

# Synthese und kontrollierte Mikrostrukturbildung funktionaler Peptid-Polymerkonjugate in organischen Lösungsmitteln

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:  
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen  
Bedingungen 2.0 Deutschland

Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/de/>

Elektronisch veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1984/>  
urn:nbn:de:kobv:517-opus-19840

[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-19840>]

Synthese und kontrollierte Mikrostrukturbildung  
funktionaler Peptid-Polymerkonjugate  
in organischen Lösungsmitteln

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

**Jens Hentschel**

geboren am 16.08.1979 in Halle/Saale

Potsdam, März 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Antonietti
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Taubert
3. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Herrmann

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Motivation.....	5
2. Grundlagen.....	7
2.1 Polymerorganisation in Lösung.....	7
2.1.1 Phasenverhalten von AB-Blockcopolymeren in Lösung .....	7
2.2 Peptide .....	10
2.2.1 Aufbau und Struktur von Peptiden.....	10
2.2.2 Die $\beta$ -Faltblattstruktur .....	11
2.2.3 Peptidsynthese.....	16
2.2.4 Synthese von schwierigen Peptidsequenzen .....	20
2.2.5 Switch-Segmente.....	21
2.3 Peptid-Polymer Konjugate – Ligationsstrategien .....	24
2.3.1 Kupplungsstrategie.....	24
2.3.2 Polymerisationsstrategie.....	26
2.3.3 Grundlagen der kontrollierten radikalischen Polymerisation.....	27
2.4 Peptid-geleitete Strukturbildung synthetischer Polymere .....	32
2.4.1 Überblick über unterschiedliche Peptid-Organisator Systeme.....	32
2.4.2 Lineare Peptid-Organisatoren .....	33
2.4.3 Strukturbildung eines PEO- <i>block</i> - (Thr-Val) <sub>5</sub> <i>all-switch</i> Konjugats .....	33
3. Design und Synthese der Peptid-Polymer Konjugate .....	37
3.1 Design der Peptidsequenzen .....	37
3.1.1 Weiterentwicklung des Peptid-Organisators.....	38
3.2 Synthese der Peptid-Polymerkonjugate.....	44
3.2.1 Wahl des synthetischen Polymers .....	44
3.2.2 Kupplungsansatz .....	44
3.2.3 Polymerisationsansatz .....	46
3.2.4 Weiterentwicklung des Peptid-RAFT-Makroüberträgers .....	51
4. Charakterisierung des Aggregationsverhaltens.....	57
4.1 Strukturbildung des Peptid-PnBA-Systems I-PBA2k in Lösung.....	57
4.1.1 Charakterisierung der gebildeten Strukturen.....	61
4.1.2 Vorschlag eines Strukturmodells .....	62

4.1.3 Kinetik der Strukturbildung .....	68
4.2 Erweiterung des Konzepts - Von Oligomeren zu Polymeren.....	70
4.2.1 Analyse der gebildeten Strukturen .....	71
4.2.2 Vergleich der Strukturen in Abhängigkeit der PnBA-Blocklänge.....	75
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	83
6. Anhang .....	87
6.1 Experimenteller Teil .....	87
6.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	88
6.1.2 Peptidsynthese.....	91
6.1.3 Synthese eines carboxyl-endfunktionalisierten <i>Poly-n-butylacrylats (PBA2k)</i> durch ATRP.....	99
6.1.4 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate .....	102
6.2 Charakterisierungsmethoden (experimenteller Teil) .....	109
6.2.1 Polymer- und Peptidcharakterisierung.....	109
6.2.2 Methoden zur Untersuchung der Strukturbildung.....	110
6.3 Charakterisierungsmethoden (theoretischer Teil).....	113
6.3.1 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	113
6.3.2 Circular dichroismus (CD) – Spektroskopie .....	114
6.3.3 Rasterkraftmikroskopie .....	116
6.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie.....	118
6.4 Abkürzungsverzeichnis .....	121
Literaturverzeichnis .....	123

# Kapitel 1

## Einleitung und Motivation

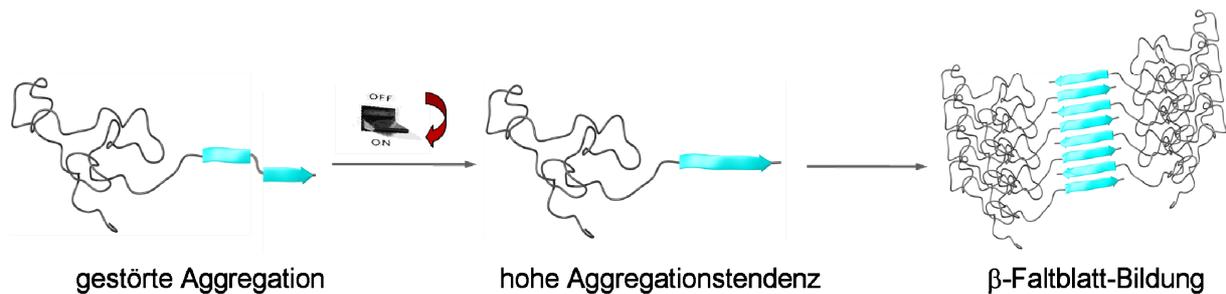
Die Natur bietet ein großes Repertoire an Materialien mit herausragenden Eigenschaften, einschließlich Festigkeit, Zähigkeit, Elastizität und Leichtbauweise (z. B. Spinnenseiden,<sup>[1]</sup> Muschelschalen<sup>[2]</sup> oder Knochen<sup>[3]</sup>). Insbesondere Peptide und Proteine besitzen die Fähigkeit durch nichtkovalente Wechselwirkungen hierarchisch strukturierte, stabilisierte und dennoch anpassungsfähige Systeme aufzubauen, die eine Vielzahl verschiedenster Funktionen in biologischen Systemen erfüllen können.

Solch vielseitige und anpassungsfähige Strukturen sind dagegen, in ihrer Komplexität auf der sub-nm Skala, für synthetische Polymere bislang unbekannt. Letztere Klasse zeichnet sich vielmehr durch ihre vielseitigen Materialeigenschaften aus. Die Strukturbildung von synthetischen AB-Blockcopolymeren ist neben elektrostatischen Wechselwirkungen (Polyelektrolytkomplexe) meist nur auf selektive Löslichkeiten der einzelnen Blöcke zurückzuführen und deshalb ziemlich begrenzt.

Um diese Limitierung zu umgehen, wurde daher in den letzten Jahren ein Ansatz entwickelt, die in der Natur vorkommenden Prinzipien der Überstrukturbildung mit synthetischen Polymeren zu kombinieren.<sup>[4,5]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die peptidgeleitete Organisation von synthetischen Polymeren eine vielseitige Methode zur Generierung biologisch-inspirierter Materialien mit ausgezeichneter struktureller Kontrolle darstellt.<sup>[6]</sup> Dieser Ansatz beinhaltet die kovalente Anbindung (Konjugation) von synthetischen Polymersegmenten an sequenzdefinierte Peptidsegmente. Letztere besitzen eine hohe Tendenz zur Selbstorganisation, spontan oder ausgelöst durch einen Schaltprozess, in stark anisotrope Mikro- oder Nanostrukturen.<sup>[7-10]</sup> Entscheidend für diesen Strukturbildungsprozeß ist die Bildung einer  $\beta$ -Faltblatt Sekundärstruktur durch die Peptidsegmente.<sup>[11]</sup>

Die Synthese solcher  $\beta$ -Faltblatt-bildender Peptide ist, aufgrund ihrer hohen Aggregationstendenz, oft mit Schwierigkeiten verbunden. Seit kurzem ist jedoch bekannt, dass diese Probleme durch die Integration von schaltbaren Störsegmenten (Switch-Segmente) in die Peptidsequenz elegant umgangen werden können.<sup>[12-14]</sup> Diese Segmente bewirken einen Knick im Peptidrückgrat, der zu einer Störung der Peptidfunktion und Unterdrückung der Aggregationstendenz führt. Nach abgeschlossener Synthese kann durch einen Schaltvorgang

die native Peptidkonformation wiederhergestellt werden. Zusätzlich zu der verbesserten Ausbeute und Reinheit der entsprechenden Peptide ist auf diese Weise eine kontrollierte Aktivierung der Aggregationstendenz möglich. So konnte in einer vorangegangenen Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Switch-Segmente als ein sehr wirkungsvolles Hilfsmittel für die peptidgeleitete Mikrostrukturbildung synthetischer Polymere genutzt werden können (Abb. 1.1).<sup>[15,10]</sup>



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der peptidgeleiteten Organisation von Peptid-Polymer Konjugaten, induziert durch einen Schaltvorgang im Peptidsegment (blauer Pfeil).

Jedoch lag bei diesem Konzept bisher der Fokus auf wasserlöslichen Polymeren, wie z. B. Polyethylenoxid, und der Selbstorganisationsprozess wurde in wässriger Lösung untersucht. Da dies jedoch den Umfang an geeigneten synthetischen Polymermaterialien stark limitiert, soll im Rahmen dieser Arbeit der Ansatz der peptidgeleiteten Strukturbildung synthetischer Polymere auf organische Lösungsmittel erweitert werden. Dies würde die Integration einer deutlich größeren Bandbreite synthetischer Polymere gestatten und somit einen Zugang zu strukturierten Polymermaterialien mit verschiedensten Materialeigenschaften und Funktionalitäten ermöglichen.

Die Synthese definierter Peptidsegmente und ihre Integration in synthetische Polymersysteme ist jedoch mit hohem Aufwand und Kosten verbunden. Dadurch ist, neben allen Vorteilen in Bezug auf Strukturkontrolle, eine industrielle Anwendbarkeit dieser Systeme limitiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Peptid-Anteil in den Polymer-Peptid Konjugaten soweit wie möglich zu minimieren, bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Funktionalität dieser bio-inspirierten Polymere. Dazu sollen, unter Verwendung der Switch-Segmente, Peptid-Konjugate mit verschieden großen synthetischen Polymerblöcken synthetisiert werden. Anschließend soll der Einfluß der Größe des Polymersegments auf den Strukturbildungsprozess in Lösung untersucht werden.

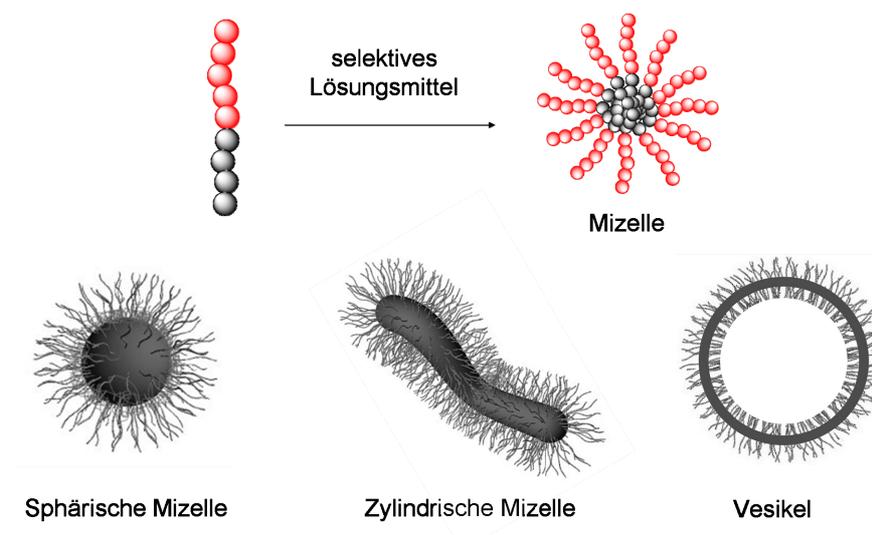
## Kapitel 2

### Grundlagen

#### 2.1 Polymerorganisation in Lösung

##### 2.1.1 Phasenverhalten von AB-Blockcopolymeren in Lösung

Die Verwendung eines selektiven Lösungsmittels führt bei AB-Blockcopolymeren in Lösung, ähnlich wie bei niedermolekularen Tensiden, zu einer Selbstorganisation in mizellare oder vesikuläre Strukturen.<sup>[16]</sup> Hierbei kann das Lösungsmittel einen der beiden Blöcke selektiv lösen und stellt gleichzeitig für den anderen Block ein schlechtes Lösungsmittel oder sogar Fällungsmittel dar. Die Triebkraft der Selbstorganisation resultiert aus dem Bestreben des unlöslichen Blocks, die Anzahl der Kontakte mit dem Fällungsmittel zu minimieren. Dieser Block wird daher den Kern und der lösliche Block die Hülle der Mizelle bilden (Abbildung 2.1). Die resultierenden Aggregate sind im einfachsten Fall sphärische Mizellen. Weiterhin können analog zu niedermolekularen Tensiden aus AB-Blockcopolymeren in verdünnter Lösung auch zylindrische Mizellen<sup>[17,18]</sup> oder vesikuläre Aggregate gebildet werden<sup>[19,20]</sup> (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Mizellbildung von A-B Blockcopolymeren in einem selektiven Lösungsmittel (oben) und mögliche Aggregatstrukturen (unten, abgewandelt aus Ref.<sup>[21]</sup>).

Die Geschwindigkeit des Organisationsprozesses ist jedoch bei Blockcopolymeren, aufgrund deutlich niedrigerer Diffusionskoeffizienten, wesentlich geringer als bei niedermolekularen Tensiden.

Die Form der beobachteten Aggregate hängt stark von der Geometrie des individuellen Moleküls ab und kann über den sogenannten kritischen Packungsparameter  $P$  vorausgesagt werden. Nach dem Modell von Israelachvili,<sup>[22]</sup> zur Vorhersage der Aggregatstruktur von niedermolekularen Tensiden, gilt folgender Zusammenhang zwischen dem Volumen  $V$  eines Tensidmoleküls, dem mittlern bzw. effektiven Flächenbedarf der Kopfgruppe  $a$ , der Konturlänge  $l_{kont}$  der hydrophoben Kette und dem Packungsparameter  $P$ :

$$P = \frac{V}{a \cdot l_{kont}} \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

Die Beziehung zwischen dem Packungsparameter und der Struktur der Aggregate ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

**Tabelle 2.1:** Erwartete Aggregatstruktur in Abhängigkeit des Packungsparameters.

$P$	Molekülgeometrie	Aggregatstruktur
$<1/3$	Kegel	sphärische Mizellen
$1/3 - 1/2$	stumpfer Kegel	zylindrische Mizellen
$1/2 - 1$	stumpfer Kegel	gekrümmte Doppelschichten, Vesikel
1	Zylinder	planare Doppelschichten

Die Aggregationszahl  $Z$  ist ein weiterer wichtiger Parameter, der mit der Größe der Mizellen korreliert. Es handelt sich dabei um die Zahl an Polymerketten, die in eine Mizelle eingebaut werden. Förster *et al.* konnten für stark segregierende Systeme einen allgemeingültigen Zusammenhang zwischen den Polymerisationsgraden des unlöslichen Blocksegments ( $N_A$ ), des gelösten Blocksegmentes ( $N_B$ ) und der Aggregationszahl  $Z$  nachweisen<sup>[23]</sup> (Gleichung 2.2).

$$Z = Z_0 \cdot N_A^\alpha \cdot N_B^{-\beta} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

Diese Beziehung kann für die Mizellbildung von Diblock-, Triblock- und Pfropfcopolymeren sowie von niedermolekularen Tensiden angewendet werden. Die Werte der Exponenten  $\alpha = 2$  und  $\beta = 0,8$  wurden empirisch bestimmt und durch Modelle bestätigt. Der vorangestellte

Faktor steht in Beziehung zum Flory-Huggins-Parameter  $\chi$  und ist im Wesentlichen von der Mischungsenthalpie zwischen dem unlöslichen Blocksegment A und dem Lösungsmittel abhängig.  $Z_0$  ist für viele Blockcopolymer- und Tensidsysteme bekannt. Die Aggregationszahl kann demnach durch Variation der Blocklängen gezielt eingestellt werden.<sup>[24]</sup>

Unter Betrachtung des relativen Blocklängenverhältnisses der individuellen Segmente  $N_A$  und  $N_B$ , kann zwischen zwei mizellaren Strukturen unterschieden werden: im Fall von  $N_A \ll N_B$  entstehen haarige Mizellen (*hairy micelles*) (der Kern ist deutlich kleiner als die Korona).<sup>[25]</sup>

Für den entgegengesetzten Fall, mit deutlich größerem Kern im Vergleich zur Korona ( $N_A \gg N_B$ ), werden „kurzgeschorene Mizellen“ (*crew cut micelles*) erhalten.<sup>[26]</sup> Der Begriff amphiphile Mizelle (*amphiphilic micelle*) bezieht sich auf ein System starker Segregation und ist nicht abhängig vom strukturellen Aufbau („hairy“ oder „crew cut“) der Mizelle.<sup>[17]</sup>

In der Tabelle 2.2 ist der Zusammenhang zwischen der Mikrostruktur (Mizellradius  $R$ ) und der Aggregationszahl  $Z$  vom Polymerisationsgrad  $N_A$  des unlöslichen Blocks gegeben.

**Tabelle 2.2:** Abhängigkeit der Mizellgröße (Mizellradius  $R$ ) und der Aggregationszahl  $Z$  vom Polymerisationsgrad  $N_A$  für die verschiedenen Mizelltypen.

Mizelltyp	Radius $R$	Aggregationszahl $Z$
hairy	$R \sim N_A^{3/5}$	$Z \sim N_A^{4/5}$
crew cut	$R \sim N_A^{2/3}$	$Z \sim N_A$
amphiphilic	$R \sim N_A$	$Z \sim N_A^2$

Die Bildung von vesikulären Aggregaten ist dagegen komplexer und vollzieht sich in zwei Schritten.<sup>[27]</sup> Im ersten Schritt bildet sich eine planare Doppelschicht, die sich im zweiten Schritt zum Vesikel abschnürt. Die Strukturkontrolle von Blockcopolymer-Vesikeln in Lösung wurde von *Eisenberg und Mitarbeitern* intensiv untersucht.<sup>[28,29]</sup>

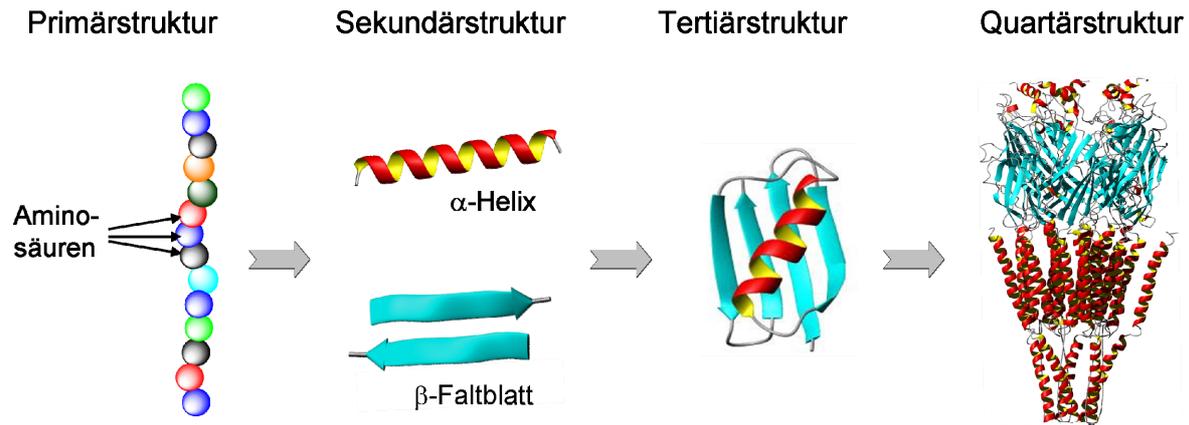
Neben den beschriebenen Parametern erlaubt auch die Veränderung der Lösungseigenschaften eine gewisse Kontrolle über Größe und Form der Blockcopolymer-Aggregate. So ist es möglich, durch z. B. Variation der Lösungsmittelzusammensetzung, der Polymerkonzentration, des Wassergehaltes oder durch Zugabe von Additiven verschiedene Aggregatstrukturen aus dem gleichen Copolymer zu erhalten.<sup>[30,31]</sup>

Dennoch ist, gerade im Vergleich zur strukturellen und funktionalen Vielfalt der natürlich vorkommenden Protein-Klasse, die Bandbreite an möglichen Mikrostrukturen aus synthetischen AB-Blockcopolymeren limitiert. Zudem findet der Organisationsprozeß auf einer anderen Längenskala statt. Während sich die komplexen Strukturen der Proteine auf der sub-nm-Skala (1-5 nm) ausbilden, sind die Dimensionen der vergleichsweise einfach aufgebauten Strukturen aus AB-Blockcopolymeren (Mizellen, Vesikel) deutlich größer (30-80 nm).

## 2.2 Peptide

### 2.2.1 Aufbau und Struktur von Peptiden

Peptide und Proteine sind die am häufigsten vertretenen und vielfältigsten Makromoleküle in lebenden Zellen. Sie sind an allen lebenswichtigen, biologischen Prozessen beteiligt und spielen dabei oft eine entscheidende Rolle. Sie erfüllen die unterschiedlichsten Aufgaben und Funktionen, beispielsweise Katalyse (als Enzyme), Transport von Molekülen, Strukturbildung (z.B. Keratin, Kollagen), Immunabwehr (z.B. als Antikörper) oder Stoffwechselregulation (als Hormone). Trotz dieser Vielfalt lassen sich alle Proteine auf die gleichen, relativ einfach gebauten Untereinheiten, die Aminosäuren, zurückführen. Proteine bestehen definitionsgemäß aus mehr als 100 Aminosäuren. Kürzere Aminosäureketten werden als Peptide bezeichnet. Ihre Strukturorganisation erfolgt hierarchisch über vier Ebenen (siehe Abbildung 2.2). Die Primärstruktur entspricht dabei der Abfolge der einzelnen Aminosäuren in der linearen Peptidkette. Durch die Sekundärstruktur wird die räumliche Anordnung der Aminosäuren beschrieben. Sie entsteht durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidbindungen des Peptid-Rückgrates. Wichtige Peptidsekundärstrukturen sind z. B. die  $\alpha$ -Helix, die  $\beta$ -Faltblattstruktur und die  $\beta$ -Schleife. Durch kovalente und nicht-kovalente Bindungskräfte von Aminosäureresten bzw. -seitenketten faltet sich die Peptid-/Proteinkette weiter. Diese der Sekundärstruktur übergeordnete räumliche Anordnung der Peptidkette wird mit dem Begriff Tertiärstruktur bezeichnet. Die Bildung einer biologisch aktiven Struktur entsteht oft erst durch die Zusammenlagerung mehrerer Peptid-/Proteinketten zu Proteinkomplexen, der sogenannten Quartärstruktur. Die einzelnen Proteine sind dabei meist durch Wasserstoffbrücken, Salzbrücken aber auch durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft.<sup>[32]</sup>



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der hierarchischen Strukturorganisation der Peptide.

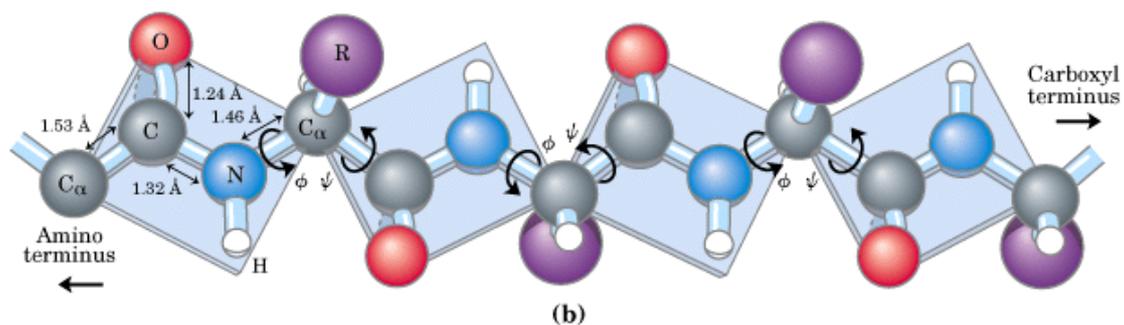
Proteine besitzen eine wohldefinierte dreidimensionale Struktur. Dabei spielt die Reihenfolge der Aminosäuren in der Peptidkette eine wichtige Rolle. Die Primärstruktur bestimmt die Strukturbildung auf allen Hierarchieebenen. Die Gesamtstruktur wiederum definiert die Funktion der Proteine (biologisches Struktur-Funktions Prinzip). So beruhen beispielsweise die selektiven Katalysatoreigenschaften von Enzymen auf ihrer Fähigkeit, Substrate in präziser Orientierung zu binden und Übergangszustände während chemischer Reaktionen zu stabilisieren.

### 2.2.2 Die $\beta$ -Faltblattstruktur

Die  $\beta$ -Faltblattstruktur ist neben der  $\alpha$ -Helix eines der grundlegendsten Strukturelemente der Peptide. Sie wurde 1951 von *Pauling* und *Corey* im Detail beschrieben.<sup>[33]</sup> Seitdem konnte das Verständnis und die Aufklärung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen in Proteinen durch neuere Analytikmethoden, wie moderne Röntgenkristallstrukturanalyse, NMR-Spektroskopie und computergestützte Berechnungen noch verbessert und erweitert werden.

Im Modell von *Pauling* und *Corey* ist die Peptidkette *all-trans* gestreckt und weist eine Zickzack-Konfiguration auf ( $\beta$ -Strang). Im Gegensatz zur  $\alpha$ -Helix, ist die Ausbildung der  $\beta$ -Faltblatt-Sekundärstruktur meist nicht durch eine einzelne Peptidkette möglich, sondern entsteht durch eine parallele oder antiparallele Anordnung mehrerer Peptidstränge zueinander (siehe Abb. 2.4). Ausnahme hierfür sind die bekannten *hair-pin* Domänen, bei denen das  $\beta$ -Faltblatt durch Rückfaltung der Peptidkette auf sich selbst entsteht. Die freie Rotation um die Amidbindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoffatom und dem Stickstoffatom ist eingeschränkt, da diese Bindung über einen partiellen Doppelbindungscharakter verfügt.

Dieser bedingt eine planare Struktur. Die Bindungen auf beiden Seiten der starren Peptidbindungseinheit sind allerdings reine Einfachbindungen. Es besteht also eine große Rotationsfreiheit um die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$ . Diese Torsion ist in Abbildung 2.3 durch Pfeile gekennzeichnet. Die Aminosäurereste in der  $\beta$ -Konformation haben negative  $\phi$ - und positive  $\psi$ -Winkel, typischerweise  $\phi = -139$  Grad und  $\psi = 135$  Grad für ein antiparalleles Faltblatt bzw.  $-119^\circ/113^\circ$  für ein paralleles Faltblatt.<sup>[34]</sup>



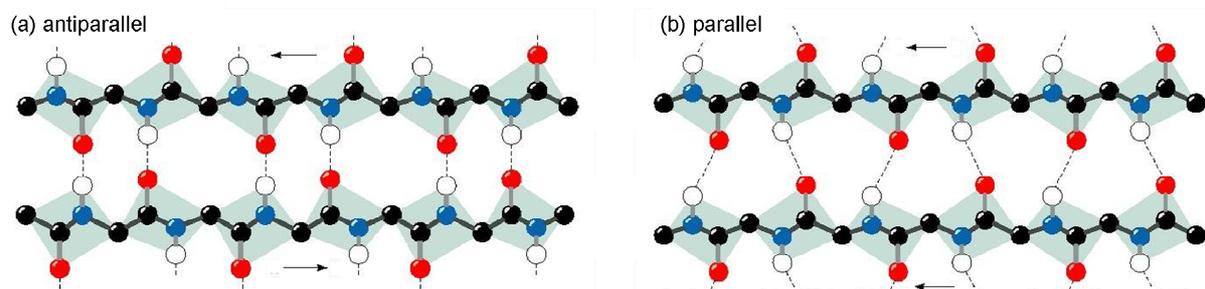
**Abb. 2.3:** Anordnung der Peptidbindungen in einem  $\beta$ -Strang; die hellblau unterlegten Bereiche symbolisieren die starre Peptidbindungsebene mit partiellem Doppelbindungscharakter; freie Drehbarkeit um echte Einfachbindungen ist durch Pfeile angedeutet.<sup>[35]</sup>

Die zur Stabilisierung notwendigen Wasserstoffbrückenbindungen entstehen zwischen den amidischen C=O- und N-H-Gruppen entlang des Peptidrückgrats der verschiedenen  $\beta$ -Stränge. Die Länge der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe und dem Proton der Amidbindung beträgt ca. 0,28 nm.<sup>[36]</sup> Die Bindungsenergie beträgt ca. 20 kJ/mol und ist im Vergleich mit kovalenten Bindungen (200-400 kJ/mol) relativ gering. Entscheidend ist allerdings nicht eine einzelne, isolierte Wasserstoffbrücke, sondern die Fähigkeit solcher Systeme, eine Vielzahl dieser Bindungen auszubilden. Es handelt sich dabei um einen kooperativen Effekt, der eine gute Stabilisierung der Konformation möglich macht.<sup>[37]</sup>

Die Peptidketten eines  $\beta$ -Faltblattes sind auf Grund der gegenseitigen sterischen Hinderung der Seitenketten fast vollständig gestreckt. Die axiale Entfernung zwischen benachbarten  $\alpha$ -C-Atomen beträgt ca. 0,35 nm, während die der  $\alpha$ -Helix nur ca. 0,15 nm entspricht.<sup>[32]</sup> Bei der Ausbildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen aus  $\beta$ -Strängen sind die Seitenketten der einzelnen Aminosäuren jeweils oberhalb und unterhalb der Ebene des  $\beta$ -Faltblattes angeordnet.

Wie in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt, können benachbarte Peptidketten bei der Bildung eines  $\beta$ -Faltblattes dieselbe Richtung einnehmen (parallele  $\beta$ -Faltblattstruktur) oder entgegengesetzt verlaufen (antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur). Die Richtung der Peptidkette wird dabei traditionell vom Amin- zum Carboxylterminus angegeben.

Die Ausbildung paralleler oder antiparalleler Anordnungen ist abhängig von verschiedenen Faktoren, u.a. von der Aminosäuresequenz. Beim parallelen  $\beta$ -Faltblatt wird ein Gesamtdipolmoment entlang der Kette ausgebildet, dessen positives Ende in die Richtung der *N*-terminalen Aminosäure zeigt. Beim antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt gleichen sich die Dipolmomente der einzelnen Peptidstränge nahezu gegenseitig aus.

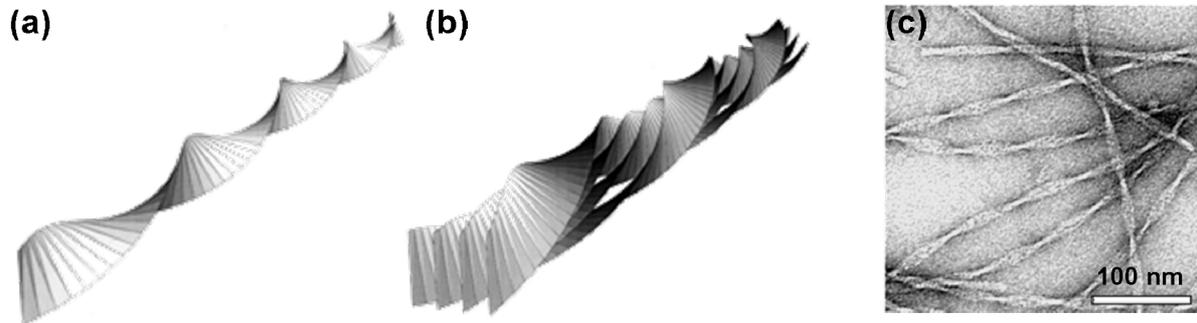


**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts (links) und eines parallelen  $\beta$ -Faltblatts (rechts).<sup>[38]</sup>

Antiparallele  $\beta$ -Faltblattstrukturen werden aus Peptidsträngen mit alternierender Orientierung ( $\uparrow\downarrow$ ) gebildet, deren Rückgrate ca. 4,5 Å voneinander entfernt liegen. Die Stränge sind fast vollständig gestreckt und die Länge einer Aminosäure-Wiederholungseinheit in der Kette beträgt jeweils ca. 3,5 Å. Im Fall von parallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind die Peptidstränge etwas weniger gestreckt. Parallele  $\beta$ -Faltblattstrukturen gelten zudem als weniger stabil im Vergleich zu antiparallelen Strukturen.<sup>[39]</sup>

Bei den meisten  $\beta$ -Faltblattstrukturen erfolgt die Anordnung der  $\beta$ -Stränge nicht planar in einer Ebene. Vielmehr tritt durch eine Rotation der Vektoren von benachbarten Peptidsträngen eine Verdrillung auf. Dieser sogenannte „Twist“ kann zwischen 1 und 30° betragen und wird durch die Orientierung des Peptidrückgrats festgelegt. Zueinander verdrehte  $\beta$ -Faltblätter sind gegenüber planaren Strukturen energetisch begünstigt, da ein Restdipolmoment kompensiert werden kann.<sup>[11]</sup> Eine interessante Eigenschaft  $\beta$ -Faltblattbildender Peptide ist die Bildung hierarchisch höher geordnete Strukturen durch Aggregation

mehrerer  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Abbildung 2.5 zeigt eine charakteristische Verdrillung einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und die Bildung einer Fibrille aus mehreren  $\beta$ -Faltblättern.



**Abb. 2.5:** Charakteristische Verdrillung einer  $\beta$ -Faltblattstruktur (a); mehrere  $\beta$ -Faltblätter bilden eine Fibrille (b); TEM-Aufnahme von verdrillten Fibrillen (c).<sup>[40]</sup>

Aminosäuren unterscheiden sich in ihrer Neigung bestimmte Sekundärstrukturen auszubilden. So ordnen sich z.B. Threonin, Valin und Phenylalanin bevorzugt in  $\beta$ -Faltblattstrukturen an, während Leucin, Glutaminsäure und Lysin häufig in  $\alpha$ -helikalen Bereichen von Proteinen gefunden werden.<sup>[41]</sup>

Dabei hat nicht nur die Natur der Aminosäuren einen bestimmenden Einfluß, sondern auch deren Abfolge in der Peptidsequenz. Die Periodizität von polaren und unpolaren Aminosäuren innerhalb der Sequenz und deren Amphiphilie hat einen großen Einfluss auf die Sekundärstrukturbildung eines Peptides. Um eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ausbilden zu können, sollte ein Peptid alternierend polare und unpolare Seitenketten aufweisen. So entstehen zwei verschiedene Faltblattseiten, eine polare (hydrophile) und eine unpolare (hydrophobe). Für  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturen sollte die Periodizität eher der Helixperiodizität von 3,6 Einheiten pro Windung folgen.<sup>[42]</sup> Sterisch anspruchsvolle Seitenketten begünstigen oft die Streckung einer Peptidkette, was ebenfalls zu einer  $\beta$ -Faltblattstruktur als zu einer  $\alpha$ -Helix Bildung beitragen kann.

In Anwesenheit von Wasser haben hydrophobe Wechselwirkungen eine große Bedeutung für die Ausbildung und Stabilität von Peptidsekundärstrukturen. Es handelt sich dabei um einen entropiegetriebenen Effekt.<sup>[32]</sup> Die hydrophoben Anteile der Peptidkette sind in wässriger Umgebung von einer Schicht hochgeordneter Wassermoleküle umgeben. Durch die Zusammenlagerung hydrophober Reste werden daher viele Wassermoleküle aus dem geordneten Zustand freigesetzt. Dadurch wird die Gesamtentropie des Systems drastisch erhöht.

Die Anordnung der hydrophoben Seitenketten auf einer Seite der  $\beta$ -Faltblattstruktur ermöglicht weiter reichende hydrophobe Wechselwirkungen und wirkt stabilisierend auf die Sekundärstruktur.<sup>[43]</sup> Durch die faziale Amphiphilie können die hydrophoben Oberflächen der  $\beta$ -Faltblätter miteinander interagieren, doppelte  $\beta$ -Faltblätter bilden und somit die hydrophoben Anteile aus der wässrigen Umgebung entfernen. Die hydrophilen Oberflächen hingegen haben die Möglichkeit, weitere Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Wechselwirkungen miteinander oder dem polaren Lösungsmittel einzugehen.<sup>[39]</sup>

Bei Peptiden mit sauren oder basischen Seitenkettenfunktionalitäten spielen elektrostatische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle. So sind die funktionellen Seitenketten bei verschiedenen pH-Werten partiell protoniert oder deprotoniert. Dies ermöglicht ionische Wechselwirkungen zwischen einzelnen Aminosäuren und hat einen spürbaren Einfluss auf die gebildete Konformation der Peptidstränge.<sup>[44]</sup>

#### *Vorkommen in nativen Strukturen*

$\beta$ -Faltblattstrukturen kommen vielfältig in der Natur vor. Sie verfügen über eine große Stabilität und dienen daher oft als strukturfixierende Segmente.<sup>[45]</sup> So besitzt beispielsweise Spinnenseide eine höhere Festigkeit als Stahl, gleichzeitig aber auch eine sehr große Dehnbarkeit. Häufige in Spinnenseide vorkommende Aminosäuren sind Alanin und Glycin. Die natürlichen Seidenstrukturen bestehen aus geordneten kristallinen Bereichen (alaninreich), die in einer amorphen Matrix (glycinreich) eingebettet sind. Die geordneten Bereiche der Spinnenseiden sind  $\beta$ -Faltblatt-reiche Strukturen, die oft parallel in Zugrichtung des Fadens angeordnet sind.<sup>[46]</sup> Die  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind für die Festigkeit des Materials verantwortlich, während die ungeordneten Bereiche für Flexibilität sorgen. Auf diese Weise wird eine Kombination von hoher Festigkeit mit enormer Dehnbarkeit ermöglicht.

Neben diesen außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften und der Tatsache, dass diese Strukturen aus wässriger Lösung gesponnen werden können, sind Spinnenseiden schlecht bakteriell abbaubar. Solche Eigenschaften sind auch für künstliche Materialien in verschiedensten Bereichen (Medizin, Konstruktionsmaterialien usw.) sehr interessant.

Auf der anderen Seite ist es ebenso von Forschungsinteresse eine Faltblattbildung zu verhindern bzw. bestehende Strukturen zu destabilisieren oder aufzulösen (z. B. Amyloidstrukturen).<sup>[47]</sup>

Amyloide sind aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufgebaute Aggregate („Amyloidfasern“), die als molekulare Ursache verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen (z. B. *Alzheimersche Krankheit*, *Parkinsonsche Krankheit* und *Creutzfeld-Jakob-Krankheit*) gelten. Jedoch sind die

elementaren Prozesse, die zur Fehlfaltung von Proteinen und der Strukturierung von Amyloiden führen, bislang noch immer nicht vollständig verstanden und werden mit großem Interesse von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht.<sup>[48]</sup> Die Beobachtung der Faserbildung gestaltet sich aufgrund der komplexen biologischen Umgebung sehr schwierig. Des Weiteren verläuft die Strukturbildung oft irreversibel und geht mit teilweise sehr hohen Aggregationsgeschwindigkeiten einher. Die hochmolekularen Amyloidfibrillen sind nicht in wässrigen Medien löslich, werden vom Organismus nicht als fremd erkannt und können sehr schlecht enzymatisch abgebaut werden. Alle Amyloidablagerungen enthalten Fibrillen ähnlicher Art,<sup>[49,50]</sup> die aus der ursprünglich vorwiegend ungeordneten Struktur entstehen. Durch ihre speziellen Oberflächeneigenschaften neigen Amyloide dazu, sich beispielsweise im Gehirn abzulagern. Dadurch kann es zu Beeinträchtigung wichtiger Gehirnfunktionen kommen.

Zusammenfassend soll noch einmal die große Bedeutung die  $\beta$ -Faltblattstruktur herausgestellt werden. Einerseits wäre ihr kontrollierter Aufbau interessant, z. B. bei der Herstellung neuer Materialien. Andererseits stellt die Vermeidung der Bildung eines  $\beta$ -Faltblattes bzw. der Deaggregation einer vorhandenen  $\beta$ -Faltblattstruktur aus unlöslichen, fibrillären Strukturen eine herausfordernde Aufgabe dar.

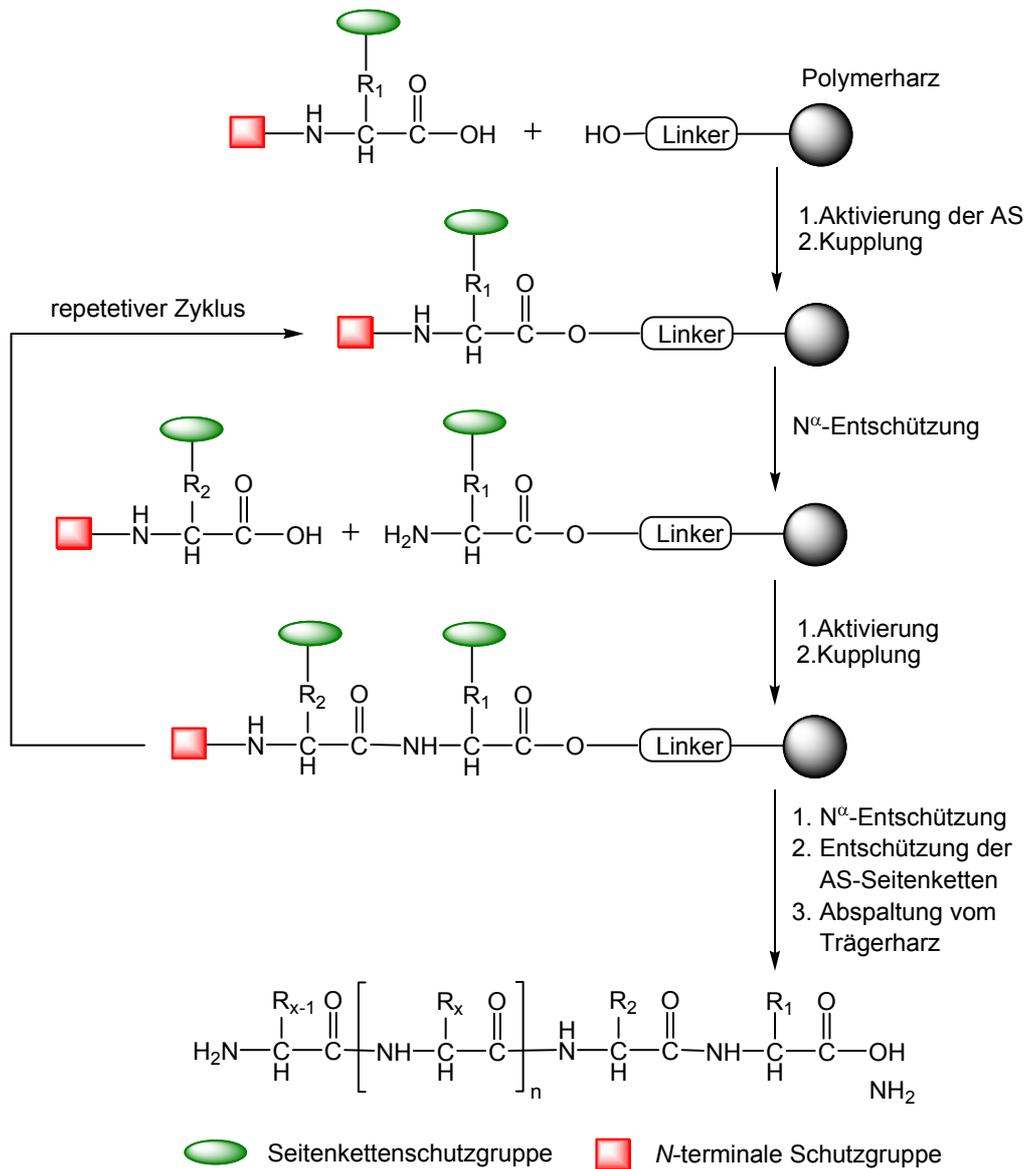
### 2.2.3 Peptidsynthese

Seit der Einführung durch *Emil Fischer*<sup>[51]</sup> wurde die Peptidsynthese stetig weiterentwickelt, und es sind verschiedene Möglichkeiten für den Aufbau von Peptidsequenzen bekannt. Neben der Synthese in Lösung oder der biotechnologischen Herstellung durch gentechnisch veränderte *E.coli* Bakterien ist die von *Merrifield* eingeführte, festphasengebundene Peptidsynthese (*solid-phase supported peptide synthesis*, SPPS),<sup>[52]</sup> die wichtigste Methode, um definierte Peptidsequenzen auf chemischem Wege herzustellen.

#### *Prinzip der festphasengebundenen Peptidsynthese*

Die SPPS nutzt vernetzte Polymer-Mikrogele als Trägerharze und bietet einige Vorteile, wie z.B. das einfache Entfernen überschüssiger Reagenzien durch Waschprozesse, Automatisierbarkeit und die Möglichkeit nicht-natürliche Aminosäuren oder andere chemische Bausteine in die Sequenz integrieren zu können. Durch die Weiterentwicklung der Synthese-Harze, Kupplungsreagenzien und Schutzgruppenstrategien konnte die

Geschwindigkeit und die Effizienz des Syntheseprozesses erhöht und der finanzielle Aufwand gesenkt werden. Über SPPS können heute vollautomatisiert Peptidsequenzen und kleine Proteine von ca. 70-100 Aminosäuren Länge synthetisiert werden und sogar Proteine sind über Fragmentkondensation mittels chemischer Synthese zugänglich. Das Prinzip der festphasengebundenen Peptidsynthese ist in Abbildung 2.6 dargestellt.



**Abb. 2.6:** Prinzip der festphasengebundenen Peptidsynthese

Während Peptide und Proteine in der Natur vom *N*- zum *C*-Terminus aufgebaut werden, verläuft der sequentielle Aufbau in der festphasengebundenen Synthese vom *C*- zum *N*-Terminus. Die Anbindung der ersten AS erfolgt über eine Ankergruppierung. Der sogenannte

Linker ermöglicht die Abspaltung des Peptides vom Harz nach beendeter Synthese unter spezifischen Bedingungen.

Um eine chemoselektive Kupplungsreaktion zu gewährleisten und eine Polymerisation zu verhindern, sind alle Seitenkettenfunktionalitäten der wachsenden Peptidkette sowie die Aminogruppe der zu kuppelnden Aminosäure temporär geschützt. Die Wahl der Reihenfolge der zu kuppelnden Aminosäuren ermöglicht den gezielten Aufbau einer definierten Peptidsequenz. Um das Peptid in hoher Reinheit zu erhalten, werden im Allgemeinen hohe Überschüsse an aktivierter Aminosäure eingesetzt. Ein Vorteil der festphasengebundenen Synthese besteht darin, dass überschüssige Reagenzien nach beendeter Reaktion durch einfaches Waschen entfernt werden können. Nach abgeschlossener Synthese wird das Peptid vom Harz abgespalten. Dabei verbleiben in Abhängigkeit des Linkers und der verwendeten Abspaltbedingungen die Seitenkettenschutzgruppen am Peptid oder werden direkt mit abgespalten.

Durch die sich immer wiederholende Abfolge der Reaktionen (Entfernen der temporären Schutzgruppe, Waschen, Kupplung der nächsten Aminosäure, Waschen) ist die Synthese automatisierbar. Dabei ist es sehr wichtig, dass alle Reaktionen quantitativ und ohne Nebenreaktionen erfolgen. Ansonsten können Fehlsequenzen auftreten, die oft nur schwer vom gewünschten Produkt abtrennbar sind.

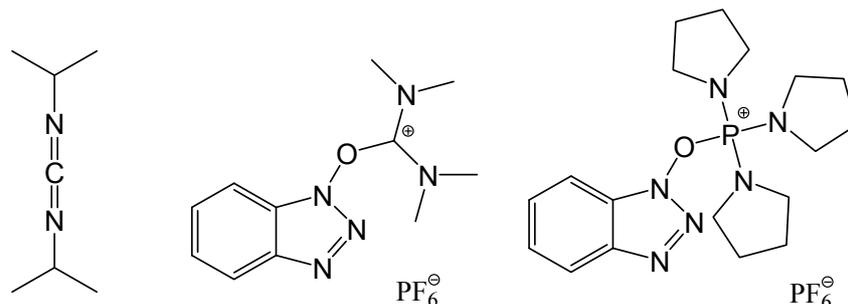
### *Schutzgruppenstrategie*

Bei der Wahl der Schutzgruppen ist es entscheidend, dass die *N*-terminalen Schutzgruppen und die Seitenkettenschutzgruppen orthogonal zueinander quantitativ abspaltbar sind. Es haben sich im Wesentlichen zwei Synthesestrategien durchgesetzt, die von Merrifield verwendete, säurelabile *t*Boc/*Bzl* Methode und die basenlabile Fmoc/*t*Bu Methode. Letztere erlaubt eine Synthese unter wesentlich mildereren und wahrlich orthogonalen Bedingungen.

Die Fmoc-Strategie schützt die  $\alpha$ -Aminogruppe mit dem basenlabilen Fluorenylmethoxycarbonyl-Rest (Fmoc). Diese Schutzgruppe erlaubt die Quantifizierung der Kupplungsausbeute. Beim Abspalten mit Piperidin entsteht Dibenzofulven, das von Piperidin abgefangen wird. Das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt kann UV-spektrometrisch bei 254 nm detektiert und quantitativ bestimmt werden. Funktionelle Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren werden mit basenstabilen Gruppen geschützt. Hier finden säurelabile Gruppen wie *tert*-Butyl (für Säure- und Hydroxyfunktionalitäten, z. B. bei Ser, Asp), Trityl (bei Amid, z. B. Gln oder Asn) oder *t*Boc (für Amine, z.B. Lys, Arg) Verwendung.

### Aktivierungsreagenzien

Für die Bildung einer Amidbindung ist eine Aktivierung der Carboxylfunktion an der beteiligten Aminosäure notwendig. Ohne die Aktivierung würde sich bei Raumtemperatur lediglich das Ammoniumcarboxylat bilden. Die gebräuchlichsten Aktivierungsmittel wandeln die Carboxylgruppe in symmetrische Anhydride oder Aktivester um. Häufig eingesetzte Aktivierungsreagenzien sind Carbodiimide, Uroniumsalze und Phosphoniumsalze (Abb.2.7).



**Abb. 2.7:** Strukturformeln von DIC (links), HBTU (Mitte) und PyBOP (rechts).

Die Aktivierung eines *N*-geschützten Aminosäurederivates an der Carbonsäurefunktion mit Carbodiimiden (z.B. Dicyclohexylcarbodiimid<sup>[53]</sup> (DCC)) war lange Zeit die Methode der Wahl. Dabei können zusätzlich Reagenzien wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) oder 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) zum Einsatz kommen, um die Kupplungseffizienz zu erhöhen. Ein Nachteil ist die Bildung des schwerlöslichen Harnstoffderivates des DCC. Dies kann allerdings durch die Verwendung von Diisopropylcarbodiimid (DIC) umgegangen werden, da dessen Harnstoffderivat in den gängigen Lösemitteln (DMF oder NMP) löslich ist. In der heutigen Zeit werden häufig andere Aktivierungsreagenzien eingesetzt, z.B. Kupplungsreagenzien des Guanidiniumtyps.<sup>[54, 55]</sup> Eine häufig genutzte Methode ist die Aktivierung der AS mit einem Gemisch aus HBTU (2-(H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) und HOBt unter Basenkatalyse, z. B. mit *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA). Durch den Basenzusatz erhöht sich die Elektrophilie der Carboxylfunktionalität der Aminosäure und der Zusatz von HOBt verringert die Tendenz zur Racemisierung.<sup>[56]</sup>

Neben der Klasse der Guanidinium/Uroniumreagentien spielen Phosphoniumreagenzien als Aktivierungsmittel für die SPPS eine große Rolle. Die Aktivierung erfolgt über die *in situ* Generierung von Aktivestern. Beispiele sind Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat (BOP), Benzotriazol-1-yl-oxytris-pyrrolidino-phosphonium-

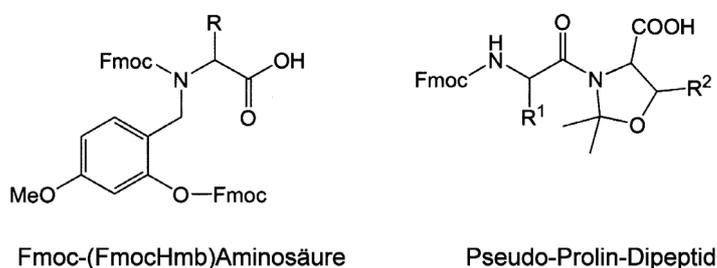
hexafluorophosphat<sup>[57]</sup> (PyBOP) sowie die noch reaktivere korrespondierende Aza-Verbindung PyAOP.<sup>[58]</sup>

### 2.2.4 Synthese von schwierigen Peptidsequenzen

$\beta$ -Faltblatt-bildende Peptide zählen häufig zu den sogenannten "schwierig synthetisierbaren Sequenzen", (*difficult sequences* oder auch *difficult peptides*). Diese Peptide neigen schon während des schrittweisen Aufbaus der Peptidkette in organischen Lösungsmitteln am Harz zu intra- und intermolekularer Aggregation (Mikroaggregation). Dies liegt meist an einer eingeschränkten Zugänglichkeit der wachsenden Ketten, bedingt durch Aggregationseffekte zwischen den geschützten Peptidketten (inter- und intramolekular)<sup>[59, 60]</sup> oder auch durch Wechselwirkungen der hydrophoben Seitenketten mit dem Trägerharz.<sup>[61]</sup> Als Folge davon sind schlechte Zugänglichkeit von Reagenzien zum Peptid Amino-Terminus<sup>[62]</sup> beobachtet worden. Dies führt zu einer Nebenproduktbildung, bedingt durch unvollständige Kupplung oder Abspaltung der N <sup>$\alpha$</sup> -Schutzgruppe.<sup>[63]</sup> Zudem können Kettenabbrüche oder Fehlsequenzen auftreten.

Es wurden bereits zahlreiche Anstrengungen unternommen, um diese schwierigen Peptidsequenzen der chemischen Synthese zugänglich zu machen. Zunächst wurden vor allem Reaktionsbedingungen variiert. Hierbei wurden der Einfluß des Lösungsmittels,<sup>[64]</sup> chaotroper Salze,<sup>[65]</sup> niedriger Harzbeladung<sup>[66]</sup> sowie erhöhter Temperatur<sup>[67]</sup> auf die Kupplungs- und Deblockierungseffizienz untersucht.

Ein zweiter Ansatz nutzt Modifikationen an der Peptidkette für die Verbesserung der Synthese. Zwei für diese Strategien verwendete Derivate sind in Abbildung 2.8 dargestellt.



**Abb. 2.8:** Aminosäurederivate für die Synthese von schwierigen Peptidsequenzen

Es ist bekannt, dass das Einbringen sekundärer Aminosäuren wie Prolin oder Sarcosin die Mikroaggregation unterdrücken kann, da diese AS nicht als Wasserstoffbrücken-Donoren

fungieren können.<sup>[68,69]</sup> Dieses Prinzip wurde durch den Einbau von temporären, sperrigen Amidschutzgruppen, wie z. B. der 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl (Hmb-) Gruppe<sup>[70]</sup> weitergeführt. Die Hmb-Schutzgruppe (Abb. 2.8 links) stört ebenso, wie die oben genannten Aminosäuren, die Strukturbildung und trägt durch verbesserte Solvatisierung des vollgeschützten Peptids wesentlich zum Erfolg der Synthese bei. Die Ankupplung einer Aminosäure an N<sup>α</sup>-substituierte Hmb-Aminosäuren ist jedoch sterisch anspruchsvoller als die Acylierung von primären Aminen und ist insbesondere für  $\beta$ -verzweigte Seitenketten schwierig. Die Kupplung wird jedoch über die Acylierung der Hydroxylfunktion unter anschließender Ausnutzung eines intramolekularen O-N Acyltransfers ermöglicht.<sup>[71]</sup>

Ähnlich wirken die in *Manfred Mutters* Labor entwickelten Pseudo-Prolin-Bausteine<sup>[72, 73]</sup> (Abb. 2.8 rechts). Hierbei werden von Serin, Threonin und Cystein abgeleitete Oxazolidin bzw. Thiazolidin-Dipeptid-Einheiten in die schwierige Sequenz integriert. Neben der Fähigkeit Wasserstoffbrücken zu unterdrücken, induzieren Pseudo-Proline ebenso wie Prolin einen starren "Knick" in der Aminosäurekette und stören dadurch die Assoziation des Stranges. Das Einbringen dieser Dipeptid-Derivate ist im Vergleich zum Einsatz von Hmb wesentlich einfacher, jedoch ist für die Anwendung von Pseudo-Proline das Vorkommen von Serin, Threonin oder Cystein in der Sequenz notwendig. Ebenso wie Hmb lassen sich die Pseudo-Proline bei der abschließenden sauren Spaltung vom Träger-Harz mit TFA rückstandslos entfernen.

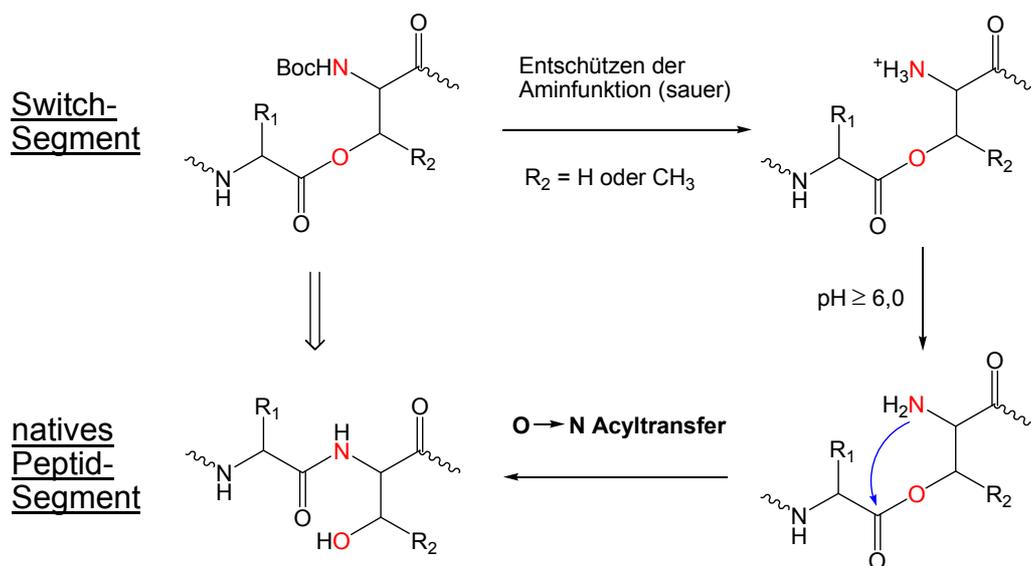
### 2.2.5 Switch-Segmente

Einen ähnlichen Ansatz verfolgt auch die erst kürzlich vorgestellte O-Acyl-Isopeptid-Methode.<sup>[12,14]</sup> Um die Aggregationseigenschaften des Peptids zu unterdrücken und folglich die Synthese zu verbessern, wird auch bei dieser Strategie ein reversibler Knick im Peptidrückgrat erzeugt. Dazu wird anstelle der Peptidbindung eine Esterbindung über die  $\beta$ -Hydroxygruppe von Serin oder Threonin aufgebaut. Die freibleibende  $\alpha$ -Aminogruppe muss dabei semi-permanent geschützt bleiben. Das Segment aus den zwei Aminosäuren, welche über die Esterbindung miteinander verknüpft sind, wird als Switch-Segment bezeichnet. Die entsprechenden Peptid-Derivate werden daher als Switch-Peptide oder auch als Depsi-Peptide bezeichnet.<sup>[13,74]</sup> Durch einen pH-Wert abhängigen Schaltvorgang können die Switch-Segmente später gezielt in die native, aggregationsfähige Peptidform umgewandelt werden.

Im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Methoden, dienen die Switch-Segmente nicht nur zur Verbesserung der Synthese, sondern verbleiben zunächst auch nach der Abspaltung vom

Syntheseharz in der Peptidsequenz. Die Estereinheiten sorgen für eine erhöhte Löslichkeit in gängigen Lösungsmitteln, wie z.B. Methanol, und erleichtern so die Reinigung und Analytik der resultierenden Peptide.

Die Bildung der nativen Amidbindung kann durch Abspaltung der temporären N<sup>α</sup>-Schutzgruppe vom betreffenden Serin- bzw. Threoninrest und anschließende pH-Erhöhung induziert werden. Ein Anstieg des pH-Wertes bewirkt eine Verschiebung des Protonierungsgleichgewichts vom Ammonium zum nucleophilen Amin, bewirkt eine regioselektive Umlagerung (O→N Acyl Transfer) in den Switch-Segmenten (Abb. 2.9) und führt damit zur Bildung des nativen Peptidrückgrats. In Abbildung 2.9 ist die Struktur der Switch-Peptide (O-Acyl-Isoform) und die resultierende native Peptidstruktur nach erfolgtem O→N Acyltransfer dargestellt.



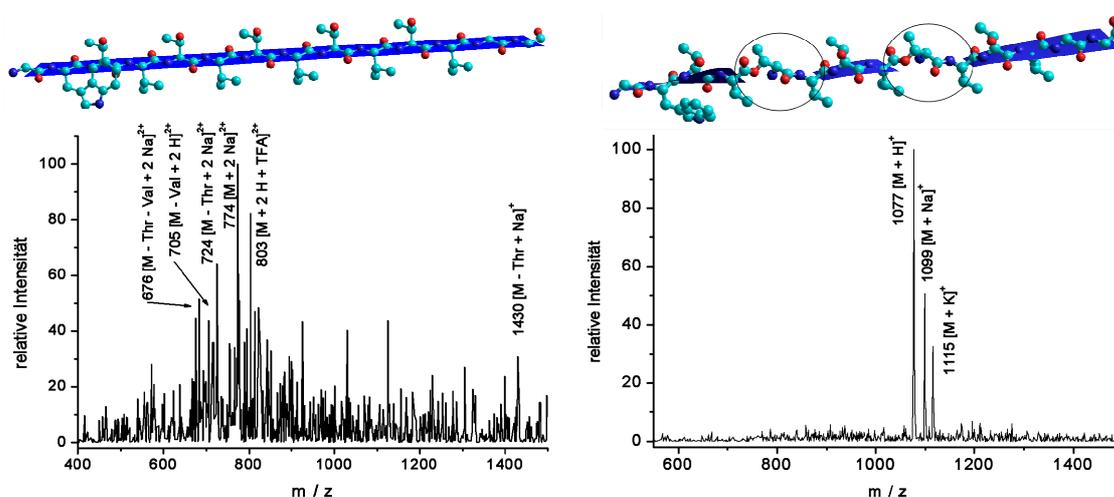
**Abb. 2.9:** pH-induzierter Übergang von der Switch-Peptidstruktur (oben links) zur nativen Peptidstruktur (unten links).

Besonders für Peptide, die stark zur Aggregation neigen, z. B. das Amyloid- $\beta$  (1-42)<sup>[13,75,76]</sup> oder die (Thr-Val)<sub>x</sub>-Sequenz,<sup>[15,74]</sup> konnten auf diesem Weg erheblich verbesserte Synthese- und Reinigungseigenschaften erzielt werden.

*Vergleich der strukturbrechenden Eigenschaften von Switch-Segmenten und Pseudo-Prolinen.*

In einer vorangehenden Arbeit wurde an einer Modell-Peptidsequenz, bestehend aus einer alternierenden Abfolge von fünf (Threonin-Valin) Einheiten ((TV)<sub>5</sub>) die strukturbrechenden Eigenschaften der Switch-Segmente und der Pseudo-Prolin Einheiten untersucht.<sup>[15]</sup> Zunächst wurde eine ungestörte (TV)<sub>5</sub>-Sequenz im Peptidsyntheseautomaten nach Standard Fmoc-Protokollen (FastMoc 0,1 mmol)<sup>[77]</sup> hergestellt. Das Massenspektrum des voll entschützten Peptids (Abb. 2.10, links) zeigte neben den Produktsignalen auch viele weitere Signale, die teilweise Fehlsequenzen zugeordnet werden konnten, in denen z.B. ein Threonin oder ein Valin fehlten. Die hohe Uneinheitlichkeit in der Produktzusammensetzung sowie die geringe Ausbeute bestätigten die erwarteten Schwierigkeiten bei der Synthese einer (TV)<sub>5</sub>-Peptidsequenz unter Standardbedingungen.

Daraufhin wurde jeweils eine (TV)<sub>5</sub>-Sequenz unter Einbau von Pseudo-Prolin Gruppen sowie Switch-Segmenten synthetisiert, um die Eigenschaften der beiden strukturbrechenden Systeme direkt vergleichen zu können.

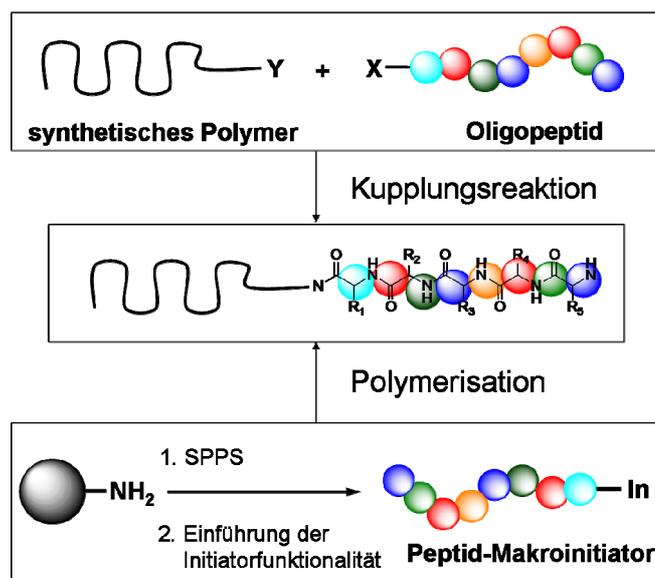


**Abb. 2.10:** ESI-Massenspektren der Peptidsequenz GG(TV)<sub>5</sub>KFG hergestellt über Standard SPPS Fmoc-Bedingungen (links) und der Peptidsequenz (TV)<sub>5</sub>G 1,3-switch (rechts), (gemessen in Methanol, c = 1 mg/ml).<sup>[15]</sup>

Der Einsatz dieser Segmente ermöglichte in beiden Fällen eine deutliche Verbesserung im Hinblick auf Ausbeute und Reinheit (siehe beispielhaft Abb. 2.10 rechts). Allerdings konnte durch CD-spektroskopische Messungen gezeigt werden, dass die strukturbrechenden Eigenschaften der Switch-Ester-Einheiten, gegenüber denen der Pseudo-Proline, deutlich stärker ausgeprägt sind.<sup>[15]</sup>

## 2.3 Peptid-Polymer Konjugate – Ligationsstrategien

Bio-inspirierte Blockcopolymere aus Polypeptiden bzw. Proteinen und synthetischen Polymeren haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die Forschungsaktivitäten richteten sich dabei auf die Untersuchung von Selbstorganisationsprozessen bis hin zu medizinischen Anwendungen, z. B. als Wirkstoffträger-Systeme.<sup>[78]</sup> Die ersten Arbeiten zur Synthese von Peptid-Polymer Konjugaten wurden von *Gallot et al.* durchgeführt.<sup>[79-81]</sup> Allerdings wurden dabei polydisperse Peptide verwendet. Eine Vielzahl weiterer Konjugate mit polydispersen Peptidsegmenten sowie Blockcopolymere aus Proteinen und synthetischen Polymeren wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben.<sup>[4,82,83]</sup> Der Zugang zu Konjugaten aus Peptiden mit definierter Aminosäuresequenz und synthetischen Polymeren ist im Wesentlichen über zwei Ansätze, den Kupplungsansatz und den Polymerisationsansatz, möglich (siehe Abb. 2.11).



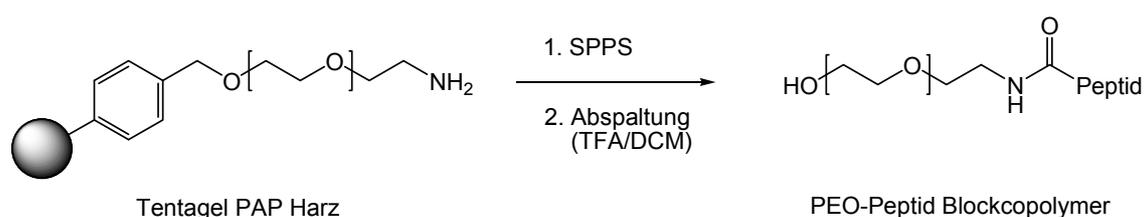
**Abb. 2.11:** Kupplungsansatz (oben) bzw. Polymerisationsansatz (unten) zur Integration definierter Oligopeptideinheiten in synthetische Polymere.<sup>[84]</sup>

### 2.3.1 Kupplungsstrategie

Der Kupplungsansatz beinhaltet die selektive Anbindung eines kettenendfunktionalisierten synthetischen Polymers an eine komplementäre Funktionalität des Peptides (siehe Abb. 2.11 oben). Die Kupplungsreaktion kann sowohl homogen in Lösung als auch an einem Trägermaterial (Harz) durchgeführt werden. Dabei ist eine spezifische Endfunktionalisierung

des synthetischen Polymersegments entscheidend für eine selektive Anbindung an das Peptidsegment. Die Kupplung von Polymersegmenten an festphasengebundene Peptide hat den Vorteil, dass Aktivierungsreagenzien und im Überschuss eingesetztes Polymer nach der Reaktion sehr einfach durch Waschprozesse entfernt werden können. Die Möglichkeit, die beiden einzelnen Blöcke unabhängig voneinander vor der Kupplung zu analysieren, ist ein weiterer Vorteil dieses Ansatzes. Allerdings ist bei dieser Methode der Polymerisationsgrad des zu kuppelnden Polymerblocks limitiert, da sowohl die Endgruppenreaktivität als auch die Diffusionsgeschwindigkeit in das Harz mit steigender Kettenlänge des Polymers abnehmen.<sup>[85]</sup>

Ein Beispiel für diese Ligationsstrategie lieferten *Klok und Mitarbeiter*, die ein  $\alpha$ -Methoxy- $\omega$ -Carboxyl funktionalisiertes Polyethylenoxid (PEO) mit der terminalen Aminfunktion eines festphasengebundenen Peptids verknüpften.<sup>[86]</sup> Aufgrund der Biokompatibilität und der guten Wasserlöslichkeit von PEO ist eine Anbindung an Peptide oder Proteine in der Medizin und Pharmakologie von großem Interesse. Daher sind in diesem Bereich bereits eine Vielzahl homogener Kupplungsstrategien entwickelt worden.<sup>[87]</sup> Derartige Verknüpfungen sind natürlich nicht nur über die terminale Peptidfunktionalität ( $-\text{NH}_2$  oder  $-\text{COOH}$ ) möglich. Auch die Seitenkettenfunktionalitäten eines Peptidsegments, wie z. B. die Carboxylgruppe von Asparagin- oder Glutaminsäure, die Amingruppe von Lysin oder die Thiolgruppe von Cystein können für die Ankupplung eines synthetischen Polymersegments ausgenutzt werden.<sup>[82]</sup> Ein weiterer, relativ einfacher Zugang zu linearen PEO-Peptid Blockcopolymeren ist die Verwendung von Tentagel PAP Harzen (PAP - *PEO Attached Products*) für die SPPS. Ein am Trägerharz gebundenes PEO-Segment dient als Ausgangspunkt für die Peptidsynthese und kann nach Abschluss des sequentiellen Aufbaus des Peptidsegments direkt als Konjugat abgespalten werden (siehe Schema 2.1). Durch Kombination der Ankupplung eines synthetischen Polymersegments an einen Peptid-Aminterminus unter Verwendung eines PAP-Harzes sind so theoretisch auch bioorganisch-synthetische ABA (PEO-Peptid-PEO) oder ABC Triblockcopolymere auf recht elegantem Wege herstellbar.



**Schema. 2.1:** Synthese eines PEO-Peptid Konjugats mit Hilfe des Tentagel PAP Harzes.

Auch andere Kettenendfunktionalisierungen, wie z.B. Maleinimide,<sup>[88,89]</sup> Vinylsulfone<sup>[90,91]</sup> oder Aldehyde<sup>[92,87]</sup> wurden bereits für die Anbindung synthetischer Polymere genutzt. Zwei weitere sehr selektive Kupplungsmethoden sind die Staudinger-Kupplung (Azid + Phosphin)<sup>[93]</sup> und die Click-Chemie (Kupfer katalysierte [3+2] Cycloaddition aus Azid und Alkin).<sup>[94]</sup> Beide Methoden tolerieren eine Vielzahl an funktionellen Gruppen und wurden bereits für die Modifizierung von Zelloberflächen eingesetzt.<sup>[95,96]</sup>

### 2.3.2 Polymerisationsstrategie

Im Falle der Polymerisationsstrategien erfolgt die Synthese des Polymersegments in Anwesenheit des Peptids. Dieser Ansatz beinhaltet eine selektive Einführung einer Initiator- oder Kettenüberträger-Funktionalität in die Peptidsequenz (siehe Abb. 2.11). Im Gegensatz zur Kupplungsstrategie ermöglicht sie den Aufbau eines hochmolekularen synthetischen Polymersegments am bioorganischen Block. Es hat sich gezeigt, dass kontrolliert radikalische Polymerisationstechniken (CRP)<sup>[97]</sup> für diesen Ansatz am besten geeignet sind. So wurden von *Wooley und Mitarbeitern* selektiv funktionalisierte Polypeptide als Makroinitiatoren für die *Nitroxide-mediated Polymerization* (NMP) von Acrylaten und Styrol verwendet.<sup>[98]</sup> Einen ähnlichen Ansatz wählten auch *Mei et al.* Sie nutzten die kupfer-katalysierte *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP) für die Polymerisation von 2-Hydroxyethylmethacrylat an einem festphasengebundenen Oligopeptid-ATRP-Makroinitiator.<sup>[99]</sup> Die Polymerisation an der festen Phase ist allerdings mit einigen Nachteilen behaftet. Aufgrund der Immobilität des Initiators an der Festphase ist keine homogene Durchmischung und Verdünnung möglich. Außerdem ist die Polymerisation stark von der Diffusionslimitierung innerhalb des Harzes geprägt. Dieses führt im Allgemeinen zu höheren Polydispersitäten der resultierenden Polymerkonjugate. Deutlich bessere Kontrolle und Molekulargewichtsverteilungen konnten durch ATRP mit Peptidmakroinitiatoren<sup>[100-102]</sup> und Peptidmakromonomeren<sup>[103]</sup> in Lösung erreicht werden. Des Weiteren erlaubt die Einführung einer Kettentransferfunktionalität in eine Peptidsequenz die effektive Kontrolle einer *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer* (RAFT) Polymerisation.<sup>[104-106]</sup> Die Vorteile der RAFT Polymerisation für die Synthese von Biokonjugaten liegen vor allem in der Toleranz gegenüber einer Vielzahl funktioneller Gruppen, der Abwesenheit von Metallkatalysatoren und der engen Verwandtschaft des RAFT Prozesses zur freien radikalischen Polymerisation.

*Börner und Mitarbeiter* synthetisierten einen Peptid-basierenden Kettenüberträger (Peptid-CTA) durch Transformation der terminalen ATRP Initiatorgruppe eines festphasen-

gebundenen Oligopeptid-ATRP-Makroinitiators in eine Dithioester Kettentransfer Funktionalität. Nach Abspaltung vom Trägerharz lieferte die durch das Peptid-CTA kontrollierte Polymerisation von *n*-Butylacrylat in Lösung, Konjugate mit kontrollierbaren Molekulargewichten und niedrigen Polydispersitäten ( $M_w/M_n \approx 1,1$ ).<sup>[107]</sup> Da die RAFT-CTA Gruppe nach der Isolation am  $\omega$ -Terminus des Konjugates verbleibt, ist eine Erweiterung um einen zusätzlichen synthetischen Block möglich. Des Weiteren kann nach Reduktion der Dithioestergruppe in eine Thiol-Funktion die Anbindung an ein Protein oder an Goldoberflächen erfolgen.

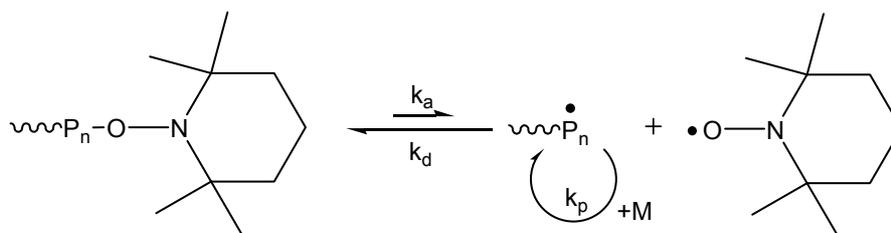
### 2.3.3 Grundlagen der kontrollierten radikalischen Polymerisation

Das Konzept der kontrollierten radikalischen Polymerisation (CRP) verbindet die Vorteile der freien radikalischen Polymerisation mit denen einer lebenden Polymerisation. Die CRP ermöglicht dadurch die Verwendung einer Vielfalt von verschiedenen Monomeren, liefert definierte Molekulargewichte und geringe Polydispersitäten und erlaubt eine gute Kontrolle der Endfunktionalisierung bei gleichzeitig relativ geringen Empfindlichkeiten gegenüber Verunreinigungen, Wasser und CO<sub>2</sub>.

Das Prinzip basiert auf einem dynamischen Gleichgewicht zwischen einer sehr kleinen Konzentration aktiver, wachstumsfähiger Kettenenden und einer Mehrheit von „schlafenden“ Spezies.<sup>[108]</sup> Durch die starke Absenkung der Konzentration an aktiven Kettenenden ist die Konzentration an freien Radikalen sehr gering. Dies vermindert das Auftreten von Kettenabbruchsreaktionen (z.B. durch Rekombination oder Disproportionierung) in starkem Maße und ermöglicht somit engere Molmassenverteilungen. Da aber weiterhin in geringem Umfang Abbruchreaktionen stattfinden, wird in diesem Zusammenhang von einer kontrollierten und nicht von einer lebenden Polymerisation gesprochen. Die drei wichtigsten Techniken der kontrollierten radikalischen Polymerisation sind die *Nitroxide Mediated Polymerization* (NMP), die *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP) und die *Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer* (RAFT) Polymerisation. Zusätzlich sind auch noch andere, spezialisiertere Methoden bekannt, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. Die Grundlagen der drei wesentlichen Methoden werden im Folgenden kurz erläutert.

### Nitroxide Mediated Polymerization (NMP)

Bei der NMP erfolgt die Initiierung der Polymerisation, wie bei der freien radikalischen Polymerisation durch einen klassischen Radikalstarter (z.B. AIBN, BPO). Zusätzlich werden Nitroxide als stabile Radikale hinzugegeben.<sup>[109-111]</sup> Ein Beispiel ist das 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO). Die stabilen Radikale reagieren reversibel mit den Radikalen der wachsenden Kettenenden unter Bildung von Alkoxyaminen. Bei Temperaturen über 110 °C (TEMPO) kommt es zu einer homolytischen Spaltung des gebildeten Alkoxyamins in das stabile Nitroxidradikal und ein freies Radikal, welches wieder als wachsendes Kettenende fungiert. Über die Temperatur und die Wahl des stabilen Radikals kann das Gleichgewicht auf die Seite der deaktivierten Spezies eingestellt werden, so dass eine Kontrolle über die Polymerisation erlangt werden kann. Das Gleichgewicht ist in Abbildung 2.12 dargestellt:



**Abb. 2.12:** Die *Nitroxide Mediated Polymerization* (NMP) am Beispiel des Aktivierungs - Deaktivierungs-Gleichgewichts mit TEMPO als stabiles Radikal.

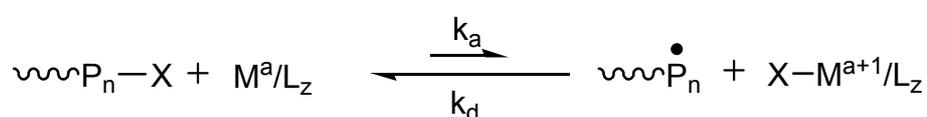
### Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)

Die ATRP wurde erstmalig 1995 durch *Matyjaszewski et al.* beschrieben.<sup>[112]</sup> Sie stellt eine Anwendung der in der organischen Chemie bekannten übergangsmetallkatalysierten *Atom Transfer Radical Addition* (ATRA)<sup>[113]</sup> auf die Synthese von Polymeren dar. Inzwischen hat sich die ATRP als vielseitige Polymerisationsmethode etabliert und umfasst eine große Anzahl von verschiedenen Übergangsmetallkatalysatoren, Liganden, Initiatoren und Monomeren.<sup>[114]</sup>

Bei der ATRP werden die reaktiven Kettenenden durch Ausbildung von Kohlenstoff-Halogen-Bindungen in „schlafende“ Spezies überführt. Die Reinitiierung erfolgt durch die Reaktion mit Übergangsmetallkomplexen, üblicherweise Kupferkomplexen (siehe Abb. 2.13). Die Generierung des aktiven Primärradikals erfolgt durch einen reversiblen Redoxprozess an einem Initiatorhalogenid, wobei gewöhnlich  $\alpha$ -Halogen-carbonsäureester verwendet werden.

Die Struktur des Initiators ist entscheidend für die Funktionalisierung der Polymerendgruppen.

Wie in Abbildung 2.13 dargestellt, wird die Abspaltung des Halogenids von der inaktiven Kette durch einen Kupfer(I)komplex katalysiert. Letzterer wird dabei durch einen Elektronentransfer zum Kupfer(II)komplex oxidiert. Das Kettenwachstum erfolgt durch die Reaktion des Monomers mit der generierten Radikalspezies ( $P_n\cdot$ ). Durch anschließende Rückübertragung des Halogenids vom Kupfer(II)komplex auf das wachsende Kettenende erfolgt die Deaktivierung. Daraus resultieren dann wieder ein Kupfer(I)komplex und ein Alkylhalogenid.



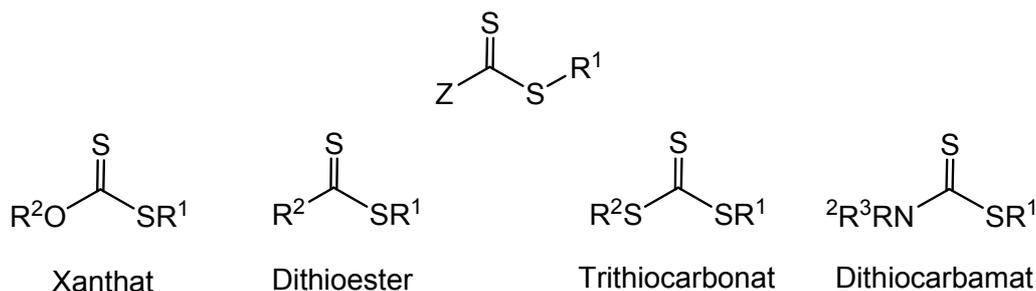
**Abb. 2.13:** Aktivierungs – Deaktivierungs Gleichgewicht der ATRP (X = Halogen, Pseudohalogen; M = Cu, Ru, Fe, Ni, Pd; a = Ladung des Metallions; L = Ligand)

Die kontrollierte Polymerisation kann auch durch Zugabe eines konventionellen radikalischen Initiators (AIBN, BPO) gestartet werden, wenn der Polymerisation zusätzlich  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{X}_2$  als Deaktivator zugesetzt wird. Diese Art der Polymerisation wird als „inverse ATRP“ bezeichnet.<sup>[115]</sup>

Der chelatisierende Ligand im Katalysatorkomplex dient zur Feinabstimmung des Redoxpotentials und zur Verbesserung der Löslichkeit der Kupfersalze im Reaktionsmedium.<sup>[116]</sup> Für die Polymerisation mit Kupferkatalysatoren eignen sich insbesondere mehrzählige Liganden mit Stickstoff als koordinierendem Atom.<sup>[117]</sup> Einige verwendete Ligandenklassen sind Phenanthroline, Pyridine, Pyridinimine und aliphatische Amine.

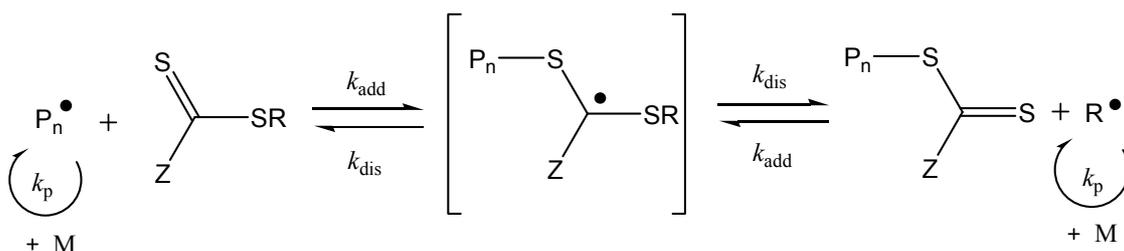
#### *Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerisation*

Eine weitere Methode der kontrollierten radikalischen Polymerisation ist die RAFT Polymerisation.<sup>[118-121]</sup> Bei dieser wird ein sogenannter Kettenüberträger oder Kettentransferreagenz (*chain transfer agent*, CTA) zugesetzt, welches in der Lage ist, das Radikal zu übertragen. Als CTAs werden Thioylsulfanyl Derivate, wie z. B. Dithiocarbamate und Trithiocarbonate verwendet (Abbildung 2.14).



**Abb. 2.14:** Strukturen von Kettenüberträgern für RAFT Polymerisationen.

Wie bei der freien radikalischen Polymerisation erfolgt die Initiierung der RAFT Polymerisation durch den Zusatz einer geringen Menge (5 - 10 mol% bezogen auf den Kettenüberträger) eines Radikalstarters (Azo- oder Peroxidinitiatoren). Für den Mechanismus des RAFT Prozesses werden eine Reihe von reversiblen Addition-Fragmentierungsschritten vorgeschlagen. Die Addition eines wachstumsfähigen Makroradikals ( $P_n^\bullet$ ) an eine Thiocarbonylthio-Verbindung ergibt ein radikalisches Zwischenprodukt, welches in eine polymergebundene Thiocarbonylthio-Verbindung und ein neues Radikal  $R^\bullet$  fragmentiert (Abbildung 2.15). Das so generierte Makroradikal bildet eine neue wachstumsfähige Kette ( $P_m^\bullet$ ). Anschließende Addition-Fragmentierungsschritte führen zu einem Gleichgewicht zwischen den wachsenden Ketten  $P_n^\bullet$  und  $P_m^\bullet$  und der inaktiven („schlafenden“) polymergebundenen Thiocarbonylthio-Verbindung.



**Abb. 2.15:** Vereinfachter Mechanismus des RAFT Prozesses (Addition-Fragmentierungsschritt).

Für ein gleichmäßiges Wachstum der Polymerketten ist eine hohe Übertragungsgeschwindigkeit des wachsenden Kettenendes im Vergleich zur Kettenwachstumsgeschwindigkeit notwendig. Die Übertragungsgeschwindigkeit kann durch eine Aktivierung der Thiocarbonylthiogruppe kontrolliert werden. Die Aktivierung der C=S Doppelbindung kann durch Einführung von Aryl-, Alkyl- oder Benzylgruppen an der Z-

Position erfolgen. Die Abgangsgruppe R des Überträgers muss in der Lage sein, das Radikal zu stabilisieren, um eine vergleichbare oder bessere Abgangsgruppe als das gebildete Initiatorradikal darzustellen. Zudem sollte es aktiv genug sein, um schnell mit einem Monomer zu reagieren.

Abgesehen vom Primärschritt, ist bei Dithiobenzoaten die Wahrscheinlichkeit, in welche Richtung das gebildete Intermediat zerfällt, gleich, da in beiden Fällen die Polymerketten, bis auf die Kettenlänge, die gleiche Struktur aufweisen. Dadurch ergibt sich eine vereinfachte Formel für die Geschwindigkeitskonstante der Übertragung  $k_{tr}$ , unabhängig von der Geschwindigkeitskonstante der Fragmentation formuliert werden:

$$k_{tr} = 0,5 k_{add} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

Die Übertragungsgeschwindigkeit  $v_{tr}$  lässt sich nach Gleichung 2.4 aus der Geschwindigkeitskonstanten der Übertragung  $k_{tr}$ , der Konzentration an aktiven Kettenenden und der Konzentration des Überträgers folgendermaßen berechnen:

$$v_{tr} = k_{tr} [P_n \cdot] [\text{Überträger}] \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

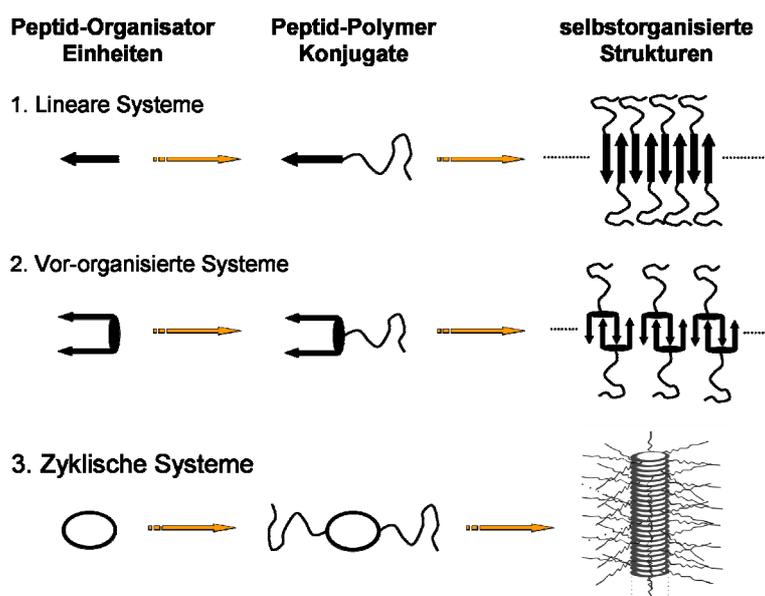
Für die Synthese von bioorganisch-synthetischen Konjugaten ist die RAFT-Polymerisation gut geeignet. Sie weist eine hohe Toleranz gegenüber einer Vielzahl funktioneller Gruppen auf, ermöglicht die kontrollierte Polymerisation einer großen Anzahl an Monomeren und erlaubt milde Reaktionsbedingungen. Außerdem werden, im Gegensatz zur ATRP, keine Übergangsmetallkatalysatoren benötigt. Dies ist von Vorteil, da Letztere biologisch toxisch sind und zu Wechselwirkungen mit dem Peptidsegment neigen, was eine kontrollierte Polymerisation beeinträchtigen kann.<sup>[101,102]</sup>

## 2.4 Peptid-geleitete Strukturbildung synthetischer Polymere

Der Ansatz, sequenzdefinierte  $\beta$ -Faltblatt-bildende Oligopeptide mit synthetischen Polymeren zu verknüpfen, um die strukturbildenden Eigenschaften von Peptiden mit den Materialeigenschaften von synthetischen Polymeren zu kombinieren, gehört erst seit kürzerer Zeit zu den Forschungsgebieten der Polymerchemie.<sup>[84,122]</sup>

### 2.4.1 Überblick über unterschiedliche Peptid-Organisator Systeme

In der Literatur sind im Allgemeinen drei verschiedene  $\beta$ -Faltblatt-bildende Peptid-Systeme für die Organisation der Mikrostruktur von konjugierten Polymeren zu finden. Diese sind zusammen mit den entsprechenden Polymerkonjugaten in Abbildung 2.16 schematisch dargestellt. Die einfachste Möglichkeit bietet die Verknüpfung einer linearen Peptidsequenz mit einem synthetischen Polymerblock (1). Des Weiteren können Peptidstränge durch Anbindung an ein Templatmolekül bereits für die  $\beta$ -Faltblattbildung vororientiert werden. Die Aggregation kann in diesem Fall schon mit kürzeren Aminosäuresequenzen im Vergleich zum linearen Analoga erreicht werden (2).<sup>[7,9]</sup> Interessant sind ebenfalls cyclische Peptidsysteme (3), welche erstmals von *Ghadiri et al.* beschrieben wurden.<sup>[123]</sup> Die korrespondierenden Polymer-Konjugate ermöglichen die Bildung von röhrenförmigen Kern-Schale Aggregaten.<sup>[124-126]</sup>



**Abb. 2.16:** Verschiedene Peptid-Organisator Systeme für das Konzept der peptidgeleiteten Strukturbildung synthetischer Polymere.<sup>[84]</sup>

## 2.4.2 Lineare Peptid-Organisatoren

Die linearen Peptid-Organisatoren sind die wohl am einfachsten zugänglichen Organisatorsysteme. Wegbereitend auf dem Gebiet der linearen Peptid-Polymer Konjugate waren die Arbeiten von *Lynn et al.*, die ein Konjugat aus Polyethylenoxid (PEO) und dem A $\beta$ <sub>10-30</sub>-Fragment der Amyloidsequenz herstellten und zeigen konnten, dass sich in Lösung fibrilläre Aggregate bilden.<sup>[127]</sup> Untersuchungen von *Messersmith et al.* machten deutlich, dass auch schon kürzere Oligopeptide (z.B. 7-mer) ein großes Potential zur Organisation von PEO in faserartige Strukturen aufweisen können.<sup>[128]</sup> Kürzlich wurde von *Frauenrath und Mitarbeitern* ein Ansatz entwickelt,  $\beta$ -faltblattbildende Peptid-Polymer Konjugate für die Ausrichtung funktioneller Gruppen in Lösung auszunutzen. Ein Tetra(L-Alanin)-Segment wurde verwendet, um eine am *N*-Terminus gebundene Diacetyleneinheit, durch Bildung eines parallelen  $\beta$ -Faltblatts so zu orientieren, dass sie topochemisch polymerisiert werden konnte.<sup>[129]</sup>

Die genannten Beispiele demonstrieren das große Potential der peptidgeleiteten Strukturbildung, jedoch waren nur relativ kurze Faserstrukturen zugänglich. Für Anwendungen in den Materialwissenschaften wären längere und mechanisch robustere Fasern wesentlich interessanter. Dafür werden Peptide mit einer sehr hohen Aggregationstendenz benötigt. Jedoch ist, wie schon in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, die festphasengebundene Peptidsynthese sowie die Aufreinigung und Analyse solcher Sequenzen sehr schwierig und aufwendig.<sup>[60]</sup>

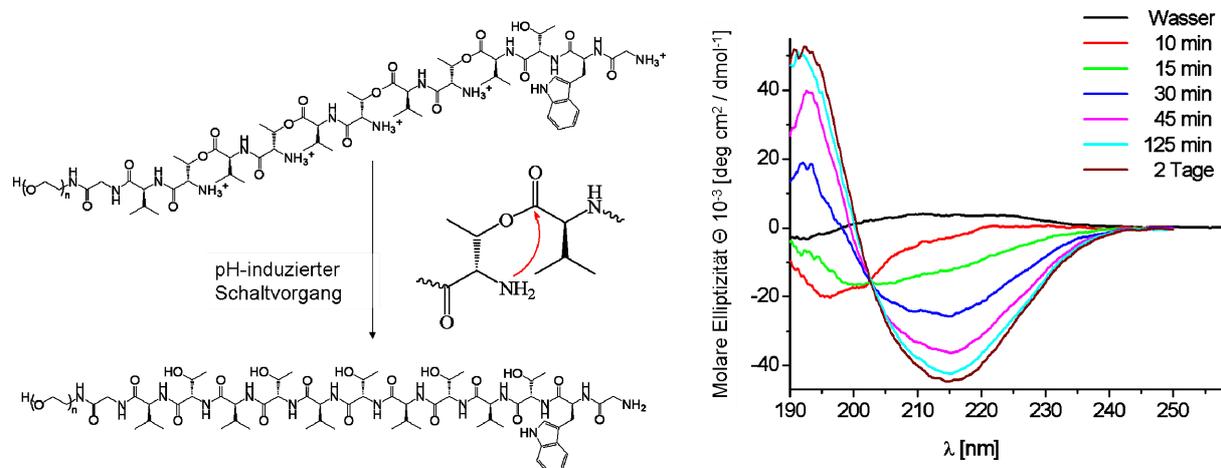
Um die Synthese solch stark aggregierender Peptide zu ermöglichen, könnten die in Abschnitt 2.2.5 beschriebenen Switch-Segmente genutzt werden. Dieser Ansatz wurde in einer vorangehenden Arbeit verfolgt. Darin wurde die Synthese und Strukturbildung eines Konjugats, bestehend aus einem linearen, schaltbaren (TV)<sub>5</sub>-Peptidsegment und einem Polyethylenoxid (PEO)-Block mit ca. 68 Wiederholungseinheiten beschrieben.<sup>[10,15]</sup>

## 2.4.3 Strukturbildung eines PEO- *block* - (Thr-Val)<sub>5</sub> *all-switch* Konjugats

Der Einbau von Switch-Segmenten in die Peptidsequenz ermöglichte nicht nur einen hohen Grad an Produktausbeute und -reinheit, sondern konnte erstmals auch als Hilfsmittel für die gezielte Initiierung und Kontrolle des Strukturbildungsprozesses ausgenutzt werden. Dabei wurde jede Bindung zwischen Threonin und dem in der Sequenz folgenden Valin als Switch-Ester aufgebaut. Die resultierende Sequenz wurde dementsprechend als *all-switch* Sequenz bezeichnet<sup>[10]</sup> (siehe Abb. 2.17 links oben). Die Synthese der Switch-Einheiten erfolgte nach

leicht abgewandelten Vorschriften von *Carpino et al.*<sup>[13]</sup> durch schrittweise Ankupplung von *t*Boc-geschütztem Threonin, das über eine ungeschützte  $\beta$ -Hydroxy-Seitenkettenfunktionalität verfügt, und anschließende Ankupplung eines Fmoc-geschützten Valins als Veresterung der  $\beta$ -Hydroxyfunktionalität des Threonins.

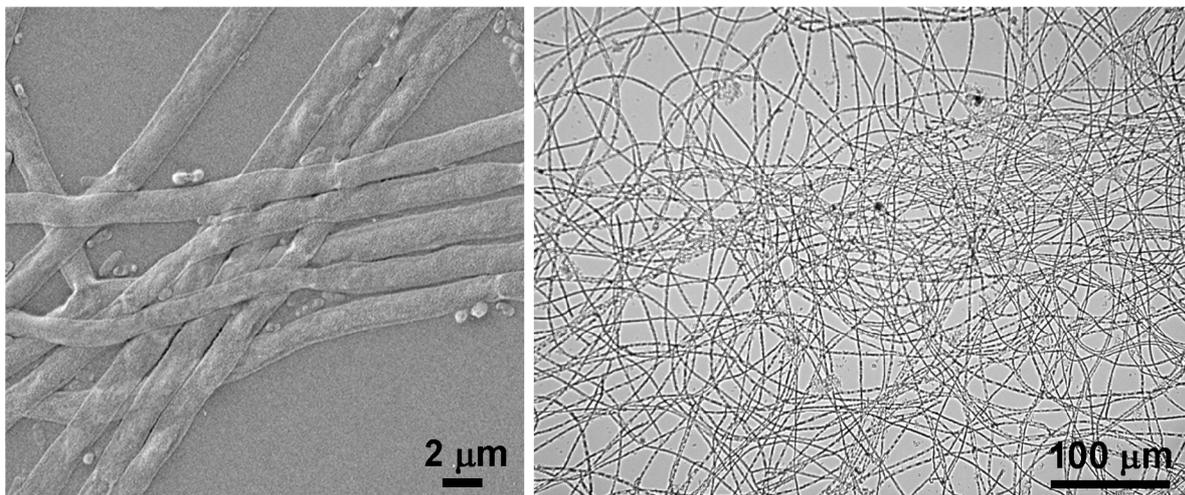
Die Peptid-PEO-Konjugate eigneten sich aufgrund der guten Lösungseigenschaften des PEO-Blocks sehr gut dazu, die Aggregation in wässriger Lösung genauer untersuchen zu können. So wurde u. a. die Induzierung und Kontrolle der Strukturbildung bei verschiedenen pH-Werten mit Hilfe von CD- und IR-Spektroskopie verfolgt. In Abbildung 2.17 (rechts) sind die zeitabhängigen CD-Messungen bei  $\text{pH} \approx 7,2$  dargestellt. Nach etwa 2 h war die Strukturbildung weitgehend abgeschlossen und das CD-Spektrum zeigte die für  $\beta$ -Faltblatt Strukturen charakteristische Bandenform mit einem Maximum bei  $\lambda \approx 193 \text{ nm}$  und einem Minimum bei  $\lambda \approx 216 \text{ nm}$ . Dennoch war in den AFM-Aufnahmen der auf Mica gespincoateten CD-Lösung eine hohe Uneinheitlichkeit an gebildeten Mikrostrukturen zu beobachten, was auf eine kinetische Kontrolle der Strukturbildung hindeutete.



**Abb. 2.17:** links: schematische Darstellung der pH-induzierten Schaltung von der gestörten  $\text{GW(TV)}_5\text{G-PEO}_{68}$  all-switch Struktur (links oben) zur nativen  $(\text{TV})_5$ -Peptidsequenz (links unten); rechts: Zeitabhängige CD-Messungen von  $\text{GW(TV)}_5\text{G-PEO}_{68}$  in wässriger Phosphat-Pufferlösung ( $c = 0,5 \text{ g/l}$ ,  $\text{pH} \approx 7,2$ ).<sup>[10,15]</sup>

Es stellte sich heraus, dass durch Senkung des pH-Wertes die Geschwindigkeit der Faltblattbildung verringert und die Einheitlichkeit der entstehenden Strukturen gesteigert werden kann. So konnten nach einem sehr langsamen Schaltvorgang in wässriger Lösung bei  $\text{pH} \approx 6$  mit Hilfe mikroskopischer Verfahren sehr einheitliche, flache Bandstrukturen mit Längen von einigen Millimetern gefunden werden (Abb. 2.18). Bei diesem pH-Wert ist nur

ein verschwindend kleiner Teil der Ammoniumgruppen der Switch-Segmente deprotoniert, d.h. dazu fähig die intramolekulare O $\rightarrow$ N Acyl-Umlagerung zum Amid zu vollziehen. Aus diesem Grund entsteht nur eine geringe Konzentration an aggregationsfähigen Spezies. CD-spektroskopische Messungen in Lösung sowie IR-spektroskopische Messungen an den Aggregaten zeigten das Vorhandensein antiparalleler  $\beta$ -Faltblattstrukturen bei gleichzeitigem Verschwinden der charakteristischen C=O Esterschwingungsbande (IR,  $\nu \approx 1730 \text{ cm}^{-1}$ ). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die Bildung der makroskopischen Bandstrukturen tatsächlich durch die Selbstorganisation der Peptidkomponente des Peptid-PEO Konjugats gesteuert wurde. Die Dimensionen und die Einheitlichkeit der erhaltenen Strukturen deuten darauf hin, dass es sich um Gleichgewichtsstrukturen handelt und keine kinetisch kontrollierten Aggregate.



**Abb. 2.18:** SEM- (links) sowie lichtmikroskopische Aufnahme (rechts) der faser- bzw. bandartigen Aggregate des Peptid-PEO Konjugats GW(TV)<sub>5</sub>G-PEO<sub>68</sub> aus wässriger Pufferlösung (pH  $\approx$  6).<sup>[10,15]</sup>



## Kapitel 3

# Design und Synthese der Peptid-Polymer Konjugate

Im letzten Kapitel wurde beschrieben, dass der Ansatz der peptidgeleiteten Strukturbildung synthetischer Polymere durch den Einsatz  $\beta$ -Faltblatt-bildender Peptidorganisatoren, in wässriger Lösung, erfolgreich angewendet werden konnte.<sup>[15]</sup> In dieser Arbeit sollte das Konzept auf organische Lösungsmittel erweitert werden, um den Zugang zu einer größeren Bandbreite an synthetischen Polymeren zu ermöglichen.

Um als Organisationseinheit für die peptidgeleitete Strukturbildung synthetischer Polymere fungieren zu können, sollte die gewünschte Peptidsequenz aus möglichst wenigen und einfachen Aminosäuren aufgebaut sein, aber dennoch eine hohe Aggregationstendenz zur  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweisen.

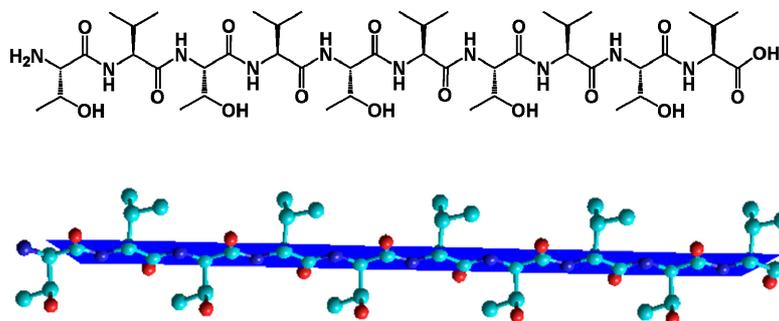
### 3.1 Design der Peptidsequenzen

Zwei Faktoren spielen bei der Wahl der Aminosäuren und deren Abfolge innerhalb der Sequenz eine wichtige Rolle. Um eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ausbilden zu können, sollte ein Peptid zum einen alternierend polare und unpolare Seitenketten aufweisen.<sup>[44]</sup> Zum anderen besitzen Aminosäuren eine unterschiedlich große Neigung  $\beta$ -Faltblattstrukturen auszubilden.<sup>[130]</sup> Es müssen möglichst beide Faktoren beachtet werden, um eine Peptidsequenz mit hoher Tendenz zur  $\beta$ -Faltblattbildung zu erhalten.

Beide Vorgaben werden durch die Wahl einer Sequenz, bestehend aus einer alternierenden Abfolge von Threonin-Valin erfüllt. Diese Aminosäuren besitzen einerseits eine hohe Neigung zur Ausbildung von  $\beta$ -Faltblättern und weisen andererseits verschiedene Polaritäten in ihren Seitenkettenfunktionalitäten auf. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen, bildet eine Sequenz aus alternierenden Valin (hydrophobe Seitenkette) und Threonin (hydrophilere Seitenkette) Einheiten einen  $\beta$ -Strang mit zwei unterschiedlich polaren Seiten.

Besonders die Abfolge mehrerer Threonin-Valin-Einheiten  $(TV)_x$  nacheinander ist bekannt dafür, stabile, ab einer bestimmten Länge teilweise unlösliche  $\beta$ -Faltblattstrukturen auszubilden. So untersuchten *Janek et al.* die Aggregationsfähigkeit linearer  $(TV)_n$ -Sequenzen in wässriger Lösung mit Hilfe von Circular dichroismus und Infrarotspektroskopie und

zeigten, dass ab fünf Wiederholungseinheiten ( $n = 5$ ) eine ausgeprägte Tendenz zur Bildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen auftritt.<sup>[131]</sup>



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung einer alternierenden (Thr-Val)<sub>5</sub>-Peptidsequenz in der  $\beta$ -Strang Konfiguration. Ausbildung von zwei unterschiedlich polaren Seiten, bedingt durch die Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren. Rote Kugeln symbolisieren Sauerstoff-, dunkelblaue Kugeln Stickstoff- und hellblaue Kugeln Kohlenstoffatome. Das blaue Band symbolisiert die  $\beta$ -Faltblattebene bedingt durch die rotationseingeschränkten Peptidbindungen.

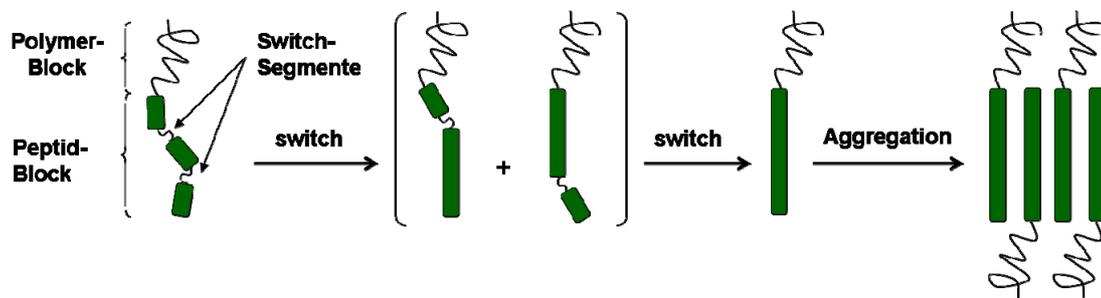
Wie in der Einführung beschrieben, konnten die starken Aggregationseigenschaften einer (TV)<sub>5</sub>-Peptidsequenz bereits als treibende Kraft bei der Strukturbildung eines (TV)<sub>5</sub>-Peptid-*block*-PEO Systems ausgenutzt werden. Die Switch-Segmente der (TV)<sub>5</sub> *all-switch* Peptidsequenz dienten dabei zum einen der Verbesserung der Synthese in Bezug auf Ausbeute und Reinheit. Zum anderen konnte die pH-abhängige Schaltbarkeit der Segmente genutzt werden, um die Strukturbildung gezielt zu initiieren und zu kontrollieren. Aus diesen Gründen wurde auch für diese Arbeit eine (TV)<sub>5</sub>-Peptidsequenz mit integrierten Switch-Störstellen als Organisationseinheit gewählt.

### 3.1.1 Weiterentwicklung des Peptid-Organisators

Ein Nachteil der (TV)<sub>5</sub> *all-switch* Sequenz ist allerdings die recht kosten- und zeitaufwendige Synthese. Diese ist nur semi-automatisierbar, da jede nicht-native Bindung (Esterbindung) zwischen den Aminosäuren per Handkupplung durchgeführt werden muss. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Synthese ökonomischer zu gestalten. Daher wurde zunächst die Anzahl der Switch-Einheiten in der (TV)<sub>5</sub>-Sequenz von vier (*all-switch*) auf zwei (*1,3-switch*) reduziert. Während im Fall der *all-switch* Sequenz noch jede Bindung zwischen Threonin und dem

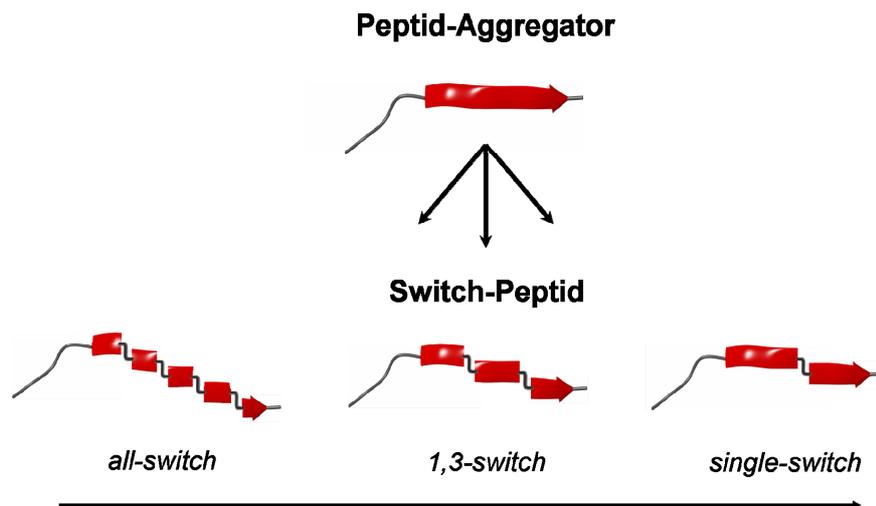
folgendem Valin als Ester-Bindung aufgebaut wurde, erfolgte dies beim *1,3-switch* Derivat nur noch für jedes zweite Threonin.

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass der Einsatz multipler Switch-Segmente in eine Peptidaggregatorsequenz zwar einerseits eine effektive Unterdrückung der Aggregationstendenz ermöglicht, andererseits macht eine hohe Zahl möglicher Zwischenstufen den Schalt- bzw. Strukturbildungsprozess sehr komplex. Wie in Abbildung 3.2 schematisch gezeigt, führt der Einbau von zwei Switch-Einheiten (*1,3-switch*) in eine  $(TV)_5$  Sequenz zu zwei verschiedenen Zwischenstufen, und im Fall von vier Switch-Segmenten (*all-switch*) können sogar 14 verschiedene Zwischenstufen gebildet werden.



**Abb. 3.2:** pH-Wert kontrollierter Schaltvorgang eines Peptid-Polymer Konjugates mit zwei Switch-Störsegmenten im Peptidblock (zweistufiger Prozess vom voll-gestörten Peptidsegment (links) über zwei mögliche Zwischenstufen (mitte) zum ungestörten Peptid-Aggregator (rechts)).

Da die Aggregationstendenz eines Peptidsegments schrittweise mit der Länge der nicht gestörten  $(TV)_n$  Sequenz ansteigt, erfordert ein gut steuerbarer Schaltprozess eine Minimierung der möglichen Zwischenstufen. Daher wurde im späteren Verlauf der Arbeit die Zahl der Switch Segmente auf eins reduziert, um einen binären AUS und EIN Zustand zu ermöglichen. Abbildung 3.3 fasst die Evolution des schaltbaren Peptid-Organisators zusammen. Ausgehend vom bekannten  $(TV)_5$  *all-switch* System wurde in dieser Arbeit die Zahl an Switch-Segmenten im Peptidsegment von vier auf zwei und schließlich auf eine Schalteinheit reduziert. Diese Veränderungen resultierten in einer Abnahme des synthetischen Aufwands und der Zahl der möglichen Zwischenstufen während des Schaltprozesses, bei gleichzeitiger Abnahme der strukturbrechenden Eigenschaften der Peptidderivate. Es konnte aber im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Switch-Segment ausreicht, um die Aggregationseigenschaften der  $(TV)_5$ -Sequenz effektiv zu unterdrücken.



**Abb. 3.3:** Entwicklung der  $(TV)_5$  Switch-Peptide als Vorläufer für die native, aggregationsfähige Peptid-Organisationseinheit.

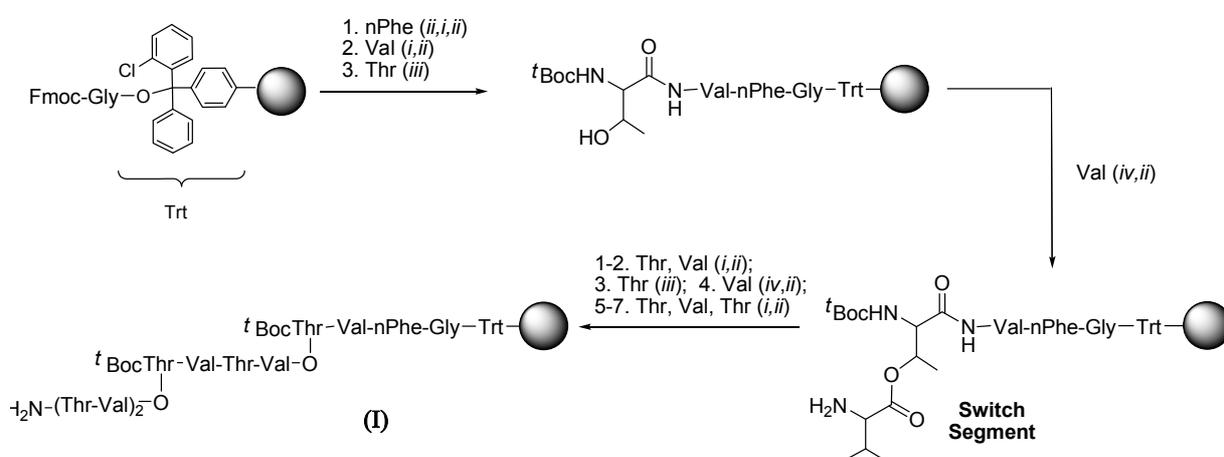
Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern die Veränderungen an der Peptidorganisationseinheit die Induktion und Kontrolle der Strukturbildung von  $(TV)_5$ -Polymer-Konjugaten beeinflussen (siehe Kapitel 4).

### 3.1.1.1 Synthese eines $(Thr-Val)_5$ - $nPhe-Gly$ *1,3-switch* Peptidderivates (I)

Für die Synthese des *1,3-switch* Peptidderivates wurde die  $(TV)_5$ -Aggregatordomäne auf der C-terminalen Seite um eine Sequenz aus p-Nitrophenylalanin und Glycin ( $nPhe-Gly$ ) erweitert. Dies sollte zum einen die Löslichkeit verbessern und zum anderen mit Nitrophenylalanin als spektroskopischen Marker eine Quantifizierung ermöglichen.

Für die festphasengebundene Peptidsynthese wurde ein mit Glycin vorbeladenes Tentagel-Chlortrityl-Harz verwendet. Diese Mischharze bestehen aus vernetztem Polystyrol mit aufgepfropften Polyethylenoxid-Seitenketten. Die hohe Flexibilität der Polyethylenoxid-Ketten verbessert die Quelleigenschaften und verringert unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen im Vergleich zu Standard-Poly(styrol)-Harzen. Alle Amidbindungen wurden unter Standard-Fmoc-Bedingungen im Syntheseautomaten geknüpft, während der Aufbau der Esterbindungen per Handkupplung im Glasreaktor durchgeführt wurde. Als Lösungsmittel wurde bei den Handkupplungen ein Gemisch aus Dichlormethan (DCM) und *N,N*-Dimethylformamid (DMF) (4:1) verwendet. Das DMF sollte das Lösungsverhalten des Peptids und die Löslichkeit der Aktivoren verbessern. In Schema 3.1 ist der Reaktionsverlauf der Synthese von  $(Thr-Val)_5$ - $nPhe-Gly$  *1,3-switch* (I) dargestellt. Die Aktivierung der Säurefunktion von Fmoc-Val OH erfolgte analog zu der Synthese des

GW(TV)<sub>5</sub>G *all-switch* Systems mit DIC und *N*-Methylimidazol (NMI). NMI wirkt dabei ähnlich wie DMAP als Umesterungskatalysator. Es wurde zunächst eine Doppelkupplung durchgeführt. Anschließend wurde der Umsatzgrad der Veresterung durch einen analytischen Fmoc-Test bestimmt.<sup>[132]</sup> Nach Erreichen des gewünschten Umsatzgrades (>95%) wurden eventuell nicht veresterte Hydroxylgruppen mit Essigsäureanhydrid und NMI zu Essigsäureestern umgesetzt. Da später ein synthetisches Polymer (Poly-*n*-butylacrylat) an die vollständige Peptidsequenz gekuppelt werden soll, können die kurzen acetylierten Peptidsequenzen, aufgrund ihrer deutlich geringeren Molmasse, durch fraktionierende Methoden, wie z.B. Dialyse oder selektives Fällern abgetrennt werden.



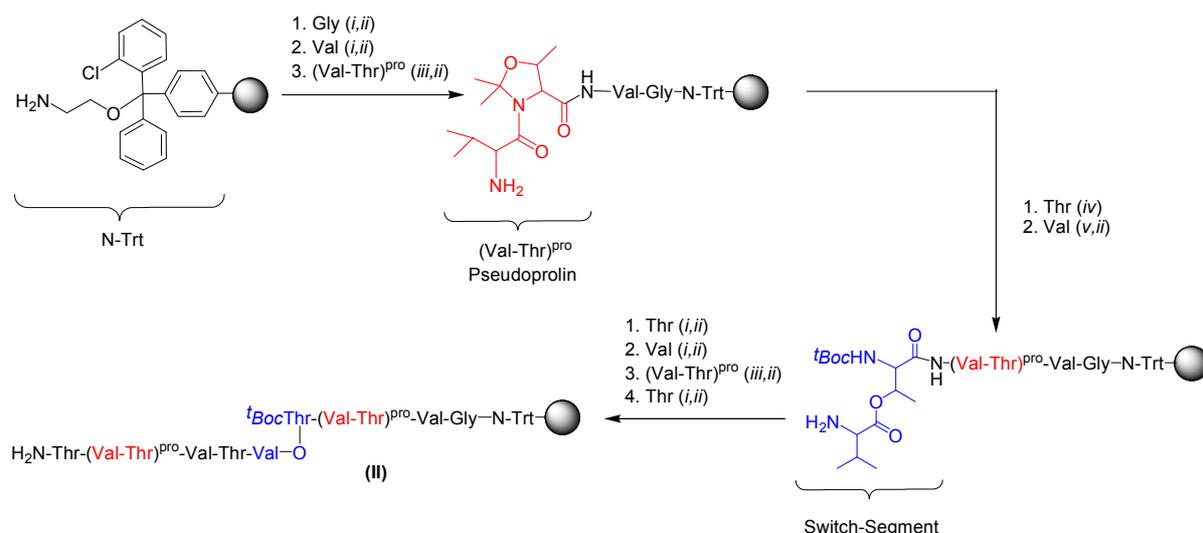
**Schema 3.1:** Synthese von (TV)<sub>5</sub>FG *1,3-switch* (I); Reaktionsbedingungen: i. Fmoc-Aminosäure (Fmoc-Aa), HBTU/DIPEA/NMP, 20 min.; ii. 20 vol.% Piperidin/NMP; iii. Boc-Thr OH, HBTU/DIPEA/NMP, 20 min.; iv. Fmoc-Val OH, DIC/NMI/DCM, 2×2 h.

Nach der Kupplung der letzten Aminosäure (Thr) und Abspaltung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde eine kleine Peptidfraktion vom Harz abgespalten (ca. 50 mg Harz; 50% TFA/DCM) und ESI-massenspektrometrisch sowie NMR-spektroskopisch charakterisiert. Das Massenspektrum zeigte das entsprechende Signal der Zielsequenz bei  $m/z$  1291, das dem Natriumaddukt  $[M+Na]^+$  zugeordnet werden konnte ( $M_{th.} = 1291,4$ ). Weiterhin bestätigten charakteristische chemische Verschiebungen bzw. die Integralintensitäten im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum das Vorliegen zweier Switch-Threonin Ester ( $\delta = 1.32$  ppm; C(CH<sub>3</sub>)O-CO), drei nativer Threonin Amide ( $\delta = 1.15$ - $1.21$  ppm; C(CH<sub>3</sub>)OH) und fünf Valin Einheiten ( $\delta = 2.02$ - $2.18$  ppm; CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) in Bezug auf die chemischen Verschiebungen von Nitrophenylalanin ( $\delta = 7.52$  and  $8.13$  ppm; C<sub>ar</sub>H). Die Zugehörigkeit der einzelnen Signale wurde durch 2D H,H-COSY NMR Messungen ermittelt.

Der am Harz verbleibende Teil von **I** wurde später für die Ankupplung eines Poly-*n*-butylacrylats genutzt (siehe Kapitel 3.2.2).

### 3.1.2.1 Synthese eines (Thr-Val)<sub>5</sub>-Gly *single-switch* Peptidderivates (**II**)

Die oben beschriebene Weiterentwicklung des Peptidorganisators führte zu einer weiteren Reduzierung der Switchsegmente im Peptidsegment. Allerdings, erhöht die Verwendung von nur einem Stör-Segment in der Mitte der (TV)<sub>5</sub> Sequenz zwischen Val<sup>6</sup> and Thr<sup>7</sup> die Schwierigkeiten der Synthese, da zwei (Thr-Val)<sub>2</sub> Domänen schon eine gewisse Aggregationstendenz aufweisen.<sup>[15]</sup> Aus diesem Grund wurden zusätzlich zwei Pseudoprolin Einheiten an die Positionen Val<sup>2</sup>-Thr<sup>3</sup> und Val<sup>8</sup>-Thr<sup>9</sup> eingebaut um eine Aggregation der Peptidsegmente während der festphasengebundenen Peptidsynthese zu verhindern. Schema 3.2 veranschaulicht die Synthese des (TV)<sub>5</sub>G *single-switch* Peptidderivates (**II**).



**Schema 3.2:** Syntheseschema zur Herstellung von (TV)<sub>5</sub>G *single-switch* (**II**); Reaktionsbedingungen: *i.* Fmoc-Aa, HBTU/DIPEA/NMP, 20 min.; *ii.* 20 vol.% Piperidin/NMP; *iii.* Fmoc-Val-Thr(Ψ<sup>Me,Me</sup>pro) OH, PyBOP/HOBt/DIPEA/DMF, 2×1 h; *iv.* Boc-Thr OH, HBTU/DIPEA/ NMP, 20 min; *v.* Fmoc-Val OH, DIC/NMI/DCM, 2×2 h;

Das Peptidderivat **II** wurde durch eine semi-automatisierte festphasengebundene Peptidsynthese erhalten. Dabei wurden Standard Fmoc-Aminosäuren sowie die Pseudoprolin-Dipeptide schrittweise am Peptidsyntheseautomaten gekuppelt. Der Einbau des Switch-Esters in der Mitte der Sequenz, zwischen Val<sup>6</sup> und Thr<sup>7</sup>, erfolgte im Glasreaktor unter Bedingungen, die schon für Peptid **I** beschrieben wurden. Nach beendeter Synthese wurde die chemische Struktur von **II** durch ESI-MS und <sup>1</sup>H NMR Untersuchungen bestätigt. Dazu

wurde eine kleine Fraktion vom Harz abgespalten, bei gleichzeitiger Entfernung aller Peptidschutzgruppen. Die ESI-MS Messungen bestätigten die erfolgreiche Synthese von **II** durch das Auftreten des entsprechenden Proton-Addukts  $[M_{II}+H]^+$  bei  $m/z$  1119,2. Des Weiteren zeigte das  $^1\text{H}$  NMR Spektrum das Vorhandensein eines Switch Threonin Esters ( $\delta = 1.33\text{-}1.35$  ppm;  $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{O-CO}$ ) sowie vier nativer Threonin Amide ( $\delta = 1.13\text{-}1.29$  ppm;  $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{OH}$ ) in Bezug auf fünf Valin Einheiten ( $\delta = 2.07\text{-}2.21$  ppm;  $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{C}\text{H}_3)_2$ ).

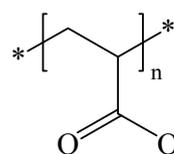
Der am Harz verbliebende Teil von **II** wurde anschließend für die Ankupplung eines RAFT-Kettenüberträgers genutzt (siehe Kapitel 3.2.3).

## 3.2 Synthese der Peptid-Polymerkonjugate

### 3.2.1 Wahl des synthetischen Polymers

Wie einleitend erwähnt, sind bereits einige Arbeiten bekannt, in denen durch die Selbstorganisation von Peptid-Segmenten eine Strukturbildung der synthetischen Polymer-Konjugate induziert werden konnte.<sup>[9,15,127,133]</sup> In den meisten Fällen wurden allerdings nur wasserlösliche Polymere, wie z. B. Polyethylenoxid (PEO) als synthetisches Polymer verwendet, und der Strukturbildungsprozess fand in der natürlichen, wässrigen Umgebung der Peptide statt. Dies limitiert jedoch den Umfang an passenden synthetischen Polymeren und damit auch die Breite der zugänglichen strukturierten Materialien. Ein weiterer Nachteil von PEO ist seine Teilkristallinität. Sie muss bei der Untersuchung von Strukturbildungsprozessen getrieben durch Peptid-Aggregation immer als zusätzlicher Faktor beachtet werden.

In dieser Arbeit soll die Methode der Peptid-geleiteten Strukturbildung von synthetischen Polymeren auf organische Lösungsmittel erweitert werden, um Zugang zu einer größeren Bandbreite an Polymermaterialien mit einer definierten Struktur zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit, mit Poly-*n*-butylacrylat (P*n*BA) ein bei Raumtemperatur nicht kristallines Polymer ( $T_g = -49^\circ\text{C}$ ) verwendet. Es sollte daher den Einfluss der Sekundärstrukturbildung der Peptide auf die Organisation des synthetischen Polymers nicht stören. Des Weiteren erlauben P*n*BAs die Änderung der mechanischen Eigenschaften durch die Modifikation des Estersubstituenten (Rest R in Abbildung 3.4). Somit lässt sich ohne große Veränderungen eine Palette von synthetischen Polymeren herstellen.



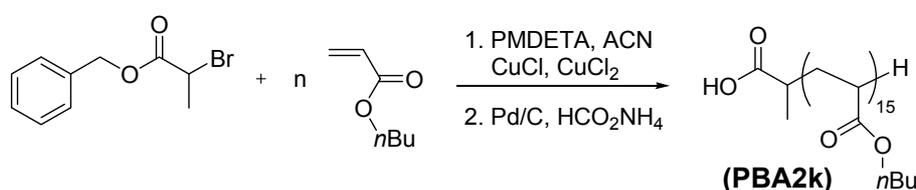
**Abb. 3.4:** Struktur der Polyacrylate

### 3.2.2 Kupplungsansatz

Aufbauend auf den Arbeiten von Rettig<sup>[101]</sup> wurde zunächst ein niedermolekulares P*n*BA mit Carbonsäure-Endfunktionalität durch kontrollierte radikalische Polymerisation hergestellt. Im nachfolgenden Schritt wurde das Polymer an den Amin-Terminus des Harz-gebundenen Peptids (**I**) gekuppelt.

### 3.2.2.1 Synthese eines Säure-endfunktionalisierten Poly-*n*-butylacrylats

Das relativ niedermolekulare Polymer wurde durch ATRP von *n*-Butylacrylat mit Hilfe des Initiators 2-Brom-Propionsäurebenzylester hergestellt (Schema 3.3). Die Kontrolle der Polymerisation bzw. die Berechnung des Umsatzes erfolgte durch <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie. Die Integralintensitäten charakteristischer Signale des Monomers (Resonanzen der Vinyl-Protonen -CH<sub>2</sub>=CH-, 5.50 bis 6.50) wurden ins Verhältnis gesetzt, zu der Intensität eines überlagerten Monomer/Polymer-Signals (-CH<sub>2</sub>-O-, 3.80 bis 4.30 ppm). Nach Erreichen des gewünschten Umsatzes wurde die Reaktion abgebrochen.



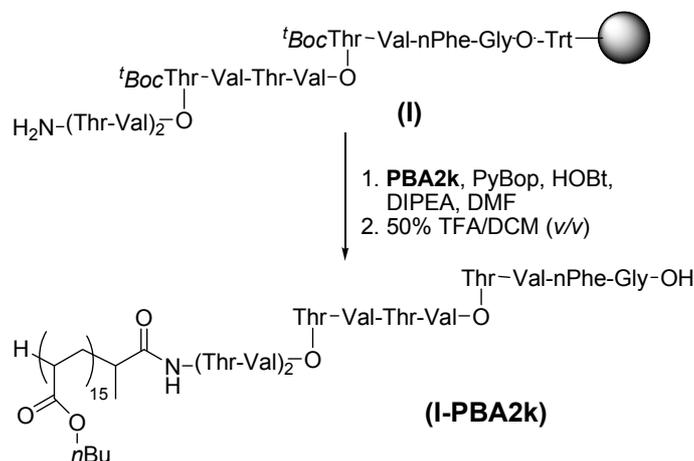
**Schema 3.3:** Reaktionsverlauf der Polymerisation von *n*BA und anschließender reduktiver Abspaltung der Benzylester-Schutzgruppe.

Die Benzylester Schutzgruppe wurde nach der Synthese unter reduktiven Bedingungen mit Ammoniumformiat und Palladium auf Aktivkohle selektiv abgespalten, während die Acrylsäureester Einheiten dabei erhalten bleiben. Unter diesen Bedingungen wird zudem auch die ω-Bromo-Funktionalität des Polymers entfernt, welche ansonsten eventuell Nebenreaktionen während der Konjugation hervorrufen könnte. Das resultierende Polymer **PBA2k** wurde durch Gel Permeations Chromatographie (GPC), <sup>1</sup>H NMR und MALDI-TOF-MS charakterisiert. Die GPC ergab eine zahlenmittlere Molmasse von  $M_{n, GPC} = 2300$ , was einem Polymerisationsgrad von  $DP_n = 18$  entspricht, bei einer Polydispersität von  $M_w/M_n = 1,13$ . <sup>1</sup>H NMR und MALDI-TOF-MS bestätigten zudem die quantitative Endfunktionalisierung von **PBA2k**.

### 3.2.2.2 Kupplung des Polymers PBA2k an das Peptidsegment I

Die Konjugation des synthetischen Polymers an das festphasengebundene Peptid erfolgte durch die Bildung einer Amidbindung zwischen der endständigen Carboxylfunktionalität des *Pn*BA und der terminalen Aminfunktion der Peptidsequenz (Schema 3.4). Die Kupplung an der Festphase hat den Vorteil, dass nach beendeter Reaktion überschüssiges, nicht gekuppeltes Polymer leicht durch Waschprozesse mit THF entfernt werden kann.

Die Aktivierung der Säurefunktion des Polymers erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von *Rettig*,<sup>[101]</sup> unter verstärkten Kupplungsbedingungen mit PyBOP / HOBt / DIPEA. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde durch einen negativen Kaisertest,<sup>[134]</sup> der die Abwesenheit freier Amingruppen anzeigt, bestätigt.



**Schema 3.4:** Schematische Darstellung der Konjugation des PnBA **PBA2k** an das Harzgebundene Peptid-Derivat **I**.<sup>[135]</sup>

Nach der Abspaltung des Konjugates **I-PBA2k** vom Harz wurde das Produkt gefällt, im Vakuum getrocknet und nach Gefriertrocknung aus Dioxan in 62% Ausbeute isoliert. Die quantitative Anbindung des PnBA an die Peptidsequenz konnte, im Rahmen des experimentellen Fehlers, durch <sup>1</sup>H NMR Messungen bestätigt werden. Diese zeigten das erwartete Verhältnis der nBA Wiederholungseinheiten zum Peptidsegment von 16:1, durch das Vergleichen der Integralintensitäten charakteristischer Signale des Polymers ( $\delta = 1.41$ ,  $\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ) und des Peptidsegments ( $\delta = 7.54$  ppm,  $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ , nPhe).

### 3.2.3 Polymerisationsansatz

Es wurde einführend schon beschrieben, dass für die Integration definierter Peptidsequenzen in synthetische Polymerketten im Wesentlichen zwei Synthesestrategien anwendbar sind. Die im vorigen Abschnitt verwendete Kupplungsstrategie bietet zwar Vorteile im Bezug auf die Charakterisierung der einzelnen Konjugatkomponenten vor der Kupplung sowie der Aufreinigung des Konjugates, ist aber limitiert auf relativ niedermolekulare Polymere. Um den Einbau von hochmolekularen Polymeren zu ermöglichen, empfiehlt sich der Polymerisationsansatz. Dabei wird das synthetische Polymer ausgehend von einem

Peptidmakroinitiator aufgebaut. In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass sich kontrolliert radikalische Polymerisationen für diesen Ansatz sehr gut eignen.<sup>[98-102,106,136]</sup> So konnten z.B. Ketten-Transfer-Reagenzien (CTAs) an Peptidsequenzen gebunden werden und als Makro-CTAs effektiv für die Kontrolle der *Reversible Addition-Fragmentation Chain-Transfer* (RAFT) Polymerisation genutzt werden.<sup>[105,106,137,138]</sup> Dabei benötigt die RAFT Polymerisation keine Anwesenheit von Metallkatalysatoren und besitzt eine hohe Toleranz gegenüber vielen funktionellen Gruppen, was einen klaren Vorteil für die Synthese von Biokonjugaten darstellt. Dennoch wurde das Potential des RAFT Prozesses für diese Synthesen noch nicht vollständig ausgenutzt. Das liegt wahrscheinlich zum einen an der Empfindlichkeit gebräuchlicher CTAs gegenüber Nucleophilen, treten doch z.B. Amine reichlich in Peptiden und Proteinen auf. Zum anderen ist eine mehrstufige Synthese des RAFT Überträgers mit anschließender chromatographischer Reinigung nicht unbedingt wünschenswert.

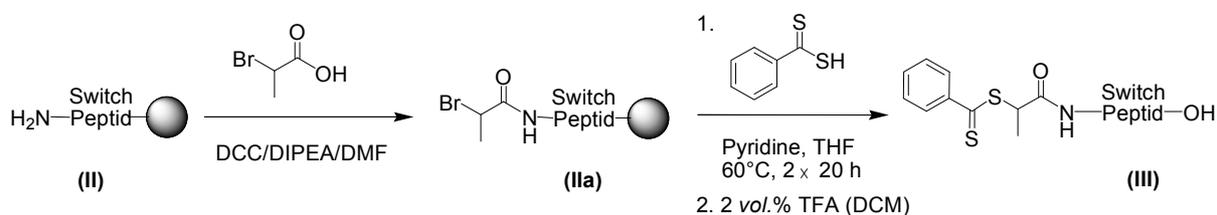
Eine interessante Möglichkeit ist die Konjugation des Peptids über die R-Gruppe des RAFT Überträgers, d.h. den initiierten Teil des CTA, da dieser Ansatz zu  $\alpha,\omega$ -funktionalisierten Biokonjugaten führt. Letztere sind von großer Bedeutung für biomedizinische Anwendungen, da sie leicht in  $\alpha$ -Peptid- $\omega$ -Thiol funktionalisierte Polymere umwandelbar sind. In Arbeiten von *Rettig* wurde der Zugangsweg zu Peptid-RAFT Makroüberträgern für Modell-Peptide beschrieben.<sup>[101,106]</sup> Dabei wurde die direkte Kupplung eines gebräuchlichen Carbonsäure-funktionalisierten CTAs (4-Cyano-4-((thiobenzyl)sulfanyl)-pentansäure) an den Amin-Terminus eines Harz-gebundenen Peptids untersucht. Wie erwartet, führte dieser direkte Ansatz zu einem deutlichen Anteil an Thioamid als Nebenprodukt.<sup>[101]</sup> Allerdings konnte dieses Hindernis durch eine Zweistufen-Prozedur überwunden werden: (i) Kupplung von 2-Brompropionsäure an den Amin-Terminus und (ii) Substitution der  $\alpha$ -Brom Gruppe mit Dithiobenzoesäure. Diese Reaktion verläuft quantitativ und führt zu Peptid-CTAs in hoher Reinheit, was eine chromatographische Aufreinigung überflüssig macht. Nach der Abspaltung vom Harz konnte das Peptid-CTA erfolgreich für die RAFT Polymerisation von *n*-Butylacrylat angewendet werden und lieferte Konjugate mit kontrollierbaren Molekulargewichten und geringen Polydispersitäten von  $M_w/M_n = 1,1$ .

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der beschriebene Ansatz zur Synthese eines Peptid-RAFT Makroüberträgers das erste Mal von Modell-Peptiden ohne jegliche Funktion auf komplexe, funktionale Peptide übertragen.

### 3.2.3.1 Einführung von RAFT Kettenüberträgern

Die Verwendung eines Switch-Peptid Makroüberträgers für die Synthese von Peptid-PnBA-Konjugaten mit unterschiedlichen Polymerkettenlängen sollte die Untersuchung der peptid-geleiteten Strukturbildung, in Abhängigkeit von der Größe des synthetischen Polymerblocks, ermöglichen.

Für den Aufbau des Peptidmakroüberträgers wurde das oben beschriebene Switch-Peptid **II** ((TV)<sub>5</sub>G *single-switch*) verwendet. Dieses zeichnete sich durch eine starke Störung der Aggregationseigenschaften aus, da es sowohl Switch- als auch Pseudoprolin-Defektsegmente enthält. Das RAFT-Initiatorsegment wurde an der *N*-terminalen Seite des Harz-gebundenen Peptids **II** durch die oben beschriebene Zweistufenprozedur eingeführt<sup>[106]</sup> (Schema 3.5).



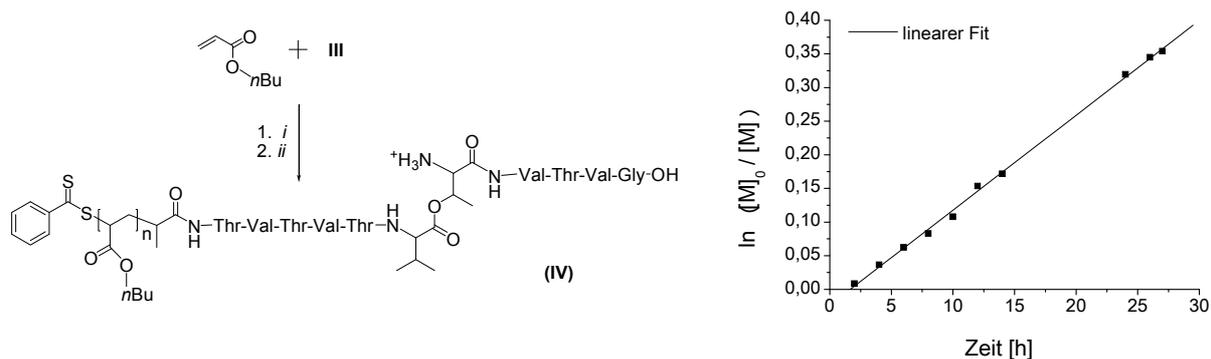
**Schema 3.5:** Darstellung der zweistufigen Synthese des Peptid-CTA (**III**), durch Einführung des RAFT-Kettenüberträger-Segments an das harzgebundene Peptid (TV)<sub>5</sub>G *single-switch* (**II**).

Im ersten Schritt wurde 2-Bromopropionsäure an die terminale Aminfunktionalität des Peptides gekuppelt. Zur Überprüfung des quantitativen Umsatzes zum Zwischenprodukt (**IIa**), wurde ein kleiner Teil vom Harz, bei gleichzeitiger Entfernung der Schutzgruppen, abgespalten und mittels ESI-MS untersucht. Das Massenspektrum zeigte die entsprechenden Ionenaddukte des Produkts  $[M_{IIa}+H]^+$  und  $[M_{IIa}+Na]^+$ , aber kein Signal für das Edukt und bestätigte somit die Umsetzung. Die anschließende Reaktion der  $\alpha$ -Bromgruppe von **IIa** mit Dithiobenzoessäure ergab den Peptid-Makroüberträger (Peptid-CTA) (**III**). Durch Abspaltbedingungen unter milden Bedingungen wurde **III** als vollgeschütztes, gestörtes Peptid isoliert. Die vollständige Umsetzung konnte NMR spektroskopisch nachgewiesen werden, durch den Vergleich von fünf Valin Einheiten ( $\delta = 2.07\text{-}2.18$  ppm;  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ) und einem Switch Ester Threonin ( $\delta = 5.26$  ppm;  $\text{CH-O-CO}$ ) zu der aromatischen Dithioester Gruppe ( $\delta = 7.42\text{-}7.96$  ppm; ArH).

Die saubere Synthese von **III** machte deutlich, dass die Methode der festphasengebundenen Synthese von Peptid-CTAs von einfachen Modell-Peptiden<sup>[101]</sup> auf komplexe Peptidsequenzen erweitert werden kann, einschließlich Peptidderivaten mit temporären Switch-Ester Defektstellen.

### 3.2.3.2 RAFT Polymerisation mit (TV)<sub>5</sub> *single-switch* Peptid-Makroüberträger

Für die Untersuchung der peptidgeleiteten Strukturbildung in Abhängigkeit von der Größe des synthetischen Polymerblocks wurde der Peptid Makroüberträger **III** verwendet, um durch RAFT Polymerisationen einen Satz aus verschiedenen Konjugaten herzustellen (Abb. 3.5, links). Diese enthielten alle die gleiche Aggregatorsequenz ((TV)<sub>5</sub>G *single-switch*), aber unterschieden sich in der Länge des P*n*BA Blocks. Die Polymerisationen wurden in DMF bei 60°C und mit AIBN als Quelle der Primärradikale durchgeführt.



**Abb. 3.5:** (links) Schematische Darstellung der Synthese von P*n*BA-(TV)<sub>5</sub>G Konjugaten (**IV**) durch RAFT Polymerisation von *n*BA mit Hilfe des Peptid-CTA (**III**), Reaktionsbedingungen: *i.* *n*BA, AIBN, DMF, 60°C; *ii.* 30 vol.% TFA/DCM; (rechts) halb-logarithmische Darstellung der RAFT Polymerisation von *n*BA mit **III** (Monomerumsatz gegen Reaktionszeit; [*n*BA]<sub>0</sub>/[**III**]<sub>0</sub>/[AIBN]<sub>0</sub> = 285/1/0,1, DMF = 90 vol.%).<sup>[139]</sup>

Der Polymerisationsverlauf wurde mit GPC und <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie verfolgt. Der rechte Teil von Abbildung 3.5 zeigt die Korrelation des Monomerumsatzes bezogen auf die Polymerisationszeit. Der lineare Verlauf nach einer kurzen Retardationszeit von 1-2 Stunden deutet auf eine Kinetik 1.Ordnung hin. Darüber hinaus steigt auch das Molekulargewicht linear mit dem Monomerumsatz und die Polydispersität M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> bleibt weitestgehend konstant bei etwa 1,2. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die RAFT Polymerisation effektiv vom Peptid-CTA **III** kontrolliert wurde und betonen die Toleranz des RAFT Prozesses gegenüber relativ komplexen, multifunktionalen Peptidstrukturen.

Bei Erreichen des gewünschten Monomerumsatzes wurden die Polymerisationen durch Abkühlen und Luftzufuhr gestoppt. Die resultierenden Peptide-Polymer Konjugate wurden durch Fällung und anschließende Gefriertrocknung aus Acetonitril/Benzol isoliert. Die Analyse der Konjugate erfolgte vor der Abspaltung aller Peptidschutzgruppen um mögliche Probleme zu vermeiden, die z.B. durch Peptidaggregation auftreten könnten. Aus GPC-Messungen konnten die apparenten zahlenmittleren Molmassen ( $M_{n,app}$ ) sowie die apparenten Polydispersitäten ( $M_w/M_n$ ) erhalten werden. Dagegen beruhte die Bestimmung der absoluten Werte für  $M_n$  aus  $^1H$  NMR Messungen, durch Vergleich der Integrale charakteristischer Resonanzen des *Pn*BA-Blocks ( $\delta = 4.05-4.10$  ppm (O-CH<sub>2</sub>)) mit solchen, die dem Oligopeptid-Segment ( $\delta = 5.26$  ppm (CH-O-CO Thr<sub>ester</sub>)) bzw. der CTA-Einheit ( $\delta = 7.34-7.96$  ppm (ArH)) zugeordnet werden konnten. Wie in Tabelle 3.1 zusammengefasst, weisen die Konjugate Molmassen,  $M_{n,konj.}$  zwischen 9900 and 39000 auf, bei gleichzeitig relativ niedrigen Polydispersitäten. Es sollte dabei beachtet werden, dass beide Methoden, GPC and NMR, entgegengesetzte Genauigkeiten mit steigendem Molekulargewicht des Konjugates besitzen. Während der Fehler der auf NMR beruhenden Molmasse ( $M_{n,NMR}$ ) mit zunehmenden Molekulargewicht des *Pn*BA-Blocks steigt, werden die auf GPC beruhenden Ergebnisse durch den abnehmenden Einfluss des Peptidblocks immer genauer.

Um die noch voll geschützten Peptidsegmente in schaltbare Aggregatorsysteme zu überführen, wurden nach erfolgter Charakterisierung der Konjugate alle Seitenkettenschutzgruppen, einschließlich der Pseudoprolin-Einheiten, vom Peptidblock entfernt (Abb. 3.5 IV). Die Abspaltung erfolgte unter Einwirkung von verdünnter Trifluoressigsäure (TFA) in DCM und anschließender Gefriertrocknung aus Acetonitril/Benzol. Die hierfür verwendeten Bedingungen beeinflussten nicht die Stabilität der Estergruppen des *Pn*BA-Blocks. Das wurde durch  $^1H$  NMR Messungen bestätigt und ist im Einklang mit Beobachtungen aus der Literatur.<sup>[99]</sup>

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl mit Hilfe der Kupplungs- als auch der Polymerisationsstrategie Peptid-Polymer Konjugate hergestellt werden konnten, die sich aufgrund ihrer (TV)<sub>5</sub> Switch Peptidsequenz, für die peptidgeleitete Strukturbildung synthetischer Polymere bestens eignen sollten. Anhand der unterschiedlich großen *Pn*BA-Blöcke konnte im Folgenden die Abhängigkeit der Strukturbildung von der Größe des konjugierten Polymers untersucht werden. In Tabelle 3.1 sind alle Daten der vier verschiedenen Switch-Peptid-*Pn*BA Konjugate zusammengefasst.

**Table 3.1:** Charakterisierung der vollgeschützten Konjugate

Konjugat	$M_{n,PnBA}$ (NMR)	$M_{n,konj.}$ <sup>a)</sup>	wt. % PnBA <sup>b)</sup>	$M_{n,app.}$ (GPC) <sup>c)</sup>	$M_w/M_n$ (GPC) <sup>c)</sup>
<b>I*-PBA2k**</b>	2000	3300	60.5	2300 <sup>‡</sup>	1.13 <sup>‡</sup>
<b>IV*-PBA8k</b>	8300	9900	86.5	11000	1.29
<b>IV*-PBA14k</b>	14200	15800	91.5	16000	1.25
<b>IV*-PBA38k</b>	38000	39600	96.5	37000	1.33

<sup>a)</sup>  $M_{n,Konjugat} \approx (M_{n,PnBA} + M_I)$ ; <sup>b)</sup> Anteil an synthetischem Polymer im vollgeschützten Konjugat; <sup>c)</sup> kalibriert gegen PnBA Standards; \* geschütztes Peptidsegment; \*\* hergestellt durch Kupplungsansatz; ‡ PnBA vor der Kupplung ans Peptid.

### 3.2.4 Weiterentwicklung des Peptid-RAFT-Makroüberträgers

Die im letzten Abschnitt beschriebene Synthese der PnBA-Peptid Konjugate macht das enorme Potential der RAFT-Polymerisation als Werkzeug für die Synthese von Peptid-Polymerkonjugaten deutlich. Die Ankupplung der CTA-Einheit ist allerdings nicht automatisierbar und relativ zeitaufwendig. Es wäre daher von Vorteil ein Peptid-CTA zu entwickeln, das auf einfacherem Wege, in einer voll automatisierbaren, festphasengebundenen Peptidsynthese, hergestellt werden kann. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit realisiert werden.

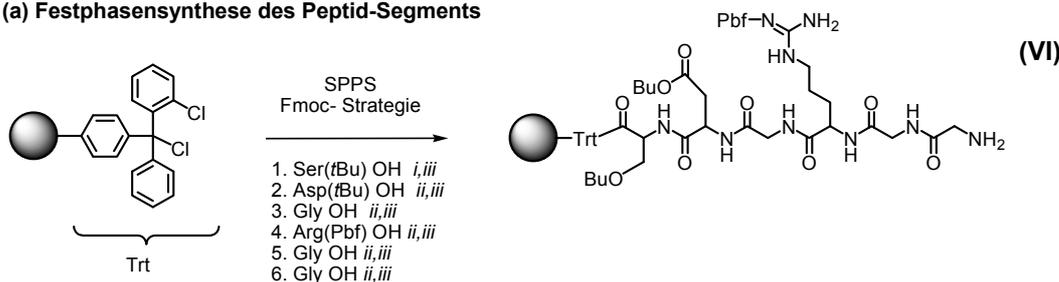
Aufgrund der hohen Empfindlichkeit, der auf Dithioester basierenden CTAs, gegenüber Nucleophilen, wurde für diesen Ansatz ein Trithiocarbonat-basierendes CTA genutzt. Für diese Klasse wurde unlängst nachgewiesen, dass sie als sehr effiziente CTAs für die kontrollierte Polymerisation verschiedenster Monomere, wie z.B. Styrol,<sup>[140]</sup> MMA,<sup>[119]</sup> *n*-Butylacrylat<sup>[141]</sup> und NIPAM<sup>[142]</sup> genutzt werden können. Darüber hinaus besitzen sie eine höhere Toleranz gegenüber Nucleophilen als die Dithiobenzoat basierenden CTAs.<sup>[142,143]</sup>

Die Verwendung des CTAs S-1-Dodecyl-S'-(R,R'-Dimethyl-R''-essigsäure)trithiocarbonat (**CTA-I**) bringt einen weiteren Vorteil. Während die Synthese herkömmlicher RAFT CTAs oft an mehrstufige Reaktionen und chromatographische Aufreinigung gebunden ist, kann das **CTA-I** durch eine Einstufenreaktion erhalten werden. Die einfache Synthese, die Abwesenheit zusätzlicher Reinigungsschritte und die Möglichkeit kostengünstige Großansätze durchzuführen, machen **CTA-I** zu einem attraktiven Kandidaten für das Design von peptidbasierten Makro-CTAs.

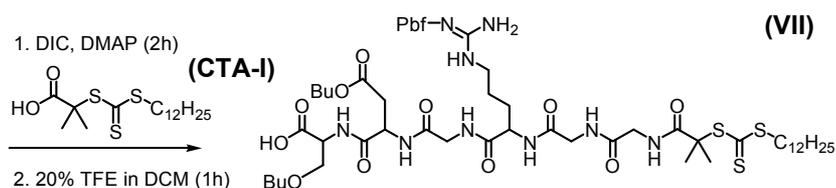
### 3.2.4.1 Synthese eines Trithiocarbonat-Peptid-CTAs

Im Folgenden wurde die Kupplung von **CTA-I** an den Amin-Terminus des Festphasen-gebundenen Peptids GGRGDS (**VI**) untersucht (Schema 3.6). Diese spezielle Peptidsequenz gehört zu der Adhäsionsdomäne von Fibronectin und ermöglicht daher eine Kontrolle der Zell-Adhäsion durch spezifische Integrin Bindung.<sup>[144]</sup> Die Peptidsequenz **VI** wurde durch die schrittweise Kupplung von Fmoc-Aminosäuren, unter Anwendung einer voll automatisierten festphasengebundenen Peptidsynthese hergestellt. Der Erfolg der Synthese wurde durch ESI-MS-Messungen einer kleinen, für die Analytik abgespaltenen, Peptidprobe bestätigt. Das Massenspektrum zeigte nur Signale die dem gewünschten Produkt ( $M_{\text{theor.}} = 911,4 \text{ g/mol}$ ) zugeordnet werden konnten ( $m/z$  912 ( $[M+H]^+$ ), 934 ( $[M+Na]^+$ )). Wie in Schema 3.6 zu sehen, wurde **CTA-I** unter standardmäßigen, automatisierbaren Kupplungsbedingungen an **VI** gebunden. Die Kupplung wurde durch die Verwendung von DIC als Aktivierungsmittel ermöglicht. Der quantitative Umsatz der terminalen Amin-Gruppe konnte durch einen negativen Kaisertest bestätigt werden.

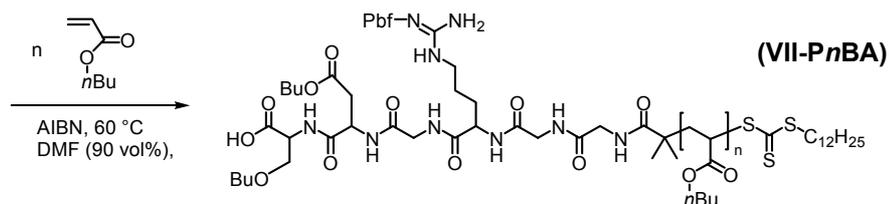
#### (a) Festphasensynthese des Peptid-Segments



#### (b) Einführung des CTA-Segments und Abspaltung vom Harz



#### (c) RAFT Polymerisation mit Peptid-CTA (VII)



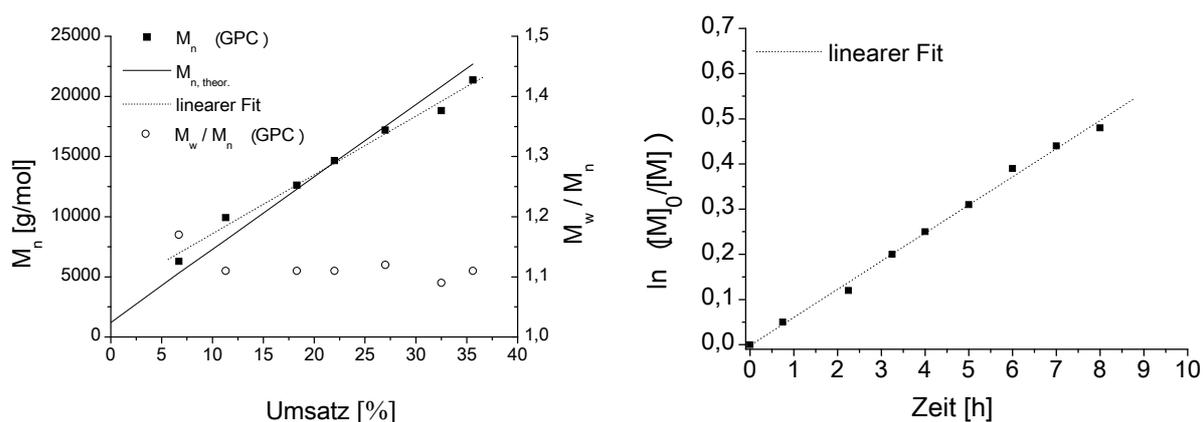
**Schema 3.6:** Synthese des Oligopeptid-PnBA Konjugates (**VII-pnBA**). Reaktionsbedingungen: 2 polystyrol-(2-chlortritylchloride) Harz; i. Fmoc-Ser OH, DIPEA / DCM, 90 min ii. Fmoc-Aa, HBTU/DIPEA/NMP, 20 min.; iii. 20 vol.% Piperidin/NMP.

Das voll-geschützte Peptid-CTA (**VII**) wurde unter milden Bedingungen (20 vol.% TFE in DCM) vom Harz abgespalten und aus Benzol/Acetonitril (1:1) gefriergetrocknet. Die chemische Struktur von **VII** wurde durch  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie überprüft und durch den Vergleich der Integrale charakteristischer Resonanzen der CTA-Einheit ( $\delta = 0.87\text{-}0.91$  ppm (3 H,  $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{-CH}_3$ ) und des Peptid-Segments (3.62-4.48 ppm (9 H,  $\alpha\text{-CH}$ )) bestätigt. Des Weiteren deuteten ESI-MS Messungen auf eine selektive Umsetzung von **VI** nach **VII** hin und zeigten keine detektierbaren Hinweise auf Nebenprodukte.

Die Chemoselektivität der Kupplungsreaktion von **CTA-I** an den Aminterminus des festphasengebundenen Peptids wurde außerdem noch durch ein Kontrollexperiment belegt. Dies sollte zeigen wie groß der Anteil einer möglichen Dithiocarbamat Bildung als Nebenprodukt bei der Synthese von **VII** ist. Dazu wurde das **CTA-I** in 20-fachem Überschuss ohne den Zusatz des DIC Aktivators auf das harzgebundene Peptid **VI** gegeben. Eine HPLC-MS Analyse erlaubte die Identifizierung des gesuchten Nebenprodukts und zeigte, dass nach zwei Stunden Reaktionszeit 10% Dithiocarbamat entstanden waren. Eine detaillierte HPLC-MS Analyse des Produkts **VII** wies darauf hin, dass im Fall der normalen Kupplung (mit DIC) das Dithiocarbamat-Nebenprodukt nur in Spuren von etwa 0.3% vorhanden war. Diese Beobachtung bestätigt die Toleranz des Trithiocarbonat-Segments gegenüber nucleophilen Angriffen.

#### 3.2.4.2 Polymerisation von *n*BA

Das Peptid-CTA **VI** wurde im Folgenden für die RAFT Polymerisation verschiedener Monomere angewendet. Zunächst wurde *n*-Butylacrylat als Modell-Monomer für Acrylate genutzt. Die Polymerisation wurde unter hoher Verdünnung in DMF (90 vol.%), bei 65°C und AIBN als Quelle der Primärradikale durchgeführt. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels GPC und  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie verfolgt. Wie in Abbildung 3.6 (links) gezeigt, bleibt die Polydispersität ( $M_w/M_n$ ) des gebildeten Polymers **VII** konstant niedrig bei  $\approx 1,1$ , während die mittlere Molmasse  $M_n$  linear mit steigendem Monomerumsatz zunimmt. Auch die semi-logarithmische Auftragung von Monomerumsatz gegen die Reaktionszeit verlief linear (Abb. 3.6, rechts). Diese Beobachtungen machen deutlich, dass das Peptid-CTA **VII** sehr gut dazu geeignet ist, die RAFT Polymerisation von *n*BA effektiv zu kontrollieren.



**Abb. 3.6:** (links) Abhängigkeit der mittleren Molmasse ( $M_n$ ) und der Polydispersität ( $M_w/M_n$ ) bei steigendem Monomerumsatz, (rechts) semi-logarithmische Auftragung von Monomerumsatz gegen Reaktionszeit für die RAFT Polymerisation von *n*BA kontrolliert durch **VII** in DMF bei 65 °C.  $[nBA]_0/[VII]_0/[AIBN]_0 = 470/1/0.1$ , DMF = 90 vol.%.<sup>[145]</sup>

### 3.2.4.3 Polymerisationen weiterer Monomere

Das Peptid-CTA **VII** wurde im Folgenden auf die Polymerisationseigenschaften anderer funktionaler Monomere, wie *N*-Isopropylacrylamid (NIPAM) und Oligo(ethylenglycol)-acrylat (OEGA) untersucht. Die resultierenden Peptid-Polymer Konjugate sollten von Interesse für biomedizinische Anwendungen sein, da sie biorelevante Eigenschaften, wie Biokompatibilität oder thermische Schaltbarkeit aufweisen. PNIPAM zum Beispiel besitzt in Wasser eine untere kritische Lösungstemperatur (LCST) bei etwa 32°C.

Die Polymerisationen von NIPAM und OEGA wurden durch  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie verfolgt und bei ca. 40-45% Umsatz gestoppt, um ein geeignetes Molekulargewicht für Bioanwendungen zu erreichen. So sollte z.B. 8000-9000 g/mol ein interessanter Molekulargewichtsbereich für die Präparation von temperatur-schaltbaren Oberflächen sein, da eine Bedeckung und Funktionalisierung möglich ist. Die GPC Daten deuteten bei beiden Polymerisationen auf einen kontrollierten Reaktionsverlauf hin (die resultierenden Konjugate besaßen Polydispersitäten  $M_w/M_n$  um 1,2). Darüber hinaus ergaben  $^1\text{H}$  NMR Messungen, nach Abspaltung der Peptidschutzgruppen, eine sehr gute Übereinstimmung des theoretischen Peptid/Polymer Verhältnisses.

Diese Ergebnisse machen das große Potential dieses Peptid-Makroüberträgers deutlich. Zum einen ist er über eine bequeme, automatisierbare Festphasensynthese zugänglich. Zum anderen erlaubt er die kontrollierte Polymerisation verschiedenster, funktionaler Monomere. Er bietet somit sehr gute Möglichkeiten zur Herstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten mit unterschiedlichsten Funktionen.

So konnten bereits, in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (Potsdam-Golm), erste positive Tests zur biologischen Relevanz der synthetisierten PNIPAM-GGRGDS Bio-Konjugate durchgeführt werden.<sup>[145]</sup>

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch Anwendung der Kupplungs- als auch der Polymerisationsstrategie in dieser Arbeit verschiedenste Peptid-Polymer Konjugate hergestellt werden konnten. Entscheidend für die spätere Funktionalität der Konjugate war zum einen die Wahl des synthetischen Polymerblocks, zum anderen aber vor allem das gezielte Design der verwendeten Peptidsequenzen. So ermöglichte die Einführung eines Trithiocarbonat-CTAs in eine bio-funktionale RGDS-Peptidsequenz die Synthese von gut definierten, medizinisch interessanten PNIPAM- bzw. POEGA- Konjugaten durch kontrollierte RAFT Polymerisation. Andererseits führte die Wahl eines (TV)<sub>5</sub>-Peptidsegments, bei gleichzeitigem Einbau von reversiblen Störstellen zu Konjugaten, die eine kontrollierte, schaltbare Mikrostrukturbildung in organischer Lösung ermöglichen sollten. Der Schaltvorgang und die peptidgeleitete Aggregation der Peptid-PnBA-Konjugate wurden im Folgenden eingehend untersucht.



## Kapitel 4

# Charakterisierung des Aggregationsverhaltens

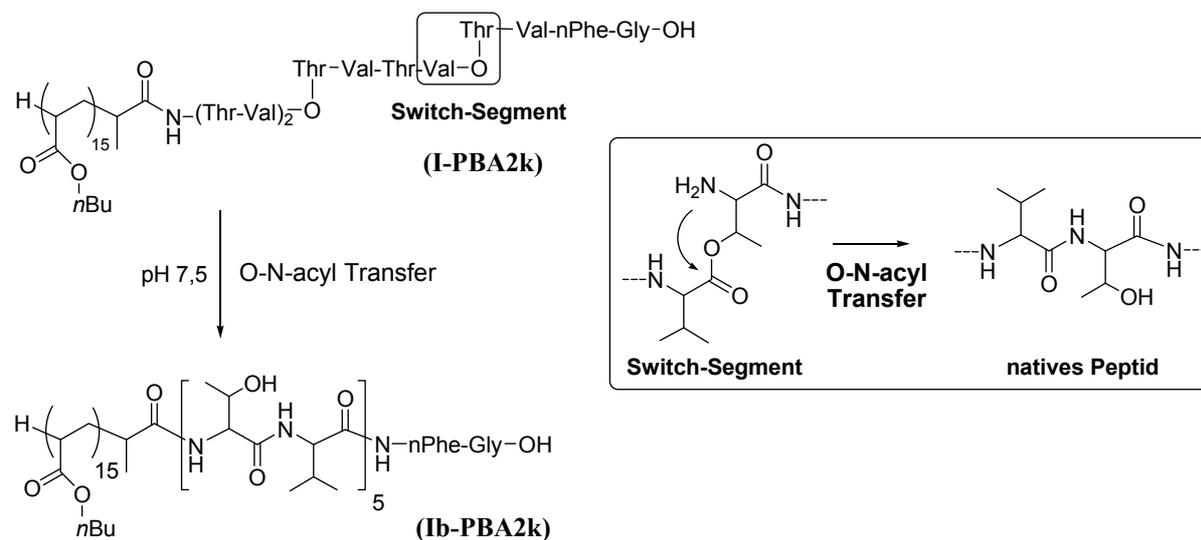
Wie einleitend in Kapitel 2.4.3 beschrieben wurden in einer vorangegangenen Arbeit die starken Aggregationseigenschaften der (TV)<sub>5</sub>-Peptidsequenz ausgenutzt, um als treibende Kraft bei der Strukturbildung eines Peptid-Polyethylenoxid-Systems in wässrigen Lösungen zu wirken.<sup>[15,10]</sup> Die in die Sequenz eingebauten Switch-Segmente erwiesen sich dabei als gutes Werkzeug für die gezielte Initiierung und Kontrolle der Strukturbildung.

In dieser Arbeit sollte nun erstmals untersucht werden, inwiefern die (TV)<sub>5</sub>-Peptidsequenz den Selbstorganisationsprozess von synthetischen Polymer-Konjugaten in organischen Lösungsmitteln steuern kann. Des Weiteren sollte der Einfluss der Größe des synthetischen Polymersegments auf die resultierenden Strukturen und den Strukturbildungsprozess analysiert werden. Als erstes wurde die Strukturbildung des kleinsten (TV)<sub>5</sub>-PnBA Konjugats untersucht.

### 4.1 Strukturbildung des Peptid-PnBA-Systems I-PBA2k in Lösung

Die in dieser Arbeit hergestellten (TV)<sub>5</sub>-PnBA Konjugate waren in diversen organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Methanol, THF oder Chloroform gut löslich, ohne dass eine Mikrostrukturbildung oder ausgedehnte Peptidsekundärstrukturbildung beobachtet werden konnte. Wie eingangs erwähnt, waren die PEO-(TV)<sub>5</sub> *all-switch* Konjugate in wässrigen Lösungen bei einem pH-Wert < 6 stabil. Erst eine Erhöhung des pH-Wertes auf pH ≥ 6 bewirkte die regioselektive Umlagerung (O → N Acyl Transfer) in den Switch-Segmenten (Schema 4.1 rechts) und führte zur Bildung des nativen Peptidrückgrats. Eine analoge Umwandlung vom gestörten Peptid-Segment zum nativen Peptid ist auch für das synthetisierte *1,3-switch* System (**I-PBA2k**) in organischen Lösungsmitteln zu erwarten. (Schema 4.1). Dies konnte durch Circular Dichroismus (CD) Messungen bestätigt werden. Die Lösung von **I-PBA2k** in Methanol zeigte ein CD-Absorptionsminimum bei etwa 195 nm sowie ein breites Maximum bei ungefähr 215 nm (Abb. 4.1, links). Während letzteres charakteristisch für die Switch-Ester-Segmente ist, resultiert das CD-Minimum aus der statistischen Kettensegmentkonformation des nativen Peptidsegments.

Auch über einen längeren Zeitraum wurden keine Anzeichen dafür gefunden, dass Peptid-Sekundärstrukturbildung unter diesen Bedingungen auftritt. Dies belegt, dass die starken strukturbrechenden Eigenschaften der Switch-Defekt-Segmente auch in organischen Lösemitteln präsent sind.

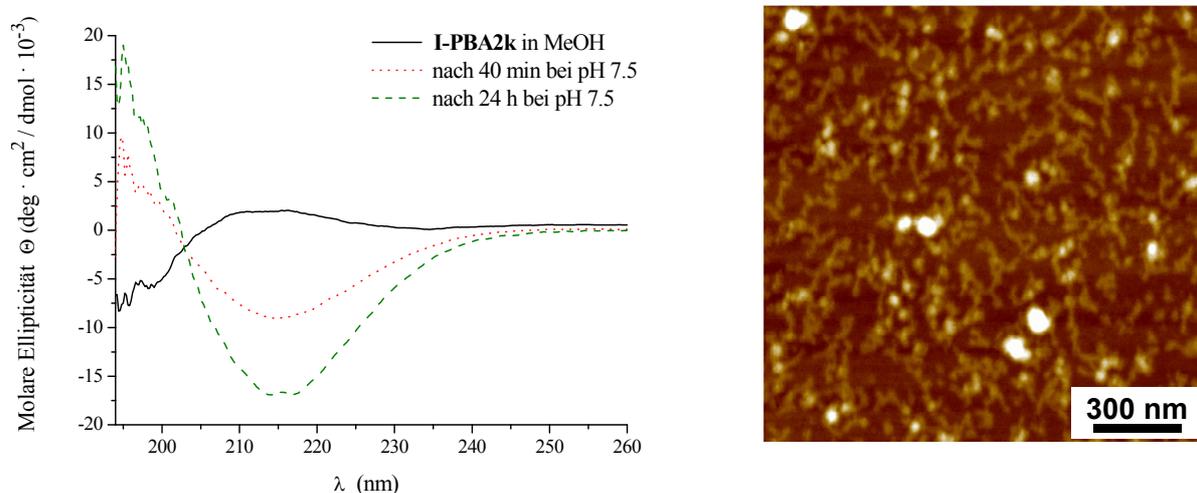


**Schema 4.1:** Links: Schaltvorgang vom gestörten Peptidkonjugat **I-PBA2k** in die native Peptidform **Ib-PBA2k**; Rechts: pH-induzierter O→N Acyl Transfers.<sup>[135]</sup>

Nach Einstellen des apparenten pH-Wertes der Lösung auf etwa 7,5, durch Zugabe methanolischer Natriumhydroxid (NaOH) Lösung, konnten innerhalb von 10-40 min die typischen CD-Cotton-Effekte für  $\beta$ -Faltblattstrukturen detektiert werden (Abb. 4.1, links). Dies deutet auf eine schnelle Wiederherstellung der Aggregationseigenschaften des Peptidblocks hin und belegt somit einen effektiven Schaltvorgang von **I-PBA2k** in **Ib-PBA2k**.

Trotz der in Methanol beobachteten  $\beta$ -Faltblattbildung zeigten AFM Aufnahmen, der geschalteten Lösung (**Ib-PBA2k**), keine ausgedehnten Mikrostrukturen (Abb. 4.1, rechts). Das kann durch eine erhöhte Dynamik der  $\beta$ -Faltblattbildung der (TV)<sub>5</sub>-Domänen in Methanol im Vergleich zum wässrigen Lösungsmittel erklärt werden. Dadurch, dass in Methanol der hydrophobe Effekt vernachlässigt werden kann, fehlt die entscheidende Triebkraft für die Stabilisierung der  $\beta$ -Faltblätter. Dies führt zur Bildung von mehr oder weniger schwachen  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Im Unterschied zu Wasser, resultiert im protischen, organischen Lösungsmittel die freie Energie der isolierten,  $\beta$ -Faltblatt-bildenden Konjugate hauptsächlich aus den kleinen Unterschieden in Wasserstoffbrücken-Bindungsenergien

zwischen Peptid/Lösungsmittel (dissoziierte Form) und Peptid/Peptid (dissoziierte Form). Da der Entropieverlust des Konjugates während der Aggregation zumindest ausgeglichen werden muss, ist die Gesamtstabilität der  $\beta$ -Faltblattstrukturen vergleichsweise gering. Dies ist in Übereinstimmung mit CD Untersuchungen, die zeigen, dass der Selbstorganisationsprozess von **Ib-PBA2k** in Methanol recht langsam abläuft, da die maximale Intensität des CD-Minimums bei 216 nm erst nach über 24h erreicht war. Außerdem ist bekannt, dass Methanol den Selbstorganisationsprozess von  $\beta$ -Faltblatt bildenden Peptiden stark verlangsamt, selbst im Fall von Peptidsegmenten mit sehr hoher Aggregationstendenz.<sup>[9]</sup>

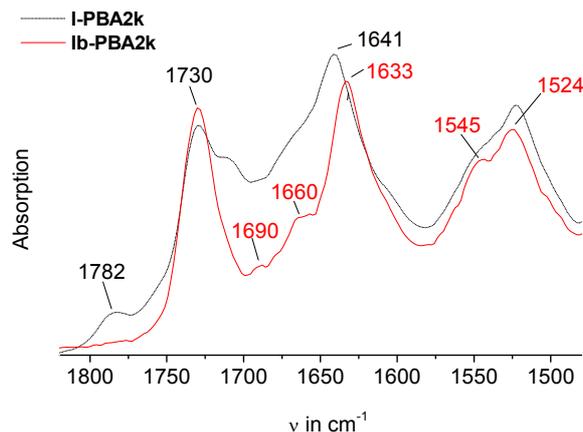


**Abb. 4.1:** Links: CD-Spektrum von **I-PBA2k** in MeOH ( $c = 0.5$  mg/ml) vor dem Schaltprozess, in methanolischer NaOH Lösung 40 min und 24 h nach dem Schalten; Rechts: AFM Aufnahme der geschalteten Lösung (**I-PBA2k** in MeOH,  $\text{pH} \approx 7,5$ , nach 24h gespinncoated auf Mica; Höhenbild ( $z = 10$  nm)) (rechts).

Da in organischen Lösemitteln die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen entscheidend für eine gute Stabilisierung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen ist, wurde Methanol gegen das aprotische und unpolare Lösungsmittel Diethylether ausgetauscht. Die für die Ausbildung von ausgedehnten, einheitlichen Strukturen erforderliche Dynamik des Peptid-Organisationsprozesses wurde durch den Zusatz von 15 vol.% Methanol als Co-Lösungsmittel gewährleistet.

Das ungeschaltete Konjugat **I-PBA2k** war löslich in Diethylether/Methanol. AFM-Aufnahmen zeigten keine Hinweise für eine peptidgeleitete Strukturbildung. Dies konnte zudem durch FT-IR Messungen an dünnen Filmen bestätigt werden. Die Amid I Bande blieb im Vergleich zur Messung im Feststoff unverändert bei  $\nu = 1641$  cm<sup>-1</sup>, und liegt damit in

guter Übereinstimmung zu gestörten (TV)-Multimer Peptiden, die eine statistische Kettenkonfiguration einnehmen.<sup>[131]</sup> Zusätzlich erlaubten die IR-Messungen den Nachweis der Ester-Gruppen. Die Schwingungsbande bei  $\nu \approx 1782 \text{ cm}^{-1}$  weist darauf hin, dass die Switch-Ester-Gruppen unter den Bedingungen stabil sind (Vergleich Abb. 4.2).



**Abb. 4.2:** Carbonyl Bereich des FT-IR-Spektrums gemessen für **I-PBA2k** und **Ib-PBA2k** in dünnen Filmen, erhalten durch Eindampfen des Lösungsmittels. Zu sehen sind die Ester-Carbonyl Absorptionsbanden ( $\nu(\text{O}^{\text{sec.ester}}) = 1782$  und  $\nu(\text{O}^{\text{prim.ester}}) = 1730 \text{ cm}^{-1}$ ) sowie die Amid I und II Bande (statistische Peptid-Kettenkonfiguration  $1641 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1524 \text{ cm}^{-1}$  für **I-PBA2k** und antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur  $1633 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1690 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1545\text{-}1525 \text{ cm}^{-1}$  für **Ib-PBA2k**). Die Bande bei  $\nu = 1660 \text{ cm}^{-1}$  kann auf  $\beta$ -Faltblätter zurück geführt werden, die sich zu großen Loop-Strukturen anorden.<sup>[146]</sup>

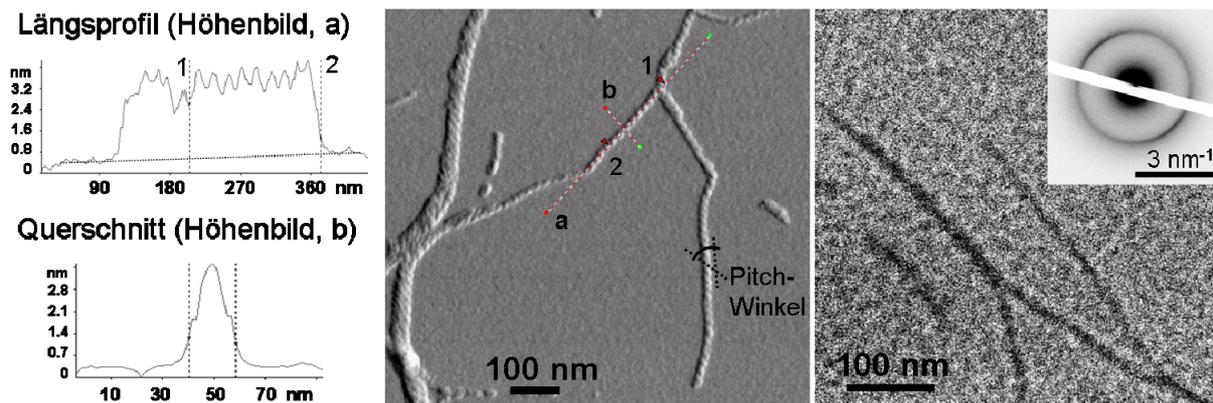
Die Zugabe von einem Äquivalent methanolischer NaOH Lösung in Bezug auf die Switch-Defekte initiiert schnell die Reorganisation in den Switch-Segmenten und sorgt somit für die Bildung der  $(\text{TV})_5$ -Aggregatorsequenz. FT-IR Messungen bestätigten dies durch das Verschwinden der Switch-Ester Absorptionsbande und die Verschiebung der Amid I Bande zu  $\nu = 1633 \text{ cm}^{-1}$  (siehe Abb. 4.2). Letztere, in Kombination mit den Banden bei  $\nu = 1660 \text{ cm}^{-1}$  und  $\nu = 1690 \text{ cm}^{-1}$  sind typische Schwingungsbanden für ein Peptid, das in einer antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt Konformation vorliegt. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur, die z.B. die Selbstorganisation von Modell- $(\text{TV})_5$ -Peptiden beschreibt.<sup>[131,147]</sup> Verglichen mit diesen Modell-Oligopeptiden ist die Bildung eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts für ein Peptid-Polymer Konjugat noch wesentlich stärker favorisiert, da eine solche Anordnung die Minimierung der sterischen Abstoßungskräfte zwischen den benachbarten Polymerknäulen ermöglicht.

Darüber hinaus ist, wie schon erwähnt, der Peptid-Selbstorganisationsprozess in organischen Lösungsmitteln durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen getrieben. Aus diesem Grund ist ein paralleles Faltblatt, aufgrund der stärker verzerrten Wasserstoffbrückenbindungen, gegenüber der antiparallelen Anordnung nicht begünstigt.<sup>[148]</sup>

#### 4.1.1 Charakterisierung der gebildeten Strukturen

In Übereinstimmung mit den IR-Messungen, die eine Peptidsekundärstrukturbildung bestätigten, konnten nach der Initiierung des Schaltvorgangs, durch Zugabe der Base zur **I-PBA2k** Lösung, mit Hilfe von AFM-Messungen gut definierte Mikrostrukturen beobachtet werden (Abb. 4.3). In der AFM-Aufnahme sind eng gewundene helikale Superstrukturen gut zu erkennen. Die AFM-Probe wurde durch spincoaten einer Lösung von **Ib-PBA2k**, 12 Stunden nach der Initiierung des Schaltvorgangs, erhalten. Erste Anzeichen für die Bildung von anisotropen Faserstrukturen konnten bereits 3 h nach dem Schaltvorgang mittels AFM beobachtet werden (siehe Abb. 4.9). Dies deutet auf einen schnellen Aggregationsprozess und ein longitudinales Wachstum hin. Anscheinend bestehen die gefundenen Strukturen aus verdrehten  $\beta$ -Faltblatt Bändern. Diese Vermutung wird durch die FT-IR Messungen gestützt, da die Schwingungsbande bei  $\nu = 1660 \text{ cm}^{-1}$  ausgedehnten  $\beta$ -Faltblättern zugeordnet werden kann, die eine Windung in große Loop-Strukturen aufweisen.<sup>[146]</sup> Des Weiteren konnte die Anwesenheit von  $\beta$ -Faltblattstrukturen in den helikalen Superstrukturen direkt durch Elektronenbeugung (*selected area electron diffraction*, SAED) im Transmissions Elektronen Mikroskop (TEM) nachgewiesen werden. Dabei wurde ein charakteristischer Strukturabstand von  $d = 4.72 \text{ \AA}$  gefunden, welcher typisch für den Abstand von  $\beta$ -Strängen im  $\beta$ -Faltblatt ist (Abb. 4.3, eingefügtes Bild rechts).<sup>[32]</sup>

Die beobachtete Verdrillung der  $\beta$ -Faltblätter (biaxiale Rotation der Peptidstränge) ist ein typisches Strukturmotiv und in Literatur bereits vielfach beschrieben worden.<sup>[11,149]</sup> Diese Analogie bestätigt, dass die Peptidorganisation die dominierende Komponente für die Strukturbildung im System darstellt. Folglich sind auch die beobachteten Superstrukturen vereinbar mit Peptid-Organisationsmodellen.<sup>[11]</sup> Es ist erwähnenswert, dass alle Strukturen eine deutliche links-händige Verdrillung aufweisen. Dies kann für Peptid-Anordnungen auch erwartet werden, da die Chiralität der L-Aminosäuren einen rechtshändigen Peptid  $\beta$ -Strang erzeugt und somit zu einer links-händigen Verdrillung um die Längsachse des  $\beta$ -Faltblatt Bandes führt (Konzept der alternierenden Chiralität in hierarchischen Systemen).<sup>[150]</sup>



**Abb. 4.3:** Helikale Superstrukturen gebildet durch die pH-induzierte Selbstorganisation von **Ib-PBA2k** in Diethylether/Methanol (85 vol.%,  $c[\mathbf{Ib-PBA2k}] = 0,6 \text{ mmol/l}$ , 12 h, Raumtemperatur). Links: Profile der Strukturen aus dem AFM Höhenbild übereinstimmend mit dem mittleren Bild; Mitte: AFM Aufnahme (Tapping Mode, Phasenbild  $z=10^\circ$ , gespinncoatede Lösung von **Ib-PBA2k**, 10×verdünnt); Rechts: TEM Aufnahme (unbehandelt, 10× verdünnt) einschließlich SAED einer repräsentativen Stelle als Einschub.<sup>[135]</sup>

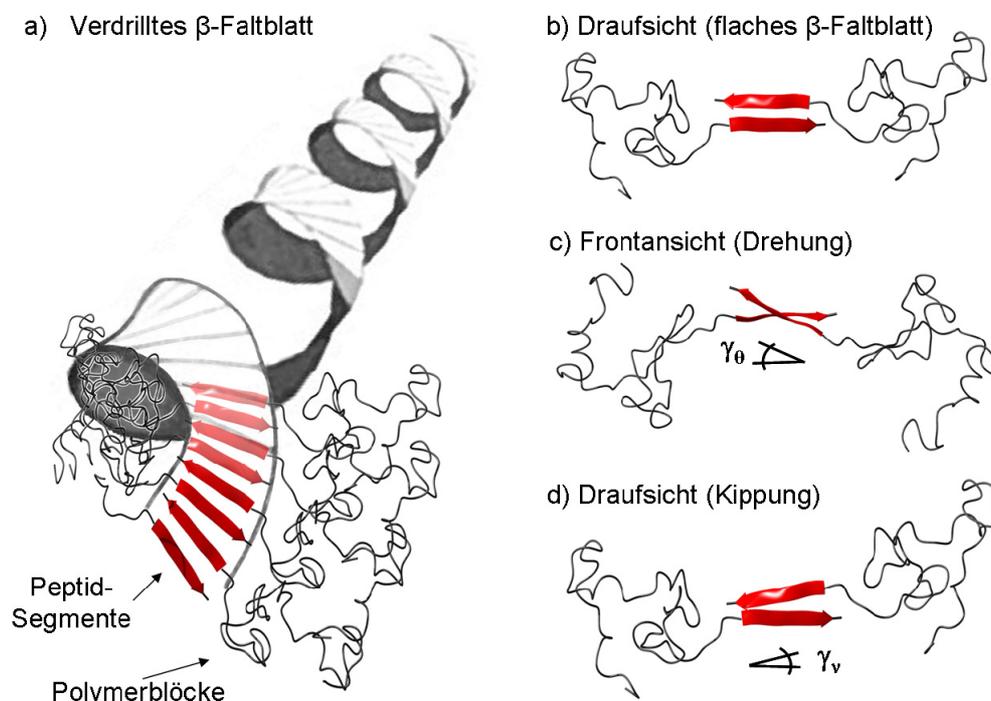
Wie aus AFM Aufnahmen ermittelt werden konnte, weisen die helikalen Strukturen recht einheitliche Höhenmaxima von  $2,9 \pm 0,5 \text{ nm}$  auf und erstrecken sich über Längen von 2-2,5  $\mu\text{m}$  (Abb. 4.3). Die Breite der Strukturen wurde über TEM Aufnahmen bestimmt und betrug etwa  $10 \pm 1 \text{ nm}$  (Abb. 4.3, rechts). Die helikale Feinstruktur der Aggregate konnte nicht mit TEM aufgelöst werden, was die These einer dicht gewundenen Helix bekräftigt (Abb. 4.3 rechts). Es zeigte sich, dass Peptid und Polymer weder über einen ausreichenden Kontrast noch über ausreichend unterschiedliche chemische Eigenschaften verfügen, die ein selektives Anfärben der Strukturuntereinheiten erlauben. Dennoch ermöglichte der viskoelastische Kontrast zwischen den Peptidsegmenten, die ein "kristallines"  $\beta$ -Faltblatt bilden, und dem weichen Polymerblock ( $T_g = -49^\circ\text{C}$ ) eine Visualisierung durch AFM. (Abb. 4.3, mitte). Die Phasenbilder gestatteten eine relativ genaue Bestimmung der helikalen Pitch-Höhe ( $37 \pm 3 \text{ nm}$ ) und des einheitlichen Pitch-Winkels ( $48^\circ \pm 3^\circ$ ).

Basierend auf diesen Dimensionen konnte ein Strukturmodell vorgeschlagen werden, dass die Struktur als einen deformierten Zylinder mit ellipsoiden Querschnitt darstellt.

#### 4.1.2 Vorschlag eines Strukturmodells

Der Vergleich mit Literaturdaten über das Aggregationsverhalten  $\beta$ -Faltblatt-bildender Oligopeptide in organischen Lösungsmitteln<sup>[151]</sup> sowie der Selbstorganisation von Peptid-Polymer Konjugaten in wässrigem Medium<sup>[9,10,133]</sup> führte zu folgendem Modellvorschlag. Wie in Abbildung 4.4 zu sehen, entsteht durch die Selbstorganisation des Peptidsegments in

ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt eine 2D-Bandstruktur mit einem semi-flexiblen Peptid  $\beta$ -Faltblatt-Kern und einer weichen PnBA Schale.

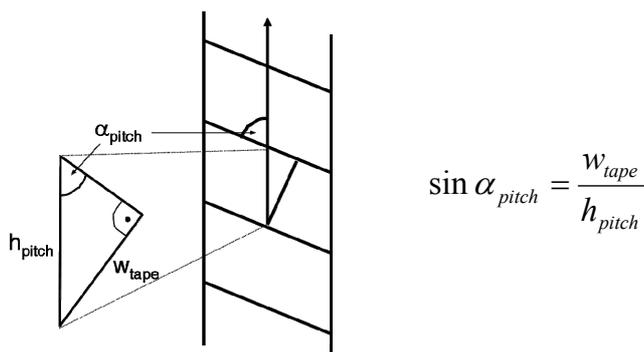


**Abb. 4.4:** Idealisiertes Strukturmodell (a), in dem die Peptidsegmente des Peptid-PnBA Konjugates ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt-Band ausbilden (a, vorne), welches sich in eine helikale Superstruktur verdrillt (a, hinten; die Polymerketten sind für eine bessere Übersichtlichkeit nicht gezeigt);  $\beta$ -Strang Rotationsmodi, die zur Verdrillung des  $\beta$ -Faltblatts führen: flaches Faltsblatt ( $\gamma_\theta = \gamma_v = 0$ ; Pauling & Corey Faltsblatt; (b)), verdrehtes Faltsblatt ( $\gamma_\theta > 0$  and  $\gamma_v = 0$ ; (c)) und gekrümmtes Faltsblatt ( $\gamma_\theta = 0$  and  $\gamma_v > 0$ ; (d)); (Die helikale Struktur von (a) wurde dabei aus Ref.<sup>[11]</sup> adaptiert.<sup>[135]</sup>)

Aufgrund der Anreicherung remanenter Dipolmomente ist eine flache  $\beta$ -Faltblattstruktur (Abb. 4.4, b) energetisch nicht bevorzugt.<sup>[11,152]</sup> Besonders in einem organischen Lösungsmittel mit vergleichsweise niedriger Dielektrizitätskonstante ist eine flache Struktur eher unwahrscheinlich. Aus diesem Grund wird eine links-händige Verdrehung induziert, wobei jedes Peptidsegment um die Längsachse des  $\beta$ -Faltblatts gedreht wird (Abb. 4.4, c). Um die beobachtete helikale Superstruktur zu bilden, ist gleichzeitig zu dieser Verdrehung eine Kippung des  $\beta$ -Faltblatt Bandes notwendig (Abb. 4.4, d). Das Auftreten von Verdrillungen bei ausgedehnten  $\beta$ -Faltblatt Bandstrukturen ist ein bekanntes Motiv.<sup>[11,152,153]</sup> Es kann vermutet werden, dass die Verdrillung durch die unterschiedliche chemische Natur der oberen und unteren Seite des  $\beta$ -Faltblatts verursacht wird (faziale Amphiphilie). Dieser

Polaritätsunterschied, hervorgerufen durch die unterschiedlichen Thr- und Val-Seitenketten, verursacht die Verdrillung des Bandes und führt zur Bildung der helikalen Konfiguration. Vermutlich unterstützt dies die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxygruppen der Threonine und macht es wahrscheinlich, dass die Threonin Seite innenliegend positioniert sind. Allerdings ist dies bis jetzt nur eine Vermutung und muss z. B. durch  $^1\text{H}$  NMR Untersuchungen bestätigt werden. Die Verdrillung des  $\beta$ -Faltblatts, aufgrund der chemischen Unsymmetrie der Faltblattseiten, macht eine Doppelband Struktur aus zwei  $\beta$ -Faltblättern unwahrscheinlich, da eine solche "Ribbon-Struktur" zwei symmetrische Seiten aufweisen würde.<sup>[9]</sup>

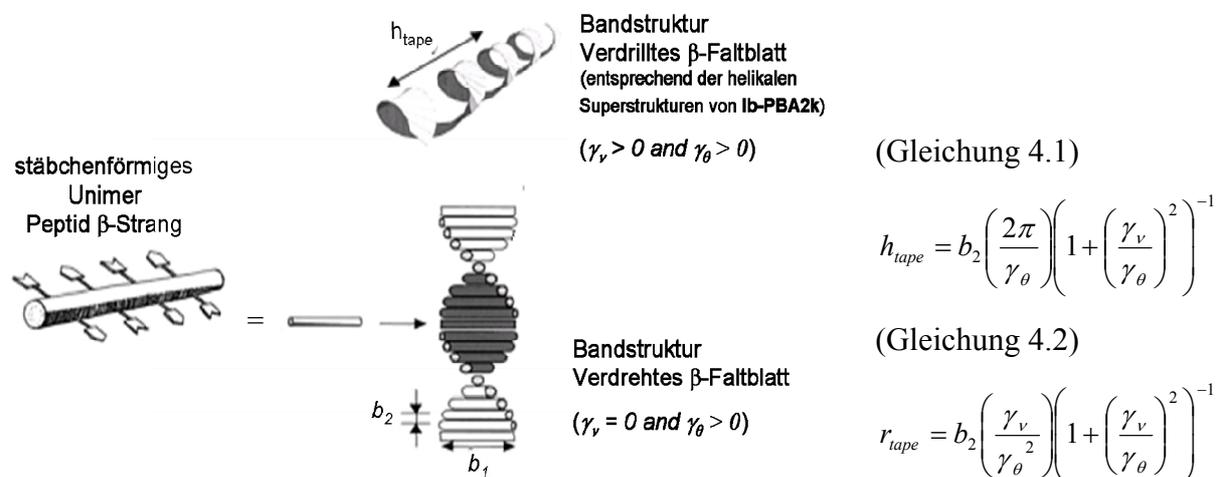
Aus den AFM Aufnahmen konnten Pitch-Höhe und -Winkel bestimmt werden. Diese erlaubten die Berechnung der maximalen Band-Breite von  $13,7 \pm 2$  nm (Abb. 4.5). Dieser Wert kann nun mit der theoretischen Breite verglichen werden, die sich aus einem nicht verdrillten antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt Band, gebildet durch Konjugat **Ib-PBA2k**, ergibt.



**Abb. 4.5:** Berechnung der maximalen Band-Breite in den helikalen Superstrukturen;  $\alpha_{pitch}$  ist der Pitch-Winkel,  $h_{pitch}$  entspricht der Pitch-Höhe und  $w_{tape}$  ist die Band-Breite.

Die theoretische Breite konnte auf ca. 7,2 nm berechnet werden. Dabei wurde angenommen, dass das Peptidsegment einen vollständig gestreckten  $\beta$ -Strang mit 0,35 nm pro Aminosäure<sup>[32]</sup> bildet und das Polymer ein statistisches Knäuel formt. Es ist allerdings wahrscheinlicher, dass der Polymerblock, aufgrund des kleinen Polymerisationsgrades und aus Packungsgründen, eine gestreckte Knäuel Konformation annimmt. Darauf deuten auch die AFM and TEM Messungen hin, da dort ein Zwischenraum von etwa 6,5 nm zwischen den Bandschleifen gut sichtbar sein sollte. Die Breite eines solchen 2D-Bandes würde zwar mit der maximalen Band-Breite von 13,7 nm ziemlich genau übereinstimmen. Dennoch ist eine vollständig gestreckte, *all-trans* Bürsten-Konformation des Polymers, aufgrund des Verlustes an konformativer Entropie sehr unwahrscheinlich.

Nach *Aggeli et. al.* lassen sich die mittleren Dreh- und Kippwinkel für ein gewundenes  $\beta$ -Faltblatt Band nach Gleichung 4.1 und 4.2 berechnen (siehe Abb. 4.6).<sup>[11]</sup>



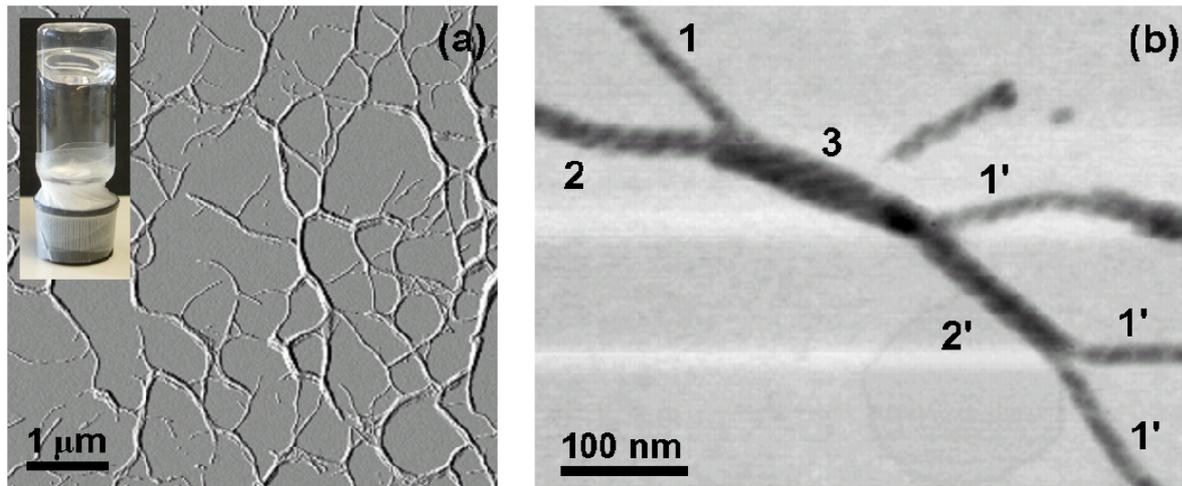
**Abb. 4.6:** Modell für die  $\beta$ -Faltblattbildung durch die Anordnung von Peptid  $\beta$ -Strängen als chirale Stäbchen in ein verformtes, steifes Band ( $\beta$ -Faltblatt Band). Die Pitch-Höhe des Bandes  $h_{\text{tape}}$  und der Radius  $r_{\text{tape}}$  können durch die Gleichungen 4.1 und 4.2 beschrieben werden. Dabei entspricht  $b_2$  dem Abstand zwischen den Strängen im Band (typische  $\beta$ -Strang Abstände in  $\beta$ -Faltblättern sind 4.63-4.75 A).<sup>[32]</sup>  $\gamma_v$  und  $\gamma_\theta$  stellen die entsprechenden Kipp- und Drehwinkel (in Radian) pro Einzelstabchen entlang des Bandwachstums Vektors dar.<sup>[11,135]</sup>

Bei einem angenommenen runden Querschnitt der Superstruktur in Lösung, mit einem berechneten Radius von etwa 7,1 nm ( $r = \text{Umfang}_{\text{Ellipsoid}} / 2\pi$ ), wurden der Dreh- und Kippwinkel entsprechend auf  $\gamma_\theta \approx 1,9^\circ$  und  $\gamma_v \approx 2,3^\circ$  berechnet. Diese Winkel wurden mit den veröffentlichten Strukturdaten eines  $\beta$ -Faltblatt-bildenden 11mer Oligopeptides verglichen. In wässriger Lösung wies dieses Oligopeptid symmetrische Verdrillungswinkel von  $\gamma_\theta = \gamma_v \approx 3^\circ$  auf.<sup>[11]</sup> Diese Winkel sind etwas größer, als die für **Ib-PBA2k** gemessenen. Es scheint sich also in organischen Lösungsmitteln ein steiferes Band mit einer geringeren Verdrillung zu bilden. Dies kann auch erwartet werden, da sich die Beiträge der Wasserstoffbrücken Bindungsenergien in organischen Lösungsmitteln und Wasser deutlich unterscheiden. Da in Diethylether die Wasserstoffbrückenbindungen stärker sind, werden auch die Bindungen zwischen den  $\beta$ -Strängen innerhalb des Faltblatt-Bandes stärker sein. Demnach ist eine Verformung des Bandes, getrieben durch Dipolmomente und/oder chemische Anisotropie energetisch aufwendiger.<sup>[154]</sup>

Eine wesentliche Eigenschaft der Strukturmechanik von  $\beta$ -Barrels (ein einzelnes gewundenes  $\beta$ -Faltblatt gilt als einfachstes  $\beta$ -Barrel) ist, dass diese Superstrukturen ziemlich stabil aber nicht starr sind und Scher-Deformationen tolerieren. Dies wurde durch AFM Untersuchungen bestätigt, da ein anisometrischer, elliptischer Querschnitt bei der Abbildung der Superstrukturen auf einer Mica-Oberfläche gefunden wurde. Da diese Deformation schon bei sehr schwacher Dämpfung auftrat, ist es leicht anzunehmen, dass eine, der für die Deformation verantwortlichen Kräfte aus der starken Adsorption von PnBA auf Mica resultiert. Diese Effekte wurden bereits in der Literatur für molekulare Bürstensysteme beschrieben.<sup>[155,156]</sup>

Im Vergleich zu klassischen Polymeren besitzen sequenz-definierte Peptide die Eigenschaft, hierarchisch geordnete Strukturen mit multiplen Strukturebenen ausbilden zu können. So besitzen ausgedehnte  $\beta$ -Faltblattstrukturen die inhärente Tendenz sich über die Ebene der Sekundärstrukturbildung hinaus zu organisieren. Häufig geschieht dies unabhängig von der Größe oder der Komplexität der Peptidstränge.<sup>[157]</sup> Dies führt zur Bildung von Doppelbandstrukturen, Fibrillen bis hin zu Fasern, die sich über Bereiche von Nanometern bis Mikrometern erstrecken können. Vor allem diese Organisationsprozesse von  $\beta$ -Faltblättern sind zur Zeit ein wichtiges Feld in der medizinischen Forschung, da z. B. das Amyloid  $\beta$ -Protein ( $A\beta_{1-42}$ ) dichte, intrazelluläre Bündel von  $\beta$ -Faltblatt-Fibrillen durch pathologisches Fehlfalten im Gehirn bildet. Diese Strukturen werden als pathogene Aggregate im Zusammenhang mit der neurodegenerativen Alzheimer-Krankheit diskutiert.<sup>[158]</sup>

Somit ist es nicht verwunderlich, dass die helikalen Superstrukturen von **Ib-PBA2k** in organischen Lösungsmitteln die Tendenz zeigten, sich in definierter Weise weiter zu organisieren. Mikroskopisch konnte dies mittels TEM und AFM Messungen (Abbildung 4.3 und 4.7) durch die Aggregation von mehreren Protostrukturen (helikale Superstruktur) beobachtet werden.



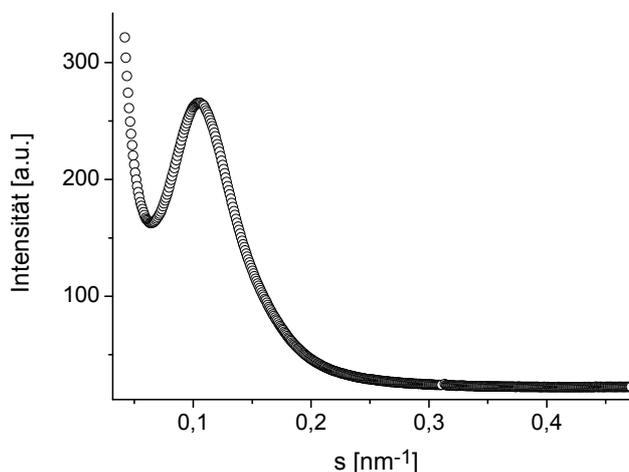
**Abb. 4.7:** AFM Aufnahme der Gel-Struktur gebildet in einer Lösung von **Ib-PBA2k** (0.6 mmol/l in Diethylether/Methanol (85 vol.%) nach ca. 12 h Vernetzung bei Raumtemperatur (5fach verdünnt, Amplitudenbild  $z = 0.2$  V) (a); makroskopisches Gel nach 24 h (a, Einschub); Aufnahme einer vernetzten Struktur im Gel (invertiertes Höhenbild  $z = 5$  nm). Es zeigt einfache Bandstrukturen mit helikaler Windung als Protostrukturen (1,1'), sowie Strukturen aus zwei (Dimere: 2, 2') und drei Bändern (Trimere: 3) (b).

In Übereinstimmung mit Modellen für die Faltung von Peptiden,<sup>[11]</sup> wiesen die resultierenden Bündel eine einheitliche, links-händige Verdrehung auf. Dies zeigt zusätzlich, dass die Zusammenlagerung der Protostrukturen einem definierten Organisationsprinzip folgte. Ein einfaches statistisches Verschlaufen aufgrund von lateralen, ungerichteten Wechselwirkungen erscheint hingegen unwahrscheinlich. Makroskopisch führt diese Aggregation zur Bildung eines Organo-Gels ab einer Konzentration von etwa  $c[\text{Ib-PBA2k}] = 0,6$  mmol/l (2 mg/ml) innerhalb von 8-12 Stunden (siehe Abb. 4.7 Einschub). Die Gelstruktur ist dabei vergleichsweise weich und ein gel-fluid Übergang kann unter recht mildem Scher-Stress beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Vernetzung der Protostrukturen durch reversible, schwache Wechselwirkungen hervorgerufen wird. Dennoch ist, wie in Abbildung 4.7 links zu sehen, die Gelstruktur selbsttragend, also mechanisch stabil.

Für eine detailliertere Untersuchung solcher Gelstrukturen ist die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (*small angle x-ray scattering*, SAXS) sehr gut geeignet. Diese Charakterisierungsmethode bietet die Möglichkeit, Informationen über die Form von in Lösung befindlichen Polymeraggregaten zu gewinnen.

Zunächst erfolgte die Messung eines getrockneten Gels. Diese ergab einen stark ausgeprägten Reflex bei  $s \approx 0,105$  nm<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 4.8), der nach dem Bragg'schen Gesetz einer Periodizität von  $d \approx 9,5$  nm zugeordnet werden kann. Dieser Wert entspricht wahrscheinlich

dem Durchmesser der helikalen Protostrukturen in einer dichten 2D-hexagonalen Packung und ist in guter Übereinstimmung mit den gemessenen Breiten der Protostrukturen aus TEM- und AFM-Aufnahmen (9-13 nm).



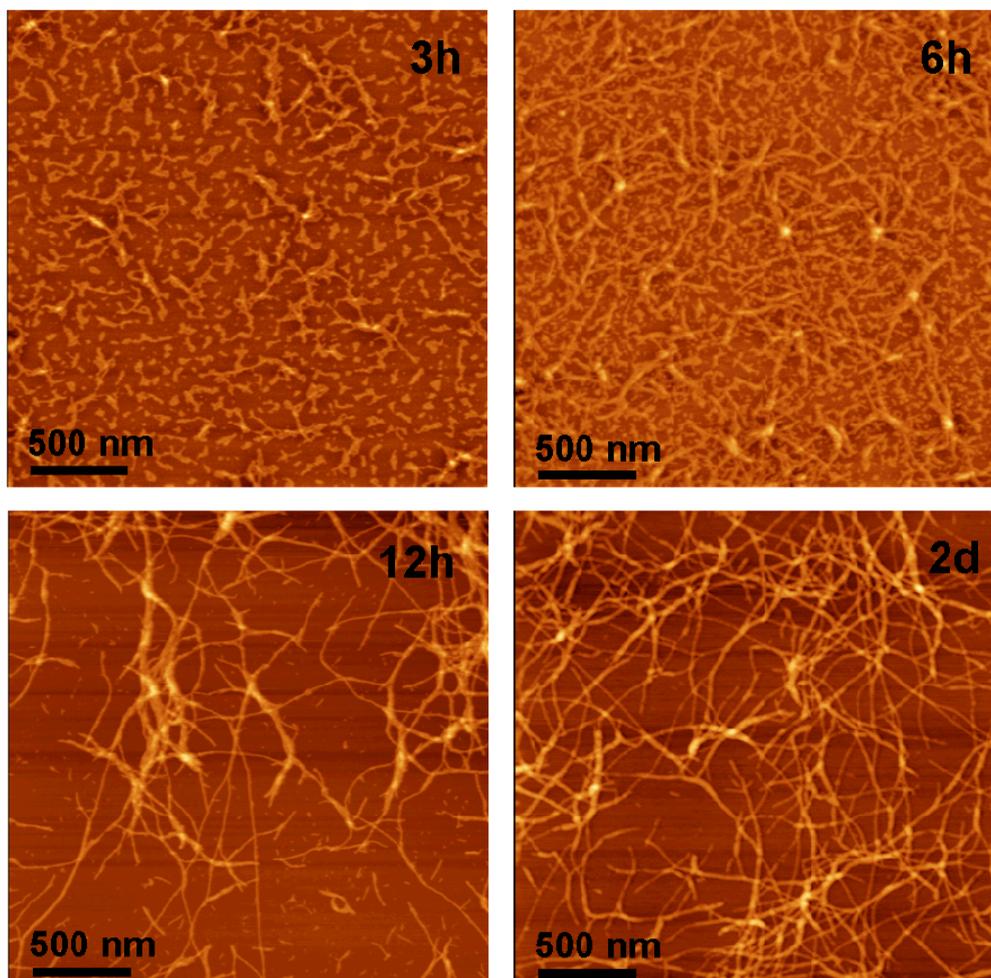
**Abb. 4.8:** Kleinwinkel-Röntgenstreudaten einer getrockneten Gelprobe aus **Ib-PBA2k**. Auftragung der Intensität über den Streuvektor.

Wie schon erwähnt, eignet sich die SAXS-Methode besonders für die Strukturuntersuchung in Lösung. Allerdings gestaltete sich die Präparation und Messung der Peptid-PnBA Proben schwierig. Aufgrund der geringen Streuintensität ist die Konzentration, ab der Gele gebildet werden (2 mg/ml bzw. 0,2 %), nicht ausreichend, um Informationen über Formfaktor bzw. Strukturfaktor aus der Streukurve zu erhalten. Eine Aufkonzentrierung der Probenansätze führte schnell zu einer inhomogenen Lösung, da entweder nicht alles gelöst werden konnte oder nach kurzer Zeit, vor dem Einsetzen der Gelbildung, eine Fällung auftrat. Die einzige Möglichkeit bestand im Einengen von verdünnten Lösungen. Allerdings ist bei dieser Methode die Konzentrationsbestimmung des Peptid-Polymer-Konjugats ungenau und auch die Zusammensetzung des resultierenden Lösungsmittelgemisches (Et<sub>2</sub>O/MeOH), welches als separate Messung von den Messdaten des Analyten abgezogen werden muss, ist nicht genau zu bestimmen. Aus diesen Gründen konnten bis zu diesem Zeitpunkt noch keine verwertbaren Strukturinformationen aus den Messungen mit Lösungsmittel erhalten werden.

#### 4.1.3 Kinetik der Strukturbildung

Um den zeitlichen Verlauf der Strukturbildung von **Ib-PBA2k** in Diethylether/Methanol zu untersuchen, wurden in verschiedenen Abständen nach der Initiierung des Schaltvorgangs AFM-Proben gemessen. In Abbildung 4.9 ist durch die Aufnahmen nach 3 h, 6 h, 12 h und

nach 2 Tagen ein repräsentativer Ausschnitt aus dem Strukturbildungsprozeß dargestellt. Es macht deutlich, dass die Strukturbildung recht schnell abläuft. Erste leicht anisotrope Strukturen bis zu 200 nm Länge waren bereits nach 3 h zu beobachten. Weitere drei Stunden später hatte der Anteil anisotroper Strukturen zugenommen. Es befand sich jedoch weiterhin viel unstrukturiertes Peptid-Polymer-Konjugat auf der Mica-Oberfläche. Nach 12 h konnten 2-3  $\mu\text{m}$  lange helikale Faserstrukturen abgebildet werden. Der Anteil an ungeordneten Strukturen war nur noch minimal. Zu diesem Zeitpunkt scheint die Bildung der Protostrukturen also nahezu abgeschlossen zu sein. Die weitere Strukturbildung und damit verbunden auch die Gelbildung geschieht, wie weiter oben schon beschrieben, durch Aggregation der einzelnen Faser-Protostrukturen.

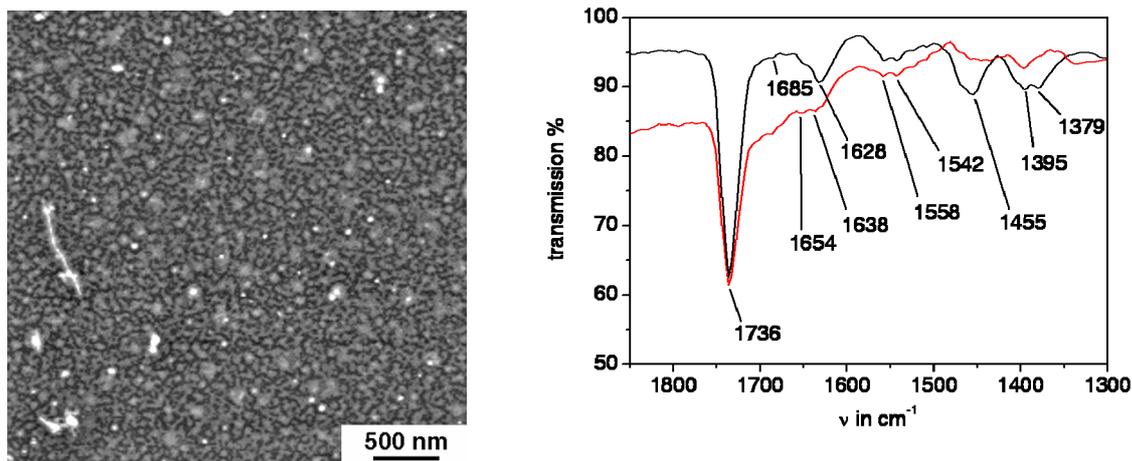


**Abb. 4.9:** AFM Aufnahmen der gebildeten Strukturen aus **Ib-PBA2k** in Diethylether/Methanol (85 vol.%,  $c[\text{Ib-PBA2k}] = 0,6 \text{ mmol/l}$ ; 10fach verdünnt, spincoating auf Mica; Höhenbilder  $z = 12 \text{ nm}$ ) nach 3 h, 6 h und 12 h bzw. 2 Tagen.

## 4.2 Erweiterung des Konzepts - Von Oligomeren zu Polymeren

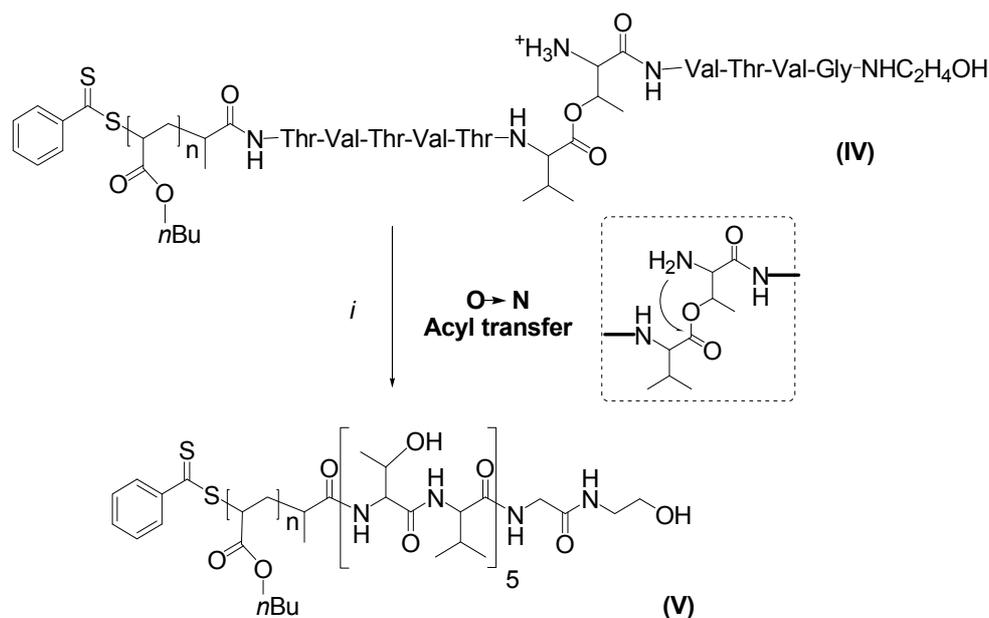
In Analogie zum Peptidkonjugat  $PnBA_{15}$ -*block*-(TV)<sub>5</sub> (**Ib-PBA2k**), das im letzten Abschnitt beschrieben wurde, waren auch die höhermolekularen Konjugate, die über den RAFT Polymerisationsansatz hergestellt wurden, direkt in einer Mischung aus Diethylether und Methanol löslich. Dennoch musste, aufgrund der längeren  $PnBA$ -Ketten, der prozentuale Anteil an Methanol von 15 auf 30 *vol.*% erhöht werden, um die Konjugate homogen lösen zu können. Da die Systeme nur noch ein Switch-Segment im Peptidblock enthielten wurde der Lösung ein wenig Trifluoressigsäure (TFA) als Stabilisator zugesetzt. Das gesamte Peptidsegment wurde auf diese Weise effektiv stabilisiert und unterdrückte eine frühzeitige Strukturbildung. Dies wurde am System **IV-PBA8k** demonstriert. AFM Aufnahmen zeigten unter diesen Bedingungen auch nach 15 Tagen keine Anzeichen für eine kontrollierte Mikrostrukturbildung (siehe Abb. 4.10 links). Zusätzlich wurde das Vorliegen von undefinierten Amid-Strukturen durch eine breite Amid I Schwingungsbande im FT-IR Spektrum nachgewiesen (Abb. 4.10, rotes Spektrum).

Diese Beobachtungen zeigen deutlich das hervorragende Potential der Switch-Segmente. Ein einzelnes Switch-Defekt-Segment reicht aus, um effektiv die benachbarten (TV)<sub>2</sub> Segmente im Peptid-Block zu stören und die Bildung von ausgedehnten  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu unterdrücken.



**Abb. 4.10:** Links: AFM-Aufnahme von **IV-PBA8k** stabilisiert mit TFA in Diethylether/Methanol (7:3), (1 mg/ml, gespinoated nach 15 d; AFM Höhenbild,  $z = 8$  nm); Rechts: FT-IR Spektren (Transmission) von **IV-PBA8k** gemessen als dünnen Film auf einem ATR-Kristall; rot: aus TFA-stabilisierter Lösung nach 25 Tagen (1 mg/ml in  $Et_2O/MeOH/TFA$  (68:30:2)); schwarz: aus einer Lösung 25 Tage nach Titration (1 mg/ml in  $Et_2O/MeOH$  (70%),  $pH_{app.} = 6,0$ ).

Durch die Titration der TFA-stabilisierten Lösung mit einer Mischung aus Diethylether und methanolischer NaOH Lösung (70:30 vol.%; 0,1 M NaOH in MeOH) konnte die peptid-geleitete Mikrostrukturbildung initiiert werden. Die damit verbundene Einstellung des apparenten pH-Wertes auf etwa 6 - 6,5 löst einen langsamen und kontrollierten O→N Acyl Transfer in den Switch-Segmenten aus und führt zur Umwandlung des gestörten Peptidkonjugates (IV) in das native, aggregationsfähige Konjugat (V) (siehe Schema 4.2).

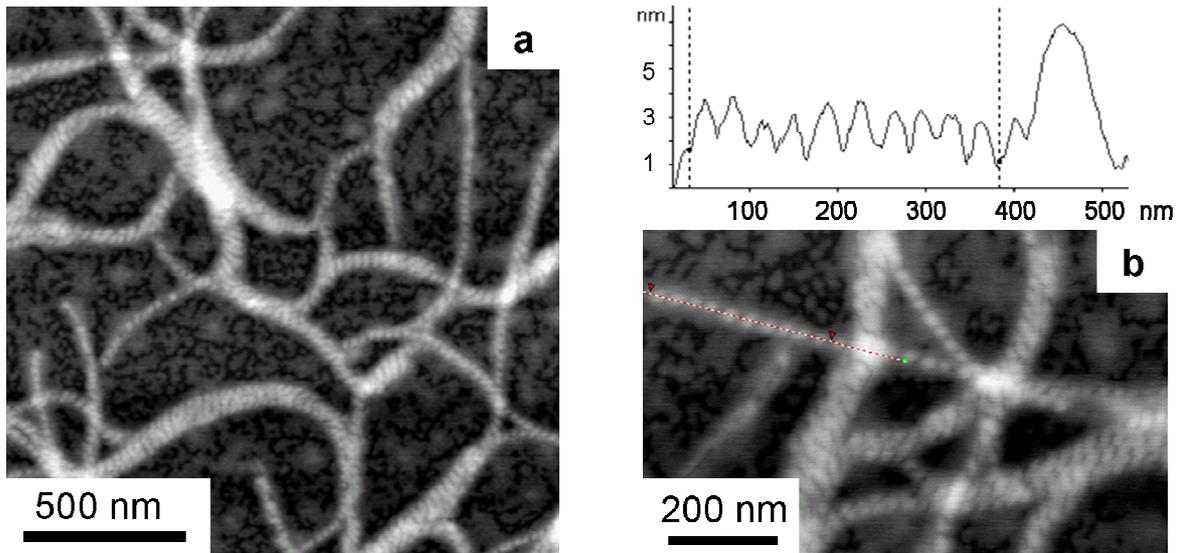


**Schema 4.2:** Darstellung des binären Schaltvorgangs vom gestörten Peptidkonjugat IV in die native, aggregationsfähige Peptidform V, ausgelöst durch den O→N Acyl Transfer im Switch-Segment; Reaktionsbedingungen: *i*. pH-Wert Erhöhung auf  $\approx 6$ .

#### 4.2.1 Analyse der gebildeten Strukturen

Der Prozess der peptid-geleiteten Strukturbildung wurde zunächst anhand des Peptid-Polymer Konjugates **IV-PBA8k** untersucht, welches einen P<sub>n</sub>BA-Block von etwa  $M_n \sim 8000$  besitzt. Durch das Einstellen des apparenten pH-Wertes ( $pH_{app.}$ ) einer verdünnten Lösung von **IV-PBA8k** (1 mg/ml) auf ca. 6,0, wurde eine sehr langsame Generierung der aggregationsfähigen Spezies **V-PBA8k** und damit ein relativ kontrollierter Selbstorganisationsprozeß erwartet. Innerhalb von zwei Tagen konnte die Bildung anisotroper, faserartiger Strukturen mit Längen bis zu einem Mikrometer durch AFM-Aufnahmen beobachtet werden. Wie in den AFM-Aufnahmen in Abbildung 4.11 zu sehen ist, organisieren sich diese Strukturen über einen längeren Zeitraum (12 d) weiter in Bündel- und fibrilläre Netzwerkstrukturen. Es ist erwähnenswert, dass neben den faserartigen Mikrostrukturen auch unstrukturiertes Material

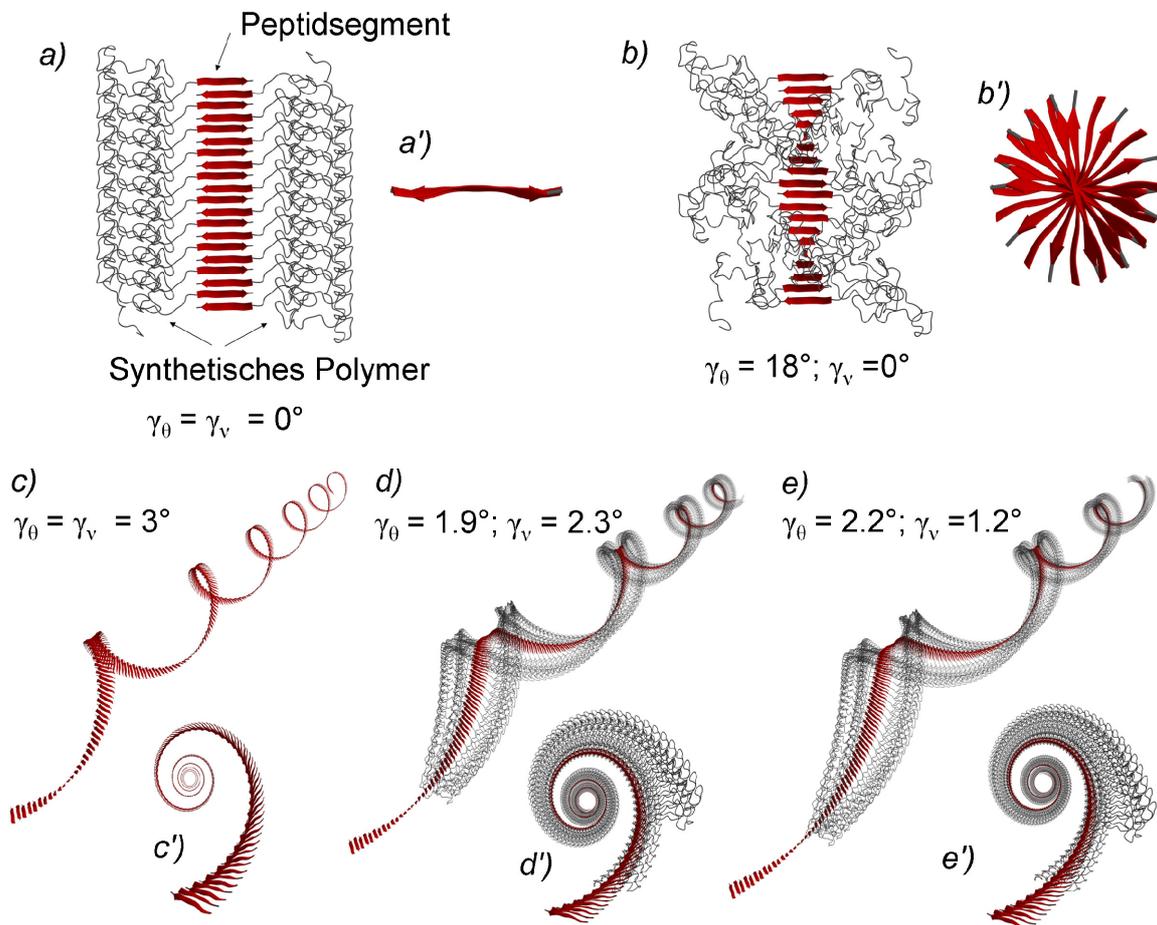
zu sehen ist. Dies könnten nicht geschaltete Konjugate sein, die sich aufgrund ihres kationischen Charakters auf der anionischen Mica-Oberfläche anreichern. Um dies genauer zu untersuchen müssen noch kinetische Messungen mittels analytischer Ultrazentrifuge durchgeführt werden, um die Entwicklung des Strukturbildungsprozesses quantitativ untersuchen zu können.



**Abb. 4.11:** AFM Aufnahmen der Fibrillen und des fibrillären Netzwerks, gebildet durch peptid-geleitete Organisation von **V-PBA8k** in Lösung, 12 Tage nach der Titration (1 mg/ml in Et<sub>2</sub>O/MeOH (70%) bei pH<sub>app.</sub> = 6,0, Höhen-Bild z = 12 nm) (a); AFM Aufnahme der individuellen Proto-Strukturen mit links-händiger helikaler Superstruktur sowie das dazu gehörige Höhenprofil (Höhenbild, z = 12 nm, geringe Dämpfung) (b).

Die dominierenden primären Strukturelemente konnten mittels AFM präziser untersucht werden. Wie in Abbildung 4.11 zu sehen, ist auch hier deutlich eine Feinstruktur, bestehend aus einer links-händigen helikalen Superstruktur erkennbar. Eine sehr ähnliche Struktur wurde schon im letzten Abschnitt für die kontrollierte Selbstorganisation des Peptid-P $n$ BA Konjugates **Ib-PBA2k** beschrieben. Die Analogie zwischen den Mikrostrukturen und den entsprechenden Peptid-Organisator Einheiten erlaubt den direkten Vorschlag eines gemeinsamen Organisationsmodells. Wie in Abbildung 4.12 zu sehen, bilden sich, durch die Selbstorganisation des Peptidsegments in eine antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur, flache Kern-Schale Bänder mit einem  $\beta$ -Faltblattkern und einer P $n$ BA-Hülle (Abb. 4.12 a und a'). Auch in diesem Fall ist das  $\beta$ -Faltblatt verdrillt (Abb. 4.12 b,b'), was in einer helikalen Superstruktur resultiert (Abb. 4.12 c-e). Analog zu dem System **Ib-PBA2k** werden die Verformungen wiederum getrieben durch *i.* Dipolmoment Effekte, *ii.* die faziale Amphiphilie des

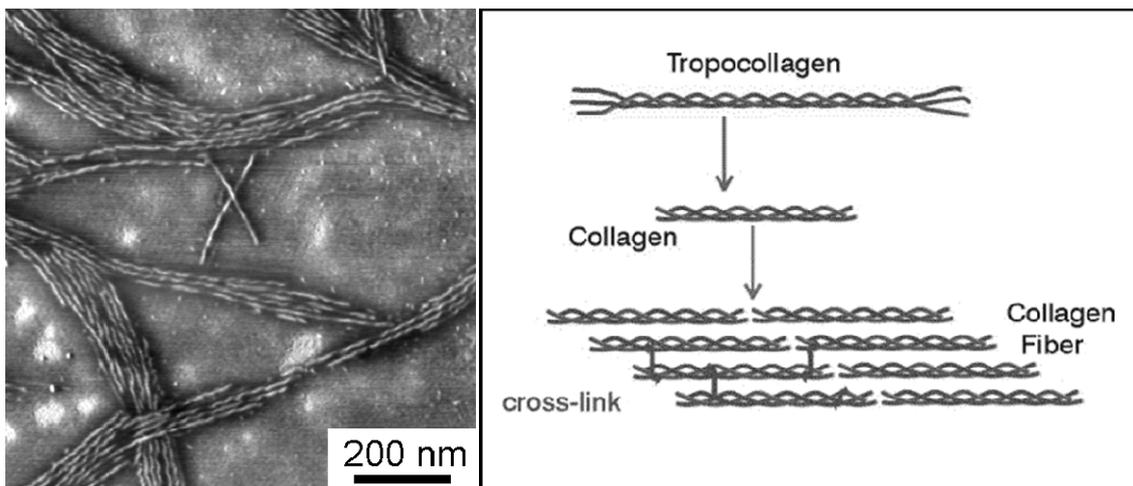
antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes und *iii.* wahrscheinlich auch durch sterische Abstoßung der benachbarten *PnBA*-Ketten. Die Links-Händigkeit ist in diesem Fall ebenfalls ein Resultat der Chiralität der Aminosäuren-Bausteine (L-Form).<sup>[11,135]</sup>



**Abb. 4.12:** Idealisiertes Organisationsmodell der peptidgeleiteten Mikrostrukturbildung, in dem die Peptidsegmente des Peptid-*PnBA* Konjugates ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt Band bilden, welches sich in eine links-händige helikale Überstruktur windet. (unverformtes Band mit einem planaren  $\beta$ -Faltblatt und einer *PnBA*-Schale (a Draufsicht; a' Frontansicht (Polymerketten entfernt)); Kern-Schale Band mit verdrehten  $\beta$ -Faltblatt Kern (b Draufsicht; b' Frontansicht (Polymerketten entfernt));  $\beta$ -Faltblatt Band des 11mer Oligopeptides,<sup>[11]</sup> mit gleichen Dreh- und Kippwinkel (c Seitenansicht, c' Frontansicht); Verdrehtes Kern-Schale Band entsprechend der Aggregate aus Peptid-Konjugat **Ib-PBA2k** (d Seitenansicht, d' Frontansicht) und verdrehtes Kern-Schale Band aus Konjugat **V-PBA8k** (e Seitenansicht, e' Frontansicht) (a-e: Positionen der  $\beta$ -Faltblätter wurden entsprechend der spezifischen Verformungswinkel  $\gamma_0$  and  $\gamma_v$  berechnet; a, b & d, e: der Polymerblock und die Peptidsegmente wurden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht maßstabgetreu gezeichnet; d, e: von den ersten 20 Konjugaten wurden die Polymerketten entfernt).<sup>[139]</sup>

Das vorgeschlagene Strukturmodell wird auch durch FT-IR Messungen an dünnen Filmen von **V-PBA8k** (eingetrocknet nach abgeschlossener Strukturbildung) bestätigt. Die Lage der Amid I Bande bei  $\nu_{\text{amide I}} = 1628 \text{ cm}^{-1}$  ist ein deutlicher Hinweis auf  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Abb. 4.10, schwarzes Spektrum). Das Peptid-Sekundärstrukturmotiv konnte zusätzlich direkt durch Elektronenbeugung (SAED-TEM) an den Mikrostrukturen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.16a). Es wurde ein Abstand von  $d \approx 4.8 \text{ \AA}$  gefunden, welcher typisch für den  $\beta$ -Strang Abstand in  $\beta$ -Faltblattstrukturen ist.<sup>[32]</sup>

Wie schon im Fall des niedermolekularen PnBA-Konjugates **Ib-PBA2k**, scheint auch die Bildung des Fasernetzwerkes aus den **V-PBA8k** Mikrostrukturen durch eine hierarchische Organisation der primären Faserstrukturen (Superhelices) gesteuert zu werden (Abb. 4.11a). Diese Bündelstrukturen entstehen wahrscheinlich durch schwache laterale Wechselwirkungen zwischen den Fasern. Genaue Untersuchungen mittels AFM-Phasenkontrastmikroskopie erlaubten Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Mechanismus. Durch die Verwendung einer hohen Dämpfung im AFM konnte aufgelöst werden, dass die Helices nicht verschlauft sind, sondern vielmehr parallel über Distanzen von mehreren Mikrometern laufen und sich in dichte Bündel packen (siehe Abb. 4.13 links). Dass dabei entstehende Interferenzmuster welches in den AFM-Messungen mit niedriger Dämpfung auftritt (Abb. 4.11), deutet auf eine klare axiale Korrelation der Superhelices in den Bündeln hin.



**Abb. 4.13:** links: AFM Aufnahme der Packung der individuellen Fibrillen, gebildet durch Selbstorganisation von **V-PBA8k** in Lösung, 12 Tage nach der Titration (1 mg/ml in Et<sub>2</sub>O/MeOH (70%) bei  $\text{pH}_{\text{app.}} = 6,0$ ; Phasen-Bild,  $z = 70^\circ$ , hohe Dämpfung); rechts: schematische Darstellung der Packung einzelner Collagen-Fibrillen zu Collagen-Fasern.<sup>[159]</sup>

Solche *In-Register* Packungen von Helices benötigen gut definierte, periodische auftretende Eigenschaften entlang der Helix-Achse. Diese könnten in diesem Fall aus der periodischen ‘‘Klebrigkeit‘‘, verursacht durch die PnBA-Bereiche und/oder aus periodisch auftretenden Dipolmomenten des  $\beta$ -Faltblatts resultieren. Die Generierung von solchen periodischen Eigenschaften entlang von Faserstrukturen stellt ein fundamentales Prinzip in der Natur dar, welches z.B. in Collagen Filamenten zu finden ist (Abb. 4.13 rechts).<sup>[160]</sup> Es ist bemerkenswert, dass dieses Prinzip durch die Selbstorganisation von synthetischen Superhelices imitiert werden kann.

Die statistische Analyse der AFM Aufnahmen (Abb. 4.11 und 4.13) sowie der TEM Messungen (Abb. 4.16) ermöglichten die Bestimmung der Strukturparameter der Superhelices. Die Parameter sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Um die Daten besser vergleichen zu können, enthält die Tabelle sowohl Strukturdaten der Superhelices von **Ib-PBA2k** als auch Daten des 11mer Oligopeptides ohne Polymerblock.<sup>[11]</sup>

**Tabelle 4.1:** Strukturparameter der helikalen Proto-Strukturen der Oligopeptide und Peptid-Polymer Konjugate.<sup>[139]</sup>

	11mer Peptid <sup>[11]</sup>	Ib-PBA2k	V-PBA8k	V-PBA14k	V-PBA38k
Höhe (AFM)	--	$2,9 \pm 0,5$ nm	$3,0 \pm 0,8$ nm	$3,8 \pm 0,8$ nm	$5,2 \pm 1,4$ nm
Breite (AFM)	--	$13 \pm 1$ nm	$15 \pm 3$ nm	$17,2 \pm 2,5$ nm	$28 \pm 5$ nm
Breite (TEM)	$\sim 10$ nm	$10 \pm 1$ nm	$13 \pm 2$ nm	$15 \pm 3$ nm	$30 \pm 5$ nm
Pitch-Höhe (AFM)	$30 \pm 15$ nm *	$37 \pm 2$ nm	$59 \pm 5$ nm		
Pitch-Winkel (AFM)	--	$48^\circ \pm 3^\circ$	$61^\circ \pm 5^\circ$		
max. Bandbreite **	--	$13,7 \pm 2$ nm	$25,8 \pm 3$ nm		
$\gamma_{\text{v bend}}$	$\sim 3^\circ$	$\sim 2,3^\circ$	$\sim 1,2^\circ$		
$\gamma_{\theta \text{ twist}}$	$\sim 3^\circ$	$\sim 1,9^\circ$	$\sim 2,2^\circ$		

\*)aus TEM Aufnahmen bestimmt; \*\*)  $w_{\text{max}} = h_{\text{pitch}} \times \sin \alpha_{\text{pitch}}$  (mit  $w_{\text{max}}$  als maximale Bandbreite in der helikalen Superstruktur,  $\alpha_{\text{pitch}}$  als Pitch-Winkel und  $h_{\text{pitch}}$  als Pitch-Höhe).

#### 4.2.2 Vergleich der Strukturen in Abhängigkeit der PnBA-Blocklänge

Beim Vergleich der helikalen Strukturen von **V-PBA8k** (86 wt.% PnBA) mit denen von **Ib-PBA2k** (61 wt.% PnBA) fällt wiederum eine starke Analogie auf. Beide Superstrukturen scheinen relativ weich zu sein, wie aus den Querschnitts-Längenverhältnissen von  $A_R = 3,4$  und  $4,3$  ( $A_R = \text{Breite}_{\text{TEM}} / \text{Breite}_{\text{AFM}}$ ) deutlich wird.

Es ist zu erwarten, dass **V-PBA8k** gegenüber **Ib-PBA2k**, Strukturen mit größerer Breite und Höhe bildet. Die Zunahme dieser Dimensionen ist allerdings nicht dramatisch (siehe Tabelle 4.1). Eine helikale Struktur ist theoretisch am einfachsten in Längsrichtung verformbar. Dies konnte auch durch deutliche Unterschiede in Bezug auf Pitch-Höhe und Pitch-Winkel belegt werden. So stieg die Pitch-Höhe der Strukturen von  $\approx 30$  nm (11mer Oligopeptid ohne Polymer<sup>[11]</sup>) auf  $\approx 37$  nm (**Ib-PBA2k**) bzw.  $\approx 59$  nm (**V-PBA8k**). Zusätzlich wurde ein Anstieg des Pitch-Winkels von  $\approx 48^\circ$  (**Ib-PBA2k**) auf  $\approx 61^\circ$  (**V-PBA8k**) beobachtet (siehe Tabelle 4.1). Diese Ergebnisse können durch ein einfaches Packungsmodell eines Bandes erklärt werden. Der Raumbedarf der Bandstrukturen, die sich in die helikale Struktur winden, steigt vom Oligopeptid zum Konjugat **Ib-PBA2k** und zum System **V-PBA8k** an. Dies führt zu der beobachteten Streckung der Helixstrukturen.

Unter der Annahme, dass das Peptid eine gestreckte  $\beta$ -Strang Konformation in einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt annimmt und das PnBA ein statistisches Knäuel bildet, konnte die theoretische Breite des Peptid-Polymer-Bandes berechnet werden.

Während das 11mer Oligopeptid ein Band mit  $\approx 4$  nm Breite bilden sollte, ist für **Ib-PBA2k** ein  $\approx 7$  nm und **V-PBA8k** ein etwa 10 nm breites Band zu erwarten. Diese Werte wurden mit den maximalen Bandbreiten, berechnet aus den Pitch-Höhen und Pitch-Winkeln der gefundenen Superhelices, verglichen (Tabelle 4.1). Es liegt nahe, dass sterische Abstoßungskräfte zwischen den Bändern nicht als beeinflussender Faktor für die Regulierung der Strukturdimensionen der Helices gesehen werden können. Dies macht erneut die Dominanz der Peptidorganisation ( $\beta$ -Faltblattbildung) auf den Bildungsprozeß der definierten Mikrostrukturen deutlich.

Im Folgenden wurde untersucht inwiefern die sterischen Wechselwirkungen der dicht gepackten, benachbarten Polymerketten die Verdrillung der  $\beta$ -Faltblatt Bandstruktur beeinflussen. Anhand des Strukturmodells, das ein eng gewundenes  $\beta$ -Faltblatt Band beschreibt, können die mittleren Dreh- und Kippwinkel berechnet werden (siehe Abb. 4.6). Tabelle 4.1 fasst die, aus den Superhelices von **Ib-PBA2k** und **V-PBA8k** bestimmten Werte für  $\gamma_\theta$  (Drehwinkel) und  $\gamma_\nu$  (Kippwinkel) zusammen. Auch im Fall der höhermolekularen Peptid-PnBA Konjugate bilden sich in organischen Lösungsmitteln steifere Bandstrukturen im Vergleich zum Modell 11mer Oligopeptid in wässriger Lösung (siehe Abb. 4.12, vereinfachte Visualisierung der Strukturen). Wie zuvor beschrieben, liegt dies an den größeren Bindungsenergiebeiträgen der Wasserstoffbrückenbindungen in organischen

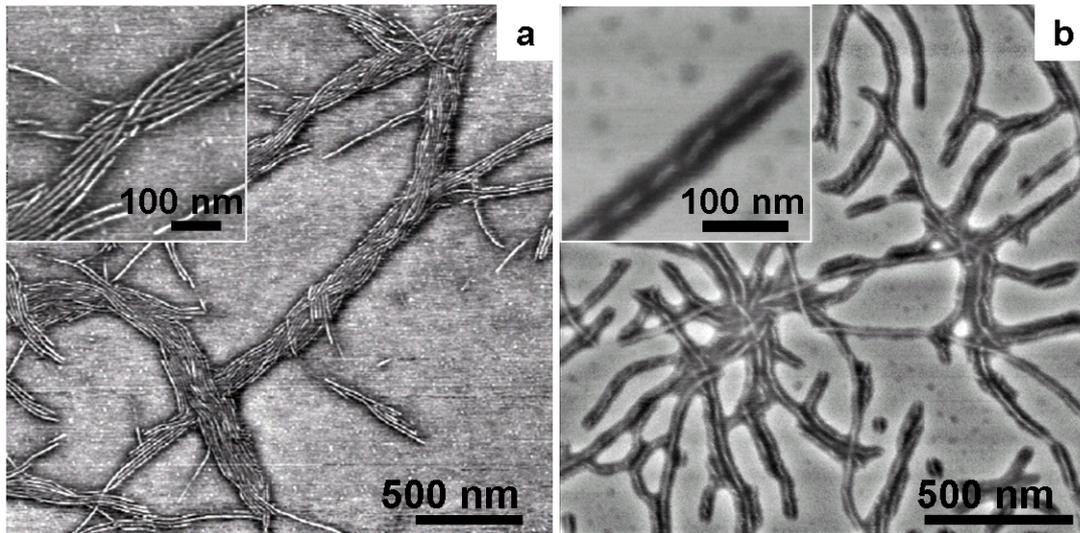
Lösungsmitteln verglichen mit Wasser. Während der Anstieg des Molekulargewichts des *PnBA*-Blocks von etwa 2k auf 8k nur einen geringen Effekt auf die Verdrillung des  $\beta$ -Faltblatts hat (Tabelle 4.1), nimmt der Kippwinkel deutlich von ca.  $2,3^\circ$  auf  $1,2^\circ$  ab. Aufgrund der geringeren Verformung entsteht eine Superhelix mit kleinerer Krümmung und größerem Durchmesser. Dies lässt sich gut mit dem vereinfachten Modell einer verformten Spiralfeder beschreiben, wobei die elastische Verformungsenergie aus dem sterischen Druck zwischen den dicht gepackten *PnBA*-Knäueln im  $\beta$ -Faltblatt resultiert.

Eine wichtige Grundlage des Ansatzes der peptidgeleiteten Organisation synthetischer Polymere besteht darin, dass das Peptidsegment des Peptid-Polymer Konjugates den Mikrostrukturbildungsprozess steuert.<sup>[84]</sup> Dennoch ist anzunehmen, dass mit steigendem Molekulargewicht das statistische Knäuel des synthetischen Polymerblocks den Organisationsprozess beeinflussen kann. Aus diesem Grund ist es interessant, den Einfluss des Molekulargewichtes des *PnBA*-Blocks auf den Selbstorganisationsprozess der Polymer-Peptid Konjugate zu untersuchen. Außerdem ist das Peptidsegment der deutlich teurere Bestandteil des Konjugates. Eine Verringerung des Peptidanteils, bei gleichzeitiger Erhaltung der strukturbildenden Funktion, würde daher das Anwendungspotential dieser Materialien stark erhöhen.

Für die Strukturbildung der Konjugate **V-PBA14k** und **V-PBA38k** mit *PnBA*-Blöcken von  $M_n \approx 14000$  und  $38000$  wurden vergleichbare Bedingungen, wie schon für **V-PBA8k** beschrieben, angewendet. Der Schaltvorgang wurde durch das Einstellen des apparenten pH-Wertes in verdünnten Lösungen von **IV-PBA14k** und **IV-PBA38k** auf etwa 6,0 ausgelöst. Dadurch sollte die  $O \rightarrow N$  Acyl Umlagerung und die Bildung der aktiven Aggregatorspezies **V-PBA14k** und **V-PBA38k** mit vergleichbarer Geschwindigkeit wie beim **V-PBA8k** System ablaufen. Während die Mikrostrukturbildung von **V-PBA14k** sich noch in vergleichbaren Zeiträumen wie im Fall von **V-PBA8k** bewegt, verlief die Selbstorganisation des höhermolekularen Analogon **V-PBA38k** deutlich langsamer.

Für das **V-PBA14k** System konnten die ersten faserartigen Strukturen im AFM nach 2 Tagen gefunden werden. AFM Messungen nach 16 Tagen zeigten ausgedehnte, fibrilläre Strukturen (Abb. 4.14 a). Dagegen wurden für das **V-PBA38k** System erst nach etwa 50 Tagen bei Raumtemperatur im AFM Anzeichen für eine Faserbildung gefunden. Erst nach etwa 80 Tagen konnten deutlich Faserstrukturen nachgewiesen werden (Abb. 4.14 b).

In Analogie zu den helikalen Superstrukturen von **Ib-PBA2k** und **V-PBA8k** konnten auch für die hochmolekularen Konjugate Hinweise für das Vorliegen einer helikalen Feinstruktur gefunden werden, selbst für die Aggregate aus **V-PBA38k**. Wie in Abbildung 4.14 b (Einschub) zu sehen ist, erlaubt die Aufnahme des AFM Phasen-Bildes die Visualisierung eines periodischen Musters entlang der Faserachse.

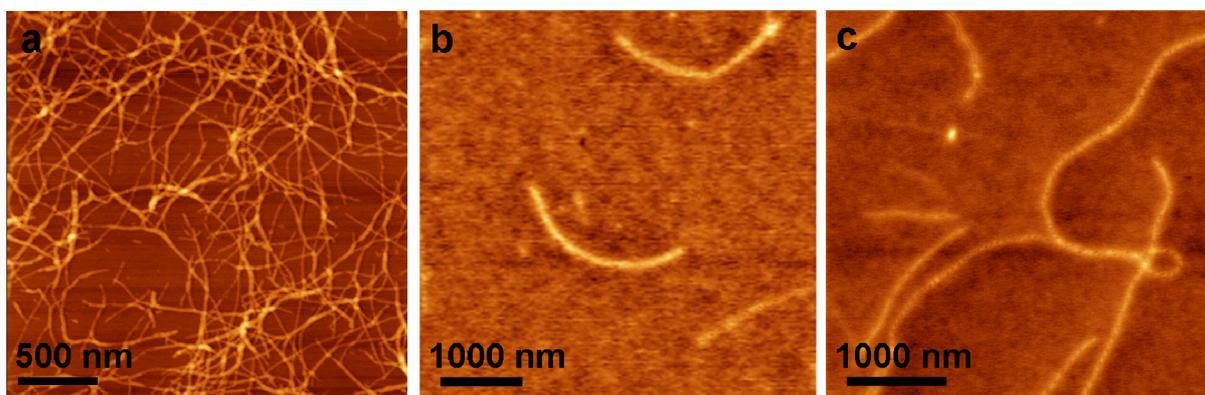


**Abb. 4.14:** AFM Aufnahmen der Strukturen, entstanden durch Selbstorganisation von **IV-PBA14k** (a) und **IV-PBA38k** (b) in Lösung, 16 d und 80 d nach Start des Schaltprozesses ( $\text{Et}_2\text{O} : \text{MeOH} = 70:30 \text{ vol.}\%$ ,  $c = 1 \text{ mg/ml}$ ; Phasen-Bilder  $z = 50^\circ$  (a) und  $z = 35^\circ$  (b)).

Wenngleich auch keine präzisen kinetischen Untersuchungen durchgeführt wurden, ist das Auftreten von anisotropen Mikrostrukturen deutlich abhängig vom Molekulargewicht des *pnBA*-Blocks. Während **Ib-PBA2k** innerhalb von 2-3 Stunden die ersten anisotropen Strukturen bildet, benötigt **V-PBA8k**  $\approx 2$  Tage, **V-PBA14k**  $\approx 16$  Tage und das **V-PBA38k** Konjugat sogar mehr als 2 Monate für die Selbstorganisation unter vergleichbaren Bedingungen. Dies konnte durchaus erwartet werden, da die Konzentration bei allen Systemen konstant gehalten wurde ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ). Die Geschwindigkeit des Strukturbildungsprozesses ist abhängig vom Volumenbruch des Peptidsegments ( $\phi^2$ ). Folglich verlangsamt sich der Organisationsprozess der Konjugate mit steigendem Molekulargewicht des *PnBA*-Blocks, da die molare Konzentration von  $3,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol/ml}$  (**Ib-PBA2k**) auf  $2,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol/ml}$  (**V-PBA38k**) absinkt. Des Weiteren spielen noch sekundäre Effekte, wie die abnehmende Polymer Endgruppen Reaktivität und Zugänglichkeit eine Rolle.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Strukturbildung von **V-PBA38k** bei einer molaren Konzentration ( $c = 5,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol/ml}$ ) untersucht, die vergleichbar zur verwendeten

Konzentration von **Ib-PBA2k** war. Wie erwartet verlief der Strukturbildungsprozess deutlich schneller als bei der zuvor verwendeten Konzentration (1 mg/ml). So konnten die ersten anisotropen Strukturen im AFM bereits nach ca. 2 Tagen beobachtet werden (siehe Abb. 4.15b). Im Kontrast dazu ist der Aggregationsprozess nach gleicher Zeit und bei etwa gleicher Konzentration im Fall des kleinsten PnBA-Konjugats (**Ib-PBA2k**) bereits wesentlich weiter fortgeschritten (Abb. 4.15a; Gelbildung). Nach 4-7 Tagen wurden für **V-PBA38k** zwar Faseraggregate mit vergleichbaren Längen (bis zu 4  $\mu\text{m}$ ) im AFM beobachtet (Abb. 4.15c), eine Gelbildung trat allerdings nicht auf.

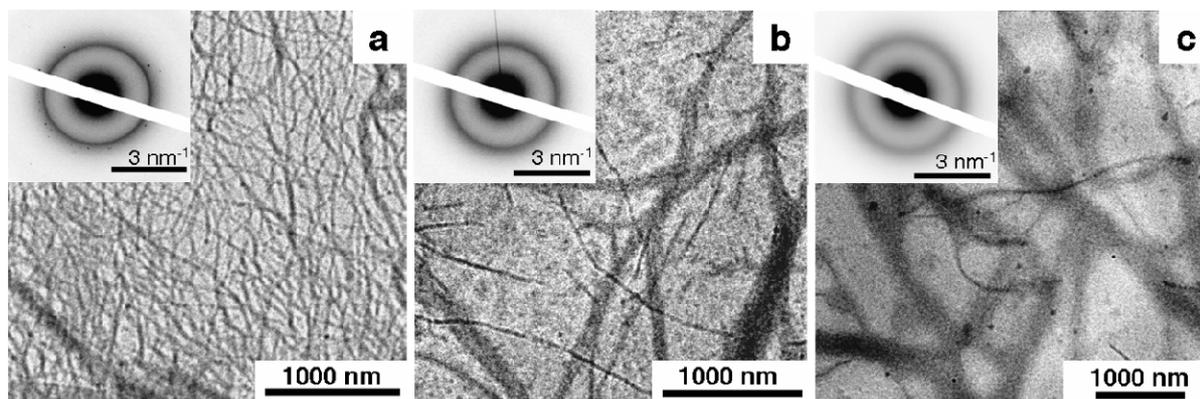


**Abb. 4.15:** AFM Aufnahmen von **Ib-PBA2k** (a) und **V-PBA38k** (b,c) bei gleicher molarer Konzentration 2 Tage (a, b) und 4 Tage (c) nach Start des Schaltprozesses ( $\text{Et}_2\text{O} : \text{MeOH} = 85:15 \text{ vol.}\%$  (a) bzw.  $70:30 \text{ vol.}\%$  (b,c),  $c = 5,1 \text{ mol/ml}$ , gespinncoated auf Mica; Höhenbilder  $z = 12 \text{ nm}$  (a),  $z = 5 \text{ nm}$  (b) und  $z = 8 \text{ nm}$  (c)).

Die Faserstrukturen in Abb. 4.15 b,c erscheinen breiter (ca. 60-80 nm) im Vergleich zu den Strukturen aus verdünnterer Lösung (ca. 50 nm, siehe Abb. 4.14 b). Dies resultiert vermutlich aus der Präparation der Probe. Beim Spincoaten einer Lösung mit höherer Konzentration wird die Micaoberfläche mit Unimeren abgesättigt. Die Faserstrukturen liegen auf bzw. in diesem Film aus Unimeren. Dadurch wird der Übergang von der Faser zur Umgebung verschmiert und die Strukturen erscheinen breiter.

Trotz der unterschiedlich schnellen Aggregationsprozesse, bilden letztendlich alle PnBA-*block-(TV)<sub>5</sub>* Konjugate fibrilläre Mikrostrukturen. Wie zu erwarten, stiegen die Querschnittsdimensionen im Einklang mit den Molekulargewichten des PnBA-Blocks von **V-PBA8k** zu **V-PBA14k** und zu **V-PBA38k** (Tabelle 4.1). Die große Analogie der resultierenden Strukturen zu verdrehten Fibrillen von  $\beta$ -Faltblatt-bildenden Peptiden macht nochmals deutlich, dass die Mikrostrukturbildung durch die Organisation des Peptidsegments gesteuert wird. Dies konnte auch für die beiden hochmolekularen Konjugate (**V-PBA14k** und

**V-PBA38k**) durch Spektroskopie- und Streumethoden nachgewiesen werden. FT-IR Spektroskopie bestätigte durch die Lage der Amid I Schwingungsbande in beiden Fällen das Vorhandensein von ausgedehnten  $\beta$ -Faltblattstrukturen und SAED-TEM Messungen der Faserstrukturen zeigten einen typischen  $\beta$ -Strang Abstand von 4.8 Å (Abb. 4.16).



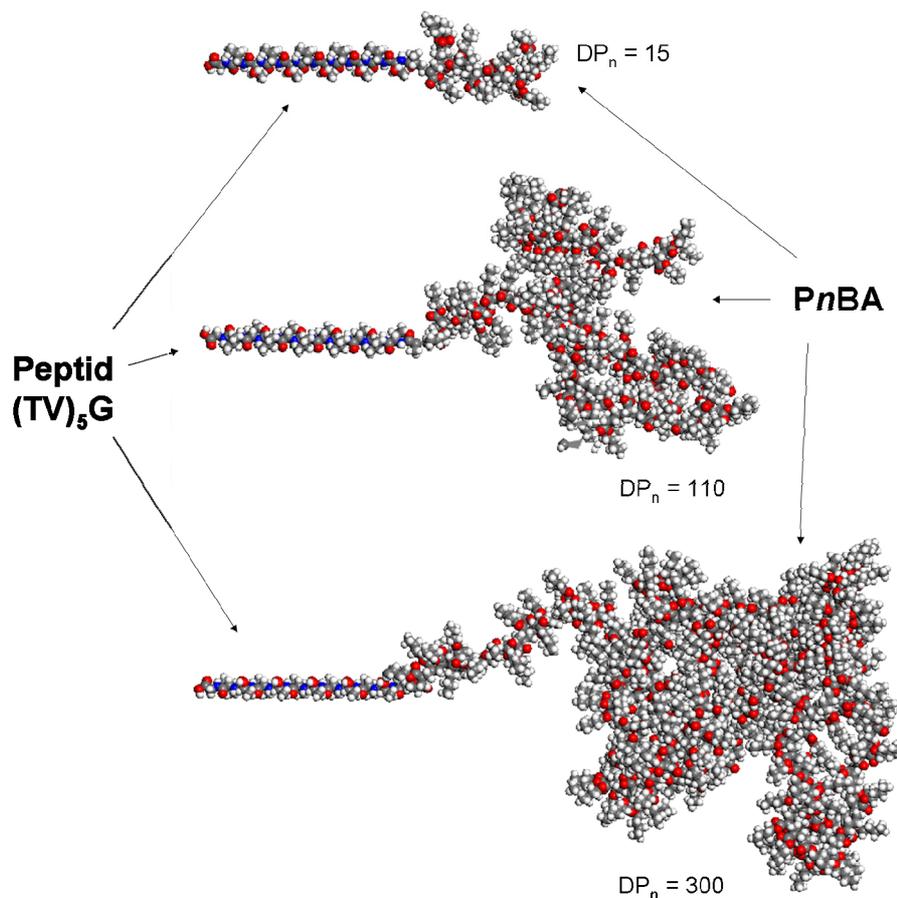
**Abb. 4.16:** TEM Aufnahmen von **V-PBA8k** (12 Tage nach Titration) (a), **V-PBA14k** (15 Tage nach Titration) (b) und **V-PBA38k** (80 Tage nach Titration; unbehandelt) (c) jeweils mit SAED von einer repräsentativen Stelle als Einschub.

Die fibrillären Strukturen von **V-PBA14k** und **V-PBA38k** wiesen also vergleichbare Dimensionen mit z. B. **V-PBA8k** Fibrillen auf, bildeten ausgedehnte  $\beta$ -Faltblatt Bänder und zeigten deutliche Hinweise auf eine helikale Feinstruktur zeigen. Daher kann auch für die höhermolekularen Konjugate von einem analogen Aggregationsmodell ausgegangen werden. Es ist nicht sonderlich überraschend, dass bei dem hohen Anteil an weichem PnBA in **V-PBA14k** (91.5 wt.%) und **V-PBA38k** (96.5 wt.%) eine genaue Visualisierung der verformten Kern-Schale Bandstrukturen schwierig ist.

Es konnte also für alle synthetisierten (TV)<sub>5</sub>-PnBA Systeme die Bildung faserartiger Strukturen beobachtet werden. Dabei wurden deutliche Hinweisen darauf gefunden, dass die Organisation dieser synthetischen Polymermaterialien durch den Peptidblock initiiert (Switch-Segmente) und gesteuert ( $\beta$ -Faltblattbildung) werden konnte.

Um die relativen Größenverhältnisse von Peptid- und PnBA-Block deutlich zu machen, wurden die Molekülstrukturen der (TV)<sub>5</sub>G-PnBA Konjugate am Computer simuliert (MS Modelling 3.1). Abbildung 4.17 zeigt die Molekülstrukturen des kleinsten Peptid Konjugats ( $DP_n = 15$ ) sowie der zwei hochmolekularen Konjugate mit  $DP_n = 110$  und  $DP_n = 300$ . Der Peptidblock ist dabei in der gestreckten *all-trans*  $\beta$ -Strang Konformation dargestellt. Der Vergleich macht deutlich, dass das kleinere Polymersegment ( $DP_n=15$ ) die peptidgeleitete

Strukturbildung wahrscheinlich sterisch kaum beeinflussen wird. Der Polymerblock mit 110 Wiederholungseinheiten hingegen scheint groß genug, um die Geschwindigkeit der Aggregation durch Herabsetzung der Zugänglichkeit der Peptidstränge, senken zu können. Dieser Effekt ist für das Konjugat mit  $DP_n = 300$  (**V-PBA38k**) noch viel stärker einzuschätzen. Dies konnte auch, wie oben beschrieben, durch eine langsamere Strukturbildung bei gleicher Konzentration bestätigt werden (siehe Abb. 4.15).



**Abb. 4.17:** Molekülstrukturen von drei Konjugaten, jeweils bestehend aus einem (TV)<sub>5</sub>G-Peptidblock in der *all-trans*  $\beta$ -Strang Konformation und einem PnBA-Block. Das obere Konjugat besitzt ein Polymersegment mit  $DP_n = 15$  (entspricht **Ib-PBA2k**). Das mittlere Molekül mit  $DP_{n, PnBA} = 110$  entspricht dem Konjugat **V-PBA14k**, und das untere Molekül mit 300 *nBA* Einheiten entspricht dem Konjugat **V-PBA38k**. Die Molekülstrukturen wurden mit MS-Modeling erzeugt (Accelrys Software Inc., Version 3.1).

Es ist daher umso beachtenswerter, dass selbst bei 8,5 wt.% (**V-PBA14k**) und 3,5 wt.% Peptidanteil (**V-PBA38k**) das Peptidsegment immer noch in der Lage ist, den Strukturbildungsprozess des Systems zu steuern. Die Ergebnisse machen deutlich, dass ein Segment aus nur 11 Aminosäuren ausreicht, um 300 *nBA* Einheiten in komplexe, definierte Mikrostrukturen zu organisieren. In diesen Konjugaten kann der Peptidblock beinahe schon als funktionelle Polymer Endgruppe angesehen werden. Dies belegt das enorme Potential der Klasse der sequenzdefinierten Oligopeptide für das rationale Design von synthetischen Polymermaterialien mit kontrollierbarer Mikrostruktur.

## Kapitel 5

### Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von Konjugaten aus funktionalen, sequenzdefinierten Peptidsegmenten und synthetischen Polymeren. Diese Materialklasse vereint interessante strukturelle und funktionelle Eigenschaften beider Komponenten. Zudem können die gewünschten Funktionalitäten der Konjugate durch gezielte Veränderungen am Peptidsegment sehr genau eingestellt werden. Das macht diese Systeme für verschiedenste Anwendungsbereiche interessant, wie z. B. für medizinische Anwendungen (Wirkstoffträger-Systeme) oder für die Untersuchung von Selbstorganisationsprozessen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das biomimetische Konzept der peptidgeleiteten Strukturbildung synthetischer Polymere auch in organischen Lösungsmitteln angewendet werden kann. Dies ermöglicht die Verwendung einer Vielzahl synthetischer Polymere mit verschiedensten Funktionalitäten und mechanischen Eigenschaften zur Herstellung strukturierter Polymermaterialien. Somit konnte eine deutliche Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten zu den vorherigen Arbeiten in Wasser erzielt werden.

Als Peptid-Organisatoreinheit wurde eine lineare (Thr-Val)<sub>5</sub>-Oligopeptidsequenz ausgewählt, von der bekannt ist, dass sie ein sehr hohes Potential zur Bildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen besitzt. Das Peptidsegment wurde durch eine semi-automatisierte, festphasengebundene Peptidsynthese aufgebaut. Aufgrund der bekannten Schwierigkeiten bei der Synthese von  $\beta$ -Faltblatt-bildenden Peptiden wurden temporäre strukturbrechende Elemente (Switch-Segmente) in die Sequenz eingebaut. Diese Einheiten können durch einen pH-abhängigen Schaltvorgang in die native Peptidform überführt werden. Die Integration solcher Segmente gestattete aber nicht nur die Synthese der Peptidblöcke in einer guten Reinheit. Sie erlaubten vielmehr die gezielte Initiierung und gute Kontrolle der Strukturbildung der Peptid-Polymer Konjugate. Die Reduzierung der Anzahl der Switch-Segmente von 4 auf 1 erlaubte eine wesentlich vereinfachte Synthese und die Generierung eines binären Schaltvorgangs. Es konnte gezeigt werden, dass ein Switch-Segment ausreicht, um die Aggregationstendenz des Peptidorganisations effektiv zu unterdrücken.

Die kovalente Anbindung des synthetischen Polymerblocks (Poly-*n*-Butylacrylat) erfolgte über zwei unterschiedliche Synthesestrategien. Der Ansatz der terminalen Kupplungsreaktion

eines säure-endfunktionalisierten *PnBA*-Blocks an das festphasengebundene Peptidsegment hat zwar Vorteile im Hinblick auf Reinigung und Charakterisierung des entsprechenden Konjugats. Er ist jedoch limitiert auf kleine Polymersegmente ( $M_n < 5000$ ). Um den Anteil an Peptidorganisator im Konjugat zu verringern, musste die Länge des synthetischen Polymers stark erhöht werden. Die Synthese solcher Konjugate erfolgte erstmals durch RAFT Polymerisation, ausgehend von einem  $(TV)_5$ -Makrokettenträger (Peptid-Makro-CTA). Dabei konnte der Ansatz der festphasengebundenen Peptid-Makro-CTA Synthese erfolgreich von einfachen Modell-Peptiden auf funktionale Peptidsequenzen mit temporären Switch-Ester Defektstellen erweitert werden.

Mit Hilfe der Kupplungs- und der Polymerisationsstrategie konnte so ein Satz aus vier gut definierten *PnBA*- $(TV)_5$  Konjugaten mit unterschiedlich großen *PnBA* Blocksegmenten ( $M_{n, \text{PnBA}} = 2000 - 38000$ ,  $M_w/M_n = 1,2-1,3$ ) synthetisiert und im Hinblick auf die Strukturbildungseigenschaften analysiert werden.

Ein neuartiges Peptid-Makro-CTA konnte durch die einfache Anbindung eines säure-funktionalisierten Trithiocarbonat-CTAs an eine biofunktionale GGRGDS-Peptidsequenz durch eine festphasengebundene Synthese erzeugt werden. Dieser Ansatz ermöglicht durch die Automatisierbarkeit einen einfachen Zugang zu funktionalen Peptid-Polymerkonjugaten. Anhand verschiedenster Monomere (*nBA*, NIPAM, OEGA) konnte eine erfolgreiche Kontrolle über die Polymerisation durch das Makro-CTA demonstriert werden.

Die Untersuchung der peptidgeleiteten Mikrostrukturbildung der *PnBA*- $(TV)_5$  Konjugate erfolgte in den organischen Lösungsmitteln Diethylether und Methanol. Durch CD-, IR- und AFM-Messungen konnte gezeigt werden, dass zwei bzw. eine Switch-Einheit im  $(TV)_5$ -Segment in der Lage waren, die Aggregation der Peptidstränge zu unterdrücken. Erst die Zugabe von Base induzierte den Schaltprozess in das native Peptidsegment. Die damit einhergehende Wiederherstellung der Aggregationstendenz führte zur Initiierung des Selbstorganisationsprozesses in  $\beta$ -Faltblattstrukturen, was durch CD- und IR-Messungen bestätigt wurde. Außerdem konnten im Fall von allen vier Konjugaten im AFM faserartige Mikrostrukturen mit deutlichen Hinweisen auf eine links-händige helikale Superstruktur beobachtet werden. Das Vorliegen von  $\beta$ -Faltblattstrukturen in diesen Aggregaten konnte durch IR-Spektroskopie und Elektronenbeugung (SAED-TEM) nachgewiesen werden. Die aus TEM- und AFM-Aufnahmen bestimmten Dimensionen der faserartigen Aggregate wurden mit der Größe des *PnBA*-Blocks des entsprechenden Konjugats korreliert und

erlaubten den Vorschlag eines Strukturmodells. Dabei bilden die Konjugate, getrieben durch die  $\beta$ -Faltblattbildung der Peptidsegmente, ein 2-dimensionales Kern-Schale Band mit einer PnBA-Schale und einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt im Kern. Letzteres verdrillt sich in eine helikale Superstruktur mit linksgängiger Windung. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese Protostrukturen durch schwache laterale Wechselwirkungen weiter organisieren, in sogenannte *in-register* Packungen unter Beibehaltung der helikalen Überstruktur. Dies führte im Fall des kleinsten Peptid-PnBA Systems ab Konzentrationen von 2 g/l zur Bildung eines schwachen Organo-Gels.

Die Ergebnisse machten deutlich, dass die peptidgeleitete Organisation synthetischer Polymere auch in organischen Lösungsmitteln angewendet werden kann. Erstaunlicherweise waren selbst Systeme mit nur 3,5 wt.% Peptidanteil im Konjugat in der Lage, durch Organisation der Peptidsegmente komplexe, anisotrope Nanostrukturen zu bilden. Diese Strukturen können durchaus als "Nanofedern", d.h. als Funktionselemente angesehen werden. Dies beweist, dass das Prinzip von "Struktur bedingter Funktionalität", wie es von natürlichen Systemen bekannt ist, auch auf synthetische Polymer-Peptidsysteme übertragen werden kann. Diese Strukturen sollten daher interessante mikromechanische Eigenschaften besitzen. Erste Rheologie Untersuchungen sind bereits in Planung. Die helikalen Kern-Schale Strukturen bieten noch eine Fülle weiterer interessanter Anwendungs- und Interaktionsmöglichkeiten. Beispielsweise ist, durch die funktionalen Oberflächen, das Einbringen von anderen Materialien in das Innere der Helix denkbar. Des Weiteren könnten z. B. "Nanodrähte" durch die Anbindung von elektrisch leitfähigen Polymeren erzeugt werden. Diese Beispiele machen das große Anwendungspotential dieser synthetischen Polymermaterialien mit definierter Mikrostruktur deutlich.



## Kapitel 6

### Anhang

#### 6.1 Experimenteller Teil

##### *Verwendete Chemikalien*

1-Benzotriazoloxyltris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP; Nova Biochem), *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC; Fluka) 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU; Iris Biotech), das Pseudoprolin Fmoc-Val-Thr( $\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro) OH (NovaBiochem), Fmoc-(4-nitro)phenylalanin (Fmoc-nPhe OH; NovaBiochem) und alle weiteren Aminosäuren (AS; Iris Biotech) wurden bei -18 °C aufbewahrt und ohne Aufreinigung direkt verwendet. Bei allen verwendeten AS handelte es sich um L-Aminosäuren. Diisopropylethylamin (DIPEA; Acros) wurde destilliert und bis zum Einsatz, vor Licht geschützt, bei 4 °C aufbewahrt. Kupfer(I)bromid (CuBr; Aldrich, 98%) wurde nach Standardbedingungen aufgereinigt.<sup>[161]</sup> Piperidin (Acros), 1-Methyl-Imidazol (NMI; Fluka, 99%), Oligo(ethylenglycol)acrylat (OEGA;  $M_{n,\text{PEO}} \approx 454$ , Aldrich), Dodecanthiol (Alfa Aesar, 98%), Methyltrioctylammoniumchlorid (Aliquot 336; Fluka, >97%) und Trifluorethanol (TFE; Fluka, 99%) wurden ohne weitere Reinigung direkt verwendet. *N*-Isopropylacrylamid (NIPAM; Acros, 99%) wurde vor der Nutzung aus *n*-Hexan umkristallisiert. Tetrahydrofuran (THF) wurde vor der Verwendung über Natrium/Benzophenon getrocknet und destilliert. Die verwendeten Harze (Polystyrol-2-Chlortritylchlorid (1,56 mmol/g; Iris Biotech), Polystyrol-2-Aminoethanol-2-Chlortrityl (0,74 mmol/g, Iris Biotech) und Tentagel-S-Chlortrityl-Glycin (RAPP Polymere; 0,25 mmol/g)) wurden bei -18 °C aufbewahrt. Als Standardlösungsmittel für die Peptidsynthese wurde *N*-Methylpyrrolidon (NMP; Iris Biotech) verwendet, das vorher über Aluminiumoxid sowie Kieselgel filtriert wurde. 2-Brom-Propionsäure (Aldrich, 99+%), *n*-Butylacrylat (Aldrich, 99+%), Dichlormethan (DCM; Iris Biotech), *N,N*-Dimethylformamid (DMF; Aldrich), Trifluoressigsäure (TFA; Acros) und Pentamethyldiethylentriamin (PMDETA; Aldrich, 99%) wurden jeweils vor der Verwendung destilliert. Alle anderen Reagenzien wurden von Aldrich bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

### 6.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

#### **AAV 1) Peptid-Synthese**

Die Festphasen-gebundene Peptidsynthese erfolgte nach Standard Fmoc-Chemie (*FastMoc<sup>TM</sup>*)<sup>[77]</sup> Protokollen in einem Peptidsyntheseautomaten der Firma Applied Biosystems (Synthesizer, ABI 433A). Als Schutzgruppe der  $\alpha$ -Aminogruppen der Aminosäuren diente die Fmoc-Gruppe (9-Fluorenylmethoxycarbonyl). Sie wird im Basischen durch Piperidin abgespalten. Im darauf folgenden Syntheseschritt wird die über HOBt/HBTU aktivierte Aminosäure an den nun ungeschützten Amintertminus gekuppelt. Die festphasen-gebundene Peptidsynthese besteht folglich aus alternierender Fmoc-Abspaltung und anschließender Kupplung der aktivierten Carboxylgruppe an die zuletzt gekuppelte Aminosäure. Das Peptid wächst während der Synthese vom C-Terminus in Richtung N-Terminus. Ein Kupplungszyklus unter Standard-Bedingungen dauert 44 Minuten.

<u>Operation und Reagenzien</u>	<u>Zeit (min)</u>
Fmoc-Abspaltung mit 20% Piperidin in NMP	6
Waschen mit NMP	6
Aktivierung der Aminosäure (HOBt/HBTU)	7
Aktivierung mit DIPEA	5
<u>Kupplung</u>	<u>20</u>
<u>Gesamt</u>	<u>44</u>

#### **AAV 2) Synthese der Switch-Ester Segmente**

Der Aufbau einer Esterbindung zwischen einem harzgebundenen, *t*Boc-geschützten Thr und einem Fmoc-Val erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von *Beyermann et al.*<sup>[13]</sup>.

Nachdem das *t*Boc-Thr OH nach Standard-Kupplungsbedingungen (AAV1) in die Sequenz eingebaut, und die Vollständigkeit der Kupplung durch einen Kaisertest (AAV5) überprüft wurde, erfolgte ein Transfer des Harzes in einen Glasreaktor. Dort wurde die Kupplung des Fmoc-Val OH an die ungeschützte  $\beta$ -Hydroxy-Seitenkettenfunktionalität des Threonins durchgeführt. Nach Überführung des Harzes in den Glasreaktor und Quellung in einem Lösungsmittelgemisch aus DCM/DMF (4:1 v/v), wurde Fmoc-Val in zehnfachem Überschuss zugesetzt. Die Aktivierung der Säurefunktion erfolgte jeweils mit DIC (1 *eq.*) und 1-Methyl-Imidazol (NMI; 0,75 *eq.* bezogen auf Fmoc-Val). Dazu wurde Fmoc-Valin in DCM/DMF gelöst und eine Minute voraktiviert. Die Kupplungszeit im Glasreaktor betrug 2 Stunden. Die

Kupplung wurde mindestens einmal wiederholt. Nach den ersten zwei Kupplungen und anschließend nach jeder weiteren Kupplung wurde der Umsatz der Veresterung durch einen analytischen Fmoc-Test (AAV6) bestimmt. Die Kupplung wurde wiederholt, bis ein Umsatz von mindestens 95% erreicht war. Zur Vermeidung von Fehlsequenzen wurden nicht veresterte Hydroxygruppen durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und NMI gecappt. Zur Ankupplung weiterer Standard-AS wurde das Harz anschließend wieder in den Reaktor des Peptidsyntheseautomaten überführt.

### ***AAV 3) Reduzierung des Beladungsgrades eines Harzes***

Die Synthese von schwierigen Sequenzen kann durch die Verwendung von niedrig beladenen Harzen teilweise verbessert werden (siehe Kapitel 2: Grundlagen). Aus diesem Grund wurden teilweise die Beladungsgrade der eingesetzten Harze gesenkt. Durch den Einsatz eines Gemisches aus  $x\%$  Boc-Glycin und  $100-x\%$  Fmoc-Glycin als erste zu kuppelnde Aminosäure kann der Beladungsgrad reduziert werden. Der Anteil an Fmoc-Glycin ist entscheidend, da, aufgrund der verwendeten Fmoc-Chemie, nur an dieser Aminosäure weitere Kupplungen zum Aufbau der Sequenz durchgeführt werden können. Der genaue Beladungsgrad wurde nach der ersten Kupplung durch einen analytischen Fmoc-Test (AAV6) bestimmt.

Bsp.: Mit einem Gemisch aus 65% Boc-Glycin / 35% Fmoc-Glycin wurde der Beladungsgrad des 2-Aminoethanol-2-Chlortritylharzes von 0,74 auf 0,25 mmol/g gesenkt.

### ***AAV 4) Abspaltung vom Harz***

Nach abgeschlossener Festphasensynthese wurde das Produkt durch Einwirken einer Abspalllösung vom Harz getrennt. Dabei wurde zwischen zwei Möglichkeiten gewählt:

#### ***a) Seitenkettenschutzgruppen verbleiben am Peptid***

Dazu wurden 10 ml Abspalllösung (20% TFE in DCM (v/v)) zum trockenen Harz gegeben. Nach 60 min wurde abfiltriert, mit Abspalllösung sowie DCM nachgewaschen und anschließend das Lösungsmittel im Membranpumpen-Vakuum fast vollständig entfernt. Das Produkt konnte durch Fällung in Diethylether und anschließender Zentrifugation abgetrennt werden. Der so erhaltene Feststoff wurde im Membranpumpenvakuum getrocknet und anschließend, je nach Löslichkeit, aus Wasser, Acetonitril oder 1,4-Dioxan gefriergetrocknet.

#### ***b) Gleichzeitige Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen***

In diesem Fall bestand die Abspaltlösung aus 50% TFA in DCM (v/v) und verblieb für 60 min auf dem Harz. Die restliche Aufarbeitung erfolgte analog zu Punkt a. Für den Fall, dass das Produkt nicht in Diethylether zu fällen war, wurde das Lösungsmittel im Ölpumpen-Vakuum vollständig entfernt und das Produkt anschließend gefriergetrocknet.

#### ***AAV 5) Kaiser-Test auf freie Amine***

Einige Harz-Kugeln wurden entnommen, gründlich mit NMP, DCM und Diethylether gewaschen und kurz im Vakuum getrocknet. Jeweils drei Tropfen der Lösungen A, B und C wurden auf das trockene Harz gegeben. Das Gemisch wurde für maximal 5 min auf 80 °C erhitzt, wobei alle 30 sek. die Farbe der Harz-Probe mit Hilfe einer Lupe überprüft wurde. Gleichzeitig wurde eine Blindprobe ohne Harz in einem separaten Gefäß durchgeführt. Im Falle einer Verfärbung der Probe gegenüber der Blindprobe wurde das Testergebnis als positiv (d.h. freie Amine vorhanden) gewertet. Die Kupplungsreaktion wurde dementsprechend verlängert oder wiederholt. Die Lösungen A, B und C wurden hergestellt wie in der Literatur beschrieben.<sup>[134]</sup>

#### ***AAV 6) Analytischer Fmoc-Test***

3-5 mg mit NMP und Dichlormethan gewaschenes und anschließend getrocknetes Harz wurden in einer UV-Küvette (d = 1 cm) mit 3 ml einer Lösung von 20 vol.% Piperidin in DMF (v/v) versetzt und innerhalb von 20 min mehrmals mit einer Pipette durchmischt. Eine zweite Küvette mit Piperidinlösung ohne Harz diente als Referenz. In einem UV-Spektroskop der Firma UVIKON (Spektrophotometer 931) wurde die Absorption der Probe gegen die Referenz bei 290 nm gemessen. Die Berechnung des Beladungsgrades des Harzes erfolgte mit Hilfe von Gleichung 6.1 (Extinktionskoeffizient = 5253 M<sup>-1</sup> für das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt).<sup>[132]</sup>

$$\text{Beladung (mmol/g)} = (\text{Absorption}) / (1,75 \cdot (\text{mg Harz-Probe})) \quad (\text{Gl. 6.1})$$

## 6.1.2 Peptidsynthese

### 6.1.2.1 Synthese von 1,3-switch Peptid *H-Thr*<sup>1</sup>(*tBu*)-*Val*<sup>2</sup>-*Thr*<sup>3</sup>(*tBu*)-(*Val*<sup>4</sup>-*Thr*<sup>5</sup>)<sup>switch</sup>-*Val*<sup>6</sup>-*Thr*<sup>7</sup>(*tBu*)-(*Val*<sup>8</sup>-*Thr*<sup>9</sup>)<sup>switch</sup>-*Val*<sup>10</sup>-*nPhe*<sup>11</sup>-*Gly*<sup>12</sup>-OH (**I**)

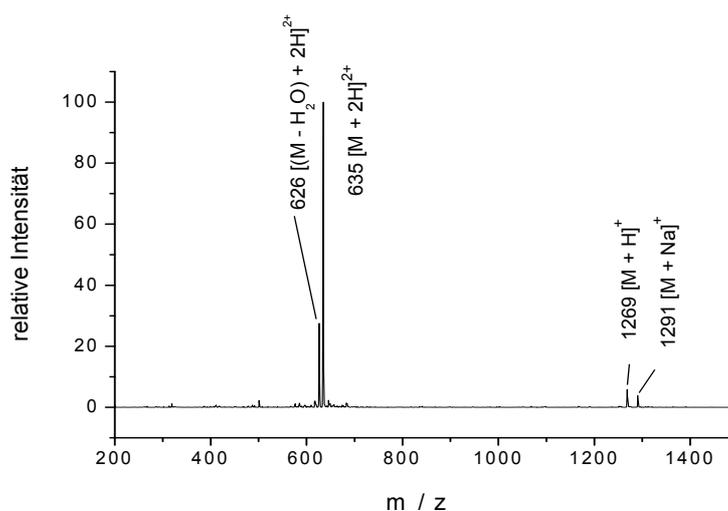
Der Aufbau der Peptidsequenz erfolgte an einem mit Fmoc-Gly vorbeladenen Tentagel-S-Chlortrityl-Harz (Beladungsgrad: 0,25 mmol/g). Vor Beginn der Synthese wurde ein Capping mit Essigsäureanhydrid durchgeführt (Ac<sub>2</sub>O/NMI/NMP, 2×15 min.). Die schrittweise Kupplung der Standard-Aminosäuren erfolgte nach AAV1 unter Anwendung von Standard-ABI-Fastmoc Doppelkupplungs- und Fmoc-Abspaltungsprotokollen. Nach jedem Kupplungszyklus wurde die vollständige Umsetzung durch einen Kaisertest (AAV5) überprüft. Die Switch-Ester Segmente (*Val-Thr*)<sup>switch</sup> wurden entsprechend AAV2 per Handkupplung zwischen *Val*<sup>4</sup> und *Thr*<sup>5</sup> sowie *Val*<sup>8</sup> und *Thr*<sup>9</sup> in die Sequenz eingebaut. Nach erfolgreicher Kupplung und dem anschließendem Capping-Schritt, erfolgte die Synthese des nativen Peptidsegments wiederum automatisiert im Syntheseautomaten nach AAV1. Nach der Abspaltung der endständigen Fmoc-Schutzgruppe von *Thr*<sup>1</sup>, wurde ein kleiner Teil von **I** bei gleichzeitiger Entfernung aller Peptidschutzgruppen nach AAV4b vom Harz abgespalten. Das Peptidderivat **I** wurde nach Gefriertrocknung aus 1,4-Dioxan als farbloser Feststoff isoliert.

<sup>1</sup>H-NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 3.30 und 4.86 ppm):

δ = 0.95-0.98 (m, 30 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Val), 1.15-1.21 (m, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)OH Thr), 1.27-1.37 (dd, 6 H, C(CH<sub>3</sub>)O-CO Thr), 2.02-2.18 (m, 5 H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Val), 3.63-4.46 (m, 19 H, 12 α-CH + 3 CH-OH Thr + CH<sub>2</sub>-CH nPhe), 5.14-5.22 (dt, 2 H, CH-O-CO Thr), 7.52-7.55 (d, 2 H, C<sub>ar</sub>H nPhe), 8.12-8.14 (d, 2 H, C<sub>ar</sub>H nPhe) ppm.

FT-IR: ν = 3281 (w, amide A), 2973 – 2880 (m, C-H), 1742 (w, C=O ester), 1640 (s, C=O amide I), 1519 (s, amide II), 1346 (m, amide III), 1181-1132 (s, O-H) cm<sup>-1</sup>.

ESI-MS: - 1 mg/ml Methanol; Laufmittel Methanol  
- Masse M<sub>theor.</sub> = 1268,4 g/mol



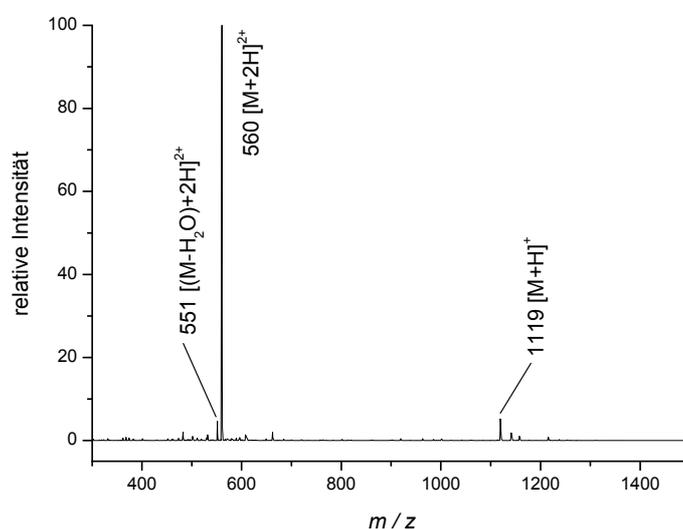
### 6.1.2.2 Synthese des single-switch Peptids *H*-Thr<sup>1</sup>(*t*Bu)-(Val<sup>2</sup>-Thr<sup>3</sup>)<sup>pro</sup>-Val<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>(*t*Bu)-(Val<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>)<sup>switch</sup>-(Val<sup>8</sup>-Thr<sup>9</sup>)<sup>pro</sup>-Val<sup>10</sup>-Gly<sup>11</sup>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (**II**)

Der Peptidsynthese erfolgte an einem 2-Aminoethanol-Chlortritylharz (1g, 0,74 mmol/g). Der Beladungsgrad des Harzes wurde bei der Kupplung von Glycin, nach AAV3, auf 0,25 mmol/g gesenkt. Die Kupplungen der Standard-AS erfolgten im Peptidsyntheseautomaten nach AAV1 (Doppelkupplungsprotokoll). Die quantitative Umsetzung wurde nach jedem Kupplungsschritt durch den Kaisertest (AAV5) überprüft. Es wurden zwei Pseudoprolineinheiten (Fmoc-Val-Thr( $\Psi^{\text{Me,Me}}$ pro) OH) (0.5 mmol, 2 eq.) in die Sequenz eingebaut, jeweils im Anschluss an die Kupplung von Val<sup>10</sup> und Val<sup>4</sup>. Dazu wurde das Harz in einen Glasreaktor überführt und eine Doppelkupplung in DMF als Lösungsmittel unter Anwendung von PyBOP / HOBt / DIPEA Kupplungsprotokollen (2/2/4 eq., 1 h) durchgeführt. Anschließend wurde das Harz gründlich gewaschen und für den Aufbau der nativen Peptidbindungen im Syntheseautomaten weiter verwendet. Der Einbau des Switch-Ester Segments zwischen Val<sup>6</sup> und Thr<sup>7</sup> erfolgte wiederum im Glasreaktor nach AAV2. Eine quantitative Umsetzung konnte nach drei Kupplungszyklen durch einen analytischen Fmoc Test (AAV6) nachgewiesen werden. Nach der Kupplung der letzten AS (Thr<sup>1</sup>) und Abspaltung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe, wurde ein kleiner Teil von **II** nach AAV4b vom Harz abgespalten. Nach Gefriertrocknung aus 1,4-Dioxan wurde **II** mittels ESI-MS und <sup>1</sup>H NMR charakterisiert.

$^1\text{H NMR}$  (MeOH- $d_4$  (3.30 und 4.84 ppm)):

$\delta = 0.94\text{-}0.98$  (m, 30 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  Val),  $1.13\text{-}1.18$  (m, 9 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{OH}$  Thr),  $1.27\text{-}1.29$  (d, 3 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{OH}$  Thr),  $1.33\text{-}1.35$  (d, 3 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{O-CO}$  Thr),  $2.07\text{-}2.21$  (m, 5 H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  Val),  $3.61\text{-}4.74$  (m, 20 H, 12  $\alpha\text{-CH}$  + 4  $\text{CH-OH}$  Thr +  $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2$ ),  $5.30\text{-}5.33$  (t, 1 H,  $\text{CH-O-CO}$  Thr),  $8.10\text{-}8.46$  (m,  $\text{NH}$ ) ppm.

ESI-MS: - 1 mg/ml ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ ; Laufmittel Acetonitril/Wasser (1:1 v/v)  
 - Masse  $M_{\text{theor}} = 1118,3$  g/mol



### 6.1.2.3 Synthese des Switch-Peptid Kettenübertrügers

$(\text{Br-CH}(\text{CH}_3)\text{-C(O)-Thr}^1(\text{tBu})\text{-(Val}^2\text{-Thr}^3)^{\text{pro}}\text{-Val}^4\text{-Thr}^5(\text{tBu})\text{-(Val}^6\text{-Thr}^7)^{\text{switch}}\text{-(Val}^8\text{-Thr}^9)^{\text{pro}}\text{-Val}^{10}\text{-Gly}^{11}\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH})$  (**IIa**)

Der Oligopeptid-ATRP-Makroinitiator wurde in Anlehnung an die Arbeiten von *ten Cate et al.* hergestellt.<sup>[106]</sup> Die Kupplung von 2-Brompropionsäure (10 eq.) an den *N*-Terminus des harzgebundenen **II** erfolgte nach Standard DIC Doppelkupplungsprotokollen (5 eq.,  $2 \times 4$  h). Die Reaktion wurde im Glasreaktor mit DMF als Lösungsmittel durchgeführt. Abschließend wurde das Harz mit DMF, NMP gewaschen und ein kleiner Teil des Peptidderivats für die Charakterisierung von **IIa** nach AAV4b abgespalten.

$^1\text{H NMR}$  (MeOH- $d_4$  (3.30 und 4.84 ppm)):

$\delta = 0.94-0.98$  (m, 30 H, C(CH $_3$ ) $_2$  Val), 1.17-1.35 (m, 15 H, 12 H C(CH $_3$ )OH Thr + 3 H C(CH $_3$ )O-CO Thr), 1.76-1.78 (d, 3 H, Br-C(CH $_3$ )-CO), 2.07-2.18 (m, 5 H, CH(CH $_3$ ) $_2$  Val), 3.65-4.68 (m, 21 H, 12 H  $\alpha$ -CH + 4 H CH-OH Thr + 4 HO-CH $_2$ -CH $_2$  + Br-CH(CH $_3$ )-CO), 5.27-5.30 (t, 1 H, CH-O-CO Thr), 8.00-8.45 (m, NH) ppm;

ESI-MS: - 1 mg/ml ACN/H $_2$ O; Laufmittel Acetonitril/Wasser (1:1 v/v)  
 - Masse  $M_{\text{theor.}} = 1254,3$  g/mol  
 -  $m/z = 1255$  ([M+H] $^+$ ), 1277 ([M+Na] $^+$ ), 647 ([M+H+K] $^{2+}$ ), 628 ([M+2H] $^{2+}$ ), 619 ([M-H $_2$ O)+2H] $^{2+}$ ; Thr Fragmentierung)

*Ph-C(S)-S-CH(CH $_3$ )-C(O)-Thr $^1$ (tBu)-(Val $^2$ -Thr $^3$ ) $^{pro}$ -Val $^4$ -Thr $^5$ (tBu)-(Val $^6$ -Thr $^7$ ) $^{switch}$ -(Val $^8$ -Thr $^9$ ) $^{pro}$ -Val $^{10}$ -Gly $^{11}$ -NHCH $_2$ CH $_2$ OH) (**III**)*

Für die Umwandlung von **IIa** in den Peptid-Makrokettenträger **III** wurde Dithiobenzoesäure ausgehend von Brombenzol durch eine Grignard-Reaktion hergestellt und anschließend zum harz-gebundenen ATRP-Makroinitiator **IIa** gegeben. Unter Argonatmosphäre wurde Brombenzol (19 mmol, 1 *eq.*) vorsichtig zu einer Dispersion aus Magnesiumspänen (19 mmol, 1 *eq.*) in THF (10 ml) getropft und für 45 Minuten gerührt. Das resultierende Phenylmagnesiumbromid wurde über einen Filter in einen gekühlten Rundkolben mit Schwefelkohlenstoff (27 mmol, 1,5 *eq.*) überführt und mit 5 ml THF nachgespült. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde vorsichtig etwas Wasser (6 ml) dazu gegeben und die resultierende Dithiobenzoat-Lösung im Membranpumpenvakuum aufkonzentriert. Nach Zugabe von Wasser (20 ml) und Diethylether (40 ml) wurde die wässrige Phase mit HCl (1 M, 20 ml) angesäuert und das Produkt zweimal mit Diethylether extrahiert. Die kombinierten Etherphasen wurden zunächst über Na $_2$ SO $_4$  und anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das mit dem gebundenen Oligopeptidderivat **IIa** (0,1 mmol) beladene Harz wurde in THF (4 ml) gequollen und nacheinander, Dithiobenzoesäure (315 mg, 2,05 mmol), sowie Pyridin (160  $\mu$ l, 2 mmol) dazu gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h bei 60  $^{\circ}$ C gerührt. Im Anschluss wurde auf Raumtemperatur gekühlt und gründlich mit THF gewaschen. Es folgten Waschschrte mit THF, Wasser, THF und DCM. Das Produkt wurde unter Erhalt der Peptidschutzgruppen nach AAV4a vom Harz abgespalten. Nach der Gefrietrocknung aus Acetonitril/Benzol (1:1),

wurden 112 mg (0,07 mmol) des Peptid-Makroüberträgers **III** als rosafarbener Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (MeOH- $d_4$  (3.30 und 4.84 ppm)):

$\delta = 0.96\text{-}1.67$  (m, 87 H, 30 H  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  Val + 12 H  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{OH}$  Thr + 3 H  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{O-CO}$  Thr + 3 H  $\text{S-C}(\text{CH}_3)\text{-CO}$  + 18 H  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$   $^t\text{Bu}$  + 12 H  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$   $^{\text{Me,Me}}\text{pro}$  + 9 H  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  Boc), 2.07-2.18 (m, 5 H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  Val), 3.56-4.60 (m, 21 H, 12 H  $\alpha\text{-CH}$  + 4 H  $\text{CH-OH}$  Thr + 4 H  $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2$  + 1 H  $\text{S-CH}(\text{CH}_3)\text{-CO}$ ), 5.26 (t, 1 H,  $\text{CH-O-CO}$  Thr), 7.42 (t, 2 H,  $\text{ArH}_{\text{meta}}$ ), 7.58 (m, 1 H,  $\text{ArH}_{\text{para}}$ ), 7.96 (d, 2 H,  $\text{ArH}_{\text{ortho}}$ ), 7.90-8.62 (m,  $\text{NH}$ ) ppm.

FT-IR:  $\nu = 3284$  (w, Amid A), 2973 – 2880 (m, C-H), 1783 (w, C=O Ester), 1636 (s, C=O Amid I), 1513 (s, Amid II), 1392-1368 (m, Amid III), 1162 (s, O-H)  $\text{cm}^{-1}$ ;

ESI-MS: - 1 mg/ml ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ ; Laufmittel Acetonitril/Wasser (1:1 v/v)  
 - Masse  $M_{\text{theor}} = 1642,2$  g/mol  
 -  $m/z = 1643$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 1603 ( $[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$ ; Thr Fragmentierung), 812 ( $[\text{M}+2\text{H}]^2$ ).

#### 6.1.2.4 Synthese des Trithiocarbonat-Oligopeptid Kettenüberträgers

##### *H-Gly<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>(Pbf)-Gly<sup>4</sup>-Asp<sup>5</sup>(tBu)-Ser<sup>6</sup>(tBu)-OH (VI)*

Ein Polystyrol-2-Chlortritylchlorid Harz wurde mit Fmoc-Ser(tBu) OH nach Standardprotokollen beladen.<sup>[132]</sup> Nach einem Cappingschritt mit  $\text{Ac}_2\text{O}$  wurde der Beladungsgrad des Harzes durch einen analytischen Fmoc-Test (AAV6) auf 0,36 mmol/g bestimmt. Die Standard-AS wurden schrittweise im Peptidsyntheseautomaten analog AAV1 gekuppelt. Nach der Abspaltung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe ( $\text{Gly}^1$ ) wurde ein kleiner Teil des Peptids zur Charakterisierung von **VI** vom Harz abgespalten (nach AAV4a). Nach Gefriertrocknung aus Acetonitril/Wasser (1:1 v/v) wurde **VI** als farbloser Feststoff erhalten.

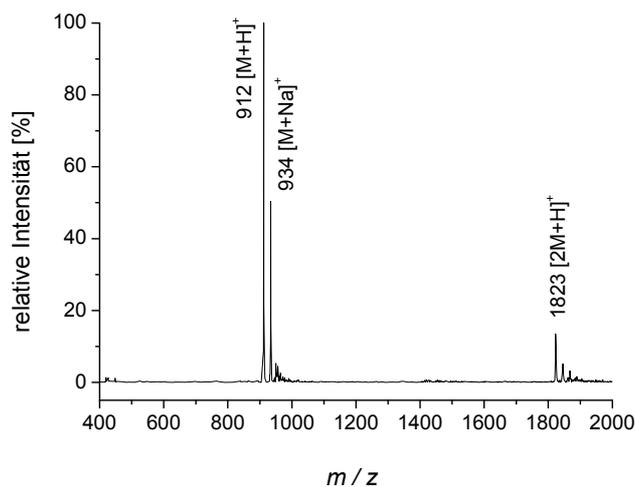
$^1\text{H NMR}$  (MeOH- $d_4$  (3.30 und 4.86 ppm)):

$\delta = 1.14$  (s, 9 H,  $\text{O-C}(\text{CH}_3)_3$  Ser), 1.28-1.87 (m, 19 H, 9 H  $\text{O-C}(\text{CH}_3)_3$  Asp, 6 H  $\text{O-C}(\text{CH}_3)_2$  Pbf, 4 H  $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$  Arg) 2.07-2.56 (m, 9 H,  $\text{C}_{\text{ar-CH}_3}$  Pbf), 2.68-

2.83 (m, 4 H, 2 H  $\text{CH}_2\text{-NH}$  Arg, 2 H  $\text{CH}_2\text{-C(O)}$  Asp), 2.99-3.18 (m, 4 H, 2 H  $\text{C}_{\text{ar}}\text{-CH}_2$  Pbf, 2 H  $\text{O-CH}_2$  Ser), 3.65-4.27 (m, 9 H,  $\alpha\text{-CH}$ ) ppm.

ESI-MS: - 1 mg/ml Methanol; Laufmittel Methanol

- Masse  $M_{\text{theor.}} = 911,4$  g/mol



### ***Synthese des RAFT-Kettenüberträgers S-1-Dodecyl-S'-(R,R'-Dimethyl-R''-Essigsäure) Trithiocarbonat (CTA-I)***

Die Synthese von CTA-I erfolgte nach Vorschrift von *Lai et al.*<sup>[143]</sup> 1-Dodecanethiol (8,09 g, 0,04 mol), Aceton (19,22 g, 0,33 mol) und Aliquot 336 (Tricaprylylmethylammoniumchlorid, 0,65 g, 1,6 mmol) wurden in einem Dreihalskolben auf 10 °C gekühlt. Innerhalb von 20 min wurde eine 50%ige Natriumhydroxidlösung (3,36 g, 0,04 mol) dazugegeben. Nach weiteren 15 min rühren, erfolgte die Zugabe von Schwefelkohlenstoff (3,04 g, 0,04 mol) gelöst in Aceton (5 ml) innerhalb von 20 min. Dabei färbte sich die Lösung rot. Es wurde weitere 10 min gerührt, bevor zu dem Gemisch Chloroform (7,12 g, 0,060 mol), in einem Schritt, und tropfenweise 50%ige Natriumhydroxidlösung (16 g, 0,2 mol) gegeben wurden. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch vorsichtige Zugabe von 60 ml Wasser und 10 ml HCl (konz.) angesäuert. Durch kräftiges Rühren und durchleiten von Stickstoff wurde das Aceton aus dem Gemisch entfernt. Der resultierende Feststoff wurde über einen Büchnertrichter abfiltriert und in 100 ml Isopropanol für 15 min gerührt. Abschließend wurde das Gemisch bis zur Trockne im

Membranpumpenvakuum eingeengt. Nach Umkristallisation aus n-Hexan wurde **CTA-I** als gelber kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 8,29 g (59% d.Th.)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$  (7.26 ppm)):

$\delta = 0.88$  (t, 3 H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 1.24-1.41 (m, 18 H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 1,72 (s, 6 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.28 (t, 2 H,  $\text{S-CH}_2$ ) ppm.

ESI-MS: - 1 mg/ml Methanol; Laufmittel Methanol

- Masse  $M_{\text{theor}} = 365.16$  g/mol

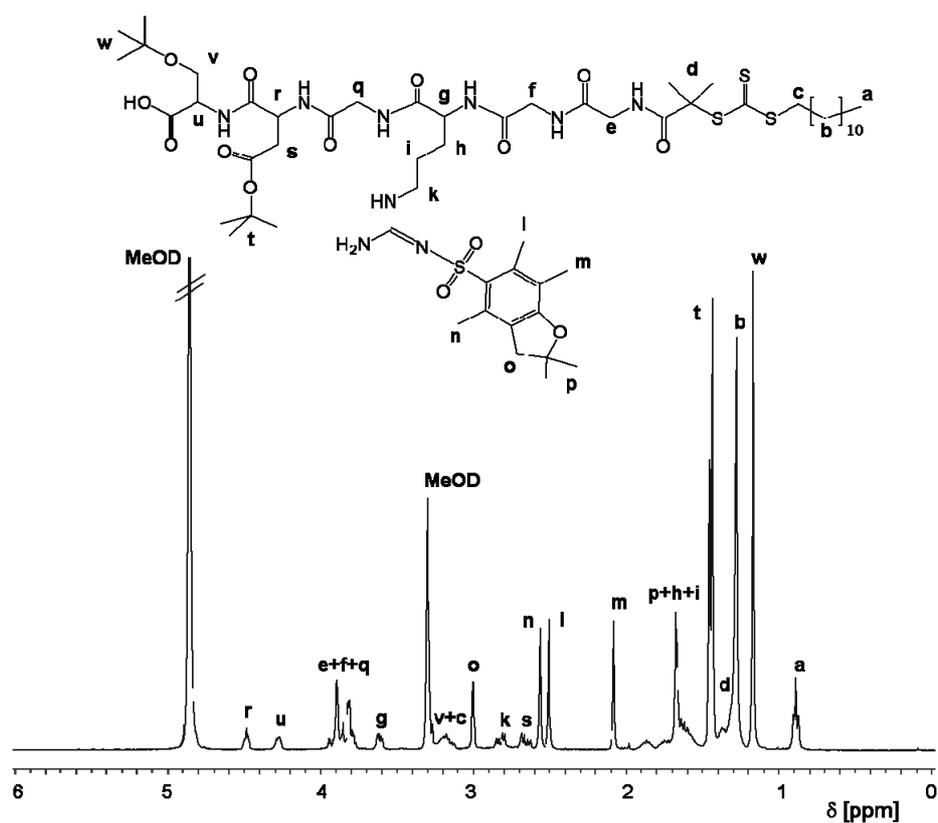
-  $m/z = 388$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 773  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ,

***C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>-S-C(S)-S-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-Gly<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>(Pbf)-Gly<sup>4</sup>-Asp<sup>5</sup>(tBu)-Ser<sup>6</sup>(tBu)-OH (VII)***

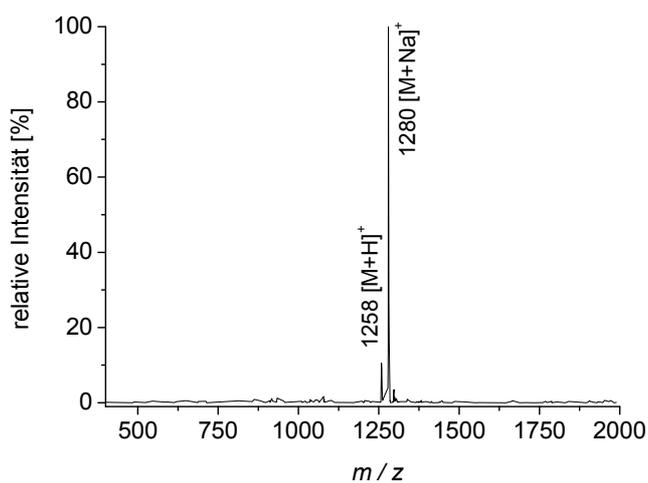
**CTA-I** (0,5 mmol, 5 eq.) wurde an die terminale Aminogruppe des harzgebundenen Oligopeptid-Precursors **VI** gekuppelt. Die Synthese wurde entweder im Peptidsyntheseautomaten unter Verwendung des ABI Fastmoc DCC-Kupplungsmoduls<sup>[77]</sup> oder im Glasreaktor durchgeführt. Als Kupplungsreagenzien dienten DIC/NMI (5/4 eq.) in einem Lösungsmittelgemisch aus DCM/DMF (80:20 v/v). Nach 2 Stunden Reaktionszeit konnte die quantitative Umsetzung durch einen Kaisertest (AAV5) nachgewiesen werden. **VII** wurde unter Erhalt der Peptid-Schutzgruppen nach AAV4a vom Harz abgespalten und nach Gefriertrocknung aus Acetonitril/Benzol (50:50 v/v) als hellgelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{MeOH-d}_4$  (3.30 und 4.86 ppm)):

$\delta = 0.87\text{-}0.91$  (t, 3 H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , T-I), 1.17 (s, 9 H,  $\text{O-C}(\text{CH}_3)_3$  Ser), 1.27-1.87 (m, 45 H, 20 H  $\text{S-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_3$ , 9 H  $\text{O-C}(\text{CH}_3)_3$  Asp, 6 H  $\text{S-C}(\text{CH}_3)_2$ , 6 H  $\text{O-C}(\text{CH}_3)_2$  Pbf, 4 H  $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$  Arg) 2.08-2.56 (m, 9 H,  $\text{C}_{\text{ar}}\text{-CH}_3$  Pbf), 2.64-2.84 (m, 4 H, 2 H  $\text{CH}_2\text{-NH}$  Arg, 2 H  $\text{CH}_2\text{-C}(\text{O})$  Asp), 3.00-3.18 (m, 6 H, 2 H  $\text{C}_{\text{ar}}\text{-CH}_2$  Pbf, 2 H  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ , 2 H  $\text{O-CH}_2$  Ser), 3.62-4.48 (m, 9 H,  $\alpha\text{-CH}$ ) ppm.



ESI-MS: - 1 mg/ml Methanol; Laufmittel Methanol  
 - Masse  $M_{\text{theor}} = 1257,6 \text{ g/mol}$



### 6.1.2.5 Kontrollexperiment

Zur Untersuchung der Nebenreaktion zwischen dem nukleophilen Amin (*N*-terminale Aminogruppe des Peptids) und der Trithiocarbonat-Einheit von **CTA-I** zum Dithiocarbamat-Nebenprodukt.

Die Kupplung des Trithiocarbonat RAFT Kettenüberträgers **CTA-I** (0,2 mmol) an das Festphasen-gebundene Peptid **VI** (0,02 mmol) wurde in Abwesenheit des Aktivators DIC durchgeführt. Die weiteren Reaktionsbedingungen blieben im Vergleich zur zuvor beschriebenen Synthese von **VII** unverändert. Nach 2 h Reaktionszeit wurde das Produkt nach AAV4a vom Harz abgespalten und aus Acetonitril/Benzol (1:1) gefriergetrocknet.

Die quantitative Analyse der Produktzusammensetzung erfolgte durch HPLC-MS Messungen.

HPLC-MS (RP8, MeOH/H<sub>2</sub>O, 254 nm):

$V_{VI} = 2,7$  ml (912 m/z ( $[M_I+H]^+$ )),  $V_{\text{dithiocarbamate}} = 22$  ml (1157 m/z ( $[M_{\text{dithiocarbamate}}+H]^+$ ));

Integralverhältnis  $A(V_{VI}) : A(V_{\text{dithiocarbamate}}) = 10:1$ .

### 6.1.3. Synthese eines carboxyl-endfunktionalisierten *Poly-n-butylacrylats* (*PBA2k*) durch ATRP

#### 6.1.3.1 Synthese von 2-Brom-propionsäurebenzylester

Die Synthese des Initiators erfolgte nach der Vorschrift von De-Cheng *et al.* <sup>[162]</sup>.

In einem 50 ml Stickstoffkolben wurden unter Argon-Atmosphäre 32 mmol Benzylalkohol und 35 mmol Pyridin in 20 ml trockenem DCM vorgelegt und auf 0 °C abgesenkt. Anschließend wurden 35 mmol 2-Propionsäurebromid tropfenweise hinzugegeben, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel. Es wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Eiswasser, gefolgt von 20 ml DCM abgebrochen wurde. Die organische Phase wurde nacheinander mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und das Rohprodukt konnte im Ölpumpenvakuum bei 70 °C umkondensiert werden. Es wurde eine farblose Lösung erhalten.

Ausbeute: 5,23 g (71% d.Th.)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.82$  (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.39 (q, 1H, CHBr), 5.19 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>ar</sub>), 7.35 (s, 5H, C<sub>ar</sub>H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 21.6$  (CH<sub>3</sub>), 39.9 (CBr), 67.6 (CH<sub>2</sub>), 128.2 (C<sub>ar</sub>H), 128.5 (C<sub>ar</sub>H), 128.6 (C<sub>ar</sub>H), 135.1 (C<sub>ar</sub>) ppm.

### 6.1.3.2 ATRP von *n*-Butylacrylat

Für die Polymerisation wurden CuBr (718 mg, 5 mmol) und CuBr<sub>2</sub> (45 mg, 0,2 mmol) in einen Schlenk-Kolben gegeben und dieser 3× evakuiert und mit Argon belüftet. Eine entgaste Mischung aus Acetonitril, *n*-Butylacrylat und PMDETA (11 ml (33 vol.%), 28,7 ml (200 mmol) und 1,1 ml (5,2 mmol)) wurde über eine Spritze unter Schutzgasatmosphäre in den Kolben transferiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h gerührt um die Kupferkomplexbildung zu ermöglichen. Anschließend wurde auf 60 °C erwärmt und die Polymerisation durch die Zugabe einer zuvor entgasten Lösung aus 2-Brompropionsäurebenzylester (1,75 ml, 10 mmol) in Acetonitril (2 ml) gestartet. Durch Probenentnahme wurde der Verlauf der Reaktion mit Hilfe von <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie und GPC verfolgt. Zur Bestimmung des Umsatzes wurden die Integrale charakteristischer Signale des Monomers (Resonanzen der Vinyl-Protonen -CH<sub>2</sub>=CH-, 5.50 bis 6.50) ins Verhältnis gesetzt, zu der Fläche eines überlagerten Monomer/Polymer-Signals (-CH<sub>2</sub>-O-, 3.80 bis 4.30 ppm). Nach 2 h Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Abkühlen und anschließende Luftzufuhr abgebrochen. Die Reaktionslösung wurde mit THF verdünnt und durch Filtration über eine Kieselgelsäule vom Katalysator gereinigt. Das Eluat wurde im Membranpumpenvakuum eingeeengt und in einer Lösung aus Methanol/Eiswasser (80:20 v/v) umgefällt. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum wurden 17,2 g Poly-*n*-butylacrylat (82% d.Th.) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.90-0.93 (t, 48 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.14-1.17 (d, 3 H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.35-1.38 (b, 32 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.58-1.91 (b, 64 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> + CH-CH<sub>2</sub>), 2.27 (b, 16 H, CH-CH<sub>2</sub>), 4.05 (b, 32 H, O-CH<sub>2</sub>), 5.13 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>-C<sub>ar</sub>), 7.33 (5 H, C<sub>ar</sub>H) ppm.

GPC: (THF, PS-standards): M<sub>n</sub> = 2100 g/mol, DP<sub>n</sub> = 15, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1,13.

### 6.1.3.3 Entfernen der Benzyl-Schutzgruppe

Die Benzylester Schutzgruppe der α-Carbonsäure Funktionalität konnte unter reduktiven Bedingungen selektiv abgespalten werden.<sup>[163]</sup>

Dazu wurde das Polymer in einem Stickstoffkolben in absolutem Ethanol gelöst und entgast. Im Argongegenstrom wurde zunächst Ammoniumformiat und anschließend Palladium auf Aktivkohle (10%) zum Reaktionsgemisch zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei 35°C und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Pd/C-Katalysator wurde durch Filtration

über Celite abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen, nacheinander mit 0,3 M HCl-Lösung, gefolgt von Wasser extrahiert und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum entfernt. Zur Reinigung wurde das Produkt aus THF in Methanol/Eiswasser (2:1 v/v) ausgefällt. Der Niederschlag wurde in DCM aufgenommen, über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum wurde **PBA2k** als viskoses Öl erhalten.

Ausbeute: 75% d.Th.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.91-0.95$  (t, 46 H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ),  $1.18-1.19$  (d, 3 H,  $\text{CH-CH}_3$ ),  $1.36-1.38$  (b, 32 H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ),  $1.59-1.91$  (b, 64 H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2 + \text{CH-CH}_2$ ),  $2.28$  (b, 16 H,  $\text{CH-CH}_2$ )  $4.05$  (b, 32 H,  $\text{O-CH}_2$ ) ppm.

Es wurden keine detektierbaren Resonanzen für die Benzylestergruppe bei 5.13 and 7.33 ppm gefunden.

GPC: (THF, PS-standards):  $M_n = 2300$  g/mol,  $DP_n = 18$ ,  $M_w/M_n = 1,17$ .

FT-IR:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2960 – 2874 (s, C-H), 1734 (s, C=O), 1166 (w, O-H).

MALDI-TOF-MS: Das MALDI-Spektrum von **PBA2k** zeigt zwei Verteilungen mit Abständen zwischen den Signalen von jeweils  $128,1 \pm 0,2$  Da, die den homologen Reihen der Natrium- und Kalium-Addukte zugeordnet werden können.

$$M^+ = n \cdot M_{[n\text{Ba}]} + M_{[\text{Endgruppen}]} + M_{[\text{Begleitung}]}$$

Bei einer theoretischen Masse von  $M_{n\text{Ba}} = 128,08$  Da pro Wiederholungseinheit und einer Masse der Endgruppen von  $M_{[\text{Endgruppen}]} = 75,1$  Da, können die drei intensivsten Signale mit Abweichungen von  $\text{max.} \pm 0,5$  Da Poly-*n*-butylacrylaten mit  $DP_{\text{peak}} = 14, 15$  bzw. 16 zugeordnet werden.

## 6.1.4 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate

### 6.1.4.1 Synthese von *PnBA-block-Thr<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Thr<sup>3</sup>-(Val<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>)<sup>switch</sup>-Val<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>-(Val<sup>8</sup>-Thr<sup>9</sup>)<sup>switch</sup>-Val<sup>10</sup>-nPhe<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-OH (I-PBA2k) (Kupplungsansatz)*

Die Konjugation des end-funktionalisierten *PnBA*-COOH (**PBA2k**) an den *N*-Terminus des vollgeschützten Peptidsegments (**I**) wurde als eine Festphasen-gebundene Kupplungsreaktion durchgeführt. 640 mg von **PBA2k** (0,32 mmol, 4 *eq.* in Bezug auf die theoretische Menge an Peptid **I**) wurden in 5 ml DMF gelöst. Die Aktivierung der Carboxyl-Funktionalität erfolgte mit PyBOP / HOBt / DIPEA (167 mg, 0,32 mmol, 4 *eq.* / 49 mg, 0,32 mmol, 4 *eq.* / 0,1 ml, 0,64 mmol, 8 *eq.*). Die resultierende Lösung wurde zum Harz gegeben und für 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach einem Waschzyklus mit DMF, DCM, DMF wurde die Kupplung wiederholt um eine quantitative Umsetzung zu gewährleisten. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde durch einen negativen Kaisertest (AAV5) bestätigt.

Die Abspaltung des Konjugates **I-PBA2k** erfolgte nach AAV4b, bei gleichzeitiger Entfernung aller Peptidschutzgruppen. Das Konjugat konnte nach Gefriertrocknung aus 1,4-Dioxan in 62 % Ausbeute (d.Th.) isoliert werden.

<sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub> (3.30 und 4.86 ppm)):

$\delta$  = 0.94-0.98 (m, 75 H, 30 H C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Val + 46 H CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.11-1.28 (m, 18 H, 9 H C(CH<sub>3</sub>)OH Thr + 6 H C(CH<sub>3</sub>)O-CO Thr + 3 H CH-CH<sub>3</sub> *PnBA*), 1.41 (m, 32 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> *PnBA*), 1.60-1.91 (b, 59 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> + CH-CH<sub>2</sub> *PnBA*), 2.16-2.18 (m, 5 H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Val), 2.31 (b, 15 H, CH-CH<sub>2</sub>), 3.63-4.55 (m, 51 H, 12 H  $\alpha$ -CH + 3 H CH-OH Thr + CH<sub>2</sub>-CH *nPhe* + 32 H O-CH<sub>2</sub> *PnBA*), 5.16-5.24 (dt, 2 H, CH-O-CO Thr), 7.53-7.55 (d, 2 H, C<sub>ar</sub>H *nPhe*), 8.12-8.14 (d, 2 H, C<sub>ar</sub>H *nPhe*) ppm.  $M_{n,conj.} = 3300$ ,  $DP_n = 16$ .

FT-IR:  $\nu = 3292$  (w, Amid A), 2960 – 2880 (m, C-H), 1730 (s, C=O Ester), 1642 (s, C=O Amid I), 1523 (m, Amid II), 1346 (m, Amid III), 1153 (s, O-H) cm<sup>-1</sup>.

#### **Schaltprozedur für Konjugat I-PBA2k:**

2 mg (0,6  $\mu$ mol) **I-PBA2k** wurden in einer Mischung aus 0,89 ml Diethylether und 0,12 ml einer methanolischen 0,01M Natriumhydroxid Lösung (1,2  $\mu$ mol NaOH) gelöst und für 12 h geschüttelt.

**6.1.4.2 Synthese der PnBA-Konjugate Ph-C(S)-S-(PnBA)<sub>n</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-C(O)-Thr<sup>1</sup>(tBu)-(Val<sup>2</sup>-Thr<sup>3</sup>)<sup>pro</sup>-Val<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>(tBu)-(Val<sup>6</sup>-Thr<sup>7</sup>)<sup>switch</sup>-(Val<sup>8</sup>-Thr<sup>9</sup>)<sup>pro</sup>-Val<sup>10</sup>-Gly<sup>11</sup>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (IV) durch RAFT Polymerisation – allgemeine Durchführung**

Der Switch-Peptid Kettenüberträger **III** (20 mg, 12,3 μmol) wurde in DMF (4 ml) gelöst und über Nacht unter Argonatmosphäre gerührt. Nacheinander wurden 0,5 ml einer Lösung von AIBN in DMF (0,4 mg/ml, 1,2 μmol) und 0,5 ml *n*BA (3,49 mmol) zum Reaktionsgemisch gegeben. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig mit Argon entgast und auf 60 °C erhitzt. Es wurden Proben entnommen um den Verlauf der Reaktion durch <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie und GPC verfolgen zu können. Bei Erreichen des gewünschten Monomerumsatzes bzw. Molekulargewichtes wurde die Polymerisation durch rasches Abkühlen und Luftzufuhr abgebrochen. Die entsprechende Probe wurde im Ölpumpenvakuum aufkonzentriert, aus Methanol in Eiswasser gefällt und zum Abschluss aus Acetonitril/Benzol (1:1) gefriergetrocknet. Drei unterschiedliche PnBA Konjugate (**IV-PBA8k**, **IV-PBA14k**, **IV-PBA38k**) wurden auf diese Weise hergestellt. Die Charakterisierung erfolgte durch GPC und NMR Spektroskopie.

**IV-PBA8k**

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub> (2.49 und 3.31 ppm)):

δ = 0.78-1.76 (m, 669 H, 30 H C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Val + 195 H CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> + 12 H C(CH<sub>3</sub>) OH Thr + 3 H C(CH<sub>3</sub>)O-CO Thr + 3 H S-C(CH<sub>3</sub>)-CO + 18 H C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> tBu + 12 H C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> PP + 9 H C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc + 130 H CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> PnBA + 130 H CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> + 130 H CH-CH<sub>2</sub> PnBA), 1.98-2.31 (m, 70 H, 5 H CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Val + 65 H, CH-CH<sub>2</sub> PnBA), 3.64-4.34 (m, 151 H, 12 H α-CH + 4 H CH-OH Thr + 4 H HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> + 1 H S-CH(CH<sub>3</sub>)-CO + 130 H O-CH<sub>2</sub> PnBA), 5.26 (t, 1 H, CH-O-CO Thr), 7.29-8.51 (m, 15 H, 5 H ArH + 10 H NH) ppm.

M<sub>n,conj.</sub> = 9900, DP<sub>n</sub> = 65.

GPC (THF, PnBA-standards): M<sub>n,app</sub> = 11000, DP<sub>n</sub> = 69, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1,29.

**IV-PBA14k**

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):

$M_{n,\text{conj.}} = 15800$ ,  $DP_n = 111$ , bestimmt durch den Vergleich der Integrale charakteristischer  $^1\text{H}$  NMR Resonanzen des PnBA-Blocks ( $\delta = 4.05\text{-}4.10$  ppm ( $\text{OCH}_2$ )), des Oligopeptidsegments ( $\delta = 5.26$  ppm ( $\text{CH-O-CO Thr}_{\text{ester}}$ )) und der CTA Endgruppe ( $\delta = 7.40\text{-}7.47$  ppm ( $\text{ArH}_{\text{meta}}$ )).

GPC (THF, PnBA-standards):

$M_{n,\text{app}} = 16000$ ,  $DP_n = 110$ ,  $M_w/M_n = 1,25$ .

**IV-PBA38k**

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):

$M_{n,\text{conj.}} = 39000$ ,  $DP_n = 292$ , bestimmt durch den Vergleich der Integrale charakteristischer  $^1\text{H}$  NMR Resonanzen vom PnBA ( $\delta = 4.05\text{-}4.10$  ppm ( $\text{OCH}_2$ )) und der CTA Endgruppe ( $\delta = 7.34\text{-}7.96$  ppm ( $\text{ArH}$ )).

GPC (THF, PS-standards):

$M_{n,\text{app}} = 37000$ ,  $DP_n = 274$ ,  $M_w/M_n = 1,33$ .

***Abspaltung der Peptidschutzgruppen:***

Zur Entschützung des Peptidsegments wurden die Konjugate in einer Mischung aus 30% TFA in DCM gelöst und für 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde Dioxan dazugegeben und die organischen Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Die resultierenden Produkte wurden aus Acetonitril/Benzol (1:1 v/v) gefriergetrocknet.

**IV-PBA8k**

$^1\text{H}$  NMR (MeOH- $d_4$  (3.30 und 4.84 ppm)):

$\delta = 0.80\text{-}1.10$  (m, 225 H, 30 H  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  Val + 195 H  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 1.16-1.95 (m, 408 H, 12 H  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{OH}$  Thr + 3 H  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{O-CO}$  Thr + 3 H  $\text{S-C}(\text{CH}_3)\text{-CO}$  + 130 H  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  PnBA + 130 H  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$  + 130 H  $\text{CH-CH}_2$  PnBA), 2.10-2.42 (m, 70 H, 5 H  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  Val + 65 H  $\text{CH-CH}_2$  PnBA), 3.64-4.34 (m, 151 H, 12 H  $\alpha\text{-CH}$  + 4 H  $\text{CH-OH}$  Thr + 4 H  $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2$  + 1 H  $\text{S-CH}(\text{CH}_3)\text{-CO}$  +

130 H O-CH<sub>2</sub> PnBA), 5.28 (t, 1 H, CH-O-CO Thr), 7.45-7.97 (m, 5 H ArH) ppm.  $M_{n,conj.} = 9700$ ,  $DP_n = 66$ .

#### IV-PBA14k

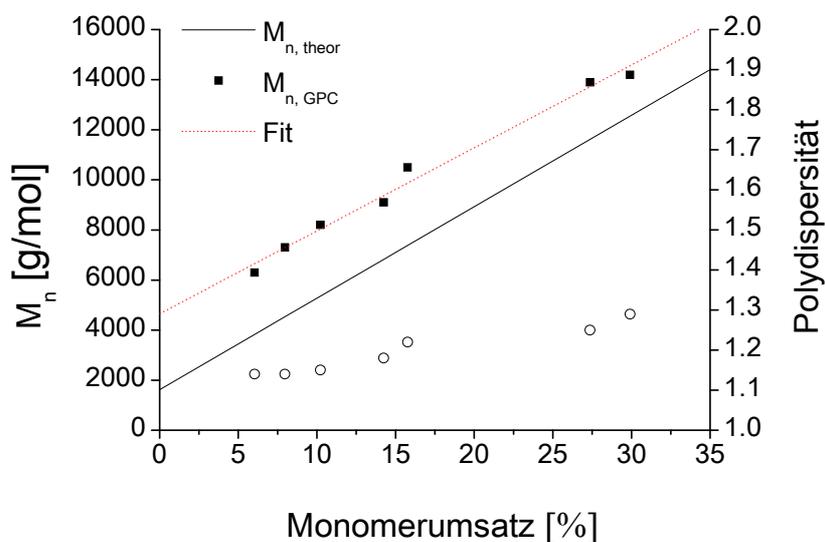
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):

$M_{n,conj.} = 16700$ ,  $DP_n = 120$ , bestimmt durch den Vergleich von Integralen charakterischer <sup>1</sup>H NMR Resonanzen des PnBA-Blocks bei 4.05-4.10 ppm (OCH<sub>2</sub>) und der CTA Endgruppe ( $\delta = 7.49$ -7.51 ppm (ArH)).

#### IV-PBA38k

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):

$M_{n,conj.} = 38000$ ,  $DP_n = 285$  bestimmt durch den Vergleich von Integralen charakterischer <sup>1</sup>H NMR Resonanzen des PnBA-Blocks bei 4.00-4.06 ppm (OCH<sub>2</sub>) und der CTA Endgruppe ( $\delta = 7.35$ -7.96 ppm (ArH)).



**Abb. 6.1:** RAFT Polymerisation von *n*BA kontrolliert durch **III** bei 60 °C: Auftragung des mittleren Molekulargewichts ( $M_n$ , bestimmt durch GPC) gegen Monomerumsatz (Reaktionsbedingungen:  $[nBA]_0/[III]_0/[AIBN]_0 = 285/1/0,1$ , DMF = 90 vol.%).

#### Allgemeine Schaltprozedur für die Konjugate IV-PBA8, IV-PBA14 und IV-PBA38:

1 mg des Peptid-PnBA Konjugats (IV) wurde in 1 ml einer Mischung aus Diethylether und Methanol (70:30 v/v) gelöst. Um einen frühen, unkontrollierten Schaltvorgang zu unterdrücken, wurde die Lösung sofort mit 20 mg TFA stabilisiert. Um eine Reproduzierbarkeit der Schaltbedingungen zu gewährleisten, wurde der apparente pH-Wert

der Et<sub>2</sub>O/MeOH Lösung bestimmt. Dies geschah durch Verdünnen von 10 µL Lösung mit 3 µL entionisiertem Wasser und Messung des pHs mit einem Standard Indikatorpapier (pH-Bereich: 2-5 und 5-8). Um den Aggregationsprozess zu starten, wurde der Schaltprozess in den Switch-Segmenten des Peptidblocks durch die Titration des TFA-Stabilisators mit Base (100 µl, Diethylether/0,1 M methanolische NaOH (70:30)) induziert. Der apparente pH-Wert der Lösung wurde auf diese Weise auf pH<sub>app.</sub> = 6,0 eingestellt. Dies ermöglicht eine langsame Transformation von **IV** in **V**. Während des Schaltvorgangs und des Aggregationsprozesses wurde die Lösung mit langsamer Geschwindigkeit bei Raumtemperatur geschüttelt.

#### **6.1.4.3 Synthese des Poly-n-Butylacrylat Konjugates C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>-S-C(S)-S-(PnBA)<sub>n</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-Gly<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>(Pbf)-Gly<sup>4</sup>-Asp<sup>5</sup>(tBu)-Ser<sup>6</sup>(tBu)OH (VII-PBA):**

Der Oligopeptid Makro-Kettenüberträger **VII** (10 mg, 8 µmol) wurde in 4 ml DMF gelöst, entgast und über Nacht unter Argonatmosphäre gerührt. Es folgte die Zugabe von 130 µl einer Stocklösung aus AIBN in DMF (1 mg/ml, 0,8 µmol), gefolgt von 0,54 ml *n*BA (3,74 mmol). Die Reaktionslösung wurde vorsichtig entgast und unter Argonatmosphäre auf 65 °C erhitzt. Für die kinetische Untersuchung der Polymerisation wurden in regelmäßigen Abständen Proben für GPC und <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie genommen. Der Monomerumsatz wurde durch den Vergleich der Integrale charakteristischer Resonanzen des vinylischen Monomers (δ = 6.35-5.65 ppm, 3H, H<sub>2</sub>C=CH) mit dem eines kombinierten Monomer/Polymer Signals (δ = 4.10-3.75 ppm, 2H, O-CH<sub>2</sub>) bestimmt. Die Polymerisation wurde durch Abkühlung auf Raumtemperatur und Luftzufuhr gestoppt.

#### **6.1.4.4 Allgemeine Prozedur für die RAFT Polymerisation von NIPAM und OEGA mit VII als Macro-CTA:**

Die Polymerisation von NIPAM oder OEGA erfolgte unter ähnlichen Bedingungen, wie für **VII-PBA** beschrieben. In Kürze: 25 mg von **VII** (20 µmol) wurden in 3,4 ml DMF gelöst und entweder wurde OEGA (0,78 mmol, 39 *eq.*) oder NIPAM (2,7 mmol, 138 *eq.*) dazu gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nach Zugabe von 4 µmol AIBN vorsichtig entgast und unter Argonatmosphäre auf 65 °C erhitzt. Direkt vor dem Abbruch der Reaktion wurde eine Probe entnommen, um den finalen Monomerumsatz durch <sup>1</sup>H NMR zu bestimmen. Das Rohprodukt wurde anschließend durch GPC charakterisiert.

Voll geschütztes **VII-PNIPAM**: (M<sub>n,NMR conversion</sub> = 9800; M<sub>n,app. GPC</sub> = 11500; M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1,20 ).

Voll geschütztes **VII-POEGA**: ( $M_{n,NMR\ conversion} = 8500$ ;  $M_{n,app. GPC} = 4800$ ;  $M_w/M_n = 1,23$ ).

Nachdem das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt wurde, erfolgte die Abspaltung aller Peptid-Schutzgruppen durch Einwirkung einer Standard Abspatlösung (TFA/H<sub>2</sub>O/TES (95/4/1 vol.%) für 2 h. Die Reaktionslösung wurde bis zur Trockne eingengt, neutralisiert und gegen entionisiertes Wasser dialysiert (MWCO 1000). Die Konjugate wurden anschließend durch Gefriertrocknung aus Acetonitril/H<sub>2</sub>O (1:1) isoliert.

**VII-PNIPAM** (leicht gelber Feststoff):

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O (4.65 ppm)):

$\delta = 0.73-2.02$  (t, 798 H, 3 H CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, 20 H S-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub>, 6 H S-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4 H CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> Arg, 170 H -CH<sub>2</sub>-CH-, 85 H -CH<sub>2</sub>-CH-, 510 H CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.74-2.89 (m, 4 H, 2 H CH<sub>2</sub>-NH Arg, 2 H CH<sub>2</sub>-C(O) Asp), 3.00-3.17 (m, 4 H, 2 H CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S, 2 H O-CH<sub>2</sub> Ser), 3.79-3.86 (m, 92 H, 85 H NH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 7 H  $\alpha$ -CH Gly, Arg), 4.23 (t, 1 H,  $\alpha$ -CH Ser), 4.42 (t, 1 H,  $\alpha$ -CH Asp) ppm;

$DP_{n,NMR} = 85$ ,  $M_{n,NMR} = 10400$ .

**VII-POEGA** ( gelblich viskoses Öl):

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O (4.65 ppm)):

$\delta = 0.81$  (t, 3 H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.08-1.94 (m, 58 H, 20 H S-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub>, 6 H S-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4 H CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> Arg, 28 H -CH<sub>2</sub>-CH- ) 2.33 (m, 14 H, -CH<sub>2</sub>-CH-), 2.76-2.84 (m, 4 H, 2 H CH<sub>2</sub>-NH Arg, 2 H CH<sub>2</sub>-C(O) Asp), 3.00-3.18 (m, 4 H, 2 H CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S, 2 H O-CH<sub>2</sub> Ser), 3.27 (m, 42 H, -O-CH<sub>3</sub>), 3.40-3.87 (m, 455 H, 448 H CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, 7 H  $\alpha$ -CH Gly, Arg), 4.14-4.23 (m, 29 H, 1 H  $\alpha$ -CH Ser, 28 H C(O)O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 4.41 (t, 1 H,  $\alpha$ -CH Asp) ppm;

$DP_{n,NMR} = 14$ ,  $M_{n,NMR} = 7300$ .



## 6.2 Charakterisierungsmethoden (experimenteller Teil)

### 6.2.1 Polymer- und Peptidcharakterisierung

#### **6.2.1.1 Kernmagnetische Resonanz (NMR) - Spektroskopie**

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte an einem Bruker DPX 400-Spektrometer in  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{MeOH-d}_4$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  oder  $\text{DMSO-d}_6$  bei Raumtemperatur bei 400 MHz ( $^1\text{H-NMR}$ ) bzw. 100 MHz ( $^{13}\text{C-NMR}$ ). Signale von Spuren nicht-deuterierten Lösungsmittels dienten als interne Standards bezogen auf Tetramethylsilan. Zur Bearbeitung der Spektren wurde das Programm Win-NMR (Bruker) verwendet.

#### **6.2.1.2 Gelpermeationschromatografie (GPC)**

GPC Messungen wurden in THF oder NMP (Flussrate 1 ml/min) unter Verwendung von drei  $5\ \mu\text{-MZ-SDV}$  Säulen ( $10^3$ ,  $10^5$  and  $10^6\ \text{\AA}$ ) durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen Brechungsindex- (RI) (Shodex RI-71) und einen UV-Detektor (TSP UV 1000; 260 nm). Für die Auswertung der Daten kam eine universelle Kalibrierung, basierend auf linearen PS-Standards (PSS, Germany) zur Anwendung. Für kinetische Untersuchungen, zur Bestimmung von  $M_n$  and  $M_w/M_n$ , wurden Proben aus dem Polymerisationsgemisch entnommen und mit THF verdünnt.

#### **6.2.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie gekoppelt mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (HPLC-MS)**

Die Umkehrphasen-HPLC-MS-Untersuchungen erfolgten an einer Anlage von Shimadzu LCMS-QP8000 $\alpha$  mit einer Chromatographie-Säule der Firma YMC (R&D Pro C18; 150 mm x 4,6 mm; Partikelgröße 5  $\mu\text{m}$ ) mit einem Methanol/Wasser Gemisch als Laufmittel und einer Flussrate von 0,4 ml/min. Die Proben wurden in Methanol gelöst (1 mg/ml). Es wurde jeweils ein Volumen von 50  $\mu\text{l}$  eingespritzt (Lösungsmittelgradient:  $t_{0\text{min.}} = 80\%$  MeOH;  $t_{15\ \text{min.}} = 100\%$  MeOH,  $t_{30\ \text{min.}} = 100\%$  MeOH). Der UV-Detektor wurde bei den Wellenlängen 254 nm und 310 nm genutzt.

#### **6.2.1.4 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)**

Die Elektrospray-TOF-MS-Untersuchungen erfolgten an einer Anlage der Firma Shimadzu des Typs LCMS-QP8000 $\alpha$  mit Stickstoff als Trägergas (4,5 l/min) im positiven Modus mit

einer Detektorspannung von 1,6 kV, einer Düsentemperatur von 150 °C und einer Spannung von 4,5 kV. Die Proben wurden in Methanol, Wasser oder einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser gelöst (1 mg/ml).

#### **6.2.1.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

Die Matrix-assistierte Laser-Desorptions/Ionisations–Massenspektrometrie wurde an einem Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation MALDI-TOF-Massenspektrometer der Firma Perseptive Biosystems, Inc. (Framingham, MA, USA) durchgeführt. Die Proben wurden in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in Wasser/Acetonitril (1:1 v/v, mit 0,1 % TFA) gelöst. Ein  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurde mit 1  $\mu\text{l}$  einer  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure-Matrix-Lösung (10 mg/ml in 0,3 % TFA in Wasser/Acetonitril (1:1v/v)) gemischt. Von dieser Mischung wurde 1  $\mu\text{l}$  auf eine Probenplatte gebracht. Die Proben wurden bei 24 °C luftgetrocknet. Die Messungen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV durchgeführt. Jedes Spektrum wurde aus 250 Beschüssen mit dem Laser gemittelt.

### 6.2.2 Methoden zur Untersuchung der Strukturbildung

#### **6.2.2.1 Circular dichroismus (CD) - Spektroskopie**

Die Messungen des Circular dichroismus wurden an einem Spektrometer J 715 der Firma Jasco durchgeführt. Die verwendete Quarzküvette hatte eine Schichtdicke von 1 mm. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 300 nm bis 190 nm (Messparameter: Auflösung: 0,2 nm; Scangeschwindigkeit: 50 nm/min; Antwortzeit: 4 s; Bandbreite; 1 nm). Für jede Messung wurden mindestens 10 Einzelmessungen akkumuliert und anschließend um das Spektrum des reinen Lösungsmittels korrigiert.

#### **6.2.2.2 Infrarot (IR) - Spektroskopie**

Die IR-Spektren wurden an einem Gerät der Firma BioRad, Modell FTS 6000 aufgenommen. Die Feststoffe bzw. dünnen Filme wurden in abgeschwächter Totalreflexion unter Verwendung einer sogenannten Golden Gate-Anordnung (Single Reflection Diamond ATR) gemessen.

### 6.2.2.3 Mikroskopie

#### a) Optische Mikroskopie

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Mikroskop der Firma Olympus vom Typ BX41TF im Auflichtmodus mit einer digitalen Kamera angefertigt. Die Proben wurden in Lösung auf einen Glasobjektträger getropft und in Flüssigkeit und/oder als getrockneter Feststoff untersucht.

#### b) 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 (Tip-Radius zwischen 6 und 10 nm). Eine Tip-Korrektur wurde nicht durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer Kraftkonstanten von  $42 \text{ Nm}^{-1}$  bei einer Resonanzfrequenz von 285 kHz angefertigt. Die Abbildung wurde mit einem  $10 \times 10 \text{ }\mu\text{m}$  e-scanner aufgenommen. Die Probenpräparation erfolgte durch Spincoating von verdünnten Lösungen (0,05 bis 0,5 mg/ml) auf frisch abgezogene Mica-Substrate. Es wurden jeweils  $10 \text{ }\mu\text{l}$  auf das drehende Substrat ( $3000 \text{ min}^{-1}$ ) getropft und bis zur Trockne gedreht. Die ausgemessenen Breiten, Längen und Höhen wurden jeweils über mind. 20 Werte gemittelt.

#### c) Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gekoppelt mit Elektronenbeugung (SAED)

Die TEM Aufnahmen erfolgten an einem Elektronenmikroskop OMEGA 912 der Firma Zeiss mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV. Als Probenträger wurden mit Kohlenstoff bedampfte Kupfer-Grids verwendet. Die Präparierung der Proben erfolgte durch das Aufbringen eines Tropfens einer verdünnten Lösung (0,1-0,5 mg/ml) auf das Kupfer-Grid und anschließende Trocknung bei Raumtemperatur. Es erfolgte keine Kontrastierung, da diese die SAED Messergebnisse beeinflussen würde.

### 6.2.2.4 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die SAXS Kurven wurden an einem Nonius Drehanode Instrument (4 kW, Cu  $K\alpha$ ) mit Lochblenden Kollimation und einem MARCCD Detektor (Pixelgröße: 79) bei Raumtemperatur aufgenommen. Der Abstand zwischen Probe und Detektor betrug 74 cm, resultierend in einem Streuvektorbereich von  $s = 2/\lambda \sin \theta = 0,04 - 0,7 \text{ nm}^{-1}$  ( $2\theta =$  Streuwinkel,  $\lambda = 0,154 \text{ nm}$ ). 2D Beugungsbilder wurden in 1D radiale Mittelwerte der Streuintensität umgewandelt.



## 6.3 Charakterisierungsmethoden (theoretischer Teil)

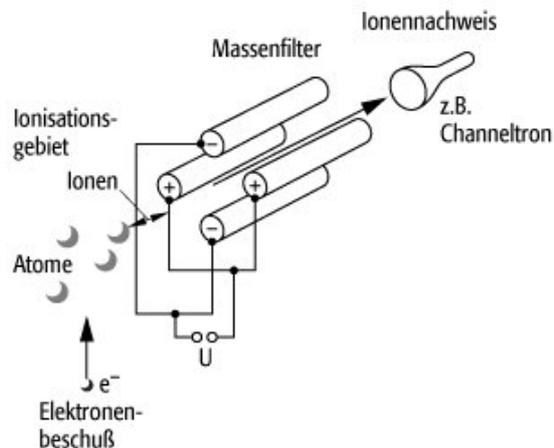
### 6.3.1 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) ist, ähnlich der *matrix assisted laser desorption / ionisation* (MALDI) – Massenspektrometrie, eine geeignete Methode zur Untersuchung von organischen Molekülen, Proteinen und Nukleotiden, die sich durch herkömmliche Ionisierungsmethoden (Elektronenstoß-Ionisation (EI), chemische Ionisation (CI)) nicht unzersetzt im Vakuum verdampfen lassen.<sup>[164,165]</sup>

Für die Messung wird eine stark verdünnte Lösung der Probe ( $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  mol/l) durch ein elektrostatisches Feld sehr fein dispergiert. Es bilden sich zunächst kleine, geladene Tröpfchen, die durch Verdampfen des Lösungsmittels spontan zu Mikrotröpfchen zerfallen (Coulomb-Explosionen) und abschließend werden die Analytmoleküle beim Transfer in das Massenspektrometer desolvatisiert. Neben den Quasimolekularionen, d.h.  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  etc. werden mit ESI-MS auch mehrfach geladene Ionen nach der allgemeinen Formel  $[M+nX]^{n+}$  detektiert, wobei X für Begleitonen wie  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  oder  $Li^+$  steht. Bei der Analyse von Mischungen muss beachtet werden, dass einige Substanzen besser ionisiert werden können als andere und das Spektrum dominieren, obwohl sie möglicherweise nur in geringer Menge in der Probe vorhanden sind.

Eine Kopplung mit HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) ist in solchen Fällen sehr vorteilhaft, da dann die Fraktionen einzeln untersucht werden können. HPLC ist eine leistungsfähige Chromatographiemethode zur Trennung chemischer Stoffgemische, insbesondere auch von Peptiden und Proteinen.<sup>[166]</sup>

Ein Nachteil der „weichen“ Elektrospray-Ionisation liegt darin, dass oft zwischen kovalent und anderweitig gebundenen Spezies nicht unterschieden werden kann. Auf der anderen Seite stehen einige Vorteile, u.a. wenig bis keine Fragmentierung, die Analysierbarkeit von großen, mehrfach geladenen Molekülen und die Koppelbarkeit an Trennverfahren wie HPLC oder Kapillarelektrophorese, die die Untersuchung einzelner Komponenten der Mischung wesentlich vereinfachen. Die Detektion erfolgt häufig mit einem Quadrupol-Massendetektor (Abb. 6.2). Es handelt sich dabei um vier parallel angeordnete Metallstäbe, die als Elektroden zur Überlagerung einer Wechsel- und einer Gleichspannung genutzt werden. Gegenüberliegende Elektroden haben die gleiche Polarität. Dadurch wird ein Quadrupolfeld erzeugt, in das die ionisierten Teilchen eintreten.



**Abb. 6.2:** Vereinfachte Darstellung eines Quadrupol-Massenspektrometers<sup>[167]</sup>

Durch die Geometrie der Anordnung und die Frequenz der Wechselspannung werden nur Teilchen bestimmter Energie und eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses ungestört durch das Quadrupolfeld beschleunigt. Alle anderen Ionen führen eine oszillierende Bewegung aus und erreichen den Auslass der Elektrodenanordnung nicht. Die Ionen, die das Feld passieren konnten, werden mit einer Elektrode oder einem Elektronenvervielfacher nachgewiesen. Ein Massenspektrum entsteht, wenn die Frequenz der Wechselspannung verändert wird und dadurch jeweils Ionen mit anderen  $m/z$ -Verhältnissen das Quadrupolfeld passieren.

### 6.3.2 Circulardichroismus (CD) – Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine sehr gute Methode, um den Gehalt an Sekundärstrukturen von Peptiden und Proteinen in Lösung abschätzen zu können.

Für diese Spektroskopie-Art ist eine optische Aktivität (Chiralität) des betreffenden Moleküls notwendig (chiroptische Methode). Dies kann durch die Struktur des Moleküls, aber auch durch seine räumliche Anordnung gegeben sein. Rechts und links polarisiertes Licht wird von optisch aktiven Substanzen unterschiedlich gebrochen. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes und die Brechungsindices sind nicht gleich ( $n_L \neq n_R$ ). Dabei können grundsätzlich zwei verschiedene Effekte auftreten. Wird die linear polarisierte Welle beim Durchlaufen des Mediums wellenlängenabhängig in ihrer Polarisationsrichtung gedreht, spricht man von optischer Rotationsdispersion (ORD). Werden die beiden zirkular polarisierten Komponenten, aus denen eine linear polarisierte Welle zusammengesetzt ist, zusätzlich verschieden stark absorbiert, so liegt Circulardichroismus (CD) vor.

Eine weitere Bedingung für CD ist die Fähigkeit des Moleküls, Licht zu absorbieren. Wechselt ein Elektron in ein energetisch höher gelegenes Orbital, tritt bei einer asymmetrischen Elektronenverteilung eine helikale Ladungsverschiebung auf, so dass sich ein Magnetfeld aufbaut. Dieses kann durch das magnetische Übergangsdipolmoment  $m$  beschrieben werden. Schließen  $m$  und das elektrische Übergangsdipolmoment  $\mu$  einen spitzen Winkel ein, so tritt ein positiver *Cotton-Effekt* auf, bei einem stumpfen Winkel ein negativer. Die eigentliche Messgröße beim CD ist der Unterschied der Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  für links bzw. rechts polarisiertes Licht (aus historischen Gründen verwendet man jedoch die Elliptizität  $\Theta$ ).

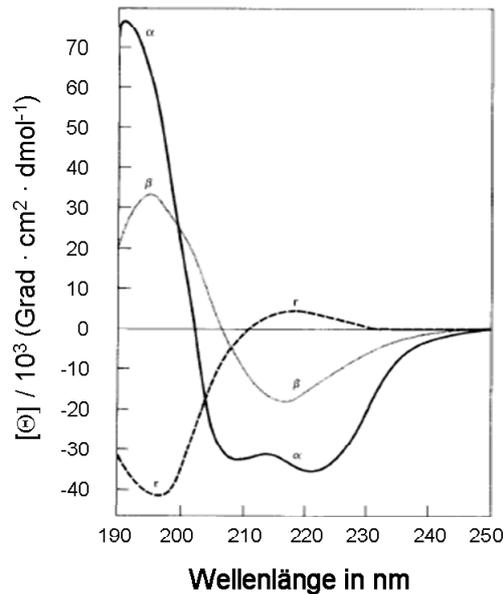
$$\Theta(\lambda) = K \cdot |\varepsilon_L - \varepsilon_R| \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl.6.1})$$

Dabei ist  $d$  die Schichtdicke [cm],  $c$  die Konzentration [mol/l],  $\varepsilon_R$ ,  $\varepsilon_L$  die Extinktionskoeffizienten für rechts bzw. links zirkular polarisiertes Licht [l/(mol·cm)] und  $K$  ein Faktor gegeben durch  $K = \ln 10 \cdot 180 / 4\pi \approx 33$ .

Durch Normierung auf die molare Masse  $M$  wird die molare Elliptizität [ $\Theta$ ] erhalten. Sie wird in  $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$  angegeben.

$$[\Theta] = \frac{M \cdot \Theta}{10 \cdot c \cdot d} \quad (\text{Gl.6.2})$$

Der Zusammenhang der beiden Größen lässt sich veranschaulichen, wenn man sich das linear polarisierte Licht in zwei gegenläufigen zirkular polarisierten Wellen zerlegt vorstellt. Beim Durchtritt durch die Messlösung wird die eine Welle stärker absorbiert als die andere. Werden die beiden Wellen dann wieder addiert, ist das Ergebnis nicht mehr linear, sondern elliptisch polarisiertes Licht. Biopolymere wie Peptide, Proteine, DNA und RNA besitzen aufgrund ihres Aufbaus eine chirale Struktur. Da es durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen zur spezifischen Kopplung von Chromophoren kommt, kann für jede Peptid-Sekundärstruktur ein charakteristisches CD-Spektrum gemessen werden.<sup>[168]</sup> Abbildung 6.3 zeigt typische CD-Spektren für Peptide. CD-Messungen ermöglichen daher eine gute Aussage, welche Sekundärstruktur das Peptid annimmt (ungefaltet,  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblattstruktur).



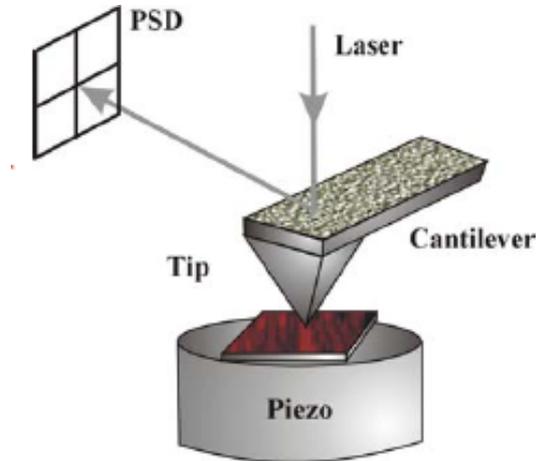
**Abb. 6.3:** Typische CD-Spektren für  $\alpha$ -Helix( $\alpha$ ),  $\beta$ -Faltblatt( $\beta$ ) und statistische Anordnung( $r$ ).<sup>[169]</sup>

### 6.3.3 Rasterkraftmikroskopie

Durch die Entwicklung der Rastertunnelmikroskopie (*scanning tunneling microscopy* (STM)) und der Rasterkraftmikroskopie (*scanning force microscopy* (SFM) oder *atomic force microscopy* (AFM)) in den 1980er Jahren durch G. Binnig und H. Rohrer wurden große Fortschritte für die direkte Abbildung auf der atomaren Größenskala erzielt.<sup>[170]</sup> So konnten durch diese Technologie, die 1986 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde, erstmals Strukturen und Vorgänge auf der Ebene von Atomen und Molekülen bildlich dargestellt werden. Rasterkraftmikroskopie wird heute in großem Maße für die Untersuchung von Biomolekülen und biologischen Proben angewendet.

Durch das mechanische Abtasten einer Probenoberfläche mit einer feinen Spitze wird eine topographische Karte der Oberfläche erstellt. Die Entfernung der Spitze von der Oberfläche kann durch einen piezoelektrischen Antrieb sehr klein, auf bis zu ca. 0,001 nm eingestellt werden. Durch zwei weitere piezoelektrische Stellelemente lassen sich Probe und Spitze in x- und y-Richtung mit einer Genauigkeit von bis zu 0,01 nm gegeneinander verschieben. Dadurch kann die Oberfläche rasterartig abgetastet werden. Zwischen der Tunnelspitze des STM und der Probe wird beim AFM eine zusätzliche Spitze angebracht, die mit Federkraft auf die Probe gedrückt wird. Die Spitze folgt der Topographie und bewegt sich auf und ab.

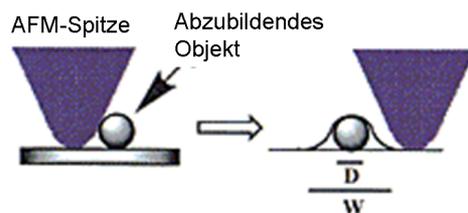
Diese Bewegung wird dabei optisch verfolgt, indem von der Rückseite der Feder ein Laserstrahl in eine segmentierte Photodiode (PSD) reflektiert wird (Abbildung 6.4).



**Abb. 6.4:** Schematische Darstellung der Messanordnung eines AFM-Mikroskops

Durch die Photoströme, die in den unterschiedlichen Segmenten der Diode gemessen werden, können die Winkel, in denen sich die Feder verbogen hat, berechnet werden. Aus diesen Werten kann direkt ein Höhenprofil erstellt werden. Im Kontaktmodus wird die Auslenkung der Feder relativ zur Probe über eine Regelschleife konstant gehalten. Hier wird die topographische Karte durch die z-Position des Piezos bestimmt.

Die Spitzen bestehen hier meist aus Silizium oder Siliziumnitrid. Ein Nachteil des Kontaktmodus besteht darin, dass die Spitzenradien bei 6 bis 10 nm liegen. Bei der Bewegung der großen Spitze über die Probe werden topographische Details nicht unverzerrt abgebildet. Erhebungen werden dabei tendenziell über- und Vertiefungen unterschätzt. Kleinere Objekte werden aufgrund des Faltungseffektes vergrößert abgebildet, d.h. der wirkliche Durchmesser  $D$  entspricht nicht der gemessenen Breite  $B$  (Abb. 6.5).



**Abb. 6.5:** Schematische Darstellung einer AFM-Messung: der wirkliche Durchmesser  $D$  entspricht aufgrund von Faltungseffekten nicht der gemessenen Breite  $B$ .<sup>[7]</sup>

Es können Strukturen gefunden werden, die als Abbild der Spitze gelten, sie haben eine ähnliche Größenordnung. Des Weiteren können steile Vertiefungen von der Spitze nicht berührt werden und erscheinen daher verfälscht auf dem topographischen Bild.<sup>[171]</sup>

Eine andere Variante des Kraftmikroskops erlaubt kontaktfreies Arbeiten.<sup>[172]</sup> Beim so genannten *Tapping-Mode* befindet sich die federnd aufgehängte Spitze in 2 bis 20 nm großer Entfernung zur Probenoberfläche. Hier wird wie beim STM mit Potentialunterschieden gearbeitet. Allerdings sind hier die in diesem Abstandsbereich auftretenden anziehenden van-der-Waals-Kräfte zwischen Probe und Spitze interessant. Das van-der-Waals-Potential ist vom Abstand abhängig und wird in ähnlicher Weise wie der Tunnelstrom beim STM genutzt. Die Spitze wird nahe der Eigenfrequenz  $\omega_0$  zur Schwingung gebracht und dann der Oberfläche angenähert. Dabei überlagert sich dem Spitzenpotential der Eigenfrequenz  $\omega_0$  das van-der-Waals-Potential. Dadurch wird die Resonanzfrequenz  $\delta\omega = \omega - \omega_0$  erniedrigt, die Amplitude der Schwingung nimmt ab. Die Schwingungsamplitude ist ein Maß für den Abstand der Spitze von der Oberfläche und ermöglicht den Gewinn von Informationen über die Topographie der Oberfläche.

Auf dem segmentierten Photodetektor, der hier ebenfalls verwendet wird, bewegt sich der von der Spitze reflektierte Lichtfleck mit der Schwingungsfrequenz der Spitze. Mit Hilfe der Auslenkung dieser Schwingung lässt sich die Schwingungsamplitude berechnen. Die Spitze wird daraufhin über eine Regelung in gleichmäßigem Abstand über die Oberfläche gefahren. Die Signale der x-, y-, z- Regelung werden anschließend in eine graphische Darstellung umgewandelt. Diese Methode ist daher besonders für weiche Proben wichtig, um eine Zerstörung im *Kontakt-Mode* zu verhindern.

### 6.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erlaubt eine direkte Abbildung der Probe. Sie nutzt dabei im Wesentlichen die Welleneigenschaften von Elektronen. Nach De Broglie hängt deren Wellenlänge  $\lambda$  mit dem Impuls  $p$  der Elektronen zusammen:

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v} = \frac{h}{p} \quad (\text{Gl. 6.3})$$

Wird eine Beschleunigungsspannung von 50 kV verwendet, so können Wellenlängen von bis zu 0,005 nm erreicht werden. Im Vergleich zur Lichtmikroskopie (Auflösungsvermögen  $\approx$  200 nm) kann dadurch ein wesentlich höheres Auflösungsvermögen erreicht werden.

Als Elektronenquelle dient eine Glühkathode, beispielsweise ein beheizter Wolframdraht, oder eine Feldemissionskathode. Die emittierten Elektronen würden mit Luftmolekülen kollidieren und werden daher im Hochvakuum beschleunigt. Die verwendete Spannung beträgt zwischen 50 und 200 kV. Die von der Elektronenquelle gelieferten Elektronen werden von einem Kondensator-Linsensystem so abgelenkt, dass sie parallel auf die Probe treffen und den betrachteten Probenabschnitt gleichmäßig ausleuchten.

Die optischen Komponenten eines TEM entsprechen formal den Komponenten eines Lichtmikroskops. Anstelle von Kondensator, Objektiv und Okular werden jedoch Elektronenlinsen eingesetzt. Durch ein Projektiv-Linsensystem hinter der Probe wird das vom Objektiv-Linsensystem kommende Bild vergrößert und auf einen Detektor geworfen. Dafür wird häufig eine CCD-Kamera verwendet.

Die Elektronen werden von der Probe gestreut und verlieren dabei teilweise auch Bewegungsenergie (inelastische Streuung). Probenbereiche mit hoher Dichte oder schweren Elementen können Elektronen ablenken und werden dadurch vom Detektor nicht erfasst. Diese Probenbereiche erscheinen daher dunkel. Bereiche mit einer geringen Materiedichte erscheinen heller. Organische und biologische Proben besitzen meist keine schweren Elemente und müssen daher kontrastiert werden. Als elektronendichte Kontrastierungsmittel kommen üblicherweise Schwermetallsalze (z.B. Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure) zum Einsatz.<sup>[173]</sup>



## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
ACN	Acetonitril
AFM	Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy)
AS	Aminosäure
Asp (D)	L-Asparaginsäure
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerisation
CD	Circulardichroismus
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4,4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Gly (G)	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatografie
HBTU	O-Benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat
Hmb	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
IR	Infrarot
Lys (K)	L-Lysin
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation
MeOH	Methanol
MMA	Methylmethacrylat
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MWCO	Molekulargewichts-Cutoff einer Dialysemembran

---

NaOH	Natriumhydroxid
<i>n</i> Ba	<i>n</i> -Butylacrylat
NIPAM	<i>N</i> -Isopropylacrylamid
NMI	1-Methylimidazol
NMP	2- <i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMP	Nitroxide-mediated Polymerisation
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, kernmagnetische Resonanz
<i>n</i> Phe	para-Nitrophenylalanin
OEGA	Oligoethylenglycolacrylat
PEO	Polyethylenoxid
Phe (F)	L-Phenylalanin
<i>Pn</i> BA	Poly- <i>n</i> -butylacrylat
ppm	parts per million
PS	Polystyrol
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium–hexafluorophosphat
RAFT	Reversibler Addition Fragmentation Kettentransfer (Polymerisation)
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (small angle x-ray scattering)
Ser (S)	L-Serin
SEM	Rasterelektronenmikroskop; -mikroskopie
<i>t</i> Boc	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
TEM	Transmissionselektronenmikroskop; -mikroskopie
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
Thr (T)	L-Threonin
TOF	Time-of-Flight / Flugzeit (-Detektor der Massenspektrometrie)
Trp (W)	L-Tryptophan
Trt	Trityl-
Val (V)	L-Valin
WAXS	Röntgenweitwinkelstreuung (wide angle x-Ray scatterin)
<i>wt.</i> %	Gewichtsprozent

## Literaturverzeichnis

1. Oroudjev, E.; Soares, J.; Arcidiacono, S.; Thompson, J. B.; Fossey, S. A.; Hansma, H. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 6460-6465.
2. Smith, B. L.; Schaffer, T. E.; Viani, M.; Thompson, J. B.; Frederick, N. A.; Kindt, J.; Belcher, A.; Stucky, G. D.; Morse, D. E.; Hansma, P. K. *Nature* **1999**, *399*, 761-763.
3. Thompson, J. B.; Kindt, J. H.; Drake, B.; Hansma, H. G.; Morse, D. E.; Hansma, P. K. *Nature* **2001**, *414*, 773-776.
4. Börner, H. G.; Schlaad, H. *Soft Matter* **2007**, *3*, 394-408.
5. Klok, H. A.; Schlaad, H., Eds. *Peptide Hybrid Polymers*; Springer Berlin, 2006; Vol. 202.
6. Börner, H. G. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 124-130.
7. Lashuel, H. A.; LaBrenz, S. R.; Woo, L.; Serpell, L. C.; Kelly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5262-5277.
8. Aggeli, A.; Bell, M.; Carrick, L. M.; Fishwick, C. W. G.; Harding, R.; Mawer, P. J.; Radford, S. E.; Strong, A. E.; Boden, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9619-9628.
9. Eckhardt, D.; Groenewolt, M.; Krause, E.; Börner, H. G. *Chem. Commun.* **2005**, 2814-2816.
10. Hentschel, J.; Krause, E.; Börner, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* 7722 - 7723.
11. Aggeli, A.; Nyrkova, I. A.; Bell, M.; Harding, R.; Carrick, L.; McLeish, T. C. B.; Semenov, A. N.; Boden, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 11857-11862.
12. Mutter, M.; Chandravarkar, A.; Boyat, C.; Lopez, J.; Dos Santos, S.; Mandal, B.; Mimna, R.; Murat, K.; Patiny, L.; Saucedo, L.; Tuchscherer, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 4172-4178.
13. Carpino, L. A.; Krause, E.; Sferdean, C. D.; Schuemann, M.; Fabian, H.; Bienert, M.; Beyermann, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7519-7523.
14. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Chem. Commun.* **2004**, 124-125.
15. Hentschel, J. Diplomarbeit, Universität Potsdam, **2005**.
16. Riess, G. *Progress in Polymer Science* **2003**, *28*, 1107-1170.
17. Antonietti, M.; Heinz, S.; Schmidt, M.; Rosenauer, C. *Macromolecules* **1994**, *27*, 3276-3281.

18. Schillen, K.; Brown, W.; Johnsen, R. M. *Macromolecules* **1994**, *27*, 4825-4832.
19. Discher, D. E.; Eisenberg, A. *Science* **2002**, *297*, 967-973.
20. Soo, P. L.; Eisenberg, A. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **2004**, *42*, 923-938.
21. Förster, S.; Plantenberg, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 688-714.
22. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*; Academic Press: London, **1985**.
23. Forster, S.; Zisenis, M.; Wenz, E.; Antonietti, M. *Journal of Chemical Physics* **1996**, *104*, 9956-9970.
24. Forster, S.; Antonietti, M. *Advanced Materials* **1998**, *10*, 195.
25. Daoud, M.; Cotton, J. P. *Journal De Physique* **1982**, *43*, 531-538.
26. Halperin, A.; Tirrell, M.; Lodge, T. P. *Advances in Polymer Science* **1992**, *100*, 31-71.
27. Antonietti, M.; Forster, S. *Advanced Materials* **2003**, *15*, 1323-1333.
28. Luo, L. B.; Eisenberg, A. *Langmuir* **2001**, *17*, 6804-6811.
29. Shen, H. W.; Eisenberg, A. *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39*, 3310.
30. Zhang, L. F.; Yu, K.; Eisenberg, A. *Science* **1996**, *272*, 1777-1779.
31. Choucair, A.; Eisenberg, A. *European Physical Journal E* **2003**, *10*, 37-44.
32. Stryer, L. *Biochemistry*, 4th ed.; W. H. Freeman and Company: New York, **1995**.
33. Pauling, L.; Corey, R. B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, *37*, 251-256.
34. Pauling, L.; Corey, R. B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, *37*, 729-740.
35. *Bild von © Irvine Geis.*
36. Loughlin, W. A.; Tyndall, J. D. A.; Glenn, M. P.; Fairlie, D. P. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6085-6117.
37. Jakubke, H. D. *Peptide*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Berlin, **1996**.
38. Internetseite. <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Slides/Protein%20Structure/>.
39. Nesloney, C. L.; Kelly, J. W. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4*, 739-766.
40. Fishwick, C. W. G.; Beevers, A. J.; Carrick, L. M.; Whitehouse, C. D.; Aggeli, A.; Boden, N. *Nano Letters* **2003**, *3*, 1475-1479.
41. Chou, P. Y.; Fasman, G. D. *Annual Review of Biochemistry* **1978**, *47*, 251-276.
42. Xiong, H. Y.; Buckwalter, B. L.; Shieh, H. M.; Hecht, M. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 6349-6353.

43. Smith, C. K.; Regan, L. *Science* **1995**, *270*, 980-982.
44. Aggeli, A.; Bell, M.; Carrick, L. M.; Fishwick, C. W. G.; Harding, R.; Mawer, P. J.; Radford, S. E.; Strong, A. E.; Boden, N. *Journal Of The American Chemical Society* **2003**, *125*, 9619-9628.
45. Shen, Y.; Johnson, M. A.; Martin, D. C. *Macromolecules* **1998**, *31*, 8857-8864.
46. van Hest, J. C. M.; Tirrell, D. A. *Chemical Communications* **2001**, *19*, 1897-1904.
47. Stefani, M.; Dobson, C. M. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* **2003**, *81*, 678-699.
48. Soto, C. *Nature Reviews Neuroscience* **2003**, *4*, 49-60.
49. Glenner, G. G. *New England Journal of Medicine* **1980**, *302*, 1283-1292.
50. Glenner, G. G.; Terry, W.; Harada, M.; Isersky, C.; Page, D. *Science* **1971**, *172*, 1150.
51. Fischer, E. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 530-610.
52. Merrifield, R. B. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149.
53. Schussler, H.; Zahn, H. *Chemische Berichte-Recueil* **1962**, *95*, 1076.
54. Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C. W.; Lee, Y. S.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mugge, C.; Wenschuh, H.; Klose, K.; Beyermann, M.; Bienert, M. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41*, 442-445.
55. Fields, G. B.; Noble, R. L. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1990**, *35*, 161-214.
56. Benoiton, N. L. *Biopolymers* **1996**, *40*, 245-254.
57. Coste, J.; Lenguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 205-208.
58. Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 4853-4856.
59. Kent, S. B. H. *Annual Review of Biochemistry* **1988**, *57*, 957-989.
60. Quibbel, M.; Johnson, T. *Difficult peptides. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach.*; OUP: Oxford, **2000**.
61. Bedford, J.; Hyde, C.; Johnson, T.; Jun, W.; Owen, D.; Quibell, M.; Sheppard, R. C. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1992**, *40*, 300-307.
62. Hyde, C.; Johnson, T.; Owen, D.; Quibell, M.; Sheppard, R. C. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1994**, *43*, 431-440.
63. Larsen, B. D.; Holm, A. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1994**, *43*, 1-9.
64. Fields, G. B.; Fields, C. g. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4202-4207.

65. Thaler, A.; Seebach, D.; Cardinaux, F. *Helvetica Chimica Acta* **1991**, *74*, 628-643.
66. Tam, J. P.; Lu, Y. A. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 12058-12063.
67. Tam, J. P. In *Peptides: Structure and Function*, **1985**; pp. 423–425.
68. Milton, R. C. D.; Milton, S. C. F.; Adams, P. A. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 6039-6046.
69. Blaakmeer, J.; Tijssseklasen, T.; Tesser, G. I. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, *37*, 556-564.
70. Johnson, T.; Quibell, M.; Owen, D.; Sheppard, R. C. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1993**, 369-372.
71. Sampson, W. R.; Patsiouras, H.; Ede, N. J. *Journal of Peptide Science* **1999**, *5*, 403-409.
72. Haack, T.; Mutter, M. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 1589-1592.
73. Wohr, T.; Mutter, M. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 3847-3848.
74. Coin, I.; Dölling, R.; Krause, E.; Bienert, M.; Beyermann, M.; Sferdean, C., D.; Carpino, L. A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6171.
75. Dos Santos, S.; Chandravarkar, A.; Mandal, B.; Mimna, R.; Murat, K.; Saucedo, L.; Tella, P.; Tuchscherer, G.; Mutter, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 11888-11889.
76. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 5965-5968.
77. Applied-Biosystems *User Manual Peptide Synthesizer ABI 433A*, **2001**.
78. Deming, T. J. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 858-875.
79. Billot, J. P.; Douy, A.; Gallot, B. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1976**, *177*, 1889-1893.
80. Billot, J. P.; Douy, A.; Gallot, B. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1977**, *178*, 1641-1650.
81. Perly, B.; Douy, A.; Gallot, B. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1976**, *177*, 2569-2589.
82. Klok, H. A. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2005**, *43*, 1-17.
83. Van Hest, J. C. M. *Polymer Reviews* **2007**, *47*, 63-92.
84. Borner, H. G. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 124-130.

85. Hellermann, H.; Lucas, H. W.; Maul, J.; Pillai, V. N. R.; Mutter, M. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1983**, *184*, 2603-2617.
86. Vandermeulen, G. W. M.; Tziatzios, C.; Klok, H. A. *Macromolecules* **2003**, *36*, 4107-4114.
87. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 459-476.
88. Chilkoti, A.; Chen, G. H.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S. *Bioconjugate Chemistry* **1994**, *5*, 504-507.
89. Velonia, K.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *J. AM. CHEM. SOC.* **2002**, *124*, 4224-4225.
90. Shimoboji, T.; Ding, Z. L.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13*, 915-919.
91. Stayton, P. S.; Shimoboji, T.; Long, C.; Chilkoti, A.; Chen, G. H.; Harris, J. M.; Hoffman, A. S. *Nature* **1995**, *378*, 472-474.
92. Kinstler, O.; Molineux, G.; Treuheit, M.; Ladd, D.; Gegg, C. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 477-485.
93. Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
94. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41*, 2596-+.
95. Breinbauer, R.; Kohn, M. *Chembiochem* **2003**, *4*, 1147-1149.
96. Kohn, M.; Breinbauer, R. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 3106-3116.
97. Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 93-146.
98. Becker, M. L.; Liu, J. Q.; Wooley, K. L. *Chem. Commun.* **2003**, 180-181.
99. Mei, Y.; Beers, K. L.; Byrd, H. C. M.; Vanderhart, D. L.; Washburn, N. R. *Journal Of The American Chemical Society* **2004**, *126*, 3472-3476.
100. Ayres, L.; Hans, P.; Adams, J.; Lowik, D.; van Hest, J. C. M. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2005**, *43*, 6355-6366.
101. Rettig, H. Dissertation, Universität Potsdam, **2006**.
102. Rettig, H.; Krause, E.; Boerner, H. G. *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1251-1256.
103. Ayres, L.; Vos, M. R. J.; Adams, P.; Shklyarevskiy, I. O.; van Hest, J. C. M. *Macromolecules* **2003**, *36*, 5967-5973.

104. Boyer, C.; Bulmus, V.; Liu, J. Q.; Davis, T. P.; Stenzel, M. H.; Barner-Kowollik, C. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 7145-7154.
105. Liu, J. Q.; Bulmus, V.; Herlambang, D. L.; Barner-Kowollik, C.; Stenzel, M. H.; Davis, T. R. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 3099-3103.
106. ten Cate, M. G. J.; Rettig, H.; Bernhardt, K.; Boerner, H. G. *Macromolecules* **2005**, *38*, 10643-10649.
107. Ayres, L.; Grotenbreg, G. M.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Overhand, M.; van Hest, J. C. M. *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, *26*, 1336-1340.
108. Matyjaszewski, K., Ed. *Controlled-living radical polymerization: Progress in ATRP, NMP and RAFT*; American Chemical Society: Washington, DC, **2000**; Vol. 768.
109. Georges, M. K.; Veregin, R. P. N.; Kazmaier, P. M.; Hamer, G. K. *Macromolecules* **1993**, *26*, 2987-2988.
110. Hawker, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 11185-11186.
111. Hawker, C. J.; Bosman, A. W.; Harth, E. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 3661-3688.
112. Wang, J. S.; Matyjaszewski, K. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 5614-5615.
113. Curran, D. P. *Synthesis* **1988**, 489.
114. Matyjaszewski, K.; Xia, J. H. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 2921-2990.
115. Xia, J. H.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **1999**, *32*, 5199-5202.
116. J. Xia; X. Zhang; Matyjaszewski, K. *Transition Metal Catalysis in Macromolecular Design*; American Chemical Society: Washington, DC, **2000**; Vol. 760.
117. Shen, Y. Q.; Zhu, S. P.; Zeng, F. Q.; Pelton, R. H. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2000**, *201*, 1169-1175.
118. Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559-5562.
119. Moad, G.; Chong, Y. K.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polymer* **2005**, *46*, 8458-8468.
120. Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Australian Journal of Chemistry* **2005**, *58*, 379-410.
121. Perrier, S.; Takolpuckdee, P. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2005**, *43*, 5347-5393.

122. König, H. M.; Kilbinger, A. F. M. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 8334-8340.
123. Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, *366*, 324-327.
124. Block, M. A. B.; Hecht, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6986-6989.
125. Couet, J.; Samuel, J. D. J. S.; Kopyshchev, A.; Santer, S.; Biesalski, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3297-3301.
126. ten Cate, M. G. J.; Severin, N.; Börner, H. G. *Macromolecules* **2006**, *39*, 7831-7838.
127. Burkoth, T. S.; Benzinger, T. L. S.; Urban, V.; Lynn, D. G.; Meredith, S. C.; Thiagarajan, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7429-7430.
128. Collier, J. H.; Messersmith, P. B. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 907-910.
129. Jahnke, E.; Millerieux, A. S.; Severin, N.; Rabe, J. P.; Frauenrath, H. *Macromolecular Bioscience* **2007**, *7*, 136-143.
130. Smith, C. K.; Withka, J. M.; Regan, L. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5510-5517.
131. Janek, K.; Behlke, J.; Zipper, J.; Fabian, H.; Georgalis, Y.; Beyermann, M.; Bienert, M.; Krause, E. *Biochemistry* **1999**, *38*, 8246-8252.
132. Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Oxford University Press: Oxford, **2000**.
133. Hamley, I. W.; Ansari, I. A.; Castelletto, V.; Nuhn, H.; Rosler, A.; Klok, H. A. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1310-1315.
134. Kaiser, E.; Colescot, R.; Bossing, C.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-599.
135. Hentschel, J.; Börner, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14142-14149.
136. ten Cate, M. G. J.; Boerner, H. G. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 1437-1446.
137. Bathfield, M.; D'Agosto, F.; Spitz, R.; Charreyre, M. T.; Delair, T. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2546-2547.
138. Zhao, Y. L.; Perrier, S. *Chemical Communications* **2007**, 4294-4296.
139. Hentschel, J.; tenCate, M. G. J.; Börner, H. G. *Macromolecules* **2007**, *40*, 9224-9232.
140. Rzaev, J.; Hillmyer, M. A. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3-5.
141. Wang, R.; McCormick, C. L.; Lowe, A. B. *Macromolecules* **2005**, *38*, 9518-9525.
142. Convertine, A. J.; Ayres, N.; Scales, C. W.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1177-1180.
143. Lai, J. T.; Filla, D.; Shea, R. *Macromolecules* **2002**, *35*, 6754-6756.
144. Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. D. *Science* **1987**, *238*, 491-497.

145. Hentschel, J.; Bleek, K.; Ernst, O.; Lutz, J. F.; Borner, H. G. *Macromolecules* **2008**, *41*, 1073-1075.
146. Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Chapman, D. *Biochemistry* **1993**, *32*, 389-394.
147. Altmann, K. H.; Florsheimer, A.; Mutter, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 314-319.
148. Creighton, T. E. *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed.; W.H. Freeman: New York, **1993**.
149. Zhang, S. G. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 321-339.
150. Cornelissen, J.; Fischer, M.; Sommerdijk, N.; Nolte, R. J. M. *Science* **1998**, *280*, 1427-1430.
151. Aggeli, A.; Bell, M.; Boden, N.; Keen, J. N.; McLeish, T. C. B.; Nyrkova, I.; Radford, S. E.; Semenov, A. *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 1135-1145.
152. Hwang, W.; Marini, D. M.; Kamm, R. D.; Zhang, S. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 389-397.
153. Fishwick, C. W. G.; Beevers, A. J.; Carrick, L. M.; Whitehouse, C. D.; Aggeli, A.; Boden, N. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1475-1479.
154. Schlaad, H.; Smarsly, B.; Below, I. *Macromolecules* **2006**, *39*, 4631-4632.
155. Boerner, H. G.; Beers, K.; Matyjaszewski, K.; Sheiko, S. S.; Moeller, M. *Macromolecules* **2001**, *34*, 4375-4383.
156. Potemkin, I. I.; Khokhlov, A. R.; Prokhorova, S.; Sheiko, S. S.; Moeller, M.; Beers, K. L.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2004**, *37*, 3918-3923.
157. Zhang, S.; Zhao, X. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2082-2086.
158. Gorman, P. M.; Chakrabartty, A. *Biopolymers* **2001**, *60*, 381-394.
159. Internetseite. <http://labs.ansci.uiuc.edu/meatscience/Library/collagen.htm>.
160. Prockop, D. J.; Fertala, A. *Journal of Structural Biology* **1998**, *122*, 111-118.
161. Keller, R. N.; Wycoff, W. M. *Inorg. Synth.* **1946**, *2*, 1.
162. Cai-AI-Yuan, P.; Lei, T.; De-Cheng, W. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39*, 3062-3072.
163. Rajagopal, S.; Spatola, A. F. *Appl. Catal. A. Gen.* **1997**, *152*, 69.
164. Aebersold, R.; Mann, M. *Nature* **2003**, *422*, 198-207.
165. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, *246*, 64-71.

166. Aguilar, M.-I., Ed. *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*; Humana Press: Totowa, USA, **2003**.
167. *Wissenschaft Online - Lexikon der Physik*; Spektrum akademischer Verlag.
168. Johnson, W. C. *Proteins-Structure Function and Genetics* **1990**, 7, 205-214.
169. Greenfield, N.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1969**, 8, 4108.
170. Binning, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. *Physical Review Letters* **1982**, 49, 57-61.
171. Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. *Physical Review Letters* **1986**, 56, 930-933.
172. Moller, C.; Allen, M.; Elings, V.; Engel, A.; Muller, D. J. *Biophysical Journal* **1999**, 77, 1150-1158.
173. Flegler, S. L.; Heckman, J. W.; Klomparens, K. L. *Elektronenmikroskopie*; Spektrum Verlag: Heidelberg, **1995**.



# Verzeichnis der Publikationen und Präsentationen<sup>1</sup>

## Publikationen:

- **Hentschel, J.**; Krause, E.; Börner, H. G.: "Switch-peptides to Trigger the Peptide Guided Assembly of Poly(ethylene oxide)-Peptide Conjugates into Tape Structures" *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7722.
- **Hentschel, J.**; Börner, H. G.: "Peptide-Directed Microstructure Formation of Polymers in Organic Media" *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14142.
- **Hentschel, J.**; ten Cate, M. G. J. Börner, H. G.: "Peptide-guided Organization of Peptide-polymer Conjugates: Expanding the Approach from Oligo- to Polymers." *Macromolecules* **2007**, *40*, 9224.
- **Hentschel, J.**; Bleek, K.; Ernst, O.; Lutz, J.F.; Börner, H. G.; "Easy access to Bioactive Peptide-polymer Conjugates via RAFT" *Macromolecules* **2008**, *41*, 1073.
- Muentzer, A.; **Hentschel, J.**; Börner, H. G.; Brezesinski, G.: "Characterization of Peptide-guided Polymer Assembly at the Air/Water Interface" *Langmuir* **2008**, *24*, 3306-3316.

## Präsentationen:

- "Self-Spinning polymers: about Nano- and Microfibers via Peptide Guided Organization of Polymers", 1<sup>st</sup> European Chemistry Congress, Budapest, August 2006 (Poster)
- "Self-organizing Polymer Fibers", Polydays 2006 – The biannual international meeting on polymers, Berlin, Oktober 2006 (Poster)
- "Microstructure Formation of Peptide-polymer Conjugates Obtained by Two Different Synthetic Strategies", ACS Fall Meeting 2007, Boston, August 2007 (Poster)

---

<sup>1</sup>Im Zeitraum dieser Arbeit entstandene Publikationen und Präsentationen