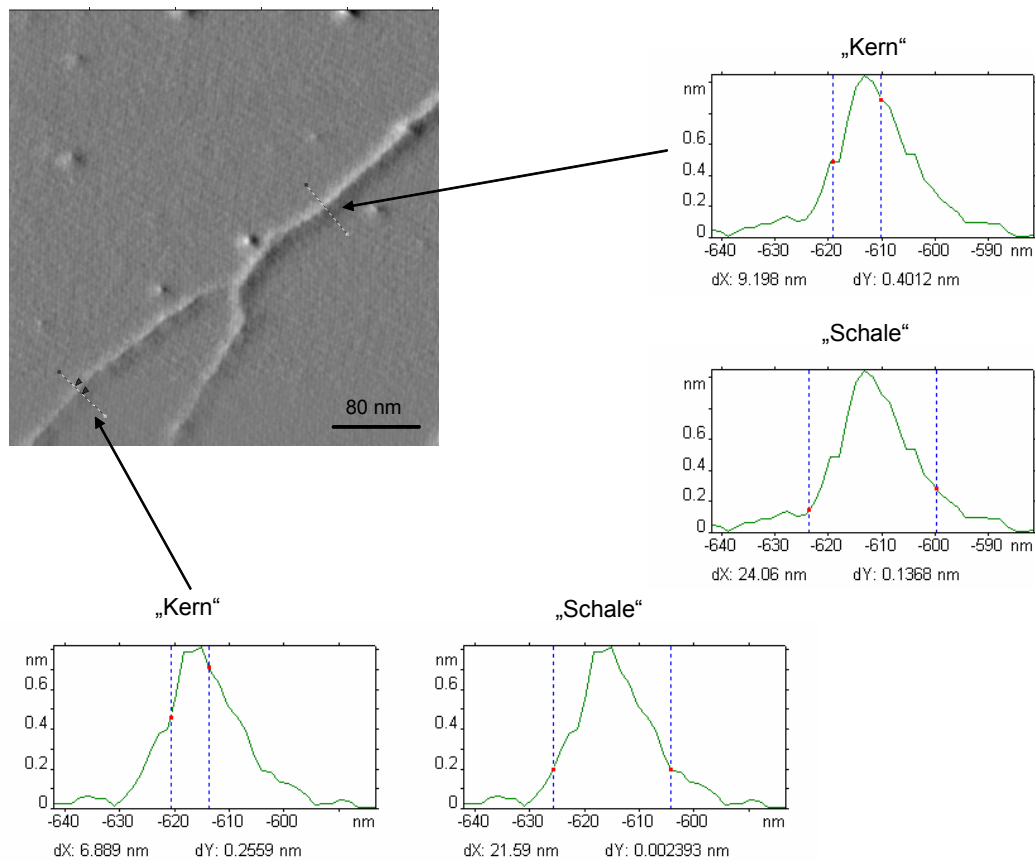


Abb. 6.9: Phasenbild eines Polyplex mit PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀ (N/P: 10/1) bei höherer Messamplitude und Querschnitte durch den Doppelstrang- und *supercoiling*-Bereich des Polyplexes.

Durch die Erhöhung der Messamplitude kommt es zur Hervorhebung einer Substruktur, die es ermöglicht im Höhenprofil den „Kern“ und die „Schale“ des Polyplexes getrennt zu betrachten. Hierfür ist die Phasendarstellung hilfreich, da sich Kern und Schale in ihren viskoelastischen Eigenschaften unterscheiden (Abb. 6.9). Die Breite der Strukturen lässt sich jedoch auch hier aufgrund des Faltungseffekts nicht absolut ausmessen.

Die Kernstruktur wird durch den DNS-Strang und die komplexierenden PAA-Segmente gebildet und die Schalenstruktur ist auf den umhüllenden PEO-Block zurückzuführen. Dabei können für die Struktur der PEO-Hülle zwei Extremfälle angenommen werden (Abb. 6.10): das statistische Knäuel oder die gestreckte *brush*.^[114]

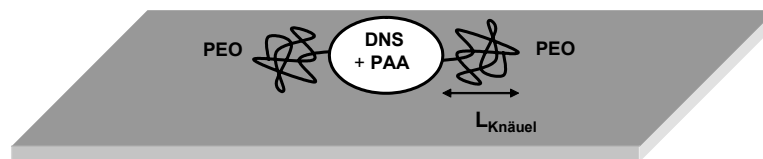
PEO als Knäuel

$$L_{\text{Knäuel}} = N^{2/3} \cdot l_{\text{PEO}}$$

l_{PEO} : Länge einer Wiederholungseinheit

$l_{\text{PEO}} = 0,35\text{nm}$; $N = 60$

$$L_{\text{Knäuel}} = 5,36 \text{ nm}$$



PEO als *brush*

$$L_{\text{brush}} = N \cdot l_{\text{PEO}}$$

$$L_{\text{brush}} = 21 \text{ nm}$$

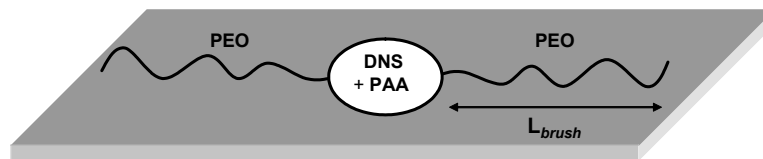


Abb. 6.10: Modell zur Untersuchung der Polyplex-Feinstruktur im AFM bei unterschiedlichen Messamplituden: Theoretische Struktur der PEO-Schale.

Abhängig von der angenommenen Struktur des PEO-Blocks ergeben sich zwei unterschiedliche theoretische Breiten der abgebildeten Polyplexstruktur von 5,36 nm für ein Knäuel und 21 nm für eine *brush*. Die tatsächliche Struktur liegt vermutlich zwischen diesen beiden Grenzfällen. In Lösung ist zwar das Knäuel durch Entropiegewinn die günstigere Konformation, aber durch die Adsorption auf dem Trägermaterial kann es zu einer Streckung der Polymerketten kommen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Modell der Umhüllung der DNS durch die PEO-PAA Blockcopolymer durch die AFM Aufnahmen bei verschiedenen Amplituden bestätigt wird.

Die gebildete Polyplexstruktur der offenen Ringe deutet jedoch trotz der Umhüllung der DNS durch das Polymer auf einen unzureichenden Ladungsausgleich hin (siehe Kapitel 6.2.1). Ein Grund hierfür könnte die ungenügende Kationenstärke von tertiären Aminen sein. Die PEO-PAA Blockcopolymer wurden durch Abspaltung vom Harz mit TFA im protonierten

Zustand isoliert. Es ist jedoch möglich, dass die bei der Charakterisierung der Polymere beobachtete Aggregation in Lösung Wechselwirkungen der Amingruppen mit den Phosphatgruppen der DNS blockieren und so die Bildung einer komprimierteren Struktur behindern.

Um den Einfluss der Kationenstärke und des Aggregationsverhaltens der Polymere auf die Polyplexbildung zu untersuchen, wurden im PAA-Segment neben den tertiären Amingruppen auch primäre Amingruppen eingeführt. Die AFM-Aufnahme zeigt auch hier vereinzelt vorliegende Plasmide, deren Adsorption auf MICA auf eine positive Gesamtladung schließen lässt (Abb. 6.11).

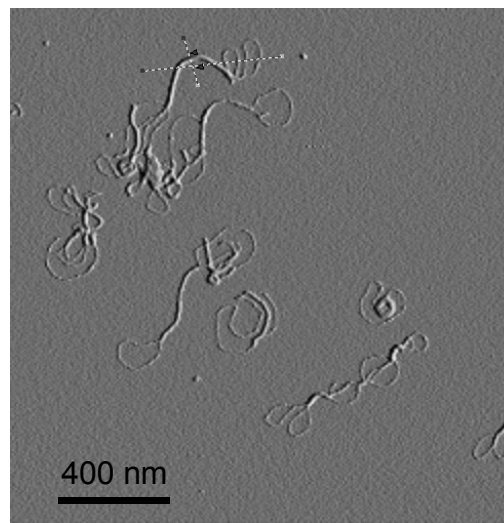


Abb. 6.11: AFM-Aufnahme (Höhenbild) eines Polyplex mit $\text{PEO}_{60}\text{-(Suc-Damp-Lys}_2)_5$ (N/P: 16/1) hergestellt mit Hilfe des Mikrofluidizers in TRIS-Puffer (10mM, pH 8.0) abgebildet auf MICA.

Allerdings kommt es, im Gegensatz zum Polyplex mit nur tertiären Aminen, zur stärkeren Komprimierung des Plasmids durch eine partielle Knäuelbildung der einzelnen Stränge oder mehrerer Stränge miteinander. Die Lichtstreuung bestätigt diese Strukturen in Lösung. Es wird eine Verteilung mit einem hydrodynamischen Radius von 73 nm und einem R_h/R_g -Verhältnis von 1.9 aufgezeichnet, das auf das Vorhandensein von polydispersen Knäueln hindeutet. Das Zetapotential der Polyplexe in Lösung ist Null, da auch in diesem Fall der PEO-Block die Oberflächenladung abschirmt. Die Untersuchung der Probe in der Lichtstreuung eine Woche nach der Präparation zeigt eine Zunahme des hydrodynamischen Radius um 22% auf 89 nm und eine Massenzunahme der Aggregate um etwa 50%. Die gebildeten Polyplexe aggregieren also trotz der sterischen Stabilisierung durch den PEO-Block und bilden dabei größere Strukturen, die für eine Aufnahme durch die Zelle nicht mehr

geeignet sind. Der Größenzuwachs von Polyplexen in Lösung mit der Zeit wurde aber bereits bei verschiedenen Polyplex-Systemen beobachtet. Eine Möglichkeit dieses Altern zu unterbinden ist der Zusatz z. B. von stabilisierenden Zuckern.^[99] Diese Art der zusätzlichen Stabilisierung wäre auch für die hier gezeigten Polyplexe denkbar. Erste Versuche in der Lichtstreuung zeigen, dass die Polyplexe sich bei Zusatz von Sucrose nicht verändern und der Massenzuwachs mit der Zeit reduziert werden kann.

Die gebildeten Strukturen deuten auf eine erhöhte Flexibilität der DNS Doppelhelix durch Einführung der primären Amingruppen hin. Teilssegmente des DNS-Strangs kondensieren mit anderen Segmenten desselben Plasmids zu linearen Strukturen. Eine helikale Überstruktur kann nicht aufgelöst werden. Gleichzeitig liegen aber auch immer noch Segmente als offene Ringstrukturen vor, die auf einen nicht effektiven Ladungsausgleich hindeuten und es bilden sich Strukturen, die aus mehreren Plasmiden bestehen (Abb. 6.11). Aufgrund der kurzen PAA-Sequenz und der abschirmenden Wirkung des PEO-Blocks kann die Vernetzung verschiedener Plasmide miteinander als unwahrscheinlich angenommen werden. Vermutlich ist diese Form der Kondensation auf den Prozess der Komplexbildung zurückzuführen: Die Ladung eines Teilssegmentes des Plasmids wird durch Anlagerung eines PAA-Segments verringert, so dass es nun mit einem anderen DNS-Segment mit reduzierter Ladung wechselwirken kann. Dabei kann es statistisch zur intramolekularen oder intermolekularen Wechselwirkung kommen und somit zur Bildung von Polyplexen aus mehreren Plasmiden.

Da auch der Einbau von zusätzlichen primären Amingruppen in das PAA-Segment noch nicht zu einem ausreichenden Flexibilitätsgewinn des DNS-Strangs führt, wurden die tertiären Amingruppen durch sekundäre Amingruppen ersetzt. An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, dass der Einbau von ausschließlich primären Amingruppen, also die Verwendung von Poly-L-Lysin, durch die Cyto- und Hemotoxizität dieses Polymers limitiert ist.

Die AFM-Aufnahme der Polyplexe mit sekundären und primären Amingruppen zeigt stäbchen- und ringförmige Aggregate (Abb. 6.12). Diese Strukturen entsprechen den in der Literatur beobachteten „toroid“ und „rod“ Strukturen für Polyplexe mit effektivem Ladungsausgleich.^[105, 106]

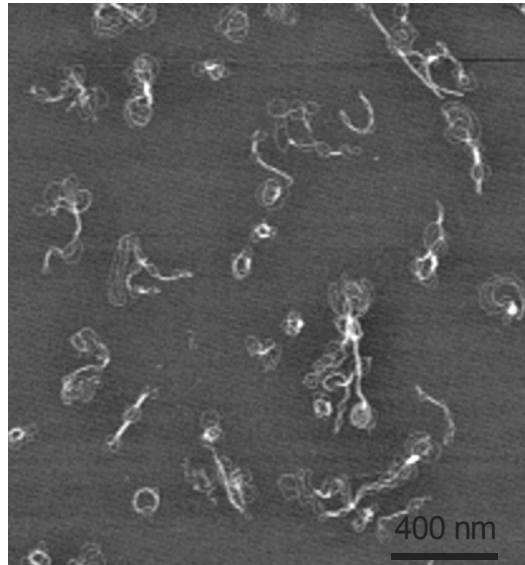


Abb. 6.12: AFM-Aufnahme (Phasenbild) eines Polyplexes mit $\text{PEO}_{60}\text{-(Suc-Spe-Lys}_2)_5$ (N/P: 21/1), hergestellt mit Hilfe des Mikrofluidizers in TRIS-Puffer (10mM, pH 8.0) abgebildet auf Mica.

Die Lichtstreuung der Polyplexe in Lösung zeigt eine Verteilung mit einem mittleren hydrodynamischen Radius von 77 nm. Die Auftragung nach Kratky lässt sich mit einer Gerade der Steigung q^{-1} annähern, was auf eine Stäbchen-Geometrie hindeutet. Diese wurde auch im AFM beobachtet. Auch diese Polyplexe besitzen aufgrund der effektiven Abschirmung der Oberflächenladung durch den PEO-Block in Lösung ein Zeta-Potential von Null.

Der Vorgang der Strukturbildung scheint bei einigen Polyplexen noch nicht abgeschlossen zu sein, wie sich im Detail an einigen Stellen im AFM-Bild zeigt (Abb. 6.13).

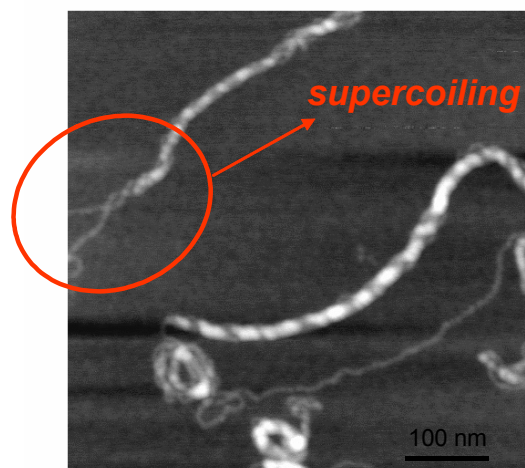


Abb. 6.13: AFM-Aufnahme eines Polyplexes mit $\text{PEO}_{60}\text{-(Suc-Spe-Lys}_2)_5$ (N/P: 21/1), hergestellt mit Hilfe des Mikrofluidizers in TRIS-Puffer (10mM, pH 8.0), abgebildet auf Mica.

Der Doppelstrang der DNS bildet bei Komplexierung mit dem PEO-PAA Blockcopolymer eine helikale Überstruktur mit einem anderen Segment desselben Plasmids aus, das so genannte *supercoiling* (Abb. 6.13). Durch den Flexibilitätsverlust der DNS bei Ladungsausgleich durch das Polymer kann der DNS-Doppelstrang von einer gespannten, gestreckten Struktur (Abb. 6.14a) in eine gedrehte, weniger gespannte Struktur übergehen (Abb. 6.14b). Bei weiterer Verdrehung (*twist*) des Doppelstrangs erreicht die DNS den Zustand des so genannten *supercoiling*, in dem die Helixachse selbst (und nicht nur der DNS-Strang) eine helikale Konformation einnimmt (Abb. 6.14c).^[115] Diese Helix kann nun wiederum durch fortschreitende Verdrehung eine erneute Überstruktur ausbilden. Dieser Prozess erfolgt z. B. bei Verdrehung eines Gummibands spontan und bildet eine weitere helikale Überstruktur (Abb. 6.14d). Dabei entsteht eine Stäbchenstruktur wie sie in der AFM-Aufnahme in Abbildung 6.12 mehrfach zu beobachten ist. Diese Stäbchenstrukturen legen sich wiederum zu Ringstrukturen zusammen, die den in der Literatur beschriebenen *toroids* entsprechen. Die *toroids* sind, soweit bisher bekannt, die stabilste Form der DNS-Kondensation. Die Daten der Lichtstreuung zeigen keine Verteilungen bei größeren R_h , die Hinweise auf Vernetzung oder Aggregation der Polyplexe geben könnten und es ist auch kein Zuwachs der mittleren Polyplexgröße innerhalb einer Woche zu beobachten. Die Polyplexe sind also in Lösung deutlich stärker als die bisher Beschriebenen gegen Aggregation stabilisiert.

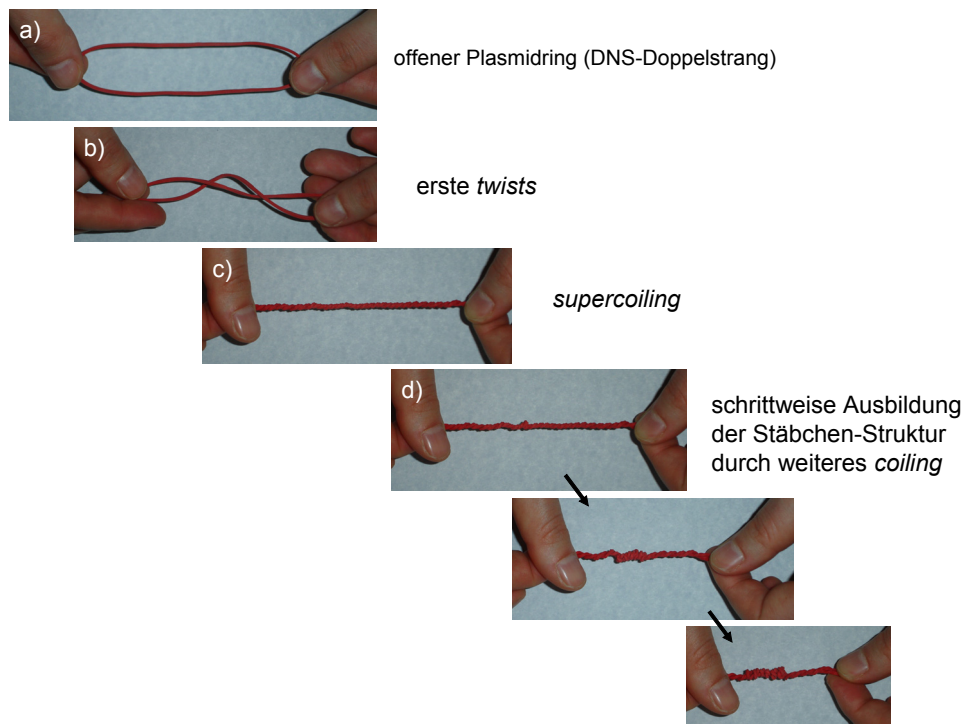


Abb. 6.14: Schematische Darstellung der Bildung von rod Strukturen durch *supercoiling* der DNS bei Komplexierung mit Polykationen.

Um näher zu untersuchen, welchen Einfluss der PEO-Block auf die Strukturbildung hat, wurde eine Polyplex mit einem reinen PAA-Block der gleichen Sequenz wie das zuvor diskutierte PEO-PAA Blockcopolymer hergestellt und mit AFM untersucht (Abb. 6.15).

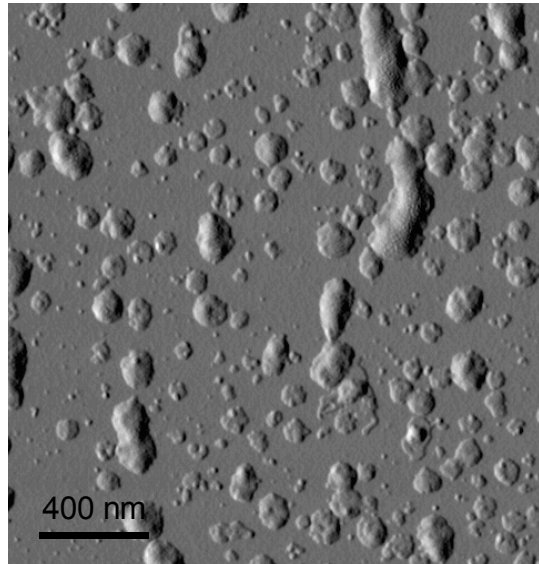


Abb. 6.15: AFM-Aufnahme eines Polyplexes mit Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅ (N/P: 17/1), hergestellt mit Hilfe des Mikrofluidizers in TRIS-Puffer (10mM, pH 8.0) abgebildet auf Mica.

Die AFM Aufnahmen zeigen globuläre polydisperse Strukturen, bei denen die Struktur der einzelnen Plasmide nicht mehr zu differenzieren ist. Die Lichtstreuung bestätigt dies, da ebenfalls eine Verteilung von polydispersen globulären Strukturen mit einem hydrodynamischen Radius von 310 nm beobachtet wurde. Da diese Polyplexe keine PEO-Hülle besitzen, lässt sich ein Zeta-Potential von +22 mV messen. Dieser Wert entspricht einer schwachen elektrostatischen Stabilisierung der Polyplexe durch eine kationische Oberflächenladung.

Es zeigt sich also deutlich, dass der PEO-Block maßgeblich an der Regulation der Wechselwirkung und an der Stabilisierung der kondensierten Struktur der Polyplexe beteiligt ist. Zum einen kann der PEO-Block bereits während der Bildung die Polyplexe stabilisieren und so eine dynamischere Strukturbildung unterstützen sowie Vernetzungen verhindern. Zum anderen stabilisiert die gebildete PEO-Hülle die Aggregation der Polyplexe in Lösung.

Es lässt sich zusammenfassen, dass nur die PEO-Blocksysteme in der Lage sind definierte Ein-Plasmid-Polyplexe zu bilden und in Lösung zu stabilisieren. Der PAA-Block definiert je nach Wahl der Bausteine die Struktur der Polyplexe. Die Struktur hängt dabei von der Effektivität der Ladungsabschirmung ab und wird durch die Stärke der verwendeten kationischen Einheiten bestimmt. Eine weitere Erhöhung der Polymerkonzentration bei der

Polyplexbildung verändert die gebildeten Strukturen nicht. Nicht untersucht wurde der Einfluss der Kettenlänge und der Anzahl der kationischen Einheiten pro Kette auf die Polyplexbildung. Die hier verwendeten PAA-Segmente mit 5 und 10 Wiederholungseinheiten und einer durchschnittlichen Molmasse von 3000 g/mol sind im Vergleich zu den kationischen Einheiten anderer nicht-viraler Vektoren sehr klein. Es wird also die Aufgabe folgender Arbeiten sein, den Einfluss der Kettenlänge des PAA-Segments, sowie des Verhältnisses der beiden Blöcke zu untersuchen.

6.3 Stabilität in Lösung

Die Versuche der Gelelektrophorese, sowie *in vitro* Studien der Toxizität, der Zell-Aufnahme und der Transfektion der Polyplexe wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis Dr. Peschka-Süss der technischen Pharmazie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. von Frau Stefanie Häfele durchgeführt. Die pharmakologischen Resultate werden separat in der Dissertation von Frau Stefanie Häfele an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. eingereicht.

6.3.1 Komplexbildung bei verschiedenen N/P-Verhältnissen

Eine einfache Methode, um die Komplexbildung bei verschiedenen N/P-Verhältnissen zu untersuchen, ist die Gel-Elektrophorese (Kapitel 3.3). Bei der Komplexierung des Plasmids durch das Polymer kommt es im Vergleich zum freien Plasmid zu einer Retardierung der Bande (Probe) auf dem Gel. Neben der Komplexierung und Ummantelung der DNS ist die Abschirmung z. B. gegen enzymatischen Abbau eine weitere Aufgabe des Polymers im Polyplex. Die Stabilität des Komplexes gegen enzymatischen Verdau kann ebenfalls mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht werden. Dazu wird der Polyplex zusammen mit DNase inkubiert und anschließend auf dem Gel aufgetrennt. Unkomplexiertes Plasmid wird bei diesem Prozess vollständig enzymatisch abgebaut und liefert somit keine Bande. Das Polymer hat die Möglichkeit das Plasmid durch Komprimierung und Ummantelung gegen diesen Verdau zu schützen. Abbildung 6.16 zeigt das Gelelektrophorese Experiment eines PEO-PAA mit tertiären Aminen.

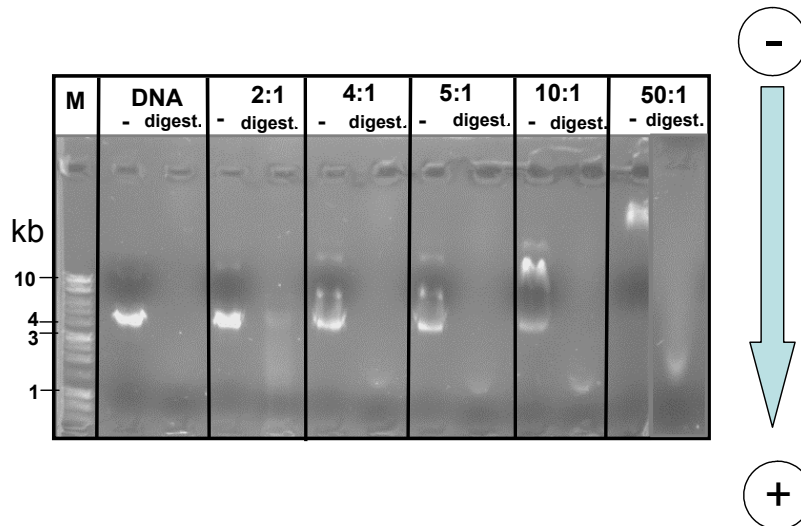


Abb. 6.16: Gel Elektrophorese PEO-(SucDamp)₁₀: (-): ohne DNase-Behandlung, (digest.): nach DNase Behandlung und Abstoppen mit SDS.

Das unkomplexierte Plasmid besitzt eine Größe von 4.7 kiloBasenpaaren (kB) und zeigt die zu erwartende Bande im Bereich des DNS-Markerrrs von etwa 5 kB (Abb. 6.16 Spalte 2 links). Als Kontrolle wurde der Verdau des unkomplexierten Plasmids mit DNase durchgeführt. Das Plasmid wird dabei vollständig abgebaut, und auf dem Gel werden keine größeren Fragmente oder unverdautes Plasmid detektiert (Abb. 6.16 Spalte 2 rechts). Die Polyplex-Bildung bei verschiedenen N/P-Verhältnissen zeigt ab einem Verhältnis von 4/1 eine Retardierung der Polyplex-Bande auf dem Gel (Abb. 6.16 Spalte 4 links). Mit steigendem Polymergehalt wird die Polyplex-Bande zu immer höheren theoretischen Massen verschoben (Abb. 6.16 Spalte 6 und 7 links). Die weitere Anlagerung von Polymer an den Polyplex führt zu einer stetigen Zunahme der Größe und somit zu einer Retardierung auf dem Gel. Darüber hinaus ergibt sich für den Polyplex ab einem bestimmten N/P-Verhältnis eine positive Gesamtladung, so dass sich die Bande der Probe nicht mehr Richtung Kathode sondern Richtung Anode bewegt.

Beim Verdau des Polyplex zeigt sich ab einem N/P-Verhältnis von 4/1 eine schwache Bande bei etwa 1 kB (Abb. 6.16 Spalte 4 rechts). Das Plasmid wird also nur noch unvollständig abgebaut. Mit zunehmendem Polymergehalt steigt zunächst die Intensität der Bande bei 1 kB. Bei einem N/P-Verhältnis von 50/1 kommt es zu einer Verschiebung der Bande zu höheren Massen (Abb. 6.16 Spalte 7 rechts). Allerdings ist bei sehr hohen Polymerkonzentrationen zu beachten, dass die Enzymaktivität durch das Polymer herabgesetzt werden kann, auf die die Verschiebung der Bande zu höheren Massen zurückzuführen sein kann.

In Abbildung 6.17 ist die Gelelektrophorese einer Reihe PEO-PAA-Polyplexe mit sekundären und primären Aminen dargestellt. Bereits bei einem N/P-Verhältnis von 2/1 kommt es zur deutlichen Retardierung der Polyplex-Bande (Spalte 3 links).

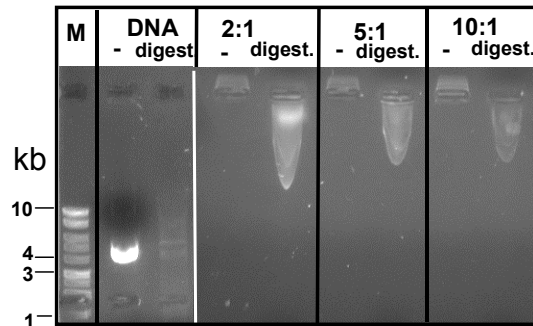


Abb. 6.17: Gel Elektrophorese PEO-Lys-(Suc-Spe-Lys₂)₅

Der Verdau der Polyplexe zeigt für alle N/P-Verhältnisse eine Bande im Bereich größer als 10 kB (Abb. 6.17 Spalte 3, 4 und 5 rechts). Der Polyplex ist also stabil gegen den Verdau durch das Enzym und schützt die DNS scheinbar effektiver als tertiäre PAAs vor dem enzymatischen Abbau. Die Bandenverlängerung der verdauten Proben (Abb. 6.17 Spalte 3, 4 und 5 rechts) im Vergleich zu den unverdauten Proben (Abb. 6.17 Spalte 3, 4 und 5 links) ist vermutlich auf den Zusatz von SDS (Sodium-Dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat) zurückzuführen. Das Tensid wird der Mischung zugesetzt, um nach einer definierten Zeit den enzymatischen Abbauprozess zu unterbinden. Bei der Gelelektrophorese von Proteinen ist der Zusatz von SDS zur Verbesserung der Auftrennung üblich. Dabei bilden die Tensidmoleküle eine negativ-geladene Mizelle um die Proteine, deren Größe und damit Ladung abhängig ist von der Masse des eingeschlossenen Proteins. Durch die erhöhte gleichmäßige Ladung der Tensid-Hülle kommt es einer besseren Auftrennung auf dem Gel. Im Fall der Polyplexe könnte es durch die mögliche Anlagerung von SDS-Molekülen zu einer Reduzierung der kationischen Ladung der Probe kommen, so dass die Bande im Gegensatz zum reinen Polyplex in Richtung der Kathode läuft. Möglicherweise treten die SDS-Moleküle aber auch in Konkurrenz zur DNS und destabilisieren die Polyplexe, so dass sich die effektive Größe der Polyplexe reduziert und die Bande zu kleineren Molmassen verschoben wird.

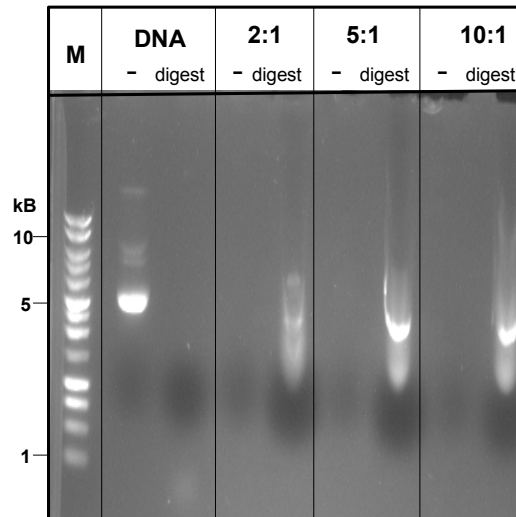


Abb. 6.18: Gelelektrophorese Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅

Um den Einfluss des PEO-Blocks auf die Polyplexbildung zu untersuchen wurde das PAA-Segment der vorangegangenen Probe ohne PEO-Block mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht. Der Versuch zeigt die Bildung eines Polyplexes ab einem N/P-Verhältnis von 2:1 (Abb. 6.18 Spalte 3 links). Aus den AFM- und LS- sowie Zeta-Potential-Messungen (Kapitel 6.2.3) ist bereits bekannt, dass die Polyplexe dieses PAA stark aggregieren und eine positive Oberflächenladung in Lösung besitzen. Die Retardierung der Bande könnte also durch die Aggregation verursacht werden. Ebenso könnte die positive Gesamtladung des Polyplex eine Wanderung Richtung Anode bewirken. Der enzymatische Verdau des Polyplexes führt zu einer Bande bei einer etwa 3-5 kB (Abb. 6.18 Spalte 3, 4 und 5 rechts). Wie bei der Polyplex-Probe desselben Segments mit PEO-Block (Abb. 6.17) kommt es also nicht zum vollständigen enzymatischen Abbau der DNS. Auch hier kann die Bandenverlängerung der verdauten Proben auf den Zusatz von SDS zurückzuführen sein, der durch Bildung von Mizellen möglicherweise zu einer Destabilisierung der Polyplexe führt.

Zusammenfassend ergibt sich, dass es bei allen PEO-PAA Blockcopolymeren zur Bildung von stabilen Polyplexen bei einem N/P-Verhältnis von 10/1 oder bereits bei kleineren Verhältnisse kommt. Einen Schutz vor dem enzymatischen Abbau bieten aber nur die Blockcopolymeren mit primären Amingruppen im PAA-Segment. Der Grund könnte die stärkere Komprimierung der DNS-Stränge sein wie dies bei AFM- und LS-Untersuchungen beobachtet wurde. Bei stärkerer Komprimierung kann sich das Enzym schlechter an die DNS anlagern, und es kommt nicht oder nur teilweise zum enzymatischen Abbau. Darüber hinaus kommt es zu einer Abschirmung des DNS-Strangs durch das Polymer, die sowohl auf

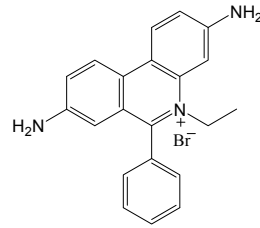
sterischen durch den PEO-Block als auch ionischen Effekten durch den PAA-Block beruhen kann.

Die reinen PAAs mit ausschließlich tertiären oder sekundären Amingruppen zeigen erst bei hohen N/P-Verhältnissen von $> 20/1$ eine Retardierung der Bande auf dem Gel. Das deutet darauf hin, dass für die Bildung eines stabilen Polyplexes größere Mengen Polymer benötigt werden, da der Ladungsausgleich nicht effektiv genug stattfinden kann. Diese Systeme sind daher nur eingeschränkt für eine Anwendung *in vitro* oder *in vivo* geeignet, da mit ihnen große Mengen Polymer in den Organismus eingebracht würden. Auch wenn die PAAs nicht toxisch sind (siehe Kapitel 6.4), so muss dennoch das Transport-Material von der Zelle abgebaut werden können, sonst würde es zu einer Belastung des Organismus führen. Eine wichtige Kenngröße für *drug delivery* Systeme ist daher die so genannte *payload* (Nutzlast, Tragkraft), die angibt wie viel Wirkstoff eine Substanz effektiv transportieren kann. Im Fall der tertiären und sekundären PAAs wäre also die *payload* zu niedrig.

PAAs mit primären Amingruppen im PAA-Segment bilden bereits bei einem N/P-Verhältnis von 2:1 einen stabilen Polyplex aus, und die DNS kann wie bei den PEO-Analoga vor dem enzymatischen Abbau geschützt werden. Die Daten der AFM- und LS-Messungen haben jedoch gezeigt, dass es zur Aggregation der Polyplexe in Lösung kommt und eine definierte Strukturbildung nicht möglich ist, was eine Parametrisierung der Polyplexe stark erschwert.

6.3.2 Ethidiumbromid Assay

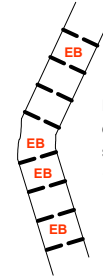
Der Grad der DNS-Komprimierung durch die Polyplexbildung lässt sich mit Hilfe eines Ethidiumbromid-Assays bestimmen.^[116] Ethidiumbromid (EB) ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Abb. 6.19 oben), der zwischen den Basenpaaren einer ungestörten DNS-Helix interkaliert werden kann. Die Interkalation bewirkt eine Zunahme der Fluoreszenz, da der Farbstoff vor dem freien Sauerstoff in Lösung geschützt ist, der als Quenscher die Fluoreszenz des nicht-interkalierten Farbstoffs herabsetzt. Die Autoquenchung des Farbstoffs durch Eximerbildung wie sie z. B. von Pyren bekannt ist, wird durch die Verwendung sehr geringer EB-Konzentrationen (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) verhindert.^[117] Bei der Bildung des Polyplexes wird durch die Komprimierung des Genmaterials die Struktur der DNS verändert. Durch diese veränderte Struktur wird aber die Einlagerung des Farbstoffs gestört und es kommt zur teilweisen Freisetzung von EB (Abb. 6.19 unten). Im Vergleich zur reinen DNS-Farbstoff-Lösung wird dadurch die Fluoreszenz herabgesetzt.^[118]



Ethidiumbromid (EB)

Interkalation bei ungestörter DNS

erhöhte Fluoreszenz
durch Einbau des EB
zwischen den Basenpaaren der DNS

Interkalation bei flexiblerer DNS

Fluoreszenz wird herabgesetzt,
da EB nicht vollständig eingelagert bleibt,
sondern zum Teil wieder in Lösung geht
→ Quenchen des EBs

Abb. 6.19: Struktur von Ethidiumbromid (EB) (oben) und schematische Darstellung der Interkalation von EB bei ungestörter und komplexierter DNS (unten).

Die Differenz der Fluoreszenz von ungestörter DNS und komplexierter DNS dient daher als Maß für die Störung der ursprünglichen DNS-Struktur bei Polyplexbildung. Üblicherweise wird in der Literatur angenommen, dass die Strukturänderung nur auf die Komprimierung der DNS durch das Polymer zurückzuführen ist. Eine stärkere Abnahme der Fluoreszenz bedeutet in diesem Fall eine stärkere Strukturänderung also eine bessere Komprimierung und kann daher als Maß für die Komprimierungsstärke eines Polykations dienen.

In Abbildung 6.20 sind die Fluoreszenzspektren der Reihe PAA-Polyplexe, des reinen Plasmids, des reinen Farbstoffs und von zwei PEI-Polyplexen dargestellt. Wie zu erwarten nimmt die Fluoreszenz von Ethidiumbromid bei Zugabe von Plasmid durch Interkalation zu. Bei Bildung des Polyplexes mit PEI hingegen nimmt die Fluoreszenz deutlich ab. Je größer die Molmasse des verwendeten PEIs desto größer ist auch die Abnahme der Fluoreszenz. Diese Beobachtungen lassen sich anhand des Strukturmodells aus Kapitel 6.2 (Abb. 6.4) erklären: Bei der Kondensation des DNS-Strangs mit dem PEI-Knäuel kommt es zu einer Deformation des DNS-Strangs, da dieser sich der Struktur des Polymer-Knäuels anpasst. Dabei wird interkalierter Farbstoff freigesetzt und seine Fluoreszenz in Lösung herabgesetzt.

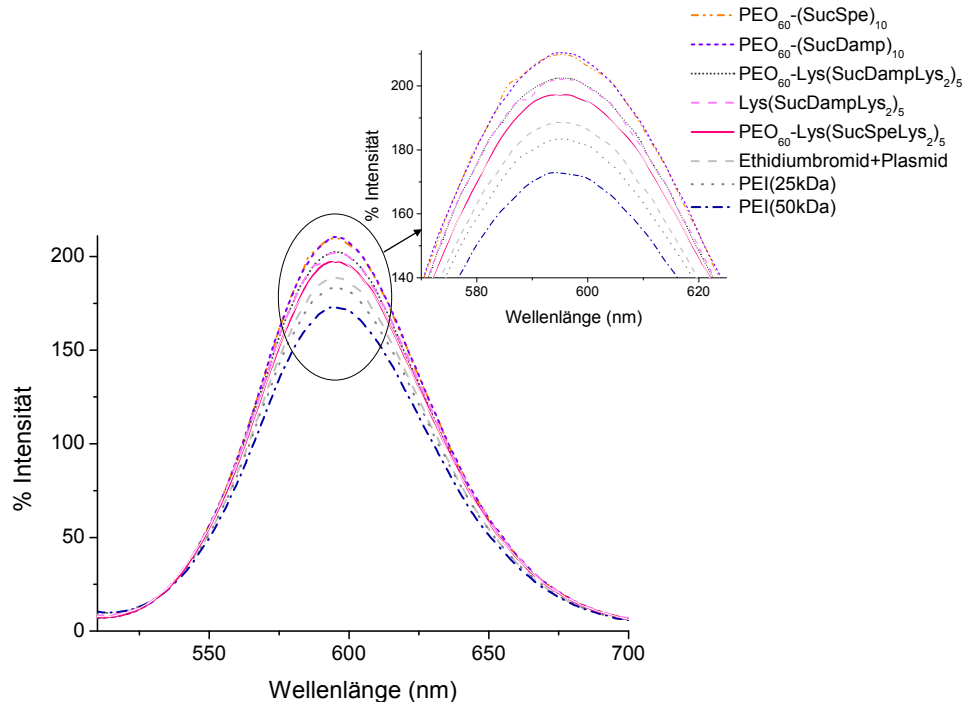


Abb. 6.20: Ethidiumbromid-Assay zur qualitativen Untersuchung der DNS-Komprimierung durch Polyplexbildung bei einem N/P-Verhältnis von 10/1.

Die Komplexbildung des Plasmids mit verschiedenen PAA-Systemen führt bei allen Polyplexen zu einer Zunahme der Fluoreszenz. Diese unerwartete Beobachtung deutet darauf hin, dass die DNS-Struktur durch die komplexierenden Polymere nicht gestört wird. Vielmehr scheint eine Stabilisierung der DNS-Struktur einzutreten. Dies würde das vorgeschlagene Struktur-Komplex-Modell (Abb. 6.6) bestätigen, da eine „weiche“ Wechselwirkung der kurzen PAA-Segmente mit dem anionischen DNS-Rückgrat die DNS-Struktur nur wenig verändern sollte. Die Zunahme der Fluoreszenz könnte entweder auf eine verbesserte Interkalation des Farbstoffs zurückzuführen sein oder auf den besseren Schutz vor Quenschern durch die abschirmende Polymerhülle.

Das PAA-System mit primären und sekundären Amingruppen, PEO₆₀-Lys(Suc-Spe-Lys₂)₅, verursacht im Assay die geringste Zunahme der Fluoreszenz. Im Rahmen des Modells sollte es in diesem Fall zur stärksten Komprimierung und geringsten Stabilisierung der ursprünglichen DNS-Struktur kommen, wie durch die AFM-Aufnahmen und LS-Daten bestätigt wird (Kapitel 6.2). Sie zeigen die Ausbildung von helikalen Überstrukturen, den *rods* und *toroids*, durch den Prozess des so genannten *supercoilings*. Dieser Trend setzt sich für die anderen PAA-Systeme fort. Die Blockcopolymere mit ausschließlich tertiären oder sekundären Amingruppen (PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀, PEO₆₀-(Suc-Spe)₁₀) zeigen die stärkste

Fluoreszenz-Zunahme und würden dem Modell entsprechend die stärkste Stabilisierung der DNS verursachen. Dies wird durch die AFM-Aufnahmen und LS-Daten bestätigt (Kapitel 6.2), die *loop*- bzw. nur leicht komprimierte Strukturen zeigen. Die Einführung von zusätzlichen primären Amingruppen führt zur stärkeren Kondensation und damit zu einer geringeren Zunahme der Fluoreszenz. Dabei verursacht die Kombination von sekundären und primären Amingruppen (PEO₆₀-Lys(Suc-Spe-Lys₂)₅) eine stärkere Komprimierung der DNS als die Kombination von tertiären und primären Amingruppen (PEO₆₀-Lys(Suc-Damp-Lys₂)₅). Ein erhöhter Anteil von primären Amingruppen pro PAA-Segment (PEO₆₀-Lys(Suc-Spe-Lys₃)₅) verringert die Fluoreszenzzunahme weiter, auch wenn die AFM- und LS-Daten keine Hinweise auf eine stärkere Kondensation liefern. Möglicherweise kommt es zu einer Strukturänderung des DNS-Kerns des Polyplexes, die mit Hilfe der verwendeten Analysemethoden nicht detektiert werden kann.

Die Fluoreszenz-Zunahme ist gleich für ein identisches PAA-System mit oder ohne zusätzlichen PEO-Block. Der PEO-Block nimmt nur Einfluss auf die Stabilität der Polyplexe in Lösung und verhindert die Aggregation zu größeren Strukturen. Auf den Grad der Komprimierung hat die Einführung eines PEO-Blocks auch nach den Ergebnissen des EB-Assays keinen Einfluss. Dieses Ergebnis zeigt noch einmal, dass allein die chemische Zusammensetzung des PAA-Blocks über die Art der Komplexierung und Stärke der Störung der DNS-Struktur entscheidet und ihre Variation die gebildeten Polyplex-Strukturen maßgeblich verändert.

Der EB-Assay bestätigt also das Komplex-Struktur-Modell, indem ein „sanfter“ und dynamischer Komplexierungs- und Komprimierungsmechanismus vorgeschlagen wurde. Dieser setzt sich von den etablierten PEI-Komprimierungsmechanismen ab und bietet potentiell die Möglichkeit, auch größere DNS-Segmente kontrolliert und mit definierter Struktur zu komprimieren. Dabei steuert der kationische Charakter der PAA-Segmente den Vorgang der Komprimierung, ähnlich wie im biologischen System, wo Proteine (Histone) mit regulierten kationischen Oberflächen funktional eingesetzt werden und eine kontrollierte Komprimierung bewirken (Abb. 6.2).

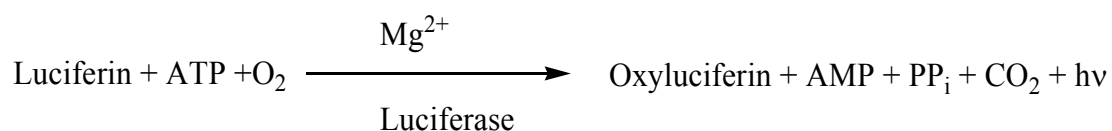
Kapitel 7

Zellbiologische Eigenschaften der Polyplexe

7.1 Toxizität der PEO-PAA und der PEO-PAA Polyplexe

Für eine zukünftige Anwendung der PAA-Systeme in der Gentherapie *in vivo* ist vor allem ihre Toxizität entscheidend. Die Polymere dürfen zu keinem Zeitpunkt der Gentherapie den Organismus schädigen, d. h. sie dürfen weder als Polyplex noch als freies Polymer cyto- oder hemotoxisch wirken. Dabei ist zu beachten, dass eine unerwünschte Schädigung oder Belastung der Zelle stattfinden kann auch ohne dass es zum Zelltod kommen muss. Um diese Effekte zu untersuchen wurden daher Vitalitätstests an einer Zelllinie in Anwesenheit von verschiedenen PAA- und PEO-PAA-Systemen durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Gen-Assays der Stoffwechsel der Zellen untersucht.^[119] Bei einer Belastung der Zelle durch das Polymer oder den Polyplex kann zu einer Reduzierung des Stoffwechsels als Reaktion auf eine Vergiftung kommen. Auch eine dramatische Erhöhung des Stoffwechsels durch Stressfaktoren wie der Zusatz fremder Substanzen ist möglich. Es wird also die relative Veränderung der Vitalität von Zellen mit oder ohne Zusatz von PAA-Systemen gemessen und kann dann mit gängigen nicht-viralen Vektoren wie PEI verglichen werden.

Die Vitalität einer Zelle wird an ihrer Adenosin-Triphosphat-Produktion (ATP-Produktion) gemessen. In Anwesenheit von ATP, Sauerstoff und dem Enzym Luciferase reagiert Luciferin unter Emission von Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562 \text{ nm}$.^[119] Dabei läuft folgende Bruttoreaktion ab:



Neben dem Oxyluciferin werden dabei Adenosin-Monophosphat (AMP), Pyrophosphat (PP_i) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) gebildet.

Der Vergleich mit einem ATP-Standard bzw. Zellen ohne Zusatz von Polymer oder Polyplex liefert Informationen über mögliche Veränderungen der Vitalität. In Abbildung 7.1 sind die Daten des Luciferase-Assays für das PEO-PAA Blockcopolymer PEO₆₀-Lys(Suc-Damp-Lys)₅ dargestellt.

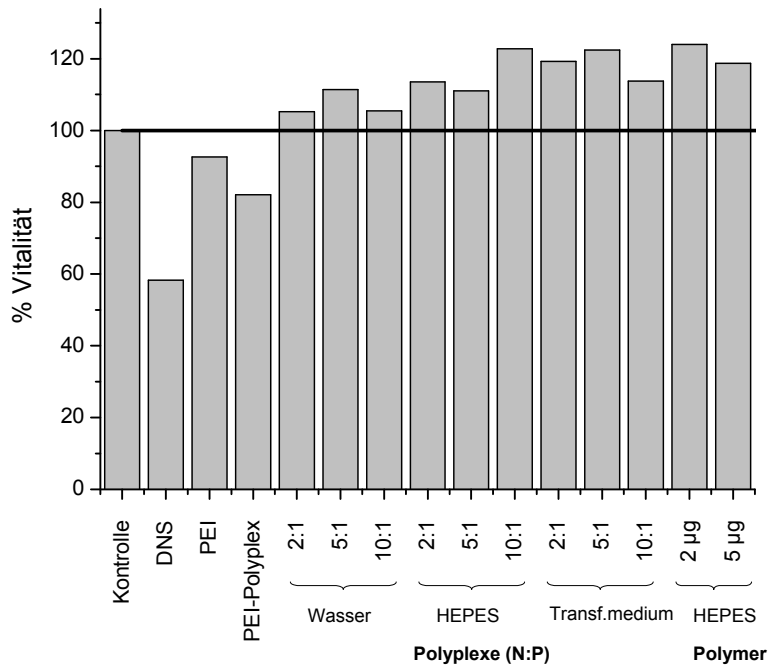


Abb. 7.1: Messung der Vitalität des Luciferase-Assays, verwendetes Polymer: PEO₆₀-Lys(Suc-Spe-Lys)₅.

Die Zellvitalität aller Polyplex-Proben, auch in verschiedenen Puffern, sowie des reinen Polymers zeigt eine Zunahme der Stoffwechselaktivität von bis zu 20 %. Dieser Effekt kann als Reaktion der Zellen auf die Internalisierung der Polyplexe, bzw. des Polymers interpretiert werden. Die Zelle beginnt die Fremdstoffen mit Hilfe ihres Stoffwechsels enzymatisch abzubauen, was im Sinne einer effektiven Gentransfektion zur Freisetzung des Genmaterials führen sollte und für die Zelle zunächst eine Zunahme der Stoffwechselaktivität bedeutet. Im Gegensatz dazu bewirkt reines PEI eine Abnahme der Stoffwechselaktivität von 10 % und ein PEI-Polyplex sogar von 20 % (Abb. 7.1 Balken 3 und 4). Diese beiden Systeme sind also ebenso wie freie DNS toxisch.

Die Untersuchung weiterer PAA-Systeme, sowohl reiner PAA-Polymere als auch PEO-PAA Blockcopolymere, lieferte ähnlich Ergebnisse der Zellvitalität (siehe Anhang). Es lässt sich also zusammenfassen, dass alle in dieser Arbeit dargestellten PAA-Systeme unabhängig von den verwendeten Bausteinen, der Sequenz oder Länge des PAA-Segments nicht toxisch sind im Sinne einer stark veränderten Vitalität. Sowohl die freien Polymere als auch die Polyplexe zeigen eine drastisch reduzierte Toxizität im Vergleich zu PEI. Zusammen mit den Ergebnissen von Duncan, die eine reduzierte Immunaktivität bei hochmolekularen PAAs beobachtet hat (2 g PAA pro Maus ohne Immunrespons), sind die Systeme somit sowohl für Versuche *in vitro* als auch *in vivo* geeignet.

7.2 Zell-Aufnahmestudien von PEO-PAA Polyplexen

Der erste Schritt zur erfolgreichen Gentransfektion ist nach der Bildung der Polyplexe die Aufnahme in die Zelle. Dabei ist es zum einen interessant die Aufnahme zu quantifizieren und zum anderen die Mechanismen der Aufnahme näher zu untersuchen. Eine Methode hierfür ist das so genannte FACS (fluorescence activated cell sorting, fluoreszenzaktivierte Zellsortierung), das Quantifizierung von fluoreszenzmarkierten Proben in der Zelle ermöglicht.^[120] Dabei werden die in Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare vereinzelt und passieren einen Laserstrahl. Mit Hilfe entsprechender Detektoren kann dabei die Fluoreszenz der Zellen gemessen werden. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck die verschiedenen PAA-Systeme nach der Synthese mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) umgesetzt und so pro PAA-Segment eine Fluorescein-Markierung eingeführt (Abb. 7.2).^[121]

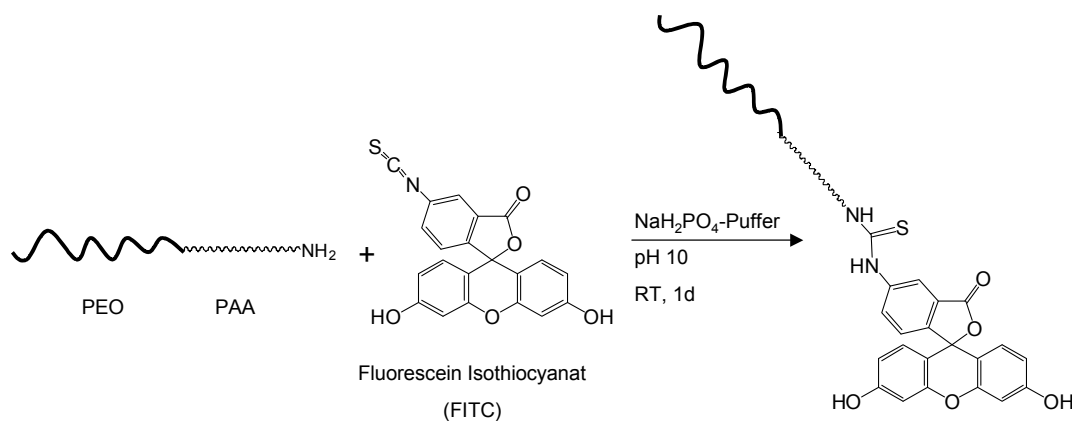


Abb. 7.2: Markierung der PAA-Systeme mit Fluorescein-Isothiocyanat.

Mit diesen markierten Polymeren wurden dann Polyplexe nach der beschriebenen Methode (Kapitel 6.1) hergestellt und im Zellversuch eingesetzt. Die Quantifizierung der Aufnahme erfolgte in HAEC und cos-7 Zellen über Messung der Fluoreszenz nach Zusatz von Polyplex und 1 h Inkubation mittels Durchflusszytometrie. Es besteht stets das Risiko, dass Polyplexe oder Polymere nicht von der Zelle aufgenommen werden, aber auf der Zelloberfläche adsorbieren und so die Messung verfälschen. Um dies auszuschließen wurden Kontroll-Experimente auch bei 4 °C durchgeführt. Bei dieser Temperatur findet keine aktive Aufnahme der Polyplexe durch Zellen statt, es kann nur Diffusion in die Zelle erfolgen.^[122] Die Polyplexe müssen jedoch aktiv über Internalisierungsprozesse aufgenommen werden, so dass die nach dem Austausch des Mediums gemessene Fluoreszenz nur auf adsorbierte Spezies zurückzuführen ist. Diese so erhaltene Fluoreszenzintensität zeigt, dass die bei 4 °C

stattfindende Adsorption zu vernachlässigen und die gemessene Fluoreszenz der 37 °C-Experimente auf erfolgreiche Aufnahme der Polyplexe in die Zellen zurückzuführen ist.

Abbildung 7.3 fasst die Daten der Zellaufnahme-Experimente für verschiedene PAA-Systeme zusammen. Das PEO-PAA-System mit ausschließlich sekundären Amingruppen (PEO₆₀-(Suc-Spe)₁₀) zeigt die geringste Aufnahmerate von 19%. Im Hinblick auf eine Anwendung *in vivo* oder *in vitro* ist die beobachtete Aufnahme zu gering. Der Verlust von 80% des Wirkstoffs bedeutet eine Belastung des Organismus und reduziert die Effektivität der Therapie drastisch. Gerade beim Einsatz von toxischen Wirkstoffen würde eine so geringe Aufnahme einen gezielten Einsatz im Sinne eines *drug delivery* ausschließen.

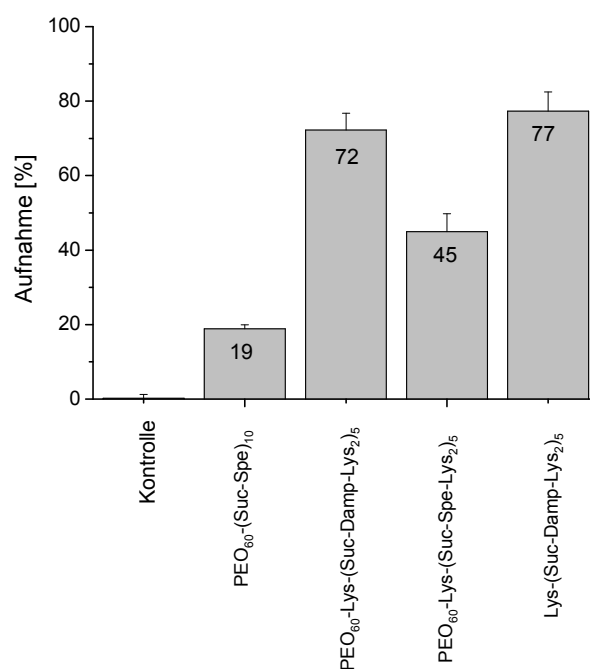


Abb. 7.3: Aufnahmestudien der fluoreszenzmarkierten Polyplexe mittels Durchflusszytometrie. Kontrolllexperiment: Zellen ohne Polyplexe

Die Zellaufnahme hängt neben anderen Faktoren maßgeblich von der Größe der zu internalisierenden Spezies ab. In der Literatur werden verschiedenen Aufnahmemechanismen diskutiert, die sich in ihrer Effektivität unterscheiden und die internalisierte Spezies in unterschiedliche Zellkompartimente transportieren. So werden z. B. große Spezies (> 800 nm) laut Literatur nach Clathrin-vermittelter Endocytose der Zellaufnahme in das Lysosom transportiert. Dort findet enzymatischer Abbau und Degradierung statt, was eine Freisetzung des Wirkstoffs verhindert. Ein solcher Mechanismus könnte für die PAA-Systeme mit ausschließlich sekundären oder tertiären Amingruppen angenommen werden (PEO₆₀-(Suc-Spe)₁₀, PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀), da diese Polyplexe in der LS hydrodynamische Radien von bis zu 800 nm zeigen.

Polyplexe mit einer Größe von 80-800 nm werden laut Literatur hauptsächlich über den Prozess der Caveolae-vermittelten Endozytose aufgenommen werden. Dieser Aufnahmeweg ist nach bisherigen Erkenntnissen sehr effizient und bietet das größte Potential für die Internalisierung von Wirkstoffkomplexen, da der intrazelluläre Transport im Endosom die Möglichkeit einer gezielten Wirkstofffreisetzung bietet.^[110] Erste Untersuchungen zu den verschiedenen Aufnahmemechanismen haben gezeigt, dass sämtlich Polyplexe über den Prozess der Caveolae-vermittelten Endozytose aufgenommen werden. Eine schlechte Zellaufnahme ist dann auf eine geringe Effizienz dieses Prozess zurückzuführen, die wiederum von der Größe und Struktur der Polyplexe abhängen kann.

Die Polyplexe mit sekundären und primären, bzw. tertiären und primären Amingruppen (PEO₆₀-Lys-(Suc-Spe-Lys₂)₅, PEO₆₀-Lys-(Suc-Damp-Lys₃)₅), die laut LS mittlere hydrodynamische Radien von 77 nm, bzw. 73 nm besitzen, zeigen eine drastische Steigerung der Internalisierungsrate. Die Kombination von sekundären und primären Amingruppen (PEO₆₀-Lys-(Suc-Spe-Lys₂)₅) zeigt im AFM die stärkste Komprimierung des Genmaterials und liefert eine Internalisierungsrate von 45%. Die Erhöhung des Anteils der primären Amingruppen (PEO₆₀-Lys-(Suc-Spe-Lys₃)₅) im PAA-Segment führt zu keiner Erhöhung der Aufnahme (45%, Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu werden die weniger stark komprimierten Polyplexe mit tertiären und primären Amingruppen (PEO₆₀-Lys-(Suc-Damp-Lys₃)₅) deutlich stärker mit ca. 73% aufgenommen. Dieser Unterschied kann nach bisherigen Kenntnissen nicht durch die Größe der Polyplexe begründet werden, da für beide Proben sehr ähnlich hydrodynamische Radien gefunden wurden. Ein anderer wichtiger Faktor, der die Zellaufnahme beeinflusst, ist die Ladung der zu internalisierenden Spezies. Dabei kommt es mehr auf die Oberflächen- als auf die Bruttoladung der Kolloide an. Zellmembranen von Eukaryonten besitzen eine negative Oberflächenladung, so dass positiv geladenen Polyplexe auf der Oberfläche adsorbieren können und es so zu einem Bindungsvorgang kommt, der eine Aufnahme auslösen kann.^[98] Aufgrund der PEO-Hülle der Polyplexe wurde ein neutrales Zetapotential bestimmt. Es ist dennoch möglich, dass die effektive Ladung des Polyplexes mit tertiären und primären Amingruppen (PEO₆₀-Lys-(Suc-Damp-Lys₃)₅) stärker positiv ist als die effektive Ladung des Polyplex mit sekundären und primären Amingruppen (PEO₆₀-Lys-(Suc-Spe-Lys₂)₅). So ist es z. B. denkbar, dass die tertiären Amingruppen weniger an der Komplexierung der DNS beteiligt sind als die sekundären Amingruppen und daher als freie kationische Gruppen die positive Oberflächenladung erhöhen, die dann eine Wechselwirkung mit der Zellmembran ermöglicht.

Dieser Argumentation folgend erklärt sich auch die drastische Steigerung der Aufnahmewerte des PAA-Systems ohne PEO-Block (Eda-Lys-(Suc-Damp-Lys₃)₅). Wie Messungen des Zetapotentials gezeigt haben, besitzen diese Polyplexe eine kationische Oberflächenladung und können so mit Zellmembranen wechselwirken. Dies führt allerdings nur zu einer lokalen Aufkonzentration, der die eigentliche Internalisierung folgen muss. Diese ist wiederum maßgeblich von der Größe der Polyplexe abhängig, die im Fall der nicht PEGylierten PAA-Systeme oberhalb der theoretischen Ausschlussgrenze für Endocytose liegt. Sämtliche PAA-Polyplexe zeigen Aggregation in Lösung und bilden dabei globuläre, polydisperse Strukturen mit mittleren hydrodynamischen Radien von ca. 300 nm. Dass es dennoch zu einer Aufnahmerate von 77% kommt, könnte auf eine Destabilisierung der Aggregate bei Adsorption an der Zellmembran zurückzuführen sein, so dass die effektiv internalisierten Polyplexe kleiner sind als die in Lösung beobachteten Aggregate.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwei der untersuchten PAA-Systeme sehr gute Internalisierungsraten von bis zu 77% zeigten und somit sehr gut für einen effektiven Transport in die Zelle geeignet sind. Die niedrigen Aufnahmewerte der PAA-Polyplexe mit nur sekundären Amingruppen könnte auf die ungenügende Komprimierung des Genmaterials und eine daraus resultierende Größe der Polyplexe oberhalb der Ausschlussgrenze für die Endocytose zurückgeführt werden. Die Unterschiede in der Aufnahmeeffizienz der PAA-Systeme mit tertiären, bzw. sekundären und primären Amingruppen sind bisher nicht mit anderen Ergebnissen zu korrelieren und sollten daher von Interesse von weiteren Untersuchungen sein.

7.3 Transfektion mit PEO-PAA Polyplexen

Zur Untersuchung der Transfektionsaktivität der PAA-Systeme wurden Polyplexe mit dem Reportergen Green Fluorescent Proteine (GFP) hergestellt. Dieses Reportergen produziert ein leicht nachzuweisendes Protein, das eine Bestimmung der Transfereffizienz ermöglicht. Das GFP ist ein Protein der Qualle *Aequora victoria*, das durch Anregung bei $\lambda = 395$ oder 475 nm mit einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 509$ nm grün fluoresziert.^[56, 123] Die Transfereffizienz ist durch die Anzahl der grün-fluoreszierenden Zellen bei entsprechender Anregung im Fluoreszenzmikroskop gegeben. Eine einfache und schnelle Methode bei erfolgreicher Expression des GFP-Gens die Transfereffizienz zu ermitteln ist auch hier die Durchflusszytometrie (FACS).^[120] Mit Hilfe entsprechender Detektoren wird dabei Streulicht

und Fluoreszenz gemessen. Das Streulicht hängt von der Größe und Struktur der Zelle ab, es können intakte Zellen und Zellfragmente getrennt werden, damit nur intakte Zellen berücksichtigt werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzmessung lässt sich der Prozentsatz der Zellen, die erfolgreich GFP produziert haben, bestimmen. Zusätzlich lässt sich durch den Zusatz des Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD die Anzahl der toten Zellen ermitteln.^[124] Damit ergeben sich Aussagen über die Toxizität und Transfektionsaktivität der Polyplexe.

Die Transfektionsversuche sämtlicher PEO-PAA bzw. PAA-Systeme lieferten einen Prozentsatz an toten Zellen von weniger als 5%. Diese Daten bestätigen das Ergebnis der Vitalitätstests, die eine sehr geringe Toxizität aller PAA-Systeme gezeigt hatten (Kapitel 7.1). Bei Standard-Systemen wie z. B. PEI und Polylysin ist ein Prozentsatz von toten Zellen um die 10 % üblich.^[125, 126] Die PAA Systeme sind also deutlich schonender als andere nicht-virale Vektoren auf Polymerbasis und somit geeignet für den Einsatz *in vivo*.

Die Transfektionseffizienz der PAA-Systeme ist allerdings noch sehr gering. PAA-Segmente mit ausschließlich tertiären oder sekundären Amingruppen führen auch bei hohen N/P-Verhältnissen nur zu einem geringen Prozentsatz erfolgreich transfizierter Zellen < 0,1 %. Die Diskrepanz zwischen den Werten der Zellaufnahme von etwa 20% für Polyplexe mit sekundären Aminen (Kapitel 7.2) und die geringe Transfereffizienz gibt Hinweise auf den Mechanismus der PAA-Polyplex-Internalisierung und die zellinterne Prozessierung der Polyplexe: Die PAA-Polyplexe können zwar erfolgreich durch die Zellen internalisiert werden, gelangen vermutlich aber aufgrund ihrer Größe anschließend ins Lysosom, wo sie enzymatisch abgebaut werden und es so nicht zu einer Freisetzung des Plasmids kommen kann. Allerdings lässt sich diese These nicht belegen, da eine Lokalisierung der Polyplexe im Lysosom oder einem anderen Zellkompartiment bisher nicht nachgewiesen wurde.

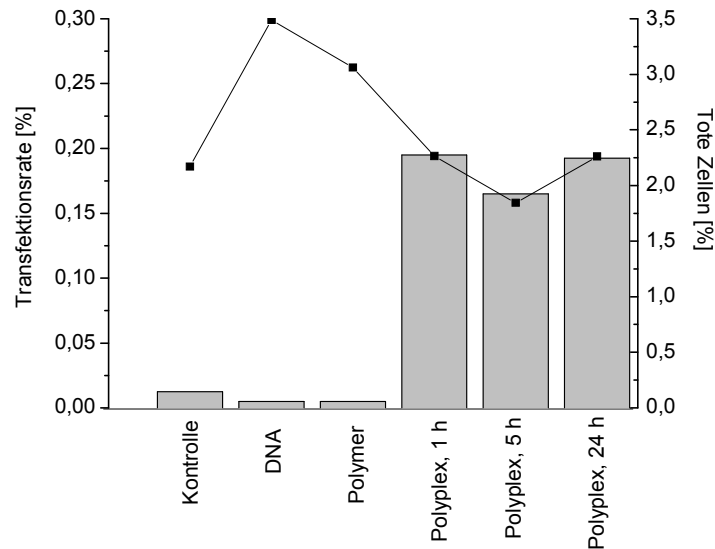


Abb.: 7.4: Transfektionsergebnisse der FACS-Messung der Versuchsreihe des Polyplexes PEO₆₀-Lys-(Suc-Damp-Lys)₂₅ mit pEGFP auf COS7-Zelllinien bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. Kontrollexperiment: Zellen ohne Zusatz. Indizierung: Linie: tote Zellen, Balken: Transfektionsrate.

Die Einführung von primären Amingruppen in das PAA-Segment hat drastischen Einfluss auf die Transfereffizienz. Transfektionsexperimente mit dem System PEO-Lys-(Suc-Damp-Lys)₂₅ zeigen Werte bis zu 0,3% transfizierte Zellen (Abb. 7.4). Dies entspricht einer Steigerung um etwa das zehnfache der Transfereffizienz ohne primäre Amingruppen. Aber auch diese Werte liegen noch weit hinter der Transfereffizienz von PEI (~ 25%) zurück. Auffällig ist auch hier die dramatische Differenz zwischen der Internalisierungsrate von über 70% und der geringen Transfereffizienz von maximal 0,3%. Aufgrund der Polyplex-Größe kommt es vermutlich zu einer Internalisierung über den Prozess der Caveolae-vermittelten Endocytose und es besteht so die Möglichkeit einer effektiven Gentransfektion. Dass dennoch nur ein geringer Prozentsatz des transportierten Genmaterials in den Zellkern gelangt und die Produktion des GFP ermöglicht, deutet auf eine unzureichende Freisetzung des Genmaterials in der Zelle hin. Für eine erfolgreiche Freisetzung des Polyplexes aus dem Endosom werden in der Literatur verschieden Faktoren diskutiert. Ein wichtiger Faktor ist der pH-Wert des Endosoms, der durch das Einströmen von Protonen von zunächst etwa 7,4 auf etwa pH 5,8 fällt.^[127] Das Polymer kann über die freien Amingruppen als Protonenakzeptor wirken und verursacht so weiteres Einströmen von Protonen. Bei gleichzeitigem Transport der Chlorid-Gegenionen kann es so zu einem steigenden osmotischen Druck innerhalb des Endosoms kommen, der das Eindringen von Wasser zur Folge hat und zum so genannten „Platzen“ des Endosoms führt.

Ein weiterer Faktor der die Freisetzung beeinflussen kann, ist die Wechselwirkung des Polymers mit der Membran des Endosoms. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Wechselwirkung von kationischen Farbstoffen oder Polykationen mit Lipidmembranen zu einer Veränderung der Membran-Oberflächenspannung führt. Dies kann eine Änderung in der Krümmung der Membran provozieren, die z. B. zum Aufreißen der Membran oder zur Induktion einer Einstülpung ähnlich wie beim Prozess der Endocytose führen kann.^[128, 129, 130]

Die gesteigerte Transfereffizienz bei Einführung von primären Amingruppen zusätzlich zu tertiären könnte also auf die Erhöhung der Basizität des PAA-Segments zurückzuführen sein, so dass dieses besser als Protonenakzeptor wirken, bzw. stärker mit der Membran wechselwirken kann.

Diesem Modell entsprechend zeigt die Kombination von sekundären und primären Amingruppen im PAA-Segment eine erneute Steigerung der Transfereffizienz auf nun 0,3-0,6%. Der Austausch von tertiären durch sekundäre Amingruppen bedeutet auch hier eine Erhöhung der Basizität des PAA-Segments und somit eine bessere Freisetzung aus dem Endosom.

Die dennoch sehr geringe Transfektionsrate der PAA-Polyplexe könnte auf eine ungenügende Freisetzung der DNS aus dem Polyplex hindeuten. Damit die DNS im Zellkern prozessiert werden kann, muss sie zunächst wieder vom Polykation getrennt werden. Der genaue Mechanismus dieses Prozesses ist noch nicht vollständig verstanden, aber möglicherweise sind die mit den PAA-Systemen gebildeten Polyplexe zu stabil und verhindern so eine ausreichende Trennung von Polymer und DNS.

Um den Einfluss der pH-abhängigen Freisetzung aus dem Endosom auf die Transfereffizienz näher zu untersuchen, wurden die Transfektions-Experimente mit den PAA-Systemen unter Zugabe von Chloroquin (7-Chlor-4-(4-diethyl-amino-1-methylbutylamino)-chinolin) wiederholt. Chloroquin wird zur Steigerung der Transfektionseffizienz *in vitro* eingesetzt, da es den Grad der Freisetzung des Genmaterials aus dem Polyplex erhöht.^[131] Dieser Effekt kann sowohl auf eine pH-Wert-Änderung im Endosom als auch auf Wechselwirkungen mit der Membran zurückzuführen sein. Die Versuche zeigen allerdings für die PEO-PAA Systeme keine Steigerung der Transfereffizienz durch Zusatz von Chloroquin (Abb. 7.6) und lassen somit keine Aussage über eine Abhängigkeit der Transfereffizienz von der Protonenakzeptorstärke zu.

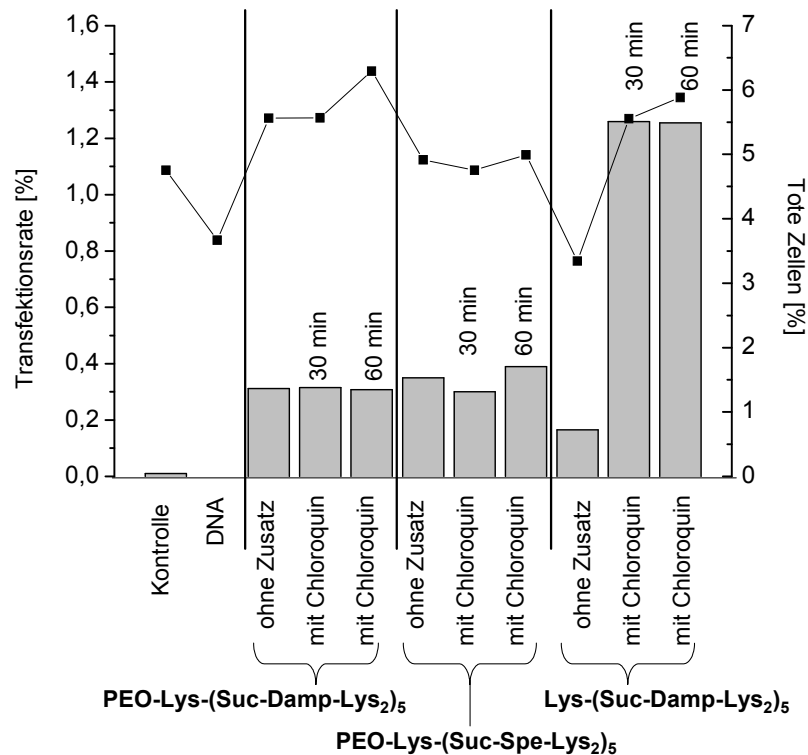


Abb. 7.6: Transfektionsergebnisse der FACS-Messung verschiedener PAA-Polyplexe mit pEGFP auf COS7-Zelllinie mit Präinkubation von Chloroquin (30, bzw. 60 min). Indizierung: Linie: tote Zellen, Balken: Transfektionsrate.

Bei der Polyplex-Probe des PAA-Segments ohne PEO-Block allerdings hat der Zusatz von Chloroquin eine Steigerung der Transfereffizienz um mehr als das 6 fache auf 1,2% zur Folge (Abb. 7.6). Die Zellaufnahme für diesen Polyplex lieferte zwar mit über 70% die bisher besten Werte der PAA-Systeme, aber die Transfereffizienz ohne Zusatz von Chloroquin blieb mit nur 0,1-0,2% hinter den Werten der PEO-PAA Blocksysteme zurück. Im Gegensatz zu den PEO-PAA Blocksystemen hat hier die Veränderung des endosomalen pH-Werts also einen starken Effekt auf die Freisetzung des Genmaterials. Warum es ausgerechnet bei diesem System zu einer starken pH-Wert-Abhängigkeit kommt, kann mit Hilfe der pH-Titrationsexperimenten der Polymere näher erklärt werden.

Abbildung 7.7 zeigt die Titrationskurve des reinen PAA-Segments Eda-Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅ in einer 150 mM NaCl-Lösung mit 0,1 N Natronlauge (NaOH). Die Amingruppen des Polymers liegen nach der Dialyse in Millipore-Wasser (pH 6) zum überwiegenden Teil bereits protoniert vor, so dass sich ein pH-Wert der Lösung von ca. 2,4 ergibt. Die Titration mit Natronlauge liefert den zu erwartenden Kurvenverlauf mit zwei Wendepunkten für die tertiären und primären Amingruppen bei pH = 5,33 und pH 8,83. Aus dem Verbrauch der Natronlauge lässt sich die Molzahl der protonierten Gruppen berechnen, die sowohl für die primären als auch für die tertiären Amingruppen mit dem theoretischen Wert der Anzahl protonierbarer Gruppen übereinstimmt. Wie zu erwarten liegt das PAA-Segment in Lösung also vollständig protoniert vor und alle Amingruppen sind für den Prozess der Deprotonierung frei zugänglich.

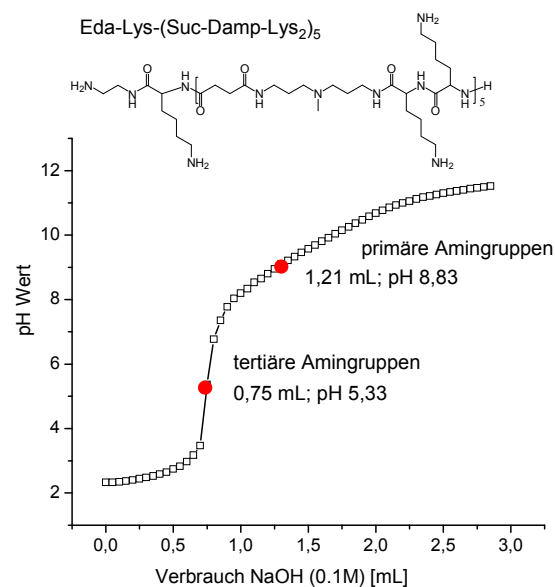


Abb. 7.7: pH-Titration des PAA Systems Eda-Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅ in 150 mM NaCl mit 1 N NaOH.

Auch das PAA-PEO Blockcopolymer PEO₆₀-Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅, mit dem selben PAA-Segment wie die zuvor untersuchte Probe, liegt nach der Aufarbeitung protoniert in Lösung vor und liefert einen pH-Wert der Lösung von 2,4 (Abb. 7.8).

Allerdings ergibt die Titration mit Natronlauge einen deutlich anderen Kurvenverlauf als für das reine PAA-Segment (vergl. Abb 7.6 und Abb. 7.7). Es wird trotz primärer und tertiärer Amingruppen nur ein Wendepunkt bei pH = 5,78 beobachtet. Darüber hinaus entspricht der Verbrauch der Natronlauge am Wendepunkt weder der theoretischen Anzahl der primären noch der tertiären Amingruppen. Eine mögliche Erklärung wäre die unvollständige Protonierung des Polymers in der Ausgangslösung. Die erneute Titration des Polymers bei vorheriger Zugabe von Salzsäure bis zu einem pH-Wert von 2 liefert jedoch eine

vergleichbare Titrationskurve (Daten nicht gezeigt). Lediglich der Verbrauch der Natronlauge liegt am Wendepunkt um den Betrag der zurück titrierten Salzsäure höher.

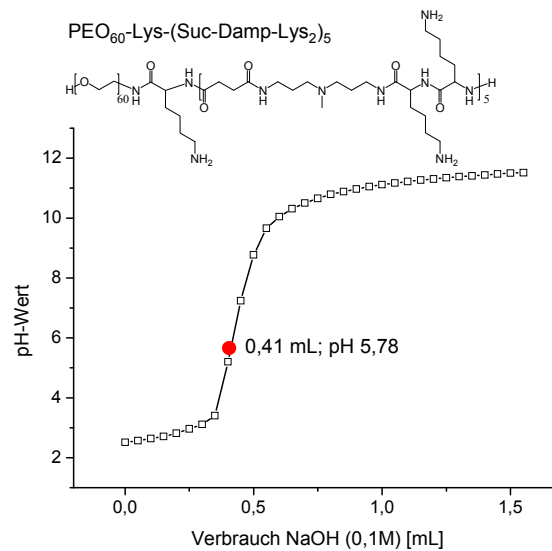


Abb. 7.8: pH-Titration des PAA Systems PEO₆₀-Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅ in 150 mM NaCl mit 1 N NaOH.

Im Unterschied zum reinen PAA-Segment bildet das PEO-PAA Blockcopolymer in Lösung Aggregate, wie bereits anhand der Daten von LS, SAXS und GPC diskutiert wurde (siehe Kapitel 5). Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Anbindung eines PEO-Blocks an ein hydrophiles Segment, das eine schwache Tendenz zur Ausbildung von Aggregaten zeigt, zu einer Stabilisierung der gebildeten Aggregate führt und somit Aggregation provozieren kann.^[132] Ein anderer Effekt, der zur Aggregation der Blockcopolymere beiträgt, ist möglicherweise der Entropieverlust durch die Zunahme der Molmasse. Diese hat den Verlust von Freiheitsgraden zur Folge und führt in diesem Fall wiederum zur Stabilisierung von Aggregaten.

Für die pH-Titration bedeutet die Bildung von Aggregaten zum einen die schlechtere Zugänglichkeit der Amingruppen.^[133] Zum anderen kann es innerhalb der Aggregate zu Nachbargruppeneffekten kommen.^[134] In der Literatur wird z. B. der Effekt der Delokalisierung von kationischen Ladungen in Oligoaminen wie z. B. dem Spermin beschrieben.^[135] Dabei kann die kationische Ladung einer Ammoniumgruppe durch eine nicht protonierte Amingruppe derselben Wiederholungseinheit delokalisiert und so mit stabilisiert werden. Es ist möglich, dass ein derartiger Schneller-Austausch-Effekt die Titration erschwert.

Der Einsatz von Chloroquin und die damit verbundene pH-Wert-Änderung im Endosom hat also vermutlich auf die PAA-Polyplexe einen stärkeren Effekt als auf die Blockcopolymer-Systeme, da sie als die schlechteren Protonenakzeptoren wirken und somit schwächer zur Anhebung des osmotischen Drucks, bzw. zur Wechselwirkung mit der Membran beitragen. Da aber bisher die Mechanismen der Freisetzung aus dem Endosom nicht vollständig verstanden sind, können die hier beobachteten Effekte nur als Folge möglicher Prozesse diskutiert werden. Im Gegensatz zu anderen nicht-viralen Vektoren bieten aber die monodispersen PAA-Systeme aufgrund ihrer definierten Struktur die Möglichkeit, die unterschiedlichen Effekte z. B. bei der Freisetzung, auf die Zusammensetzung und Struktur zurückzuführen. Für die hier vorgestellten Systeme besteht daher die Möglichkeit der systematischen Optimierung und somit einer Verbesserung etwa der Transfereffizienz.

Kapitel 8

Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese monodisperser, multifunktionaler Poly(amidoamine) (PAAs). Die Klasse der PAAs ist besonders interessant für eine Anwendung im Bereich der Biomedizin, da sie meist nicht toxisch ist, eine sehr geringe Immunogenizität zeigt und eine erhöhte Zellmembranpermeabilität besitzt. Allerdings ist der Einsatz linearer PAAs bisher limitiert, da ihre Synthese nur den Zugang von hochpolydispersen Systemen mit einer streng alternierenden oder statistischen Verteilung von Funktionalitäten erlaubt. Es ist daher von großem Interesse diese Polymerklasse durch die Möglichkeit eines sequenzdefinierten Aufbaus und der Integration von neuen Funktionalitäten zu verbessern.

Um dies zu ermöglichen, wurden, vergleichbar mit der etablierten Festphasensynthese von Peptiden, schrittweise funktionale Disäure- und Diamin-Bausteine an ein polymeres Trägerharz addiert. Der sequenzielle Aufbau ermöglicht die Synthese monodisperser PAAs und die Kontrolle über die Monomersequenz. Die Wahl der Monomer-Bausteine und ihrer Funktionalitäten kann dabei für jede Addition neu getroffen werden und entscheidet so über die Sequenz der Funktionalitäten im Polymerrückgrat.

Die verwendete Chemie entspricht dabei der Standardpeptidchemie, so dass mit Hilfe eines Peptidsynthese-Automaten die Synthese vollständig automatisiert werden konnte. Die Verwendung spezieller Trägerharze, die bereits mit einem synthetischen Polymerblock wie PEO oder auch mit einem Peptid vorbeladen waren, erlaubt die direkte Synthese von PEO- und Peptid-PAA Blockcopolymeren.

Da die hier dargestellten PAAs später auf ihre Eignung als multivalente Polykationen in der Gentherapie getestet werden sollten, wurden zunächst Bausteine gewählt, die den Einbau verschiedener Aminfunktionalitäten ermöglichen. Die Bausteine müssen dabei so gewählt sein, dass sie kompatibel sind mit der Chemie des Peptidsynthesizers und eine quantitative Addition ohne Neben- oder Abbruchreaktionen garantieren. Darüber hinaus ist der Einbau von Peptidsequenzen und Disulfid-Einheiten in die PAA-Kette möglich, die z. B. für einen selektiven Abbau des Polymers im Organismus genutzt werden können.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in dieser Arbeit vorgestellten PAA-Systeme großes Potenzial als nicht-virale Vektoren für die Gentransfektion bieten. Sie sind nicht toxisch und zeigen Zellaufnahme-Effizienzen von bis zu 77%. Die Gentransfereffizienz ist im

Vergleich zu etablierten Polymer-Vektoren zwar noch sehr gering, aber die bisherigen Versuche zeigen bereits eine mögliche Ursache, nämlich die schlechte Freisetzung des Genmaterials innerhalb der Zelle. Eine Lösung dieses Problems bietet jedoch die weitere Modifizierung der PAA-Systeme durch den Einbau von Sollbruchstellen. Diese Sollbruchstellen ermöglichen einen programmierten Abbau des Polymers innerhalb der Zelle und damit sollte die Freisetzung des Genmaterials vom Träger deutlich erleichtert werden. Mögliche Bruchstellen sind z. B. enzymatisch gezielt spaltbare Peptideinheiten oder Disulfid-Einheiten, wie sie bereits als Bausteine für die PAA-Synthese vorgestellt wurden (vergl. Kapitel 4.4). Da nur innerhalb der Zelle ein reduzierendes elektrochemisches Potential besteht, werden z. B. Disulfid-Einheiten auch nur dort gespalten und bieten außerhalb der Zelle ausreichende Stabilität zum Erhalt der Polyplexstruktur.

Neben einer Anwendung in der Gentherapie bieten die hier vorgestellten PAA-Systeme den Vorteil einer systematischen Untersuchung von Struktur-Eigenschafts-Beziehungen der Polyplexe. Es wurden verschiedene Zusammenhänge zwischen der chemischen Struktur der PAA-Segmente und der Art und Stärke der DNS-Komprimierung aufgezeigt. Die Komprimierungsstärke wiederum zeigte deutlichen Einfluss auf die Internalisierungsrate und damit auch Transfektionseffizienz. Darüber hinaus zeigte sich ein drastischer Einfluss des PEO-Blocks auf die Stabilisierung der Polyplexe sowie deren intrazelluläre Freisetzung bei Zusatz von Chloroquin.

Dennoch bleiben aufgrund der Komplexität der Zusammenhänge noch viele Mechanismen der Transfektion unverstanden, und es muss Aufgabe folgender Arbeiten sein, das Potential der hier eingeführten monodispersen PAA-Systeme weiter auszuloten. So wäre z. B. eine Korrelation der Kettenlänge mit den Parametern der Polyplexbildung, der Zellaufnahme und Transfektionseffizienz von großem Interesse. Darüber hinaus bietet der Einbau von Sollbruchstellen wie kurzen Peptidsequenzen oder den hier bereits eingeführten Disulfid-Einheiten neue Möglichkeiten der gezielten Freisetzung und des programmierten Abbaus, die näher untersucht werden müssen.

Neben der Anwendung im Bereich der Gentransfektion sind außerdem andere Gebiete für den Einsatz von monodispersen multifunktionalen PAAs denkbar, da diese kontrollierbare und einstellbare Wechselwirkungen ermöglichen. Sie wären z. B. geeignet für den Transport therapeutisch aktiver Proteine oder Cytostatika bzw. den Einsatz als Peptidomimetika zur Strukturinduktion und -kontrolle etwa beim Kristallwachstum.

Kapitel 9

Anhang

9.1 Experimenteller Teil

9.1.1 Synthese von N²,N³-bis(tert-butoxycarbonyl)spermin ((*t*Boc)Spe)

Benzaldehyd (5.25 g, 0.05 mol) wurde unter Rühren zu einer Lösung Spermin (5.00 g, 0.025 mol) in CHCl₃ (100 mL) zugetropft. Die Lösung wurde für 5 h am Rückfluß gekocht und dann auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurde in kleinen Portionen *t*Boc-Anhydrid (11.00 g, 0.05 mol) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 150 mL einer wässrigen KHSO₄-Lösung (1 M) über Nacht gerührt und das Reaktionsgemisch anschließend dreimal mit Ether (150 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaOH stark alkalisch gemacht, mit NaCl gesättigt und dann mit CHCl₃ extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Entfernen des Lösungsmittels lieferte 9.1 g (91%) des gewünschten Produktes.

¹H-NMR (CDCl₃; δ in ppm): 1.28 (m, 4 H), 1.39 (s, 18 H, ^tBoc), 1.65 (m, 4 H), 2.64 (m, 4 H), 2.75 (m, 2 H), 3.16 (m, 6 H)

¹³C-NMR: 26.1 (β -CH₂-N^tBoc), 28.1 (CH₃-^tBoc), 31.8 (β -CH₂-amin), 39.4 (α -CH₂-amin), 43.7 (α -CH₂-N^tBoc), 46.5 (α -CH₂-N^tBoc), 79.2 (CCH₃-^tBoc), 155.5 (C=O).

GC-MS: m/z = 402 (M_{th.} = 402.26 g/mol).

9.1.2 Allgemeine Reaktionsvorschrift zur Synthese der PAAs

Die Synthese der PAAse wurde vollautomatisch an einem ABI 433a Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems Deutschland durchgeführt. Der Synthesizer wurde mit den benötigten Chemikalien ausgerüstet und die Standard-Syntheseprotokolle (Fastmoc ABI) wurden für den folgenden Prozess modifiziert.

Das Harz (833 mg, 0.3 mmol/g, 0.25 mmol) wurde in einem 41 mL Reaktor vorgelegt und einmal mit CH₂Cl₂ und dreimal mit NMP gewaschen. Bernsteinsäureanhydrid (SucA) (250 mg, 2.5 mmol) wurde in 2.5 g NMP und DIPEA (1 mL, 5.7 mmol) gelöst. Diese Mischung wurde in den Reaktor transferiert und für 20 min geschüttelt. Dann wurde mit NMP und einer Mischung DIPEA in NMP gewaschen, um eventuell dargestellte lineare Anhydride

zu hydrolisieren. Dieser Kupplungsprozess wurde wiederholt bis mit einem negativen Kaiser-Test vollständige Umsetzung der Amin-Funktionen mit Bernsteinsäureanhydrid nachgewiesen werden konnte. Mit Hilfe des Malachit-Grün-Tests wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. Nach mehrfachem Waschen des Harzes mit DMF, wurde eine Lösung von PyBOP (1.0 g, 1.9 mmol) und HOBt (180 mg, 1.2 mmol) in 8 mL DMF in den Reaktor transferiert um dort die terminalen Carboxyl-Funktionen am Harz zu aktivieren. 2.5 mmol des Diamins wurden in DMF gelöst und in den Reaktor überführt, diese Mischung wurde für 25 min geschüttelt. Nach dem Waschen mit DMF wurde dieser Kupplungsprozess wiederholt, bis mit Hilfe eines negativen Malachit-Grün- und eines positiven Kaiser-Tests die vollständige Umsetzung der Carboxyl-Funktionen mit dem Diamin nachgewiesen werden konnte. Nach der erfolgreichen Kupplung eines Diamin-Bausteins kann eine Aminosäure in die Sequenz eingebaut werden. Dazu wird zunächst die entsprechende Fmoc-Aminosäure (1 mmol) in DMF gelöst und ihre Carboxyl-Funktion mit einer Lösung von HBTU in DMF (0,37 g, 0,98 Äq, 0,17 g/L) aktiviert. Die voraktivierte Aminosäure-Lösung wird dann in den Reaktor überführt und für 25 min geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit DMF gewaschen und dann mit einer Lösung von Piperidin in DMF (20 %) die Fmoc-Gruppe der terminalen Amin-Funktion abgespalten. Dieser Prozess kann über das UV-Signal der freien Fmoc-Gruppe quantitativ verfolgt werden und zeigt die Vollständigkeit der Kupplung (Abb. 9.1). Alle folgenden Kupplungen wurden diesem Protokoll folgend durchgeführt, NMP wurde in allen Fällen durch DMF ersetzt. Um das Produkt vom Harz abzuspalten, wurde das Harz zunächst gründlich mit CH_2Cl_2 gewaschen und in einen Kolben überführt.

Eine Lösung von 5% TFA in CH_2Cl_2 (300 mL) wurde hergestellt, auf das Harz gegeben und für 30 min geschüttelt. Im Fall des $^t\text{BocSpe}$ musste eine 30% Lösung TFA in CH_2Cl_2 verwendet werden um die ^tBoc -Schutzgruppen abzuspalten. Das Harz wurde in einer Glasfritte aufgefangen und die Lösung im Vakuum stark eingeeengt. Der Rückstand wurde aus Ether ausgefällt und getrocknet. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Rohprodukt in Wasser gelöst, dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

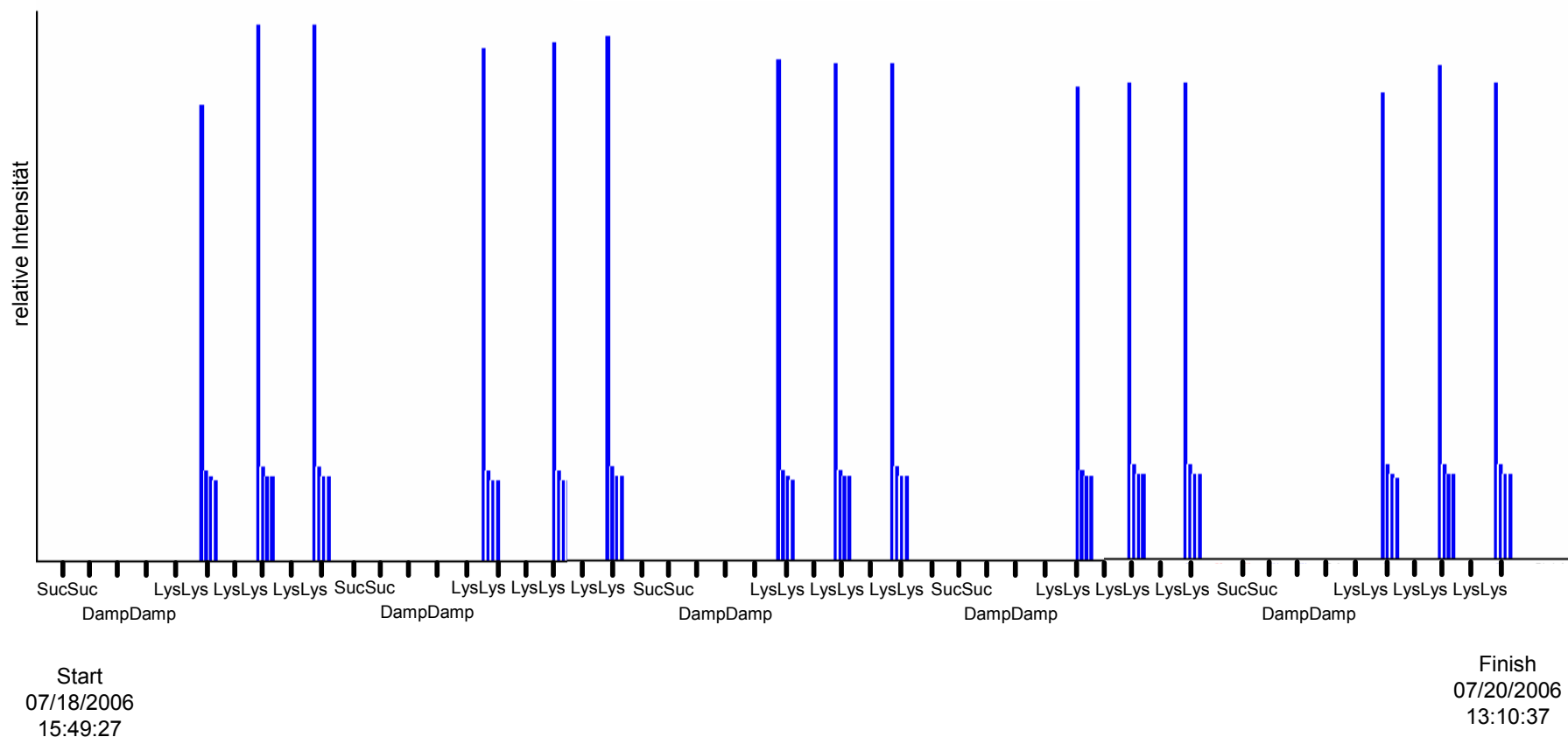


Abb. 9.1: UV-Signal der Fmoc-Abspaltung während der Synthese eines PAA-Segments der Sequenz (Suc-Damp-Lys₃)₅. Auf der y-Achse werden die Kartuschen aufgezeichnet, jeder Baustein wurde doppelt gekuppelt. Auf der x-Achse wird die prozentuale UV-Absorption gemessen. Bei der Abspaltung wird das Harz insgesamt 4mal mit Piperidin in DMF umgesetzt, so dass jeweils vier Signale pro Lysin-Baustein aufgezeichnet werden. Entscheidend ist dabei, dass jeweils das Signal der ersten Abspaltung für alle Kupplungen in etwa den gleichen Wert besitzt. Dies bedeutet den Erhalt aller funktionellen Gruppen, deren Konzentration z. B. durch Abbruchreaktionen reduziert werden könnte.

9.1.3 Analytik der PEO-PAA und Peptid-PAA Blockcopolymerer

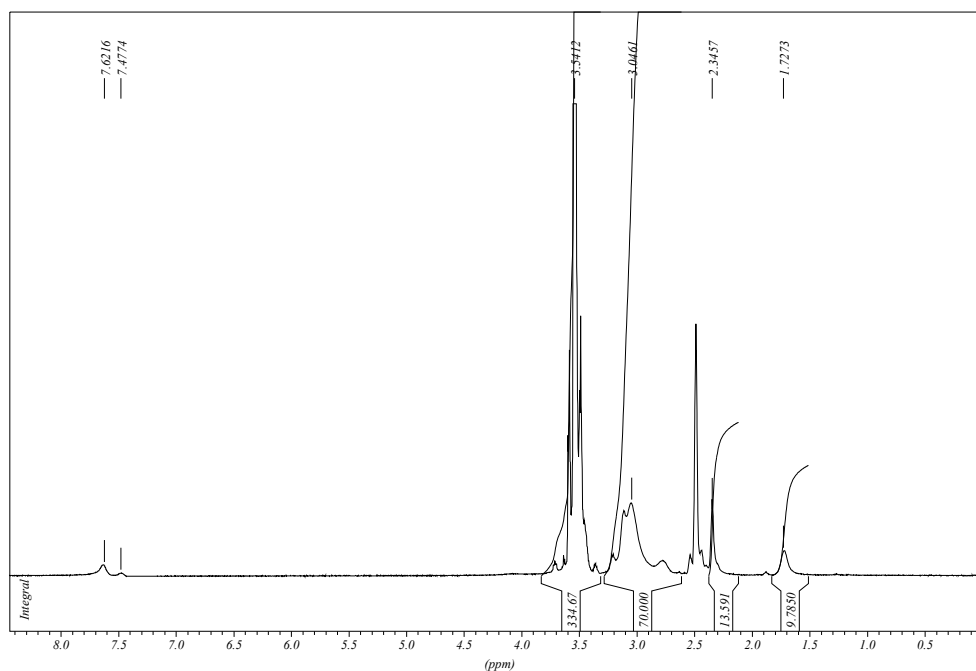
9.1.3.1 Analytik zu PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀

Abb. 9.2: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung PEO₆₀-(Suc-Damp)₁₀ gemessen in DMSO bei 100 °C.

¹H-NMR (DMSO; 100 °C) $\delta = 1.74 - 1.98$ (m, 10 H, β -CH-Amin), $2.21 - 2.41$ (m, 10 H, β -CH-Amin), $2.67 - 3.30$ (m, 70 H, α -CH₃-Amin, α -CH₂-Amin), $3.36 - 3.84$ (m, 344 H, O-CH₂-CH₂, O=C-CH₂-CH₂, α -CH₂-Amid, β -CH₂-Amid) ppm.

¹³C-NMR (DMSO; 100 °C) $\delta = 24.3$ (β -CH₂-Amin), 31.0 (O=C-CH₂-CH₂), 36.2 (α -CH₂-Amid), 53.3 (α -CH₃-Amin, α -CH₂-Amin), 60.1 (HO-CH₂), 69.9 (O-CH₂-CH₂), 171.7 (C=O) ppm.

FT IR (ν in cm⁻¹): 1651 (Amid I), 1555 (Amid II), 1103 (Ether), 963 (Amin).

TGA: T₂(Abbau) = 224 °C, T₁(max Abbau) = 409 °C, T_{5%} = 180 °C and DSC: T_m = 49 °C.

9.1.2.2 Analytik zu PEO₆₀-(Suc-Spe)₁₀

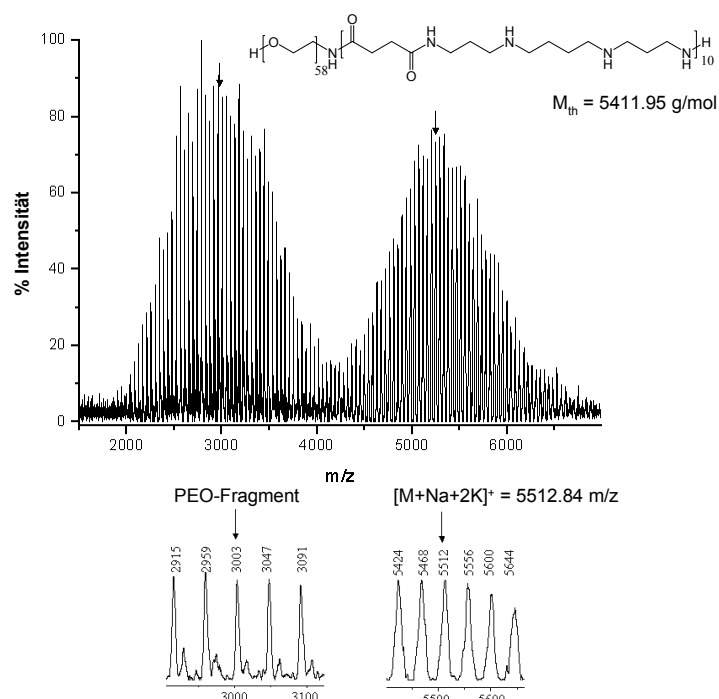


Abb. 9.3: MALDI-TOF-Spektrum der Verbindung PEO₆₀-(Suc-Spe)₁₀.

¹H-NMR (DMSO; 100 °C): δ = 1.36-1.98 (m, 20 H, β -CH₂-amin), 2.16-2.42 (m, 20 H, β -CH₂-amin), 2.73-3.33 (m, 80 H, α -CH₂-amin), 3.35-3.81 (m, 360 H, O-CH₂-CH₂, O=C-CH₂-CH₂, α -CH₂-amid, β -CH₂-amid) ppm.

¹³C-NMR (DMSO; δ = 22.8 (CH₂), 26.2 (β -CH₂-amin), 27.7 (β -CH₂-amin), 30.7 (O=C-CH₂-CH₂), 35.6 ((α -CH₂-amid), 44.6 (α -CH₂-amin), 46.2 (α -CH₂-amin), 60.3 (HO-CH₂), 72.4 (O-CH₂-CH₂), 171.6 (C=O) ppm.

FTIR (ν in cm⁻¹): 1651 (Amid I), 1562 (Amid II), 1103 (Ether), 955 (Amin).

MALDI-TOF-MS: m/z = 5512 ([M + Na]⁺ + 2K) (Abb. 9.3).

9.1.2.3 Analytik zu PEO₆₀-Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅

¹H-NMR (DMSO; 100 °C): δ = 1.23 – 1.46 (m, 22 H, β-CH₂-Lysin), 1.48 – 1.64 (m, 22H, γ-CH₂-Lysin), 1.64 – 1.90 (m, 22 H, α-CH₂-Lysin), 2.28 – 2.43 (m, 20 H, β-CH₂-Amin), 2.62 – 2.75 (m, 22 H, δ-CH₂-Lysin), 2.75 -2.85 (m, 15 H, α-CH₃-Amin), 2.92 – 3.31 (m, 31 H, α-CH₂-Amid), 3.40 – 3.74 (m, 20 H, α-CH₂-Amid), 3.80 – 4.25 (m, O=C-CH₂-CH₂, O=C-(NH), O-CH₂-CH₂-PEO), 7.50 – 8.15 (m, NH₂).

FTIR (ν in cm⁻¹): 1642 (Amid I), 1536 (Amid 2), 1171 (Ether), 1132 (Amin).

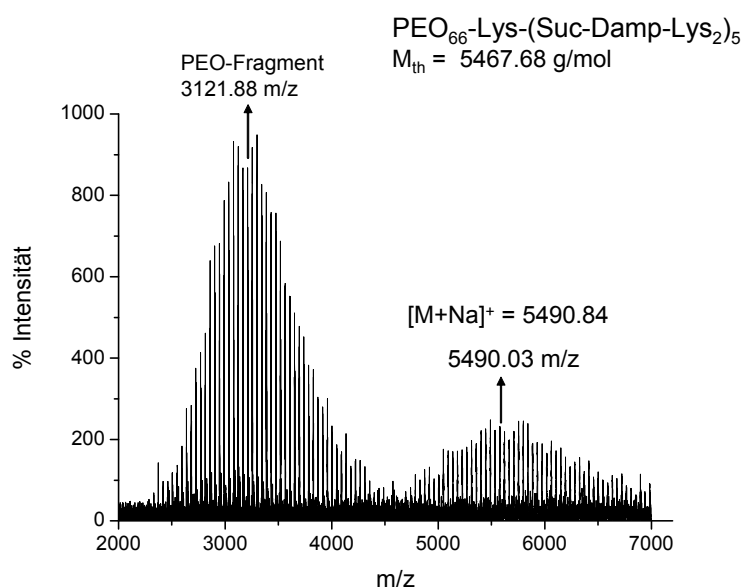


Abb. 9.4: MALDI-TOF-Spektrum der Verbindung PEO₆₀-Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅

9.1.2.4 Analytik zu PEO₆₀-Lys-(Suc-Spe-Lys₂)₅

¹H-NMR (DMSO; 100 °C): δ = 1.22 – 1.40 (m, 22 H, β-CH₂-Lysin), 1.48 – 1.64 (m, 22H, γ-CH₂-Lysin), 1.64 – 1.74 (m, 22 H, α-CH₂-Lysin), 2.24 – 2.40 (m, 20 H, β-CH₂-Amin), 2.72 – 2.83 (m, 22 H, δ-CH₂-Lysin), 2.87 – 2.99 (m, 20 H, β-CH₂-Amin), 3.00 – 3.16 (m, 20 H, α-CH₂-Amid), 3.16 – 3.75 (m, 40 H, α-CH₂-Amin, O=C-CH₂-CH₂, O=C-(NH), O-CH₂-CH₂-PEO), 7.50 – 8.00 (m, NH₂).

FTIR (ν in cm⁻¹): 1780 (Amid I), 1653 (Amid II), 1166 (Ether), 1082 (Amin).

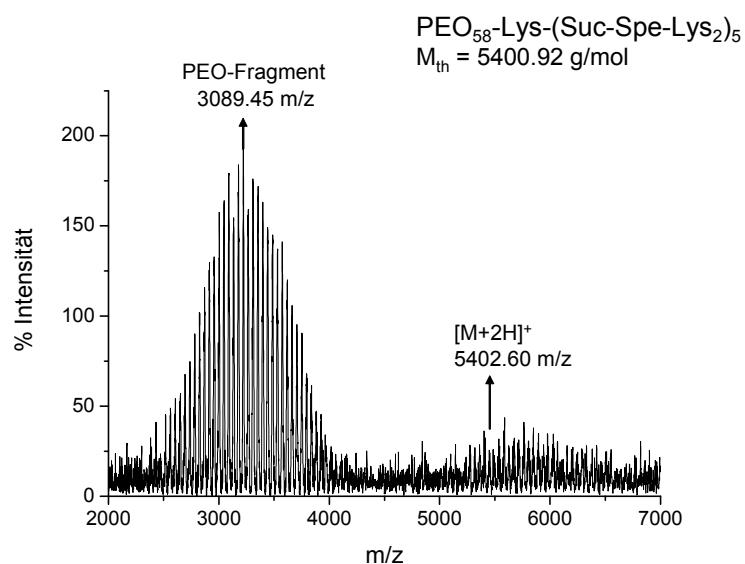


Abb. 9.5: MALDI-TOF-Spektrum der Verbindung PEO₆₀-Lys-(Suc-Spe-Lys₂)₅

9.1.2.5 Analytik zu Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅

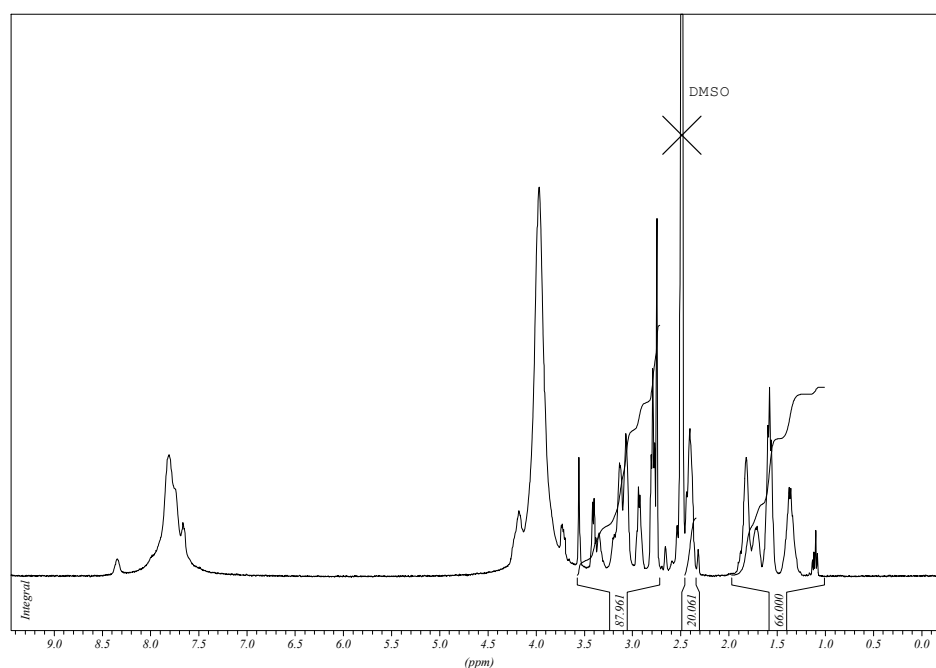


Abb. 9.6: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung Lys-(Suc-Damp-Lys₂)₅ gemessen in DMSO bei 100 °C.

¹H-NMR (DMSO; 100 °C) δ = 1.04 – 1.48 (m, 22 H, β -CH₂-Lysin), 1.50 – 1.68 (m, 22H, γ -CH₂-Lysin), 1.68 – 1.90 (m, 22 H, α -CH₂-Lysin), 2.26 – 2.44 (m, 20 H, β -CH₂-Amin), 2.68 – 2.88 (m, 22 H, δ -CH₂-Lysin), 2.90 – 3.08 (m, 15 H, α -CH₃-Amin), 3.08 – 3.28 (m, 31 H, α -CH₂-Amid), 3.28 – 3.46 (m, 10 H, α -CH₂-Amid), 3.50 – 3.78 (m, 10 H, α -CH₂-Amid), 3.80 – 4.25 (m, O=C-CH₂-CH₂, O=C-(NH)), 7.50 – 8.10 (m, NH₂).

^{13}C -NMR (DMSO; δ = 22.7 (δ - CH_2 -Lysin), 24.4 (β - CH_2 -Amin, β - CH_2 -Lysin), 27.0 (α - CH_2 -Lysin, γ - CH_2 -Lysin), 31.2 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 36.5 (α - CH_2 -Amid), 54.0 (α - CH_3 -Amin, α - CH_2 -Amin), 70.5 (CH -Lysin).

FTIR (ν in cm^{-1}): 1642 (Amid I), 1536 (Amid II), 1133 (Amin).

MALDI-TOF: m/z = 2646 ($[\text{M}+\text{K}]^++2\text{H}$) und PAA-Fragmente

9.1.3 Kolorimetrische Tests der PAA-Festphasensynthese

9.1.3.1 Malachitgrün-Test:

Es wurde eine 0.25% Lösung von Malachitgrün-Oxalat in Ethanol hergestellt. Das zu testende Harz wurde gründlich mit dem zuvor verwendeten Lösungsmittel und anschließend mit Dichlormethan und Diethylether gewaschen. Das Harz wurde getrocknet und mit 1 mL der Malachitgrün-Oxalat-Lösung überschichtet. Es wurden 3-5 Tropfen DIPEA zugesetzt und die Lösung gut durchmischt. Nach 3 Minuten wurde das Harz über einer Glasfritte abfiltriert und gründlich mit Ethanol gewaschen. Eine verbleibende Grünfärbung des Harzes indiziert freie Carboxylfunktionen an der Festphase.

9.1.3.2 Kaiser-Test

Die zu verwendenden Lösungen A, B und C wurden wie in der Literatur beschrieben hergestellt. Das zu testende Harz wurde gründlich mit dem zuvor verwendeten Lösungsmittel und anschließend mit Dichlormethan und Diethylether gewaschen. Das getrocknete Harz wurde in ein Reagenzglas überführt und mit jeweils 3-5 Tropfen der Lösungen A, B und C versetzt. Das Gemisch wurde für insgesamt maximal 5 Minuten auf 80 °C erhitzt und alle 30 s die Färbung des Harzes überprüft. Die Blaufärbung des Harzes indiziert freie Aminfunktionen an der Festphase.

9.1.4 Aufarbeitung von Cystamin (Cya)

Cystamin ist nur als Dichlorid-Salz kommerziell erhältlich, muss aber für den Einsatz in der PAA-Festphasensynthese in das freie Diamin überführt werden. Dazu wurde das Salz (25 g, 0,1 mol) zunächst in Wasser gelöst und die Mischung anschließend mit Natronlauge (1N) stark alkalisch gemacht. Die Lösung wurde anschließend mit Chloroform extrahiert (3*150 mL) und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als gelbe Flüssigkeit gewonnen (Ausbeute: 58 %).

GC-MS: m/z : 153 ($M_{\text{th.}} = 153,24$ g/mol)

9.1.5 Spaltung der Disulfid-Einheit zwischen PEO- und PAA-Block

Die Synthese des PEO-PAA Blockcopolymers PEO-Suc-Cya-(Suc-Damp)₃ mit einer Disulfid-Einheit zwischen den beiden Blöcken wurde nach den Standardprotokollen der automatisierten PAA-Synthese (Kapitel 4.1) an einem Wang-PAP-Harz durchgeführt. Das Blockcopolymer wurde mit 5% TFA in DCM vom Harz abgespalten, in Wasser dialysiert (MWCO: 1000 g/mol), gefriergetrocknet (Ausbeute: 36 %) und mit Hilfe der Massenspektrometrie charakterisiert (Abb. 9.7).

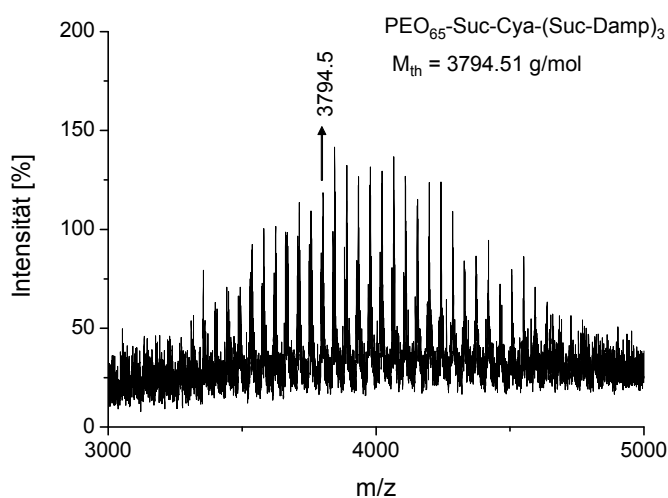


Abb. 9.7: MALDI-TOF-Spektrum der Verbindung PEO₆₀-Suc-Cya-(Suc-Damp)₃

Um die Spaltbarkeit der Disulfid-Einheit zu überprüfen wurden 20 % des getrockneten Harzes (0,05 mmol) aus der Blockcopolymer-Synthese in einen Kolben mit Schutzgas (Argon) überführt und mit destilliertem und entgastem DMF überschichtet. Als Reduktionsmittel wurde DTT (19 mg, 2,5 Äq, 0,125 mmol) in destilliertem und entgastem DMF unter Schutzgas in einem zweiten Kolben gelöst und diese Lösung dann auf das Harz überführt. Diese Mischung wurde für eine Stunde unter Schutzgas gerührt und anschließend durch Filtration das Harz von der Lösung getrennt. Zur Lösung wurde Mercaptoethanol (35 µL, 10 Äq, 0,5 mmol) zugesetzt und dann eine Mischung aus Iod in DMF solange tropfenweise zugefügt bis eine konstante Gelbfärbung der Lösung auftritt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und dialysiert (MWCO: 500 g/mol). Das Produkt wird nach der Gefriertrocknung als farbloser Feststoff gewonnen (Ausbeute: 11 %) und mit Hilfe der ESI-MS charakterisiert (Kapitel 4.4). Das abfiltrierte Harz wurde gründlich mit DMF gewaschen und dann mit einer Lösung aus Mercaptoethanol (70 µL, 20 Äq, 1 mmol) in DMF überschichtet. Zu dieser Mischung wurde solange Iod in DMF zugetropft bis eine konstante Gelbfärbung entstand. Dann wurde das

Harz gründlich mit DMF und DCM gewaschen und anschließend mit 5 % TFA in DCM für 30 min abgespalten. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand in Diethylether ausgefällt. Nach erneutem Umfällen aus MeOH/Diethylether wurde das Produkt als farbloser Feststoff gewonnen (Ausbeute: 23 %) und mit Hilfe der MALDI-TOF-MS charakterisiert (Abb. 9.8).

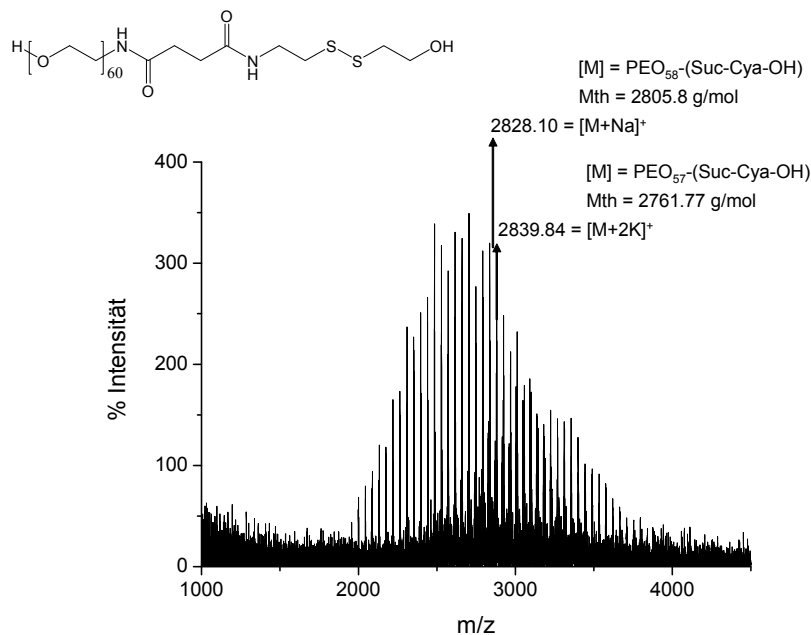


Abb. 9.8: MALDI-TOF-Spektrum des PEO-Blocks nach erfolgreicher Abspaltung des PAA-Blocks über eine Cystamin-Einheit und anschließende Oxidation in Anwesenheit von Mercaptoethanol.

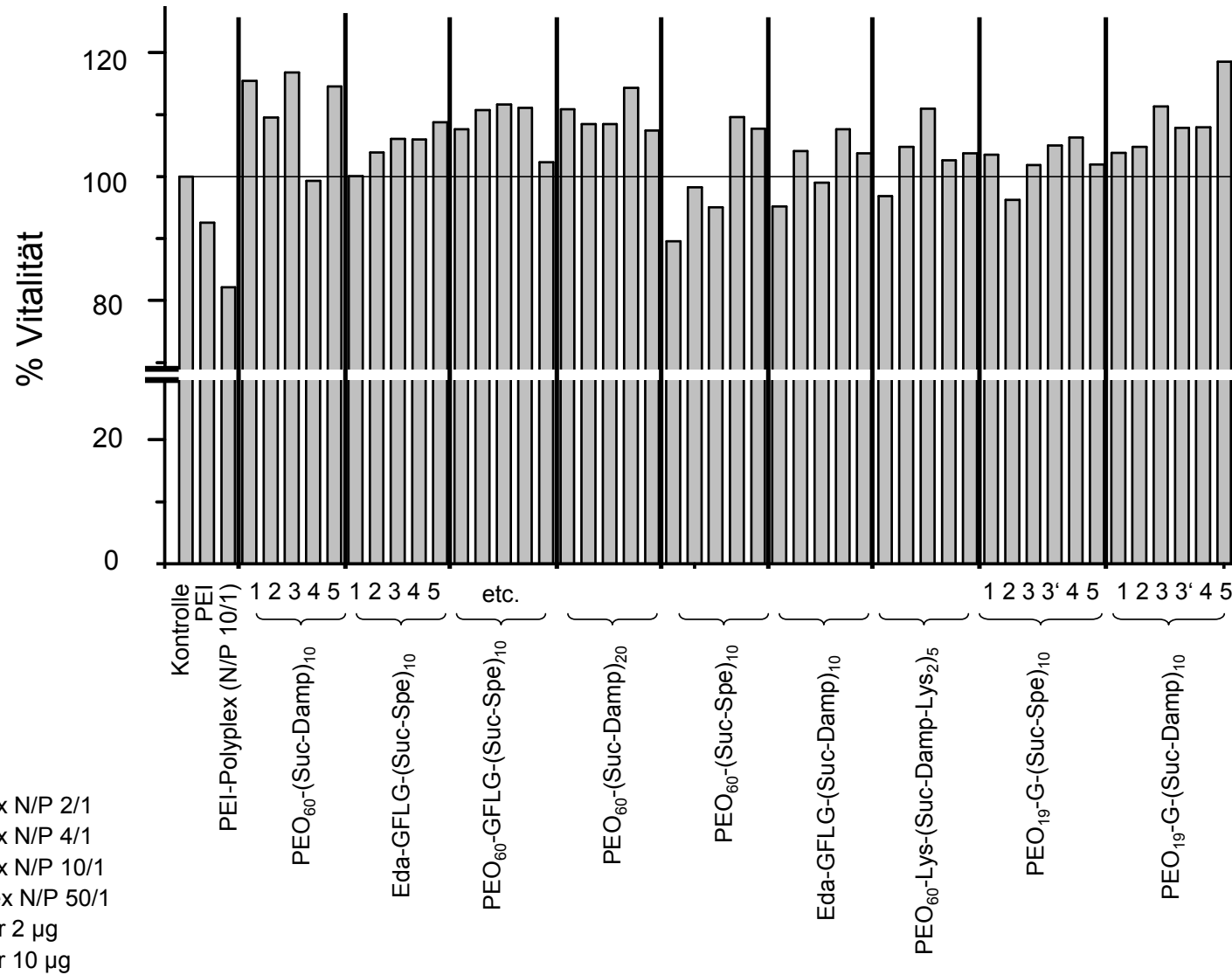
9.1.6 Ethidiumbromid-Assay

Es wurde Lösungen von Ethidiumbromid (0,3 mg/mL), GFP-Plasmid (0,016 mg/mL, $6 \cdot 10^{-5}$ mmol/mL P, 1 Äq(P)/mL) und den zu untersuchenden Polymeren (10 Äq(N)/mL) in TRIS-Puffer (10 mM, pH 8) hergestellt. Die in der folgenden Tabelle dargestellten Proben wurden in Fluoreszenz-Einmalküvetten gemischt und für 1 h vor Licht geschützt, bevor sie anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 595$ nm vermessen wurden.

Probe	Volumen [μ L]		
	nur EB	EB + Plasmid	Polyplexe
EB-Lösung	20	20	20
Plasmid-Lösung	0	65	65
Polymerlösung	0	0	40
Puffer	1980	1915	1875

Tabelle 9.1: Proben der Polyplexe für den Ethidiumbromid-Assay

9.1.7 Experimente zur Zellvitalität in Anwesenheit von PAA-Systemen



9.1.8 Fluoreszenzmarkierung der PAA-Systeme

Das zu markierende Polymer (0,01 mmol, 1 Äq) wurde in NaH_2PO_4 -Puffer (10 mM, pH 10) gelöst und mit einer Lösung Fluorescein Isothiocyanat (5,77 mg, 0,015 mmol, 1,5 Äq) ebenfalls in NaH_2PO_4 -Puffer gemischt. Die Mischung wurde 1d unter Ausschluss von Licht gerührt und anschließend durch Dialyse gegen Wasser (MWCO: 1000 g/mol) überschüssiger Farbstoff und Salz entfernt. Die Dialyse wurden ebenfalls unter Ausschluss von Licht durchgeführt um ein Verblässen des Farbstoffs zu verhindern. Das Produkt wurde durch Gefriertrocknung als orangefarbener Feststoff gewonnen (Ausbeute: 42 %).

9.2 Methoden

9.2.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker DPX 400-Spektrometer in DMSO-d_6 bei 100 °C bei 400 MHz ($^1\text{H-NMR}$), bzw. 100 MHz ($^{13}\text{C-NMR}$) gemessen. Signale von Spuren nicht-deuterierter Lösungsmittel dienten als interne Standards bezogen auf Tetramethylsilan. Zur Bearbeitung der Spektren wurde das Programm Win-NMR (Bruker) verwendet.

9.2.2 Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS/ MALDI-TOF-TOF-MS)

Die Matrix-assistierte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie wurde mit einem Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation MALDI-TOF-Massenspektrometer der Firma Perseptive Biosystems, Inc. Framingham, MA, USA durchgeführt. Die MALDI-TOF-TOF-Messungen wurden an einem 4700 Proteomics Analyzer der Firma Applied Biosystems, Framingham, Inc., MA, USA durchgeführt, der mit einem Nd:YAG Laser (355 nm, Frequenz 200 Hz) ausgestattet war. Die Proben wurden in einer Konzentration von 0,1 mg/mL in Methanol/Acetonitril (1:1, mit oder ohne Zusatz von 0,1 % TFA (v/v))gelöst. Es wurde 1 μl dieser Lösung mit 1 μl einer α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure-Matrix-Lösung (10 mg/mL in 0,3 % TFA in Methanol/Acetonitril (1:1) (v/v)) gemischt. Von dieser Mischung wurde 1 μl auf eine Probenplatte aufgebracht und bei 24 °C getrocknet. Die Messungen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV durchgeführt. Jedes Spektrum wurde aus 250 Beschüssen mit dem Laser gemittelt.

9.2.3 Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Messungen wurden an einem ESI-MS qp8000 α der Firma Shimadzu, Duisburg, Deutschland durchgeführt. Die Probe wurde mit einer Konzentration von 1 mg/mL in Methanol mit 0,1 % Ameisensäure (v/v) gelöst und anschließend 10 μ l dieser Lösung mit Hilfe eines Autosamplers eingespritzt. Es wurde Stickstoff als Trägergas (4,5 mL/min) verwendet und die Probe im positiven Modus mit einer Detektorspannung von 1,6 kV, einer Düsentemperatur von 150 °C und einer Spannung von 4,5 kV vermessen.

9.2.4 Größenausschlußchromatographie (GPC)

Die Messungen wurden in NMP bei 70 °C durchgeführt. Die Trennung erfolgte über eine GRAM-Säule der Firma PSS, Mainz, Deutschland bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 mL/min. Die Detektion der Fraktionen erfolgte an einem RI- (Shodex-RI-70) und einem UV-Detektor (TSP UV 1000; 270 nm). Zur Kalibrierung wurden PEO-Standards der Firma PSS, Mainz, Deutschland verwendet.

9.2.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Aufnahmen wurden mit einem NanoScope IIIa-Gerät der Firma Veeco Instruments, Santa Barbara, CA, USA im "tapping mode" angefertigt. Es kamen kommerzielle Siliciumspitzen (Typ NCR-W) zum Einsatz, deren Tip-Radius zwischen 6 und 10 nm groß ist. Eine Tip-Korrektur wurde nicht durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer Kraftkonstante von 42 N \cdot m⁻¹ bei einer Resonanzfrequenz von 285 kHz angefertigt. Die Abbildung wurde mit einem 10 \cdot 10 μ m e-Scanner aufgenommen. Die Probenpräparation erfolgte durch Spincoating der Polyplox-Lösungen in TRIS-Puffer (10 mM, pH 8.0) auf frisch abgezogenen Mica-Substraten. Es wurden jeweils 5 μ l Lösung auf das stehende Substrat aufgetropft, etwa 5 min gewartet und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 5000 min⁻¹ bis zur Trockne rotiert.

9.2.6 Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS)

Die SAXS-Messungen in Lösung erfolgten mit einer Kratky-Kamera in einer justierten Kapillare, so dass der Röntgenstrahl stets dieselbe Stelle der Kapillare traf. Die Probe wurde unter Vakuum mit Röntgenstrahlung der Wellenlänge $\lambda = 0,154$ nm (Cu-K α) durchstrahlt. Zunächst wurde das Lösungsmittel unter gleichen Bedingungen vermessen und anschließend die 4 w%-Lösung des Polymers in Wasser.

9.2.7 Lichtstreuung (LS)

Messungen der dynamischen Lichtstreuung wurden mit einem kommerziellen Goniometer mit Temperaturkontrolle ($\pm 0,05$ K) und angeschlossenen Photomultiplier, sowie einem Multiple-Tau Digitalkorrelator (ALV 5000) der Firma ALV, Langen durchgeführt. Als Lichtquelle diente ein Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge $\lambda = 633$ nm der Firma Polytec (Modell PL 3000) mit 34 mW Leistung. Die aufgenommene Korrelationsfunktion wurde mit *Contin* in eine intensitätsgewichtete Radienverteilung umgerechnet. Die zylindrischen Quarzküvetten (1 cm Durchmesser) wurden mit Tensidlösung (Hellmanex, Hellma) im Ultraschallbad gereinigt, mit Reinswasser mehrfach gespült, anschließend in einer Acetondestillie mindestens 10 min staubfrei gespült und bis zum Gebrauch in einem Exsikator aufbewahrt.

9.2.8 Fluoreszenz

Die Messungen der Fluoreszenz wurden in Kunststoff-Einmalküvetten an einem Lumineszenz Spektrometer der Firma Perkin Elmer, Connecticut, USA bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 595$ nm durchgeführt.

9.2.9 pH-Titration

Die Titrationskurven wurden mit Hilfe des automatischen Titriergeräts 702 SM Titrino der Firma Metrohm, Filderstadt, Deutschland bei Zugabe von 0,1 N NaOH aufgezeichnet. Die Polymere wurden in 150 mM NaCl-Lösung gelöst. Die Konzentration betrug mindestens 20 mg/mL. Es wurden je mindestens zwei Messungen durchgeführt. Darüber hinaus wurden Polymerlösungen vermessen, die zunächst ebenfalls mit Hilfe des Titriergeräts und 1 N HCl auf einen pH-Wert von 2,0 gebracht wurden.

9.3 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie, -mikroskop)
CDCl ₃	Chloroform, deuteriert
CID	Collision Induced Dissociation (engl.): Kollisionsinduzierte Dissoziation
cos-7	Affennierenkarzinom-Zelllinie
Cya	Cystamin
Damp	3,3'-Diamino-N-methyldipropylamin
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DIC	Diisopropylcarbodiimid
digest.	digested (engl.): verdaut
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EB	Ethidiumbromid
EPR	enhanced permeability and retention
ESI	Elektrospray-Ionisation
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (engl.): fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFP	Green Fluorescent Proteine (engl.): grün-fluoreszierendes Protein
GPC	Gelpermeationschromatographie
HAEC	Humanzelllinie
HBTU	O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
LS	Lichtstreuung
Lys	L-Lysin
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
M _n	zahlengemitteltes Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
M _w	massengemitteltes Molekulargewicht

NMP	2-N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (kernmagnetische Resonanz)
PAA	Poly(amidoamin)
pEGFP	Plasmid Enhanced Green Fluorescent Proteine
PEI	Polyethylenimin
PEO	Polyethylenoxid
PLL	Poly-L-Lysin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidonophosphonium-hexafluorophosphat
SAXS	Small Angle X-ray Scattering (Kleinwinkelröntgenstreuung)
Spe	Spermin
Suc	Succinic Anhydride (Bernsteinsäureanhydrid)
^t Boc	<i>tert.</i> Butyl-oxy-carbonyl
TFA	Trifluoroacetic Acid (Trifluoressigsäure)
TOF	Time-of-Flight (Flugzeit)

Kapitel 10

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Antonietti für die Möglichkeit am MPI zu promovieren, für seinen fachlichen Rat und die zahlreichen Ideen. Vor allem aber auch dafür, dass die Zeit an seinem Institut meine Begeisterung und Freude an der Chemie noch weiter bestärkt hat.

Mein großer Dank gilt auch Dr. Hans Börner, meinem Betreuer, für viele Antworten und noch mehr Fragen, die meine Arbeit vorangebracht haben und mir viel über das Wesen der Wissenschaft gezeigt haben. Auf das noch zahlreiche Generationen neuer DoktorandInnen dem AK Börner beitreten und ihn erfolgreich wieder verlassen!

Ich danke vor allem meiner Gruppe für eine schöne und spannende Zeit im AK Börner. Besonders danke ich Katharina Ostwald und Jessica Brandt für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und in allen anderen Bereichen des Lebens. Madonna und Farin gehören für immer zu meinem Textrepertoire! Doreen Eckhardt hat mich vor vielen Fehlern bewahrt und mir dabei noch Lachfalten, laute Musik und schöne Momente beschert. Vielen Dank!

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Stefanie Häfele und Dr. Regine Peschka-Süss, für die erfolgreiche Zusammenarbeit und ihre tatkräftige Unterstützung, die gemeinsamen Ideen und die schöne Zeit in Freiburg, Golm und Mainz. Ich danke auch Felicitas Hens und Birgid Erhard für ihre Hilfe im Labor.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Eberhard Krause und Heike Stephanowitz für zahllose Massenspektren, die gute und kreative Zusammenarbeit und viel Geduld mit mir und meinen Polymeren.

Dank gilt auch der Kaffeerrunde: Ines Below für Rat und Tat, Jens Hentschel für's Kickern und Georg Garnweitner für seinen österreichischen Humor. Ganz besonders danke ich Jens Weber und Julia Maier für eine tolle gemeinsame Zeit in Golm, Potsdam, Berlin, Köln und hoffentlich noch in vielen anderen Städten ...

Ich danke meinen Bürokolleginnen Justyna Justynska, Danielle Franke, Zofia Hordyjewicz und Anja Gress.

Danken möchte ich auch den DoktorandenvertreterInnen Christian, Melanie, Renate, Kerstin, Wolfgang, Oliver, Florian, meinem Nachfolger Jens und der Gleichstellungsbeauftragten Antje. Power to the people!

Ein großes Dankeschön an alle Organisatoren des ersten DoktorandInnen-Workshops der MPG „Global Changes“, vor allem Johanna Havemann für ihren Idealismus.

Ich möchte mich bei Harald und Alexandra bedanken, die im Rahmen eines Praktikums an dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Großer Dank gilt auch Anne Heilig, für zahlreiche AFM-Aufnahmen von besonders guter Qualität. Olaf Niemeyer danke ich für viele, viele NMR-Messungen inklusive Sonderwünschen, Heidi Zastrow für diverse Zeta-Potential-Messungen, Margit Barth für die Leihgabe und Hilfe mit dem Mikrofluidizer und Irina Shekova für die Hilfe mit den Titrationsmessungen.

Marlies Gräwert und Dr. Helmut Schlaad danke ich für zahlreiche GPC-Messungen, das Umbauen der Anlage, ihre Risikobereitschaft und die viele Hilfe beim Auswerten der Daten.

Birgit Schonert und Dr. Reinhard Sigel danke ich für die vielen LS-Messungen sowie deren Auswertung und Interpretation und ein kleines bisschen Freiburg in Golm.

Dr. Bernd Smarsly danke ich für die Röntgenmessungen, deren Auswertung und Interpretation.

Antje Völkel und Dr. Helmut Cölfen danke ich für die UZ-Messungen und immer neuen Lösungsvorschläge.

Ich danke Tilo für seine Unterstützung und Hilfe, aber vor allem für seine Freundschaft!

Ganz besonders und noch mehr möchte ich meiner Familie danken, für ihre Unterstützung und dass sie mich meinen Weg haben gehen lassen.

Literatur

- 1 Hoffman, A. S.; *Clinical Materials*; **1992**; *11*; 13.
- 2 Navarro, M., Aparicio, C., Charles-Harris, M., Ginebra, M. P., Engel, E., Planell, J. A.; *Advances in Polymer Science*; **2006**; *200*; 209.
- 3 Miller, N. D., Williams, D. F.; *Biomaterials*, **1984**, *5*; 356.
- 4 Drug delivery Polymere
- 5 Duncan, R.; *Nature Reviews*; **2003**; *2*; 347.
- 6 Benita, S., Hoffman, A., Donbrow, M.; *The Journal of pharmacy and pharmacology*; **1985**; *37*; 391.
- 7 Mukherjee, S., Das, L., Kole, L., Karmakar, S., Datta, N., Das, P.K.; *Journal of Infectious Diseases*; **2004**; *189*; 1024.
- 8 Mahkam, M., Allahverdipoor, M., Mohammadi, R., Ranaei-Siadat, S. O., Rashidi, M. R., Davaran, S., Barshan, M., Ranaei-Siadat, S. E.; *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*; **2006**; *21*, 135.
- 9 Varshosaz, J., Sadrai, H., Alinagari, R.; *Journal of Microencapsulation*; **2004**; *21*; 761.
- 10 Veronese, F.M., Schiavon, O., Pasut, G., Mendichi, R., Andersson, L., Tsirk, A., Ford, F., Wu, G. Kneller, S., Davies, J., Duncan, R.; *Bioconjugate Chemistry*; **2005**; *16*; 775.
- 11 Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K.; *Journal of Controlled Release*; **2000**; *65*, 271.
- 12 Pegasys
- 13 Wagner, E., Kloeckner, J.; *Advances in Polymer Science*; **2006**; *192*; 135.
- 14 Duncan, R., Ringsdorf, H., Satchi-Fainaro, R.; *Advances in Polymer Science*; **2006**; *192*; 1.
- 15 <http://wiley.co.uk/genetherapy/clinical>
- 16 Young, L.S., Searle, P.F., Onion, D., Mautner, V.; *Journal of Pathology*; **2006**; *208*, 299.
- 17 Dewey R.A., Morrissey G., Cowsill C.M., Stone D., Bolognani F., Dodd N.J., Southgate T.D., Klatzmann D., Lassmann H., Castro M.G., Lowenstein P.R.; *Nature Medicine*; **1999**; *5*; 1256.
- 18 Smaglik P.; *Nature*; **1999**; *402*; 707.
- 19 Akhtar, S.; *Gene Therapy*; **2006**; *13*; 739.
- 20 Clark, P.R., Hersh, E.M.; *Current Opinion in Molecular Therapeutics*; **1999**; *1*; 158.
- 21 Pagano J.S., Vaheri A; *Archiv fur die gesamte Virusforschung*; **1965**; *17*; 456.
- 22 Wagner, E., Kloeckner, J.; *Advances in Polymer Science*; **2005**; *192*; 135.
- 23 Kauwe-Medina, L.K., Xie, J., Hamm-Alvarez, S.; *Gene Therapy*; **2005**; *12*; 1734.
- 24 Labhsetwar, V.; *Current Opinion in Biotechnology*; **2005**; *16*; 674.
- 25 Terasaki M., Jaffe L. A.; *Methods in cell biology*; **2004**; *74*; 469.
- 26 Godbey, W.T., Wu, K. K., Mikos, A.G.; *Journal of Controlled Release*; **1999**; *60*; 149.
- 27 Boussif, O., Lezoulac'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B.; *Procedures of the National Academy of Science*; **1995**; *92*; 7297.
- 28 Remy, J.-S., Abdallah, B., Zanta, M.A., Boussif, O., Behr, J.-P., Demeneix, B.; *Advanced Drug Delivery Reviews*; **1998**; *30*; 85.
- 29 Choosakoonkriang, S, Lobo, B.A., Koe, G.S., Koe, J.G., Middaugh, C.R.; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **2003**; *92*; 1710.
- 30 Mishra, S., Webster, P., Davis, M.E.; *European Journal of Cell Biology*; **2004**; *83*; 97.

- 31 Park, T.G., Jeong, J.H., Kim, S.W.; *Advanced Drug Delivery Reviews*; **2006**; 58; 467.
- 32 Ferruti, P., Marchisio, M.A., Duncan, R.; *Macromolecular Rapid Communications*; **2002**; 23; 332.
- 33 Ferruti, P., Franchini, J.; *Polymeric Gene Delivery*; **2005**; 255.
- 34 Ferruti, P., Franchini, J.; *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*; **2004**; 19; 221.
- 35 Santhakumaran, L.M., Chen, A., Pillai, C.K.S., Thomas, T., He, H., and Thomas, T.J.; *Nanofabrication Towards Biomedical Applications*; C.S.S.R. Kumar, J.Hormes, C.Leuschner (eds.); Wiley-VCH Verlag, Weinheim; **2005**; 253.
- 36 Wilson, L.R., Tomalia, D.A.; *Polymer Preprints*; **1989**; 30; 115.
- 37 Dey, R.K., Ray, A.R.; *Biomaterials*; **2003**; 24; 2985.
- 38 Christensen, L.V., Chang, C.-W., Kim, W.J., Kim, S.W.; *Bioconjugate Chemistry*; **2006**; 17; 1233.
- 39 Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., Yan, J.; *Journal of Controlled Release*; **2006**; 114; 100.
- 40 Zhang, X., Godbey, W.T.; *Advanced Drug Delivery Reviews*; **2006**; 58; 515.
- 41 Ferruti, P., Ranucci, E., Trotta, F., Gianasi, E., Evagorou, E.G., Wasil, M., Wilson, G., Duncan, R.; *Macromolecular Chemistry and Physics*; **1999**; 200; 1644.
- 42 Hunter, A.C. and Moghimi, M.; *Drug Discovery Today*; **2002**; 7; 998.
- 43 Ferruti, P., Manzoni, S., Richardson, S.C.W., Duncan, R., Patrick, N.G., Mendichi, R., and Casolaro, M.; *Macromolecules*; **2000**; 33; 7793.
- 44 Griffiths, P.C., Paul, A., Khayat, Z., Wan, K.-W., King, S.M., Grillo, I., Schweins, R., Ferruti, P., Franchini, J., Duncan, R.; *Biomacromolecules*; **2004**; 5; 1422.
- 45 Tiera, M.J., Winnik, F.M., Fernandes, J.C.; *Current Gene Therapy*; **2006**; 6, 59.
- 46 Richardson, S.C.W., Patrick, N.G., Man, Y.K.S., Ferruti, P., Duncan, R.; *Biomacromolecules*; **2001**; 2; 1023.
- 47 Merrifield, R. B.; *Journal of the American Chemical Society*; **1963**; 85; 2149.
- 48 Bodanzky, M. in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Volume I*; Gross, E., Meienhofer, J. (eds.); Academic Press, New York; **1979**; 105.
- 49 Chan, W. C.; White, P.D.; *"Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis"*; Oxford University Press; **2000**; Oxford.
- 50 Jakubke, H.-D.; *Peptide, Chemie und Biologie*; Spektrum Akademischer Verlag; **1996**; Heidelberg-Berlin-Oxford.
- 51 Benoiton, N. L.; *Biopolymers*; **1996**; 40; 245:
- 52 Martinez, J., et al.; *Journal of Medical Chemistry*; **1985**; 28; 1874.
- 53 Carpino, L. A., Imazumi, H., el-Faham, A., Ferrer, F.J., Zhang, C., Lee, Y., Foxman, B.M., Henklein, P., Hanay, C., Mügge, C., Wenschuh, H., Klose, J., Beyermann, M., Bienert, M.; *Angewandte Chemie*; **2002**; 114; 457.
- 54 Ito, Y., Manab, S.; *Current opinion in chemical biology*; **1998**; 2, 701.
- 55 Bannwarth, W.; *Helvetica Chimica Acta*; **1988**; 71; 1517.
- 56 Stryer, L.; *Biochemie*; **1996**; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin – Oxford.
- 57 Karas, M., Hillenkamp, F., Stahl, B., Steup, M.; *Analytical Chemistry*; **1997**; 63; 1463.
- 58 Karas, M., Hillenkamp, F.; *Analytical Chemistry*; **1988**; 60; 2299.
- 59 Beavis, R.C., Chait, B.T.; *Analytical Chemistry*; **1990**; 62; 1863.
- 60 Karas, M., Krueger, R.; *Chemical Reviews*; **2003**; 103, 427.
- 61 Greer, F.M.; *Journal of chemical technology and biotechnology*; **1991**; 51; 127.
- 62 Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M.; *Science*; **1989**; 246; 64.

- 63 Strupat, K.; *Methods in enzymology*; **2005**; 405; 1.
- 64 Wissenschaft Online, *Lexikon der Physik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- 65 Aebersbold, R., Mann. M.; *Nature*; **2003**; 422; 198.
- 66 Winter, R., Noll, F.; *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner Studienbücher Chemie; **1998**; Stuttgart.
- 67 Cowie, J.M.G.; *Polymers: Chemistry & Physics of Modern Materials, 2nd Edition*; **1991**; Blackie Academic & Professional; London-Glasgow-Weinheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras.
- 68 Zimm, B.J.; *Chemical Physics*; **1948**; 16; 1093.
- 69 Wiener, N.; *Acta Mathematica*; **1930**; 55; 118.
- 70 Gadegaard, N.; *Biotechnic & Histochemistry*; **2006**; 81; 87.
- 71 Quate, C. F.; *Surface Science*; **1994**; 299-300; 980.
- 72 Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C.; *Physical Review Letters*; **1986**; 56; 930.
- 73 Möller, C., Allen, M., Elings, V., Engel, A., Müller, D.J.; *Biophysical Journal*; **1999**; 77; 1150.
- 74 Ogden, R. C., Adams, D. A.; *Methods in Enzymology*; **1987**; 152; 61.
- 75 Hartmann, L., Krause, E., Antonietti, M., Boerner, H.G.; *Biomacromolecules*; **2006**, 7, 1239.
- 76 Rapp, W.; in *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*; Jung, G. (ed.); VCH: Weinheim - New York - Basel, **1996**; 425.
- 77 Prugh, J. D., Birchenough, L. A., Egbertson, M. S.; *Synthetic Communications*; **1992**; 22; 2357.
- 78 Choi, W.-M., Kopeckova, P., Minko, T., Kopecek, J.; *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*; **1999**; 14; 447.
- 79 Cavallaro, G., Campisi, M., Licciardi, M., Ogris, M., Giammona, G.; *Journal of Controlled Release*; **2006**; 115; 322.
- 80 Kloeckner, J., Wagner, E., Ogris, M.; *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; **2006**; 29; 414.
- 81 Kaiser, E. C., R. L., Bossinger, C.D., Cook, P.I.; *Analytical Biochemistry*; **1970**; 34; 595.
- 82 Attardi, M. E., Porcu, G., Taddei, M.; *Tetrahedron Letters*; **2000**; 41; 7391.
- 83 Irvine, G.B.; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; **2003**; 56; 233.
- 84 Murgasova, R., Hercules, D.M.; *Analytical Bioanalytical Chemistry*; **2002**; 373; 481.
- 85 Kuhn, R., Mueller, H.G.; Bayer, G., Kraemer-Lucas, H., Kaiser, W., Orth, P., Eichenauer, H., Ott, K.H.; *Colloid and Polymer Science*; **1993**; 271; 133.
- 86 Cölfen, H., Antonietti, M.; *Advances in Polymer Science*; **2000**; 150; 67.
- 87 Theisen, A., Johann, C., Deacon, M.P., Harding, S.E.; *Refractive Increment Data Book for Polymer and Biomolecular Scientists*; **2000**; Nottingham University Press.
- 88 Watterson, A.C., Chen, M.-H.; *Polymer Preprints* (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry); **2001**; 42; 189.
- 89 Mendichi, R., Ferruti, P., Malgesini, B.; *Biomedical Chromatography*; **2005**; 19; 196.
- 90 Dubin, P.L., Edwards, S.L., Mehta, M.S., Tomalia, D.; *Journal of Chromatography*; **1993**; 635; 51.
- 91 Zhang, Y., Cremer, P.S.; *Current Opinion in Chemical Biology*; **2006**; 10; 658.
- 92 Chernushevich, I.V., Loboda, A.V., Thomson, B.A.; *Journal of Mass Spectrometry*; **2001**; 36; 849.
- 93 Jackson, A.T., Williams, J.P., Scrivens, J.H.; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*; **2006**; 20; 2717.

- 94 Bandu, L.M., Watkins, K.L., Bretthauer, M.L., Moore, C.A., and Desaire, H.; *Analytical Chemistry*; **2004**; 76; 1746.
- 95 Subbi, J., Aguraiuja, R., Tanner, R., Allikmaa, V., Lopp, M.; *European Polymer Journal*; **2005**; 41; 2552.
- 96 Lee, S., Han, S.Y., Lee, T.G., Chung, G., Lee, D., and Oh, H.B.; *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*; **2006**; 17; 536.
- 97 Jones, N.A., Hill, I.R.C., Stolnik, S., Bignotti, F., Davis, S.S., Garnett, M.C.; *Biochimica et Biophysica Acta*; **2000**; 1517; 1.
- 98 Hong, S., Leroueil, P.R., Janus, E.K., Peters, J.L., Kober, M.-M., Islam, M.T., Orr, B.G., Baker, J.R., Banaszak Holl, M.M.; *Bioconjugate Chemistry*; **2006**; 17; 728.
- 99 Clement, J., Kiefer, K., Kimpfler, A., Garidel, P., Peschka-Suess, R.; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; **2005**; 59; 35.
- 100 Danielsen, S., Maurstad, G., Stokke, B.T.; *Biopolymers*; **2005**; 77; 86.
- 101 Holm, C., Kékicheff, P., Podgornik, R.; *Electrostatic Effects in Soft Matter and Biophysics*; **2001**; NATO Science Series; II; 53.
- 102 Vasilescu, D., Grassi, H., Rix-Montel, M.-A.; *Charged and Reactive Polymers*, Vol. II; D.Reidel Publishing Company, Dordrecht-Holland/ Boston-USA; **1975**; 197.
- 103 Maltsev, E., Wattis, J.A.D., Byrne, H.M.; *Physical Review E*; **2006**; 74; 1.
- 104 Bloomfield, V.A.; *Current Opinion in Structural Biology*; **1996**; 6; 334.
- 105 Danielsen, S., Vaarum, K.M., Stokke, B.T.; *Biomacromolecules*; **2004**; 5; 928.
- 106 Golan, R., Pietrasanta, L.I., Hsieh, W. Hansma, H.G.; *Biochemistry*; **1999**; 38; 14069.
- 107 Petersen, H., Fechner, P.M., Martin, A.L., Kunath, K., Stolnik, S., Roberts, C.J., Fischer, D., Davies, M.C., Kissel, T.; *Bionconjugate Chemistry*; **2002**; 13; 845.
- 108 Eastman, J.; *Colloid Science*; **2005**; Blackwell Publishing Ltd, Oxford; 36.
- 109 Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., Hoekstra, D.; *Biochemical Journal*; **2004**; 377; 159.
- 110 Rejman, J., Bragonzi, A., Conese, M.; *Molecular Therapy*; **2005**; 12; 468.
- 111 Vijayanathan, V., Thomas, T., Antony, T., Shirahata, A., Thomas. T.J.; *Nucleic Acid Research*; **2004**; 32; 127.
- 112 Moreno-Herrero, F., Colchero, J., Baro, A.M.; *Ultramicroscopy*; **2003**; 96; 167.
- 113 Lashuel, H.A., LaBrenz, S.R., Woo, L., Serpell, L.C., Kelly, J.W.; *Journal of the American Chemical Society*; **2000**; 122, 5262.
- 114 Fütterer, T., Nordskog, A., Hellweg, T., Findenegg, G.H., Förster, S., Dewhurst, C.D.; *Physical Review E*; **2004**; 70.
- 115 Tanigawa, M., Okada, T.; *Analytica Chimica Acta*; **1998**; 365; 19.
- 116 Danielsen, S., Maurstad, G., Stokke, B.T.; *Biopolymers*; **2005**; 77; 86.
- 117 Ananthapadmanabhan, K.P., Goddard, E.D., Turro, N.J., Kuo, P.L.; *Langmuir*; **1985**; 1; 352.
- 118 Srinivasachari, S., Liu, Y., Zhang, G., Pevette, L., Reineke, T.M.; *Journal of the American Chemical Society*; **2006**; 128; 8176.
- 119 Coombe, D.R., Nakhoul, A.M., Stevenson, S.M., Peroni, S.E., Sanderson, C.J.; *Journal of Immunological Methods*; **1998**; 215; 145.
- 120 Adams, P.D., Lopez, P., Sellers, W.R., Kaelin, W.G., Jr.; *Methods in Enzymology*; **1997**; 283; 59.
- 121 <http://probes.invitrogen.com/handbook>: Section 1.1
- 122 Ito, I., Began, G., Mohiuddin, I., Saeki, T., Saito, Y., Branch, C.D., Vaporciyan, A., Clifton, S.L., Yen, N., Roth, J.A., Ramesh, R.; *Molecular Therapy*; **2003**; 7; 409.
- 123 Lybarger, L., Chervenak, R.; *Methods in Enzymology*; **1999**; 302; 199.

- 124 Schmid, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H., Braun, J., Giorgi, J.V.; *Cytometry*; **1992**; 13; 204.
- 125 Von Gersdorff, K., Sanders, N.N., Vandenbroucke, R., De Smedt, S.C., Wagner, E., and Ogris, M.; *Molecular Therapy*; **2006**; 14; 745.
- 126 Hill, I.R.C., Garnett, M.C., Bignotti, F., Davis, S.S.; *Biochimica et Biophysica Acta*; **1999**; 1427; 161.
- 127 Henry, S.M., El-Sayed, M.E.H., Pirie, C.M., Hoffman, A.S., and Stayton, P.S.; *Biomacromolecules*; **2006**; 7; 2407.
- 128 Jung, M., Hubert, D.H.W., Bomans, P.H.H., Frederik, P., van Herk, A.M., and German, A.L.; *Advanced Materials*; **2000**; 12; 210.
- 129 Raudino, A., Castelli, F., Gurrieri, S.; *Journal of Physical Chemistry*; **1990**; 94; 1526.
- 130 Stavans, J.; *Physica A*; **2002**; 306; 368.
- 131 Ciftci, K., Levy, R. J.; *International Journal of Pharmaceutics*; **2001**; 218; 81.
- 132 Vandermeulen, G.W.M., Tziatzios, C., and Klok, H.-A.; *Macromolecules*; **2003**; 36; 4107.
- 133 Liu, Y., Reineke, T.M., *Bioconjugate Chemistry*, ACS ASAP.
- 134 Menzel, H., Horstmann, S., Behrens, P., Bärnreuther, P., Krüger, I., and Jahns, M.; *Chemical Communications*; **2003**; 2994.
- 135 Karpas, Z., Bell, S.E., Wang, Y.-F., Walsh, M., and Eiceman, G.A.; *Structural Chemistry*; **1994**; 5; 135.