
Max Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung

Modularer Ansatz zu
multifunktionellen Polymer-Peptid-Fasern

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

Harald Hahn

geboren am 23.08.1980 in Potsdam/ Babelsberg

Golm, März 2009

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3301/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-33016](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-33016)
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-33016>]

„Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns.“

Richard P. Feynman

„Ideen, wie absolute Gewißheit, absolute Genauigkeit, endgültige Wahrheit und so fort, sind Erfindungen der Einbildungskraft und haben in der Wissenschaft nichts zu suchen.“

Max Born

Inhaltsverzeichnis:

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG UND MOTIVATION | 1 |
| 2. GRUNDLAGEN | 3 |
| 2.1. Peptide | 3 |
| 2.2. Strukturbildung vororganisierter Polymer-Peptid-Konjugate | 8 |
| 2.3. Merrifield Festphasengebundene Peptid Synthese | 13 |
| 2.3.1. Festphasengebundene Peptid Synthese (SPPS) | 13 |
| 2.3.2. Schutzgruppen | 15 |
| 2.3.3. Aktivierungsreagenzien | 15 |
| 2.3.4. Einfluss des Harzes | 17 |
| 2.3.5. Freisetzung der festphasengebunden Peptide..... | 18 |
| 2.4. Erzeugung von Aziden | 19 |
| 2.5. „Klick Chemie“ | 23 |
| 3. CHARAKTERISIERUNGSMETHODEN | 27 |
| 3.1. Massenspektrometrie (MS)..... | 27 |
| 3.1.1. Allgemeines | 27 |
| 3.1.2. ESI-MS | 28 |
| 3.1.2.1. Ionisation..... | 28 |
| 3.1.2.2. Auftrennung und Detektion..... | 29 |
| 3.1.3. MALDI-TOF | 29 |
| 3.1.3.1. Ionisation..... | 30 |
| 3.1.3.2. Auftrennung und Detektion..... | 30 |
| 3.2. Circular Dichroismus | 31 |
| 3.2.1. Allgemeines | 31 |
| 3.2.2. Funktionsprinzip | 31 |
| 3.3. Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM)..... | 36 |
| 3.3.1. Allgemeines | 36 |
| 3.3.2. Messprinzip..... | 36 |
| 4. DIAZOTRANSFER ZUR ERZEUGUNG BIOLOGISCHER KLICK SUBSTRATE | 39 |
| 4.1. Diazotransfer an einem vollgeschützten Peptid der Sequenz GRGDS | 39 |
| 4.1.1. Herstellung der vollgeschützten GRGDS Sequenz: | 39 |
| 4.1.2. Diazotransfer am vollgeschützten GRGDS | 40 |
| 4.2. Diazotransfer an Trirpticin | 42 |
| 4.2.1. Herstellung von Trirpticin | 42 |
| 4.2.2. Diazotransfer an Trirpticin..... | 43 |
| 4.2.3. 1,3 Cycloaddition an Trirpticin..... | 44 |
| 4.3. Diazotransfer am Harz..... | 45 |
| 4.3.1. Herstellung der GRGDS-Peptidsequenz am Harz | 45 |
| 4.3.2. Diazotransfer an den harzgebundenen GRGDS-Harz Sequenzen..... | 46 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 4.4. | Diazotransfer an Chitosan | 48 |
| 4.1.1. | Herstellung von Chitosan Hydrochlorid | 49 |
| 4.1.2. | Diazotransfer an Chitosan Hydrochlorid | 49 |
| 5. | DIAZOTRANSFER GEFOLGT VON GEZIELTEN MODIFIKATIONEN AN POLYMER-PEPTID-FASERN | 53 |
| 5.1. | Design des Polymer-Peptid-Konjugates..... | 53 |
| 5.2. | Entwicklung des Polymer-Peptid-Konjugates (II)..... | 54 |
| 5.3. | Herstellung des aminfunktionalisierten Polymer-Peptid-Konjugates (II)..... | 55 |
| 5.4. | Diazotransfer an den aminfunktionalen Fasern (II)..... | 58 |
| 5.5. | 1,3-dipolare Addition von Fluorescein an die azidfunktionalisierten Fasern (III) | 64 |
| 5.6. | Baukastensystem der Alkine..... | 71 |
| 5.7. | Weitere Modifikationen an den azidfunktionalen Fasern..... | 73 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 79 |
| 7. | ANHANG | 81 |
| 7.1. | Allgemeine Arbeitsvorschriften..... | 81 |
| 7.2. | Experimenteller Teil:..... | 82 |
| 7.3. | Methoden: | 101 |
| 7.4. | Abkürzungsverzeichnis:..... | 104 |
| 7.5. | Literaturverzeichnis | 106 |

1. Einleitung und Motivation

Die Natur verfügt über viele Materialien mit exzellenten Eigenschaften, die für ihren jeweiligen Verwendungszweck optimiert sind. Eine wichtige Stoffklasse in der Natur sind die Peptide, die aus 20 verschiedenen Bausteinen, den natürlichen Aminosäuren, zu linearen Polypeptidketten kombiniert werden. Der Einfachheit dieser Baukastenstrategie steht eine hochkomplex und mehrstufig organisierte Strukturvielfalt gegenüber. Peptide bestimmen die Eigenschaften von Biomaterialien maßgeblich, sie sind z. B. für die hohe Festigkeit der Knochen, bei geringem Gewicht oder die Elastizität und Zugspannung der Spinnenseide, verantwortlich. Ein wichtiger Bestandteil vieler Peptidstrukturen ist das β -Faltblatt. Mehrere Peptide können unter Ausbildung einer ausgedehnten β -Faltblattstruktur fibrilläre Fasern oder Bänder bilden. Diese hierarchisch aufgebauten Überstrukturen weisen interessante anisotrope Eigenschaften im sub-nm Bereich auf.

Im Gegensatz zur Natur können synthetische Makromoleküle aus einer großen Vielfalt an Monomeren aufgebaut werden. Die Auswahl der Monomere beeinflusst dabei die Eigenschaften der synthetischen Polymere. So können unter anderem die mechanischen, elektrischen und optischen Eigenschaften der Polymere gesteuert werden. Dies eröffnet ein nahezu unerschöpfliches Potential für Anwendungen in den verschiedensten Bereichen.

In den Polymerwissenschaften haben sich in den letzten Jahren Polymer-Peptid-Konjugate etabliert, sie verknüpfen die Strukturbildungseigenschaften der Peptide mit den Materialeigenschaften synthetischer Polymere. Durch den Polymerblock können gezielt Eigenschaften wie Bioabbaubarkeit, Leitfähigkeit oder Löslichkeit eingestellt werden.

In vorhergehenden Arbeiten wurde die peptidgeleitete Aggregation synthetischer Polymere beschrieben.^[1-4] Es gelang Polymere mit Hilfe β -faltblattbildender Peptidsequenzen zu organisieren. Dabei wurden unterschiedliche Formen wie Röhren, Spiralen und bänderartige Fasern mit einheitlicher Höhe und Breite erhalten. Diese anisotropen, elongierten Bandstrukturen bestehen aus einem Peptidkern, der lateral von der Polymerhülle abgeschirmt wird. Die Peptidkerne dieser Strukturen besitzen funktionale Oberflächen, die von den Seitenketten der Peptide bestimmt werden. Der Peptidteil setzte sich ursprünglich aus alternierenden Valin-Threonin Einheiten zusammen, die durch Silifizierungsprozesse weiter modifiziert werden konnten. So entstanden hierarchisch geordnete Polymer-Peptid-Silika Strukturen.^[5, 6] Es war ebenfalls möglich die Art der funktionellen Gruppen zu modifizieren. Dazu musste die Aminosäuresequenz geändert und der Peptidteil neu

synthetisiert werden. Der Austausch von Threonin gegen Histidin führte zu Nanobändern mit imidazolfunktionalisierten Oberflächen.

Diese Arbeit beschreibt die Etablierung eines modularen Ansatzes zu funktionalen Polymer-Peptid-Nanostrukturen. Von einem Polymer-Peptid-System ausgehend sollten die Oberflächenfunktionen des aggregierten Systems verändert werden, um kleine funktionale Moleküle selektiv an den Peptidteil anbringen zu können. Mit Hilfe dieser Moleküle können verschiedene Funktionen an der Oberfläche des Polymer-Peptid-Systems erzeugt werden, ohne dafür das Strukturbildungsmotiv, den Peptidteil, verändern zu müssen. Ausgehend von einem Polymer-Peptid-System können so viele verschieden funktionale Nanobänder hergestellt werden. Dabei müssen jedoch alle Reaktionen an den Nanobändern strukturkonservierend sein.

Eine Herangehensweise für die kovalente Anbringung der funktionalen Moleküle stellte die 1,3-dipolaren Cycloaddition dar. Diese Reaktion beschreibt die konzertierte Umlagerung eines Azides mit einem Alkin zu einem heterocyclischen Fünfring, dem Triazol. Einen einfachen Zugang zur Erzeugung der Azide, bietet der Diazotransfer, ausgehend von aminfunktionalen Polymer-Peptid-Fasern.

Die azidfunktionalisierten Bandstrukturen dienen als Grundbaustein für den modularen Ansatz. An diese Funktionen können über die 1,3-dipolare Cycloaddition verschiedene alkinfunktionalisierte Moleküle angebracht werden. So können die Eigenschaften der Fasern an die jeweilige Aufgabe angepasst werden.

2. Grundlagen

2.1. Peptide

Der Begriff „Peptid“ wurde 1902 durch *E. Fischer*^[7] geprägt. „Peptid“ ist ein Kunstwort, welches sich aus dem griechischen „Pepton“ (peptos, griech. verdaut) und der Endung „id“ zusammensetzt. Die Endung „id“ wurde wegen des analogen Aufbaus (Monomereinheiten) der Peptide zu den Polysacchariden gewählt. Seit der Einführung des Begriffes, gefolgt von der Synthese und Untersuchung einiger Peptide im Jahre 1906 durch *E. Fischer*, wurde die Peptidsynthese stetig weiterentwickelt.^[8, 9]

Peptide sind aus mehreren α -Aminosäuren aufgebaut. α -Aminosäuren besitzen mindestens eine Aminogruppe und eine Carbonsäuregruppe, die beide an das α -C Atom gebunden sind (siehe Schema 1). Alle 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren unterscheiden sich allein durch den Rest R, der ebenfalls an das α -C Atom angebunden ist.

Bei einer unverzweigten Kette von bis zu 100 Aminosäuren wird von Peptiden gesprochen. Verbindungen von mehr als 100 Aminosäuren werden als Proteine bezeichnet. Dabei ist die Grenze zwischen Peptiden und Proteinen nicht scharf definiert.

Die chemische Verknüpfung zweier Aminosäuren (R1 und R2) zu einem Dipeptid (Schema 1), wird als Kondensation bezeichnet. Unter Wasserabspaltung entsteht bei der Kondensation der Amin- mit der Carboxylgruppe eine Amidbindung, die durch Mesomerie stabilisiert ist (Abbildung 1). Durch diesen Effekt erhöht sich die Bindungsordnung zwischen Stickstoff und Carbonylkohlenstoff auf ca. 1,5, was die Drehbarkeit der Amidbindung stark einschränkt. Die Diederwinkel der N-C $^{\alpha}$ - (ϕ) und C-C $^{\alpha}$ -Bindung (ψ) können verschiedene Werte annehmen. Sie bestimmen die Konformation des Peptides.

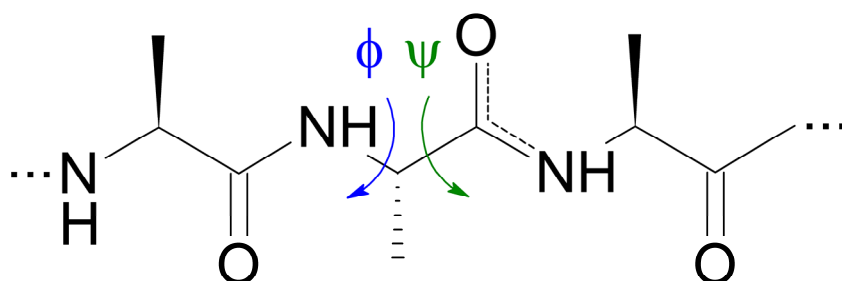


Abbildung 1. Gezeigt ist ein Tripeptid, der partielle Doppelbindungscharakter der Amidbindung (gestrichelt) sowie die Diederwinkel ϕ (phi) und ψ (psi).

Biosynthese der Peptide

Die Natur bietet eine große Auswahl an Materialien mit verschiedensten Eigenschaften. Dazu nutzt sie nur wenige Grundbausteine. Die Verschlüsselung von Erbgut wird durch vier verschiedenen Nucleotide erreicht. Sie speichern Millionen an Merkmalen. Die DNA (engl. desoxy ribonucleic acid) als Träger der Erbinformation enthält Informationen für die Synthese von Peptiden und Proteinen. Anstelle des englischen Begriffs DNA wurde früher die deutsche Variante DNS (Desoxi Ribonuclein Säure) verwendet. Dieser Begriff wird zunehmend seltener verwendet und gilt als veraltet.^[10]

Die natürliche Biosynthese von Peptiden in einer Zelle besteht aus mehreren Schritten (Abbildung 2). Zuerst wird die mRNA (engl. messenger ribonucleic acid) aus der DNA hergestellt. Dieser Vorgang wird als Transkription bezeichnet. Die mRNA kann den Zellkern verlassen und zu den im Cytoplasma lokalisierten Ribosomen wandern. In den Ribosomen findet dann die Synthese der Peptide, die sogenannte Translation statt.

Die mRNA besteht aus vier verschiedenen DNA Basen, die Reihenfolge von je drei Basen heißt Codon. An den Ribosomen wird diese Reihenfolge durch die tRNA (engl. transfer RNA) abgelesen. Für jedes Codon auf der mRNA gibt es ein passendes Codon auf der tRNA, das sogenannte Anticodon. In Abhängigkeit des jeweiligen Anticodons bindet eine spezielle Aminosäure an die tRNA, welche die Aminosäure zum Ribosom transportiert.

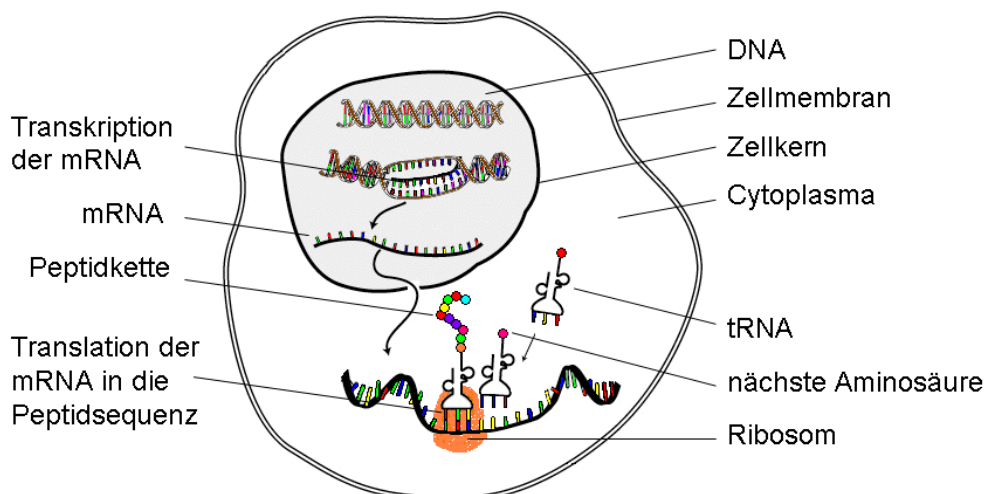


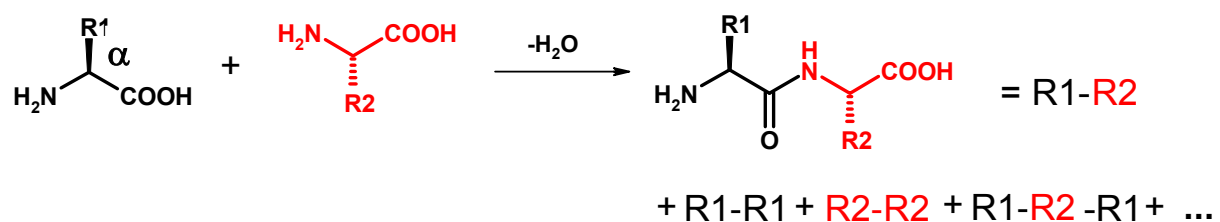
Abbildung 2. Dargestellt ist die mRNA Transkription im Zellkern, das Wandern der mRNA ins Cytoplasma und die Translation einer Peptidsequenz im Ribosom durch Ablesen der mRNA mit tRNA.

In den Ribosomen bindet die tRNA an die mRNA, wenn Codon und Anticodon exakt zueinander passen. Dabei wird die Aminosäure der tRNA mit dem Ende des bereits

aufgebauten Peptidstranges verknüpft. Die Peptidkette wird so sequenziell am Ribosom aufgebaut, ihre Sequenz wird von der Reihenfolge der Codons auf der mRNA bestimmt.

Jedes Codon verschlüsselt jeweils nur eine Aminosäure, aber jede Aminosäure wird durch mehrere Codons verschlüsselt. Das Codon bestehend aus den drei Basenpaaren Guanin-Adenin-Cytosin (G-A-C) steht für Asparaginsäure. Alle 20 proteinogenen Aminosäuren werden durch diese Codons beschrieben, sie werden als kanonische Aminosäuren oder auch Standardamino­säuren bezeichnet. Diese proteinogenen Aminosäuren sind α -Aminosäuren.

Die Kondensation ungeschützter Aminosäuren verläuft nicht selektiv und führt zu einer Reihe von Nebenprodukten. (Schema 1). Es kommt zu statistischen Verknüpfungen der Aminosäuren, darunter Verknüpfungen mit sich selbst sowie ungewollte Mehrfachverknüpfungen. Um dies in der synthetischen Peptidsynthese zu verhindern ist die Einführung von Schutzgruppen notwendig.



Schema 1. L-Aminosäure (R1) kondensiert mit einer anderen L-Aminosäure (R2) zu einem Dipeptid (R1-R2), sowie mehreren Nebenprodukten, z. B. durch Reaktionen der Aminosäuren mit sich selbst, Bildung von Tripeptiden oder Oligomeren.

Heute stehen verschiedene Möglichkeiten für den Aufbau eines Peptides mit definierter Sequenz zur Verfügung. Eine Methode ist die Genexpression durch Bakterien (z. B. E. Coli). Dabei wird die natürlich vorkommende Peptidbiosynthese genetisch modifizierter Bakterien zur Herstellung synthetischer Proteine genutzt. Weitere Möglichkeiten sind die Peptidsynthese in Lösung, sowie die im Jahr 1963 von R. B. Merrifield vorgestellte Festphasengebundene Synthese.^[11] Mit dieser wurden schrittweise vier Aminosäuren zu einer definierten Sequenz verknüpft. Merrifield stellte in weiteren Arbeiten die Synthese größerer Peptide, wie Bradykinin^[12, 13], sowie die automatisierte Festphasengebundene Peptidsynthese vor.^[14] Für seine Arbeiten um die Festphasengebundene Synthese erhielt Merrifield 1984 den Nobelpreis für Chemie. Die sogenannte Merrifield Festphasengebundene Synthese wird vor allem bei der Herstellung von Oligopeptiden bis zu 40 Aminosäuren, teilweise bis zu 100 Aminosäuren genutzt. In der vorliegenden Arbeit kam

sie zur Darstellung des Peptidteils zur Anwendung. In Kapitel 2.3 wird näher auf die Festphasengebundene Peptidsynthese eingegangen.

Strukturbildung

In der Natur liegen die meisten Peptidstränge in mehreren charakteristischen Sekundärstrukturmotiven vor. Die wichtigsten sind das Zufallsknäuel, der Turn, die α -Helix und das β -Faltblatt (Abbildung 3). Turnsequenzen findet man oft in β -Faltblattstrukturen, die durch den Turn mit sich selbst ein antiparalleles β -Faltblatt ausbilden. Während die Anordnung der Kettensegmente im Zufallsknäuel statistisch ist, sind die Winkel (ϕ , ψ) in den anderen Peptidstrukturen festgelegt. Der Verlust an Entropie bei der Bildung dieser Konformationen wird durch die Ausbildung attraktiver Wechselwirkungen kompensiert. Diese Wechselwirkungen können unter anderem Interaktionen der Peptid Seitenketten oder Wasserstoffbrückenbindungen sein.

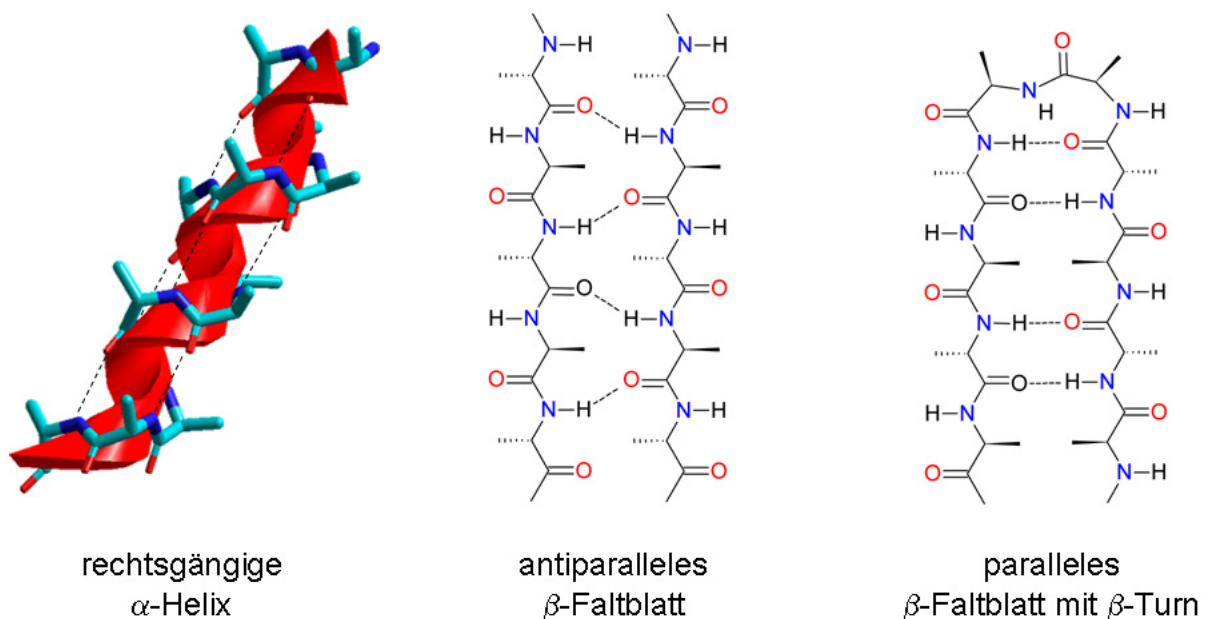


Abbildung 3. Zeigt eine rechtsgängige α -Helix (links), sowie ein antiparalleles (mitte) und ein paralleles β -Faltblatt mit turn (rechts). Die Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt dargestellt.

Jede Aminosäure hat eine unterschiedliche Tendenz ein bestimmtes Strukturmotiv zu stabilisieren oder zu destabilisieren. Diese Tendenz basiert auf der Funktion ihrer Seitenkette, die Eigenschaften wie elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen, beisteuern kann. Die Chou Fasman Parameter geben die Strukturbildungstendenz der

jeweilige Aminosäure empirisch wieder.^[15] Neben der Art bestimmt die Sequenz (Primärstruktur) der Aminosäuren die Struktur und Funktion der Peptide. Um Struktur und Funktion biologischer und synthetischer Peptide zu steuern, muss daher die Sequenz der Aminosäuren in einem Peptid definiert aufgebaut werden.

Die Anordnung zu einer α -Helix wird durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der i -ten und der $i+4$ -ten Aminosäure stabilisiert. Bei kleineren β -Faltblattstrukturen (Oligomere) sind die Wasserstoffbrückenbindungen hingegen intermolekular. Erst bei größeren Peptiden, die über Schleifen und Turns verfügen, sind intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen in β -Faltblattstrukturen zu finden.

Die Anordnung der Peptide zu β -Faltblattstrukturen wurde 1933 von *Astbury*^[16] für Keratinfasern durch Röntgenstreuung nachgewiesen.^[17-19] Die α -Helix und das β -Faltblatt, wurden dann durch Röntgenuntersuchungen an kristallinen Peptiden von *Pauling* und *Corey*^[20-22] bestätigt und detailliert beschrieben. Für die β -Faltblattstruktur können eine parallele und eine antiparallele Anordnung unterschieden werden (Abbildung 3).

In der β -Faltblatt-Konformation sind hydrophobe und hydrophile Aminosäuren meist in alternierender Reihenfolge angeordnet.^[23] Die Reihenfolge der Aminosäuren kann die β -Faltblatt-Konformation weiter stabilisieren. Eine große Bedeutung hat in diesem Zusammenhang der hydrophobe Effekt in Wasser der in Kapitel 2.2 diskutiert wird.

Native Peptide bilden in Abhängigkeit ihrer Seitenketten Sekundärstrukturen aus. Soll die Strukturbildung von synthetischen Peptidsystemen kontrolliert werden, ist die Wahl einer geeigneten Reihenfolge der Aminosäuren entscheidend. Eine lineare Sequenz aus alternierenden Valin-Threonin Multimeren wird oft als Modell für β -Faltblattstrukturen verwendet. Dieses Peptid aggregiert zu β -Faltblättern, wenn es mindestens fünf Wiederholungseinheiten lang ist.^[24, 25] Um die Proteinfaltung und die Bildung ihrer Sekundärstrukturen verstehen zu können, ist es nötig, das untersuchte Peptidsystem so einfach wie möglich zu gestalten. Das Verständnis der Proteinfaltung kann helfen Krankheiten zu verhindern oder zu bekämpfen. Viele Mechanismen der körpereigenen Immunabwehr basieren auf Peptiden. Daher können native Peptide *in vivo* eingesetzt werden, um Krankheiten zu bekämpfen. Im Körper kommt es jedoch zum Abbau dieser Stoffe, sodaß der erwünschte Effekt nicht immer eintreten kann. Besonders wurden in diesem Zusammenhang die sogenannten Peptidomimetika untersucht.^[26] Peptidomimetika sind Stoffe, die eine vergleichbare Sekundärstruktur aufweisen wie native Proteine. Ein Beispiel hierfür sind Rückgrad-Mimetika. Sie unterscheiden sich von Peptiden im Anknüpfungspunkt der Seitenkette, der nicht am α -Kohlenstoff, sondern am Stickstoff

lokalisiert ist.^[27, 28] Trotz dieser Veränderung behalten Peptidomimetika oft ihre Wirkung, sie werden *in vivo* jedoch schlecht abgebaut. Dadurch können sie deutlich länger ihre Wirkung entfalten.

Eine weitere Möglichkeit Peptide vor dem ungewollten Abbau zu schützen ist ihre Maskierung durch Anbringen kovalent gebundener Polymere. Da die Wirkung des Peptides durch seine Konformation bestimmt wird, sollte sich nicht durch die Anbringung des Polymers verändern. Daher ist das Verhalten von Polymer-Peptid-Konjugaten von besonderem Interesse. Werden mehrere Peptidstränge durch ein Molekül, sogenanntes Templat Molekül, in räumliche Nähe gebracht, spricht man von vororganisierten Peptiden. Je kleiner der untersuchte Peptidteil ist, desto weniger Freiheitsgrade besitzt er. Die Faltung von kleinen Peptiden ist daher einfach zu verstehen. Von besonderem Interesse ist es daher mit möglichst kurzen Peptidketten eine Strukturbildung in Polymer-Peptid-Verbindungen zu erzeugen. Der Ansatz zur Peptidaggregation mit Hilfe von vororganisierten Molekülen soll nachfolgend näher erläutert werden.

2.2. Strukturbildung vororganisierter Polymer-Peptid-Konjugate

Bei vororganisierten Peptiden wird die Geometrie zweier Peptidketten durch das Templatmolekül vorgegeben, so kann die Strukturbildung von Peptidketten beeinflusst werden.^[29] Das meist starre Templat dient dabei als Kristallisationskeim für die Strukturbildung.^[30] Ein großer Vorteil bei vororganisierten Peptiden ist, dass wesentlich kürzere Peptide die gleichen strukturbildenden Eigenschaften haben. Dadurch werden die Peptidsysteme kleiner und verständlicher. Sie dienen als gut zugängliche Modelle, mit deren Hilfe die Strukturbildung nativer Proteine untersucht und verstanden werden kann. Wird die oben angesprochene Valin Threonin Sequenz betrachtet, reichen vororganisierte Sequenzen bestehend aus zwei Wiederholungseinheiten (also vier Aminosäuren) aus, um die β -Faltblattstrukturen zu erzeugen.

Ein Beispiel für ein schaltbares Templat Molekül ist in Abbildung 4 dargestellt. An diesem flexiblen Molekül wird die Strukturbildung durch Zugabe von Kupfer(II) kontrolliert. Die Konformation des Templates wird durch die Bildung eines Kupferkomplexes vorgegeben und die Peptidstränge dadurch ausgerichtet. So konnte die Strukturbildung mit Hilfe der Kupferkonzentration erzeugt werden.^[31]

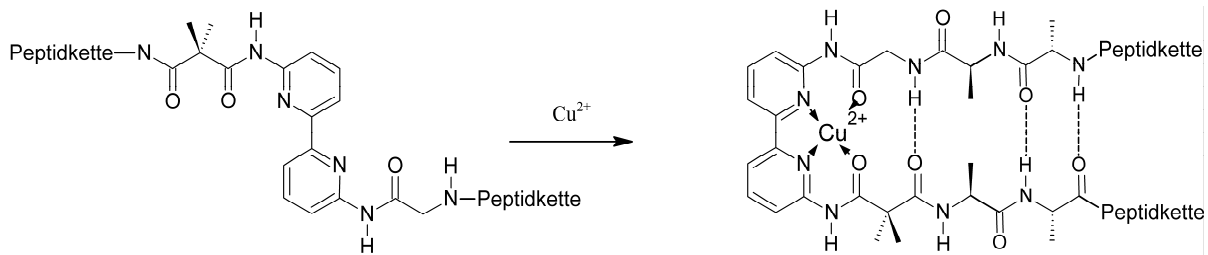


Abbildung 4. Die Peptidketten in an dem Bipridin-Liganden werden durch Kupferzugabe ausgerichtet und dadurch in eine antiparallele β -Faltblatt Konformation gebracht.

Ein weiteres Templat basiert auf einem Dibenzofuran-Grundkörper. Bei dem Templat konnten die Abstände der zwei Peptidketten variiert werden. Durch Anknüpfung in 4,6-Position betragen die Abstände 5 Å, in 2,8-Position 8-10 Å. Ebenso konnte das entstehende β -Faltblatt verändert werden, indem die Anordnung der Peptide in eine parallele oder antiparallele Ausrichtung vorgegeben wurde.^[32] Die zwei Peptidketten in 2,8-Position bilden ein antiparalleles β -Faltblatt aus.^[33] Durch Anbringung paralleler Peptidsequenzen in 2,6-Position konnte ein Gastmolekül eingebracht werden, wodurch ein antiparalleles β -Faltblatt ausgebildet wurde.^[34] Durch Aggregation zu dem β -Faltblatt ordneten sich die templatvororganisierten Peptide zu einer elongierten Überstruktur an.

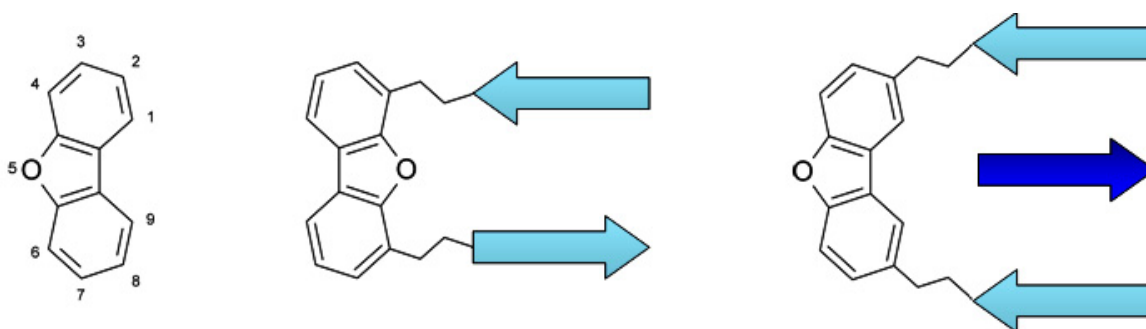


Abbildung 5. Dibenzofuran-Grundkörper (links). Die Anbringung von Peptiden in 4,6-Position führt zu einem antiparallelen β -Faltblatt (mitte), in 2,8-Position können zwei parallele Peptidstränge mit einem Gastmolekül (**dunkelblau**) ein antiparalleles β -Faltblatt ausbilden (rechts). Die Pfeile repräsentieren β -Faltblattstränge.

Der beobachtete Prozess der Strukturbildung kann dazu genutzt werden Polymere zu aggregieren. So können die Vorteile von Peptiden und Polymeren verbunden werden. Der Peptidteil steuert hierbei die Aggregation des Polymerteils. Um die templatvororganisierte Peptidaggregation zur Polymerstrukturierung nutzen zu können, müssen die Polymere mit dem Templat verknüpft werden. Dazu wird eine weitere Funktionalität benötigt, die an dem

Dibenzofuran-Grundkörper nicht vorhanden ist. Einen guten Ausgangspunkt bietet das literaturbekannte Polymer-Peptid System (**I**), in dem der Polymerteil und die zwei Peptidarme über ein Carbazol Templat miteinander verbunden sind (Abbildung 6).^[4] Die Peptidarme sind derart gestaltet, dass hydrophobe und hydrophile Aminosäuren alternierend angeordnet sind, wobei die hydrophile Aminosäure Threonin, die hydrophobe Valin ist. Die durch das Carbazol vororganisierten Peptide bilden ein β -Faltblatt und lösen dadurch die Strukturbildung zu Fasern aus.

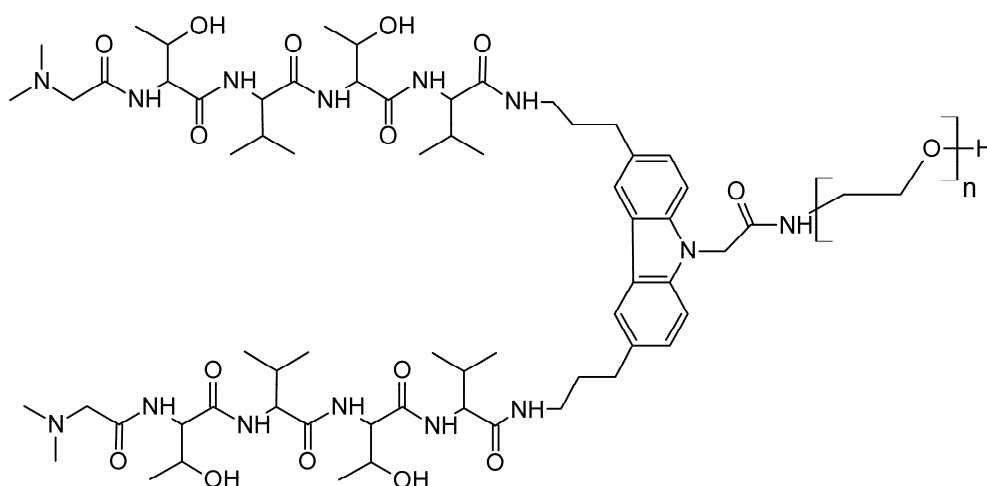


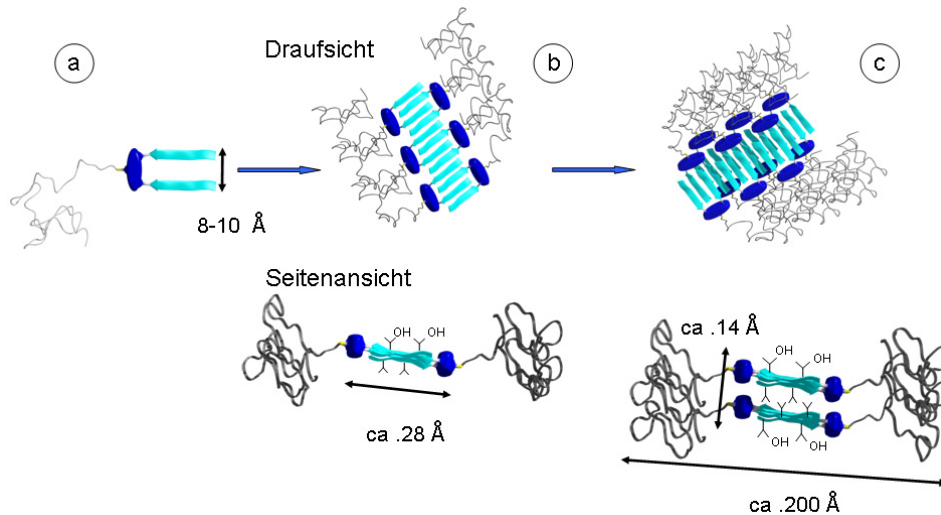
Abbildung 6. Dargestellt ist das literaturbekanntes Polymer-Peptid-Molekül (**I**).

Mehrere dieser Polymer-Peptid-Konjugate (**I**) aggregieren unter Ausbildung eines antiparallelen β -Faltblattes miteinander (Schema 2b). Diese β -Faltblattstruktur (Bandstruktur, Tape) besitzt zwei amphiphilen Seiten, die Seitenketten der hydrophoben Aminosäuren sind auf der einen, die der hydrophilen Aminosäuren auf der entgegengesetzten Seite.^[35] Aus zwei dieser β -Faltblattstrukturen entsteht durch den hydrophoben Effekt ein Doppelband (Schema 2c). Der hydrophobe Effekt soll nachfolgend eingehender behandelt werden.

Hydrophober Effekt

In Wasser entsteht aus **I** ein β -Faltblatt mit amphiphilen Seiten, wobei auf der einen Seite des β -Faltblattes die hydrophoben Seitenketten, auf der entgegengesetzten die hydrophilen Seitenketten liegen (Schema 2b). Die hydrophobe Seite des β -Faltblattes kann keine Wasserstoffbrückenbindungen mit den umgebenden Wassermolekülen ausbilden. Diese Seite ist von einem hochgeordneten Käfig aus Wassermolekülen umgeben. Die damit verbundene hohe Entropie der umgebenden Wassermoleküle ist thermodynamisch

ungünstig. Der hydrophobe Effekt führt zur Bildung von Doppelbändern. Um die hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Wasser zu vermeiden ordnen sich zwei dieser Bänder derart an, dass ihre hydrophoben Seitenketten einander zugewandt sind.



Schema 2. Die Darstellung der Organisation von **I** (a) in bänderartige Aggregate (b). Die Bänder besitzen einen β -Faltblattkern und eine PEO Schale. Die einzelnen β -Faltblattstrukturen (b) ordnen sich zu Doppelbändern an (c).^[36]

Durch die Anordnung zweier β -Faltblätter mit ihren hydrophoben Bereichen zueinander, werden die hochgeordneten Wassermoleküle freigesetzt. Die ungünstigen Wechselwirkungen mit dem Wasser werden so minimiert. Trotz der steigenden Ordnung der Peptide ist der hydrophobe Effekt, durch die Freisetzung der Wassermoleküle, ein entropiegetriebener Prozeß. Zusätzlich stabilisieren sich die hydrophoben Bereiche durch Van-der-Waals Wechselwirkungen. Die hydrophilen Bereiche liegen dagegen auf der lösungsmittlexponierten Seite und können weiterhin stabilisierende Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel eingehen.^[37]

Aminosäuren mit sauren oder basischen funktionellen Seitenketten haben dabei eine entscheidende Rolle, in Abhängigkeit des pH-Wertes können sie geladen oder neutral vorliegen. Durch die Kontrolle des pH-Wertes können attraktive und repulsive Wechselwirkungen mit nahen Funktionalitäten anderer Aminosäuren erzeugt oder verhindert werden.^[38] Dies hat einen starken Einfluß auf die Konformation des Peptids.

Die beobachteten faserartigen Nanostrukturen (**I**) sind solche Doppelbänder in deren Inneren die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren Valin liegen. Auf der Außenseite der

Doppelbänder liegen dem Wasser zugewandt die hydrophilen Aminosäurereste Threonin (siehe Abbildung 6).

Auf diese Art werden die unvorteilhaften hydrophoben Kontakte zwischen den Seitenketten des Valins und dem Wasser minimiert, während die begünstigten hydrophilen Wechselwirkungen mit dem Wasser erhalten bleiben. Die Strukturbildung von (**I**) wird durch Denaturierung und langsame Dialyse von Methanol nach Wasser noch verbessert.

Wenn es möglich ist, die Funktionalitäten dieser Polymer-Peptid-Bänder zu variieren, so könnten die Eigenschaften der Peptidfasern gesteuert werden. Die vorhandenen, dem Lösungsmittel zugewandten, Funktionalitäten bieten dafür einen guten Ansatzpunkt. Ein Beispiel für Modifizierungen an den Seitenketten ist im folgenden erläutert.

Modifikationen an (I**)**

Die Threonin Seitenketten des Templates (**I**) konnten in weiterführenden Arbeiten genutzt werden, um Silifizierungsprozesse daran durchzuführen. So können Eigenschaften wie Härte, Länge, Löslichkeit, etc. verändert werden. In der Literatur gibt es verschiedene Ansätze, Silika zu strukturieren. Neben Sol Gel Prozessen wie „nanocasting“ und „nanocoating“, gibt es auch verschiedene Spray Verfahren.^[39-43] Eine weitere Möglichkeit Silika zu strukturieren, basiert auf der Nachahmung biologischer Silifikationsprozesse.^[44] An faserartigen Proteinstrukturen konnte gezeigt werden, dass Biosilifikation *in vivo* und *in vitro* zu Silikanadeln führte.^[45]

Durch Einspritzen der Polymer-Peptid-Fasern (**I**) in ethanolische Lösungen mit geringen Kieselsäure Konzentrationen, (2,5 Äq. je Threonin ~ 270 µM) konnten nach zehn Sekunden Reaktionszeit die einzelnen Bänder von **I** silifiziert werden.^[5] Bei höheren Konzentrationen an Silika vernetzten sich die Fasern von **I** miteinander zu Überstrukturen. Wenn eine Lösung von (**I**) in eine Lösung mit vorhydrolysiertem TMOS gedruckt wurde, richteten sich diese Überstrukturen, in Abhängigkeit der Druckgeschwindigkeit, aus.^[6]

So konnten durch die Selbstaggregation des Templates **I** makroskopische Netzwerke von orientierten Polymer-Silika-Konjugaten zugänglich gemacht werden. Weiterhin konnten durch Kalzinieren der Silika beschichteten Polymer-Peptid-Fasern **I**, zylindrische Porenstrukturen erzeugt werden.

2.3. Merrifield Festphasengebundene Peptid Synthese

2.3.1. Festphasengebundene Peptid Synthese (SPPS)

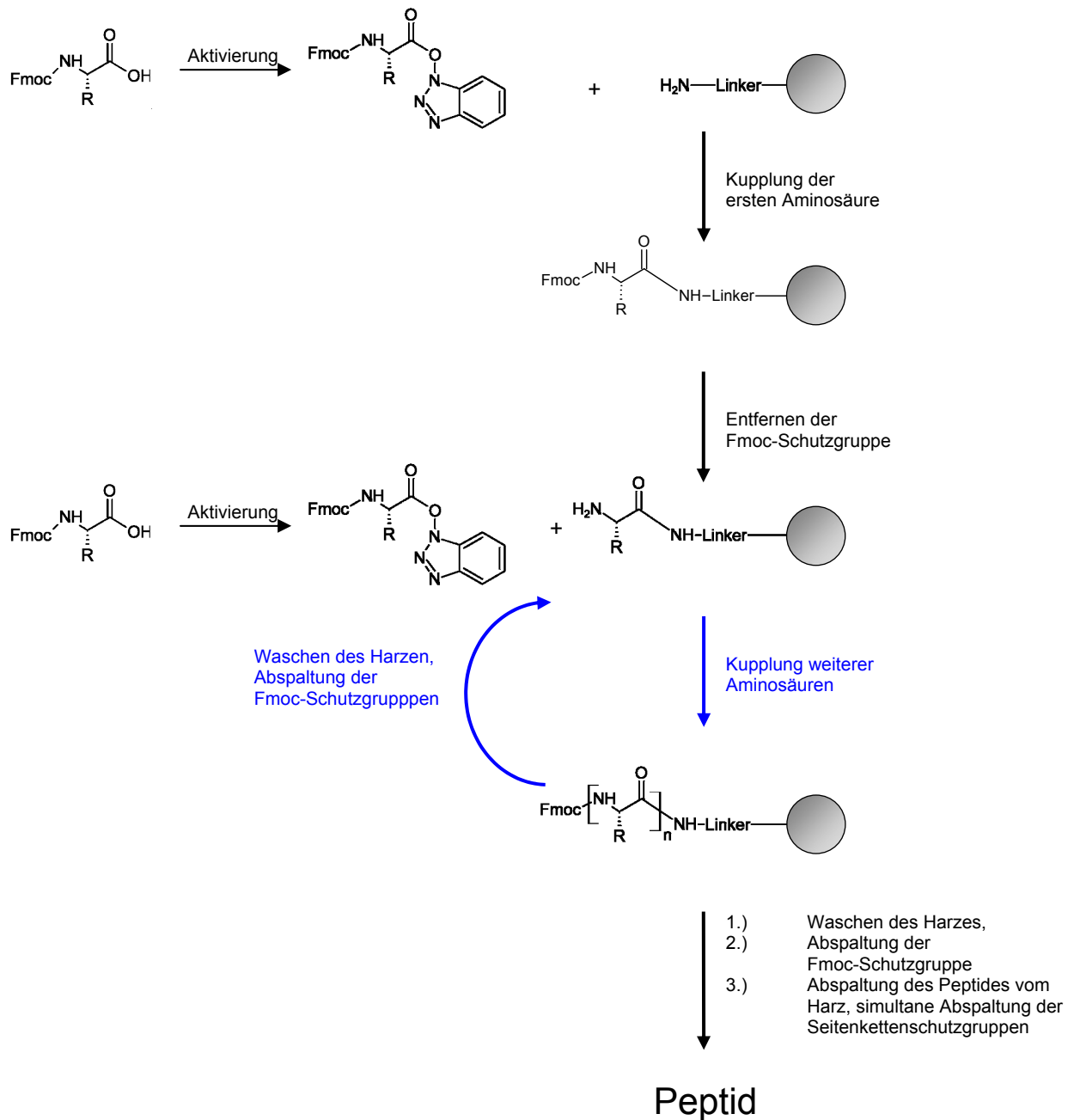
Die Grundidee der SPPS (engl.: Solid-Phase supported Peptide Synthesis) ist der schrittweise Aufbau einer Aminosäuresequenz an einem unlöslichen Trägermaterial unter milden Reaktionsbedingungen. Die Reihenfolge der Aminosäuren bestimmt die Eigenschaften der Peptidsequenz. Es ist daher äußerst wichtig, dass jede zu kuppelnde Aminosäure mit nahezu 100%igem Umsatz gekuppelt wird, um Fehlsequenzen zu minimieren. Bei einer Peptidsynthese von 12 Aminosäuren mit einem Umsatz von 95 % pro Einzelkupplung reduziert sich die Gesamtausbeute nach 12 Kupplungsschritten auf 54 %. Die Nebenprodukte bestehen meist aus Auslassungssequenzen von 1-2 Aminosäuren und ähneln dem gewünschten Produkt in Masse und Löslichkeit stark. Daher sind sie sehr schlecht vom Produkt abzutrennen. Aus diesem Grund wird eine Schutzgruppenstrategie verwendet, die eine vollständige Kupplung der Aminosäure gewährleistet. So kann ein Peptid mit einer definierten Sequenz aufgebaut werden.

Die kovalente Anbindung der Aminosäuren an ein leichtvernetztes Polymerharz birgt den Vorteil, sämtliche Kupplungsreagenzien im großen Überschuss einsetzen zu können, was die quantitative Umsetzung vereinfacht. Nach erfolgter Reaktion können die überschüssigen Reagenzien durch Waschschrte entfernt werden.

In schwierigen Fällen kann die zu kuppelnde Aminosäure, ohne die N-terminale Schutzgruppe abzuspalten, mehrfach gekuppelt werden. Erst wenn die Kupplung quantitativ ist, wird die Schutzgruppe der nun vollständig gekuppelten Aminosäure abgespalten. Die nächste Aminosäure kann nun an die freie Aminogruppe gekuppelt werden. Auch in der automatisierten Synthese wird bei schwierigen Sequenzen zweimal gekuppelt (sog. Doppelkupplungen), um die notwendigen hohen Umsätze zu erreichen.

Der schrittweise Aufbau der Peptidsequenz ist in Schema 3 dargestellt. Im Gegensatz zur Natur wird das Peptid nicht vom N-Terminus zum C-Terminus aufgebaut, sondern anders herum. Die Säuregruppe der Aminosäure wird durch PyBop/ HoBt (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat)/ 1-Hydroxybenzotriazol) in einen Aktivester überführt. Im ersten Schritt der SPPS der Säuregruppe wird die erste zu kuppelnde Aminosäure mit dem aktivierten Säureende am Polymerharz kondensiert. Durch die Schutzgruppe am Aminende wird eine ungewollte Mehrfachkupplung verhindert. Nach der vollständigen Kupplung wird das Harz gründlich gewaschen, um alle überschüssigen Reagenzien zu entfernen. Dann wird die Amin-Schutzgruppe der harzgebundenen

Aminosäure entfernt. An das Aminende der am Harz befestigten Aminosäure kann nun die nächste Aminosäure gekuppelt werden. Die repetitiven Schritte: Entfernen der temporären α -Amin-Schutzgruppe, die Aktivierung der Säuregruppe, die Kupplung der nächsten Aminosäure gefolgt vom Waschen erlauben die Automatisierung des Prozesses.



Schema 3. Abgebildet ist das Kupplungsschema der SPPS. Blau dargestellt sind die wiederholenden Schritte der Kupplung weiterer Aminosäuren zum Aufbau von Peptidsequenzen.

Um möglichst hohe Umsätze bei kurzen Kupplungszeiten zu erreichen, wurde die SPPS stetig weiterentwickelt. Inzwischen steht eine Vielzahl an Parametern zur Verfügung die für den jeweiligen Verwendungszweck optimiert wurden.

Die Art der Schutzgruppen, Aktivierungsreagenzien und das Harzes beeinflussen die Geschwindigkeit und Ausbeuten der einzelnen Schritte. Im Folgenden soll auf diese Faktoren im Hinblick auf die in dieser Arbeit verwendete Fmoc-Strategie (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) näher eingegangen werden.

2.3.2. Schutzgruppen

Jede Aminosäure besitzt mindestens zwei funktionelle Gruppen, die α -Carbonsäure und das α -Amin. Um eine Reaktion mit sich selbst zu verhindern, müssen an der Kondensation nicht beteiligten Gruppen geschützt sein. Dadurch wird z. B. eine Polymerisation (Mehrfachkupplung) der Aminosäuren vermieden.

Bei der Fmoc Festphasensynthese findet eine orthogonale Schutzgruppenstrategie Anwendung. Die α -Aminogruppe der zu kuppelnden Aminosäure ist mit einer im Reaktionsverlauf entfernbaren Schutzgruppe versehen. Dabei wird die Fmoc-Schutzgruppe verwendet.^[46] Die Fmoc-Schutzgruppe ist unter milden, basischen Bedingungen abspaltbar. In den meisten Fällen wird dazu eine 20 %ige Piperidinlösung verwendet.

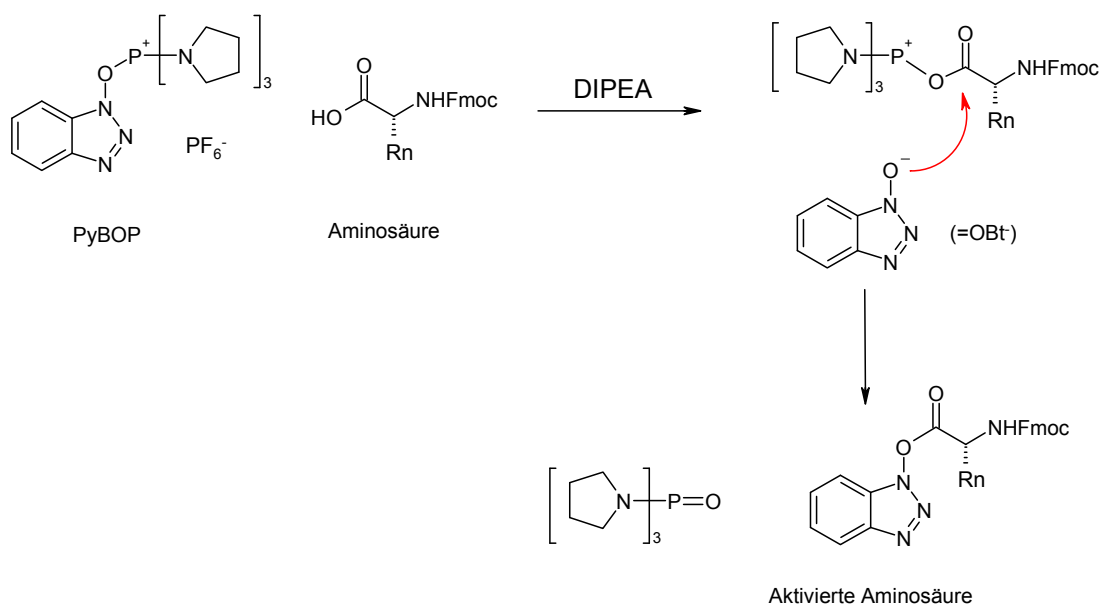
Die funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten sind mit einer, unter Kupplungsbedingungen beständigen Schutzgruppe versehen. Es steht eine Vielzahl von semipermanenten Schutzgruppen zur Verfügung, die für den jeweiligen Verwendungszweck optimiert sind. Die Seitenkettenschutzgruppen (sekundäre Schutzgruppen) müssen unter den basischen Bedingungen der Fmoc Abspaltung stabil sein. Sonst würde es zu ungewollten Nebenreaktionen, wie einer Verzweigung der Peptidkette, kommen. Deshalb werden bei der Fmoc-Strategie, für die Seitenketten säurelabile Schutzgruppen verwendet. Die Abspaltung der sekundären Schutzgruppen kann daher mit der ebenfalls sauren Abspaltung der Peptide vom Harz einher gehen.

2.3.3. Aktivierungsreagenzien

Wie bereits erwähnt, wurden die Reagenzien im Überschuss eingesetzt, um den Umsatz und die Ausbeuten zu erhöhen. Mit Hilfe von Aktivierungsreagenzien soll der Umsatz noch weiter erhöht werden.

Die Aktivierung der Carboxylgruppe geschieht durch Einführung einer elektronenziehenden Gruppe, die den nucleophilen Angriff des Amins erleichtert. Dadurch wird die Kupplungsreaktion in Bezug auf Geschwindigkeit und Ausbeute deutlich verbessert.

Im Besonderen haben sich die Aktivierungsreagenzien PyBOP und HBTU (O-(1-Benzotriazolyl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) bewährt. Die Aktivierungsreagenzien bilden mit der zu kuppelnden Carboxylfunktion sogenannte Aktivester (Schema 4). Der Aktivester ist bei einem nucleophilen Angriff des Amins eine gute Abgangsgruppe. Dies beschleunigt die Reaktion und erhöht deren Umsätze.



Schema 4. Mechanismus der Aktivierung einer Aminosäure durch PyBOP/ HOBT.

Zusätzlich wird eine nicht nucleophile Base, z. B. DIPEA (N,N-Diisopropylethylamin), verwendet. Dabei dient die Base der Deprotonierung des HOBT's, sowie der Säuregruppe der Aminosäure zum Carboxylat. Weitere Aktivierungsreagenzien sind in Abbildung 7 zusammengefasst. Sie basieren auf Phosphoniumreagenzien, wie PyAOP. Es finden aber auch Guanidinium/ Uroniumreagenzien Verwendung, unter anderem HATU (O-(7-Aza-1-benzotriazolyl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) und HBTU. Die Reaktivität der Aktivierungsreagenzien nimmt in folgender Reihenfolge ab: HATU>HBTU>PyBOP>DIC/HOBt>DCC.^[47]

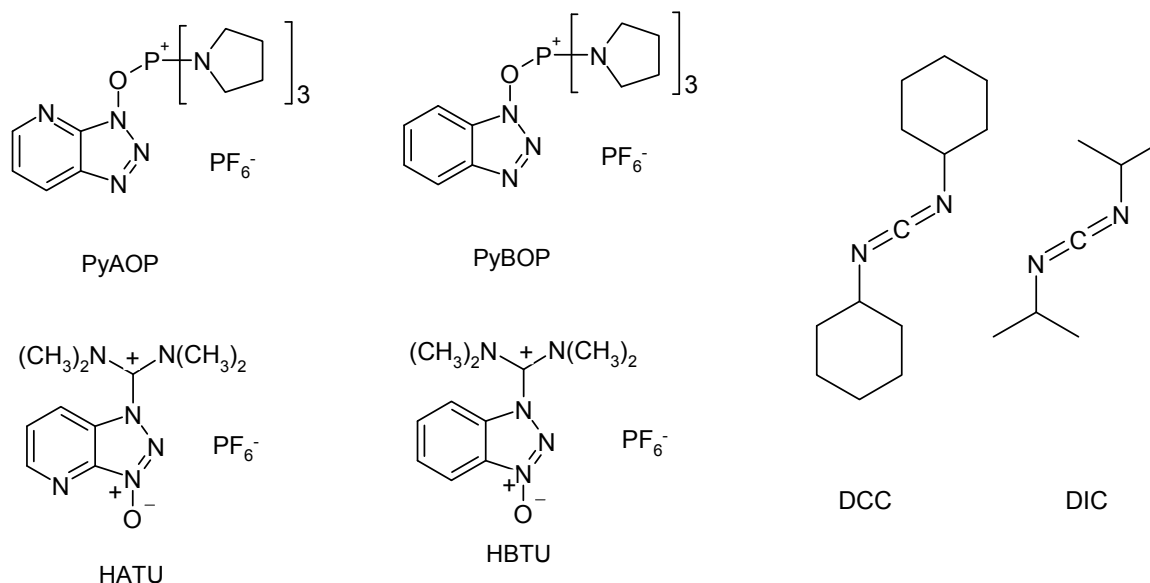


Abbildung 7. Dargestellt sind verschiedene Aktivierungsreagenzien.

Die schonenden Reaktionsbedingungen, z. B. das Arbeiten bei Raumtemperatur, verhindern eine Racemisierung der Aminosäuren. Um bei schwierigen Sequenzen die höchsten Ausbeuten zu erzielen ist die Handkupplung mit PyAOP/ HATU als Aktivierungsreagenzien die beste Möglichkeit. Weiterhin ist es möglich, die Kupplungszeit zu erhöhen und Mehrfachkupplungen durchzuführen, um das gewünschte Peptid zu synthetisieren.

Die Wahl des Lösungsmittels und des Harzes beeinflusst das Quellverhalten und damit die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen. Dieser Einfluss wird nachfolgend genauer erläutert.

2.3.4. Einfluss des Harzes

Die in der Festphasengebundenen Synthese verwendeten Harze bestehen meist aus Polystyrol, das mit Divinylbenzol quervernetzt wurde. Diese Harze sind unlöslich, quellen aber in organischen Lösungsmitteln. Das Quellverhalten des Harzes ist wichtig, da die Reaktionsgeschwindigkeiten in der Festphasengebundenensynthese diffusionskontrolliert sind. Je besser das jeweilige Harz quillt, desto einfacher können Reagenzien zum Reaktionsort gelangen, desto schneller und vollständiger sind die Reaktionen.^[48-50]

Das 2-Chlortrityl Harz quillt wie die meisten Harze in Abhängigkeit der Vernetzung. Bei 1 % Vernetzung quillt es in Dichlormethan auf das vier- bis sechsfache seiner Ausgangsgröße. Ist das Harz stärker vernetzt quillt es deutlich weniger, es quillt also bei

2 % Divinylbenzolanteil nur um den Faktor zwei bis vier. In Wasser hingegen quillt das 2-Chlortritylharz nicht.

Die Geschwindigkeit der Kupplungsreaktionen erhöht sich generell, je kleiner die Harzkugeln sind. In der Praxis sind zu kleine Harzkügelchen jedoch nicht geeignet, da sie durch ihre geringe Größe beim Filtern schwer zurückzuhalten sind. Um ein gutes Verhältnis zwischen Filtrierbarkeit und Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen, haben sich Größen von 75 bis 150 μm bewährt.

Die Größe von Harzen wird vor allem in zwei Einheiten angegeben, entweder in μm oder in *Taylor Mesh Größe*. Die *Taylor Mesh Größe* ist invers proportional zum Durchmesser. Gewöhnlich werden zwei verschiedene Harzgrößen verwendet 100-200 mesh, was einem Durchmesser von 75-150 μm entspricht, sowie 200-400 mesh was einem Harzdurchmesser von 35-75 μm gleichkommt.

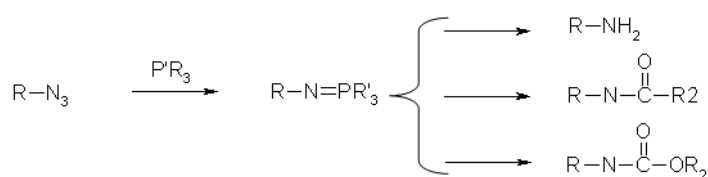
2.3.5. Freisetzung der festphasengebundenen Peptide

Sowohl die Entfernung der Fmoc Gruppe als auch die Aktivierung der α -Carbonsäure wurde unter basischen Bedingungen durchgeführt. Daher muss der Linker basenstabil sein. Andernfalls würde es schon während der Kupplung zu ungewollten Abspaltungen der Teilsequenzen vom Harz kommen. Um dies zu vermeiden wird ein basenstabiler Linker verwendet, der jedoch unter sauren Bedingungen, (insbesondere der häufig verwendeten Trifluoressigsäure (TFA)) labil ist. Eine Abspaltung der Peptide vom Harz mit TFA entfernt meist simultan die Seitenkettenschutzgruppen. Das Peptid liegt nach der Aufarbeitung, üblicherweise das Ausfällen in Diethylether, Dialyse und Gefriertrocknung, in seiner analysenrein vor.

Sowohl bei der Abspaltung des Peptids vom Harz, als auch beim Aufbau der Sequenz spielt die Art des Harzes und der Linker eine entscheidende Rolle. Soll als Beispiel ein vollgeschütztes Peptid vom Harz abspalten werden, eignet sich ein 2-Chlortrityl Harz. Dieser Linker ist sehr säurelabil, so dass schon eine 30%ige Lösung aus Trifluorethanol (TFE) in Dichlormethan genügt, um das Peptid vom Harz abzuspalten. Unter diesen Bedingungen sind etwaige Seitenkettenschutzgruppen wie Boc- oder ^tBu-Schutzgruppen stabil.

2.4. Erzeugung von Aziden

Seit der Synthese von Phenylazid im Jahre 1864 durch *P. Grieb* spielen Azide in der chemischen Industrie und in der Biochemie als energiereiche und vielseitig einsetzbare Reagenzien eine wichtige Rolle. Sie werden zum Beispiel als Schutzgruppen für Amine verwendet^[51]. Mit der *Staudinger Reaktion* können aus Aziden Phosphazene hergestellt werden. Daraus können, wie in Schema 5 dargestellt, primäre Amine, Amide oder Carbamate gewonnen werden.^[52-54]

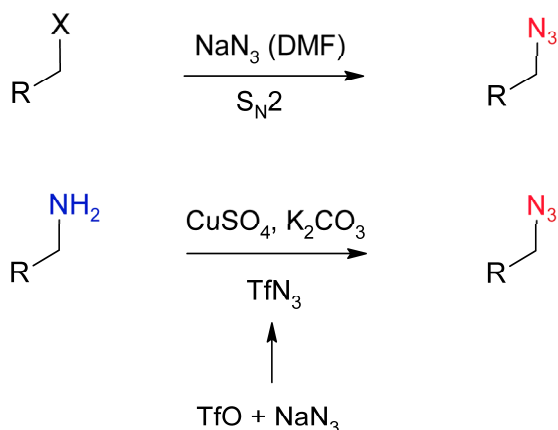


Schema 5. Verschiedene Nachfolgereaktionen der Staudinger Reaktionen

Es gibt heute unzählige Wege, organische Azide herzustellen. Es können fünf Wege unterschieden werden: a) Einführung der Azidgruppe (Substitution oder Addition), b.) Diazotierung (z. B. von Aminen oder Hydrazinen), c.) Einführung eines Stickstoffatoms, d.) Spaltung von Triazenen sowie durch e.) Umlagerung von Aziden.^[55, 56]

Die beiden wichtigsten Methoden in der Polymerwissenschaft, die nucleophile Substitution und der Diazotransfer an primären Aminen sollen nachfolgend näher erläutert werden (Schema 6).

Aliphatische Azide sind über das nucleophile Azidion gut zugänglich. Dabei wird in den meisten Fällen Natriumazid als Azidquelle genutzt. Der klassische Mechanismus ist eine S_N2 Substitution. Neben den klassischen Varianten (thermisch in DMF), wo Abgangsgruppen, wie Halogenide^[57], Carboxylate^[58] oder Triflate^[59] verwendet werden, gibt es moderne Varianten, die in ionischen Flüssigkeiten^[60] und überkritischem Kohlenstoffdioxid^[61] durchgeführt werden.



Schema 6. Zwei wichtige Wege zur Erzeugung von Aziden. Durch nucleophile Substitution (oben) mit der Abgangsgruppe X (Halogenid, Carboxylat, Triflat). Sowie durch Diazotransfer primärer Amine.

Aus Aminen können Azide im Allgemeinen mit Hilfe von Triflatazid (TfN_3) in einer Kupfer(II) katalysierten Reaktion gewonnen werden. ^[62, 63] Diese Technik hat mehrere Vorteile: sehr hohe Ausbeuten, Erhaltung der Konformation und milde Reaktionsbedingungen.

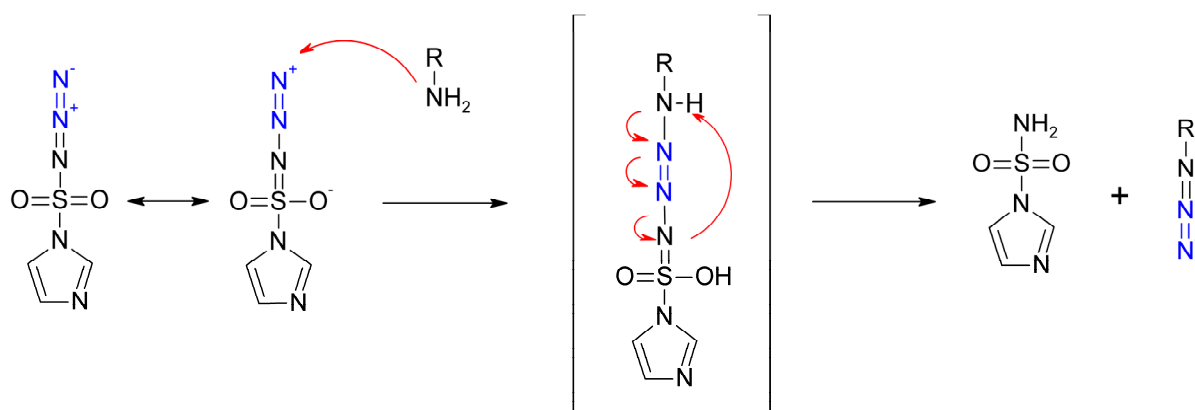
Als Nachteil muss erwähnt werden, dass TfN_3 instabil, also latent explosiv, und zudem sehr giftig ist. Meist wird TfN_3 in einer Wasser/ Dichlormethan (DCM) Zwei-Phasenreaktion aus Natriumazid (NaN_3) und Triflat (TfO) hergestellt. Da TfN_3 wasserunlöslich ist, sammelt es sich in der organischen Phase an und kann abgetrennt werden. Wird die Reaktion ohne DCM durchgeführt, scheidet sich das TfN_3 als Feststoff ab. Bei ungelöstem TfN_3 besteht jedoch eine erhöhte Explosionsgefahr. Das so gewonnene Triflatazid hydrolysiert mit Wasser, somit ist die gewonnene Menge an Triflatazid inkonsistent. Aus diesem Grund muss mit großem Überschuss an Reagenzien (6Äq. N_3^-), gearbeitet werden. Auf Grund dieser feuchtigkeitsbedingten Labilität muss das Diazotransferreagenz *in situ* hergestellt und sofort verwendet werden.

Neuere Arbeiten, die Herstellung von Triflatazid in trockenem Acetonitril und Pyridin betreffend, konnten den hohen Überschuss an Natriumazid reduzieren. Dieser Ansatz ist jedoch auf die beiden Lösungsmittel limitiert und kann ebenfalls nicht für wässrige Systeme genutzt werden. ^[64]

Alles in allem kann zusammengefasst werden, dass der Diazodonor Triflatazid nicht überzeugend im wässrigen Medium funktioniert. Die Verwendung von Triflatazid in wässrigen Lösungen ist durch die Kombination aus Giftigkeit und der Explosivität (im trocknen Zustand) und der Wasserunlöslichkeit nicht möglich.

Eine deutliche Verbesserung konnte 2007 durch *Goddard-Borger* und *Stick* erreicht werden, die ein neues Diazotransferreagenz vorgestellt haben.^[65] Das Diazotransferreagenz basiert auf Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid und kann aus günstigen Reagenzien hergestellt werden. Wie alle Azide zersetzt sich das Imidazolsulfonylazid thermisch, jedoch erst bei Temperaturen über 150°C. Es ist daher im trockenen Zustand lagerbar, und kann im Voraus hergestellt werden. Bei der Herstellung von Imidazole-1-sulfonylazid wird auch Natriumazid verwendet, das Produkt ist unter Laborbedingungen stabil, daher einfach und sicher zu handhaben.

Aus historischen Gründen wurden die ersten Reaktionen ebenfalls Kupfer(II) katalysiert durchgeführt, allerdings können auch Nickel-, Kobalt- oder Zink(II)salze die Reaktion katalysieren.



Schema 7. Dargestellt ist der Mechanismus Diazotransfers mittel Imidazolsulfonylazid an primären Aminen. Das Amin greift an dem Azid an, der instabile Übergangszustand reagiert in einer konzertierten Reaktion zum Azid weiter.

Der von *Doering* und *DePuy* 1953 für Triflatazid vorgeschlagene Mechanismus des Diazotransfers ist in Schema 7 dargestellt.^[66] Durch Zugabe des Radikalfängers 2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-oxyl (TEMPO) konnte keine Veränderung in der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt werden, daher wurde ein radikalischer Reaktionsverlauf ausgeschlossen.^[67] Eine abweichende, von *Nyffeler* diskutierte, Variante geht ebenfalls von *DePuy's* linearem Übergangszustand aus, verläuft jedoch zeitweise über einen Fünfring mit dem Metallkatalysator.^[68] Trotz des bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus gibt es viele Beispiele für den erfolgreich durchgeführten Diazotransfer.

Goddard-Borger und *Stick* testeten den Diazotransfer an kleinen Molekülen. Unter anderem wurde der Diazotransfer an den Aminosäuren Valin, Phenylalanin und Lysin durchgeführt.

An Kohlenhydrat-Derivaten mit primären Aminen wie 2-Galaktosamin und 2-Glukosamin, konnte der Diazotransfer ebenfalls demonstriert werden. Der Diazotransfer wurde meist in Methanol durchgeführt, beim Lysin kam ein Methanol/ Wasser Gemisch (50 % v/v) zur Anwendung.

Dies deutet die Möglichkeit an, den Diazotransfer mit dem Imidazolsulfonylazid in Wasser durchzuführen. Vom Diazotransfer mit Triflatazid ist bekannt, dass der ebenfalls an Peptidsequenzen an der Festphase mit guten Ergebnissen durchführbar ist. Es ist daher von Interesse den Diazotransfer auf wässrige Systeme zu übertragen, sowie die Voraussetzungen und Ergebnisse des Diazotransfers an der Festphase zu überprüfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Diazotransfer verwendet um aus primären Aminen Azide zu synthetisieren. Dabei wurde das Imidazolsulfonylazid unter verschiedenen Bedingungen eingesetzt (Kapitel 4).

In der „Klick Chemie“ dienen Azide der Verknüpfung zweier Moleküle. Dabei reagiert ein Azid mit einem primären Alkin unter Bildung eines 1,2,3-Triazols. Die in dieser Arbeit verwendete „Klick Chemie“ wird daher im nächsten Kapitel näher beschrieben.

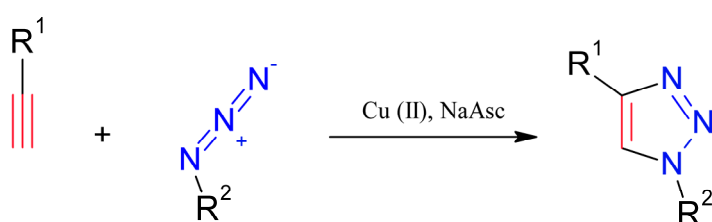
2.5. „Klick Chemie“

Der Begriff „Klick Chemie“ (engl. click chemistry) bezeichnet im allgemeinen effiziente, vielseitige Reaktionen mit vollständigem Umsatz. Die Familie der „Klick-Chemie“ lässt sich grob in mehrere Reaktionsklassen einteilen^[69]

- (a) Cycloadditionen ungesättigter Verbindungen z. B. die 1,3-dipolare Additionen, Diels Alder Reaktionen
- (b) andere zyklische Reaktionen
- (c) Ringöffnungsreaktionen an gespannten Heterocyclen
- (d) Additionen an Kohlenstoffmehrfachbindungen (z. B. Mercaptan an primäre Doppelbindungen).

In engem Zusammenhang wird der Begriff „Klick Chemie“ mit der 1963 von *Huisgen* systematisch untersuchten 1,3-dipolaren Cycloaddition^[70] benutzt. *Huisgen* verwendete auch den Begriff [3+2] Cycloaddition. Diese Umlagerungsreaktion zweier π -Bindungen zu zwei σ -Bindungen läuft schnell und mit hohen Umsätzen ab (Schema 8). Das Prinzip der 1,3-Cycloaddition ist ungleich länger bekannt. Die Arbeit von *L.I. Smith* aus dem Jahre 1938 gibt einen umfassenden Überblick.^[71]

Obwohl *Huisgen* schon die Breite der Anwendungsmöglichkeiten der [3+2] Cycloaddition erkannte, kam der wirkliche Durchbruch erst mit den bahnbrechenden Veröffentlichungen von *Sharpless* und Mitarbeitern im Jahre 2001.^[72] Nach Veröffentlichung dieser Arbeiten potenzierte sich die Anzahl der Publikationen, auf dem Gebiet der „Klick Chemie“.

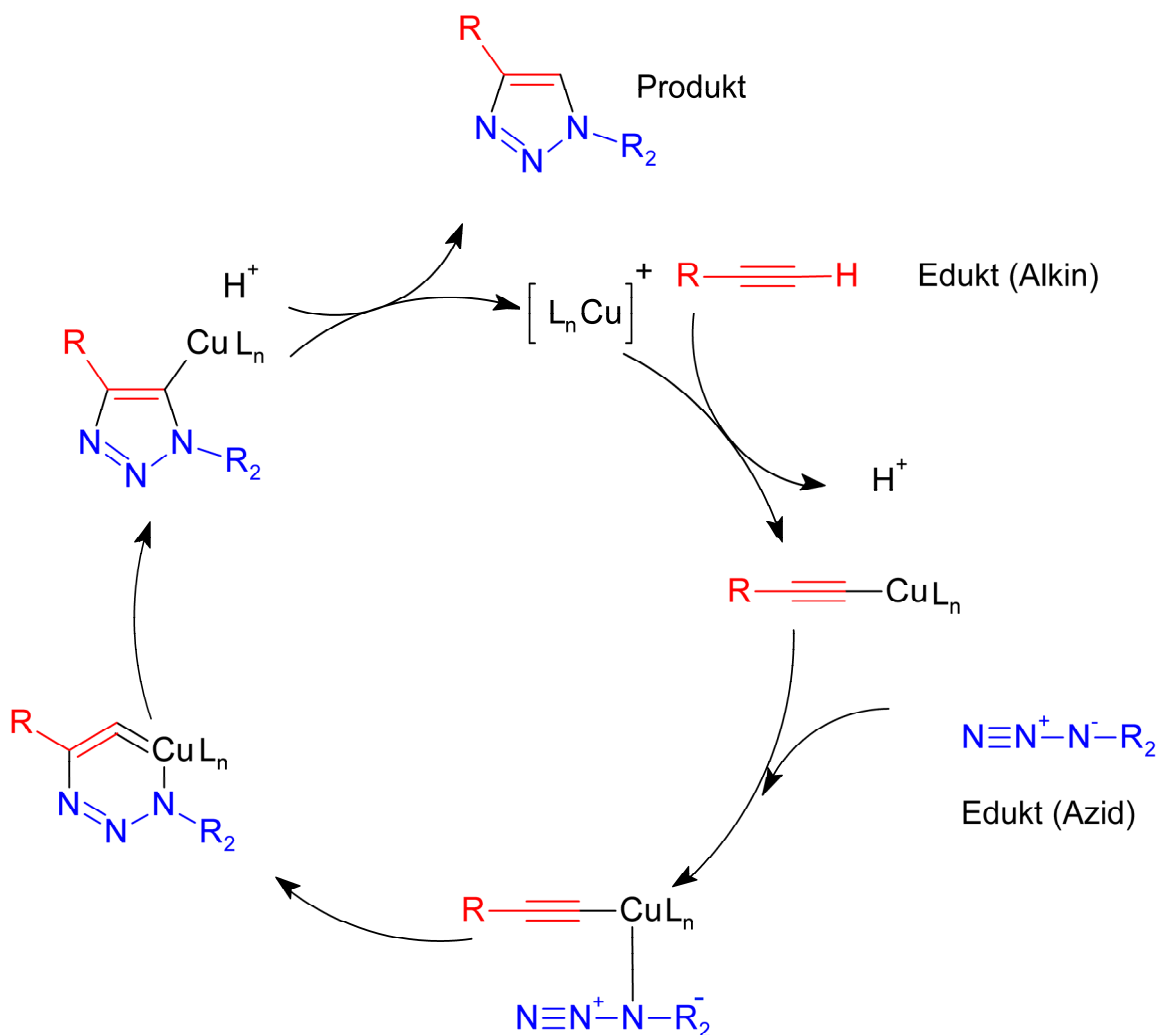


Schema 8. Klick Reaktion: Alkin und Azid reagieren zu einem 1,2,3-Triazolring. Das Natriumascorbat (NaAsc) dient zur Reduzierung des Cu(II).

Ein Jahr später konnten *Fokin* und *Sharpless*^[73] einen Mechanismus für die Kupfer(I) katalysierte „Klick Reaktion“ vorschlagen, der in Schema 9 dargestellt ist.

Der Zyklus beginnt mit der Bildung von Kupfer-Acetylen, gefolgt von der Anlagerung des Azides an das Kupfer. Weiter verläuft die Reaktion vermutlich über einen sechsgliedrigen Übergangszustand, in dem das Kupfer Bestandteil des Ringes ist.^[74] Dieser lagert sich zum

1,2,3-Triazol um. Mit der Abspaltung des Kupfers wird anschließend der Katalysator zurückgewonnen.



Schema 9. Der Mechanismus der Cu(II) katalysierten [3+2] Cycloaddition von *Fokin* und *Sharpless*.^[73]

Kupfer(I) spielt aber nicht nur in der „Klick Chemie“ eine entscheidende Rolle. In der Natur kommt es unter anderem als Cu^{I+}/Cu^{II+} -Paar in Redoxprozessen sowie bei der Sauerstoff-Absorption und Reduktion vor.^[75] Die hohe Reaktivität von Kupfer(I)-Verbindungen basiert auf ihrer thermodynamischen Instabilität, was sich in leichter Oxidierbarkeit^[76] und Disproportionierung^[77] (zu Cu^0 und Cu^{II+}) bemerkbar macht. Daher wird in der Synthesechemie meist unter inerten Bedingungen und in wasserfreien Lösungsmitteln gearbeitet.

In der Natur hingegen gibt es viele Kupfer(I)-haltige Proteinverbindungen^[78, 79], die unter aeroben, wässrigen Bedingungen stabil sind. Will man diese Bedingungen auf chemische

Reaktionen übertragen, muss das katalytisch eingesetzte Kupfer(I) stabilisiert werden. Dazu werden Liganden benötigt, die das Kupfer komplexieren.

Es wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt, in denen Thiole, Imine, sowie Halogenide als Kupferliganden für die „Klick Reaktion“ genutzt wurden. Die meisten Liganden sind dabei entweder zu labil (Amine, Halogenide), um das Kupfer zu schützen oder sie sind zu stabil (Nitrile) und unterdrücken die katalytische Wirkung des Kupfer(I). Als sehr effektive Liganden haben sich Poly-1,2,3-Triazolamine herausgestellt. Insbesondere das TBTA (Trisbenzyltriazolmethylamin) schützt Kupfer(I) vor der Oxidation und erhöht zudem seine katalytische Aktivität.

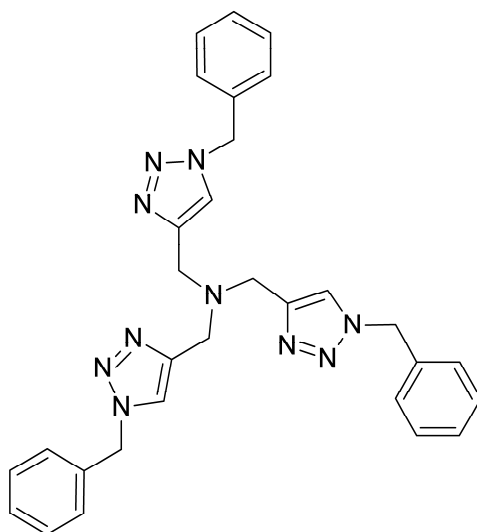


Abbildung 8. Abgebildet ist die Strukturformel von TBTA, ein sehr guter Ligand für die Kupfer(I) katalysierte 1,3-dipolare Addition.

Durch den Vorteil der sanften Reaktionsbedingung, sowie durch die hohen Umsätze, eignet sich die Kupfer (I) katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition hervorragend für die Modifikation von wässrigen Peptidsystemen.

Werden Reaktionen an funktionalen Gruppen von Polymeren durchführen, ergeben sich mehrere Probleme. Bedingt durch ihre Größe diffundieren Makromoleküle viel langsamer. Das senkt die Reaktionsgeschwindigkeit der Polymere deutlich herab. Bei Polymeren mit vielen reaktiven Gruppen ist es notwendig eine vollständige Umsetzung aller Gruppen zu erreichen. Andernfalls wird ein schlechter Funktionalisierungsgrad beobachtet. Bei kleinen Molekülen ist es möglich, nicht umgesetzte Moleküle abzutrennen. Dies ist bei Polymeren, mit nur zum Teil umgesetzten funktionalen Gruppen, nicht möglich.

Die „Klick Chemie“ konnte erfolgreich in der Polymerchemie etabliert werden. Die ATRP^[80] (Atom Transfer Radical Polymerisation) bietet mit der Brom Endgruppe eine hervorragende Möglichkeit ein Azid zu erzeugen und daran Alkine zu klicken.^[81-83] Die

1,3-dipolaren Cycloaddition von Aziden und Alkinen konnte an Dendrimeren^[39, 84-86] und linearen Polymeren^[87-90] durchgeführt werden. Die Vielseitigkeit der Cycloaddition konnte nicht nur an synthetischen Polymeren, sondern auch an natürlichen Systemen, wie Zellen oder DNA gezeigt werden.^[91, 92] Insbesondere bei natürlichen Polymeren, deren Strukturbildung von den funktionellen Gruppen abhängt ist es wichtig, eine regio-spezifische und stereospezifische Reaktion zu nutzen, die mit hohen Ausbeuten einhergeht.

Ein weiteres Beispiel für biologische Moleküle sind neben der DNA die Peptide. Die bei Peptiden vorkommenden selbstorganisierenden Strukturbildungsprozesse hängen neben der Sequenz von den jeweiligen Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren ab. Native Peptide weisen ihre Eigenschaften nur unter bestimmten Bedingungen auf. So kann die Faltung und Aggregation eines Peptides nur in wässrigen Lösungen unter bestimmten Bedingungen, wie Salzkonzentration, Druck und Temperatur stattfinden. Sollen diese natürlichen vorkommenden Wechselwirkungen ausgenutzt und untersucht werden, ist die Auswahl des Lösungsmittels limitiert. Hier bietet sich die „Klick Chemie“ an. Sie ist tolerant gegenüber allen anderen funktionellen Gruppen, unter milden Bedingungen durchführbar und ist lösungsmittelinsensitiv.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kupferkatalysierte [3+2] Cycloaddition eine Ringbildungsreaktion mit hohen Ausbeuten ist. Diese Reaktion stellt eine Möglichkeit dar, ein Alkin mit einem Azid unter Bildung eines 1,2,3-Triazols umzusetzen. Die Cycloaddition erlaubt die Kontrolle über die Regio- und Stereoselektivität. Die Reaktion ist in organischen Lösungsmitteln, aber auch in Wasser, sowie in heterogenen Lösungsmitteln (Zweiphasenreaktion) durchführbar.

Aus diesem Gründen wurde die 1,3-dipolare Cycloaddition in der vorliegenden Arbeit verwendet, um Polymer-Peptidsystemen mit definierten Sekundärstrukturen zu modifizieren. Dabei sollte untersucht werden, ob die peptidkontrollierten Strukturen während der Reaktionsbedingungen stabil sind.

3. Charakterisierungsmethoden

Um Polymer-Peptid-Konjugate zu charakterisieren, stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Neben den klassischen Analysemethoden wie Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Infrarotspektroskopie (IR) und Massenspektrometrie (MS) können die gängigen Peptidanalytiken Matrix-Assistet-Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI-MS) und Circular dichroismus (CD) verwendet werden. Zusätzlich können die klassischen Polymeranalytiken, wie Gel-Permeations-Chromatographie (GPC), Rheologie, Lichtstreuung (LS), Thermogravimetrie (TG) genutzt werden.

Weiterhin stehen Methoden, wie die Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic-force-microscopy, AFM), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) oder Rasterelektronenmikroskopie (REM) zur Verfügung, um Makrostrukturen zu visualisieren. Stellvertretend sollen die Massenspektrometrie, der Circular dichroismus und die Rasterkraftmikroskopie näher erläutert werden.

3.1. Massenspektrometrie (MS)

3.1.1. Allgemeines

Die Massenspektrometrie basiert auf der Trennung von bewegten, geladenen Atomen und Molekülen in einem magnetischen Feld. Erste Arbeiten zur Trennung geladener Teilchen wurden von *Aston*^[93, 94] und *Thomson*^[95] vom späten 19. bis Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt.

Das Interesse daran, größere Biomoleküle wie Proteine massenspektrometrisch zu untersuchen, war groß. Mit Hilfe der gängigen Ionisationsverfahren konnten diese Moleküle entweder nicht ionisiert werden oder es fanden starke Fragmentierungen statt, weil Peptide thermisch instabil und zudem schwer flüchtig sind.

Zur massenspektrometrischen Analyse von Biomolekülen müssen diese unzersetzt als geladene Moleküle in die Gasphase überführt werden. Dafür eignen sich sowohl kontinuierliche Ionisationsverfahren wie das Elektrospray (ESI)^[96] als auch das gepulste Ionisationsverfahren der MALDI.^[97]

3.1.2. ESI-MS

Die Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS), eine schonende Methode zur Untersuchung von Proteinen und anderen Biomolekülen, wurde 1989 von *Fenn* entwickelt.^[98] Im Jahre 2002 erhielt er dafür den Nobelpreis der Chemie.

3.1.2.1 Ionisation

Bei der ESI-MS wird eine stark verdünnte Analytlösung ($10^{-3} - 10^{-7}$ mol/L) verwendet. Gewöhnlicherweise ist das Lösungsmittel leicht verdampfbar, weitere Zusätze wie Säuren oder Basen sind üblich.

Bei der Elektrospray-Ionisierung bewirkt eine hohe Potentialdifferenz zwischen einer mit Analytlösung durchspülten Kapillare und dem Einlass ins Massenspektrometer die Bildung von Ionen. Die aus der Kapillarspitze austretende Flüssigkeit bildet unter dem Einfluss des elektrischen Feldes einen feinen Nebel hochgeladener Tröpfchen. Diese werden auf Grund der Ladung und der anliegenden Spannung in Richtung Massenspektrometer beschleunigt. In diesem so versprühten Aerosol liegt der Analyt ionisiert vor.

Auf ihrem Weg zum Massenspektrometer durchqueren die Aerosol Tröpfchen einen Potential- und Druckgradienten.^[99] Die feinverteilten Lösungsmitteltropfen verdunsten (durch das anliegende Vakuum) weiter, dadurch nimmt die Konzentration der geladenen Analytmoleküle zu. Die repulsiven Kräfte zwischen den gleichgeladenen Analytmolekülen führen bei einer kritisch hohen Konzentration zur sogenannten Coulomb Explosion. Der genaue Mechanismus wird noch diskutiert^[100]. Als Ergebnis liegen die geladenen Analytmoleküle separiert vor. Die einzelnen Analytmoleküle werden im Anschluss im Massenspektrometer analysiert.

Je nach Art des an der Kapillare angelegten Potentials unterscheidet man zwei Ionisationsarten: positive Ionisation oder negative Ionisation. Bei der ES-Ionisation werden nicht nur Quasimolekülionen mit einer Ladung erzeugt und detektiert. Es treten im positiven Modus außerdem Ionenaddukte auf, die die Masse $[M+aX]^{a+}$ besitzen wobei X für Begleitonen, wie Protonen (H^+), Alkalimetallionen (Na^+ , K^+), etc. steht. Im negativen Modus entstehen Ionen, denen ein Proton $[M-H]^{1-}$ fehlt.

Für große Makromoleküle sind mehrfach geladene Ionen detektierbar, so treten zum Beispiel neben $[M+H]^{1+}$ auch $[M+2H]^{2+}$ und $[M+3H]^{3+}$ usw. auf. Die Anzahl der Mehrfachladungen nimmt mit der Größe des Analyten und der Anzahl der ionisierbaren Funktionalitäten zu. So treten bei verschiedenen Masse / Ladungsverhältnissen (m/z) Ionenpeaks auf.

Weil die Ionisation in Abhängigkeit von Struktur, Molekülgröße und funktionellen Gruppen stattfindet, kann es in Produktgemischen vorkommen, dass kaum vorhandene Verunreinigungen im Massenspektrum dominieren. Aus diesem Grund bietet sich eine Kopplung dieser kontinuierlichen Ionisationsmethode mit Gaschromatographie (GC) oder High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) an, um so quantitative Aussagen zur Zusammensetzung von Analytgemischen zu ermöglichen.

3.1.2.2 Auftrennung und Detektion

Als Analysatoreinheit dient in der ESI-MS oft ein Quadrupol-Massendetektor. Der Quadrupol besteht aus vier parallelen Stabelektroden. An diesen Elektroden wird eine Spannung angelegt, welche eine Überlagerung einer Gleichspannung und einer hochfrequenten Wechselfspannung ist. Die jeweils gegenüberliegenden Metallstäbe haben dieselbe Polarität. Benachbarte Stäbe besitzen somit entgegengesetzte Polaritäten und eine um 180° gegeneinander verschobene Phase.^[101]

Für die Spannung gilt: $U(t) = U + V_0 \cdot \cos(\omega t)$

Über die Einstellung der Frequenz (ω) oder der Spannungen (U , V) lässt sich festlegen, welche Teilchen den Detektor erreichen. Die Flugbahn des Teilchens mit dem richtigen m/z -Verhältnis ist sinusförmig. Bei der sinusförmigen Flugbahn bleiben die Abstände zu den Quadrupolstäben gleich, das geladene Teilchen erreicht den Detektor. Alle anderen Teilchen, die diesen Quadrupol durchlaufen, werden durch die Wechselfspannung auf instabile Flugbahnen gelenkt und kollidieren mit dem Quadrupol oder werden aus dem Quadrupol-Feld herausgeschossen. In Abhängigkeit von den Spannungen U , V und der Frequenz ω erreichen nur diejenigen Teilchen mit dem richtigen m/z -Verhältnis den Detektor. Durch eine Variation dieser Parameter kann ein ganzes Spektrum an m/z Werten aufgenommen werden.

3.1.3. MALDI-TOF

In der Mitte der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde die „matrix assisted laser desorption ionisation“ kurz MALDI Massenspektrometrie entwickelt. *Hillenkamp* und sein damaliger Assistent *Karas* stellten 1985 die schonende MALDI vor.^[102] Sie wiesen nach, dass Alanin einfacher zu ionisieren ist, wenn man es zusammen mit Thryptophan durch einen Laser ($\lambda = 255 \text{ nm}$) anregt. In den nächsten vier Jahren gelang es ihnen, auch sehr große Proteine

(250 kDa) mit der MALDI zu charakterisieren.^[103-105] Bis heute hat die MALDI MS weitere Modifikationen erfahren. So konnte die Auflösung der linearen Methode durch *Lennon* und *Brown* stark verbessert werden, indem ein gepulster Laser verwendet wurde.^[106, 107]

3.1.3.1 Ionisation

Die MALDI stellt eine sehr schonende Ionisation bereit, die gerade für große und komplexe Moleküle, insbesondere Biomoleküle, Anwendung findet.

Bei der MALDI wird der Analyt mit einer Matrix in großem molaren Überschuss (100-100.000 fach) co-kristallisiert. Als Matrix werden kleine Moleküle genutzt, die bei der verwendeten Laserwellenlänge stark absorbieren (z. B. N₂ Laser: $\lambda = 337$ nm). Typische Moleküle für Peptide sind 4-Hydroxy-3-Methoxyzimtsäure (Ferulsäure), Sinapinsäure (SA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (ACHC).^[108, 109]

Die Analytmoleküle müssen homogen in die Matrixkristalle eingebettet werden. Matrix und Analyt werden dafür zusammen in einem Lösungsmittel gelöst und auf dem Probenträger eingetrocknet. Das so entstehende Matrixgitter wird durch Beschuss mit kurzen (2-5 ns), hochenergetischen Laserpulsen angeregt. Diese Pulse induzieren eine Relaxation im Kristallgitter und führen zu einer gemeinsamen, explosionsartigen Freisetzung von Matrix und Analyt in die Gasphase.^[110]

3.1.3.2 Auftrennung und Detektion

Nach Erzeugung der Ionen werden diese in einem elektrischen Feld beschleunigt und dann in einem TOF (engl. time-of-flight) Massenspektrometer analysiert. Das TOF ist das meistgenutzte und am besten für die MALDI angepasste Verfahren, dass vor allem durch den großen Massenbereich und die hohe Auflösung überzeugt. Nach Verlassen des Ionenbeschleunigers besitzen die Analytmoleküle auf Grund unterschiedlicher m/z-Verhältnisse unterschiedliche Geschwindigkeiten. Durch die unterschiedlichen Geschwindigkeiten erreichen die Analyten den Detektor zu verschiedenen Zeiten. Um die Flugzeit mit dem m/z Verhältnis korrelieren zu können, ist eine Kalibrierung notwendig. Hierzu werden als Standardsubstanzen entweder monodisperse Biomoleküle wie Rinderinsulin verwendet. Alternativ ist aber auch eine Mehrpunktkalibrierung mit einem Polymerstandard (z. B. Polystyrol) möglich.

Die Genauigkeit und Auflösung wird heute standardmäßig durch Verzögerungsextraktion und Reflektron deutlich verbessert.^[106, 111]

3.2. Circular Dichroismus

3.2.1. Allgemeines

Circular Dichroismus (CD) ist eine spektroskopische, chiroptische Technik die auf unterschiedlicher Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht beruht. Die CD-Spektroskopie bietet die exzellente Möglichkeit, die Faltung und Interaktion von Proteinen in Lösung zu studieren.^[112]

Schon 1939 beobachtete *Mulliken* elektronische Übergänge in Molekülen^[113], 1956 wurden helikale Polymere von *Moffitt* mittels CD untersucht.^[114] Damals war noch wenig über die Sekundärstruktur von Proteinen bekannt. Erst nachdem die Daten von Proteinstrukturen durch andere Techniken wie Röntgenkristallstrukturanalyse (RKSA) gewonnen wurden, konnten die gemessenen CD-Spektren mit diesen Daten korreliert werden. Seit 1980 findet ein explosives Wachstum an strukturebiologischen Arbeiten statt. Pro Jahr kommen ca. 2.000 hochauflösende Strukturen von Proteinen in die Protein-Datenbank (PDB).^[115]

Die CD-Spektroskopie bietet so eine schnelle und günstige Möglichkeit die Konformation von gelösten Proteinen und anderen chiralen Molekülen und Polymeren in Lösung zu untersuchen.^[116-118] Zwei Voraussetzungen sind für die untersuchten Moleküle notwendig. Zum einen müssen die untersuchten Moleküle chiral und nicht racemisch sein, zum anderen müssen sie Licht in der spezifischen Wellenlänge absorbieren.

3.2.2. Funktionsprinzip

In der klassischen Physik wird Licht als elektromagnetische Welle beschrieben. Die elektrischen und magnetischen Vektoren sind dabei in Ausbreitungsrichtung orthogonal zueinander. Linear polarisiertes Licht kann als eine Kombination zweier zirkularpolarisierter Wellen beschrieben werden. Die eine Komponente rotiert gegen den Uhrzeigersinn (links polarisiertes Licht; L), die andere mit dem Uhrzeigersinn (rechts polarisiertes Licht; R). Sind Amplitude, Wellenlänge und Phase der Komponenten gleich, ergibt die Linearkombination ihrer Vektoren linear polarisiertes Licht.^[119]

Durchquert ein linear polarisierter Lichtstrahl eine Probe, die links polarisiertes (L) und rechts polarisiertes (R) Licht zu gleichen Anteilen ($\epsilon_L = \epsilon_R$) oder gar nicht absorbiert, ist der austretende Lichtstrahl ebenfalls linear polarisiert. Werden jedoch die Komponenten unterschiedlich stark absorbiert ($\epsilon_L \neq \epsilon_R$), so ist die elektromagnetische Welle nach dem Durchlaufen der Probe zirkular polarisiert (Abbildung 9).

Die zirkulare Polarisation kommt dadurch zustande, dass links polarisiertes Licht zum Teil absorbiert wurde, rechts polarisiertes Licht jedoch nicht. Werden nun die Vektoren addiert entsteht zirkular polarisiertes Licht. Dabei ist die lange Achse der Ellipse zu der des eingestrahlten linear polarisierten Lichtes parallel.

Bei dieser Erklärung wurden zwei Faktoren vereinfacht: Zum einen wird meist sowohl links polarisiertes (L) als auch rechts polarisiertes (R) Licht absorbiert, nur unterschiedlich stark, beides resultiert jedoch in elliptisch polarisiertem Licht. Zum anderen kommt es fast immer vor, dass zusätzlich die Ebene des linear polarisierten Lichtes gedreht wird. Dieser Effekt wird als optische Rotationsdispersion (ORD) beschrieben und basiert auf unterschiedlicher Ausbreitungsgeschwindigkeit von links und rechts polarisiertem Licht im Material. Damit sind in Abhängigkeit der Wellenlänge unterschiedlichen Brechungs-Indices ($n_L \neq n_R$) verbundenen. Das führt dazu, dass zusätzlich zum CD Effekt der sogenannte Cotton Effekt auftritt.^[120, 121]

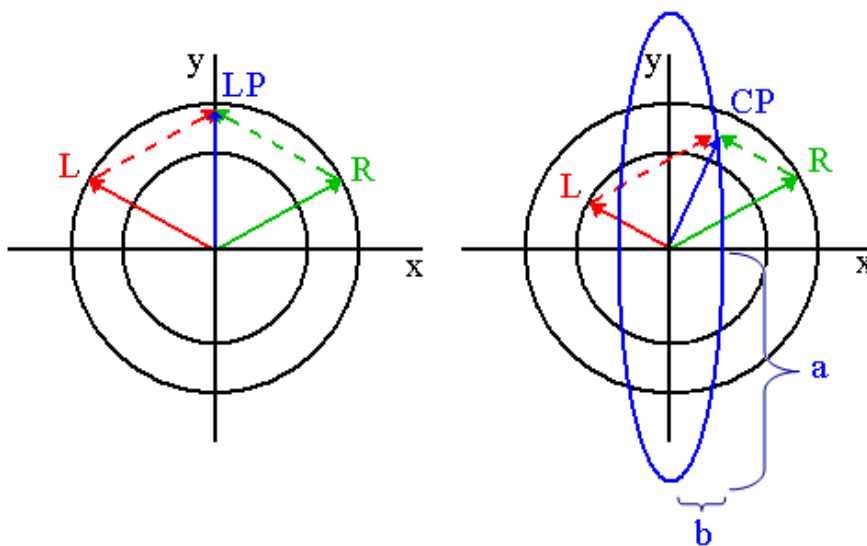


Abbildung 9. Entstehung von elliptisch polarisiertem Licht; links: eingestrahltes Licht; rechts: nach dem Durchgang durch ein optisch aktives Medium entsteht zirkularpolarisiertes Licht

Aus der entstandenen Ellipse kann die Elliptizität Θ berechnet werden, wobei Θ über das Verhältnis der Neben- und Hauptachsen der Ellipse (b und a) definiert ist: ^[112, 122]

$$\tan \theta = b/a = (L-R)/(L+R) \quad (\text{Gl. 1})$$

Die molare Elliptizität errechnet sich durch die molaren Konzentration c (mol/l) und die Pfadlänge l (cm) der Küvette:

$$[\theta]_{\lambda} = 100 \cdot \theta \cdot (c \cdot L)^{-1} \quad [\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 / (\text{dmol})] \quad (\text{Gl. 2})$$

Mit Hilfe des Lambert Beerschen Gesetzes kann (Gl. 2) wie folgt umgestellt werden:

$$[\theta]_{\lambda} = 3300 \cdot \Delta \epsilon \quad (\text{Gl. 3})$$

Wobei $\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ ist.

Für Peptide ist es gebräuchlich die molare Elliptizität in das mittlere Molekulargewicht (engl.: mean weight ellipticity, MWE) umzurechnen:

$$[\theta]_{\lambda, \text{MWE}} = 100 \cdot \theta \cdot M \cdot (c \cdot L)^{-1} \quad [\text{Grad} \cdot \text{g} \cdot \text{cm}^2 / (\text{dmol} \cdot \text{mol})] \quad (\text{Gl. 4})$$

Sind die Wiederholungseinheiten (N_R) bestimmt, wie bei bekannten Peptiden oder Makromolekülen, so kann die mittlere molare Elliptizität pro Wiederholungseinheit (engl. Mean residue ellipticity, MRE) berechnet werden:

$$[\theta]_{\lambda, \text{MRE}} = 100 \cdot \theta \cdot M \cdot (c \cdot L \cdot N_R)^{-1} \quad [\text{Grad} \cdot \text{g} \cdot \text{cm}^2 / (\text{dmol} \cdot \text{mol})] \quad (\text{Gl. 5})$$

Die CD-Spektren von Peptiden werden generell in 3 Bereiche unterteilt:

- (a) Unter 250 nm: Die Amidbindungen von Peptiden absorbieren im Bereich von 190 nm bis 230 nm und dominieren diesen Bereich.
- (b) 250-300 nm: hier liefert die Absorption aromatischer Seitenketten ihren Beitrag zum Circular dichroismus.
- (c) 300-700 nm; hier spielt die Absorption extrinsischer Chromophore (wie z. B. Hämoglobin) eine Rolle.

Messungen des Circular Dichroismus an Peptiden sind wichtig für die Ermittlung der Sekundärstruktur. Für Peptide sind mehrere Sekundärstrukturen bekannt. Die häufigsten sind β -Faltblatt, α -Helix, Turn und ungeordnet Strukturen (engl. random coil). Jede Sekundärstruktur gibt ein eindeutiges CD-Signal (Abbildung 10).

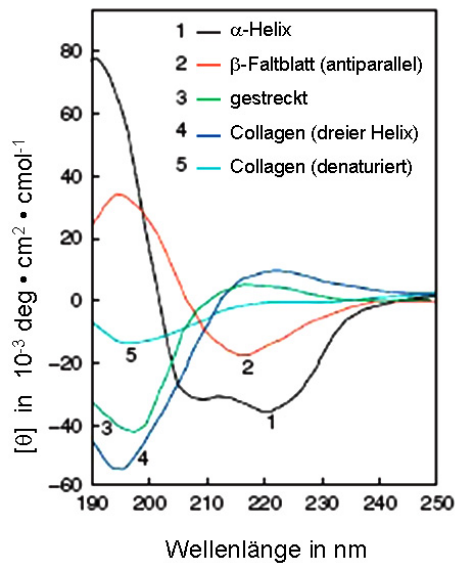


Abbildung 10. CD Spektrum von Peptiden mit repräsentativen Sekundärstrukturen. Gezeigt ist Poly-L-Lysine mit (1) α -Helikaler Konformation, (2) β -Faltblatt Konformation (pH = 11,1), (3) gestreckter Konformation (pH = 5,7),^[115] sowie Kollagen in (4) nativer Form (triple Helix) sowie in denaturierter Form (5) (random coil)^[123, 124]

Es ist anzumerken, dass die ausgedehnte Struktur von Poly-L-Lysine (vergleich Abbildung 10, (3)) ursprünglich als „random coil“ beschrieben wurde. Das Spektrum konnte aber mit Poly-L-Prolin abgeglichen werden, welches ebenfalls eine ausgedehnte Struktur annimmt, die kein Zufallsknäuel, sondern eine linksgängige Helix bildet.^[125]

Wie schon beschrieben ist eine Voraussetzung für die Entstehung eines CD-Signals die Absorption in einem spezifischen Wellenlängenbereich. Die Amid Bindung ist durch zwei Übergänge charakterisiert: einem relativ schwachen, aber breiten $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 220 nm und einen intensiven $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 190 nm.

Das Signal der random coil Struktur besitzt ein Minimum bei 195 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) und ein sehr schwaches Maximum bei 212 nm ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang). Es ist damit invers zum Signal des β -Faltblatt, dies besitzt ein Maximum bei 195 nm und ein Minimum bei 218 nm.

Bei der α -Helix kommt es zur Exitonkopplung, dadurch entsteht eine Aufspaltung des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs in zwei Komponenten. Die senkrecht polarisierte Komponente bei 192 nm und die parallel polarisierte Komponente bei 209 nm. Außerdem kommt es durch die Exitonkopplung zur Energieabsenkung des $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs, das in einer bathochromen Verschiebung des Übergangs auf 222 nm resultiert.

Die Spektren von β -Faltblättern variieren stärker, als die von helikalen Strukturen. Beeinflusst wird das Aussehen der β -Faltblattspektren durch die Anordnung zu parallelen

oder antiparallelen β -Faltblattstrukturen. Weiterhin verändert z. B. die Verdrillung der β -Faltblattstruktur das Aussehen der Spektren stark.

Besteht ein Molekül aus mehreren Bereichen mit unterschiedlichen Sekundärstrukturen, kann in erster Näherung angenommen werden, dass sich das gemessene CD Signal aus einer Linearkombination der beiden Anteile zusammensetzt. Es gibt mehrere Programme, die anhand des gemessenen CD-Spektrums die Sekundärstrukturanteile des Peptides ermitteln können.^[126-129] Die wichtigsten sind SELCON^[130], CONTINLL^[131], K2D und CDSSTR⁶³.

Dabei ist es notwendig, dass gemessene Kurven genau in die jeweiligen Bestandteile entfaltet werden. In Abbildung 11 ist die Entfaltung einer Helix Struktur dargestellt.

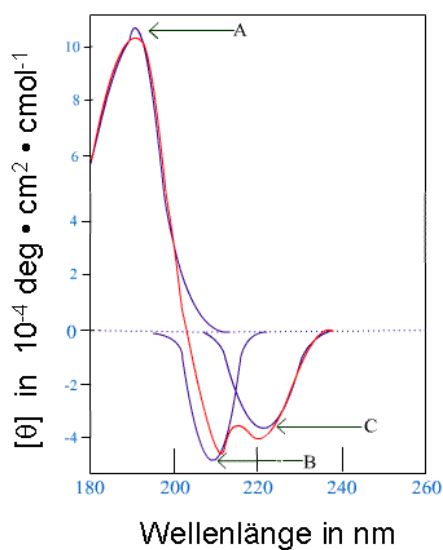


Abbildung 11. Entfaltung eines CD Spektrums, gezeigt ist das gemessene Spektrum einer α -Helix und die einzelnen Elektronischen Übergänge, die in ihrer Summe das gemessene Spektrum ergeben, A ($\pi \rightarrow \pi^*$ -senkrechter Übergang), B ($\pi \rightarrow \pi^*$ -paralleler Übergang), C ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang).

Es stehen weitere Möglichkeiten zur Verfügung, um das Verhalten von Proteinen in Lösung mittels CD zu untersuchen. So kann die Messzelle beheizt werden oder Peptide durch Reagenzien denaturiert (Hofmeister Salze) und neu gefaltet werden.^[116, 132, 133]

Aus diesen Daten können Aussagen über die Kinetik und Thermodynamik einer Protein Faltung gemacht werden, so sind unter anderem Zwischenstufen der Faltung bestimmbar. Weiterhin können Protein Ligand Wechselwirkungen, sowie die Aggregation von Proteinen untersucht werden.^[116]

3.3. Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM)

3.3.1. Allgemeines

Werden Polymere und Polymeraggregate auf der Nanometerskala untersucht, wird das Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie erreicht. In grober Näherung entspricht die Auflösung der Hälfte der Wellenlänge des verwendeten Lichtes (für blaues Licht $\lambda = 400 \text{ nm}$ entspricht dies $0,2 \mu\text{m}$). Bei optimaler Gerätebeschaffenheit und der Verwendung von Ölimmersion können praktisch Objekte voneinander unterschieden werden, die $0,3 \mu\text{m}$ voneinander entfernt liegen. Die Ursache hierfür ist das sog. Abbe Limit^[134]:

$$d = \lambda \cdot (2n \sin\alpha)^{-1}$$

Hierbei ist d das Auflösungsvermögen, n der Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Gegenstand, α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs.

Diese Grenze konnte durch far-field fluorescence microscopy noch deutlich ($15\text{-}20 \text{ nm}$) herabgesetzt werden.^[135] Diese Technik gehört noch nicht zum Laborstandard, wird aber mit Sicherheit in der Zukunft an Bedeutung gewinnen und bei einigen Problemen einen fantastischen Einblick gewähren. Allerdings ist die Anwendung durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen limitiert.

Im Gegensatz zur spektroskopischen Mikroskopie nutzt die AFM Mikroskopie keine Lichtbrechung und weist damit kein wellenlängenabhängiges Limit auf. Bei der von *Binnig* und *Rohrer* 1986 entwickelten Methode werden Kräfte zwischen einer sehr feinen Spitze und der zu untersuchenden Oberfläche ermittelt.^[136] Diese Methode soll nachfolgend genauer erläutert werden.

3.3.2. Messprinzip

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird eine sehr kleine Spitze zeilenweise über die Oberfläche der Substanz geführt. Die Spitze ist an einer Blattfeder (Cantilever) angebracht und wird über die Oberfläche bewegt. Ändert sich die Höhe der Oberfläche, wechselwirkt die Spitze mit der Oberfläche. Diese Wechselwirkungen werden auf den Cantilever übertragen.

Die laterale Steuerung dieser Bewegung erfolgt durch ein Piezostellelement. Dies ermöglicht das zeilenweise abrastern der Oberfläche, so dass Punkt für Punkt ein Bild über deren Beschaffenheit aufgenommen werden kann.

Die Cantilever wird durch attraktive (Van der Waals Kräfte) und repulsive Wechselwirkungen mit der Oberfläche unterschiedlich stark gebogen. Diese Verbiegung kann mit optischen Sensoren gemessen werden und ist ein Maß für die zwischen Spitze und Oberfläche wirkende Kraft.

Je nach Art des zu untersuchenden Materials kann aus einer Vielzahl von Messmodi gewählt werden:

Bei dem **Kontaktmodus** (Abbildung 12 a) wird die Spitze der Oberfläche weit angenähert, werden die repulsiven Kräfte zwischen Probe und Spitze gemessen. Der Kontaktmodus kann wiederum in zwei Varianten unterteilt werden.

Wird die Oberfläche abgerastert, ohne die Höhe der Cantilever nachzuregeln ist dies der sogenannte „constant height mode“: Liegt ein Objekt auf der Oberfläche und die Spitze fährt darüber, wird die Cantilever nach oben gebogen. Aus dem Winkel dieser Biegung kann die Höhe des Objektes ermittelt werden. Ein Nachteil des „constant height mode“ ist eine mögliche Beschädigung der Probe durch die ständige Änderung der Auflagekraft.

Alternativ dazu existiert als zweite Variante der „constant deflection mode“. Hierbei wird die z-Höhe der Cantilever entsprechend der Höhe des Objektes nachgeregelt, wobei die Biegung der Cantilever konstant bleibt. Die Höheninformation wird aus der Kraft, mit der die neue Höhe adjustiert wurde, gewonnen. Nachteilig beim „constant deflection mode“ sind schnelle Änderungen der Höhe. Es kann zu Phasenverschiebungen zwischen Input und Response kommen, die es nötig machen für jede Probe den Stellfaktor (engl. gain) einzustellen. Je nach Höhe des Stellfaktors folgt die Spitze den Höhenänderungen schneller oder langsamer. Das kann dazu führen, dass kleine Strukturen neben größeren nicht mehr abgebildet werden.

Der Kontaktmodus eignet sich besonders für harte, gut fixierte Proben. Er erlaubt eine sehr gute Auflösung und liefert weitere Informationen über die Oberfläche, wie Reibungswiderstand, Adhäsion und Elastizität.

Der Kontaktmodus ist für weiche Proben, wie organische Moleküle oder Polymerstrukturen, ungeeignet, da die Probe dadurch zerstört werden kann. Sollen weiche Proben untersucht werden, wird der „**Tapping mode**“ (Abbildung 12 b) genutzt. Beim „tapping modus“ wird die Cantilever nahe der Eigenfrequenz (typischerweise 100-350 kHz) über der Oberfläche zum oszillieren angeregt. Nähert sich die schwingende Spitze der Oberfläche, wirken Van-der-Waals-Kräfte auf die Probe. Diese anziehenden Kräfte bewirken die Verringerung der ursprünglichen Amplitude.

Der Vorteil des „tapping mode“ besteht darin, dass die lateralen Kräfte minimiert werden. Zudem werden mehr Bildsignale erhalten: die Höhe, die Amplitude und die Phasenverschiebung. Aus der Phasenverschiebung können z. B. Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften der Probe gewonnen werden.

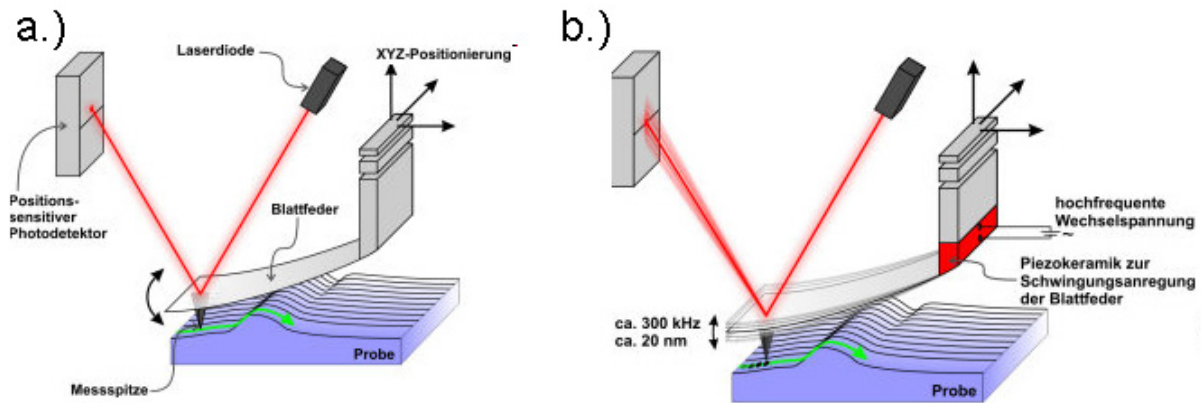


Abbildung 12. a.) Kontakt und b.) Tapping mode beim AFM, abgebildet sind Probe, Cantilever, Optik und Piezo – Steuerelemente.

4. Diazotransfer zur Erzeugung biologischer Klick

Substrate

Das Ziel der Arbeit ist es den Diazotransfer an Polymer-Peptid-Aggregaten durchzuführen. An diesen azidfunktionalisierten Aggregaten können dann über Klick-Chemie verschiedene Funktionalitäten angebracht werden. Die Polymer-Peptid-Aggregate sind, wie in Kapitel 2.2 erläutert in Wasser stabil. Methanol führt zum Zerfall der Aggregate. Um den Diazotransfer an Polymer-Peptid-Aggregaten durchführen zu können, müssen daher die Reaktionsbedingungen optimiert werden.

Der Diazotransfer mit Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid wurde von *Goddard-Borger* und *Stick* an niedermolekularen Molekülen, wie Glukosamin, Lysin oder Valin in Methanol demonstriert.^[65] Bei dem zweifachen Diazotransfer an Lysin (α - und ϵ - Amin) wurde ein Methanol/ Wasser Gemisch genutzt.

Um die Anwendungsmöglichkeiten des neuartigen Diazotransferreagenz zu untersuchen, wurde der Diazotransfer unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die Diazotierung primärer Amine wurde an einem kleinen, vollgeschützten Modellpeptid durchgeführt. Die Reaktion konnte danach an größere, multifunktionale Peptide angepasst werden, wobei gleichzeitig das Konzept der N-ständigen Aminfunktionalität auf die Seitenkettenfunktionalität des Lysins (ϵ -Amin) übertragen wurde. Dabei wurde der Diazotransfer vom Methanol/ Wasser Gemisch auf Wasser übertragen. Die Ergebnisse werden nachfolgend näher dargestellt.

4.1. Diazotransfer an einem vollgeschützten Peptid der Sequenz GRGDS

4.1.1. Herstellung der vollgeschützten GRGDS Sequenz:

Die Peptidtriade RGD ist eine wichtige Sequenz, die in der Natur oft vorkommt. Sie dient unter anderem als Adhäsionssequenz im Fibronectin. Zellen können mit Hilfe der Zelloberflächen-Rezeptoren den Transmembranproteinen (Integrin) an diese Erkennungssequenz binden. Die RGD Sequenz spielt zum Beispiel in der Befruchtung von Eizellen eine wichtige Rolle.^[137] Das gut untersuchte Peptid (GRGDS) sollte als Modellpeptid für den Diazotransfer dienen.

Bei der Herstellung des vollgeschützten Peptids GRGDS wurde ein 2-Chlortritylharz als Trägermaterial verwendet. Das 2-Chlortritylharz besteht aus Polystyrol, welches mit 1 % 1,4-Divinylbenzol vernetzt ist. Tritylharze bieten in der Peptidchemie den Vorteil, dass angebundene Peptide unter schwach sauren Bedingungen abgespalten werden können.^[138] Besonders säureempfindlich sind 2-Chlortritylharze, durch den Chlorsubstituenten in 2-Position an einem der Phenylringe. Sie ermöglichen eine Abspaltung mit 30 % TFE. Dadurch bleiben die Schutzgruppen ^tBu und Boc in der Seitenkette erhalten.^[139]

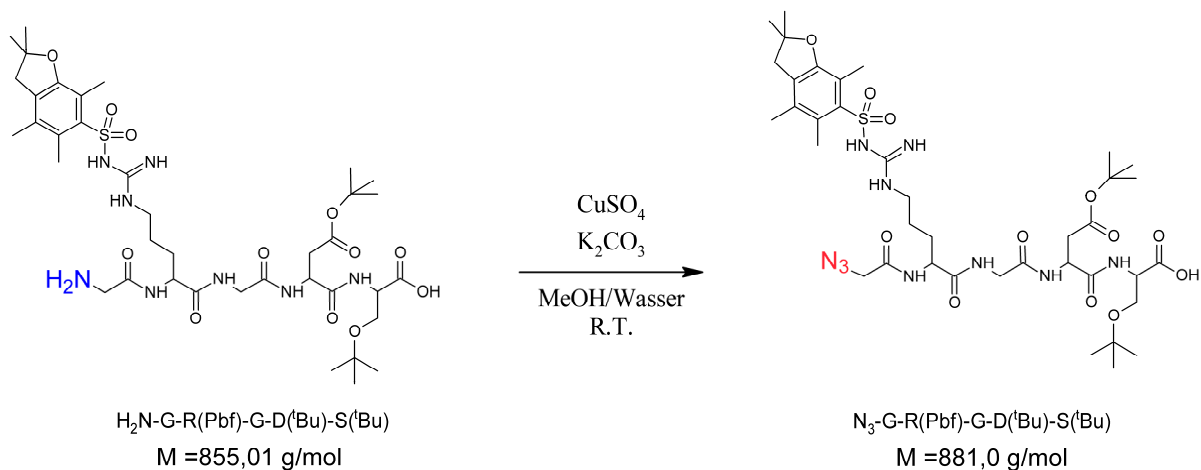
Mittels festphasengebundener Synthese wurde ein Peptid der Sequenz GRGDS an einem 2-Chlortritylharz aufgebaut. Nach Vollendung der Synthese konnte das Peptid mit TFE in Dichlormethan unter Erhaltung aller Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten werden.

Auf diese Art wurde das Produkt (G-R(Pbf)-G-D(^tBu)-S(^tBu)) analysenrein isoliert was durch IR, NMR und ESI-MS nachgewiesen werden konnte. Das vollgeschützte GRGDS besitzt eine freie Aminogruppe. Um den Diazotransfer zu untersuchen, wurde wie nachfolgend beschrieben, die N-terminale Aminogruppe des GRGDS in ein Azid überführt.

4.1.2. Diazotransfer am vollgeschützten GRGDS

Das GRGDS wurde in einem Methanol/ Wasser Gemisch (50 % (v/v)) gelöst und mit Kaliumcarbonat, sowie Kupfer(II)sulfat versetzt. Dann wurde das Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid dazugegeben (Schema 10). Der Azidtransfer ist relativ einfach durch die Abwesenheit freier Aminogruppen nachzuweisen. Dazu wird eine kleine Probe während der Reaktion entnommen. An dieser Probe kann ein Kaisertest durchgeführt werden, der durch Blaufärbung noch freie Amine anzeigt. Nach 18 Stunden zeigte der durchgeführte Kaisertest keine Farbreaktion an. Das so gewonnene Azid wurde mit Chloroform extrahiert, das Lösungsmittel eingengt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde über DOWEX™ geschüttelt, um das Kupfer zu entfernen. Nach der Lyophilisierung lag das vollgeschützte, azidierte Peptid als farbloser Feststoff vor.

Das azidierte Peptid wurde mit ESI-MS und IR Spektroskopie untersucht. Das Massenspektrum zeigt Signale mit m/z 882, 904 und 919. Diese Signale entsprechen den Protonen-, Natrium- und Kaliumaddukten des azidierten Peptides. Es wurden keine Signale des Eduktes detektiert. Dies deutete auf den vollständigen Umsatz der Aminogruppe hin.



Schema 10. Azidtransfer an vollgeschütztem GRGDS, in Methanol/ Wasser (50 % v/v) Mischung

Das IR-Spektrum zeigt bei $\nu = 2108 \text{ cm}^{-1}$ die charakteristische Schwingungsbande für Azide, die durch die antisymmetrische Valenzschwingung des Azides entsteht.

Um die Kinetik des Diazotransfers abzuschätzen, wurde die Reaktion wiederholt. Dabei wurden insgesamt vier Proben nach verschiedenen Reaktionszeiten entnommen. Die Probe wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroformphase am Rotationsverdampfer eingengt. Nach Gefriertrocknung aus Wasser/ Acetonitril 50 % (v/v) wurde der farblose Feststoff mittels HPLC-ESI-MS auf seine Zusammensetzung untersucht.

Schon nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden waren mehr als 80 % Produkt zum Azid umgesetzt. Nach fünf Stunden waren immerhin 97 % umgesetzt. Der nahezu quantitative Umsatz von 99,7 % konnten nach 25 Stunden nachgewiesen werden (Abbildung 13).

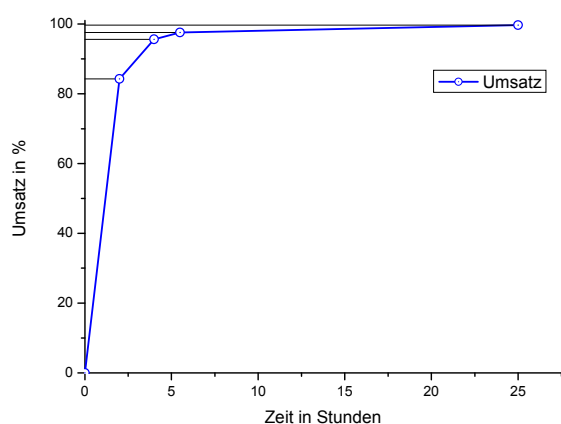


Abbildung 13. Mittels RP-HPLC ermittelter Umsatz des Diazotransfers an vollgeschütztem GRGDS in Methanol/ Wasser 50 % (v/v).

Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass der Diazotransfer mit hohen Ausbeuten verläuft. Weiterhin legen die Daten nahe, dass Reaktionszeiten von über 10 Stunden bei Raumtemperatur sinnvoll sind. Letztendlich konnte der Diazotransfer an der α -Amingruppe der ersten Aminosäure des vollgeschützten Modellpeptids quantifiziert werden. Um diese Erkenntnisse auf ungeschützte Peptide in Wasser zu übertragen, wurde wie im Nachfolgenden gezeigt der Diazotransfer an Triterpticin durchgeführt.

4.2. Diazotransfer an Triterpticin

4.2.1. Herstellung von Triterpticin

Der Diazotransfer wurde an kleinen, vollgeschützten Modellpeptiden in Methanol/ Wasser Gemisch 50 % (v/v) demonstriert. Aus diesen Vorversuchen war bekannt, dass eine Reaktionszeit von 16-24 Stunden für die Diazotierung optimal ist. Ebenso konnte an der Festphase ein Diazotransfer durchgeführt werden (Kapitel 4.3). Sowohl bei dem Modellpeptid (GRGDS) als auch bei der Peptidsequenz am Harz waren die anderen funktionellen Gruppen geschützt. In Hinblick auf den Diazotransfer an Polymer-Peptid-Aggregaten ist es interessant an größeren, ungeschützten Peptiden eine Diazotierung durchzuführen. Die Polymer-Peptid-Aggregate sind in Wasser stabil sind, deaggregieren jedoch in Wasser Methanol Gemischen. Daher wurde der Diazotransfer in Wasser und unter Anwesenheit diverser funktioneller Gruppen durchgeführt.

Dazu wurde ein literaturbekanntes, antibakterielles Peptid, das Triterpticin gewählt. Triterpticin ist ein aus 13 Aminosäuren bestehendes Peptid aus der Familie der Cathecilidine. Die Sequenz von Triterpticin lautet: VRRFPWWPFLRR, die Struktur ist in Abbildung 14 gezeigt. Es wurde 1996 von *Watabe* beschrieben und weist antimikrobielle Eigenschaften auf.^[140] Im Jahre 1999 wurde dessen Struktur von *Schibil* in SDS-Mizellen untersucht.^[141] Die antimikrobielle Eigenschaft macht das Triterpticin für Anwendungen in der Polymerchemie interessant. Das Triterpticin könnte durch Anbringen an Polymer Systemen immobilisiert werden und so zum Beispiel in antibakteriellen Beschichtungen Anwendung finden.

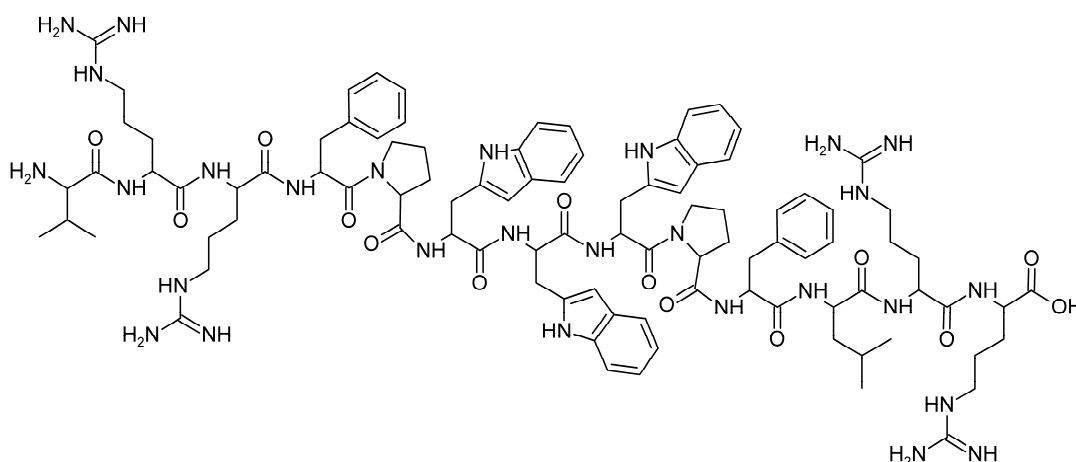


Abbildung 14. Strukturformel von nativem Trypticin.

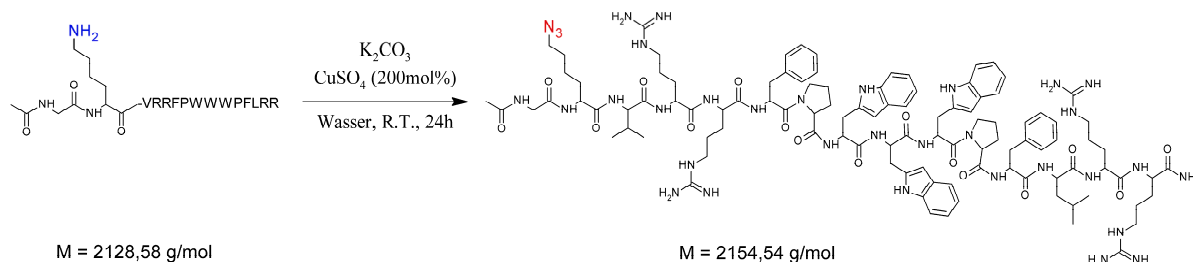
Sowohl bei dem Diazotransfer an GRGDS in Lösung, als auch bei dem Diazotransfer am Harz wurde die N-terminale Aminogruppe der Peptidsequenz in ein Azid umgewandelt. Um die Möglichkeiten des Diazotransfers an der Seitenkette zu überprüfen, wurden dem Trypticin zwei weitere Aminosäuren hinzugefügt, Lysin (K) und Glycin (G). Um einen zweiten Diazotransfer zu verhindern, wurde der N-Terminus der Sequenz vor der Abspaltung vom Harz acetyliert. Als finale zu synthetisierende Sequenz ergibt sich: Ac-GK(ϵ -NH₂)VRRFPWWPFLRR-NH₂ (dabei ist das Aminende (links) acetyliert und das Säureende (rechts) ein Amid).

Aus Vorversuchen war bekannt, dass die Synthese dieses aus 15 Aminosäuren bestehenden Peptids schwierig verläuft. Daher wurde ab der achten zu kuppelnden Aminosäure (W3) durch Dreifachkupplung der Umsatz verbessert. Nach Abschluß der Sequenz und dem Acetylieren des Aminendes wurde das Peptid vom Harz abgespalten und isoliert. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet und gegen Wasser dialysiert (MWCO 500 Da) und lyophilisiert. Das so erhaltene Produkt wurde analysenrein gewonnen, was durch NMR, IR und ESI-MS nachgewiesen wurde.

4.2.2. Diazotransfer an Trypticin

Der Azidtransfer wurde mit Wasser als Lösungsmittel durchgeführt, die Reaktionsgleichung ist in Schema 11 dargestellt. Dazu wurde das Peptid gelöst und Kaliumcarbonat sowie Kupfersulfat dazugegeben. Unter Rühren wurden Imidazol-1-Sulfonylazid Hydrochlorid dazugegeben. Nach 18 Stunden wurde die Lösung über DOWEX Ionenaustauscher HarzTM gegeben, um die Kupferionen zu entfernen, im Anschluss wurde dialysiert (MWCO 500 Da). Das lyophilisierte, farblose Pulver wurde mittels HPLC-MS, IR und NMR charakterisiert.

Bei der ersten Versuchsdurchführung fand keine Diazotierung statt. NMR, IR und HPLC-MS entsprachen den Werten des Eduktes. Die katalytische Menge an zugegebenem Kupfer(II) (10mol %) wurde vermutlich durch das Peptid gebunden und stand nicht mehr für die Reaktion zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde der Diazotransfer mit 2 Äquivalenten Kupfer(II) wiederholt. Die Erhöhung der Kupfer Konzentration ermöglichte den Diazotransfer zu Ac-GK(ϵ -N₃) VRRFPWWPFLRR-NH₂.



Schema 11. Diazotransfer an der Seitenkette (Lysin) von Tryptitricin. Das um die Aminosäuren Glycin und Lysin erweiterte Tryptitricin wurde am N-Terminus acetyliert. Die Diazotierung wurde in Wasser durchgeführt.

Die HPLC Ergebnisse zeigen den vollständigen Diazotransfer an. Das dazugehörige ESI-Massenspektrum zeigt die zwei, drei und vierfachen Protonenaddukte des ϵ -acidierten Tryptitricins bei $m/z = 1078$, 719 und 540 an.

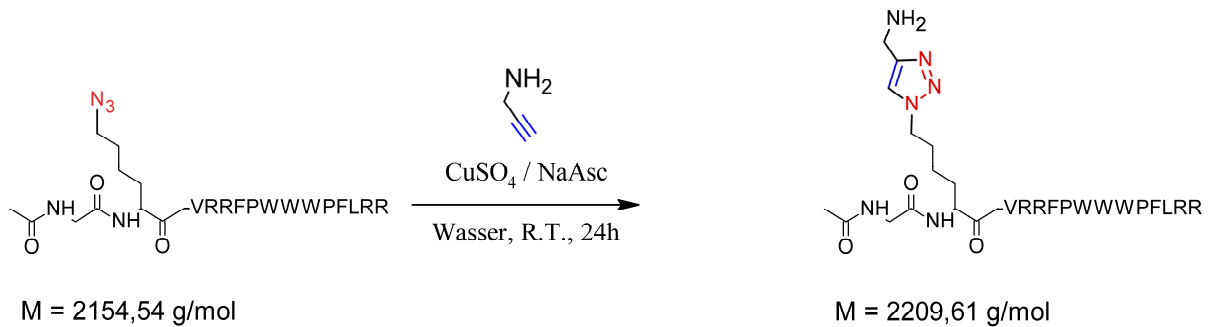
Das IR-Spektrum des azidierten Tryptitricin zeigte antisymmetrische Valenzschwingung des Azides bei $\nu = 2100,5 \text{ cm}^{-1}$. Es gleicht, mit Ausnahme der Azidbande, dem des Eduktes. Sowohl der negative Kaisertest als auch die HPLC-MS zeigte den vollständigen Diazotransfer an. Das so modifizierte Tryptitricinazid ist für die „Klick Chemie“ zugänglich. Beispielhaft für verschiedene Modifikationen wurde wie nachfolgend gezeigt Propargylamin mit dem Tryptitricinazid umgesetzt.

4.2.3. 1,3 Cycloaddition an Tryptitricin

Um die Zugänglichkeit für weiterführende 1,3-dipolare Cycloadditionen zu demonstrieren, wurde das Tryptitricinazid mit Propargylamin umgesetzt (Schema 12). Nach 18 Stunden Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung durch Zugabe von TREN und Dialyse (500 MWCO) gegen Wasser aufgereinigt. Der gefriergetrocknete Feststoff wurde mit IR, ESI-MS und NMR untersucht.

Das IR Spektrum vom modifizierten Tritrpticin Das Fehlen der Azidbande bei $\nu = 2100,5 \text{ cm}^{-1}$ ist ein Hinweis auf die Vollständigkeit der Cycloaddition.

Die ESI-MS zeigte die die drei und vierfach geladenen Natriumaddukte bei $m/z = 737$ und 553 an.



Schema 12. Dargestellt ist die Huisgen Cycloaddition von Propargylamin an der ϵ -Azid Funktion des Tritrpticins.

Der einfache und vollständige Umsatz zum Triazol zeigt, daß es möglich ist das Tritrpticin kovalent an Alkine zu binden Es sollte weiterhin möglich sein das Tritrpticinazid mit alkinmodifizierten Polymere (Polymeroberflächen) umzusetzen, um so antibakterielle Polymere und Oberflächen zu erzeugen.

4.3. Diazotransfer am Harz

4.3.1. Herstellung der GRGDS-Peptidsequenz am Harz

Der Diazotransfer am vollgeschützten Peptid warf die Fragestellung auf, ob es möglich sei, die N-ständige Aminogruppe einer Peptidsequenz an der Festphase in ein Azid zu überführen. Die Verwendung einer Festenphase als Trägermaterial für den Diazotransfer ermöglicht es eines Überschusses an Reagenzien einzusetzen. Nach dem Ende der Reaktion können die überschüssigen Reagenzien durch waschen entfernt werden. Weiterhin vorteilhaft ist der mehrfache Diazotransfer, dadurch kann eine quantitative Umsetzung der Aminogruppe erreicht werden.

Es wurden drei verschiedene Harze verwendet. Ein 2-Chlortritylharz, ein HMPA-PEGA Harz sowie ein TentaGel MB $-\text{NH}_2$ Harz (Rapp). Diese besitzen ein unterschiedliches Quellverhalten in den verschiedenen Lösungsmitteln.

Das 2-Chlortritylharz ist ein mit 1,4-Divinylbenzol vernetztes Polystyrolharz. Es quillt in DMF und DCM gut, aber in Wasser nicht. DMF ist ein gängiges Lösungsmittel für den Diazotransfer mit Triflatazid, daher wurde der Diazotransfer am 2-Chlortritylchlorid Harz in DMF durchgeführt.

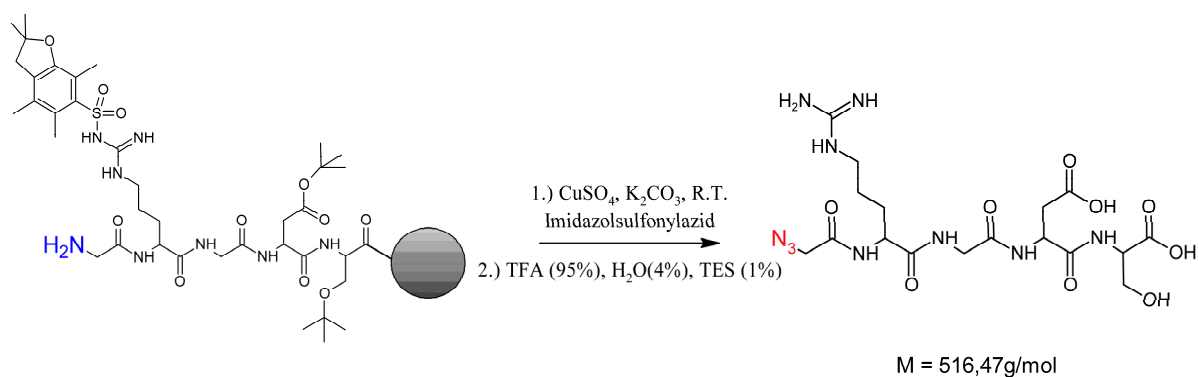
Das TentaGel MB-NH₂ Harz besteht aus einem amin-terminalen Polyethylenglycol-Polystyrol-Harz. Die Polystyrolkugeln sind mit 230-300 µm größer als herkömmliche Harze (90 µm).^[142] Bei der Abspaltung der Peptide verbleibt die PEG-Kette an dem Harz. Sie dient als „spacer“ und verbessert das Quellvermögen in Wasser. Dies erleichtert die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen und verbessert die Reaktionsgeschwindigkeit sowie Ausbeute.

Das HMPA-PEGA Harz besteht aus Dimethylacrylamid und Mono-2-acrylamidopropyl(2-aminopropyl)polyethylenglycol, welches mit Bis-2-acrylamidopropyl(2-aminopropyl)polyethylenglycol vernetzt ist.^[143, 144] Die Größe des Harzes ist mit 150-300 µm (ungequollen) angegeben. Damit sind die Harzkugeln etwas größer, als die bei Standardharzen für die Peptidsynthese verwendeten Harze. PEGA Harze quellen hervorragend in den meisten Lösungsmitteln. Der hohe PEG Anteil ermöglicht ein sehr gutes Quellverhalten in Wasser. PEGA Harze können je nach PEG-Kettenlänge von Molekülen mit einem Gewicht von 35-50 kDa durchdrungen werden.^[145] Sowohl das HMPA-PEGA, als auch das TentaGel MB Harz sollten sich hervorragend für einen Diazotransfer in Wasser eignen.

An jedem der drei Harze wurde mittels SPPS die Aminosäuresequenz GRGDS (H₂N-G-R(Pbf)-G-D(^tBu)-S(^tBu)-CO-Harz) aufgebaut. Die verschiedenen Eigenschaften der Harze und das damit einhergehende unterschiedliche Quellvermögen, ermöglichte die Durchführung des Diazotransfers in verschiedenen Lösungsmitteln.

4.3.2. Diazotransfer an den harzgebundenen GRGDS-Harz Sequenzen

Der Diazotransfer an den Sequenzen der drei Harze wurde, wie in der Festphasengebundenen Peptidsynthese üblich, mit einem 10fachen Überschuss an Reagenzien durchgeführt (Schema 13). Nach 16 Stunden Reaktionszeit wurden die Harze gründlich gewaschen. Jeweils nach zweifachem Diazotransfer wurde das Peptid vom Harz abgespalten, aufgereinigt und nach der Gefriertrocknung analysiert. Auf diese Art wurde das vollgeschützte GRGDS gewonnen.



Schema 13. Abgebildet ist der Diazotransfer an der ungeschützten Sequenz GRGDS. Der Diazotransfer fand vor der Abspaltung am Harz statt.

Der Diazotransfer am 2-Chlortrityl Harz wurde in DMF durchgeführt. Der Kaisertest war nach zweifacher Reaktion immer noch positiv. Das ESI-MS zeigte nur die Masse des nicht umgesetzten $\text{H}_2\text{N-GRGDS}$: $[\text{M}_{(\text{amin})}]^+ = 491$ (100 %, theor. = 490,5 Da). Daraus folgt, dass der Diazotransfer am 2-Chlortritylharz nicht stattgefunden hat.

Der Diazotransfer am TentaGel MB Harz wurde in Wasser durchgeführt. Der Kaiser Test war nach doppeltem Diazotransfer nur schwach positiv. dies deutet darauf hin, daß noch einige freie Amingruppen vorhanden sind. Das ESI-MS zeigte das Edukt-Produktgemisch von aminfunktionalisiertem $\text{H}_2\text{N-GRGDS}$ ($m/z = 491$) und azidfunktionalisiertem $\text{N}_3\text{-GRGDS}$ ($m/z = 517$). Damit stimmen die Ergebnisse des ESI-MS gut mit dem Kaisertest überein. Die Diazotierung verlief nicht vollständig.

Die Reaktion am HMPA-PEGA-Harz wurde in Wasser/ Methanol 50 % (v/v) durchgeführt. Schon nach dem ersten Diazotransfer zeigte der Kaisertest keine Blaufärbung mehr an. Nach dem Abspalten wurde das Peptid analysiert. Das ESI-MS zeigte nur einen Massenpeak bei $m/z = 517$ an. Der Massenpeak entspricht dabei dem Protonenaddukt des azidfunktionalisiertem GRGDS. Sowohl der Kaisertest, als auch die ESI-MS konnten die vollständige Umsetzung zum Azid nachweisen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es möglich ist den Diazotransfer am Harz durchzuführen. Dabei muss auf die richtige Wahl des Harzes geachtet werden. Es ist wichtig, dass das Harz gut quillt, um eine ausreichende Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen zu gewährleisten. Ein Diazotransfer an einem 2-Chlortritylharz in DMF war nicht erfolgreich. Dabei konnte nicht verifiziert werden was die Ursache dafür war. Mögliche Ursachen könnte die unzureichende Löslichkeit der Reagenzien Kupfersulfat und Kaliumcarbonat sein. Ein Diazotransfer mit DIPEA statt Kaliumcarbonat führte ebenfalls nicht zur Diazotierung.

Die Ergebnisse der Diazotierung an den drei Harzen sind in Tabelle 1 dargestellt. Der Kaiser Test dient dabei als erste Orientierung für den Umsatz der Amingruppen zu Aziden. An dem 2-Chlortritylharz konnte keine Diazotierung durchgeführt werden, obwohl das Harz in DMF gut quillt und DMF für Diazotierungs Reaktionen ein gängiges Lösungsmittel darstellt.

Mit mehr als zwei Wiederholungen des Diazotransfers könnte auch in Wasser, am TentaGel MB Harz eine quantitative Umsetzung erreicht werden. Die Diazotierung ist am HMPA-PEGA Harz vollständig verlaufen. Von den beiden wasserquellbaren Harzen scheint das HMPA-PEGA Harz die beste Zugänglichkeit zu haben.

Tabelle 1. Tabellarische Darstellung der Untersuchungsergebnisse des Diazotransfers an den Harzen.

| | 2-Chlortritylharz | TentaGel MB Harz | HMPA-PEGA Harz |
|--------------|-------------------|---------------------------------|----------------|
| ESI-MS (m/z) | nur Amin (491 Da) | Amin (491 Da) und Azid (517) | nur Azid (517) |
| Kaiser Test | positiv | schwach positiv | negativ |

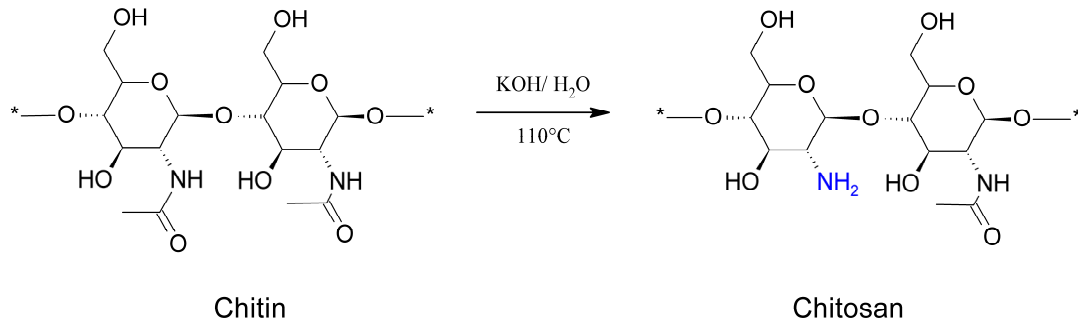
Die Wahl des Lösungsmittels hat ebenfalls Einfluss auf die Diazotierung. Der Diazotransfer in Methanol/ Wasser 50 % (v/v) ist scheinbar effektiver, als in reinem Wasser. Letztendlich konnte nicht festgestellt werden ob der größere Einfluss durch das Lösungsmittel oder die Wahl des Harzes stattfindet. Als Fazit kann festgehalten werden, daß der N-terminale Diazotransfer unter den richtigen Bedingungen an der Festphase mit quantitativen Ausbeuten durchführbar ist. Dies ermöglicht ein Arbeiten mit Überschüssen an Imidazolsulfonylazid Hydrochlorid und ein einfaches Entfernen der unverbrauchten Reagenzien durch Waschen.

4.4. Diazotransfer an Chitosan

Chitosan ist ein natürlich vorkommendes Polyaminosaccharid, das aus Chitin gewonnen wird. Es wurde 1859 von C. Rouget durch Kochen von Chitin in Kalilauge entdeckt. Chitin ist ein Polysaccharid aus 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose-Einheiten. Durch die Behandlung mit Kalilauge wird die Acetylschutzgruppe des Amins teilweise entfernt. Werden mehr als 50 % der Amingruppen des Chitins deacetyliert wird im Allgemeinen von Chitosan gesprochen (Schema 14).

Der Grad der Deacetylierung kann erheblich variieren, eine vollständige Entschützung aller Acetylgruppen ist schwierig. Kochen in 120 °C heißer Natronlauge z. B. erzeugt innerhalb von 1-3 Stunden einen Deacetylierungsgrad von 70 % (Schema 14).^[146] Ebenso wie der

Deacetylierungsgrad variiert die Verteilung der Acetylgruppen. So gibt es je nach Herstellung Chitosan mit stark deacetylierten Bereichen und weniger stark deacetylierten Bereichen, ebenso gibt es Chitosan mit einer homogenen Verteilung der Acetylgruppen.



Schema 14. Gezeigt ist die partielle Deacetylierung von Chitin zu Chitosan.

Die meisten Polysaccharide (Zellulose, Dextran, Pektin) sind neutral oder anionisch geladen. Chitosan hingegen weist durch die Amingruppen kationische Gruppen auf und zeichnet sich durch interessante Eigenschaften aus. Diese beinhalten die Fähigkeit Filme zu bilden, sowie Metalle als Chelatligand zu komplexieren. Die metallbindenden Eigenschaften können z. B. genutzt werden, um $\text{Cd}^{[147, 148]}$ und $\text{Hg}^{[149]}$ zu komplexieren.

Vasella und *Zhang* ist es in einer fünfstufigen Synthese in organischen Lösungsmitteln gelungen, alle freien Aminfunktionen des Chitosans in ein Azid umzuwandeln.^[150] Wie im Folgenden näher erläutert konnte in einer Einstufenreaktion der Diazotransfer an Chitosan durchgeführt werden. Als Ausgangstufe für die Diazotierung dient das gut wasserlösliche Chitosan Hydrochlorid. Die Herstellung von Chitosan Hydrochlorid, sowie der daran durchgeführte Diazotransfer werden nachfolgend beschrieben.

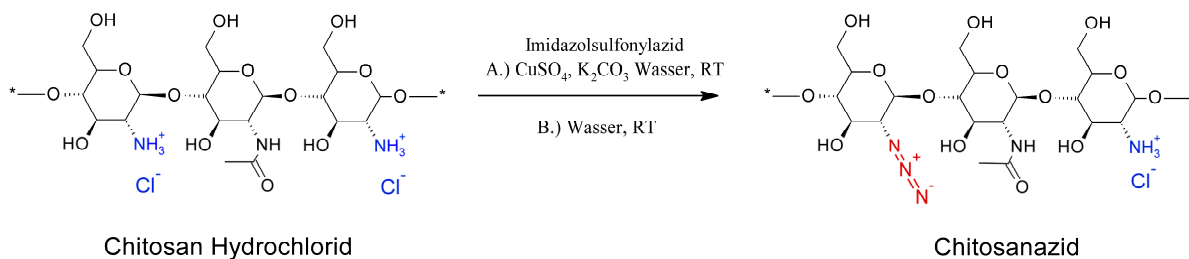
4.1.1. Herstellung von Chitosan Hydrochlorid

Da Chitosan schlecht in Wasser löslich ist, wurde zu der Suspension in Wasser soviel HCl gegeben, bis das Chitosan gelöst war. Anschließend wurde in THF ausgefällt und das Chitosan Hydrochlorid gefriergetrocknet. Mittels NMR wurde ein Acetylierungsgrad von 15 % ermittelt.

4.1.2. Diazotransfer an Chitosan Hydrochlorid

Um die Wasserlöslichkeit des Chitosans zu gewährleisten, sollten nicht alle Amingruppen umgesetzt werden. Daher wurde das Diazotransferreagenz unterstöchiometrisch eingesetzt.

Die Einführung der Azidgruppen im Chitosan wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Der erste Ansatz wurde mit Kupfersulfat und Kaliumcarbonat, sowie Imidazolsulfonylazid durchgeführt (Schema 15A). Das derart gewonnene Chitosanazid (A1) wurde mit NMR, sowie IR, GPC und AUZ charakterisiert.



Schema 15. Der Diazotransfer von Chitosan Hydrochlorid zu Chitosanazid in Wasser. Der partielle Umsatz der Amingruppen ermöglicht die Wasserlöslichkeit.

Die im IR detektierte antisymmetrische Valenzschwingung des Azides bei $\nu = 2115 \text{ cm}^{-1}$ zeigte die qualitative Einführung der Azidgruppe an.

Werden die Ergebnisse aus der GPC betrachtet, zeigt sich jedoch ein sehr viel niedrigeres Molekulargewicht (in Tabelle 2 dargestellt). Dies kann zwei Ursachen haben: zum einen die Abnahme des Polymerisierungsgrades und damit verbunden des Molekulargewichtes, zum anderen die Abnahme der Molekülgröße. Beide Fälle führen in der GPC dazu, dass der Analyt schneller eluiert und so ein niedrigeres Molekulargewicht bestimmt wird.

Um diese GPC-Ergebnisse weiter zu verifizieren wurde eine Sedimentations-Geschwindigkeits-Messung mit der Analytischen Ultrazentrifuge (AUZ) durchgeführt. Die Messung wurde in 0,1 mM Essigsäure/Acetat Puffer (pH = 4,5) bei einer Gesamtionenstärke von 154 mM (NaCl) durchgeführt.

Die Sedimentations-Geschwindigkeitsmessung (Tabelle 2) zeigt deutlich, dass das Chitosanazid (A1) mit 0,9 Svedberg langsamer sedimentiert, als das Chitosan Hydrochlorid mit 1,5 Svedberg. Die Geschwindigkeit, mit der die Teilchen in Richtung Boden der Messzelle sedimentieren, hängt von der Molekülmasse, der Dichte und der Form der Teilchen ab. Der Sedimentationskoeffizient sagt aus, wie schnell ein Teilchen sedimentiert, jedoch nicht, auf Grund welcher Eigenschaft. Beim Chitosanazid (A1) resultiert die geringere Sedimentationsgeschwindigkeit aus dem reduzierten Polymerisationsgrad, was sich in der Abnahme der Molekülmasse niederschlägt.

Tabelle 2. Gewichtsmittel (GPC) der Chitosankomponenten und Sedimentationskoeffizient (AUZ).

| | Chitosan | Chitosan HCl | Chitosanazid (A1) |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Gewichtsmittel (M_w) [g/mol] | $2,57 \cdot 10^5$ | $1,47 \cdot 10^5$ | $8,5 \cdot 10^3$ |
| Sedimentationskoeffizient [S] | | 1,5 | 0,9 |

Ohne eine Änderung des Polymerisationsgrades könnte die verlangsamte Sedimentation auf eine Abnahme der Dichte zurückgeführt werden. Würde jedoch die Abnahme der Sedimentationsgeschwindigkeit aus der Reduzierung der Dichte resultieren, müsste die Größe (Form) der Moleküle zugenommen haben. Auf Grund der erhöhten Größe hätte in der GPC jedoch ein höheres Gewichtsmittel detektiert werden müssen. Da dies nicht der Fall war, kann die Abnahme der Dichte (mit gleichzeitiger Zunahme der Größe) ausgeschlossen werden.

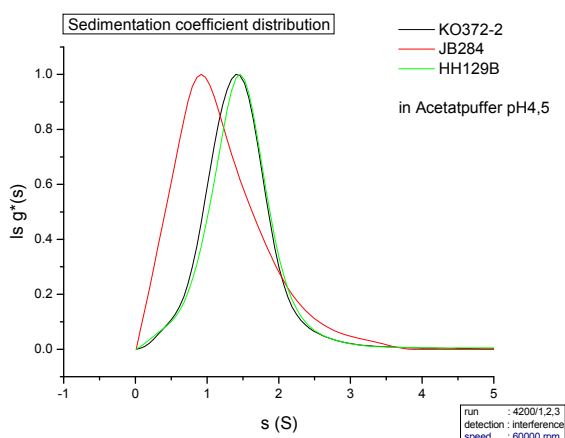


Abbildung 15. Gezeigt sind die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation von Chitosan Hydrochlorid (schwarz), Chitosanazid (A1 - rot) und Chitosanazid (A2 - grün).

Es ist in der Literatur bekannt, dass Metallionen wie Eisen und Kupfer zum Abbau von Zuckern führen können.^[151-153] Da der Cu(I) katalysierte Diazotransfer zu einer Reduzierung des Polymerisationsgrades des Chitosans führte, mussten die Reaktionsbedingungen angepasst werden.

Der verbesserte zweite Ansatz (Schema 15b) basierte auf mehreren Überlegungen. Der Diazotransfer sollte prinzipiell auch ohne Katalysator funktionieren. Jedoch verlaufen die unkatalysierten Reaktionen langsamer und mit schlechteren Umsätzen. Da vollständige Umsätze die Löslichkeit in Wasser drastisch erniedrigen, ist eine quantitative Umsetzung störend. Die Zugabe von Kaliumcarbonat führte zum teilweisen Ausfallen des Chitosans vor

dem Diazotransfer. Die Diazotierung ohne Kupfer am ausgefallenen Chitosan ist vermutlich zu stark verlangsamt. Daher wurde der Diazotransfer ohne Kupfersulfat und ohne Kaliumcarbonat durchgeführt. Da die Reaktion unkatalysiert sehr langsam und unvollständig abläuft wurden drei Äquivalente Diazotransferreagenz über einen Zeitraum von drei Tagen in mehreren kleinen Portionen dazugegeben (Schema 15B). Dann wurde das Chitosanazid (A2) durch Dialyse (MWCO 10.000) und Lyophilisation aufgereinigt.

Mittels IR-Spektroskopie wurde die Azidbande bei $\nu = 2125\text{cm}^{-1}$ gefunden. Die antisymmetrische Valenzschwingung zeigt den Azidtransfer an.

Das NMR-Spektrum zeigte, im Vergleich zu dem NMR-Spektrum des Chitosan Hydrochlorides, einen zusätzlichen Peak bei 3,68 ppm, welcher durch das azidnahe Proton hervorgerufen wird. Eine Bestimmung des Azidierungsgrades konnte mit Hilfe der Integrale erfolgen. Es ergab sich für das Chitosanazid (A2) einen Azidierungsgrad von $8 \pm 1 \%$.

In vorhergehenden Arbeiten, die Herstellung von Chitosanazid in organischen Lösungsmitteln betreffend, wurden Auswirkungen auf den Polymerisierungsgrades nicht untersucht.^[150] Es ist jedoch anzunehmen, dass dort ebenfalls ein Abbau des Polymerisationsgrades stattfindet. Die kupferfreie Diazotierung von Chitosan konnte mit Imidazolsulfonylazid Hydrochlorid durchgeführt werden. Die Sedimentationsgeschwindigkeit (AUZ) (Abbildung 15) des Chitosanazid (A2) weicht nicht signifikant von der des Chitosan Hydrochlorid ab. Daher kann geschlussfolgert werden, dass während des kupferfreien Diazotransfer kein Abbau der Polyaminosaccharid-Kette stattfand.

Das Chitosanazid soll in weiterführenden Arbeiten durch Elektrospinnen präpariert werden. Die Chitosan-Azide können nach der Verarbeitung durch Bestrahlung mit UV Licht vernetzt werden. Dabei werden aus den Aziden, Nitrenradikale erzeugt. Die Nitrene können miteinander vernetzen, das Chitosan kann so nach der Verspinnung modifiziert werden.

5. Diazotransfer gefolgt von gezielten Modifikationen an Polymer-Peptid-Fasern

Prinzipiell können funktionelle Polymersystemen in vielfältiger Weise durch Reaktionen an ihren funktionellen Gruppen modifiziert werden. Bei polyfunktionalen Makromolekülen ist der vollständige Umsatz aller funktionellen Gruppen schwierig zu erreichen. Limitierende Faktoren sind dabei meist die Beschränkung des Lösungsmittels und die reduzierte Zugänglichkeiten der funktionellen Gruppen (sterische Effekte).

Eine Umsetzung an den funktionellen Gruppen muss daher quantitativ sein und speziell an das jeweilige Polymersystem angepasst werden. Außerdem werden gut zugängliche funktionelle Gruppen benötigt, um das gewünschte Produkt zu erhalten.

Nachfolgend soll gezeigt werden, wie das literaturbekannte Polymer-Peptid-System **I** mit weiteren Funktionen an den Fasern versehen wird. Weiterhin werden verschiedene Funktionen an diese Fasern angebracht.

5.1. Design des Polymer-Peptid-Konjugates

Nachdem die Bedingungen des Diazotransfers untersucht wurden, sollten die Amingruppen von Polymer-Peptid-Nanofasern in ein Azid umgewandelt werden. Diese Polymer-Peptid-Fasern bieten viele Vorteile. Sie können vielfältige Strukturen wie Bänder, helikale gewundene Bänder und Röhren ausbilden, und besitzen dabei definierte, funktionale Flächen. Um die funktionalen Flächen der Polymer-Peptid-Fasern zu variieren muss jedoch der Peptidteil neu synthetisiert werden. Weiterhin ist es notwendig die Aggregation des neuen Peptides zu überprüfen. Schon kleine Änderungen im Peptidteil könnten die Strukturbildung unterbinden.

Der modulare Ansatz geht von einem Band aus, deren Oberfläche mit unterschiedlichen Funktionen bestückt werden kann, so können multifunktionelle Systeme und nicht natürliche Funktionen an der Oberfläche der Bänder angebracht werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Polymer-Peptid Nanofaser zu synthetisieren, welche einen Grundbaustein für möglichst breit gefächerte Modifikationen bildet. Das faserbildende Element in dieser Arbeit sollte auf dem Polymer-Peptid-Konjugat **I** basieren (Abbildung 16). Es sollten durch einfache Reaktionen weitere Funktionalitäten in das System eingebracht werden, die durch Modifikationen in Wasser zugänglich sind.

Wie in den Grundlagen beschrieben, eignet sich die „Klick Chemie“ hervorragend für die Verknüpfung von Molekülen und die Funktionalisierung von Polymeren. Um die 1,3-dipolare Addition nutzen zu können, werden alkin- oder azidfunktionalisierte Fasern benötigt. Azide können mittels des vorgestellten Diazotransferreagenzes leicht aus Amingruppen gewonnen werden. Die Herstellung der aminfunktionalisierten Fasern soll daher im nächsten Schritt näher beschrieben werden.

5.2. Entwicklung des Polymer-Peptid-Konjugates (II)

Das bereits beschriebene Strukturbildungselement der vororganisierten, β -faltblattbildenden Valin-Threonin Einheiten (Kapitel 2.2) in **I** sollte auch in dem neuen zu synthetisierenden Polymer-Peptid-Konjugat genutzt werden. Das Polymer-Peptid-Konjugat (**I**) besteht aus einer Polyethylenoxiddkette, die an ein Carbazolmolekül angebunden ist (Abbildung 16). An diesem Carbazolmolekül befinden sich zwei vorausgerichtete Peptidarme. Der Peptidteil von **I** wurde für die neue Aufgabe weiterentwickelt.

Zu **I** wurden zugängliche Funktionalitäten hinzugefügt, diese sollten später weiter modifiziert werden. Weiterhin sollten die Funktionalitäten auf der dem Lösungsmittel zugewandten Seite des Doppelbandes liegen. Das bekannte Polymer-Peptid-Konjugat **I** wurde daher pro Peptidarm um zwei zusätzliche Aminosäuren erweitert.

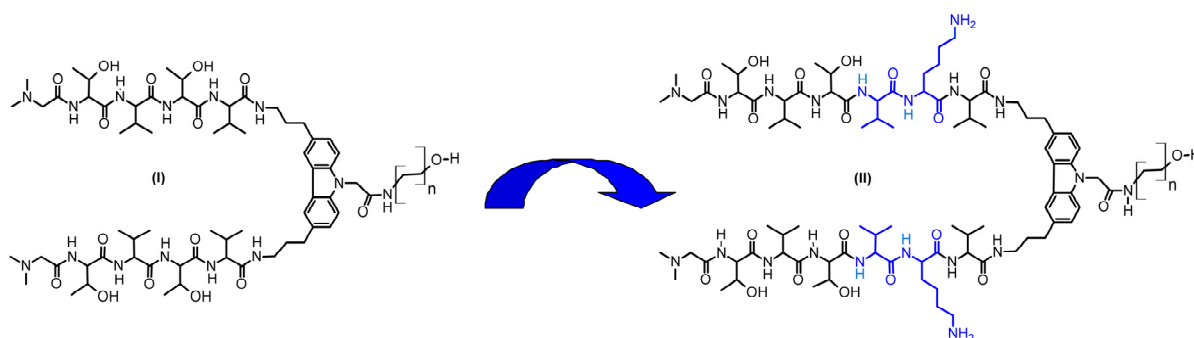


Abbildung 16. Vorüberlegung zur Veränderung des literaturbekannten Peptid-Polymer Systems (**I**). Die Einführung von Lysin und Valin (hier blau dargestellt) ergeben die aminfunktionalisierte Peptid-Polymer-Verbindung (**II**).

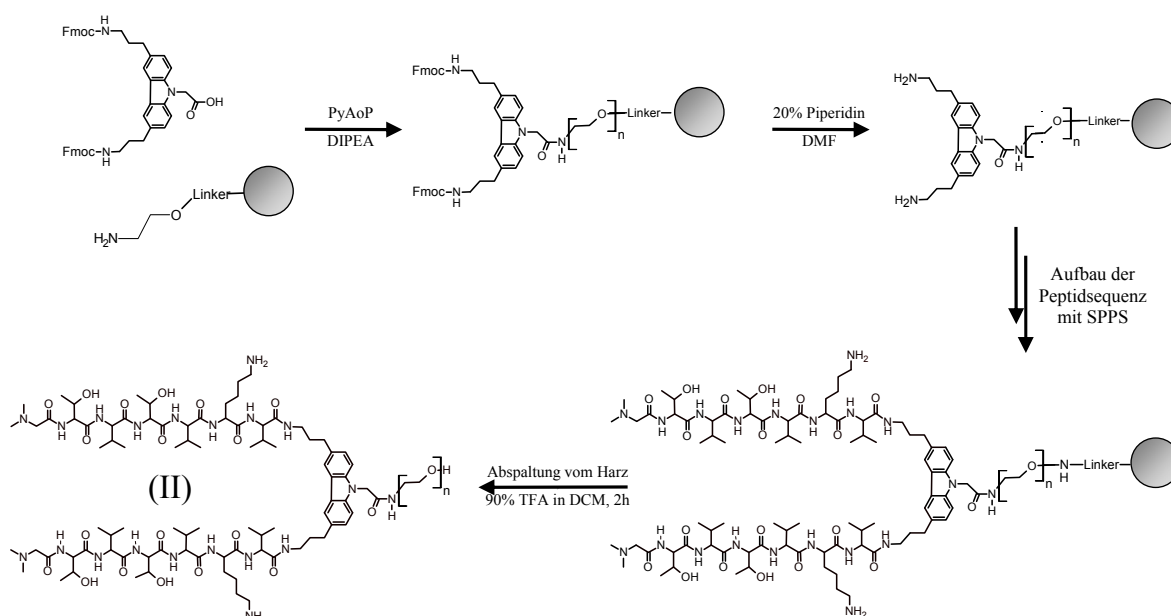
Die Aminosäure Lysin wurde eingefügt, um in der Seitenkette des Peptidrückgrades eine Aminogruppe zu erzeugen. Diese Aminogruppe kann später in ein Azid überführt werden. An das Azid kann durch die 1,3-dipolare Addition eine große Anzahl an Funktionalitäten geklickt werden. Um die alternierenden Eigenschaften der Seitenkette

(hydrophob-hydrophil) beizubehalten, wurde ein weiteres Valin pro Peptidarm zu kuppeln. Die Veränderungen des Templates **I** sind in Abbildung 16 dargestellt.

Das theoretisch entwickelte Polymer-Peptid-Konjugat **II** wurde, wie im folgenden beschrieben hergestellt.

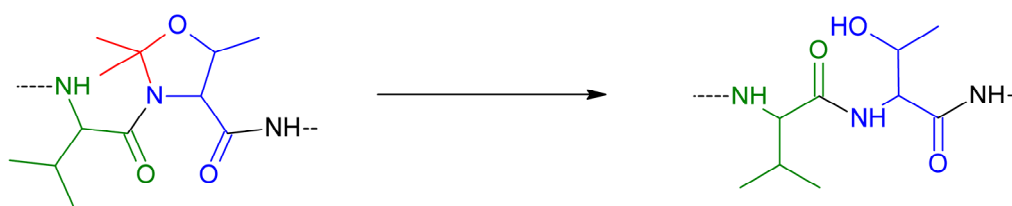
5.3. Herstellung des aminfunktionalisierten Polymer-Peptid-Konjugates (II)

In Schema 16 sind die Schritte zur Herstellung des Polymer-Peptid-Verbindung (**II**) dargestellt. Die Kupplung des Carbazol-Templates an das Polyethylenoxid Harz verlief analog zu der von Verbindung **I**.^[4] An den zwei Aminfunktionalitäten des Carbazolderivates konnte mittels Festphasengebundener Synthese die Peptidsequenz aufgebaut werden. Als letzte Aminosäure wurde Dimethylglycin (dmG) gekuppelt. Die Aminosäure dmG besitzt ein zweifach methylierte α -Amingruppe und schließt die Sequenz ab. Auf Grund seiner unzureichenden Löslichkeit musste Dimethylglycin als einzige Aminosäure dieser Sequenz per Hand gekuppelt werden. Nachdem ein Kaisertest die Vollständigkeit der dmG Kupplung angezeigt hatte, wurde **II** vom Harz abgespalten. Das Produkt **II** wurde laut NMR, MALD-TOF und IR analysenrein gewonnen.



Schema 16. Dargestellt sind die Beladung des Harzes mit dem Templatmolekül, Abspaltung der Fmoc Schutzgruppen, sowie der Aufbau der Peptidsequenz (mit SPPS). Nach der Abspaltung vom Harz lag das Polymer-Peptid-Konjugat (**II**) ungeschützt vor.

Es ist bekannt, dass die Peptidsynthese der VT-Sequenz ab der vierten Aminosäure kaum noch quantitativ abläuft.^[154] Bei dem Vorläufermodell wurde daher die automatische Synthese ab dem dritten Threonin abgebrochen und die weiteren Aminosäuren per Hand im Glasreaktor gekuppelt. Der Grund für die Schwierigkeit der Kupplung weiterer Aminosäuren war die starke Aggregationstendenz des Peptides zu einer β -Faltblattes Struktur während der Synthese.^[155] Mit der Aggregation verbunden ist eine schlechte Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen. Die Kupplung von Aminosäuren an aggregierten Peptidsequenzen ist nicht mehr quantitativ.



Schema 17. Unter den chemischen Bedingungen der Abspaltung vom Harz bildet sich aus dem Pseudoprolin (VT)^{pro} (links) das natürliche Peptid (VT)^{nativ} (rechts) aus. Blau dargestellt ist Threonin, grün Valin, die Sekundärstruktur brechende Pseudoprolin Gruppe ist rot dargestellt. Zur Vereinfachung wurden die anderen Aminosäuren weggelassen.

Unter der Verwendung eines Pseudoprolins (Fmoc-Val-Thr-(psi Me,Me pro)-OH), wurde die native Struktur des Peptides gestört. So konnte die Aggregation der Peptide während der Synthese von **II** verhindert und die Synthese vollautomatisiert durchgeführt werden. Nach dem Abspalten der Peptidsequenz bildete sich aus dem Pseudoprolin wieder die native VT-Struktur (Schema 17) zurück.

Strukturbildung durch gezielte Deaggregation und Aggregation

Um die Faserbildung zu kontrollieren, wurden statistisch gebildete Aggregate von **II** vollständig mit TFA denaturiert und deaggregiert. Nach 30 Minuten bei gelindem Schütteln wurde die TFA entfernt und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Zur möglichst quantitativen Entfernung der TFA, wurde noch dreimal abdestilliert und jeweils in Methanol aufgenommen. Bei der folgenden Dialyse wurde die Zusammensetzung der Dialyselösung langsam von Methanol nach Wasser verändert (10 % je Tag). Dadurch wurde eine kontrollierte Aggregation ausgelöst.

Wie bei dem bekannten Polymer-Peptidsystem **I** fand auch bei der neuen Polymer-Peptid-Verbindung **II** eine Strukturbildung zu Doppelbändern statt. Das Vorhandensein von

β -Faltblattstrukturen wurde mit CD Spektroskopie untersucht. Das CD-Spektrum zeigte ein Minimum bei 218 nm und ein Maximum bei 195 nm. Dieses Spektrum ist typisch für die β -Faltblatt Konformation.

Die erzeugten Nanostrukturen konnten mittels AFM abgebildet werden (Abbildung 17). Die Abstände paralleler Fasern entsprachen dabei der Breite einer Fasern. Durch 10faches Messen der Abstände wurde ein Mittelwert für die Breite und Höhe gebildet. Es ergab sich eine durchschnittliche Breite von $23 \pm 2,5$ nm und eine durchschnittliche Höhe von $1,6 \pm 0,2$ nm.

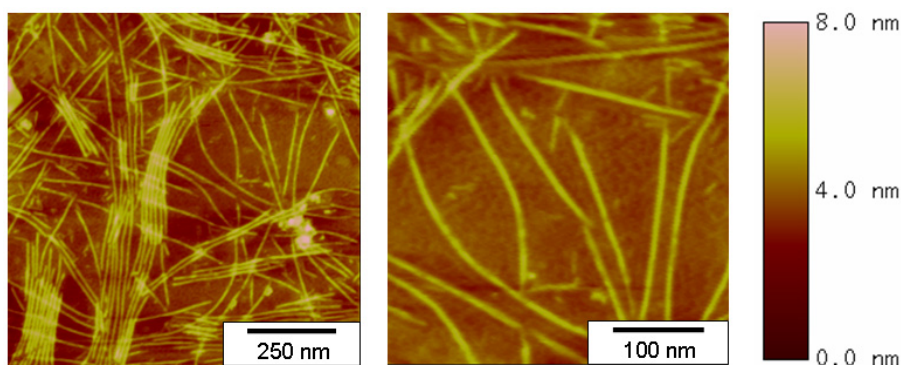


Abbildung 17. Abgebildet sind die Höhenbilder der AFM Fasern, die durch Aggregation von **II** in Wasser entstehen.

Ein positiver Kaisertest zeigte, dass die Seitenkette der Aminosäure Lysin dem Wasser zugewandt und damit für weitere Reaktionen gut zugänglich (Abbildung 18).

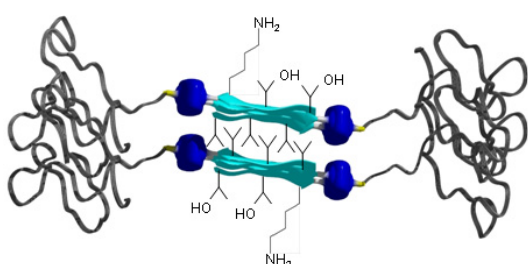


Abbildung 18. Die Seitenansicht der Doppel-Bänder von **II**, zeigt deutlich die Amingruppe auf den dem Lösungsmittel zugewandten Seiten des Doppelbandes.

Modifikation der Aminfunktionalisierten Fasern (**II**)

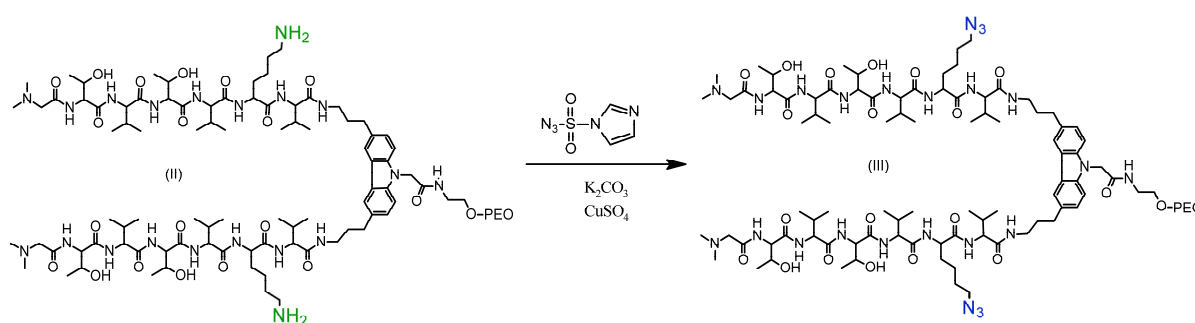
Prinzipiell ist es möglich, eine Amingruppe für verschiedene Modifikationen zu nutzen. Denkbar wären unter anderem Umsetzungen mit Säuren zu Amiden oder mit Ketonen zu Iminen.

Sehr viel vorteilhafter wäre es eine Reaktion nutzen zu können, die in Wasser mit hohen Umsätzen funktioniert. Dabei müssen während der Reaktion sämtliche anderen funktionellen Gruppen inert sein. Eine Einführung von Schutzgruppen würde ebenfalls die Faser zerstören, oder ihre kolloidale Stabilität herabsetzen, dass die Fasern möglicherweise koagulieren. Eine solche Reaktion stellt die „Klick Chemie“ mit der Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition bereit. Für die 1,3-dipolare Cycloaddition werden alkin- oder azidfunktionalisierte Fasern benötigt. Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, sind die Azide leicht aus den Amingruppen zugänglich. Aus diesem Grund wurde wie im Folgenden erläutert die Amingruppe in eine Azidfunktion umgewandelt.

5.4. Diazotransfer an den aminfunktionalen Fasern (II)

Der Diazotransfer wurde an den bereits gebildeten Polymerfasern von **II**, mit Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid durchgeführt. Die Reaktion verläuft Kupfer(II) katalysiert unter milden Bedingungen im wässrigen Medium. Es werden viele verschiedene funktionellen Gruppen toleriert und die Umsätze sind quantitativ.

Zu der Faserlösung wurden 0,2 Äq. Kupfersulfat, 4,2 Äq. Kaliumcarbonat und 2,1 Äq. Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid gegeben und die Reaktionslösung über Nacht langsam geschüttelt.



Schema 18. Die Reaktionsgleichung des Diazotransfers zeigt die aminfunktionalisierten Fasern von **II**. Sie werden quantitativ in die azidfunktionalisierten Fasern **III** überführt. Aus Übersichtsgründen sind die unaggregierten Moleküle abgebildet.

Als Nachweis für die Vollständigkeit des Diazotransfers diente der Kaiser Test, der freie Amine schon in sehr kleinen Konzentrationen colorimetrisch durch eine Blaufärbung anzeigt. Ein negativer Kaisertest zeigte nach 16 Stunden Reaktionszeit die Vollständigkeit der Transferreaktion an.

Nach dem Ende der Reaktion wurden die Kupfer(II)ionen mittels DOWEX™ Ionenaustauscherharz und Dialyse (MWCO 500 Da) entfernt. Die so gewonnenen Peptid-Polymer-Fasern **III** lagen vermutlich mit Azidfunktionalitäten vor (Schema 18). Um weitere Analysemethoden anwenden zu können, wurde ein kleiner Teil der Faserlösung gefriergetrocknet. Der gewonnene farblose Feststoff wurde mit MALDI-TOF, IR und NMR analysiert.

Die Ergebnisse von **III** werden im Vergleich zu dem aminfunktionalisierten Molekülen (**II**) dargestellt. In Abbildung 19 werden die MALDI-TOF-Massenspektren von **II** und **III** dargestellt. Beide weisen eine Massenverteilung von $\Delta M = 44,04 \pm 0,5$ Da auf. Dies entspricht der Wiederholungseinheit des Polyethylenoxids. Die Gesamtmasse des Polymer-Peptid-Konjugates errechnet sich aus den Fragmenten:

$$M_{(n)}^+ = n \cdot M_{[\text{Ethylenoxid}]} + M_{[\text{Templat}]} + 2 \cdot M_{[\text{Peptid}]} + M_{[\text{Endgruppen}]} + M_{[\text{Gegenion}]}$$

Die Moleküle **II** und **III** sind fast identisch, der einzige Unterschied findet sich im Peptidteil. Pro umgesetzter Aminfunktion zu Azidgruppen, beträgt die Massenzunahme 26 Da. Jedes Polymer-Peptid-Konjugat besteht aus zwei analogen Peptidketten, daher beträgt die Massenzunahme im Diazid (**III**) insgesamt 52 Da. Eine Peptidkette von (**II**) hat ein Molekulargewicht von 713,9 Da, es ergibt sich so für den gesamten Peptidanteil von (**II**):

$$2 \cdot M_{\text{Peptid}} = 2 \cdot 713,9 \text{ Da.}$$

Für die Peptidketten von (**III**) ergibt sich: $2 \cdot M_{\text{Peptid}} = 2 \cdot (713,9 \text{ Da} + 26 \text{ Da} = 739,9 \text{ Da})$.

Jede Wiederholungseinheit eines Ethylenoxides wiegt $M_{[\text{Ethylenoxid}]} = 44,04$ Da. Mit der Masse des Templates ($M_{[\text{Templat}]} = 335,19$ Da), der Endgruppen (am PEO nur $H = 1$ Da), sowie des Gegenions: $M_{[\text{Gegenion}]} = 39,1$ Da (Kalium) ergibt sich:

$$M_{(n)}^+ = n \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot M_{[\text{Peptid}]} + 39,1 + 1 \text{ [Da]}$$

Mit $n = 71$ Wiederholungseinheiten des PEO folgt daraus:

$$M(\text{II})^+ = 71 \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot 713,9 + 1 + 39,1 = 4929,93 \text{ Da (exp. 4929,73 Da)}$$

$$M(\text{III})^+ = 71 \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot 739,9 + 1 + 39,1 = 4981,93 \text{ Da (exp: 4981,53 Da)}$$

Die beiden Massen wurden in den jeweiligen MALDI-Spektren gefunden. Die Peakverteilungen stammten vom Polyethylenoxidanteil ($\Delta M_{(\text{PEO})} = 44,04$ Da).

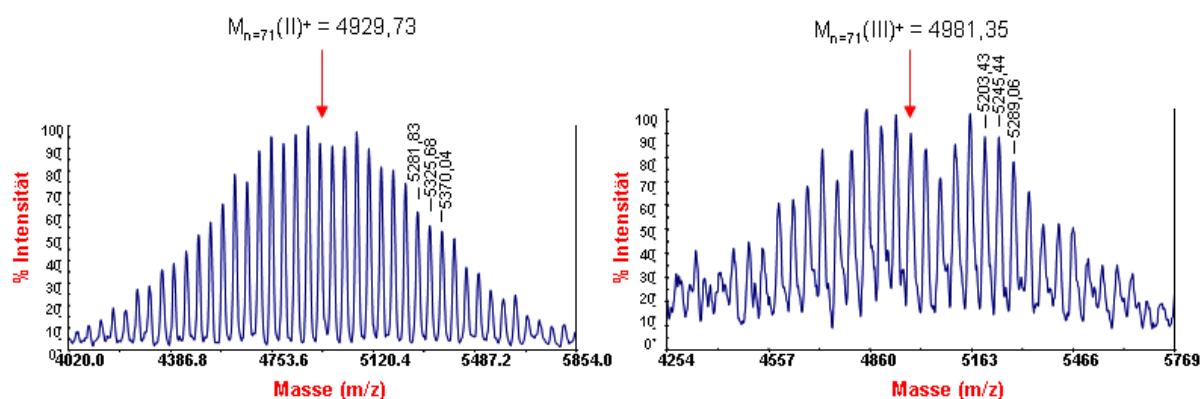


Abbildung 19. MALDI-TOF-Spektren, links: Spektrum von **II**, rechts Spektrum von **III**.

Das Signal-Rausch-Verhältnis der MALDI-TOF-Messung von **III** ist schlechter, als die Messung des Polymer-Peptid-Konjugates in **II**. Dies ist u. a. auf das Fehlen der Amingruppen in **III** zurückzuführen. Diese leicht protonierbare Funktionalitäten erleichtern die Ionisierung des gesamten Moleküls. Fehlt diese Funktionalität (wie in **III** der Fall), ist die Ionisierung insgesamt schwieriger zu erreichen. Die Ionisierung könnte mit einem Laser stärkerer Leistung verbessert werden, jedoch ist bekannt, dass Azide bei starker Energiezufuhr Stickstoff abspalten, was zu einer relativen Massenabnahme führen würde.

Wird das IR Spektrum des aminfunktionalisierten Templates (**II**) mit dem des azidfunktionalisierten (**III**) (siehe Abbildung 20) verglichen, wird ersichtlich, dass die typischen Schwingungsbanden von Peptiden, die Amid(I) Bande (1627 cm^{-1}) und Amid(II) Bande (1548 cm^{-1}), unverändert sind. Dies deutet darauf hin, daß das β -Faltblatt intakt geblieben ist.

Die Bande bei $\nu = 2100\text{ cm}^{-1}$ die im Spektrum der Verbindung **III** zu erkennen ist, wird der asymmetrischen Valenzschwingung des Azides zugeschrieben. Diese typische Azid Schwingungen stellt einen deutlichen Hinweis auf das Vorhandensein der Azidgruppe dar.

Weiterhin ist bei den aminfunktionalisierten Fasern (**II**) die für primäre Amine typischen Schwingung bei $\nu = 1672\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen. Nach dem Diazotransfer in Verbindung **III** wird dieser Peak so klein, dass er von der Amid(I) Bande verdeckt wird.

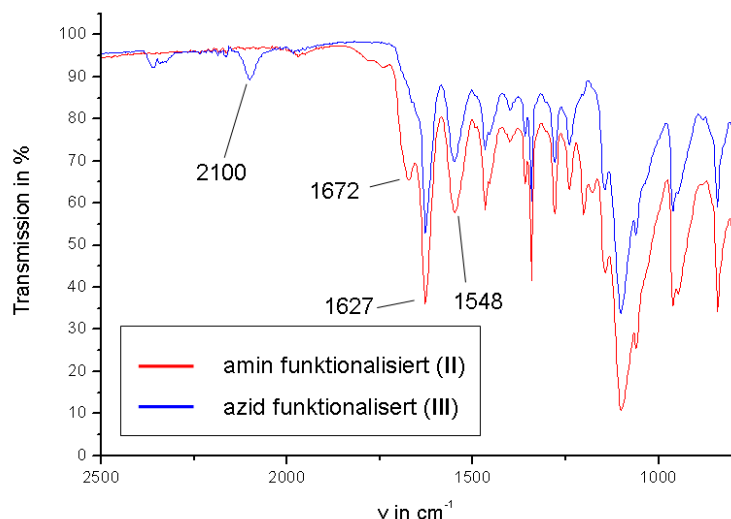


Abbildung 20. IR-Spektren von **II** und **III**, deutlich zu sehen das Verschwinden der Aminbande (1672 cm^{-1}), sowie die Azidbande (2100 cm^{-1}) nach dem Azidtransfer.

Aus den Ergebnissen der Massenspektrometrie und des negativen Kaisertest ist davon auszugehen, dass der Diazotransfer vollständig verlief.

Die synthetisierten Fasern besitzen nunmehr Lösungsmittel-exponierte und damit leicht zugänglichen Azidfunktionen (Abbildung 21). Sie sind der Grundbaustein, um weitere Funktionalitäten mittels „Klick Chemie“ an die Faser anzubringen und damit die Eigenschaften der Fasern zu variieren. Die Länge und Flexibilität der Lysin Seitenkette stellte sich als weiterer Vorteil heraus. Kürzere Seitenketten sind weniger gut zugänglich und reagieren daher deutlich langsamer. Ein Grund ist die sterische Abschirmung durch die PEG-Ketten, die durch eine längere Seitenkette verringert wird.

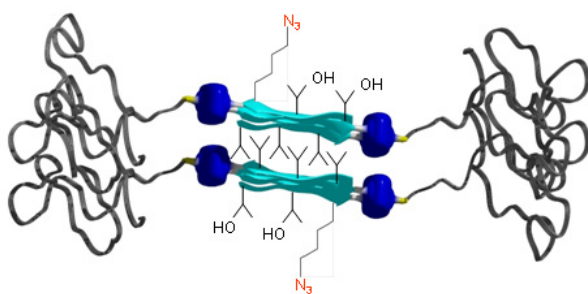


Abbildung 21. Seitenansicht von den Fasern **III**, das Azid und die Seitenketten des Threonins sind Lösungsmittel-exponiert (Wasser), während die Seitenketten vom Valin im Kern des β -Faltblatt-Doppelbandes lokalisiert sind.

An die azidfunktionalisierten Fasern kann eine große Auswahl an Molekülen angebracht werden. So können viele Eigenschaften, mittels „Klick Chemie“ an die Fasern addiert

werden. Die einzigen Voraussetzungen an das anzubringende Molekül sind eine primäre Alkinfunktion und dessen Wasserlöslichkeit.

Exemplarisch für die weiteren Möglichkeiten, die Eigenschaften der azidfunktionalisierten Faser zu variieren, wurde als erstes ein einfach nachzuweisendes Modellsystem verwendet. Ein Fluoreszenzfarbstoff wurde mit einer Alkingruppe versehen (siehe Anhang) und mittels [3+2] Cycloaddition an die Faser geklickt.

Nach dem der Diazotransfer durchgeführt war, wurde mittels CD-Spektroskopie überprüft, ob die β -Faltblattstruktur noch erhalten ist. Das Ergebnis der CD-Messung zeigt ein Maximum bei 195 nm und ein Minimum bei 216 nm. Dies ist ein typischer Verlauf eines β -Faltblatts, es dient als indirekter Hinweis auf den Erhalt der Fasern. In Falle einer Störung des β -Faltblatt durch die Reaktionsbedingungen, lägen keine Fasern mehr vor. Die in Lösung gefundenen Signale für das β -Faltblatt deuten darauf hin, dass die Fasern während des Diazotransfers stabil bleiben. Sie sind allerdings kein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein von Aggregaten. Von Interesse ist daher die Visualisierung der Fasern, zum Beispiel durch AFM und TEM.

Für die Untersuchung mit der AFM wurde die Lösung der Fasern verdünnt und durch Spincoaten auf Mica präpariert. Es konnte beobachtet werden, dass in Abhängigkeit der Präparation (Verdünnung der Probe, Konzentration, Spincoatgeschwindigkeit, etc.) die Länge der Fasern variierte. Die optimalen Bedingungen waren eine langsame Verdünnung auf die Präparationskonzentration von 0,2 g/L und Spincoaten bei $2500 \text{ u} \cdot \text{min}^{-1}$. Unter diesen Bedingungen konnten Fasern bis zu 500 nm Länge beobachtet werden.

Die Fasern wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Breite untersucht. Die Breite der Fasern kann aus der Halbwertsbreite der Fasern (sog. FWHH) bestimmt werden. Da die gemessene Breite durch Faltungseffekte^[156] beeinflusst wird, wurde die tatsächliche Breite als Abstand paralleler, dicht gepackter Fasern bestimmt. Für die Breite wurden auf diese Art Werte von $24 \pm 2 \text{ nm}$ ermittelt.

Um die Fasern mit TEM zu visualisieren, wurde der Hintergrund mit Schweratomen gefärbt. Hierfür wurde die Lösung der Fasern auf 0,4 g/L verdünnt, auf dem Grid aufgebracht und mit Uranylacetat angefärbt (Abbildung 22).

Die Breite der elektronenkontrastarmen (hellen) Bereiche entsprach der des Peptidkerns, da das PEO vom Uranylacetat durchdrungen wird. Die für den Peptidkern gefundene Breite lag bei $4 \pm 0,4 \text{ nm}$. Aus dem Abstand zweier paralleler Fasern wurde im TEM die tatsächliche

Breite der Fasern ermittelt, sie lag bei $16,0 \pm 2,0$ nm und stimmte gut mit der ermittelten Breite aus den AFM Messungen überein.

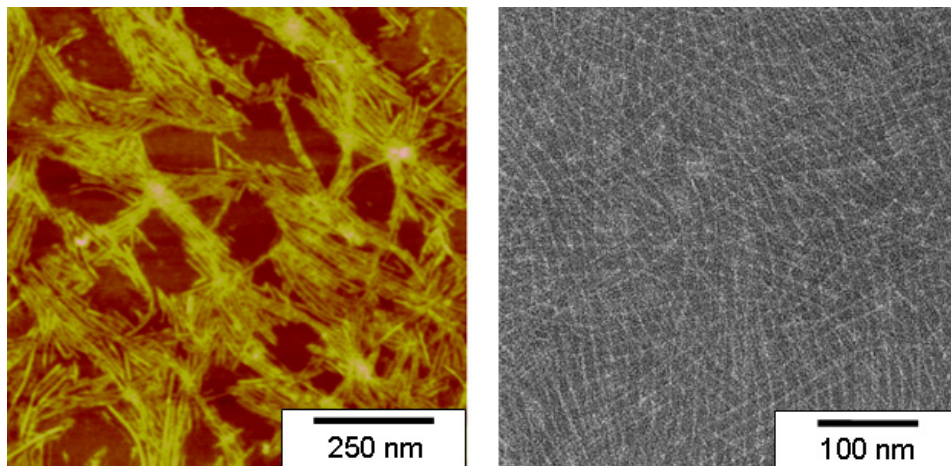


Abbildung 22. Die Visualisierung der azidfunktionalisierten Fasern (III). Links: AFM (Höhenbild) $C = 0,2\text{g/L}$, Rechts: TEM Aufnahme (auf graphitbeschichtetem Kupfernetz, negativ kontrastiert mit Uranylacetat).

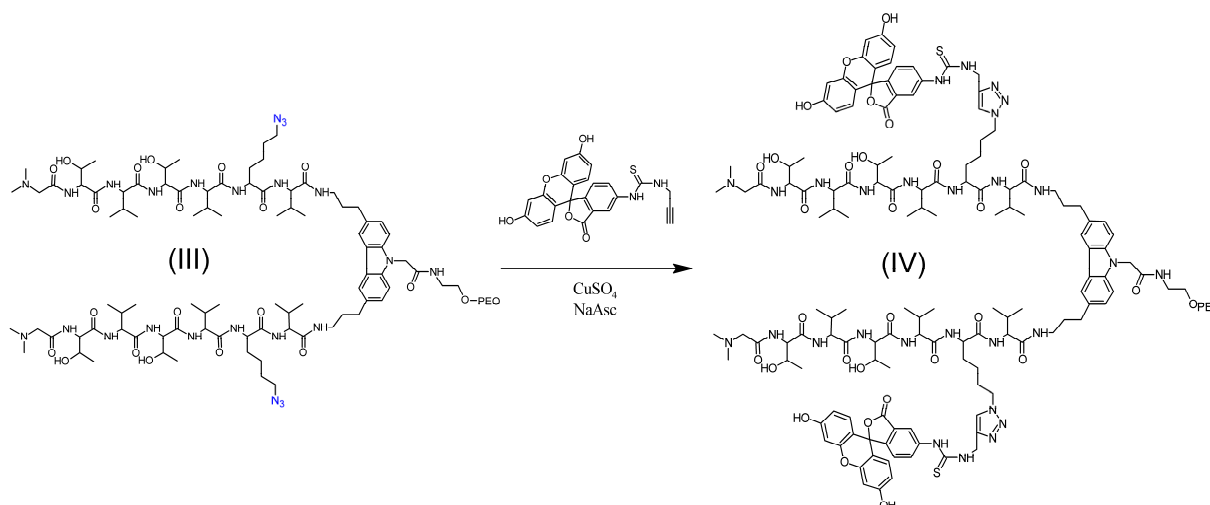
Anhand der AFM und TEM Messungen konnte gezeigt werden, dass die Nanofasern durch die Bedingungen des Diazotransfers nicht beeinflusst werden.

Nach der Untersuchung der azidfunktionalen Fasern, konnten sie mit der „Klick-Chemie“ weiter modifiziert werden. Um das Prinzip zu veranschaulichen, wurde daher als erstes ein Farbstoff an die Fasern angebracht. Dies wird im nächsten Abschnitt ausführlicher erläutert.

5.5. 1,3-dipolare Addition von Fluorescein an die azidfunktionalisierten Fasern (III)

Die azidfunktionalisierten Fasern (III) sind der Basis für die nachfolgenden Modifikationen. Verschiedene alkinfunktionalisierte Bausteine können an die azidfunktionalisierten Fasern angebracht werden. Als Nachweis für das Baukastenprinzip wurde daher ein Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe der 1,3-dipolaren Addition an die Fasern angebracht. Die Visualisierung der fluoreszierenden Fasern erfolgte über Konfokale Mikroskopie.

Zu der Faser-Lösung von III wurde unter Schutzgas Atmosphäre alkinfunktionalisiertes Fluorescein und Kupfersulfat hinzugefügt. Zu dieser Lösung wurden Natriumascorbat (NaAsc) im Argongegenstrom gegeben und die Lösung über Nacht unter gelindem Schütteln reagieren gelassen. Nach Ablauf der Reaktion wurden die modifizierten Fasern (IV) mittels DOWEX Ionenaustauscher Harz und Dialyse (MWCO = 1000 Da) gereinigt. Die nach der Reaktion vorliegenden Fasern mit den über Triazolgruppen verbundenen Fluoresceinmolekülen sind in Schema 19 dargestellt. Ein Teil der Lösung wurde gefriergetrocknet und mit IR-Spektroskopie, MALDI-TOF und NMR untersucht.



Schema 19. „Klicken“ des alkinmodifizierten Fluoresceins an die Azid-Fasern III ergeben die fluoresceinfunktionalisierten Fasern IV unter Ausbildung des 1,2,3-Triazolringes.

Der vollständige Umsatz an Azid konnte gut mittels IR detektiert werden. Die Ergebnisse werden vergleichend mit III dargestellt (Abbildung 23). Das IR-Spektrum von IV zeigte keine Azidschwingung bei $\nu = 2100 \text{ cm}^{-1}$. Dies deutet auf den vollständigen Umsatz der in III vorhandenen Azidgruppen zum 1,2,3-Triazolring hin. Zusätzlich entsteht eine Bande bei 1751 cm^{-1} , die dem 1,2,3-Triazolring zugeordnet werden kann. Die Amid(I) Bande

($\nu = 1627 \text{ cm}^{-1}$) war auch nach der „Klick Reaktion“ unverändert vorhanden, die Amid(II) Bande wurde von $\nu = 1548 \text{ cm}^{-1}$ zu $\nu = 1571 \text{ cm}^{-1}$ verschoben. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Sekundärstruktur (β -Faltblatt) leicht verändert.

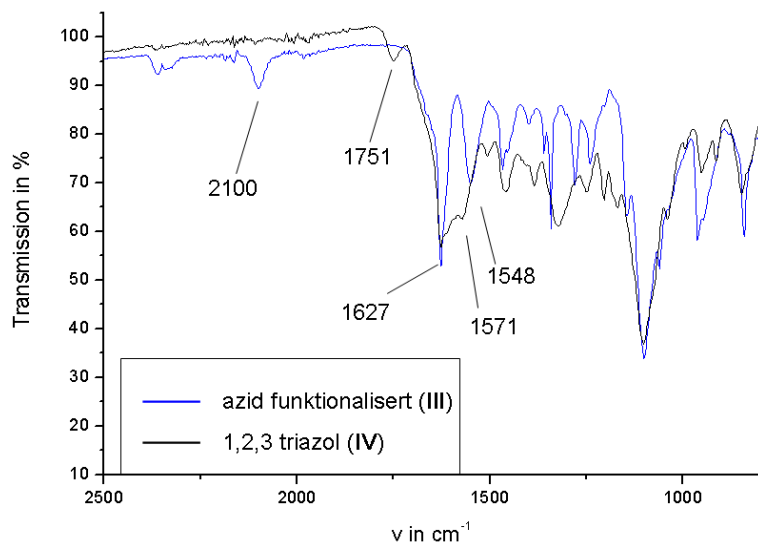


Abbildung 23. IR Spektren der azidfunktionalisierten Fasern (III) (blau) und der mit Fluoresceine modifizierten Fasern (IV) (schwarz).

Die MALDI-TOF-MS von IV detektierte keine Massensignale. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Fluoreszenzfarbstoff bei der Wellenlänge des verwendeten Lasers absorbierte. Daher fand die Matrixablation vermutlich nicht oder nur unvollständig statt, das resultierte in der unzureichenden Ionisierung des Analytmoleküls. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum kein Massenspektrum detektiert wurde.

Der Vergleich der CD-Spektren der Fasern von II, III, IV zeigt deutlich, dass alle Fasern ein β -Faltblatt Motiv ausbilden (siehe Abbildung 24). Alle Spektren besitzen ein Maximum bei 195 nm. Die Minima variieren leicht, so zeigt das CD-Spektrum der Fasern mit Aminfunktionen (II) ein Minimum bei 218 nm. Die Fasern mit Azidfunktionen (III) und die Faser mit dem Fluorescein (IV) besitzen ein Minimum bei 216 nm. Diese hypsochrome Verschiebung im CD-Signal und die Verschiebung der Amid(II) Bande in der IR-Spektroskopie deuten auf eine leichte Veränderung der β -Faltblatte Struktur hin. Möglicherweise wird diese Änderung durch Solvationseffekte hervorgerufen.

Das CD-Spektrum von II und III besitzt einen Sattelpunkt im Bereich von 233-238 nm. In vorherigen Arbeiten wurde dieses Charakteristikum auf Absorptionen des Carbazols zurückgeführt. Das Carbazol selbst ist nicht chiral, befindet sich aber in chiraler Umgebung

und weist damit ebenfalls eine unterschiedliche Absorption von links- und rechtszirkularpolarisiertem Licht auf. Diese Vermutung konnte durch **IV** weiter vertieft werden. Durch den fasergebundenen Farbstoff steigt der aromatische Anteil im System an, wodurch der Sattelpunkt zu einem Minimum bei 239 nm wird. Mit dem höheren Anteil an Aromaten in **IV** und damit verbunden dem größeren Anteil an chromophoren Gruppen im Molekül nimmt auch die Intensität der Absorption zu.

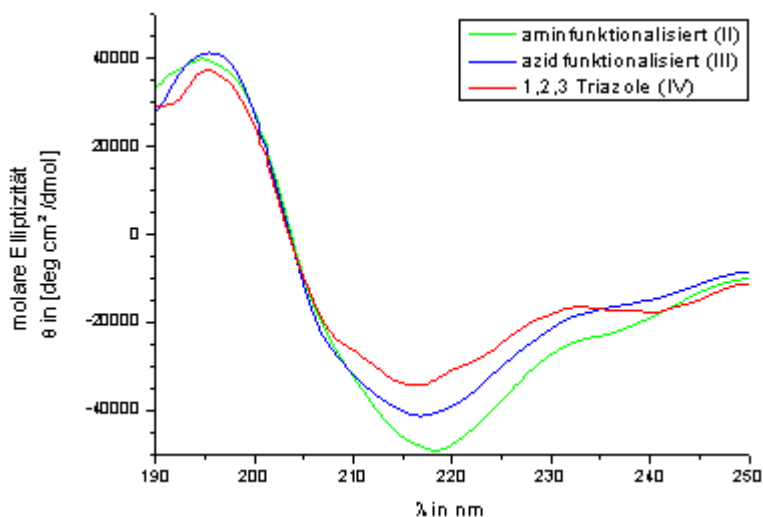


Abbildung 24. CD Spektren der Fasern von **(II)**, **(III)** und **(IV)**: typische β -Faltblatt Struktur Maximum bei 195 nm, Minimum bei 218 nm **(II)** und 216 nm **(III)** und **(IV)**.

Die Absorptionsmaxima des Fluorescein-Alkins liegen bei 213, 238, 317 und 490 nm (UV Spektroskopie, nicht gezeigt). Die Absorption von Fluorescein bei 238 nm scheint durch die chirale Umgebung einen CD aktiven elektronischen Übergang zu besitzen. Das Fluoresceine ist selbst nicht chiral, befindet sich aber in chiraler Umgebung. Die Nähe zu den β -Faltblattstrukturen ist ausreichend, um eine unterschiedlich starke Absorption von zirkularpolarisiertem Licht hervorzurufen. Somit könnte das Minimum des CD-Spektrums bei 239 nm von **IV** als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die „Klick Reaktion“ erfolgreich war.

Die AFM-Aufnahmen von **(IV)** (Abbildung 25) zeigen deutlich, dass die Faserstruktur nach der Klick Reaktion vorhanden ist. In Abbildung 25 sind weiterhin die aminfunktionalisierten Fasern **(II)** und die azidfunktionalisierten Fasern **(III)** dargestellt. Die Länge der Fasern variiert in Abhängigkeit der Faser Konzentration, und Probenpräparation. Durch spincoaten bei 0,2 g/L bei $3000 \text{ u} \cdot \text{min}^{-1}$ wurden Fasern mit einer Länge zwischen 0,2-0,5 μm gefunden

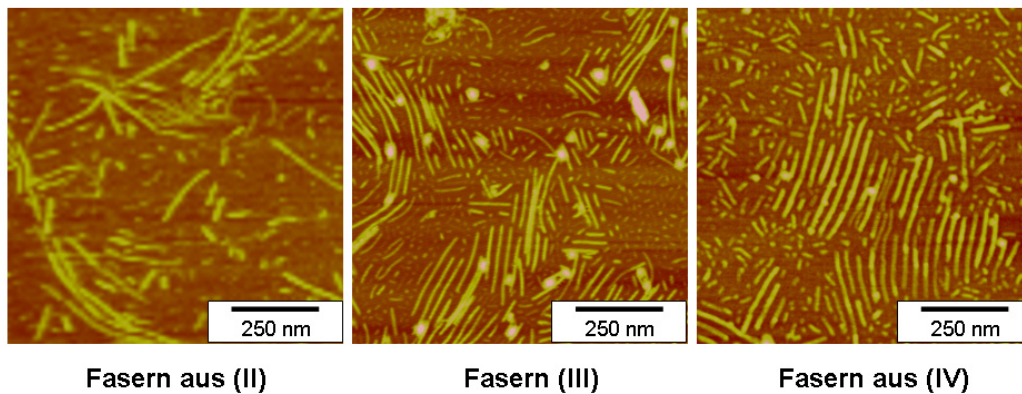


Abbildung 25. AFM Aufnahmen (Höhenbilder) der Polymer-Peptid-Fasern II, III und IV.

Aus den AFM Aufnahmen der mit Fluorescein modifizierten Fasern (**IV**) wurde, analog zu **II** und **III**, die Höhe und Breite der Fasern bestimmt. Es wurden Werte für die Höhe von $2,2 \pm 0,3$ nm und für die Breite von 29 ± 3 nm ermittelt.

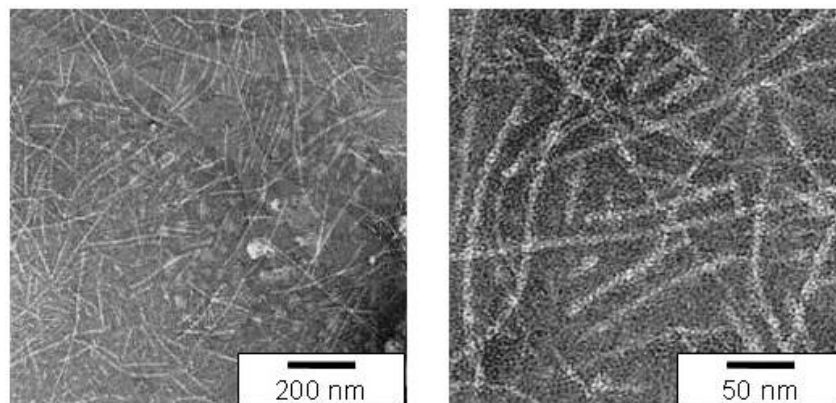


Abbildung 26. Die TEM Aufnahmen der Fluorescein modifizierten Fasern von (**IV**).

Aus den TEM Aufnahmen wurden ebenfalls, analog zu **II** und **III** die Breite der Fasern aus den Abständen ermittelt, sowie die Breite des Peptidkerns. Für den Peptidkern wurde durchschnittlich die Breiten von $4,8 \pm 0,9$ nm gefunden. Die Abstände zweier paralleler Fasern betragen $17,1 \pm 1,8$ nm.

In Tabelle 3 sind die Abmessungen der Fasern **II**, **III** und **IV**, aus den AFM- und TEM Aufnahmen dargestellt. Ein Vergleich der im AFM ermittelten Höhe der Fasern zeigt, dass sowohl **II** als auch **III** weiterhin eine Höhe von 1,6 nm aufweisen. Nach der 1,3-dipolaren Addition des Fluoresceins steigt die Höhe der Fasern auf 2,2 nm an. Wie in Abbildung 27 dargestellt, ist das Fluorescein ober- und unterhalb des Doppelbandes lokalisiert. Die Bänder werden dadurch höher, als die Bänder mit Alkin- und Azidfunktion. Zusätzlich kann es zur Rückfaltung der PEO Ketten auf das Farbstoffmolekül kommen.

Werden die Abstände der Fasern verglichen, so fällt auf, dass diese in der Reihenfolge **II**, **III** und **IV** zunehmen. Die Fasern werden breiter, wobei der größte Zuwachs in der Breite bei (**IV**) zu verzeichnen ist.

Tabelle 3. Abmessungen der Fasern im festen Zustand, AFM-Aufnahmen auf MICA, tapping mode; TEM mit Uranylacetat negativ kontrastiert.

| | | (II) | (III) | (IV) |
|--------------------------------|------|-------------|--------------|-------------|
| Abstand (AFM) | [nm] | 23 ± 2,5 | 24 ± 2 | 29 ± 3 |
| Höhe (AFM) | [nm] | 1,6 ± 0,2 | 1,7 ± 0,2 | 2,2 ± 0,3 |
| Breite Peptidkern (TEM) | [nm] | 4,4 ± 1,4 | 4,0 ± 0,4 | 4,8 ± 0,9 |
| Abstand (TEM) | [nm] | 15,0 ± 2,1 | 16,0 ± 2,0 | 17,1 ± 1,8 |

Aus den TEM-Aufnahmen der Fasern **II** - **IV** wurden die Breite des Peptidkerns und der Abstand der Fasern bestimmt. Die Breite der kontrastarmen Bereiche entspricht dabei näherungsweise der Breite des Peptidkerns der Bänder. Der Abstand zweier paralleler Fasern entspricht der Breite des Polymer-Peptid-Konjugates.

Vergleicht man die Breiten der Peptidkerne, so fällt auf, dass sie im Rahmen der Messgenauigkeit unverändert sind. Wie erwartet hat sich der β -Faltblatt bildende Peptidkern unter den Reaktionsbedingungen nicht verändert. Die Abstände der Fasern nehmen von 15 nm bei Fasern aus **II** zu 17 nm (Fasern aus **IV**) leicht zu.

Damit stimmen die TEM Ergebnisse gut mit denen der AFM Messung überein. Eine Erklärung für die zunehmende Breite in **IV**, ist die Verdrängung des Polyethylens (PEO). Bei unmodifizierter Peptidseitenkette kann der Bereich von PEO durchdrungen werden. Befinden sich nun größere Funktionalitäten, wie das Fluorescein an der Seitenkette, muss das PEO an den Rand des Doppelbandes ausweichen. Dadurch werden die Fasern breiter. Weiterhin kann das PEO auf den Fasern liegen. Diese Rückfaltung vergrößert ebenfalls die Höhe der Fasern **IV** im Vergleich zu den sterisch weniger anspruchsvollen Fasern **II** und **III**. Wird vorausgesetzt, daß ein Teil des PEOs auf die funktionalen Bandbereiche zurückfaltet, so sollte der Beitrag zur Höhe in den Fasern **II-IV** konstant sein. Durch die sterisch anspruchsvollen Fluoresceinmoleküle wird der Anteil des Rückgefalteten PEOs eher kleiner. Trotz der Verbreiterung der Polymer-Peptid-Fasern bleiben die Doppelbänder intakt. Es kann festgehalten werden, dass weder der Diazotransfer, noch die Bedingungen der 1,3-dipolaren Addition die Fasern zerstören.

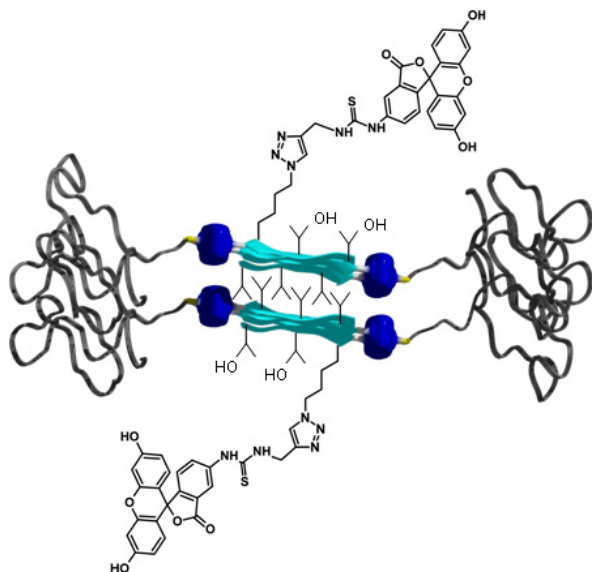


Abbildung 27. Querschnitt der Fasern, das Fluorescein ist ober- und unterhalb des Peptiddoppelbandes lokalisiert und damit dem Lösungsmittel zugewandt.

Fluoreszenzuntersuchungen der Fasern aus (IV) mittels konfokaler Mikroskopie zeigen die bündelartige Anordnung der Faser (nicht abgebildet), sowie einzelne, separat liegende und fluoreszierende Fasern (Abbildung 28). Die Länge der Fasern ist mit 1-5 μm größer als die Fasern der AFM Messung. Ein Grund könnte hierfür ist im Substrat zu finden, die AFM Messungen wurden auf Mica, die Messung mit dem Konfokalen Mikroskop auf Glas durchgeführt. Auf dem Glaträger konnte mittels AFM eine starke Aggregation der Fasern beobachtet werden. Möglicherweise könnte die im Konfokalen Mikroskop abgebildete Faser ein Aggregat mehrerer kürzerer Fasern sein. Die Breite der Fasern kann nicht verglichen werden, da die Auflösung der konfokalen Mikroskopie ist mit 170 nm nicht ausreichend um die kleinen Abstände der Fasern aufzulösen. Dadurch die werden die Faser in der Konfokalen Mikroskopie scheinbar verbreitert.

Aus diesen Ergebnissen konnte zusammengefasst werden, dass der Diazotransfer und die nachfolgende 1,3-dipolare Addition an den Fasern mit hohen Umsätzen erfolgten. Der empfindliche Kaisertest zeigte den vollständigen Umsatz des Amins (II) zum Azid (III) an. Der Umsatz vom Amin bis hin zum Azid konnte durch die Ergebnisse der IR-Spektroskopie noch unterstützt werden. Die Abwesenheit der Azidbande im IR-Spektrum von Verbindung IV machte deutlich, dass der größte Teil des Azides in eine Triazolgruppe überführt wurde. Die Peptid-Polymer-Fasern blieben unter den Reaktionsbedingungen stabil, dies konnte mittels CD-Spektroskopie, AFM und TEM nachgewiesen werden.

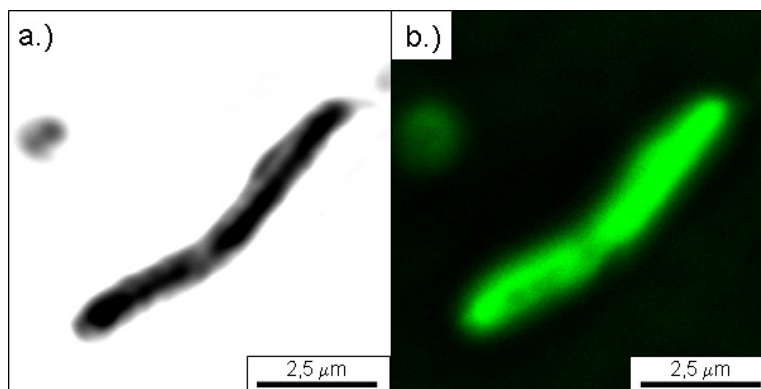


Abbildung 28. Konfokale Aufnahme der Fluorescein haltigen Fasern (IV),
a.) Durchlicht Bild, b.) Fluoreszenzbild

Die Addition von Fluorescein diente als Modell, um die Möglichkeit weiterer Modifikationen an den azidfunktionalisierten Fasern zu veranschaulichen. Die azidfunktionalisierten Fasern bilden den Ausgangspunkt für die viele weitere Modifizierung an den Fasern. Die verschiedenen Funktionalisierungen werden mit Hilfe der 1,3-dipolaren Cycloaddition an die Fasern angebracht. Dadurch können neue Eigenschaften entlang der Fasern generiert werden. Durch die kovalente Anbringung von verschiedenen Funktionen können die Eigenschaften der Fasern maßgeschneidert werden. Einige mögliche Funktionalisierungen, die an die Fasern angebracht wurden, sind nachfolgend beschrieben.

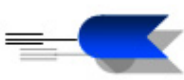


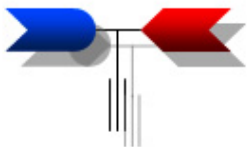
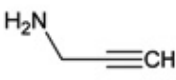
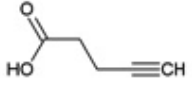
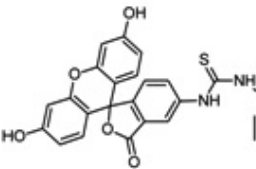
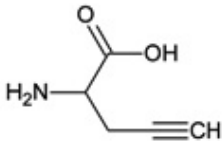
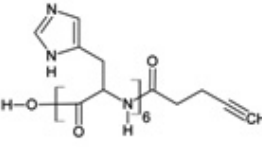
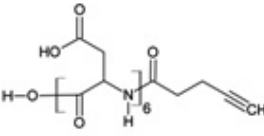
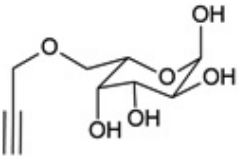
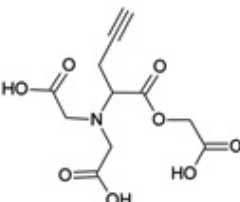
5.6. Baukastensystem der Alkine

Wie bereits in Kapitel 2.5 erläutert, bietet die Klick-Chemie eine gute Möglichkeit, Polymere und anderen Makromolekülen mit Modifikationen zu versehen. Dabei kann eine große Auswahl an Molekülen mit der Azidgruppe umgesetzt werden. Einige dieser Moleküle sind in Tabelle 4 dargestellt.

Diese Moleküle besitzen alle eine Alkingruppe und können über die 1,3-dipolare Addition an die azidfunktionalisierten Fasern geklickt werden. Auf diese Art können die Eigenschaften der Fasern maßgeschneidert werden. Das Fluorescein ermöglichte die Visualisierung der Fasern mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie (Kapitel 5.5). Der alkinmodifizierte Zucker kann z. B. Silberionen reduzieren. So sollten die Silberionen entlang der Fasern reduziert und ausgerichtet werden. Sie liegen dann als Metallnanodrähte vor.

Mit Ausnahme von Fluorescein und dem Zucker eignen sich alle dargestellten Moleküle zur Koordination von Metallen. Dabei steigt die Fähigkeit, Metalle zu komplexieren, mit der Anzahl der funktionellen Gruppen an. Die Reihenfolge der Funktionellen Gruppen ist: Pentinsäure < NTA < Asparaginsäurehexapeptid. Die Ursache hierfür ist der Chelateffekt. Je mehr funktionelle Gruppen einer Art ein Molekül besitzt, die ein Metallatom koordinieren können, desto stabiler ist die Komplexierung des Metallions. Zusätzlich kann die räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen die Fähigkeit Metalle zu binden beeinflussen. Je vorgegebener eine Konformation ist, desto besser werden Metallionen gebunden, die eine für die Konformation vorgegebene Größe besitzen. Metallionen, die wesentlich von dieser Größe abweichen, werden dafür von starren Liganden schlechter gebunden. Ein Beispiel ist das NTA (Nitrilotriessigsäure), es ist ein sehr guter Ligand für Moleküle in der Größe von Nickelionen. Nickel(II)ionen besitzen einen Ionenradius von 78 pm. Das in dieser Arbeit verwendete NTA-Derivat, ein Carboxymethylester des NTA, besitzt eine etwas größere Bindungsstelle als das NTA. Dadurch wird es möglicherweise ein guter Ligand für Kalzium, das mit 106 pm einen größeren Ionenradius als das Nickel besitzt.

Tabelle 4. Die Tabelle zeigt einige mögliche Alkine, welche an die Fasern angebracht werden können, um deren Eigenschaften zu variieren.

| | | | |
|--|---|--|---|
|  <p>Aminfunktion</p> |  <p>Säurefunktion</p> |  <p>Farbstoff</p> |  <p>Multifunktional</p> |
|  <p>Propargylamin</p> |  <p>Pentinsäure</p> |  <p>Fluoresceine</p> |  <p>PRA</p> |
|  <p>Pentinsäure-His₆-</p> |  <p>Pentinsäure-Asp₆</p> | |  <p>Galactose-alkin</p> |
| |  <p>NTA-Derivat</p> | | |

Die in Tabelle 4 dargestellten Moleküle wurden, wie im nachfolgenden Kapitel gezeigt an die Faser angebracht.

5.7. Weitere Modifikationen an den azidfunktionalen Fasern

Besonders interessant im Hinblick auf die Herstellung von Metallfasern in Nanogröße ist die faserorientierte Komplexierung von Metallionen. Dies kann durch selektive oder allgemeine Liganden geschehen. In der Metallchemie kommen dabei oft Carbonylgruppen (z. B. Taträt, Oxalat) oder Amine (Beispiele: bipy, en) zur Anwendung.

Werden Metallionen an die Fasern gebunden, können alle überschüssigen und damit ungebundenen Ionen durch Dialyse entfernt werden. Die verbleibenden Metallionen sind somit an der Faser lokalisiert. Werden sie dort reduziert, liegen die faserkomplexierten Metall-Nanopartikel, durch die Fasern angeordnet, vor. Sie können als Kristallisationskeime für weitere Metallionen dienen. Auf diese Art könnten Metalldrähte im Nanometer Maßstab hergestellt werden. Eine nicht selektive Komplexierung mit simultaner Reduzierung der Metallionen durch DNA gebundene Zuckermoleküle^[92] gibt einen Ausblick auf weitere Möglichkeiten der Anwendung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Arten von alkinfunktionalisierten Carbonsäuren an die Azidgruppen angebracht. Pentinsäure (eine Säurefunktion), NTA (mit drei Säurefunktionalitäten) sowie das Asparaginsäurehexapeptid (sechs Säuregruppen).

Die Bedingungen der Klick Reaktion sind mit denen in Kapitel 5.5 (Fluorescein) identisch. Hierbei ist zu beachten, dass mit einem Überschuss an Kupferionen gearbeitet werden musste, da die guten Komplexierungseigenschaften der (Oligo-) Carbonsäuren eine Herabsetzung der effektiven Konzentration an Kupferionen bewirken. Um dies bei dem NTA zu vermeiden, wurde es ^tBu geschützt umgesetzt. Nach der 1,3-dipolaren Addition konnten die Schutzgruppen abgespalten werden. Nach 18 Stunden Reaktionszeit wurde jeweils durch Dialyse aufgereinigt. Durch den Zusatz von TREN konnte das Kupfer durch Dialyse entfernt werden. So wurden drei verschiedene Fasern hergestellt, die pentinsäuremodifizierten Fasern (**V**), die NTA-funktionalisierten Fasern (**VI**) und die hexasparaginsäuremodifizierten Fasern (**VII**). Ein Teil der Faserlösung wurde jeweils gefriergetrocknet und mit IR, MALDI-TOF und NMR untersucht.

Die IR Spektren sind in Abbildung 29 dargestellt. Der Umsatz der Azidgruppe kann deutlich an der Valenzschwingung des Azides beobachtet werden. Das Spektrum von **V** weist einen kleinen N₃ Peak bei $\nu = 2100 \text{ cm}^{-1}$ auf, Verbindung **VI** zeigt an dieser Stelle kein Signal, während die N₃-Valenzschwingung von **VII** noch erkennbar ist. Die Metall komplexierenden Carbonsäuren – insbesondere das Asparaginsäurehexapeptid scheinen die Huisgen Reaktion zu behindern. Dies wird besonders am NTA deutlich, dessen Umsetzung verlief quantitativ.

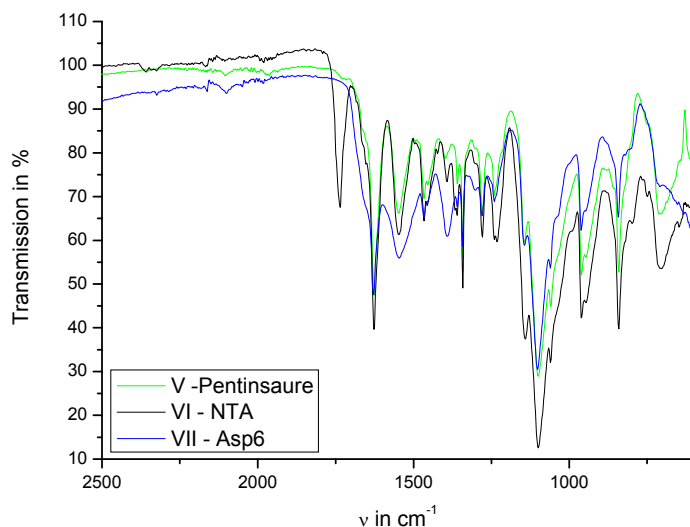


Abbildung 29 Die IR-Spektren der modifizierten Fasern **V-VII**.

Die 3 verschiedenen Fasern **V**, **VI**, **VII** wurden auf Ihre Fähigkeit Kalziumionen zu binden überprüft. Dazu wurde zu 25mL der jeweiligen Faserlösung Schrittweise eine Lösung mit bekannter Kalziumionenkonzentration getropft. Der pH Wert der Lösung wurde mit einer pH Elektrode kontrolliert und durch automatische Titration konstant gehalten. Durch eine Kalziumselektive Elektrode konnte parallel zum pH Wert die freie Kalziumkonzentration in Lösung bestimmt werden.^[157] Aus der Differenz der zugegebenen Ionen Menge und der freien Kalziumkonzentration konnte die Menge an gebundenem Kalzium bestimmt werden. Als Referenz wurde gegen destilliertes Wasser gemessen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die modifizierten Fasern an sich kein Kalzium binden. Dafür wurden die ^tBu geschützten Polymer-Peptid-Fasern (**VI**) vermessen, die kein Kalzium gebunden haben.

Aus der Konzentration der Fasern und ihres Molekulargewichtes konnte die Anzahl der faserbildenden Moleküle in der Lösung bestimmt werden. Zusammen mit der gebundenen Kalziummenge konnte die Anzahl der gebundenen Kalziumionen pro Faser-Molekül errechnet werden. Die Ergebnisse der Kalziumbindung sind in Tabelle 5 dargestellt.

Die pentinsäurefunktionalisierten Fasern (**V**) binden 0,48 Kalziumionen je Faser-molekül. Bei nur zwei funktionellen Carbonylgruppen sind das 0,24 Kalziumionen je Säurefunktion. Die NTA modifizierten Fasern (**VI**) komplexieren 0,74 Kalziumionen je Molekül. Bei zwei NTA Funktionen das sind rechnerisch 0,37 Kalziumionen je NTA oder auf sechs Carbonsäurefunktionen gerechnet 0,123 Kalziumionen pro Säurefunktion.

Die Fasern, an denen das Asparaginsäurehexapeptid angebracht ist (**VII**) binden 2,69 Kalziumionen je Molekül. Jedes Molekül besitzt zwei Arme mit je einem Asparaginsäurehexapeptid. Daher kommen 12 Säurefunktionalitäten auf 2,69 Kalziumionen. Das ergibt 0,22 Kalziumionen je Carbonylgruppe.

Pro Fasermolekül bindet das asparaginsäurefunktionalisierte (**VII**) die meisten Kalziumionen, gefolgt von dem NTA funktionalisierten (**VI**) und dem pentinsäurefunktionalisierten (**V**) Molekül. Diese Beobachtung entspricht dem Chelateffekt. Wird jedoch die Bindung je funktioneller Gruppe berechnet, so bindet **V** mit 0,24 Kalziumionen je Carboxylgruppe mehr, als **VII** mit 0,22 und **VI** mit 0,12. Eine mögliche Ursache für die gute Kalziumbindung in **V** könnte die hohe Flexibilität der Pentinsäurearme sein. Das NTA-Derivat bindet nicht wie erwartet ein Kalziumion je NTA Funktion. Ein Grund hierfür könnte die vorgegebene Geometrie der Säurefunktionen sein, ebenfalls binden jeweils 2 Säurefunktionen ein Kalziumion, daher besitzt das NTA für Kalzium eine unnötig große Anzahl an Carboxylgruppen. Für die 106pm großen Kalziumionen (Radius) besitzt das NTA nicht die optimale Konfiguration. Kleinere Metallionen wie Eisen(II) oder (III), Nickel(II) oder Platin könnten vermutlich wesentlich besser mit dem NTA Derivat wechselwirken.

Tabelle 5. Die drei carbonylmodifizierten Fasern und die von ihnen absorbierte Menge an Kalziumionen.

| Fasern modifiziert mit | Pentinsäure | NTA-Derivat | Asp ₆ |
|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Kalzium gebunden [mol] | 6,659998 10 ⁻⁷ | 3,22516 10 ⁻⁷ | 8,13059 10 ⁻⁷ |
| Konzentration d. Fasern [g/L] | 0,3 | 0,0999 | 0,082 |
| M eines Liganden [g/mol] | 5448,62 | 5710,8 | 6777,2 |
| Ca ²⁺ / Molekül | 0,4838 | 0,7375 | 2,6879 |
| Ca ²⁺ / funktioneller Gruppe | 0,2419 | 0,1229 | 0,224 |

Diese Werte der funktionalisierten Fasern können mit denen anderer Carbonsäure-Polymere, wie z. B. Polyacrylsäure (PAA) verglichen werden. So bindet PAA pro 71 Carbonylgruppen 15 Kalziumionen. Das entspricht 0,21 Kalziumionen je Carbonylgruppe.^[158]

Mit 0,224 Kalziumionen je Carbonylgruppe bindet **VII** etwas mehr, als das lineare Analogon PAA. Die Pentinsäure modifizierte Faser weist mit 0,24 Kalziumionen je Carbonylgruppe eine noch bessere Bindung auf. Das NTA-Derivat bindet im Vergleich zu PAA mit 0,12 Kalziumionen je Carbonsäurefunktion deutlich schlechter.

Weitere Studien zur Beeinflussung der Morphologie von Kalziumcarbonat (ACC) durch die Fasern **V** und **VII**, werden aktuell durchgeführt. Die Fasern **VII**, scheinen hauptsächlich das kinetisch stabile Vaterit zu bilden. Darauf deuten erste IR, SEM und WAXS Messungen hin (Abbildung 30). Die Abbildungen der SEM Messungen zeigen runde und linsenförmige Kalziumcarbonatkristalle, das entspricht der Form typischer Vateritkristalle.^[159] Die Kristalle sind polydispers verteilt. Zwischen den Kristallen sieht man vereinzelt Stäbchenartige Gebilde. Bisher konnte nicht festgestellt werden, worum es sich dabei handelt. Möglicherweise sind das Aragonitkristalle oder kalziumummantelte Fasern.

Das IR Spektrum zeigt einen Peak bei 743 nm, diese Schwingungsbande ist typisch für Vaterit.^[160] Das IR Signal bei 703 nm kann nicht zugeordnet werden. Sowohl Calcit als auch Aragonit konnten durch die IR Spektroskopie nicht nachgewiesen werden, beide besitzen eine Schwingungsbande bei 713 nm. Es kann festgehalten werden, dass der Hauptbestandteil des gebildeten Kalziumcarbonat in der Faserlösung **VII** aus dem kinetisch stabilem Polymorph Vaterit besteht. Dies ist insofern bemerkenswert, da in Anwesenheit von Polyasparaginsäure Calcit entsteht. Die funktionale Oberfläche der Fasern besteht auch aus Asparaginsäure, aber die Ausrichtung und höhere Dichte an Funktionalen Gruppen in **VII** scheinen die Bildung von Vaterit zu unterstützen. Durch die Ausrichtung entlang der Faser weisen die funktionellen Gruppen der Asparaginsäure eine andere Wechselwirkung mit dem Kalziumcarbonat auf.

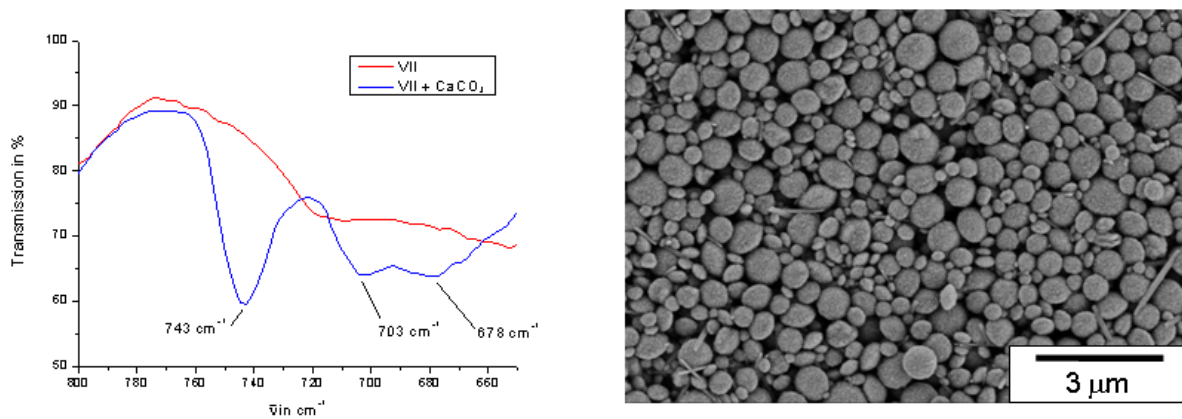


Abbildung 30. IR Spektroskopie (links) und SEM Aufnahmen (rechts) der Kalziumcarbonatkristalle, die in der Faserlösung von **VII** nucleiert worden sind. Im IR Spektrum ist das Spektrum von **VII** (rot) und von den Kalziumcarbonat mit **VII** (blau) dargestellt.

Weiterhin wurde ein Histidin-Hexapeptid an die Fasern geklickt. Hier musste ein Überschuss an Kupferionen verwendet werden, um eine ausreichende Konzentration an freien

Kupferionen zu gewährleisten. Nach der Klick Reaktion wurde mittels Dialyse aufgereinigt. Dabei konnte durch Zusatz von Triäthyltetraamin (TREN) das Kupfer simultan mit der Dialyse entfernt werden. Die Ergebnisse der MALDI-TOF und der IR Spektroskopie zeigten eine unvollständige Kupplung der funktionellen Gruppen (antisymmetrische Valenzschwingung des Azides noch vorhanden, sowie zwei Massenverteilungen von unvollständig und vollständig umgesetztem Gruppen). Obwohl das Kupfersulfat schon mit großen Überschüssen von 5 Äquivalenten eingesetzt wurde scheint das Histidin das Kupfer zu komplexieren. Daher wurde ein weiterer Versuch unternommen, bei dem TBTA als Kupferligand eingesetzt wurde. Der Umsatz konnte laut IR verbessert werden, dennoch war es nicht möglich, alle Azidgruppen mit dem Histidin-Hexapeptid zu modifizieren. anhand dieser Daten wird deutlich, dass die Umsetzung der Fasern mit metallionenkomplicierenden Alkinen unvollständig verläuft.

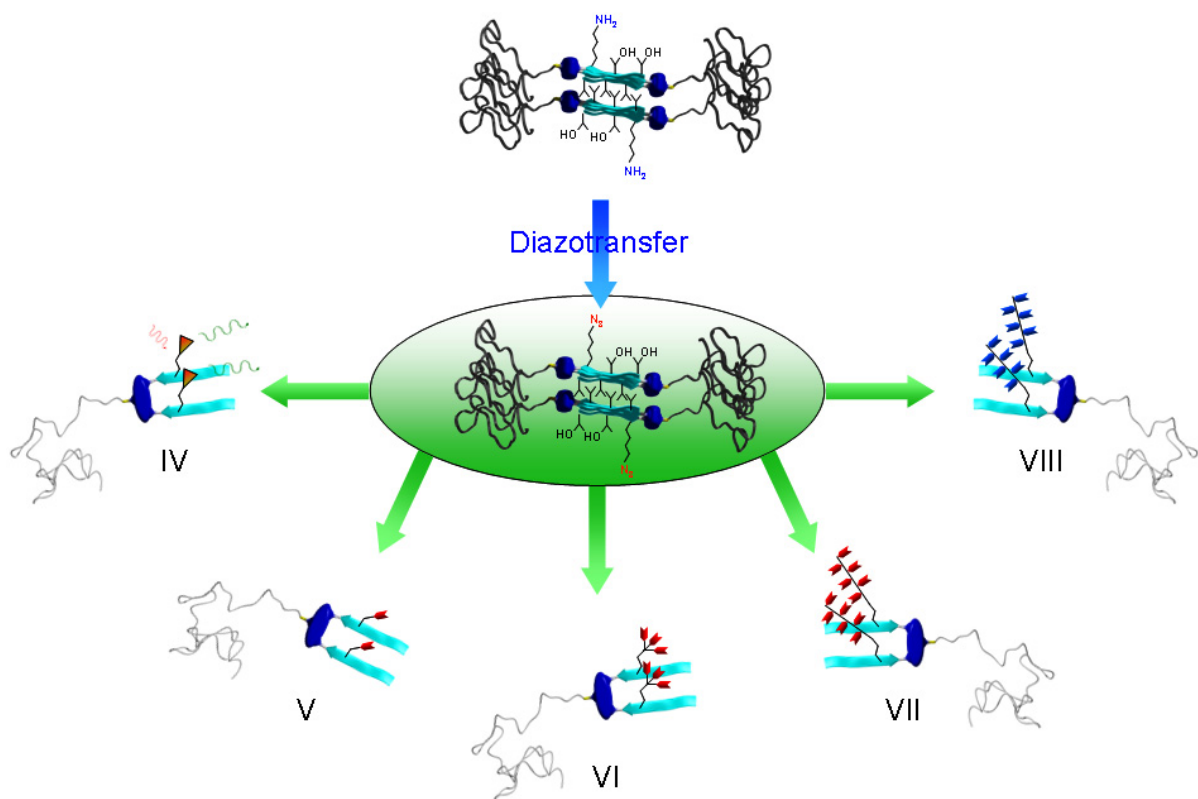


Abbildung 31. Dargestellt sind einige Modifikationen an den azidfunktionalisierten Polymer-Peptid-Fasern.

Um Metallionen an den Fasern zu binden und dort zu reduzieren gibt, es prinzipiell 2 Wege. Ein Weg ist die Bindung über funktionelle Gruppen und die Reduzierung durch die Zugabe reduzierender Reagenzien. Eine weitere Möglichkeit ist die Reduzierung an der Faser durch

Zuckermoleküle. Daher wurden die azidfunktionalisierten Fasern (**III**) mit einem alkinfunktionalisierten Zucker (alkinmodifizierte Galactose) umgesetzt. Unter diesen Bedingungen ist ein Überschuss an Kupferionen nachteilig, da der Zucker diese reduzieren würde und dann in oxidierten Form vorläge. Daher wurden nur 10mol % Kupfer verwendet. Um die Reaktion zu beschleunigen wurden 10mol % TBTA (siehe Kapitel 2.5) zugesetzt. TBTA erhöht die Reaktivität des Kupfers und schützt es zugleich vor ungewollter Komplexierung durch die Edukte.

Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde etwas TREN dazugegeben und gegen Wasser dialysiert. Das galactosefunktionalisierte Polymer-Peptid-Systeme (**IX**) wurden gefriergetrocknet und mittels MALDI, NMR und IR untersucht.

Das IR-Spektrum von **IX** zeigt bei $\nu = 2098 \text{ cm}^{-1}$ eine schwache Bande an, der Zucker konnte demzufolge größtenteils quantitativ an die Fasern angebracht werden (Abbildung 32).

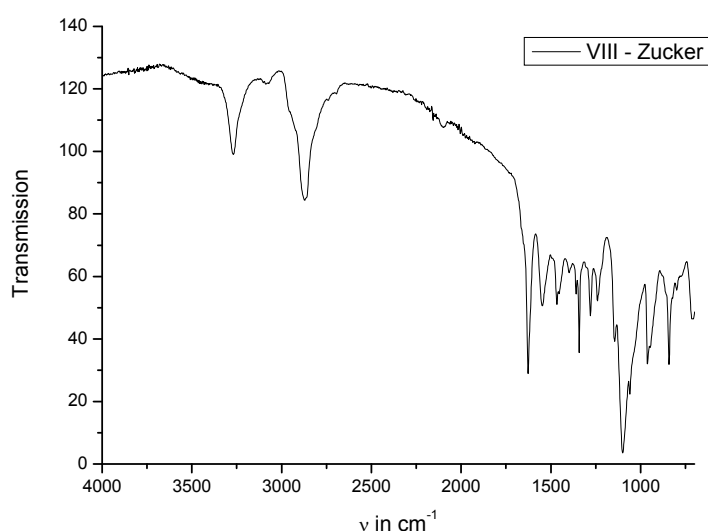


Abbildung 32. Das IR Spektrum des galaktosefunktionalisierten Polymer-Peptid-Systems.

Analog zu der von *Gramlich* und *Carell* beschriebenen Silberionenabscheidung an DNA^[161] können an den galaktosefunktionalisierten Fasern Silberionen abgeschieden werden. Dies geschieht in weiterführenden Schritten mit Tollens Reagenz. Mit der in der Schwarz-Weiss-Photographie verwendeten Entwicklerlösung können aus diesen Silber(0) Keimen dann Silberdrähten hergestellt werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit präsentiert einen modularen Ansatz zur Erzeugung von Polymer-Peptid-Fasern mit variablen Oberflächenfunktionen. Um Struktur-Wirkungsbeziehungen in biologischen und synthetischen Materialien verstehen und beeinflussen zu können, ist die gezielte Modifikation der Komponenten von großer Bedeutung. Ausgehend von azidfunktionalisierten Fasern gelang es die aggregierten Polymer-Peptid-Systeme mit verschiedenen Eigenschaften zu versehen. Die angewandte Methode war dabei die 1,3-dipolaren Addition. Diese Reaktion beschreibt die konzertierte Umlagerung eines Azides mit einem Alkin, sie ist in den meisten Lösungsmitteln unter hohen Ausbeuten durchführbar. Unter Nutzung einer Diazotransfer Reaktion konnten die benötigten Azidfunktionen an den Faserstrukturen generiert werden. Sämtliche Reaktionsbedingungen mussten dabei an die Fasereigenschaften angepasst werden, um die Polymer-Peptid-Fasern nicht zu zerstören.

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde daher der kupferkatalysierte Diazotransfer mit Imidazolsulfonylazid Hydrochlorid untersucht. Dazu erfolgte die Übertragung der literaturbekannten Diazotierung von einzelnen Aminosäuren auf das Modellpeptid GRGDS. Der Diazotransfer erfolgte am Aminende dieses vollgeschützten Modellpeptids. Es konnte gezeigt werden, dass der Diazotransfer in Methanol innerhalb von 10-16 Stunden quantitativ (>99 %) abläuft.

Da stabile Polymer-Peptid-Fasern nur in Wasser ausgebildet worden, musste der Diazotransfer an dieses Lösungsmittel angepasst werden. Als Modellsystem diente das um zwei Aminosäuren verlängerte Trripticin. Dieser Diazotransfer konnte an der ϵ -Aminfunktion der Lysin Seitenkette in Wasser, unter Anwesenheit verschiedener funktioneller Gruppen, durchgeführt werden. Allerdings musste dazu ein Überschuss an Kupferionen verwendet werden, weil katalytische Mengen Kupfer durch das Trripticin komplexiert wurden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Diazotransfer auch an einem anderen biologischen Makromolekül, dem Chitosan, durchführbar ist. Die kupferkatalysierte Azideinführung führte dabei zur Verringerung der Molekülgröße des Chitosans. Die kupferfreie Diazotierung des Chitosans konnte hingegen ohne eine Abnahme der Molekülgröße durchgeführt werden. Der Diazotransfer an Chitosan eröffnet die Möglichkeit, die Azidgruppen mit UV Licht zu Nitrenen umzusetzen. Diese Nitrene reagieren miteinander und vernetzen sich dabei. So wäre es möglich, die Eigenschaften von Chitosan, z. B. nach

dem Elektrosponnen, zu verändern. Weiterhin kann der Diazotransfer an primären Aminen, von Biomolekülen, genutzt werden, um Azide für die 1,3-dipolare Addition zu erzeugen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Diazotransfer an den Fasern von Polymer-Peptid-Konjugaten durchgeführt. An den daraus resultierenden, azidfunktionalisierten Fasern konnte mittels 1,3-dipolarer Addition eine Vielzahl funktioneller Gruppen eingeführt werden. Um den Diazotransfer durchzuführen, sind Aminfunktionen in der Seitenkette des Polymer-Peptid-Systems Voraussetzung. Das templatvororganisierte, literaturbekannte (VT)₂-Strukturbildungsmotiv wurde deshalb um die Aminosäuren Lysin und Valin erweitert. Diese aminfunktionalisierten Polymer-Peptid-Systeme bilden Fasern aus, die auf dem Organisationsmotiv einer β -Faltblattstruktur basieren. Mit Hilfe der Diazotierung konnten die Aminfunktionen der Fasern in Azide überführt werden. Nach der Einführung der Azidgruppe bestätigte sich die Stabilität der β -Faltblattstruktur durch eine CD-Messung. AFM und TEM Messungen ermöglichten die Abbildung der Fasern.

Diese azidfunktionalisierten Polymer-Peptid-Fasern dienten als Grundbausteine für den modularen Ansatz. Es konnte demonstriert werden, dass verschiedene alkinfunktionale Moleküle mittels der 1,3-dipolaren Addition an die Azidfunktionen der Fasern gebunden werden konnten. Die quantitative Umsetzung der Azidgruppen ließ sich dabei über die IR-Spektroskopie verfolgen. Zur Visualisierung der Fasern wurde ein Fluoreszenzfarbstoff, mittels der 1,3-dipolaren Addition, an die Fasern gebracht. Mit konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie gelang, zusätzlich zu den AFM und TEM Aufnahmen, die Visualisierung dieser Fasern. Diese Fasern könnten in biologischen und synthetischen Systemen Verwendung finden, um z. B. Stofftransporte oder Anreicherungen optisch zu bestimmen.

Eine Vielzahl von Modifikationen konnte an den azidfunktionalisierten Polymer-Peptid-Fasern durchgeführt werden. Es wurden drei Moleküle mit Carbonsäurefunktionen an die Fasern angebracht und ihre Kalziumbindung untersucht. Die Anzahl der, an den Fasern gebundenen Kalziumionen variierte in Abhängigkeit der Carbonsäuregruppen.

Weiterhin wurde ein reduzierender Zucker an den Fasern angebracht. Im Folgenden könnte der fasergebundene Zucker genutzt werden, um Silberionen an den Fasern zu reduzieren und so Silberdrähte in Nanogröße zu erzeugen.

In weiterführenden Forschungen könnten zusätzliche Moleküle an die Fasern angebracht werden, um deren Eigenschaften an die jeweiligen Anforderungen anzupassen. So könnte z. B. die Anbringung von Dienen und deren anschließende Polymerisation die Polymer-Peptid-Fasern stabilisieren.

7. Anhang

7.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften

Kaiser-Test^[162]

Das zu analysierende Harz wurde mehrfach mit NMP und DCM, anschließend mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die verwendeten Lösungen (A, B und C) wurden wie in der Literatur beschrieben hergestellt:

Lösung A besteht aus 80mg Phenol in 20mL Ethanol,

Lösung B aus 0,001M KCN in 100mL Pyridin

Lösung C aus 500mg Ninhydrin in 10 mL Ethanol.

Das gut getrocknete Harz wurde in ein Reagenzglas überführt und mit jeweils 2 Tropfen der Lösungen A-C versetzt. Das Gemisch wurde 5 Minuten auf 80°C erhitzt, dabei wurde alle 30 Sekunden die Färbung des Harzes überprüft. Wenn sich das Harz blau färbt, ist dies ein Indiz für freie Aminfunktionalitäten am Harz.

Peptidsynthese:

Alle Reagenzien und Aminosäuren wurden vor der Reaktion im Vakuum (Exsikkator) getrocknet. Die Aminosäuren wurden bei Iris Biotech gekauft und direkt verwendet.

Diisopropylamin (DIPEA, Acros) wurde fraktioniert destilliert und bis zur Verwendung vor Licht geschützt und gekühlt (4°C) aufbewahrt.

N-Methylpyrrolidon (NMP, BASF) wurde Chromatographisch über Aluminiumoxid (sauerneutral-basisch), sowie Kieselgel filtriert. N,N-Dimethylformamid (DMF) wurde auf gleiche Art gesäult. Dichlormethan (DCM) wurde mit Calciumhydrid unter Rückfluß gekocht und frisch verwendet. Piperidin und Trifluoressigsäure (TFA) wurden bei Acros bezogen und nicht weiter aufgearbeitet.

1-Benzotriazoloxyltris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP, NovaBiochem), 7-azabenzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat (PyAOP, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) und 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU, IrisBiotech) wurden im Tiefkühlschrank gelagert.

Synthese der Polymer-Peptid-Konjugate

Die Synthese des 3,6-Bis(N-tert.-Butyloxycarbonyl-3-aminopropyl)-carbozol-9-essigsäure-ethylester-tert.-butylester (Boc-Templat) wurde wie bereits in der Literatur beschrieben hergestellt.^[4]

Standart Protokoll für Beladung von TentaGel PAP-Harz (Templat-PEO)

Das TentaGel PAP Harz wurde von Rapp Polymere in Tübingen bezogen. Die Beladung des Harzes betrug 0,22 mmol/g. Es wurden 1,2 Äq des Boc-Templat und 2,4 Äq. PyAOP getrennt voneinander in so wenig DMF gelöst, wie möglich. Dann wurden die beiden Komponenten vermischt und mit 4,8 Äq. DIPEA versetzt. Dabei konnte eine Gelbfärbung der Lösung beobachtet werden. Das aktivierte Boc-Templat wurde anschließend zu dem vorgequollenen Harz gegeben.

Nach vier Stunden schütteln wurde das Harz mit DMF und NMP gewaschen, um so die Reagenzien zu entfernen. Ein kleiner Teil wurde für den Kaiser Test entnommen und mit DCM und Diethylether gewaschen und getrocknet. Wenn der Kaiser Test freie Amingruppen anzeigte, wurde die oben beschriebene Kupplung an dem restlichen Harz wiederholt, bis keine freien Amin Gruppen mehr nachgewiesen werden konnten. Die Kupplung war meist nach dem zweiten oder dritten Zyklus vollständig.

Das Harz wurde gründlich mit DMF, DCM und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Abspaltung der Boc Gruppen erfolgte mit 30 % TFA in DCM (v/v) für 30 Minuten. Das Harz wurde durch waschen mit DCM und einer DIPEA Lösung neutralisiert und noch mal gründlich mit DCM und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ein Kaiser Test zeigte freie Amingruppen an.

7.2. Experimenteller Teil:

Herstellung des vollgeschützten Peptides GRGDS

An einem 2-Chlortritylharz wurde die Sequenz GRGDS mittels Standard Fmoc SPPS aufgebaut. Das Peptid wurde zwei Stunden mit 30 % TFE/ DCM abgespalten, in Ether ausgefällt und aus Wasser/ Acetonitril (50 % v/v) gefriergetrocknet.

ESI-MS: (m/z in Da): $[M+H]^+ = 856$ (100 %, $M_{\text{theor.}} = 855$);

$[M+Na]^+ = 878$ (8 %, $M_{\text{theor.}} = 878$);

$[2M+H]^+ = 1711$ (10 %, $M_{\text{theor.}} = 1711$).

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 2978(w), 2937(w), 2875(w), 1724(m), 1660(s), 1541(s), 1456(w), 1408(w), 1369(m), 1250(s), 1155(s), 1103(s), 995(w), 910(w), 850(w), 810(w), 785(w), 734(w), 667(s)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = 1,05$ (s, 9H $^t\text{Bu(S)}$), 1,37 (s, 9H, $^t\text{Bu(D)}$), 1,41 (s, 6H, Me (Pbf)), 1,53+1,73 (m, 2H, $\beta+\gamma$ -Arg), 2,0 (s, 3H; Me (Pbf)), 2,48 (s, 6H, Me (Pbf)), 2,68 (dd, 1H, β -Asp), 3,01 (m, 1H, β -Asp), 2,96 (s, 2H, δ -Arg), 3,47+3,58 (s, 2H, β -Ser), 3,68-,3,86 (s, 3H, α -Gly + α -Arg), 4,34 (s, 1H, α -Ser), 4,50 (m, 1H, α -Asp), 6,95 (s, 1H, NH), 7,47 (s, 1H, NH), 7,86 (s, 1H, NH), 8,06 (s, 1H, NH), 8,49 (s, 2H, NH)

Diazotierung des vollgeschützten Peptides GRGDS

Das vollgeschützte GRGDS wurde in Methanol/ Wasser (50 % v/v) zusammen mit 2,6 Äq. Kaliumcarbonat, 0,1 Äq. Kupfersulfat gelöst. Nach Zugabe von 1,3 Äq. Imidazolsulfonylazid Hydrochlorid wurde 18 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingengt, in Diethylether ausgefällt und aus Acetonitril/ Wasser gefriergetrocknet. Das hellblaue Pulver wurde zur Abtrennung des Kupfers in Methanol/ Wasser gelöst und über DOWEX Ionenaustauscherharz vier Stunden geschüttelt, abdekantiert und erneut gefriergetrocknet. Das gewonnene farblose Pulver wurde dann mit ESI-MS und IR Spektroskopie untersucht. Das Massenspektrum zeigt Signale mit m/z 882, 904 und 919. Dies entspricht den Protonen, Natrium und Kaliumaddukten des azidfunktionalisierten GRGDS.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 2978(w), 2937(w), 2875(w), 2108 (m), 1724(m), 1660(s), 1541(s), 1456(w), 1408(w), 1369(m), 1250(s), 1155(s), 1103(s), 995(w), 910(w), 850(w), 810(w), 785(w), 734(w), 667(s)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = 1,1$ (s, 9H $^t\text{Bu(S)}$), 1,43 (s, 6H, Me (Pbf)), 1,46 (s, 9H, $^t\text{Bu(D)}$), 1,58+1,73 (m, 3H, $\beta+\gamma$ -Arg), 2,1 (s, 3H; Me (Pbf)), 2,48 (s, 6H, Me (Pbf)), 2,68 (d, 1H, β -Asp), 3,01 (m, 1H, β -Asp), 3,01(s, 2H, δ -Arg), 3,5+3,67 (m, 2H, β -Ser), 3,9 (s, 3H, 2 x α -Gly + α -Arg), 4,36 (s, 1H, α -Ser), 4,74 (m, 1H, α -Asp), 8,3 (br, NH)

Herstellung von Tritrpticin

Die Sequenz von Tritrpticin lautet: VRRFPWWPFLRR und wurde am Synthesizer gekuppelt. Das verwendete Harz war ein Tentagel SRam Harz, nach dem Abspalten liegt die Sequenz dadurch am Säureterminus als Amid vor.

Am N-Terminus wurde noch Glycin und Lysin gekuppelt, sowie acetyliert, so dass die endgültige Sequenz wie folgt aussah: Ac-GKVRFPWWPFLRR-CONH₂. Die Kupplung der ersten Aminosäuren wurde mittels leicht modifizierter Standard Fmoc-SPPS (Doppelkupplung, mit verlängerten Kupplungszeiten (30min/ Aminosäure)) realisiert. Ab der achten Aminosäure (erstes zu kuppelndes Thryptophan) wurden die Kupplungen schwierig (vorhergehende Experimente), daher wurde Dreifachkupplungen mit deutlich verlängerten Kupplungszeiten (45min/ je Aminosäure), sowie „Capping“ gearbeitet.

Das fertige Produkt wurde mit 95 % TFA (1 % TMBS, 4 % Wasser) für 2 Stunden abgespalten, das Lösungsmittel im Anschluß abgefiltert und eingengt, in Diethylether ausgefällt, getrocknet und lyophilisiert.

ESI-MS: Die im ESI-MS detektierten Ionenpeaks, beruhen auf mehrfachgeladenen Addukten. Deutlich erkennbar sind die Ionenpeaks von zwei-, drei- und vierfachgeladenen Protonenaddukten. Die einfach geladenen Peaks liegen nicht im Messbereich der ESI-MS ($[M_{\text{theor.}}] = 2128,58$):

$$[M+2H]^{2+} = 1065 \text{ (10 \%, theor. = 1065,3 Da)}$$

$$[M+3H]^{3+} = 711 \text{ (100 \%, theor. = 710,5 Da)}$$

$$[M+4H]^{4+} = 533 \text{ (82 \%, theor. = 533,1 Da)}$$

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3273(m), 3186(m), 2965(w), 2931(w), 2870(w), 1627(s), 1527(s), 1438(s), 1340 (w), 1246(m), 1109(s), 974 (w), 840(w), 740(s)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = 0,79-0,81$ (s, 12 H δ -Ile + γ -Val); 1,48+1,63 (m 16H, β + γ -Arg); 1,84 (s, 3H, Ac); 1,87 (m, 2H, β -Pro), 2,75 (s, 2H, β -Pro), 2,93+3,1 (ds, 13H, 2 \times ϵ -Lys+6 \times δ -Arg+4 β -Phe); 3,3 (s, 1H δ -Pro); 3,5 (s, 6H β -Trp); 3,8 (br. H₂O-Signal); 4,16+4,53 (s, 5H α -H); 4,52+4,57+4,67 (s, 3H α -H), 6,9(t), 7,0(s), 7,1 (s), 7,15(s?), 7,3(m), (32H)*; 7,44(s) + 7,5(s) (4H)*; 7,66(s, 3H)*; 7,8+7,9+8,0+8,1+8,22+8,28 (5-6H)*

*aromat. Signale (Trp +Phe) und Amid (NH) liegen übereinander, sind kaum getrennt integrierbar

Diazotransfer an Titrpticin

Es wurde 1Äq. Titrpticin mit 3Äq. Kupfersulfat**, 3,0 Äq Kaliumcarbonat, sowie 1,5 Äq. Diazotransferreagenz versetzt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt. Zur Aufreinigung wurde gegen Wasser dialysiert, über DOWEX Ionenaustauscher Harz geschüttelt und lyophilisiert.

**ein Versuch mit katalytischen Mengen an Kupfersulfat (0,3 Äq. ergab keinen Umsatz), das könnte durch die komplexierenden Eigenschaften des Titrpticins verursacht worden sein, daher wurde im Folgeversuch mit größeren Überschüssen an Kupfersulfat gearbeitet.

ESI-MS:

Die ESI-MS detektierte mehrere Ionenpeaks, die auf mehrfachgeladenen Addukten beruhen, die einfach geladenen Peaks liegen nicht im Messbereich der ESI-MS:

$$[M_{\text{theor.}}] = 2155,6;$$

$$[M+2H]^{2+} = 1078 \text{ (12 \% , theor. = 1078,3 Da)}$$

$$[M+3H]^{3+} = 719 \text{ (100 \% , theor. = 719,2 Da)}$$

$$[M+4H]^{4+} = 540 \text{ (75 \% , theor. = 539,6 Da)}$$

Reinheit laut HPLC-ESI-MS: über 99 %.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3284(m), 3197(w), 2949(w), 2875(w), 2100 (m), 1647(s), 1531(s), 1436(m), 1338 (w), 1201 (s), 1180(s), 1134 (s), 837(m)

1,3 Huisgen Cycloaddition von Propargylamin an Titrpticin

Es wurde 1Äq. Titrpticin mit 5 Äq. Kupfersulfat, 8 Äq Natriumascorbat, sowie 1,5 Äq. Propargylamin versetzt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt. Zur Aufreinigung wurde TREN zu der Lösung gegeben und gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

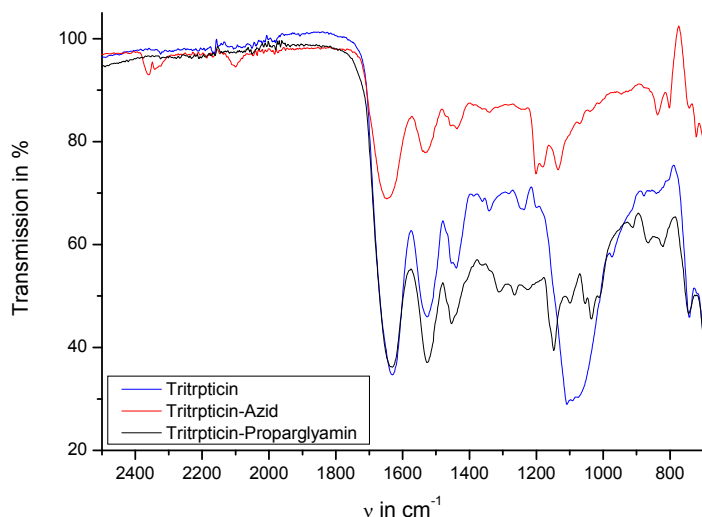


Abbildung 33. IR Spektren von Tritrpticin (blau), Tritrpticinazid (rot) sowie dem Tritrpticin mit „angeklicktem“ Propargylamin.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3284(m), 3197(w), 2949(w), 2875(w), 1647(s), 1531(s), 1436(m), 1338 (w), 1201 (s), 1180(s), 1134 (s), 837(m)

$M = 2209,66 \text{ g/mol}$

ESI-MS(m/z): 737 ($[\text{M}+3]^{3+}$ theor. = 737,55)

553 ($[\text{M}+4]^{4+}$ theor. = 553,41)

Herstellung von Chitosan HCl:

Das Chitosan wurde in Wasser gegeben und soviel HCl addiert, bis es vollständig gelöst was. Anschließend wurde in THF ausgefällt und zweimal aus Wasser gefriergetrocknet.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 2885 (m), 1624 (s), 1515 (s), 1419 (w), 1378 (m), 1312 (m), 1250 (w), 1152(s), 1066(s), 1033 (m), 897 (m), 668 (s)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , RT, in ppm):

$\delta = 1,94$ (0,H, s, Acetyl(3H)^x), 3,07 (1 H, m, CH-NH_2), 3,63+3,79 (5,0 H, br. m, $\text{CH-OH} + \text{CH}_2\text{-OH} + \text{CH(NH}_2\text{)-CH-O-CH}$), 4,77 (s, 1H, $\text{CH(NH}_2\text{)-CH-O-CH}$)

13±2 % Acetylschutzgruppen

^x bei vollst. Acetylierung

^{13}C -NMR: $\delta = 55,7$ ($\underline{\text{C}}\text{H-NH}_2$); $60,1$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$); $70,3$ ($\underline{\text{C}}\text{OH}$); $74,7$ ($\underline{\text{C}}(\text{OC})\text{CH}_2\text{OH}$); $75,4$; $76,1$; $76,8$ ($\text{C}(\text{NH}_2)\text{-CH-O-}\underline{\text{C}}$); $97,7$ ($\text{C}(\text{NH}_2)\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-O-C}$)

Chitosanazid (A1)

Zu einer Lösung von Chitosan Hydrochlorid (15 % Acetyliert) wurden 0,3 Äq. Kupfersulfat, 1,5 Äq. K_2CO_3 gegeben. Unter Rühren wurde 1 Äq. Imidazolsulfonylazid in 3 Portionen zu der Lösung gegeben und über Nacht rühren gelassen. Dann wurde 4 Tage dialysiert (MWCO 10.000 Da) um die Reagenzien zu entfernen. Nach der Gefriertrocknung lag das Chitosanazid vor. Mittels NMR konnte der Azid Gehalt auf 30 % bestimmt werden.

Durch GPC und AUZ Messungen wurde allerdings eine Abnahme des Gewichtsmittels (GPC) und des Sedimentationskoeffizienten (AUZ) von Chitosanazid (A1) festgestellt. Um den Diazotransfer unter Erhalt des Polymerisierungsgrades durchzuführen wurde die Reaktion unter Kupfer freien Bedingungen durchgeführt (siehe Chitosanazid (A2)).

Chitosanazid (A2)

Zu der Lösung von Chitosan Hydrochlorid wurden über 3 Tage 3 Äq. Imidazolsulfonylazid in kleinen Mengen dazugegeben. Im Anschluss wurde 4 Tage dialysiert (MWCO 10.000 Da) um überschüssige Reagenzien zu entfernen. Das Chitosanazid wurde durch Gefriertrocknung gewonnen und analysiert.

^1H -NMR (400 MHz, D_2O , RT, in ppm):

$\delta = 1,95$ (0,37 H, s, Acetyl (3H)^x), $3,07$ (0,91 H, m, $\underline{\text{C}}\text{H-NH}_2$), $3,63+3,79$ (5,09 H, br. m, $\underline{\text{C}}\text{H-OH} + \underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-OH} + \text{CH}(\text{NH}_2)\text{-}\underline{\text{C}}\text{H-O-CH}$), $4,76$ (s, 1H, $\text{CH}(\text{NH}_2)\text{-CH-O-}\underline{\text{C}}\text{H}$)

12 ± 2 % Acetylschutzgruppen

Aus der Abnahme des ($\underline{\text{C}}\text{H-NH}_2$) Signals kann der Umsatz zu Azid bestimmt werden.

Azidierungsgrad: 8 ± 1 % der Amingruppen wurden zu Azid umgesetzt.

^x bei vollst. Acetylierung

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 2878 (m), 2125 (s), 1629 (s), 1521 (s), 1417 (w), 1379 (m), 1264 (w), 1227 (m), 1250 (w), 1205(m), 1149(s), 1067(s), 1037 (s), 897 (m), 835 (m), 800(w), 746(s), 630 (s)

Tabelle 6 Gewichtsmittel und Sedimentationskoeffizient von Chitosan, Chitosanhydrochlorid und Chitosanazid (A1).

| | Chitosan | Chitosan HCl | Chitosanazid (A1) |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Gewichtsmittel (M_w) [g/mol] | $2,57 \cdot 10^5$ | $1,47 \cdot 10^5$ | $8,5 \cdot 10^3$ |
| Sedimentationskoeffizient [S] | n. b. | 1,5 | 0,9 |

*Die GPC Messung wurde in DMSO durchgeführt, die AUZ in Essigsäure/ Acetatpuffer (pH =4,75).

Die Diazotierung änderte den Polymerisierungsgrad nicht. Das konnte durch eine Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung (AUZ) nachgewiesen werden:

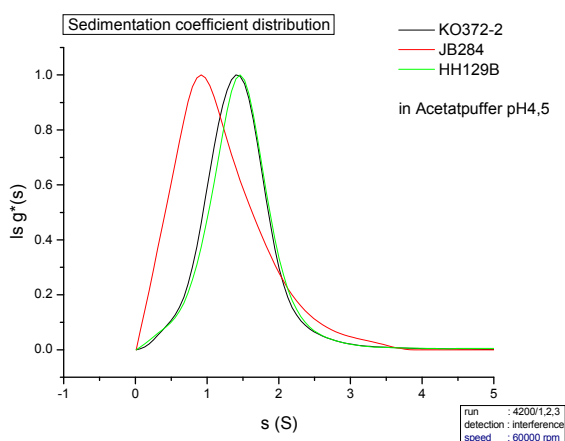


Abbildung 34. Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung von Chitosanhydrochlorid (schwarz), Chitosanazid (A1-rot) und Chitosanazid (A2-grün)

Die Sedimentationsgeschwindigkeitsmessung von Chitosanhydrochlorid (schwarz), Chitosanazid (A1) (rot) und (A2) (grün) dargestellt. Deutlich erkennbar der geringe Polymerisierungsgrad von Chitosanazid (A1) und die gleiche Sedimentationsgeschwindigkeit von A2 und dem Edukt Chitosanhydrochlorid.

Peptid Synthese am Templat ((DMG-TVTVKV)₂-Templat-PEO)

Das Templat beladene Harz wurde in einen SPPS Reaktor überführt. Die Aminosäuren wurden nach Standard-Fmoc-Protokollen gekuppelt. Da bekannt ist, dass Valin-Threonin-Sequenzen schon während der Synthese aggregieren^[163] wurde nach der Kupplung von Valin (V⁶) und Lysin (K⁵) und Valin (V⁴) eine Pseudoprolin Einheit bestehend aus Pseudoprolin (Fmoc-Val-Thr-(psi Me,Me pro)-OH) eingebaut. Alle Aminosäuren wurden automatisiert gekuppelt.

Im Anschluss wurde mittels Handkupplung im Glasreaktor Dimethylglycin (dmG) gekuppelt. Bei der Handkupplung wurden die Aminosäuren und Reagenzien in zehnfachem

Überschuss eingesetzt. Die Kupplung von DMG wurde zweimal wiederholt, bis der Kaiser Test keine freien Amin Gruppen mehr anzeigte. Das fertige Produkt wurde mit 99 % TFA (1 %TMSB) für 6 Stunden abgespalten, die TFA im Vakuum entfernt, den Feste Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und zweimal in Diethylether ausgefällt. Der Ether wurde abdekantiert, der Rückstand getrocknet und lyophilisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = 0,8$ (m, 36H, $\text{CH}_3\text{-Val}$), $1,0$ (d, 6H, $\text{CH}_3\text{-Thr}$), $1,05$ (d, 6H $\text{CH}_3\text{-Thr}$), $1,27$ (m, 4H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-Lys}$), $1,49$ (t, 6H, $\delta\text{-CH}_2\text{-Lys}$), $1,62$ (m, 1 H, $\beta\text{-CH}_2\text{-Lys}$), $1,72$ (m, 1H, $\beta\text{-CH}_2\text{-Lys}$), $1,76$ (t, 4H, $\text{CH}_2\text{-Templat}$), $1,9\text{-}2,0$ (m, 6H, $\beta\text{-CH-Val}$), $2,72$ (br, 4H, $\epsilon\text{-CH}_2\text{-Lys}$), $2,78$ (br, 12H, $\text{CH}_3\text{-dmG}$), $3,01$ (m, 2H, 4H, $\text{CH}_2\text{-Templat}$), $3,20$ (d, 4H $\text{CH}_2\text{-Templat}$), $3,49$ (s, 290H, PEO), $3,9\text{-}4,5$ (mm, 16H, $\alpha\text{-CH-Val/Thr/Lys} + \beta\text{-CH-Thr}$), $4,95$ (s, 2, $\text{CH}_2\text{-Carbazole}$), $7,22$ (d, 2H, $\text{CH-Templat aromat.}$), $7,38$ (d, 2H, $\text{CH-Templat aromat.}$), $7,65$ (m, 9H, NH), $7,88$ (s, 2H, $\text{CH-Templat aromat.}$), $7,91$ (d, 4H, NH), $8,07$ (t, 3H, NH), $8,64$ (d, 2H, NH)

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3273(s), 3086(w), 2960(w), 2874(s), 1788(w), 1672(m - Amin), 1627(s, Amid(I)), 1549(m - Amid (II)), 1466(m), 1456(w), 1400(w), 1359 (w), 1342(s), 1281(m), 1240 (w), 1201 (m), 1172(w), 1144(m), 1103 (s), 1062 (m), 962 (s), 946 (m), 841 (s), 799 (m), 719(m), 706(m), 667(s)

Die Abbildung 35 zeigt das MALDI-TOF-Spektrum des aminfunktionalisierten Templates. Man erkennt deutlich eine Verteilung mit Abständen von $44,05 \pm 0,5$, die einer Wiederholungseinheit des PEO entsprechen. Die Gesamtmasse des Polymer-Peptid-Konjugates errechnet sich aus den Fragmenten:

$$M^+ = n \cdot M_{[\text{Ethyleneoxid}]} + M_{[\text{Templat}]} + 2 \cdot M_{[\text{Peptid}]} + M_{[\text{Endgruppen}]} + M_{[\text{Gegenion}]}$$

Jede Wiederholungseinheit eines Ethylenoxides wiegt $M_{[\text{Ethylenoxid}]} = 44,04$ Da, mit der Masse des Templates ($M_{[\text{Templat}]} = 335,19$ Da), der Peptidketten ($2 \cdot M_{\text{Peptid}} = 2 \cdot 713,9$ Da), der Endgruppen (am PEO nur $\text{H} = 1$ Da), sowie des Gegenions $M_{[\text{Gegenion}]} = 39,1 = \text{Kalium}$. Für $n = 71$ Wiederholungseinheiten des PEO ergibt sich so:

$$M^+ = 71 \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot 713,9 + 1 + 39,1 = 4929,93 \text{ Da (exp.: } 4929,73 \text{ Da).}$$

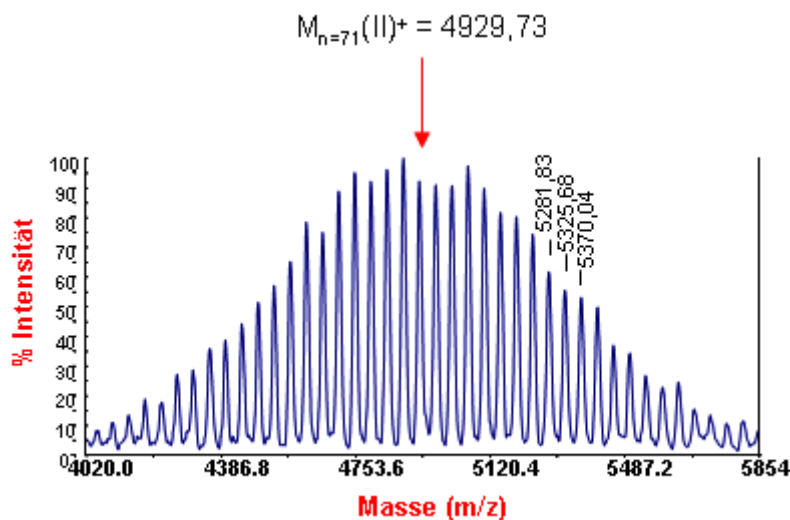


Abbildung 35. MALDI-TOF-MS von (II), deutlich zu sehen die Verteilung des Polymeranteils (PEO) von $\Delta M = 44$ Da.

Faserbildung aus ((DMG-TVTVKV)₂-Templat-PEO)

Der weiße Feststoff wurde mit reiner TFA für 30 Minuten denaturiert, die TFA am Rotationsverdampfer entfernt und in Methanol aufgenommen. Das Methanol wurde noch 2mal am Rotationsverdampfer entfernt, um die TFA möglichst vollständig zu entfernen. Dann wurde in soviel Methanol aufgenommen, dass eine Konzentration von 5 g/L eingestellt wurde und langsam nach Wasser (10 % je Tag) dialysiert (MWCO = 2000 Da). Die so erhaltenen Fasern konnten mit AFM, TEM und CD nachgewiesen werden.

Diazotransfer an Polymer-Peptid-Konjugat

Es wurde das ((DMG-TVTVKV)₂-Templat-PEO entweder in Wasser gelöst oder die fertigen Fasern bekannter Konzentration genommen. Zu dieser Lösung wurden 2,4 Äq. Kaliumcarbonat (K₂CO₃), 0,2 - 2 Äq Kupfersulfat (CuSO₄) und 2,4 Äq Diazotransferreagenz gegeben. Die Lösung wurde über Nacht schütteln gelassen.

Zur Aufreinigung wurde dialysiert und die überschüssigen Kupferionen mit DOWEX™ Ionenaustauscher Harz entfernt.

Ein kleiner Teil der Lösung wurde lyophilisiert, um die Substanz mit IR, NMR und MALDI-TOF zu charakterisieren.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3271(s), 3086(w), 2960(w), 2874(s), 2100(s –Azid), 1627(s, Amid(I)), 1548(m – Amid (II)), 1465(m), 1454(w), 1400(w), 1359 (w), 1342(s), 1278(m), 1240 (w), 1201 (w), 1145 (m), 1101 (s), 1061 (m), 962 (s), 946 (m), 881(w), 841 (s), 800(w), 799 (m), 711(m), 669(m)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = 0,79-0,83$ (m, 36H, $\text{CH}_3\text{-Val}$), 1,0 (d, 6H, $\text{CH}_3\text{-Thr}$, $J=5,99$ Hz), 1,05 (d, 6H, $\text{CH}_3\text{-Thr}$, $J = 5,77$ Hz), 1,28 (m, 4H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-Lys}$), 1,47 (t, 6H, $\delta\text{-CH}_2\text{-Lys}$, $J = 7,3$ Hz), 1,62 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2\text{-Lys}$), 1,76 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{-Templat}$), 1,9-1,98 (m, 6H, $\beta\text{-CH-Val}$), 2,67 (br, 12H, $\text{CH}_3\text{-dmG}$), 3,4 (m, 4H, $\epsilon\text{-CH}_2\text{-Lys}$), 3,22 (d, 4H $\text{CH}_2\text{-Templat}$), 3,49 (s, 290H, PEO), 3,66 (d, 2H, PEO-O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Gly-Templat}$), 3,94 (m, 4H, $\beta\text{-Thr}$), 4,1 (dt, 2H, $\alpha\text{-CH-Lys}$), 4,15-4,4 (mm, 10H, $\alpha\text{-CH-Val/Thr}$), 4,5 (t, 1H, NH), 4,83 (m, 1H, NH), 4,95 (s, 2, $\text{CH}_2\text{-Carbazol}$), 7,22 (d, 2H, $J = 8,04$ Hz, CH-Templat arom.), 7,37 (d, 2H, CH-Templat arom.), 7,63 (d, 2H NH, $J=8,77\text{Hz}$), 7,72 (d, 2H, NH, $J=8,62\text{Hz}$), 7,87 (s, 2H, CH-Templat arom.), 7,88 (d, 2H, NH), 7,91 (d, 2H, NH), 7,98-8,02 (m, 3H, NH), 8,3 (m, 1H, NH)

Die Abbildung 36 zeigt das MALDI-TOF-Spektrum des azidfunktionalisierten Templates. Man erkennt deutlich eine Verteilung mit Abständen von $44,05 \pm 0,5$, die einer Wiederholungseinheit des PEO entsprechen. Die Gesamtmasse des Polymer-Peptid-Konjugates errechnet sich aus den Fragmenten:

$$M^+ = n \cdot M_{[\text{Ethyleneoxid}]} + M_{[\text{Templat}]} + 2 \cdot M_{[\text{Peptid}]} + M_{[\text{Endgruppen}]} + M_{[\text{Gegenion}]}$$

Jede Wiederholungseinheit eines Ethylenoxides wiegt $M_{[\text{Ethylenoxid}]} = 44,04$ Da, mit der Masse des Templates ($M_{[\text{Templat}]}=335,19$ Da), der Peptidketten^(a) ($2 \cdot M_{\text{Peptid}}=2 \cdot 739,9$ Da), der Endgruppen (am PEO nur $H = 1$ Da), sowie des Gegenions $M_{[\text{Gegenion}]} = 39,1 = \text{Kalium}$. Für $n = 71$ Wiederholungseinheiten des PEO ergibt sich so:

$$M^+ = 71 \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot 739,9^{(a)} + 1 + 39,1 = 4981,93 \text{ Da (exp.: 4981,53 Da)}.$$

^(a) Der Unterschied in der Masse von (III) im Vergleich zu (II) liegt im Peptidteil. Jeder Peptidarm wiegt 26 Da mehr (Summenformel $+2N - 2H$). Wird die Masse von **II** (siehe oben) mit dieser Differenz verrechnet ($4929,73 \text{ Da} + 2 \cdot 26,1 \text{ Da}$), so ergibt sich für **III**: 4981,93 Da.

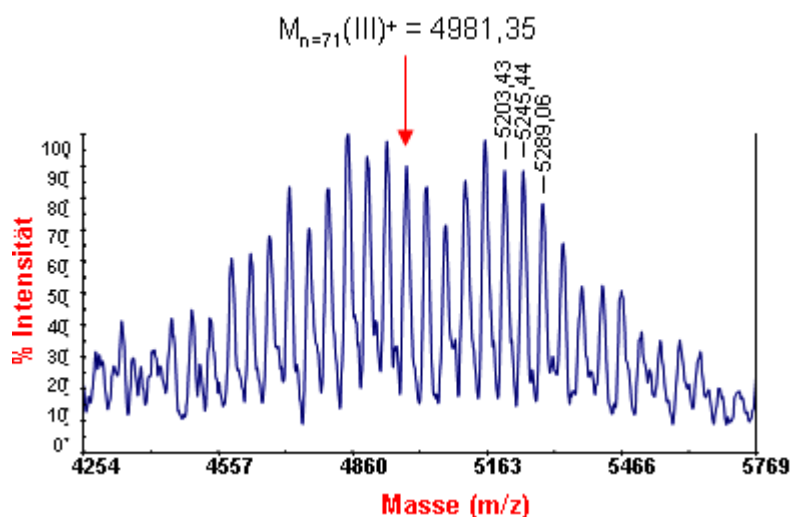


Abbildung 36 MALDI-TOF-Spektrum von (III), die Verteilung entsteht durch den Polymeranteil (PEO) und beträgt $\Delta M = 44$ Da.

Ein AFM der Produktlösung bestätigt die Stabilität der Fasern unter den Reaktionsbedingungen:

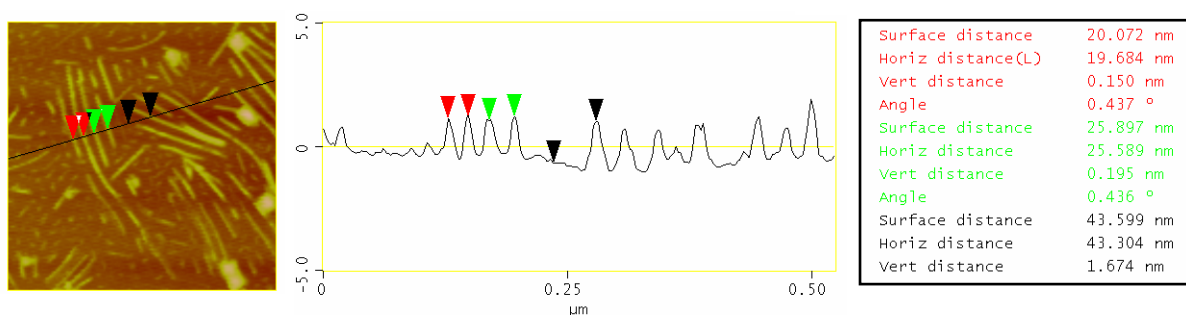


Abbildung 37. AFM Aufnahme und Querschnitt durch die azidfunktionalisierten Fasern

Herstellung von Alkin funktionalisiertem Fluoresceine

Unter Schutzgas wurden 1 Äq Fluoresceinthioisocyanat (FTIC) in Wasser gelöst 1,05 Äq Propargylamin dazugegeben. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionslösung an der Vakuumlinie gefriergetrocknet. Der so erhaltene Feststoff wurde mit IR, NMR und ESI-MS charakterisiert.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 2989 (w), 2902(w), 1743(m), 1737(s), 1575(s), 1460(s), 1382(m), 1309(s), 1242(m), 1205(s), 1172(w), 1107(s), 1041(w), 910(s), 846(s), 760 (m), 667 (w), 628 (w)

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = (2,3 \text{ (s, 1H)}; 3,24 \text{ (d, 2H)}, 5,25, 5,29 \text{ (2 H NH)}, 6,52 \text{ (d, 1H)}, 6,40 \text{ (d 2H)}, 6,56 \text{ (s 2H)}, 6,59 \text{ (s 1H)}, 6,64 \text{ (d, 2H)}, 7,14 \text{ (s 1H)}, 7,71 \text{ (d, 1H)})$

$^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = (30,8, 68,2, 72,8, 74,1, 102,5, 103,3; 110,3, 113,0; 124,7; 125,5; 127,6; 129,5; 145,5; 147,6, 152,4; 159,9; 169,1)$

Das MS-Spektrum zeigte nur den Quasimolekülpeak $[\text{M}+\text{H}]^+$: ($M_{\text{theor.}} = 444,4 \text{ g/mol}$; $M_{\text{exp}} = 445 \text{ g/mol}$).

Klicken an dem Polymer-Peptid-Konjugat

Zu der Lösung der azidfunktionalisierten Fasern wurden unter Argon Schutzgas 2 Äq Kupfersulfat, 2,2 Äq des alkinfunktionalisierten Farbstoffs gegeben. Zu dieser langsam geschüttelten Lösung wurden 5 Äq Natriumascorbat (NaAsc) gegeben. Unter Schutzgas wurde über Nacht geschüttelt und dann mittels Dialyse und DOWEX Ionenaustauscher Harz die Reagenzien entfernt. Ein MALDI-TOF-MS detektierte keine Ionen. IR und AFM Messungen werden nachfolgend abgebildet.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3269(s), 3086(w), 2961(w), 2872(s), 1749(m), 1627(s, Amid(I)), 1612(w), 1572(m), 1548(w – Amid (II)), 1506(w), 1460(m), 1386 (m), 1321(s), 1250 (w), 1203 (m), 1168(w), 1103 (s), 1062 (w), 1040(m), 995(w), 950 (m), 914(w), 846 (s), 829(w), 819(w), 800(w), 717(m), 690(w), 671(w), 663(w), 646(w), 624(w), 617(w)

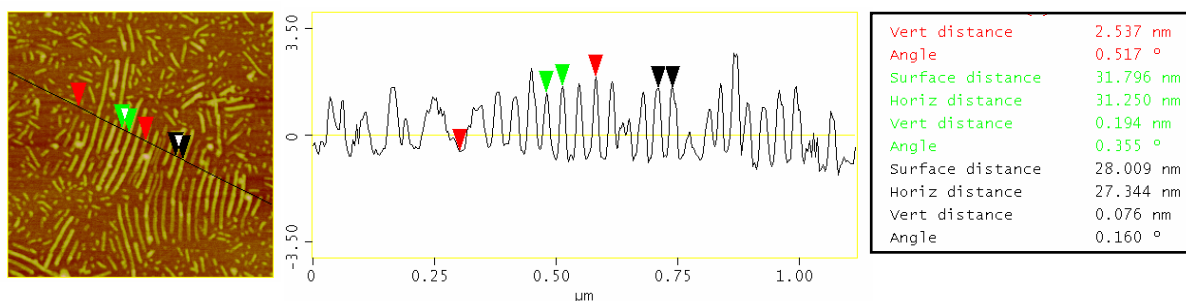


Abbildung 38. repräsentativer Querschnitt durch IV, Höhe: (rot): 2,45 nm; Breite 1 (grün): 31,3 nm; Breite 2 (schwarz): 27,3 nm

Herstellung pentinsäurefunktionalisierter Fasern (V)

Zu der Lösung der azidfunktionalisierten Fasern wurden unter Argon Schutzgas 2,5 Äq Kupfersulfat, 1,6 Äq Pentinsäure gegeben. Zu dieser langsam gerührten Lösung wurden 4 Äq Natriumascorbat (NaAsc) gegeben. Die Lösung war zu Beginn blau gefärbt, nach Zugabe von Natriumascorbat wurde die Lösung gelb und durchsichtig. Unter Schutzgas wurde über Nacht gerührt und dann durch Zusatz von TREN und Dialyse gegen Wasser die Reagenzien entfernt. Das Produkt wurde mit IR und MALDI-TOF und NMR charakterisiert.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 1722(s – Amid(I)), 1625 (s), 1549(s – Amid(II)), 1466(s), 1454(s), 1398(m), 1357(m), 1342(s), 1303(w), 1278(m), 1240 (s), 1143 (w), 1097(s - PEO), 1058(m), 960(s), 840(s), 711(m)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = 0,78\text{-}0,86$ (m, 36H, $\text{CH}_3\text{-Val}$), 1,0 (d, 6H, $\text{CH}_3\text{-Thr}$, $J=5,99$ Hz), 1,05 (d, 6H, $\text{CH}_3\text{-Thr}$, $J = 5,77$ Hz), 1,22 (m, 3H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-Lys}$), 1,49 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2\text{-Lys}$), 1,62 (m, 1 H), 1,75 (t, 6H, $\delta\text{-CH}_2\text{-Lys}$, $J = 7,3$ Hz), 1,89-1,99 (m, 6H, $\beta\text{-CH-Val}$), 2,70* (t, ~2H, $\beta\text{-Pentins.}$) 2,77* (s, ~12H, $\text{CH}_3\text{-dmG}$), 2,08 (m, ~2H, $\beta\text{-Pentins.}$), 3,0 +3,15 (m, 2+2H, $\gamma\text{-Pentins.}$), 3,39 (d, 4H $\text{CH}_2\text{-Templat}$), 3,49 (s, br, 290H, PEO), 3,66 (t, 2H), 3,93-3,97 (m, 8H, $\beta\text{-Thr} + 4\text{H, } \epsilon\text{-Lys}$)*, 4,09 (dt, 2H, $\alpha\text{-CH-Lys}$), 4,19-4,4 (mm, 10H, $\alpha\text{-CH-Val/Thr}$), 4,85 (m, 1H, NH), 4,93 (s, 2, $\text{CH}_2\text{-Carbazol}$), 7,22 (d, 2H, $J = 8,04$ Hz, $\text{CH-Templat aromat.}$), 7,37 (d, 2H, $\text{CH-Templat aromat.}$), 7,62 (d, 2H NH, $J=8,77\text{Hz}$), 7,71 (d, 2H, NH, $J=8,62\text{Hz}$), 7,75 (s, 2H, Triazol), 7,86* (s, ~2H, $\text{CH-Templat aromat.}$), 7,87* (d, ~2H, NH), 8,03 (d, 2H, NH), 8,3 (m, 1H, NH), 8,6 (d, 2H, NH)

*können nicht getrennt integriert werden

Die Masse von V berechnet sich aus folgenden Anteilen: Der Masse des PEO ($M_{[\text{PEO}]}$), der Masse des Templates ($M_{[\text{Templat}]}$), der Masse der Peptidarme ($M_{[\text{Peptid}]}$), der Endgruppe ($M_{[\text{Endgruppe}]}$), sowie des Gegenions ($M_{[\text{Gegenion}]}$). Es ergibt sich daraus:

$$M_{(n)}^+ = n \cdot M_{[\text{Ethylenoxid}]} + M_{[\text{Templat}]} + 2 \cdot M_{[\text{Peptid}]} + M_{[\text{Endgruppen}]} + M_{[\text{Gegenion}]}$$

Jede Wiederholungseinheit eines Ethylenoxides wiegt $M_{[\text{Ethylenoxid}]} = 44,04$ Da. Mit der Masse des Templates ($M_{[\text{Templat}]} = 335,19$ Da), der Endgruppen (am PEO nur $\text{H} = 1$ Da), sowie des Gegenions $M_{[\text{Gegenion}]} = 22,99$ Da (Kalium) ergibt sich:

$$M_{(n)}^+ = n \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot M_{[\text{Peptid}]} + 39,1 + 1 \text{ [Da]}$$

Das Polymer-Peptid-Konjugat besteht aus zwei analogen Peptidketten an die je ein Pentinsäuremolekül mittels 1,3-dipolarer Addition angebracht wurde, für jede Peptidkette von **V** ergibt sich daher $M_{\text{Peptid}} = 739,19 \text{ Da} + 98,10 \text{ Da} = 837,29$. Mit $n = 70$ Wiederholungseinheiten des PEO folgt daraus:

$$M(\text{IX})^+ = 70 \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot 837,29 + 1 + 22,99 = 5116,56 \text{ Da (exp: 5116,76 Da)}$$

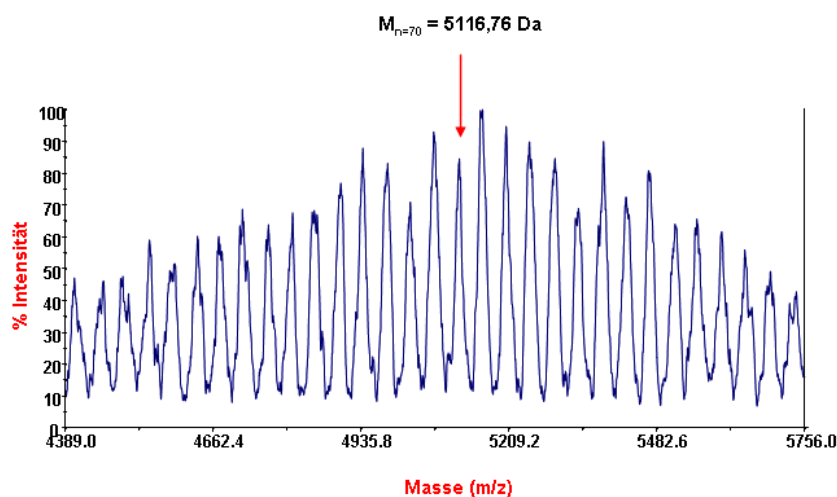


Abbildung 39. MALDI-TOF-MS von **V** in der ACHC als Matrix.

Herstellung NTA-Alkin

Zu einer Lösung von Propargylglycin wurden unter Schutzgas 4Äq. ^tBu-Bromacetat und 10Äq. DIPEA gegeben. Bei 55°C wurde die Lösung für 17 Stunden gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung eingengt und mit Cyclohexan: Ethylacetat (3:1) vermischt. Der entstandene Brei wurde abfiltriert und 3 mal mit Ethylacetat gewaschen. Das Filtrat wurde unter reduziertem Druck getrocknet, mit Cyclohexan: Ethylacetat (2:1) gesüßt. Das so gewonnene Produkt wurde mit NMR und ESI-MS analysiert:

Tabelle 7 Zuordnung der ESI-MS Signale ($M^0 = 455,45 \text{ g/mol}$):

| Zuordnung | Gefunden | Theoretisch |
|--------------------------------------|----------|-------------|
| $[\text{M}+\text{Na}]^+$ | 478 | 478 |
| $[\text{M}+\text{H}]^+$ | 456 | 456 |
| $[\text{M}+\text{Na}-\text{tBu}]^+$ | 422 | 422 |
| $[\text{M}+\text{Na}-\text{tBu}]^+$ | 400 | 399 |
| $[\text{M}+\text{Na}-2\text{tBu}]^+$ | 366 | 366 |
| $[\text{M}+\text{H}-2\text{tBu}]^+$ | 344 | 343 |
| $[\text{M}+\text{H}-3\text{tBu}]^+$ | 288 | 287 |

$^1\text{H-NMR}$:

$\delta = 1,45$ (s, 16H, tBu), 1,47 (s, 6H), 2,32 (t, 1H, Alkin), 2,63-2,69 (m, 2H, β -CH), 3,29 (t, 2H), 3,51 (d, 4H, Propargyl CH), 3,78 (dd, 1H, α -CH), 4,54 (d, 2H)

Herstellung NTA funktionalisierter Fasern (VI)

Zu der Lösung der azidfunktionalisierten Fasern wurden unter Argon Schutzgas 1,5 Äq Kupfersulfat, 1,5 Äq NTA-Derivat (vollgeschützt) gegeben. Zu dieser langsam gerührten Lösung wurden 3 Äq Natriumascorbat (NaAsc) gegeben. Unter Schutzgas wurde über Nacht gerührt und dann durch Zusatz von TREN und Dialyse gegen Wasser die Reagenzien entfernt. Das Produkt wurde mit IR und MALDI-TOF und NMR charakterisiert.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 1736(s), 1664(w), 1627 (s), 1546(s), 1466(s), 1465(s), 1456(w), 1392(w), 1365(m), 1342(s), 1303(w), 1278(m), 1240 (s), 1230 (s), 1141 (m), 1097(s), 1060(m), 960(s), 945(m), 841(s), 7967(w), 748 (w), 708(m)

Herstellung von Asp₆

Mittels SPPS wurde das Hexapeptid am SRam Harz aufgebaut. An das Amin Ende des Peptides wurde per Handkupplung Pentinsäure gekuppelt, nach vollständiger Kupplung (Kaiser Test) wurde mit 30 % TFA/ DCM vom Harz abgespalten, in Diethylether ausgefällt und dialysiert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , RT, in ppm):

$d = 2,38$ (s, 1H, Alkin H), 2,51 (s, 4H, Pentinsäure), 2,8-3,1 (m, 12 H β -Asp), 3,71 (s, 4H), 4,74 (m, 6H α -Asp)

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3278 (s), 3076 (w), 2933 (w), 1710 (s), 1643 (s), 1533 (s), 1406 (s), 1340 (w), 1286 (m), 1224 (w), 1180 (s), 914 (m), 833(w)

Herstellung der asparaginsäurefunktionalisierten Fasern (VII)

Zu der Lösung der azidfunktionalisierten Fasern wurden unter Argon Schutzgas 1,5 Äq Kupfersulfat, 1,5 Äq Asparaginsäurehexapeptid gegeben. Zu dieser langsam gerührten Lösung wurden 3 Äq Natriumascorbat (NaAsc) gegeben. Unter Schutzgas wurde über Nacht gerührt und dann durch Zusatz von TREN und Dialyse gegen Wasser die Reagenzien entfernt. Das Produkt wurde mit IR und MALDI-TOF und NMR charakterisiert.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 1722(s), 1625 (s), 1549(s), 1466(s), 1454(s), 1398(m), 1357(m), 1342(s), 1303(w), 1278(m), 1240 (s), 1143 (w), 1097(s), 1058(m), 960(s), 840(s), 711(m)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = 0,84$ (m, 36H, γ -Val), 1,02 (m, 12H, γ -Thr), 1,15 (s, 2H, γ -Lys), 1,23 (s, 2H), 1,29 (m, 1H), 1,48 (d, 2H), 1,5 + 1,65 (m, 4H, β -Lys), 1,77 (m, 4H, Templat), 1,79-1,99 (m 6H, β -Val), 2,23 (s, 12 H, Me-N), 2,33 (s, 4 H, Teil von m β -Asp)**, 2,60 (s, 2H Teil von m β -Asp)**, 2,67 (s, 4H, Pentinsäure), 2,73 (s, 4H, Pentinsäure)*, 2,91 (d, 4H, Me-dmG)*, 3,5 (m, PEO), 3,94 (s, 1H), 4,01 (s, 1H), 4,1 (t, 1H), 4,19 (4,29 (s, 4H α -Thr), 4,40 (s, α -Val), 4,93 (s, 2 H, NH), 6,52 (s, 1H, NH), 6,8 (m, 1H, NH), 7,05 (t, 1H, NH), 7,23 (d, 2 H, Templat, $J = 7,05$ Hz), 7,37 (d, 2H, Templat, $J = 7,05$), 7,65 (d, 3H, $J =$), 7,74 (m, 1 H), 7,88 (s, 3 H), 8,0 (m, 1H, NH), 8,1 (m, 1H, NH), 8,2 (m, 1H, NH)

MALDI-TOF:

Die MALDI TOF-MS Messung gestaltete sich schwierig, da die 12 Carbonsäuregruppen eine positive Ionisierung erschweren. In ACHC als Matrix konnten keine Signale detektiert werden, in DHB war das Spektrum sehr verrauscht, aber auswertbar:

Die Masse von (VII) berechnet sich aus folgenden Anteilen: Der Masse des PEO ($M_{[\text{PEO}]}$), der Masse des Templates ($M_{[\text{Templat}]}$), der Masse der Peptidarme ($M_{[\text{Peptid}]}$), der Endgruppe ($M_{[\text{Endgruppe}]}$), sowie des Gegenions ($M_{[\text{Gegenion}]}$). Es ergibt sich daraus:

$$M_{(n)}^+ = n \cdot M_{[\text{Ethylenoxid}]} + M_{[\text{Templat}]} + 2 \cdot M_{[\text{Peptid}]} + M_{[\text{Endgruppen}]} + M_{[\text{Gegenion}]}$$

Jede Wiederholungseinheit eines Ethylenoxides wiegt $M_{[\text{Ethylenoxid}]} = 44,04$ Da. Mit der Masse des Templates ($M_{[\text{Templat}]} = 335,19$ Da), der Endgruppen (am PEO nur $H = 1$ Da), sowie des Gegenions $M_{[\text{Gegenion}]} = 39,1$ Da (Kalium) ergibt sich:

$$M_{(n)}^+ = n \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot M_{[\text{Peptid}]} + 39,1 + 1 \text{ [Da]}$$

Das Polymer-Peptid-Konjugat besteht aus zwei analogen Peptidketten an die je ein alkinfunktionalisiertes Asparaginsäurehexapeptid ($M = 787,65$ Da) angebracht wurde, für jede Peptidkette von (VII) ergibt sich daher $M_{\text{Peptid}} = 739,19 \text{ Da} + 787,65 \text{ Da} = 1526,84$. Mit $n = 56$ Wiederholungseinheiten des PEO folgt daraus:

$$M_{(VII)}^+ = 56 \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot 1526,84 + 1 + 39,1 = 5895,21 \text{ Da (exp: } 5896,61 \text{ Da)}$$

Weiterhin sind dominante m/z Signale zu erkennen, die der Polymerverteilung von $M \pm 44$ Da zugeordnet werden können. Das Spektrum ist relativ verrauscht, was auf eine unzureichende Ionisierung von VII zurückgeführt wurde.

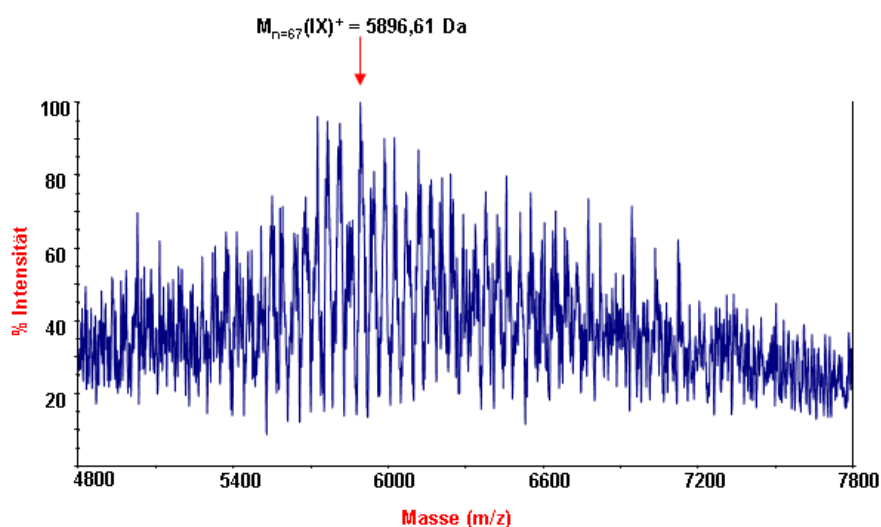


Abbildung 40. MALDI-TOF-MS von VII unter Benutzung von DHB als Matrix.

Herstellung His₆

Mittels SPPS wurde das Hexapeptid am SRam Harz aufgebaut. An das Amin Ende des Peptides wurde per Handkupplung Pentinsäure gekuppelt, nach vollständiger Kupplung (Kaiser Test) wurde mit 30 % TFA/ DCM vom Harz abgespalten, in Diethylether ausgefällt und dialysiert.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3284 (w), 3136(s), 3028 (s), 2862 (m), 2796 (w), 2640 (w), 1728 (m), 1654 (s), 1625 (w), 1529 (s), 1429 (s), 1350 (w), 1176 (s), 1124 (s), 958 (m), 914 (w), 829 (s), 796 (s), 719 (s), 623 (s)

Herstellung der His₆ Fasern (VIII)

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 3269 (s), 3089 (m), 2866 (s), 2100 (s), 1627 (s), 1544 (s), 1465 (s), 1452 (m), 1398 (m), 1359 (m), 1342 (s), 1278 (s), 1238 (s), 1143 (m), 1099 (s), 1061 (w), 960 (m), 943 (m), 840 (s), 823 (w), 801 (w), 761 (w), 704 (m), 663 (w), 623 (m)

Herstellung galactosefunktionaler Polymer-Peptid-Fasern (IX)

Zu der Lösung der azidfunktionalen Fasern (1Äq.) wurden 0,1 Äq. CuSO₄, sowie 0,1 Äq. TBTA unter Schutzgas gegeben. Zu dieser Lösung wurde Natriumascorbat (0,5 Äq.), sowie fünf Minuten später der alkinmodifizierte Zucker (1,5 Äq.) gegeben.

Nach 24 Stunden Reaktionszeit wurde dialysiert und gefriergetrocknet. Das erhaltene Molekül wurde mit MALDI-TOF, IR und NMR untersucht.

Die Masse von (IX) berechnet sich aus folgenden Anteilen: Der Masse des PEO ($M_{[\text{PEO}]}$), der Masse des Templates ($M_{[\text{Templat}]}$), der Masse der Peptidarme ($M_{[\text{Peptid}]}$), der Endgruppe ($M_{[\text{Endgruppe}]}$), sowie des Gegenions ($M_{[\text{Gegenion}]}$). Es ergibt sich daraus:

$$M_{(n)}^+ = n \cdot M_{[\text{Ethylenoxid}]} + M_{[\text{Templat}]} + 2 \cdot M_{[\text{Peptid}]} + M_{[\text{Endgruppen}]} + M_{[\text{Gegenion}]}$$

Jede Wiederholungseinheit eines Ethylenoxides wiegt $M_{[\text{Ethylenoxid}]} = 44,04$ Da. Mit der Masse des Templates ($M_{[\text{Templat}]} = 335,19$ Da, der Endgruppen (am PEO nur $H = 1$ Da), des Gegenions $M_{[\text{Gegenion}]} = 22,99$ Da (Natrium), sowie für jede Peptidkette zusätzlich einmal die Masse des Zuckers von 218,21 Da: (IX) $M_{\text{Peptid}} = 739,19$ Da + 218,21 Da = 957,40. Mit $n = 67$ Wiederholungseinheiten des PEO folgt daraus:

$$M(\text{IX})^+ = 67 \cdot 44,04 + 335,19 + 2 \cdot 957,40 + 1 + 22,99 = 5224,66 \text{ Da (exp: 5223,54 Da)}$$

Weiterhin sind dominante m/z Signale zu erkennen, die der Polymerverteilung von $M \pm 44$ Da zugeordnet werden können. Das Spektrum ist relativ verrauscht, was auf eine unzureichende Ionisierung von IX zurückgeführt wurde.

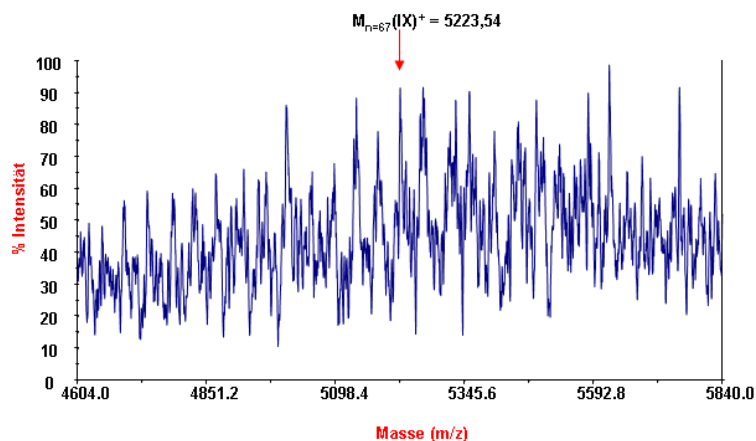


Abbildung 41. MALDI-TOF-MS Spektrum von (IX) in der Matrix DHB.

FTIR-ATR (ν in cm^{-1}): 2100(s), 1627 (s), 1546(s), 1465(s), 1454(w), 1396(w), 1357(m), 1359(m), 1303(w), 1342 (s), 1278(m), 1240 (m), 1145 (w), 1099(s), 1058(w), 960(s), 947(w), 841 (s), 798 (w), 709(m)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, RT, in ppm):

$\delta = 0,79\text{-}0,81$ (m, 36H, $\text{CH}_3\text{-Val}$), $0,98^{*1}$ (d, 6H, $\text{CH}_3\text{-Thr}$), $1,03^{*1}$ (d, 6H, $\text{CH}_3\text{-Thr}$), 1,21 (m, 6H, $\delta\text{-CH}_2\text{-Lys}$), 1,47(m, 4H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-Lys}$), 1,63 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2\text{-Lys}$), 1,74 (t, 6H, $\text{CH}_2\text{-Templat}$), 1,88-1,98 (m, 6H, $\beta\text{-CH-Val}$), 2,69 (t, 4H) (2,76 (br, 12H, $\text{CH}_3\text{-dmG}$), 3,01 (m, 2H), 3,15 (d, 2H), 3,21 (m, 4H, $\epsilon\text{-CH}_2\text{-Lys}$), 3,38 (d, 4H $\text{CH}_2\text{-Templat}$), 3,47(s + br, 290H, PEO), 3,66 (d, 2H, $\text{PEO-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Gly-Templat}$), $3,93^{*4}$ (m, $\sim 4\text{H}$, $\beta\text{-Thr}$), $3,95^{*4}$ (m, $\sim 4\text{H}$, $\epsilon\text{-Lys}$), 4,1 (dt, 2H, $\alpha\text{-CH-Lys}$), 4,18-4,35* (mm, 12H, $\alpha\text{-CH-Val/Thr}$), 4,83 (m, 1H, NH), 4,91 (s, 2, $\text{CH}_2\text{-Carbazol}$), 7,19 (d, 2H, $J = 8,04$ Hz, $\text{CH-Templat aromat.}$), 7,21 (d, 2H, Templat aromat.), 7,61 (d, 1H, NH), 7,69 (m, 1H, NH), $7,85^{*2}$ (s, $\sim 2\text{H}$, $\text{CH-Templat aromat.}$), $7,87^{*2}$ (m, $\sim 1\text{H}$, NH), $7,99^{*3}$ (s, $\sim 2\text{H}$, Triazol), $8,02^{*3}$ (m, $\sim 1\text{H}$, NH), 8,61 (m, 1H, NH), 9,59 (br, $\sim 1\text{H}$)

*nicht getrennt integrierbar

7.3. Methoden:

Zirkular Dichroismus (CD)

Die CD Messungen wurden an dem Spektrometer J 715 der Firma Jasco durchgeführt. Die Schichtdicke der verwendeten Küvette betrug 1mm, die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 300 bis 190 nm.

Die Messparameter waren im einzelnen: Auflösung 0,2 nm, Scangeschwindigkeit 50 nm/min; Response: 4 sec, Bandbreite 1 nm. Für jede Messung wurden 8 Einzelmessungen akkumuliert, die durch das reine Lösungsmittel korrigiert wurden.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker DPX 400-Spektrometer in DMSO-d₆ bei 400 MHz (¹H-NMR), 100 MHz (¹³C-NMR) gemessen. Die Anteile nicht-deuterierter Lösungsmittel dienten als interne Standards bezogen auf Tetramethylsilan. Die Auswertung der Spektren wurde Mithilfe des Programms Win-NMR von Bruker durchgeführt.

FT-IR-Spektroskopie

Die IR Spektroskopie wurden an einem Gerät der Firma BioRad, Modell FTS 6000 erstellt. Dazu wurden die lyophilisierten Feststoffe direkt auf dem ATR Kristall (abgeschwächte totale Reflexion) unter Verwendung der sog. Golden Gate Technik gemessen.

Bei der Angabe der IR-Spektroskopischen Daten wurden folgende Abkürzungen verwendet: $\bar{\nu}$ = Wellenzahl (cm⁻¹); s = Bande mit starker Intensität, m = Bande mit mittlerer Intensität, w = Bande mit schwacher Intensität. Einzelne Banden wurden speziell zugeordnet, diese Zuordnungen sind in Klammern angegeben.

Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Aufnahmen wurden mit einem NanoScope IIIa-Gerät der Firma Veeco Instruments, Santa Barbara, CA, USA im „tapping mode“ angefertigt. Es kamen kommerzielle Siliciumspitzen (Typ NCR-W) zum Einsatz, deren Tip-Radius zwischen 6 und 10 nm groß ist. Es wurde keine Tip-Korrektur durchgeführt.

Die Aufnahmen wurden mit einer Kraftkonstante von 42 N·m⁻¹ bei einer Resonanzfrequenz von 285 kHz angefertigt. Die Abbildung wurde mit einem 10x10 µm e-Scanner aufgenommen.

Die Probenpräparation erfolgte durch Spincoating Lösungen (wenn nicht anders angegeben C = 0,2 g/L) auf frisch abgezogenen Mica-Substraten. Es wurden jeweils 5 µl Lösung auf das stehende Substrat aufgetropft, etwa drei Sekunden gewartet und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 3000 min⁻¹ zwei Minuten rotiert.

Fluoreszenz

Die Messungen der Fluoreszenz wurden in Kunststoff-Einmalküvetten an einem Lumineszenz Spektrometer der Firma Perkin Elmer, Connecticut, USA bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 520$ nm durchgeführt.

Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Die Matrix-assistierte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie wurde mit einem Voyager-DE STR BioSpectrometry Workstation MALDI-TOF-Massenspektrometer der Firma Perseptive Biosystems, Inc. Framingham, MA, USA durchgeführt

Die Proben wurden in einer Konzentration von 0,1 mg/mL in Methanol/Acetonitril (1:1, mit oder ohne Zusatz von 0,1 % TFA (v/v))gelöst. Es wurde 1µl dieser Lösung mit 1 µl einer a-Cyano-4-Hydroxymzimtsäure-Matrix-Lösung (10 mg/ mL in 0,3 % TFA in Methanol/ Acetonitril (1:1) (v/v)) gemischt. Von dieser Mischung wurde 1 µl auf eine Probenplatte aufgebracht und bei 24 °C getrocknet. Die Messungen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV durchgeführt. Jedes Spektrum wurde aus 250 Laserpulsen gemittelt.

Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Messungen der erfolgten an einem Gerät (LCMS-ESI-MS PQ8000α) der Firma Shimadzu, Duisburg, Deutschland.

Dieses Gerät kann als HPLC-MS betrieben werden, indem eine YMC-Pack-Pro C18 Säule vorgeschaltet wird. Wurde diese Technik genutzt werden Lösungsmittel- oder Gradient, bei

den jeweiligen Messungen angegeben. Wenn nicht anderes angegeben, wurde ein Gradient von 100 % Methanol zu 100 % Wasser in 30 Minuten.

Die Probe wurde mit einer Konzentration von 1 mg/mL in Methanol mit 0,1 % Ameisensäure (v/v) oder Acetonitril/ Wasser (1:1 v/v) gelöst und anschließend 10 µl dieser Lösung mit dem Autosampler eingespritzt. Es wurde Stickstoff als Trägergas (4,5 mL/min) verwendet. Die Probe wurden (wenn nicht anders angegeben) im positiven Modus mit einer Detektorspannung von 1,6 kV, einer Düsentemperatur von 150 °C und einer Spannung von 4,5 kV gemessen.

7.4. Abkürzungsverzeichnis:

| Abkürzung | Voller Name |
|------------------|--|
| AFM | Rasterkraftmikroskopie |
| App | Annäherung (engl. Approximation) |
| Arg (R) | Arginin |
| Asc | Ascorbinsäure (Vitamin C) |
| Asp (D) | Asparaginsäure |
| AUZ | Analytische Ultrazentrifuge |
| Bipy | 2,2'-Bipyridin |
| BS | Bernsteinsäure |
| Boc | tert.-Butoxycarbonyl |
| DCC | N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCM | Dichlormethan |
| DETA | Diethylentriamin |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DIC | N,N'-Diisopropylcarbodiimid |
| dmG | N,N-Dimethylglycin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| en | Ethylendiamin |
| ESI | Elektrosprayionisation |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl |
| FTIC | Fluoresceinethioisocyanat |
| Gln | Glutamin |
| His (H) | Histidin |
| HBTU | 2-(1H-bezotriazole-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium-hexafluorophosphat |
| HOBT | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie |
| IR-Spektroskopie | Infrarot Spektroskopie |
| ITC | Isothermale-Titrations-Calorimetrie |
| LS | Lichtstreuung |
| Lys (K) | Lysin |
| MALDI TOF | Matrix Assisted Laser Desorption – Time of Flight |
| NMP | n-Methyl-2-Pyrrolidon |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance, Kernmagnetische Resonanz |
| NTA | Nitriloessigsäure |
| NOESY | Nuclear Overhauser and Enhancement Spectroscopy |
| Ox | Oxalat |
| PEO | Polyethylenoxid |
| Phe (F) | Phenylalanin |
| ppm | parts per million |
| PyAOP | 7-azabenzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat |

| Abkürzung | Voller Name |
|-----------|--|
| PAA | Polyacrylsäure |
| PyBOP | Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat |
| SPPS | Solid Phase Peptid Synthesis |
| TBTA | Tris-(benzyltriazolmethyl)amin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Thr (T) | Threonin |
| TMS | Tetramethylsilan |
| TMSB | Trimethylsilylbromid |
| TNBSA | Trinitrobenzolsulfonsäure |
| TREN | Triäthyltetraamin |
| TRIS | Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin |
| Trt | Tritylgruppe |
| Tyr | Tyrosin |
| UP | Unpolare Aminosäure |
| Val (V) | Valin |

7.5. Literaturverzeichnis

- [1] J. Hentschel, E. Krause, H. G. Börner, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 7722.
- [2] J. Hentschel, H. G. Börner, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14142.
- [3] M. G. J. ten Cate, H. Rettig, K. Bernhardt, H. G. Börner, *Macromolecules* **2005**, *38*, 10643.
- [4] D. Eckhardt, M. Groenewolt, E. Krause, H. G. Börner, *Chemical Communications* **2005**, 2814.
- [5] S. Kessel, H. G. Börner, *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29*, 419.
- [6] S. Kessel, H. G. Börner, *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29*, 316.
- [7] E. Fischer, *Chem. Z.* **1902**, *26* 939.
- [8] E. Fischer, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 453.
- [9] E. Fischer, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 530.
- [10] Duden, *6. überarbeitete und erweiterte Auflage ISBN: 978-3-411-05506-7* 299.
- [11] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149.
- [12] R. B. Merrifield, *Biochemistry* **1964**, *3*, 1385.
- [13] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86*, 304.
- [14] Merrifield, R. B., J. M. Stewart, *Nature* **1965**, *207*, 522.
- [15] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Annual Review of Biochemistry* **1978**, *47*, 251.
- [16] Astbury, *Oxford Univ. Press* **1933**.
- [17] M. L. Huggins, *Journal of Organic Chemistry* **1936**, *1*, 407.
- [18] W. T. Astbury, *Transactions of the Faraday Society* **1933**, *29*, 0193.
- [19] W. T. Astbury, H. J. Woods, *Philos Trans Roy Soc London* **1933**, *A232*, 333.
- [20] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, *37*, 205.
- [21] L. Pauling, R. B. Corey, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, *37*, 251.
- [22] L. Pauling, *Journal of the American Chemical Society* **1940**, *62*, 2643.
- [23] C. K. Smith, L. Regan, *Science* **1995**, *270*, 980.

-
- [24] C. K. Smith, J. M. Withka, L. Regan, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5510.
- [25] K. Janek, J. Behlke, J. Zipper, H. Fabian, Y. Georgalis, M. Beyermann, M. Bienert, E. Krause, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8246.
- [26] W. A. Loughlin, J. D. A. Tyndall, M. P. Glenn, D. P. Fairlie, *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 6085.
- [27] R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, D. C. Spellmeyer, R. Y. Tan, A. D. Frankel, D. V. Santi, F. E. Cohen, P. A. Bartlett, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89*, 9367.
- [28] R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, S. B. H. Kent, W. H. Moos, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 10646.
- [29] J. P. Schneider, J. W. Kelly, *Chemical Reviews* **1995**, *95*, 2169.
- [30] D. S. Kemp, B. R. Bowen, C. C. Muendel, *Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 4650.
- [31] J. P. Schneider, J. W. Kelly, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 2533.
- [32] H. Diaz, J. R. Espina, J. W. Kelly, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 8316.
- [33] K. Y. Tsang, H. Diaz, N. Graciani, J. W. Kelly, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 3988.
- [34] S. R. Labrenz, J. W. Kelly, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 1655.
- [35] H. G. Börner, D. Eckhardt, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2005**, *230*, U4052.
- [36] H. G. Börner, B. M. Smarsly, J. Hentschel, A. Rank, R. Schubert, Y. Geng, D. E. Discher, T. Hellweg, A. Brandt, *Macromolecules* **2008**, *41*, 1430.
- [37] C. L. Nesloney, J. W. Kelly, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4*, 739.
- [38] A. Aggeli, M. Bell, L. M. Carrick, C. W. G. Fishwick, R. Harding, P. J. Mawer, S. E. Radford, A. E. Strong, N. Boden, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 9619.
- [39] Y. Y. Wu, G. S. Cheng, K. Katsov, S. W. Sides, J. F. Wang, J. Tang, G. H. Fredrickson, M. Moskovits, G. D. Stucky, *Nature Materials* **2004**, *3*, 816.
- [40] H. Yang, N. Coombs, G. A. Ozin, *Advanced Materials* **1997**, *9*, 811.
- [41] M. Antonietti, B. Berton, C. Goltner, H. P. Hentze, *Advanced Materials* **1998**, *10*, 154.

-
- [42] P. J. Bruinsma, A. Y. Kim, J. Liu, S. Baskaran, *Chemistry of Materials* **1997**, *9*, 2507.
- [43] H. Y. Fan, Y. F. Lu, A. Stump, S. T. Reed, T. Baer, R. Schunk, V. Perez-Luna, G. P. Lopez, C. J. Brinker, *Nature* **2000**, *405*, 56.
- [44] C. Sanchez, H. Arribart, M. M. G. Guille, *Nature Materials* **2005**, *4*, 277.
- [45] K. Shimizu, J. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 6234.
- [46] G. B. Fields, R. L. Noble, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1990**, *35*, 161.
- [47] L. C. F. Albericio, *Methods in enzymology*, Acad. Press. London, 289, 104.
- [48] J. A. Moss, *Curr Protoc Protein Sci* **2005**, Chapter 18, Unit 18.7.
- [49] P. G. Sasikumar, K. S. Kumar, V. N. R. Pillai, *Journal of Peptide Research* **2003**, *62*, 1.
- [50] K. C. Pugh, E. J. York, J. M. Stewart, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1992**, *40*, 208.
- [51] G. J. S. Lohman, P. H. Seeberger, *Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 4081.
- [52] Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353.
- [53] X. Ariza, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 7515.
- [54] I. Bosch, A. Gonzalez, F. Urpi, J. Vilarrasa, *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 5638.
- [55] S. Brase, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 5188.
- [56] R. Stolle, F. Hanusch, *Journal Fur Praktische Chemie-Leipzig* **1933**, *136*, 9.
- [57] N. Halland, A. Braunton, S. Bachmann, M. Marigo, K. A. Jorgensen, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 4790.
- [58] W. Kurosawa, T. Kan, T. Fukuyama, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8112.
- [59] H. Tanaka, A. M. Sawayama, T. J. Wandless, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6864.
- [60] C. Chiappe, D. Pieraccini, P. Saullo, *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 6710.
- [61] A. Loris, A. Perosa, M. Selva, P. Tundo, *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 4046.
- [62] W. S. Horne, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 9372.

-
- [63] C. J. Cavender, V. J. Shiner, *Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37*, 3567.
- [64] R. B. Yan, F. Yang, Y. F. Wu, L. H. Zhang, X. S. Ye, *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 8993.
- [65] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Organic Letters* **2007**, *9*, 3797.
- [66] W. V. Doering, C. H. Depuy, *Journal of the American Chemical Society* **1953**, *75*, 5955.
- [67] P. B. Alper, S. C. Hung, C. H. Wong, *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6029.
- [68] P. T. Nyffeler, C. H. Liang, K. M. Koeller, C. H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 10773.
- [69] J. F. Lutz, H. Schlaad, *Polymer* **2008**, *49*, 817.
- [70] R. Huisgen, *Angewandte Chemie-International Edition* **1963**, *75*, 604.
- [71] L. I. Smith, *Chemical Reviews* **1938**, *23*, 193.
- [72] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 2004.
- [73] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41*, 2596.
- [74] M. P. Doyle, M. A. McKervey, T. Ye, *Wiley, New York* **1997**.
- [75] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Organic Letters* **2004**, *6*, 2853.
- [76] M. G. Simmons, C. L. Merrill, L. J. Wilson, L. A. Bottomley, K. M. Kadish, *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1980**, 1827.
- [77] L. Ciavatta, D. Ferri, R. Palombari, *Journal of Inorganic & Nuclear Chemistry* **1980**, *42*, 593.
- [78] Y. Rondelez, G. Bertho, O. Reinaud, *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41*, 1044.
- [79] Y. Rondelez, M. N. Rager, A. Duprat, O. Reinaud, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 1334.
- [80] K. Matyjaszewski, Y. Nakagawa, S. G. Gaynor, *Macromolecular Rapid Communications* **1997**, *18*, 1057.
- [81] B. S. Sumerlin, N. V. Tsarevsky, G. Louche, R. Y. Lee, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2005**, *38*, 7540.
- [82] J. A. Opsteen, J. C. M. van Hest, *Chemical Communications* **2005**, 57.
- [83] J. F. Lutz, H. G. Börner, K. Weichenhan, *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, *26*, 514.

-
- [84] M. Malkoch, K. Schleicher, E. Drockenmuller, C. J. Hawker, T. P. Russell, P. Wu, V. V. Fokin, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3663.
- [85] M. J. Joralemon, R. K. O'Reilly, J. B. Matson, A. K. Nugent, C. J. Hawker, K. L. Wooley, *Macromolecules* **2005**, *38*, 5436.
- [86] P. Wu, M. Malkoch, J. N. Hunt, R. Vestberg, E. Kaltgrad, M. G. Finn, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C. J. Hawker, *Chemical Communications* **2005**, 5775.
- [87] B. Helms, J. L. Mynar, C. J. Hawker, J. M. J. Frechet, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15020.
- [88] M. Malkoch, R. J. Thibault, E. Drockenmuller, M. Messerschmidt, B. Voit, T. P. Russell, C. J. Hawker, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 14942.
- [89] J. F. Lutz, H. G. Börner, K. Weichenhan, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2005**, *230*, 482.
- [90] W. H. Binder, C. Kluger, *Macromolecules* **2004**, *37*, 9321.
- [91] A. J. Link, D. A. Tirrell, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 11164.
- [92] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 1398.
- [93] F. W. Aston, *Phys. Review* **1918**, *11*, 316.
- [94] F. W. Aston, *Phil. Mag.* **1919**, *48*, 707.
- [95] J. J. Thomson, *Phil. Mag.* **1897**, *44*, 293.
- [96] S. Gaskell, *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 1378.
- [97] K. L. Bush, *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 233.
- [98] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64.
- [99] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, *9*, 37.
- [100] P. Kebarle, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 804.
- [101] R. A. Yost, R. K. Boyd, *Methods in Enzymology* **1990**, *193*, 154.
- [102] J. Rosmarinowsky, M. Karas, F. Hillenkamp, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1985**, *67*, 109.
- [103] F. Hillenkamp, D. Holtkamp, M. Karas, P. Kluesener, *Benninghoven, a. (Ed.). Springer Proceedings in Physics, Vol. 9. Ion Formation from Organic Solids (IfoS Iii): Mass Spectrometry of Involatile Material; Third International Conference, Muenster, West Germany, Sept. 16-18, 1985. X+219p. Springer-Verlag: New York, N.Y., USA; Berlin, West Germany. Illus* **1986**, 153.

-
- [104] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, 78, 53.
- [105] M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1989**, 28, 760.
- [106] R. S. Brown, J. J. Lennon, *Analytical Chemistry* **1995**, 67, 1998.
- [107] R. S. Brown, J. J. Lennon, *Analytical Chemistry* **1995**, 67, 3990.
- [108] R. C. Beavis, *Org. Mass Spectrom* **1992**, 27, 156.
- [109] W. Low, J. Kang, M. DiGruccio, D. Kirby, M. Perrin, W. H. Fischer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, 15, 1156.
- [110] R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, 17, 337.
- [111] B. A. Mamyryin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin, *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki* **1973**, 64, 82.
- [112] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **2005**, 1751, 119.
- [113] R. S. Mulliken, *Journal of Chemical Physics* **1939**, 7, 14.
- [114] W. Moffitt, *Journal of Chemical Physics* **1956**, 25, 467.
- [115] Greenfield, N. J., G. D. Fasman, *Biochemistry* **1969**, 8, 4108.
- [116] N. J. Greenfield, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **1999**, 18, 236.
- [117] R. W. Woody, *Biochemical Spectroscopy* **1995**, 246, 34.
- [118] W. C. Johnson, *Proteins-Structure Function and Genetics* **1990**, 7, 205.
- [119] S. Beychok, *Science* **1966**, 154, 1288.
- [120] N. S. Simmons, A. G. Szentgyorgyi, C. Cohen, D. B. Wetlaufer, E. R. Blout, *Journal of the American Chemical Society* **1961**, 83, 4766.
- [121] J. A. Schellman, P. Oriel, *Journal of Chemical Physics* **1962**, 37, 2114.
- [122] R. W. Woody, *Monatshefte Fur Chemie* **2005**, 136, 347.
- [123] N. J. Greenfield, *Nature Protocols* **2006**, 1, 2527.
- [124] H. Bentz, H. P. Bachinger, R. Glanville, K. Kuhn, *European Journal of Biochemistry* **1978**, 92, 563.
- [125] M. L. Tiffany, S. Krimm, *Biopolymers* **1972**, 11, 2309.
- [126] N. Sreerama, R. W. Woody, *Numerical Computer Methods, Pt D* **2004**, 383, 318.
- [127] N. J. Greenfield, *Numerical Computer Methods, Pt D* **2004**, 383, 282.

-
- [128] N. Sreerama, S. Y. Venyaminov, R. W. Woody, *Analytical Biochemistry* **2000**, 287, 243.
- [129] N. J. Greenfield, *Analytical Biochemistry* **1996**, 235, 1.
- [130] N. Sreerama, R. W. Woody, *Analytical Biochemistry* **1993**, 209, 32.
- [131] S. W. Provencher, J. Glockner, *Biochemistry* **1981**, 20, 33.
- [132] M. A. Andrade, P. Chacon, J. J. Merelo, F. Moran, *Protein Engineering* **1993**, 6, 383.
- [133] J. M. Scholtz, Q. Hong, E. J. York, J. M. Stewart, R. L. Baldwin, *Biopolymers* **1991**, 31, 1463.
- [134] E. Abbe, *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **1873**, 9, 413.
- [135] G. Donnert, J. Keller, R. Medda, M. A. Andrei, S. O. Rizzoli, R. Lurmann, R. Jahn, C. Eggeling, S. W. Hell, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 11440.
- [136] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Physical Review Letters* **1986**, 56, 930.
- [137] B. R. Sessions, K. I. Aston, A. P. Davis, B. J. Pate, K. L. White, *Molecular Reproduction and Development* **2006**, 73, 651.
- [138] Z. N. Zhu, B. McKittrick, *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 7479.
- [139] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, 37, 513.
- [140] C. Lawyer, S. Pai, M. Watabe, P. Borgia, T. Mashimo, L. Eagleton, K. Watabe, *FEBS Letters* **1996**, 390, 95.
- [141] D. J. Schibli, P. M. Hwang, H. J. Vogel, *Biochemistry* **1999**, 38, 16749.
- [142] G. Rapp-Polymere, <http://www.rapp-polymere.com/>.
- [143] F. I. Auzanneau, M. Meldal, K. Bock, *J Pept Sci* **1995**, 1, 31.
- [144] M. Meldal, *Tetrahedron Letters* **1992**, 33, 3077.
- [145] M. Renil, M. Ferreras, J. M. Delaisse, N. T. Foged, M. Meldal, *Journal of Peptide Science* **1998**, 4, 195.
- [146] M. Kumar, *Reactive & Functional Polymers* **2000**, 46, 1.
- [147] K. G. R. Nair, R. Madhavan, *Fishery Technology* **1984**, 21, 109.
- [148] I. N. Jha, L. Iyengar, A. Rao, *Journal of Environmental Engineering-Asce* **1988**, 114, 962.
- [149] C. Penichecovas, L. W. Alvarez, W. Arguellesmonal, *Journal of Applied Polymer Science* **1992**, 46, 1147.

-
- [150] F. Y. Zhang, B. Bernet, W. Bonnet, O. Dangles, F. Sarabia, A. Vasella, *Helvetica Chimica Acta* **2008**, *91*, 608.
- [151] R. Blattner, R. J. Ferrier, *Carbohydrate Research* **1985**, *138*, 73.
- [152] M. Bicchieri, S. Pepa, *Restaurator-International Journal for the Preservation of Library and Archival Material* **1996**, *17*, 165.
- [153] K. Uchida, S. Kawakishi, *Agricultural and Biological Chemistry* **1986**, *50*, 367.
- [154] I. Coin, R. Dolling, E. Krause, M. Bienert, M. Beyermann, C. D. Sferdean, L. A. Carpino, *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 6171.
- [155] K. H. Altmann, A. Florsheimer, M. Mutter, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1986**, *27*, 314.
- [156] M. Luna, P. J. de Pablo, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, A. M. Baro, H. Tokumoto, S. P. Jarvis, *Ultramicroscopy* **2003**, *96*, 83.
- [157] D. Gebauer, A. Völkel, H. Cölfen, *Science* **2008**, *322*, 1819.
- [158] D. Gebauer, H. Cölfen, A. Verch, M. Antonietti, *Advanced Materials* **2009**, *21*, 435.
- [159] N. Gehrke, H. Cölfen, N. Pinna, M. Antonietti, N. Nassif, *Crystal Growth & Design* **2005**, *5*, 1317.
- [160] N. V. Vagenas, A. Gatsouli, C. G. Kontoyannis, *Talanta* **2003**, *59*, 831.
- [161] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 8350.
- [162] E. Kaiser, Colescot.Rl, Bossinge.Cd, P. I. Cook, *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*, 595.
- [163] M. Mutter, A. Chandravarkar, C. Boyat, J. Lopez, S. Dos Santos, B. Mandal, R. Mimna, K. Murat, L. Patiny, L. Saucedo, G. Tuchscherer, *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 4172.

Danksagung

Die Entstehung einer Promotion ist weit mehr als das Zusammentragen von Messergebnissen, deren Auswertung und Interpretation. Viele Menschen sind an der Arbeit beteiligt und in meiner Erinnerung ein Teil davon geworden. Hiermit will ich ihnen danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Markus Antonietti für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren, für seinen fachlichen Rat und für seine Begeisterung an der Chemie, die einen immer wieder inspirieren und anspornen können.

Ich danke meinem direkten Betreuer Dr. Hans Börner für seine unzählige Ideen, Vor- und Ratschläge.

Ich danke der gesamten Kaffeeecke (das Wort mit den 3e) für die Pausen mit vielen Gesprächen. Im Einzelnen Jessica und Katharina, Nancy und Romina die inzwischen alle zum Kaffee trinken bekehrt wurden, was hoffentlich nicht der Vergessenheit anheim fällt. Besonders danke ich Steffi, die nicht nur mit uns Kaffee und Tee getrunken hat, sondern sich aufopferungsvoll durch meine Hieroglyphen gewühlt hat.

Ich danke weiterhin den mitgliedern der AG Börner, seien es ehemalige oder noch aktuelle. Für Gespräche und gelegentliche Witze danke ich Hajo, Rafi, Emre und Jens. Weiterhin danke ich Laura Hartmann, deren Hinweise und Bemerkungen zu meiner Zeit als Diplomand ich erst während der Promotion richtig deuten gelernt habe.

Den vielen anderen Doktoranten und Postdocs, mit denen ich Labor und Büro geteilt habe, möchte ich ebenfalls danken: Florian, ChristinA und ChristinE, Anja und Niels, sowie Jens W.

Ein besonderer Dank gebührt Klaus Tauer, Helmut Schlaad, Helmut Cölfen und Arne Thomas, deren Türen tagsüber für Diskussionen zu jedem Thema immer offen standen und nachts immer verschlossen waren (was ich freilich nie überprüft habe).

Für viele AFM, NMR, SEM, TEM, AUZ und GPC Messungen danke ich Anne Heilig, Olaf Niemeyer, Rona Pitschke, Heike Runge, Antje Völkel sowie Marlies Gräwert.

Ich danke allen Freunden und meinen Verwandten, für das ihr Verständnis sowie die Unterstützung und Zuversicht während der Promotion.

Ein unendlich riesiger Dank gilt meiner kleinen Familie, die mich unterstütz, aufgebaut, geschont und motiviert haben. Vielen Dank für eure Liebe!