



Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung IAP

**Vom Monomer zum Glykopolymer: Anwendung als Biofunktionalitäten auf
Oberflächen und als Transportmoleküle**

**Univ.-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Polymerchemie"**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Institut für Chemie
der Universität Potsdam**

**von
Master of Science RWTH Aachen University
Christine Schulte-Osseili, geb. Schulte
geboren in Köln, Deutschland**

Potsdam, Januar 2019

Gutachter: Prof. Dr. Alexander Böker
Prof. Dr. Rainer Haag
Prof. Dr. André Laschewsky

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-43216>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-432169>

Die Dissertationsarbeit wurde am Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung in Potsdam-Golm im Zeitraum von April 2015 bis Januar 2019 in dem Forschungsbereich Life Science und Bioprozesse von Prof. Dr. Alexander Böker durchgeführt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Disserationsarbeit selbstständig verfasst worden ist und keine weiteren Hilfsmittel als die genannten verwendet wurden. Die inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Dissertationsarbeit wurde ausschließlich in diesem Promotionsverfahren an der Universität Potsdam an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät am Institut für Chemie eingereicht. Dem Promotionsverfahren ging kein gescheitertes Promotionsverfahren voraus.

Potsdam, 30. Januar 2019, Christine Schulte-Osseili

Publikationen & Konferenzbeiträge

Christine Schulte-Osseili, Moritz Kleinert, Norbert Keil, Ruben R. Rosencrantz, *Rapid drop-test for lectin binding with glycopolymer-coated optical ring resonators*, *Biosensors*, **2019**, 9,24.

H. Park, S. Walta, R. R. Rosencrantz, A. Körner, **C. Schulte**, L. Elling, W. Richtering and A. Böker, „*Micelles from self-assembled double-hydrophilic PHEMA-glycopolymer-diblock copolymers as multivalent scaffolds for lectin binding*“, *Polym. Chem.* **2016**, 7, 878.

R. R. Rosencrantz, V. H. Nguyen, H. Park, **C. Schulte**, A. Böker, U. Schnakenberg, L. Elling, „*Lectin binding studies on a glycopolymer brush flow-through biosensor by localized surface plasmon resonance*“, *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 408, 5633-5640.

Konferenzbeiträge

09/2017 “Bioinspired recognition of bacteria by glycopolymer micelles”, GlyconetBB Congress: „new and emerging technologies”, Potsdam, Poster Presentation.

02/2017 “Glycopolymer brushes for glyco-chips as biosensor”, GlycoBioTec, Berlin, Poster Presentation.

10/2016 “Glycopolymer brushes – a powerful tool for the analysis of glycan-mediated interaction”, International Symposium on “Functional Biointerfaces, Berlin, Poster Presentation, Speed lecture.

09/2016 “Glycopolymer brushes – a powerful tool for the analysis of glycan-mediated interaction”, Polydays, Postdam, Poster Presentation.

05/2016 “Glycopolymer brushes as functional surface coating, brushes for specific lectin binding”, XIV Bionnale, Berlin, Speed lecture.

Winter School

01 - 02/2017 „Moderne Methoden zur Synthese und Analyse von Glykoproteinen“, GlyconetBB, Potsdam.

Summer School

06/2016 Summer Course Glycosciences - 14th European Training Course on Carbohydrates, The Graduate School VLAG, Groningen,
Glycopolymer brushes - a powerful tool for the analysis of glycan-mediated interaction, Poster Presentation.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung der Dissertationsarbeit unterstützt, begleitet und motiviert haben.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. A. Böker für die Möglichkeit an einem interessanten Thema zu forschen und für seinen wissenschaftlichen und persönlichen Rat während meiner Promotion.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Haag und Prof. Dr. A. Laschewsky für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens bedanken.

Ein ganz besondere Dank geht an Dr. R. R. Rosencrantz für die tägliche Betreuung, die Motivation und die ständige Bereitschaft über schwierige Fragestellungen zu diskutieren.

Ein weiterer Dank gilt Dr. S. Rosencrantz für die Anfertigung der SPR-Messungen und die Unterstützung bei biotechnologischen Fragen und die Bereitstellung der Proteine.

Ebenfalls möchte ich mich bei M. Kleinert, M. Sc., bedanken für die erfolgreiche Kooperation.

Für die Durchführung der Analytik in der Disseration, möchte ich mich bei Herrn Dr. H. Wetzel für die GPC-Analysen, bei Herrn Dr. A. Holländer für die XPS-Messungen, bei Frau S. Grunst für die TEM- und Kryo-REM-Messung und bei Frau S. Stegmann für weitere GPC-Analysen bedanken.

Insbesondere bedanke ich mich bei dem gesamten Arbeitskreis und dem Fraunhofer-Institut IAP für die kollegiale Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Austausch und das nette Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und engen Freunden, ganz besonders meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich in jeder Phase unterstützt und ermutigt haben. Außerdem danke ich meiner Schwester, die mich während der Arbeit, mit vielen schönen Stunden außerhalb der Arbeit motiviert hat.

Als letztes möchte ich meinem Mann Dr. Hassan Osseili für die emotionale Unterstützung, Motivation und Hilfe bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/ Abstract	ix
Abkürzungsverzeichnis	xi
1. Einleitung	1
1.1. Glykobiologie	1
1.2. Glykopolymere	3
1.3. Polymerisationsstrategien	5
1.3.1. <i>Atom Transfer Radical Polymerization</i> (ATRP)	5
1.3.2. Glykopolymere über ATRP	7
1.3.3. <i>Surface-Initiated-ATRP</i> (SI-ATRP)	8
1.3.4. <i>Reversible Addition-Fragmentation Chain-Transfer Polymerization</i> (RAFT)	8
1.3.5. Glykopolymere über RAFT	10
1.4. Biosensoren	10
1.5. Motivation und Struktur der Dissertationsarbeit	13
1.6. Literatur	15
2. Allgemeine Materialien und Analytik	19
2.1. Material	19
2.2. Analytik	20
3. Darstellung von Glykomonomeren	23
3.1. Einleitung	23
3.2. Ergebnisse und Diskussion	24
3.3. Zusammenfassung	32
3.4. Experimenteller Teil	34
3.4.1. Synthese des Glykomonomers 2-O-(<i>N</i> -Acetyl- β -D-Glukosamin)ethylmethacrylat (GlcNAcEMA) über die Königs-Knorr-Reaktion	34
3.4.2. Synthese des Glykomonomers Laktosaminethylmethacrylat (LacAEMA)	36
3.4.3. Synthese des Glykomonomers Laktose über Wittig-Reaktion	37
3.4.4. Synthese des Glykomonomers Mannosaminmethacrylat (ManAMA)	38
3.4.5. Synthese des Glykomonomers Galaktosaminmethacrylat (GalAMA)	39
3.5. Literatur	41
4. Synthese von Homoglykopolymeren über radikalische Polymerisationen	42
4.1. Einleitung	42
4.2. Glykopolymere über Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)	43
4.2.1. Biologische Untersuchungen der Glykopolymere	46
4.3. Glykopolymere über RAFT-Polymerisation	47
4.4. Herstellung von Glykopolymeren über reduktive Aminierung	50
4.5. Zusammenfassung	53
4.6. Experimenteller Teil	54
4.6.1. Synthese des Glykopolymers PManAMA über ATRP	54
4.6.2. Synthese des Glykopolymer PLacAEMA über ATRP	54
4.6.3. Synthese der Glykopolymere PManAMA und PGalAMA über RAFT-Polymerisation	54
4.6.4. Synthese von PHEMA über RAFT-Polymerisation	55
4.6.5. Synthese von PEI-Laktose über reduktive Aminierung	55
4.7. Literatur	56

5. Glykopolymere als Teil von Blockcopolymeren und deren Selbstassemblierung zu Mizellen	58
5.1. Einleitung	58
5.2. Synthese des Diblockcopolymeren PHEMA- <i>b</i> -PLacAEMA und seine Selbstassemblierung zu Mizellen	60
5.3. Synthese der Diblockcopolymeren PMMA- <i>b</i> -PManAMA und ihre Selbstassemblierung zu Mizellen	65
5.4. Zusammenfassung	75
5.5. Experimenteller Teil	76
5.5.1. Synthese des Diblockcopolymeren PHEMA- <i>b</i> -PLacAEMA	76
5.5.2. Synthese der Diblockcopolymeren PMMA- <i>b</i> -PManAMA	76
5.5.3. Herstellung der Mizellen mit NileRed	77
5.5.4. Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration (CMC)	77
5.6. Literatur	78
6. Glykopolymere auf Oberflächen	79
6.1. Einleitung	79
6.2. Glykopolymere auf Siliziumoberflächen	81
6.3. Glykopolymere auf Goldoberflächen	87
6.4. Glykopolymere auf optischen Mikroring-Resonatoren	91
6.5. Glykopolymere über „ <i>Grafting to</i> “ auf Goldoberflächen zur Anwendungen in SPR-Messungen	97
6.6. Zusammenfassung	107
6.7. Experimenteller Teil	108
6.7.1. Glykopolymere auf Oberflächen	108
6.7.1.1. Polymerbürsten auf Oberflächen über „ <i>Grafting from</i> “	108
6.7.1.1.1. Anbindung der Initiatoren auf den Oberflächen	108
6.7.1.1.1.1. Aufbringen des Initiators auf Siliziumoberflächen/Si ₃ N ₄ -Oberflächen	108
6.7.1.1.1.2. Aufbringen des Initiators auf Goldoberflächen	108
6.7.1.1.1.3. Aufbringen des Initiators auf Oberflächen über einen Stempelprozess	108
6.7.1.1.2. Polymerisation der Polymerbürsten auf die Oberflächen über „ <i>Grafting from</i> “	109
6.7.1.1.3. Synthese von Glykopolymeren auf optischen Mikroring-Resonatoren	109
6.7.1.1.3.1. Bindungsanalyse für optische Mikroring-Resonatoren	109
6.7.1.2. Polymerbürsten auf Goldoberflächen über „ <i>Grafting to</i> “	110
6.7.1.3. Biologische Untersuchungen über SPR-Messungen	110
6.8. Literatur	111
7. Zusammenfassung und Ausblick	113
8. Anhang	115
8.1. Glykomonomere	115
8.2. Glykopolymere	129
8.3. Diblockcopolymeren	133
8.4. Glykopolymere auf Oberflächen	145

Zusammenfassung

Glykopolymere sind synthetische und natürlich vorkommende Polymere, die eine Glykaneinheit in der Seitenkette des Polymers tragen. Glykane sind durch die Glykan-Protein-Wechselwirkung verantwortlich für viele biologische Prozesse. Die Beteiligung der Glykanen in diesen biologischen Prozessen ermöglicht das Imitieren und Analysieren der Wechselwirkungen durch geeignete Modellverbindungen, z.B. der Glykopolymere. Dieses System der Glykan-Protein-Wechselwirkung soll durch die Glykopolymere untersucht und studiert werden, um die spezifische und selektive Bindung der Proteine an die Glykopolymere nachzuweisen. Die Proteine, die in der Lage sind, Kohlenhydratstrukturen selektiv zu binden, werden Lektine genannt.

In dieser Dissertationsarbeit wurden verschiedene Glykopolymere synthetisiert. Dabei sollte auf einen effizienten und kostengünstigen Syntheseweg geachtet werden.

Verschiedene Glykopolymere wurden durch funktionalisierte Monomere mit verschiedenen Zuckern, wie z.B. Mannose, Laktose, Galaktose oder *N*-Acetyl-Glukosamin als funktionelle Gruppe, hergestellt. Aus diesen funktionalisierten Glykomonomeren wurden über ATRP und RAFT-Polymerisation Glykopolymere synthetisiert.

Die erhaltenen Glykopolymere wurden in Diblockcopolymeren als hydrophiler Block angewendet und die Selbstassemblierung in wässriger Lösung untersucht. Die Polymere formten in wässriger Lösung Mizellen, bei denen der Zuckerblock an der Oberfläche der Mizellen sitzt. Die Mizellen wurden mit einem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff beladen, wodurch die CMC der Mizellenbildung bestimmt werden konnte.

Außerdem wurden die Glykopolymere als Oberflächenbeschichtung über „*Grafting from*“ mit SI-ATRP oder über „*Grafting to*“ auf verschiedene Oberflächen gebunden. Durch die glykopolymerbeschichteten Oberflächen konnte die Glykan-Protein-Wechselwirkung über spektroskopische Messmethoden, wie SPR- und Mikroring-Resonatoren untersucht werden. Hierbei wurde die spezifische und selektive Bindung der Lektine an die Glykopolymere nachgewiesen und die Bindungsstärke untersucht.

Die synthetisierten Glykopolymere könnten durch Austausch der Glykaneinheit für andere Lektine adressierbar werden und damit ein weites Feld an anderen Proteinen erschließen. Die bioverträglichen Glykopolymere wären alternativen für den Einsatz in biologischen Prozessen als Transporter von Medikamenten oder Farbstoffe in den Körper. Außerdem könnten die funktionalisierten Oberflächen in der Diagnostik zum Erkennen von Lektinen eingesetzt werden. Die Glykane, die keine selektive und spezifische Bindung zu Proteinen eingehen, könnten als antiadsorptive Oberflächenbeschichtung z.B. in der Zellbiologie eingesetzt werden.

Abstract

Glycopolymers are synthetic and naturally occurring polymers that carry a glycan unit in the side chain of the polymer. Glycans are responsible for many biological processes due to the glycan-protein interaction. The involvement of glycans in these biological processes enables the imitation and analysis of interactions by suitable model compounds, e.g. glycopolymers. This system of glycan-protein interaction will be investigated and studied by glycopolymers in order to demonstrate the specific and selective binding of proteins to glycopolymers. The proteins that are able to selectively bind carbohydrate structures are called lectins.

In this dissertation different glycopolymers were synthesized. Care should be taken to ensure an efficient and cost-effective synthesis route.

Different glycopolymers were produced by functionalized monomers with different sugars, such as mannose, lactose, galactose or *N*-acetyl-glucosamine as functional group. From these functionalized glycomonomers, glycopolymers were synthesized via ATRP and RAFT polymerization.

The glycopolymers obtained were used as hydrophilic blocks in diblock copolymers and self-assembly in aqueous solution was investigated. In aqueous solution, the polymers formed micelles in which the sugar block sits on the surface of the micelles. The micelles were loaded with a hydrophobic fluorescent dye, which made it possible to determine the CMC of micelle formation.

In addition, the glycopolymers were bound to various surfaces as surface coatings via "grafting from" with SI-ATRP or via "grafting to". Through the glycopolymer-coated surfaces, the glycan-protein interaction could be investigated by spectroscopic measurement methods such as SPR and microring resonators. The specific and selective binding of lectins to the glycopolymers was detected and the binding strength was investigated.

The synthesized glycopolymers could become addressable for other lectins by exchanging the glycan unit and thus open up a broad field of other proteins. The biocompatible glycopolymers would be an alternative for use in biological processes as transporters of drugs or dyes into the body. In addition, the functionalised surfaces could be used in diagnostics for recognition of lectins. The glycan, which do not bind selectively and specifically to proteins, could be used as anti-adsorptive surface coatings, e.g. in cell biology.

Abkürzungsverzeichnis

6-O-MMAGlc	Methyl-6-O-methacryloyl- α -D-glukosid
ABCVA	4,4'-Azobis-(4-cyan-valeriansäure)
Ac-GlcNAc-Cl	Acetyl-N-acetylglukosamin-chlorid
Ac-GlcNAcEMA	Acetyl-N-acetylglukosaminethylmethacrylat
bpy	2,2'-Bipyridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Con A	Concanavalin A
CPT	Dithio-4-cyan-4-(thiobenzoylthio)-pentansäure
DCM	Dichlormethan
DEAEAB	N-(2-diethylamino)ethyl-4-aminobenzamid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Erythrina Cristagalli Lektin
Gal	Galaktose
GalAMA	Galaktosemethacrylamid
GalNH ₂	1-Amino-1-deoxy- β -D-galaktose
GAMA	2-Glukonamidoethylmethacrylat
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GlcNAcEMA	N-Acetylglukosaminethylmethacrylat
GS-II	Lektin II aus Griffonia Simplicifolia
HEMA	2-Hydroxymethylmethacrylat
Lac	Laktose
LacAEMA	Laktosaminethylmethacrylat
LacAMA	Laktosemethacrylamid
LAMA	2-Lactobionamidoethylmethacrylat
MA	Methylacrylat
MAGlu	2-(D-Glukopyranosyloxy)ethylmethacrylat
Man	Mannose
ManAMA	Mannosemethacrylamid
MAIGlc	3-O-Methacryloyl-1,2,5,6-di-O-isopropyliden- α -D-glukofuranose
ManNH ₂	1-Amino-1-deoxy- β -D-mannose
MEK	Methylethylketon
MeOH	Methanol
MMA	Methylmethacrylat
NaOH	Natriumhydroxid
BA	n-Butylacrylat
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)
PEI	Poly(ethylenimin)
PET	Poly(ethylenterephthalat)

PHEMA- <i>b</i> -PGlcNAcEMA	Poly(2-hydroxymethylmethacrylat)- <i>block</i> -poly(<i>N</i> -acetylglukosaminethylmethacrylat)
PHEMA- <i>b</i> -PLacAEMA	Poly(2-hydroxymethylmethacrylat)- <i>block</i> -poly(laktoseaminethylmethacrylat)
PLacAEMA	Poly(laktoseaminethylmethacrylat)
PLAMA	Poly(2-lactobionamidoethylmethacrylat)
PMA	Poly(methylacrylat)
P(MAIGlc)	Poly(3-O-methacryloyl-1,2,5,6-di-O-iopropyliden-D-glukofuranose)
P(MeOEGMA)	Poly(ethylenglykol)-methylether-methacrylat
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
PMMA- <i>b</i> -PManAMA	Poly(methylmethacrylat)- <i>block</i> -poly(mannosemethacrylamid)
PMMA- <i>b</i> -PHEMA	Poly((methylmethacrylat)- <i>block</i> -(2-hydroxy methylmethacrylat))
PS	Poly(styrol)
THF	Tetrahydrofuran
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>

μCP	Mikrokontaktdruck
ATRP	<i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>
CA	<i>Contact Angle</i>
CMC	<i>Critical Micellization Concentration</i>
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
CFRP	<i>Controlled Free Radical Polymerization</i>
CTA	<i>Chain Transfer Agent</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
ESI MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR-Spektroskopie	Infrarotspektroskopie
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
Kryo-REM	Kryo-Rasterkraftmikroskop
NMP	<i>Nitroxide-mediated polymerization</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
RAFT	<i>Reversible Addition-Fragmentation Chain-Transfer</i>
SFM	<i>Scanning Force Microscopy</i>
SI-ATRP	<i>Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
XPS	<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>
EIS	Elektrochemische Impedanzspektroskopie

d	duplett
J	Kopplungskonstante
m	multiplett
q	quartett
s	singulett
t	triplett

1. Einleitung

1.1. Glykobiologie

Der Begriff Glykobiologie wurde in den 1980er Jahren geprägt.^[1] Die Glykobiologie fasst die zwei Wissenschaftsdisziplinen Zuckerchemie und Biochemie zusammen.^[2] Dabei geht sie auf die zelluläre und molekulare Biologie von Kohlenhydratkomplexen, den Aufbau von Kohlenhydraten und die Wechselwirkung zwischen Kohlenhydraten und Proteinen ein.^[2-5] Kohlenhydrate werden auch als Glykane bezeichnet.^[2] Glykane sind Mono-, Oligo- und Polysaccharide^[6], die zu den diversesten und häufigsten Biopolymere der Natur, wozu auch Cellulose gehört, zählen.^[2] Die neun Monosaccharidbausteine der Glykosylierung in Vertebraten sind in Abbildung 1 dargestellt.^[6] Diese Monosaccharide können als Monomere für Oligo- und Polysaccharide eingesetzt werden, die verzweigt oder linear aufgebaut sein können.^[7] Polysaccharide entstehen durch die Verknüpfung von OH-Gruppen am anomeren C-Atoms eines Monosaccharids mit einer nicht anomeren OH-Gruppe eines anderen Monosaccharides. Diese Glykokonjugate kommen natürlich vor und werden durch enzymatische Reaktionen aufgebaut.^[2] Die natürlichen Kohlenhydratsequenzen sind verantwortlich für biologische Prozesse. So sind sie z.B. auf der Zelloberfläche gebunden und gehen dort Wechselwirkungen mit Proteinen (Lektinen) ein.^{[8][9]}

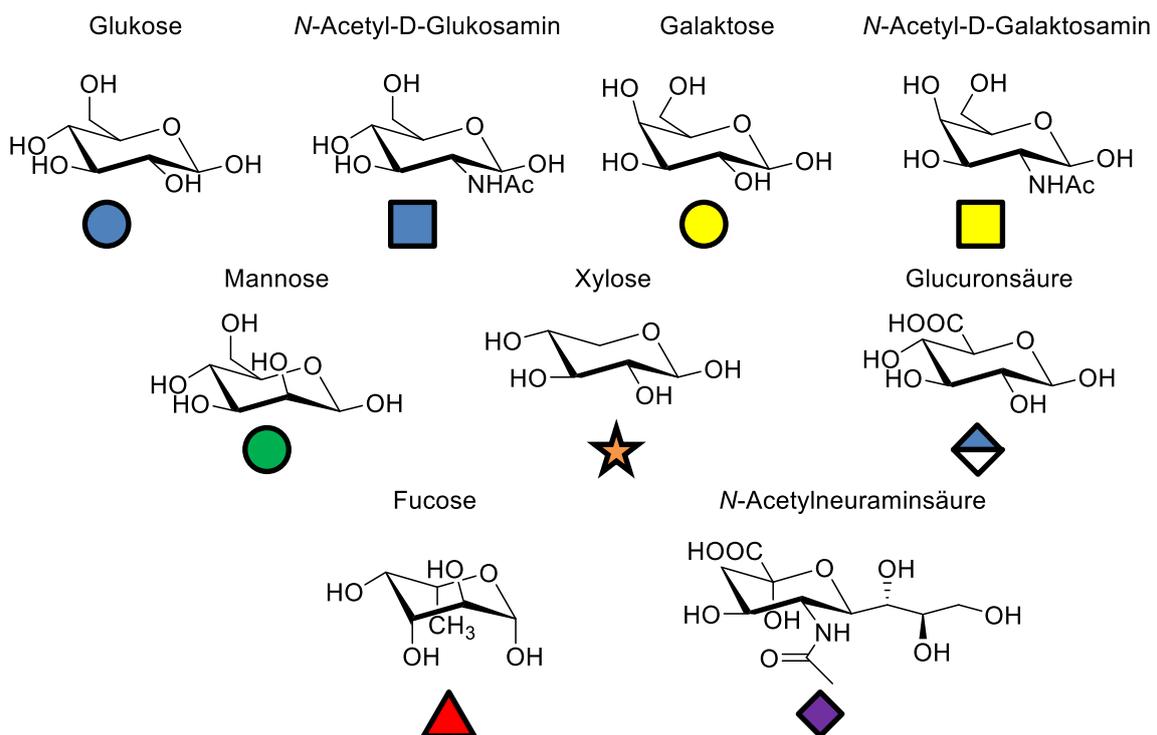


Abbildung 1: Strukturen der neun wichtigsten in Glykoproteinen vorkommenden Zuckern und die entsprechenden Symbole, die in der Glykobiologie als Abkürzung verwendet werden.^{[10][6]}

Lektine sind Proteine, die in der Lage sind Kohlenhydratstrukturen selektiv zu binden.^{[8][9][11]} Es gelingt ihnen, sich reversibel an Mono- und Oligosacchariden zu koppeln und sie sind in der Lage den „Glycocode“ der Glykane, der z.B. auf der Zelloberfläche gebildet wird, zu entschlüsseln. Diese Eigenschaften machen sie wertvoll und essenziell für viele biologische Prozesse z.B. die zelluläre Erkennung, die Adhäsion oder die Migration von Zellen. Eine Vielzahl dieser Lektine wurden bereits

aus Pflanzen, Tieren oder Bakterien isoliert und charakterisiert.^{[12][13]} Jedes Lektin besitzt eine oder mehrere Glykan-bindende Domänen. Diese sind bekannt als *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD) mit bis zu 200 Aminosäuren.^{[7][14][15]} Um den Bindungsmechanismus zu verstehen wurden mittels Röntgenstrukturanalyse kristallographische Untersuchungen durchgeführt. Diese Messungen zeigten, dass Lektine an ihren Liganden durch eine Kombination aus Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen, elektrostatischen Wechselwirkungen und Chelatisierung mit Ca^{2+} -Ionen binden. Die Wasserstoffbrückenbindungen werden über die Aminosäuren des Lektins mit den OH-Gruppen des Glykans ausgebildet. Außerdem können Wasserstoffbrückenbindungen auch mit Wassermolekülen der Umgebung und den CRDs der Lektine ausgebildet werden. Daraus resultiert, dass die Glykan-Lektin-Wechselwirkung, durch die Konkurrenz zu den Wasserstoffbrückenbindungen, die die CRDs mit den Wassermolekülen der Umgebung eingeht, schwach ist.^{[7][16]} Die schwache Bindungsstärke wurde in der Natur durch Generieren einer Multivalenz der Liganden kompensiert. Diese Multivalenz tritt zum Beispiel bei Glykoproteinen auf. Bei den Glykoproteinen sind mehrere gleiche Glykane vorhanden, die Wechselwirkungen zu den Lektinen eingehen können. Die Lektine binden mit den CRD an den Glykanen. Durch die Mehrfachbindung wird die Bindungsstärke erhöht. Das Phänomen wird „*cluster glycoside effect*“ genannt.^{[17][18]} Die ersten veröffentlichten Pflanzenproteine gehen auf das Jahr 1888 zurück und wurden von Hermann Stillmark dargestellt.^[16] Er berichtete in seiner Dissertationsarbeit von der Toxizität des *Ricinus communis*.^{[16][19]} Vor 1950 wurden Lektine ausschließlich aus Pflanzen isoliert und sie hatten die Fähigkeit Erythrozyten zu agglutinieren, weshalb sie „Hemagglutinine“ genannt werden. Mit der Entdeckung, dass einige Hemagglutinine eine Affinität und Selektivität zu Erythrozyten der menschlichen Blutgruppen aufweisen, wurde der Name Lektin (von lat.: *legere* – aussuchen) eingeführt.^{[19][20]}

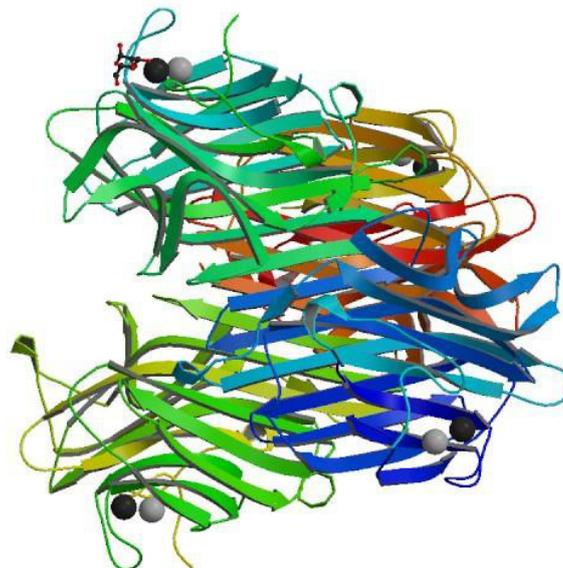


Abbildung 2: Kristallstruktur von Concanavalin A ConA-R1M.^[21]

Lektine werden in verschiedene Gruppen unterteilt. Eine Gruppe bilden die Pflanzenlektine, die wieder in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst Lektine, die von dem Samen der *Leguminosen* isoliert werden. Zu dieser Gruppe wird das bekannte Lektin *Concanavalin A* (*Con A*)

(**Abbildung 2**) zugeordnet, das stark Mannose und Glukose bindet. Die zweite Pflanzenlektin Gruppe sind die Lektine, die von dem Samen des Getreides isoliert werden. Das bekannteste Lektin dieser Gruppe ist das *Wheat Germ Agglutinin (WGA)*, das selektiv *N*-Acetylglukosamin und *N*-Acetylneuraminsäure bindet. Die andere Gruppe sind die Lektine, die aus Tieren isoliert werden. Die tierischen Lektine werden in drei Obergruppen unterteilt: Die *C-Typ* Lektine sind die größte Gruppe, die in drei Untergruppen unterteilt wird: *Endocytoc* Lektine, *Collectine* und *Selectine*. Bei den *C-Typ* Lektinen verläuft der Bindungsprozess über die Chelatisierung von Ca^{2+} -Ionen. Die zweite Gruppe sind die *P-Typ* Lektine mit dem Mannose-6-Phosphat Rezeptor als das bekannteste Beispiel. Die *S-Typ* Lektine beschreibt die dritte Gruppe, die auch Galektine genannt werden. Sie sind an der Zell-Adhäsion beteiligt und in vielen Zelltypen enthalten. Galektine binden spezifisch an β -Galaktose und einige sind in der Lage *N*-Acetylglukosamin zu erkennen.^{[12][7][22]}

Insgesamt werden Oligosaccharide häufig stärker gebunden als Monosaccharide. Von den neun Monosacchariden werden sieben von Lektinen erkannt: Mannose, Glukose, Galaktose, *N*-Acetylglukosamin, *N*-Acetylgalaktosamin, Fucose und *N*-Acetylneuraminsäure.^{[16][23]}

1.2. Glykopolymere

Glykopolymere sind natürliche oder synthetische Polymere, die Glykaneinheiten tragen. Diese sind in der Seitenkette des Polymers als funktionelle Gruppe enthalten.^[24] Dabei unterscheiden sich die Glykopolymere von Oligosacchariden, deren Hauptkette aus Glykaneinheiten besteht.^[25] Die Glykopolymere können als Makromoleküle in verschiedenen Strukturen und Architekturen auftreten (**Abbildung 3**). Sie können als lineare Glykopolymere, Blockcopolymere, in Sternpolymer oder strukturiert/assembliert in Mizellen und Vesikeln vorkommen. Des Weiteren können sie als Oberflächenfunktionalisierung, gebunden auf Oberflächen oder Partikeln, benutzt werden.^{[22][26][27][7]}

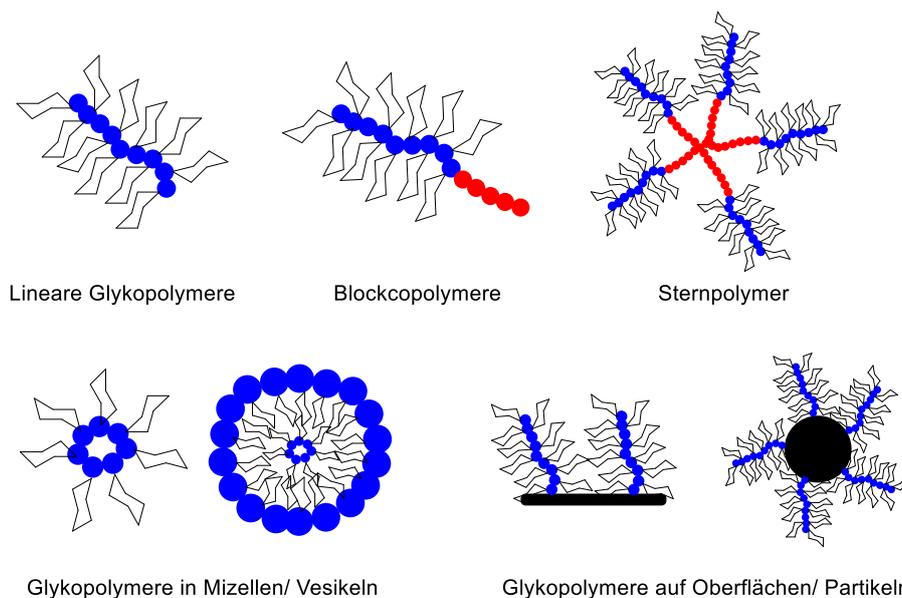


Abbildung 3: Verschiedene Architekturen in denen die Glykopolymere vorkommen können. Sie können als lineare Glykopolymere, Blockcopolymere, in Sternpolymeren, strukturiert/assembliert in Mizellen und Vesikeln oder als Oberflächenfunktionalisierung, gebunden auf Oberflächen oder Partikeln, vorkommen.

Glykane gehen mit Proteinen eine spezifische und selektive Wechselwirkung ein.^{[28][29]} In der Natur ist diese Glykan-Protein-Wechselwirkung verantwortlich für viele biologische Prozesse, die zelluläre Erkennung, die Adhäsion und die Ansteckung mit Pathogenen.^[30] Durch Glykopolymeren können diese natürlichen Prozesse nachgeahmt werden und die Wechselwirkung genauer untersucht werden.^[25] In Glykopolymeren werden mehrere Glykane eingebaut und so eine Multivalenz generiert, welche die Stärke der Glykan-Protein-Wechselwirkung erhöht. Die Proteine binden stärker an den Glykan-basierten Strukturen und der sogenannte „*cluster glycoside effect*“ tritt auf.^{[18][24]} Dieser Effekt wird vor allem in der Natur ausgenutzt. Hier werden Glykoproteine und Glykolipide aus Glykanen aufgebaut und diese können natürliche Prozesse eingehen.^{[31][17]} Glykane sind als Glykokonjugate auf der Zelloberfläche vorhanden und wechselwirken dort mit Lektinen. Die Wechselwirkungen dieser zwei Biomoleküle in Entschlüsselungs- und Erkennungsprozessen eine zentrale Rolle.^[32]

Glykopolymeren können über zwei Synthesestrategien hergestellt werden: a) Die polymeranaloge Umsetzung durch Additions-Reaktionen oder b) die direkte Polymerisation von Glykomonomeren.^{[33][34]} Die häufig verwendete Synthesestrategie von Glykopolymeren ist die *Controlled Free Radical Polymerization* (CFRP).^[35] In dieser Dissertation werden die CRP Arten, *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP)^{[36][37]} und *Reversible Addition-Fragmentation Chain-Transfer* (RAFT)^{[38][39]} Polymerisation angewendet. Die Vorteile der CFRP ist die hohe Toleranz vieler Lösungsmittel und funktioneller Gruppen. Als Folge können Polymere mit definierter Kettenlänge und kleinem Polydispersitätsindex synthetisiert werden.^{[40][25]} Glykopolymeren können in Lösung als Homopolymere und Blockcopolymer synthetisiert werden.^{[41][42][43]}

Eine wichtige Anwendung der Glykopolymeren ist die Oberflächenbeschichtung.^{[44][45]} Diese Reaktion kann über CFRP in drei unterschiedlichen Formen ablaufen: a) „*Grafting from*“, b) „*Grafting to*“ und c) „*Grafting through*“. Die „*Grafting from*“ Methode verläuft über eine direkte Polymerisation des Glykopolymeren auf der Oberfläche.^[46] Die Bürstendichte ist bei der „*Grafting from*“-Methode sehr hoch.^[47] Die „*Grafting to*“-Methode verläuft über eine kovalente Verknüpfung eines Polymeren über eine Endgruppe an die Oberfläche.^[48] Die Bürstendichte ist bei der „*Grafting to*“-Methode durch sterische Hinderung weniger dicht.^[46] Bei der „*Grafting through*“-Methode werden Monomere auf der Oberfläche gebunden und durch die Polymerisation eingebaut.^{[49][50]}

Die Morphologie der gebundenen Polymeren auf der Oberfläche ändert sich mit der Bürstendichte und dem Lösungsmittel (**Abbildung 4**).^[51] Die Polymeren interagieren mit dem Lösungsmittel der Umgebung. Die Konformation der Polymeren in Lösung hängt von der Kettensteifheit, dem Polymerisationsgrad und der Qualität des Lösungsmittels ab. Der Parameter für die Qualität des Lösungsmittels beinhaltet die Monomer/Lösungsmittel-Wechselwirkung. Wenn die Wechselwirkung zwischen Monomer und Lösungsmittel dominiert und die Ketten sich trotz Entropieverlust strecken, handelt es sich um ein gutes Lösungsmittel. Hier liegt eine ausgeweitete, entspannte Knäuelstruktur der Polymeren vor.^[51] In einem gutem Lösungsmittel strecken sich die Polymerbürsten aus, damit ein großer Kontakt zum Lösungsmittel besteht und eine „*Mushroom*“-Struktur wird gebildet (**b**). Wird die Polymerbürstendichte erhöht, steigt auch der osmotische Druck entlang der Polymerbürsten und sie strecken sich weiter (**a**). Die Polymeren kollabieren und formen eine dichte Knäuelstruktur, wenn der Kontakt des Monomers zum Lösungsmittel minimiert werden soll. Hier liegt ein schlechtes

Lösungsmittel für die Polymere vor.^[51] In einem schlechten Lösungsmittel kollabieren auch die Polymerbürsten auf die Oberflächen und bilden eine oberflächennahe Knäuelstruktur, um weniger Kontakt zum Lösungsmittel zu haben (c).^[51-54]

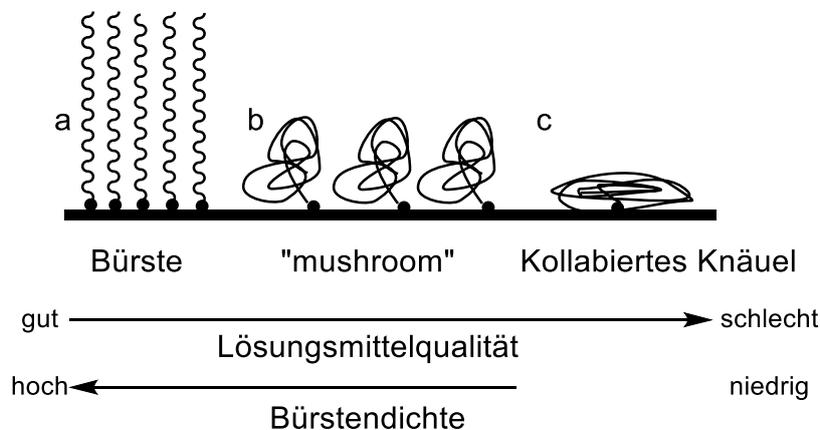


Abbildung 4: Darstellung der Bürstenmorphologie auf der Oberfläche in Abhängigkeit der Dichte und des Lösungsmittels, a) die Streckung der Polymerbürsten mit Erhöhung der Polymerbürstendichte auf der Oberfläche, b) „Mushroom“ Struktur, bei der ein gutes Lösungsmittel vorliegt und die Polymerbürsten sich strecken, c) oberflächennahe Knäuelstruktur, bei der ein schlechtes Lösungsmittel vorliegt und die Polymerbürsten kollabieren.

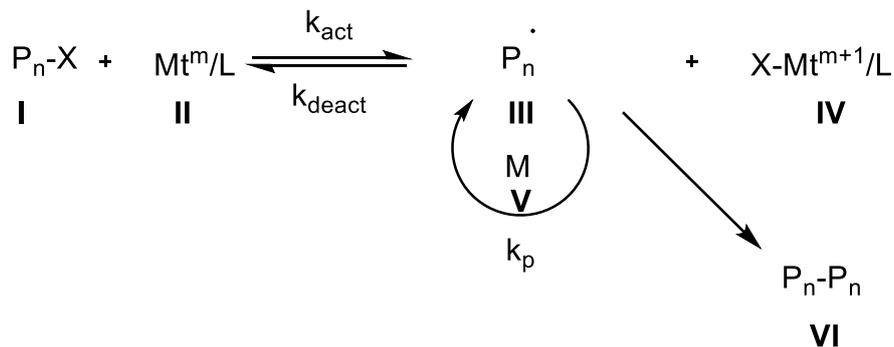
Die Biokompatibilität und Biofunktionalität machen die Glykopolymere interessant für Materialwissenschaften.^{[55-57][30]} Dort können sie als Oberflächenfunktionalitäten und als Biopolymere eingesetzt werden.^[58] Außerdem findet sich ein großes Anwendungsgebiet in den Lebenswissenschaften sowie in der medizinischen Diagnostik. Darüber hinaus können Glykopolymere bei Einkapselungsprozessen für den Transport und die Freisetzung von Wirk- und Farbstoffen genutzt werden.^{[36][40]}

1.3. Polymerisationsstrategien

1.3.1. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)

Die *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP) ist eine der meist untersuchten und genutzten kontrollierten Polymerisationsarten.^[59] Die ersten Untersuchungen wurden im Jahr 1995 von den Arbeitsgruppen um Matyjaszewski *et al.*^{[60][61]} und Sawamoto *et al.*^[62] gemacht. Durch die ATRP-Reaktion konnten Makromoleküle mit definierten Molekulargewicht, Zusammensetzung und Funktionalität hergestellt werden. Die ATRP ist eine metallkatalysierte Polymerisation basierend auf Nickel oder Kupfer.^{[63][64]} Dabei ist der Kupferkatalysator der effizienteste für eine Vielzahl von Monomeren und zeigte eine breite Toleranz für unterschiedliche Lösungsmittel. Die ATRP ist eine Polymerisation, bei der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen über Radikaladdition aufgebaut werden.^[65] Ein vereinfachter Mechanismus der ATRP ist in Schema 1 dargestellt.^[59] Die ATRP wird durch das Gleichgewicht von inaktiver Spezies **I** und aktiver Spezies **III** kontrolliert. Dabei wird die inaktive Spezies mit Hilfe des Metallkomplexes **II** in die aktive Form umgewandelt. Diese Reaktion ist durch die Geschwindigkeitskonstante (k_{act}) charakterisiert. Der Metallkomplex **II** abstrahiert das Halogenid (**X**) an der inaktiven Spezies. Dadurch wird die radikalische Spezies **III** und der oxidierte Metallkomplex **IV** gebildet. In einer reversiblen Rückreaktion reagiert der Metallkomplex **IV** mit dem Radikal **III** und die

inaktive Spezies entsteht mit einer Geschwindigkeitskonstante von (k_{deact}). Ist die ATRP im aktiven Zustand **III** kann ein Monomer **VI** mit der Geschwindigkeitskonstante der Propagation (k_p) an das Radikal **III** addiert werden und die Polymerisation startet. Ein Reaktionsabbruch **VI** entsteht durch Radikalkopplung oder Disproportionierung (k_t).^[66-68] Damit eine effektive Kontrolle der Polymerisation möglich ist, muss das Gleichgewicht auf der Seite der inaktiven Spezies liegen und die Abbruchreaktionen müssen unterdrückt werden. Weiter muss die Geschwindigkeit des Austausches von (k_{act}) zu (k_{deact}) schneller als (k_p) sein, damit alle Polymerketten Monomere addieren können. Sind diese Faktoren gegeben, liegt eine kontrollierte radikalische Polymerisation vor, bei der das Molekulargewicht eingestellt werden kann.^[69]



Schema 1: Mechanismus des ATRP-Gleichgewichts. Die ATRP wird durch ein Gleichgewicht von inaktiver I und aktiver Spezies III kontrolliert. ^[59]

Bei einer idealen ATRP wird der Polydispersitätsindex von der Konzentration der inaktiver Spezies **I** und dem oxidiertem Metallkomplex **IV**, der Geschwindigkeitskonstante der Propagation (k_p), der Geschwindigkeitskonstante der Deaktivierung (k_{deact}) und der Monomerumsetzung (**Gleichung a**) beeinflusst.^{[59][70]}

$$\frac{M_w}{M_n} = 1 + \frac{1}{DP_n} + \left(\frac{k_p[P_n X]}{k_{deact}[X-Cu^{II}/L]} \right) \left(\frac{2}{p} - 1 \right) \quad \text{(a)}$$

Gleichung **a** besagt, dass ein kleiner Polymerisationsindex und eine engere Molekulargewichtsverteilung erreicht wird, wenn bei dem gleichen Monomer, der Katalysator den Kettenaufbau schneller deaktiviert und ein kleinere k_p/k_{deact} resultiert. Dies kann durch Erhöhung der Konzentration des oxidierten Metallkomplexes **IV** und durch Reduzierung der Konzentration der inaktiven Spezies beeinflusst werden, was einen höheren Umsatz bewirkt.^[59]

Die ATRP wurde im Laufe der Jahre für viele Monomerarten getestet. Dabei sind die typischen Monomere die, die das Radikal stabilisieren können z.B. Styrol, Methacrylat, Acrylat oder (Meth)acrylamid.^[67] Dabei wird die Polymerisation vom Initiator, dem Katalysator, dem Lösungsmittel, der Temperatur und der Reaktionszeit beeinflusst. Für eine kontrollierte und erfolgreiche ATRP müssen die Faktoren für jedes Monomer neu eingestellt werden. Durch die ATRP konnten verschiedene Polymerarten, Homopolymere, Blockpolymere, Copolymere und sternförmige Polymere mit verschiedener Zusammensetzung und Architektur hergestellt werden.^[59]

Zwei der häufigsten Monomere, die mit ATRP polymerisiert werden, sind 2-Hydroxymethylmethacrylat (HEMA) und Styrol. Weiter wurden häufig Blockpolymere über ATRP hergestellt. Dabei wurde ein Polymerblock durch die Addition des Halogenids im zweiten Polymerisationsschritt als Makroinitiator verwendet. Beers *et al.* polymerisierten HEMA als Homopolymere über ATRP.^[71] Sie variierten das Initiator- zu Monomer-Verhältnis und erhielten Homopolymer mit kontrolliertem Molekulargewicht und kleiner Polydispersität. Ein gemischtes Lösungsmittelsystem von Methylethylketon/1-Propanol (70/30), eine geringe Reaktionstemperatur von 50 °C und ein Kupferkatalysator mit 2,2'-Bipyridin als Ligand wurde als beste Bedingungen herausgestellt. Außerdem polymerisierten sie das Blockcopolymer (PMMA-*b*-PHEMA) mit Poly(methylmethacrylat) PMMA als Makroinitiator. Robinson *et al.* publizierten die Polymerisation von PHEMA über ATRP.^[72] Matyjaszewski *et al.* polymerisierten Styrol über ATRP und erhielten ein definiertes Polymer mit einer Polydispersität von kleiner als 1,10.^[70] Sie stellten heraus, dass das Molekulargewicht proportional zum Monomer/Initiator-Verhältnis steigt. Außerdem verläuft die Polymerisation nach einer Kinetik erster Ordnung unter Beachtung der Monomerkonzentration. Shipp *et al.* stellten Blockcopolymere mit Methylmethacrylat (MMA), *n*-Butylacrylat (BA) oder Methylacrylat (MA) über ATRP her.^[73] Dabei betrachteten sie die Funktionalität der Monomere und die Initiierungseffektivität des Makroinitiators. Eine kontrollierte und effektive Polymerisation von PMMA, Polystyrol (PS) und Poly(methylacrylat) (PMA) über ATRP wurde von Haddleton *et al.* publiziert.^[74] Sie nutzten die Polymere als Makroinitiatoren um Triblockcopolymere herzustellen.

1.3.2. Glykopolymere über ATRP

Die Synthese von Glykopolymeren kann über die ATRP-Methode dargestellt werden.^[36] Im Jahr 1998 synthetisierte Ohno *et al.* ein Glykopolymer über ATRP.^[37] Sie stellten ein Polymer aus einem Methacrylat, das eine Glukoseeinheit trägt, namens Poly(3-O-methacryloyl-1,2,5,6-di-O-isopropyliden-D-glukofuranose) (PMAIGlc) dar. Des Weiteren synthetisierten Sie ein Diblockcopolymer (PS-*b*-PMAIGlc) mit Polystyrol als Makroinitiator. Sie erhielten eine enge Molekulargewichtsverteilung. Muthukrishnan *et al.* berichteten von linearen und verzweigten Glykopolymeren über ATRP.^{[75][76]} Sie polymerisierten ein 3-O-Acryloyl-1,2,5,6-di-O-isopropyliden- α -D-glukofuranose und 3-O-Methacryloyl-1,2,5,6-di-O-isopropyliden- α -D-glukofuranose (MAIGlc) als Homopolymer und erreichten hohe Molekulargewichte und kleine Polydispersitäten. Diese Polymerisationen können mit Hilfe von geschützten Monomeren durchgeführt werden. Durch anschließende Entschützung konnten wasserlösliche Glykopolymere erhalten werden.

Narai und Armes *et al.* präsentierten Glykan-basierte Homo- und Blockcopolymere auf der Basis von Methylmethacrylat, die über ATRP hergestellt wurden.^{[41][77][78]} Sie synthetisierten zwei Homopolymere mit Glukose (2-Glukonamidoethylmethacrylat (GAMA)) und Laktose (2-Lactobionamidoethylmethacrylat (LAMA)) als Glykaneinheit. Dabei konnten sie die ungeschützten Monomere in wässrigem Medium polymerisieren. Durch die Wahl des Initiators können noch weitere funktionelle Gruppen an die Polymere hinzugefügt werden. Maynard *et al.* nutzten Biotin-markierte Initiatoren um Polymere und Glykopolymere herzustellen.^{[79][80]} So konnten Protein-Polymer-Konjugate über ATRP erhalten werden.

1.3.3. *Surface-Initiated-ATRP (SI-ATRP)*

In den letzten Jahren wuchs der Anspruch Polymere auf Oberflächen zu binden. Durch die Oberflächenmodifikation können die Eigenschaften der Oberflächen genau bestimmt und eingestellt werden. So können bioaktive Oberflächen realisiert werden. Eine Möglichkeit Polymere in hoher Dichte auf der Oberfläche kovalent zu binden, ist die *Surface-Initiated-ATRP (SI-ATRP)*.^[81] Dabei wird ein Initiator kovalent auf eine Oberfläche gebracht und die Polymerisation verläuft über einen „*Grafting from*“-Prozess auf der Oberfläche. Die Polymerisation startet, wie bei der ATRP, indem das Halogenid des Initiators mit dem Metallkomplex Cu(I) reagiert und zu Cu(II) oxidiert. Bei der SI-ATRP ist die Konzentration des vorhandenen Initiators auf der Oberfläche nicht ausreichend, um den Aktivierungsschritt zu gewährleisten. Eine Möglichkeit wäre eine Konzentrationserhöhung des Cu(II)-Metallkomplexes. Jedoch wird die Zugabe eines zusätzlichen Initiators zur Polymerisationslösung am häufigsten angewandt. Dabei ist ein Vorteil, dass die Polymere sowohl auf der Oberfläche, als auch in der Lösung entstehen. Die Charakterisierung der parallel entstehenden freien Polymere ist einfacher und lässt Rückschlüsse auf die Oberflächenpolymerisation zu.

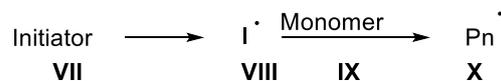
Im Jahre 2000 zeigten Fukuda *et al.* die Polymerisation eines Glykopolymeres Poly(3-O-Methacryloyl-1,2,5,6-di-O-isopropyliden-D-glukofuranose) P(MAIGlc) auf einer Siliziumoberfläche über SI-ATRP.^[82] Sie erhielten eine homogene Polymerschicht mit einer hohen Polymerdichte. Riedel *et al.* synthetisierten PHEMA über SI-ATRP auf einer Goldoberfläche.^[83] Sie generierten eine Oberfläche mit einer Polymerschicht von 25 nm. Diese Oberflächen nutzen sie um die antiadsorptive Beschaffenheit der Oberfläche zu untersuchen. Kuzmyn *et al.* untersuchten die Antiadsorptivität der Oberflächen.^[84] Dabei brachten sie Poly(ethylenglykol)methylethermethacrylat P(MeOEGMA) über SI-ATRP auf die Oberfläche und funktionalisierten die Polymerbürsten mit Bovines Serumalbumin (BSA). Ren *et al.* beschrieben die Synthese von Polymerbürsten mit einem Höhengradienten entlang der Oberfläche.^[85] Sie synthetisierten PHEMA über SI-ATRP auf die Oberfläche, indem sie die Reaktionszeiten auf der Oberfläche variierten. Yang *et al.* generierten lineare Poly(2-lactobionamidoethylmethacrylat) PLAMA und PHEMA und kammförmige PLAMA Polymere auf einer Polyethylenterephthalat (PET) Oberfläche.^[86] Sie nutzen die Oberfläche um Proteinadsorption zu untersuchen.

1.3.4. *Reversible Addition-Fragmentation Chain-Transfer Polymerization (RAFT)*

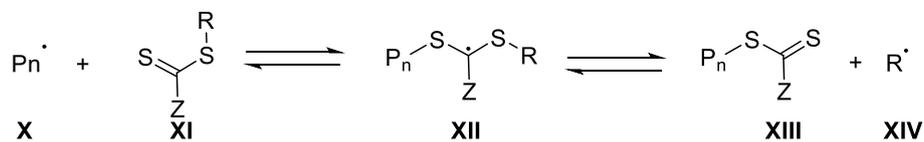
Eine zweite wichtige lebende Polymerisationsstrategie ist die *Reversible Addition-Fragmentation Chain-Transfer* Polymerisation (RAFT). Seit der ersten Erwähnung im Jahr 1998 wurde die RAFT-Polymerisation immer mehr angewendet.^[87] Die Vorteile der RAFT-Polymerisation liegen in der Einstellung eines definierten Molekulargewichts, dem Erreichen einer kleinen Polydispersität, der Möglichkeit des kontrollierten und kontinuierlichen Kettenwachstums und der Tolerierbarkeit von funktionellen Gruppen.^[88] Der Mechanismus der RAFT-Polymerisation ist in Schema 2 dargestellt. Er verläuft über einen Kettentransfer, der auf einem Gleichgewicht von aktiver und inaktiver Spezies beruht. Im ersten Schritt startet die Initiierung. Dabei wird ein Initiator **VII**, durch den Abgang des

Halogenids radikalisiert **VIII**, ein Monomer **IX** addiert sich und startet das Kettenwachstum. Es entsteht eine radikalisiertes Polymer **X**. Der zweite Schritt besteht in der Additions-Fragmentierung. Dabei addiert sich das Radikal **X** an den RAFT-Agent **XI** und ein Gleichgewicht zwischen aktiver **XI**, **XIII** und inaktiver Spezies **XII** stellt sich ein (Additions-Fragmentierung/ Degenerative Kettenübertragung). Durch die Entstehung einer Abgangsgruppe **XIV** wird im dritten Schritt, die Reinitiiierung, ein neues Polymerradikal **XV** generiert. Der eigentliche RAFT-Mechanismus ist die Kettenübertragung (Schritt 4). Hier stellt sich das Gleichgewicht zwischen aktiver **XIII**, **XVII** und inaktiver Spezies **XVI** ein. An die Polymerradikale **XV**, **X** können neue Monomere addieren **IX** und ein Kettenwachstum läuft ab. Die RAFT-Polymerisation kann durch Terminierungsreaktionen abgebrochen werden.^{[88][89][65][68]}

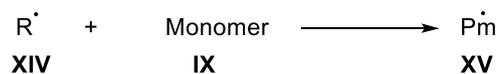
1. Initiierung



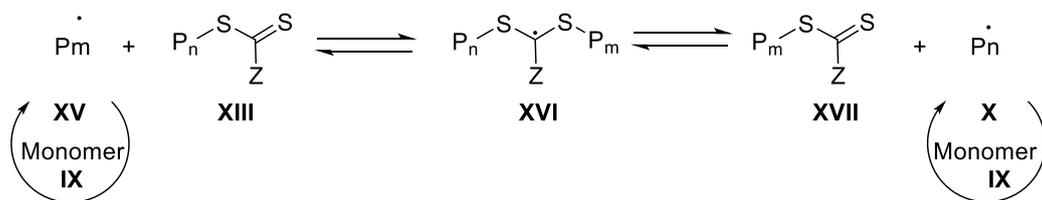
2. Additions-Fragmentierung



3. Reinitiiierung



4. Degenerative Kettenübertragung



Schema 2: Mechanismus des RAFT-Gleichgewichts. RAFT verläuft über einen Kettentransfer, der auf einem Gleichgewicht von aktiver und inaktiver Spezies beruht. Der erste Schritt ist die Initiierung, der zweite Schritt ist die Additions-Fragmentierung, der dritten Schritt ist die Reinitiiierung, und der vierte Schritt ist die Kettenübertragung, der eigentliche RAFT-Mechanismus.^[65]

Eine erfolgreiche Polymerisation über RAFT, setzt die Wahl der richtigen RAFT-Agentien voraus. Dabei bestimmen die Abgangsgruppe (R) und die reaktive Gruppe (Z) die Effektivität des RAFT-Agens für verschiedene Monomere. Für die Polymerisationen werden meist Dithio- oder Trithio-RAFT-Agentien ausgewählt. Für eine ideal lebende RAFT-Polymerisation muss das RAFT-Agens ein guter *Chain Transfer Agent* (CTA) sein.^[90]

Durch die RAFT-Polymerisation konnten auch aktive Monomere polymerisiert werden. Im Jahr 1998 erwähnten Thang *et al.* eine neue lebende freie radikalische Polymerisation.^[87] Sie polymerisierten verschiedene Monomere: MMA, Styrol, Acrylsäurebutylester und Acrylsäure. Dabei stellten sie heraus, dass der RAFT-Prozess vorteilhaft in der Einstellung des Molekulargewichts und der engen

Polydispersität ist. Putnam *et al.* synthetisierten ein MMA Polymer über RAFT-Polymerisation.^[91] Sie erreichten enge Molekulargewichtsverteilungen von $\sim 1,13$ und testeten verschiedene Lösungsmittel, Monomerkonzentrationen und pH-Werte. Sie zeigten, dass in einem Wasser/1,4-Dioxan-Gemisch eine kontrollierte Polymerisation mit enger Molekulargewichtsverteilung und hohem Umsatz stattfindet. Charleaux *et al.* polymerisierten MMA über RAFT in Wasser.^[92] Dabei nutzen sie ein Trithio-RAFT-Agens und zeigten, dass eine kontrollierte Polymerisation und ein Polymerisationsindex von 1,19 erreicht werden konnte. Acrylamid konnte ebenfalls über RAFT in wässrigem Medium polymerisiert werden. Mc Cormick *et al.* erreichten einen moderaten Umsatz von 28 % und eine enge Molekulargewichtsverteilung von 1,26 nach einer Reaktionszeit von 24 h.^[93] Barner-Kowollik *et al.* synthetisierten über „*Grafting from*“ PHEMA-Bürsten auf Oberflächen mittels RAFT.^[94] Sie generierten PHEMA-Bürsten von 50 nm auf der Oberfläche und nutzten diese für Ablagerungsexperimente. Loewe *et al.* synthetisierten Polymere über RAFT direkt in Wasser.^[95] Sie erreichten Umsätze von 90 % und kleine Polydispersitäten von bis zu 1,08. Außerdem brachten sie Polymere über Reduktion der Dithio-Gruppe zum Thiol über „*Grafting to*“ auf Goldoberflächen. Vana *et al.* synthetisierten Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAm) über RAFT mit einem Trithio-RAFT-Agens.^[96] Über das Trithio-RAFT-Agens konnten sie das Polymer, durch Abspalten der Trithiocarbonat-Gruppe (TTC), auf Goldnanopartikel binden.

1.3.5. Glykopolymere über RAFT

Glykopolymere konnten auch über RAFT-Polymerisation hergestellt werden. Dabei wurden sie direkt im wässrigen Medium polymerisiert. Mc Cormick *et al.* synthetisierte im Jahr 2003 ein Glykopolymer über RAFT.^[99] Sie verwendeten das Monomer 2-(D-Glukopyranosyloxy)ethylmethacrylat (MAGlu) und ein Dithio-4-cyan-4-(thiobenzoylthio)-pentansäure (CPT) RAFT-Agens und polymerisierten direkt in wässriger Lösung. Sie erhielten Glykohomopolymere bei einer Reaktionszeit von 90 min mit 70 % Umsatz und einem Molekulargewicht von 20.900 g/mol und eine Polydispersität von 1,03. Bei einem Umsatz von 40 % erreichten sie ein Molekulargewicht von 14.200 g/mol und eine Polydispersität von 1,08. Davis *et al.* polymerisierten das Glykomonomer Methyl-6-*O*-methacryloyl- α -D-glukoside (6-*O*-MMAGlc) als Homo- und als Blockcopolymer mit PHEMA über RAFT.^[97] Sie polymerisierten das ungeschützte Monomer in einem Wasser/Ethanol-Gemisch mit (4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)-pentansäure als RAFT-Agens. Ein Glykopolymer mit einem Molekulargewicht von 22.000-70.000 g/mol und einer Polydispersität $< 1,10$ wurde erhalten. Anschließend wurde das Glykopolymer mit HEMA verlängert, um das Blockcopolymer P(6-*O*-MMAGlc)-*b*-PHEMA zu erhalten. Des Weiteren polymerisierte die Gruppe um Davis *et al.* 6-*O*-Vinyladipoyl-D-glukopyranose mit Dithiocarbamat als RAFT-Agens zum Homopolymer.^[98] Sie erreichten bei einer Konzentration des RAFT-Agens von 4,6 mM einen Umsatz von 27 %, ein Molekulargewicht von 19.600 g/mol und eine Polydispersität von 1,19.

1.4. Biosensoren

Biosensoren sind Sensorsysteme, die eine biologische Einheit besitzen. Sie werden als analytische Plattform genutzt, um die Anwesenheit von Biomolekülen oder chemischen Kontaminationen zu

detektieren.^[99] Die Biomoleküle sind Proteine, Enzyme, Nukleinsäuren oder einfach chemische Moleküle. Die detektierten Signale geben Auskunft über verschiedene Prozesse: Die Enzymkinetik, die Aktivität oder das Bindungsverhalten können untersucht werden. Diese Signale werden durch optische, elektrische oder thermische Sensoren detektiert.^[100] Bekannte Biosensoren sind z.B. Mikrofluidik und Nanofluidik Sensoren. Hierbei werden kleine Lösungsmittelvolumina über den Sensor geleitet. Die Sensoren detektieren die Adsorption der Biomoleküle.^[99-101] In dieser Dissertation werden Mikroring-Resonatoren und Goldoberflächen für Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) als Biosensoren angewendet.

Ein optischer Mikroring-Resonator besteht aus einem optischen Wellenleiter, einem ringförmigen Wellenleiter, dem Mikroring und einem Kopplungsmechanismus als Zugang zum Mikroring (**Abbildung 5**).^[102]

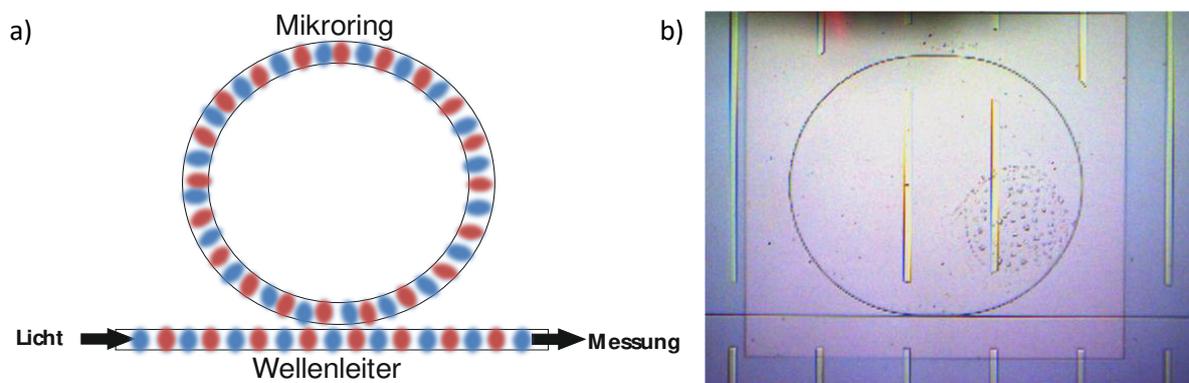


Abbildung 5: Mikroring-Resonator: a) schematische Darstellung eines Mikroring-Resonators, b) Mikroskopische Aufnahme des Mikroring-Resonators. Der Mikroring-Resonator besteht aus einem optischen Wellenleiter, einem ringförmigen Wellenleiter, dem Mikroring und einem Kopplungsmechanismus als Zugang zum Mikroring.

Polarisiertes Licht wird als Signal eingegeben und koppelt mit dem Mikroring. Eine Resonanz der optischen Wellenlänge wird als Antwortsignal detektiert. Die Welle des Lichtes verweilt auf dem Mikroring und bildet eine Phasenverschiebung von 2π pro ganze Runde aus.^[103] Die Qualität des Mikroring-Resonators wird beeinflusst durch die Dicke des Mikrorings, dem Durchmesser des Rings, der Bandbreite des Wellenleiters und dem Abstand zwischen Wellenleiter und Mikroring. Es konnte ein Faktor definiert werden, der die optischen Mikroring-Resonatoren miteinander vergleicht. Der Q-Faktor (Quality-Factor) ist definiert als:

$$Q = \frac{\lambda_r}{\delta\lambda} \quad (\mathbf{b})$$

mit λ_r als resonante Wellenlänge und $\delta\lambda$ als Spektrallinienbreite der Resonanz.^[104] Nur bei einer spezifischen Wellenlänge (λ_r) koppelt das Licht in den Mikroring. Diese ist definiert als

$$\lambda_r = \frac{2\pi r n_{eff}}{m} \quad (\mathbf{c})$$

mit r als Radius des Mikrorings, n_{eff} als der effektive Brechungsindex und m als die Zahl, die die Länge der Verweildauer der Welle auf dem Mikroring angibt.^{[104][105]} Ändert sich der Brechungsindex der

Oberfläche auf dem Mikroring, dann ändert sich auch der effektive Brechungsindex der sich ausbreitenden optischen Welle. Daraus resultiert eine Verschiebung in der Resonanz der Wellenlänge. Die Resonanz der Wellenlänge wird als Funktion der Zeit aufgenommen.^{[103][105]} Die Mikroring-Resonatoren ermöglichen es, Änderungen des Brechungsindex mit einer Sensitivität von bis zu 200 nm/RIU zu detektieren.^[106] Die gemessene Resonanzverschiebung der Wellenlänge ist proportional zu der Konzentration der Moleküle, die auf der Oberfläche adsorbieren. Die Funktionalisierung des Mikroring-Resonators und die dadurch bedingte Veränderung des Brechungsindex ermöglicht eine spezifische Detektion von adsorbierten Molekülen wie z.B. Proteine und Aptameren.^{[107][108]}

Oberflächenplasmonen sind elektromagnetische Wellen, die sich durch kollektive oszillierende freie Elektronen ausbreiten. Diese Elektronen werden an der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem dielektrischem Medium hervorgerufen.^{[109][110]} Wenn Oberflächenplasmonen optisch induziert werden, wird dieses Phänomen Oberflächenplasmonenresonanzen (SPR) genannt. Oberflächenplasmonen werden angeregt, indem ein einfallender Lichtimpuls mit dem Impuls der entstehenden Plasmonen gekoppelt wird. Das kann durch verschiedene Kopplungsmethoden stattfinden: dem Prisma, dem Wellenleiter oder der Reibung.^[109] Die am häufigsten verwendete Methode ist die Prismakopplung, diese Kopplung nutzt auch die bekannte Kretschmann-Methode aus.^[111] Polarisiertes Licht wird durch das Prisma auf die Metallschicht gestrahlt. Das Licht trifft in einem bestimmten Einfallswinkel auf die Metallschicht. Bei diesem Einfallswinkel wird das auftreffende Licht von den Oberflächenplasmonen absorbiert. Es resultierte eine Abnahme in der Intensität des zurückgestrahlten Lichtes (Resonanz).^[112] Der Einfallswinkel wird stark beeinflusst von den Brechungsindices, der auf der Oberfläche adsorbierten Moleküle. Da die Oberflächenplasmonen nur an der Oberfläche auftreten, können Adsorption oder Bindungsverhalten in einem Abstand von bis zu 200 nm von der Oberfläche untersucht werden.^[112] Die Funktionalisierung der Oberfläche und die Adsorption oder Bindung von Molekülen führt zu einer Änderung des Brechungsindex. Dadurch wird die Resonanz verändert und eine Verschiebung der Reflektion detektiert. Über die SPR können Bindungsverhalten z.B. von Proteinen zu Glykanen^[113] oder DNA zu Proteinen untersucht werden.^{[114][115][116]}

1.5. Motivation und Struktur der Dissertationsarbeit

Glykopolymere ermöglichen es die biologischen Prozesse von Glykanen zu imitieren und zu studieren. Die Glykan-Protein-Wechselwirkung ist verantwortlich für viele biologische Prozesse. Dieses System der Glykan-Protein-Wechselwirkung soll imitiert werden um Glykopolymere in Zukunft in Biosensoren, für Implantate oder als Transportmoleküle einzusetzen. Vorangegangene Arbeiten publizierten die Synthese von Glykopolymeren auf Oberflächen und in Mizellen und deren Wechselwirkung zu Lektinen.^{[58][117][118]} So publizierten Park *et al.*^[58] GlcNAc-basierte Glykopolymerbürsten, die über SI-ATRP auf Siliziumoberflächen synthetisiert wurden. Sie verlängerten die Glykaneinheit zu Di-, Tri-, Tetra-, Penta- und Hexasacchariden und testeten die Wechselwirkung zu ECL und GS-II. Lazar *et al.*^[117] nutzten glykopolymerbeschichtete Oberflächen, um die Lektinbindung mit elektrochemischer Impedanzspektroskopie (ESI) zu untersuchen. Sie zeigten eine Bindungskinetik von GS-II an PGlcNAcEMA über ESI. Des Weiteren synthetisierten Park *et al.*^[118] doppelt hydrophile Diblockglykopolymere Poly(2-hydroxyethylmethacrylat-*block-N*-acetylglucosaminethylmethacrylat) (PHEMA-*b*-PGlcNAcEMA) und formten Mizellen in wässriger Lösung. Sie zeigten eine spezifische Bindung der Mizellen zu GS-II. Die Mizellen konnten mit dem hydrophoben Farbstoff NileRed beladen werden und es konnte gezeigt werden, dass der Glykopolymerblock an der Außenseite der Mizelle sitzt. Diese Vorarbeiten dienten als Ausgangspunkt für die Dissertationsarbeit.

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, Glykopolymere über einen schnellen und kostengünstigen Syntheseweg herzustellen. Dabei sollte ein Glykopolymer mit definierten Polymerisationsgrad, die eine Zuckereinheit tragen, synthetisiert werden. Die Glykopolymere sollten aus einem bestehenden Glykomonomer polymerisiert werden, das über eine schnelle und kostengünstige Syntheseroute synthetisiert wurde. Die Multivalenz der so entstandenen Glykopolymere konnte ausgenutzt werden. Das ergab die Möglichkeit die Glykan-Protein-Wechselwirkung zu analysieren. Die synthetisierten Glykopolymere wurden als Homopolymere, als Diblockcopolymere und auf Oberflächen hergestellt. Außerdem wurde die Zuckereinheit durch verschiedene Zucker variiert. Es wurden Glykopolymere mit Mannose, Laktose, *N*-Acetylglucosamin und Galaktose synthetisiert. Die Polymerisationseigenschaften der unterschiedlichen Glykopolymere konnte untersucht werden. Darüber hinaus wurde die Anwendung als Transportmoleküle und als Biosensoren eruiert.

Kapitel 3 eruiert verschiedenen Synthesestrategien zur Herstellung von Glykomonomeren. Dabei wurde auf eine schnelle und kostengünstige Syntheseroute mit einer quantitativen Ausbeute geachtet. Vier verschiedene Syntheserouten wurden variiert und eine Optimierte herausgestellt.

In **Kapitel 4** werden unterschiedliche Synthesestrategien zur Herstellung von Glykopolymeren dargestellt. Aus den Glykomonomeren aus Kapitel 3 wurden Glykopolymere polymerisiert. Unterschiedliche Polymerisationsstrategien wie ATRP und RAFT wurden angewendet. Die Polymerisationskinetik der ATRP-Reaktion wurde für verschiedene Glykopolymere untersucht. Ein kommerziell erhältliches Polymer wurde nachträglich mit Glykanen in einer polymeranalogen Umsetzung funktionalisiert. Dadurch konnten große Mengen von Glykopolymeren erhalten werden.

Kapitel 5 untersucht die Verwendung von Glykopolymeren in Diblockcopolymeren. Verschiedene Diblockglykopolymere wurden synthetisiert und die Selbstassemblierung in wässriger Lösung untersucht. Die gebildeten Strukturen wurden mit einem hydrophoben Farbstoff beladen. Daraus konnte die mögliche Anwendung der Diblockglykopolymere als Transportmoleküle untersucht werden.

In **Kapitel 6** wurden die Glykopolymere über verschiedene Synthesestrategien auf unterschiedliche Oberflächen gebracht. Es wurde die Anbindungen an den unterschiedlichen Oberflächen untersucht. Außerdem wurde die biologische Anwendung über Glykan-Lektin-Wechselwirkungen getestet. Hierfür wurden Systeme wie der Mikroring-Resonator und die SPR verwendet und die mögliche Anwendung in Biosensoren untersucht. Die Messungen der Wechselwirkungen über die Mikroring-Resonatoren wurden in Kooperation mit dem Projektpartner Moritz Kleinert, M. Sc., am Heinrich-Hertz-Institut, Abteilung Photonische Komponenten durchgeführt. Der Projektpartner stellte die Mikroring-Resonatoren zur Verfügung und führte die laserbasierten Messungen durch.

1.6. Literatur

- [1] T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 785.
- [2] C.-W. v. d. Lieth, T. Lütteke, M. Frank, *Bioinformatics for glycobiology and glycomics*, Wiley-Blackwell, Chichester, Hoboken, NJ, **2009**.
- [3] N. Kresge, R. D. Simoni, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, H1-H108.
- [4] X. Lin, *Development* **2009**, *136*, 4072.
- [5] J. E. Hudak, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 16.
- [6] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger, (Eds.) *Essentials of glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **2017**.
- [7] T. K. Lindhorst, *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [8] H. Franz, *Naturwissenschaften* **1990**, *77*, 103.
- [9] G. Hermann, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **1980**, *105*, 1060.
- [10] A. Varki, R. D. Cummings, M. Aebi, N. H. Packer, P. H. Seeberger, J. D. Esko, P. Stanley, G. Hart, A. Darvill, T. Kinoshita, J. J. Prestegard, R. L. Schnaar, H. H. Freeze, J. D. Marth, C. R. Bertozzi, M. E. Etzler, M. Frank, J. F. Vliegthart, T. Lütteke, S. Perez, E. Bolton, P. Rudd, J. Paulson, M. Kanehisa P. Toukach K. Aoki-Kinoshita, A. Dell, H. Narimatsu, W. York, N. Taniguchi, S. Kornfeld, *Glycobiology* **2015**, *25*, 1323.
- [11] G. Uhlenbruck, *Naturwissenschaften* **1981**, *68*, 606.
- [12] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441.
- [13] F. Licastro, L. J. Davis, M. C. Morini, *Int. J. Biochem.* **1993**, *25*, 845.
- [14] M. Fukuda (Ed.) *Frontiers in molecular biology*, IRL Press, Oxford, **1994**.
- [15] B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaÿ, *Carbohydrates in chemistry and biology*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, **2000**.
- [16] N. Sharon, H. Lis, *Lectins*, Springer, Dordrecht, **2007**.
- [17] H. Schlaad, *Advances in Polymer Science* **2013**, *253*, 1.
- [18] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555.
- [19] E. J. M. van Damme, W. J. Peumans, A. Barre, P. Rougé, *Crit. Rev. Plant Sci.* **1998**, *17*, 575.
- [20] G. A. Andrews, P. S. Chavey, J. E. Smith, *Comparative Haematology International* **1992**, *2*, 68.
- [21] G. S. Chen, J. H. Gan, R. T. Hu, *Crystal structure of ConA-R1M*, **2018**.
- [22] S. R. S. Ting, M. H. Stenzel in *Polymer Chemistry Series* (Eds.: C. R. Becer, L. Hartmann), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 17–76.
- [23] N. Sharon, L. J. Goldstein, *zahlr. Abb. und Tab. Academic Press, Inc.* **1986**.
- [24] Y. Miura, *Polym. J.* **2012**, *44*, 679.
- [25] C. R. Becer, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 742.
- [26] V. Ladmiral, E. Melia, D. M. Haddleton, *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 431.
- [27] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.
- [28] H.-J. Gabius, *Naturwissenschaften* **1995**, *82*, 533.
- [29] G. Yilmaz, C. R. Becer, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2014**, *2*, 39.
- [30] Y. Miura, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 5031.
- [31] H.-J. Gabius, S. André, J. Jiménez-Barbero, A. Romero, D. Solís, *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 298.
- [32] T. K. Lindhorst in *Polymer Chemistry Series* (Eds.: C. R. Becer, L. Hartmann), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 1–16.

- [33] M. Hetzer, G. Chen, C. Barner-Kowollik, M. H. Stenzel, *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 119.
- [34] Q. Zhang, D. M. Haddleton in *Advances in Polymer Science* (Ed.: V. Percec), Springer International Publishing, Cham, **2013**, pp. 39–59.
- [35] S. G. Spain, M. I. Gibson, N. R. Cameron, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 2059.
- [36] Y. Miura, Y. Hoshino, H. Seto, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1673.
- [37] K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1998**, *36*, 2473.
- [38] A. Ghadban, L. Albertin, *Polymers* **2013**, *5*, 431.
- [39] A. B. Lowe, B. S. Sumerlin, C. L. McCormick, *Polymer* **2003**, *44*, 6761.
- [40] S. R. S. Ting, G. Chen, M. H. Stenzel, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1392.
- [41] R. Narain, S. P. Armes, *Chem. Commun.* **2002**, 2776.
- [42] S. G. Spain, L. Albertin, N. R. Cameron, *Chem. Commun.* **2006**, 4198.
- [43] O. León, V. Bordegé, A. Muñoz-Bonilla, M. Sánchez-Chaves, M. Fernández-García, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 3623.
- [44] R. Fleet, E. T. A. van den Dungen, B. Klumperman, *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 2191.
- [45] S. N. R. Kutcherlapati, R. Koyilapu, U. M. R. Boddu, D. Datta, R. S. Perali, M. J. Swamy, T. Jana, *Macromolecules* **2017**, *50*, 7309.
- [46] O. Azzaroni, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2012**, *50*, 3225.
- [47] I. Luzinov, S. Minko, V. V. Tsukruk, *Soft Matter* **2008**, *4*, 714.
- [48] B. Zdyrko, I. Luzinov, *Macromolecular rapid communications* **2011**, *32*, 859.
- [49] P. Datta, J. Genzer, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2016**, *54*, 263.
- [50] R. Mohammadi Sejoubasari, A. P. Martinez, Y. Kutes, Z. Wang, A. V. Dobrynin, D. H. Adamson, *Macromolecules* **2016**, *49*, 2477.
- [51] R. R. Bhat, M. R. Tomlinson, T. Wu, J. Genzer in *Advances in Polymer Science* (Ed.: R. Jordan), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2006**, pp. 51–124.
- [52] M. Stamm, *Polymer Surfaces and Interfaces*, Springer **2008**, 1.
- [53] Y. Mei, T. Wu, C. Xu, K. J. Langenbach, J. T. Elliott, B. D. Vogt, K. L. Beers, E. J. Amis, N. R. Washburn, *Langmuir* **2005**, *21*, 12309.
- [54] W.-L. Chen, R. Cordero, H. Tran, C. K. Ober, *Macromolecules* **2017**, *50*, 4089.
- [55] Y. Miura, H. Seto, T. Fuku in *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications* (Ed.: G. Radis-Baptista), InTech, **2013**.
- [56] L. Bes, S. Angot, A. Limer, D. M. Haddleton, *Macromolecules* **2003**, *36*, 2493.
- [57] S. R. S. Ting, E. H. Min, P. Escalé, M. Save, L. Billon, M. H. Stenzel, *Macromolecules* **2009**, *42*, 9422.
- [58] H. Park, R. R. Rosencrantz, L. Elling, A. Böker, *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 45.
- [59] K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2012**, *45*, 4015.
- [60] J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5614.
- [61] J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7901.
- [62] M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura, *Macromolecules* **1995**, *28*, 1721.
- [63] T. Pintauer, K. Matyjaszewski, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1087.
- [64] M. Kamigaito, T. Ando, M. Sawamoto, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3689.
- [65] J.M.G. Cowie, V. Arrighi, *Polymers. Chemistry and Physics of Modern Materials, Third Edition*, CRC Press, Hoboken, **2007**.
- [66] A. Khabibullin, E. Mastan, K. Matyjaszewski, S. Zhu in *Advances in Polymer Science* (Ed.: P. Vana), Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 29–76.
- [67] K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921.
- [68] G. Moad, D. H. Solomon, *The chemistry of radical polymerization*, Elsevier, Amsterdam, **2006**.

- [69] T. E. Patten, K. Matyjaszewski, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 901.
- [70] K. Matyjaszewski, T. E. Patten, J. Xia, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 674.
- [71] K. L. Beers, S. Boo, S. G. Gaynor, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1999**, *32*, 5772.
- [72] K. L. Robinson, M. A. Khan, M. V. de Paz Bañez, X. S. Wang, S. P. Armes, *Macromolecules* **2001**, *34*, 3155.
- [73] D. A. Shipp, J.-L. Wang, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1998**, *31*, 8005.
- [74] R. Whitfield, A. Anastasaki, V. Nikolaou, G. R. Jones, N. G. Engelis, E. H. Discekici, C. Fleischmann, J. Willenbacher, C. J. Hawker, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1003.
- [75] S. Muthukrishnan, G. Jutz, X. André, H. Mori, A. H. E. Müller, *Macromolecules* **2005**, *38*, 9.
- [76] S. Muthukrishnan, H. Mori, A. H. E. Müller, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3108.
- [77] R. Narain, S. P. Armes, *Macromolecules* **2003**, *36*, 4675.
- [78] R. Narain, S. P. Armes, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1746.
- [79] K. L. Heredia, H. D. Maynard, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 45.
- [80] V. Vázquez-Dorbatt, H. D. Maynard, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2297.
- [81] S. Pearson, G. Chen, M. H. Stenzel, *John Wiley & Sons, Inc.* **2010**, *1*.
- [82] M. Ejaz, K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules* **2000**, *33*, 2870.
- [83] T. Riedel, P. Majek, Z. Riedelova-Reicheltova, M. Vorobii, M. Houska, C. Rodriguez-Emmenegger, *Anal. Methods* **2016**, *8*, 6415.
- [84] A. R. Kuzmyn, A. de los Santos Pereira, O. Pop-Georgievski, M. Bruns, E. Brynda, C. Rodriguez-Emmenegger, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4124.
- [85] T. Ren, Z. Mao, J. Guo, C. Gao, *Langmuir* **2013**, *29*, 6386.
- [86] Q. Yang, M. Ulbricht, *Macromolecules* **2011**, *44*, 1303.
- [87] J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559.
- [88] S. Perrier, *Macromolecules* **2017**, *50*, 7433.
- [89] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Polymer* **2008**, *49*, 1079.
- [90] J. F. Quinn, T. P. Davis, E. Rizzardo, *Chem. Commun.* **2001**, 1044.
- [91] J. M. Pelet, D. Putnam, *Macromolecules* **2009**, *42*, 1494.
- [92] I. Chaduc, M. Lansalot, F. D'Agosto, B. Charleux, *Macromolecules* **2012**, *45*, 1241.
- [93] D. B. Thomas, B. S. Sumerlin, A. B. Lowe, C. L. McCormick, *Macromolecules* **2003**, *36*, 1436.
- [94] M. Zamfir, C. Rodriguez-Emmenegger, S. Bauer, L. Barner, A. Rosenhahn, C. Barner-Kowollik, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 6027.
- [95] C. L. McCormick, A. B. Lowe, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 312.
- [96] B. Ebeling, P. Vana, *Macromolecules* **2013**, *46*, 4862.
- [97] L. Albertin, M. Stenzel, C. Barner-Kowollik, L. J. R. Foster, T. P. Davis, *Macromolecules* **2004**, *37*, 7530.
- [98] L. Albertin, C. Kohlert, M. Stenzel, L. J. R. Foster, T. P. Davis, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 255.
- [99] S. Prakash, M. Pinti, B. Bhushan, *Phil. Trans. R. Soc. A* **2012**, *370*, 2269.
- [100] A. C. Carpenter, I. T. Paulsen, T. C. Williams, *Genes* **2018**, *9*.
- [101] A. P. F. Turner, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3184.
- [102] I. Sadegh Amiri, S. E. Alavi, S. Mahdaliza Idrus in *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology* (Eds.: I. Sadegh Amiri, S. E. Alavi, S. Mahdaliza Idrus), Springer Singapore, Singapore, **2015**, pp. 17–39.
- [103] W. Bogaerts, P. de Heyn, T. van Vaerenbergh, K. de Vos, S. Kumar Selvaraja, T. Claes, P. Dumon, P. Bienstman, D. van Thourhout, R. Baets, *Laser Photon. Rev.* **2012**, *6*, 47.

- [104] J. H. Wade, R. C. Bailey, *Annual Rev. Anal. Chem.* **2016**, *9*, 1.
- [105] K. Amini, S. Amini, H. Veladi, *Majlesi Journal of Telecommunication Devices* **2017**, *6*, 43.
- [106] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, Y. Sun, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *620*, 8.
- [107] F. Ghasemi, E. S. Hosseini, X. Song, D. S. Gottfried, M. Chamanzar, M. Raeiszadeh, R. D. Cummings, A. A. Eftekhar, A. Adibi, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *80*, 682.
- [108] J. T. Kindt, R. C. Bailey, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 818.
- [109] S. Roh, T. Chung, B. Lee, *Sensors* **2011**, *11*, 1565.
- [110] X. Guo, *J. Biophotonics* **2012**, *5*, 483.
- [111] E. Kretschmann, *Z. Physik* **1971**, *241*, 313.
- [112] Y.-W. Su, W. Wang, *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 3943.
- [113] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140.
- [114] R. R. Rosencrantz, V. H. Nguyen, H. Park, C. Schulte, A. Böker, U. Schnakenberg, L. Elling, *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 5633.
- [115] K. A. Willets, R. P. van Duyne, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267.
- [116] M. A. Cooper, *Nature Reviews Drug discovery* **2002**, *1*, 515.
- [117] J. Lazar, H. Park, R. R. Rosencrantz, A. Böker, L. Elling, U. Schnakenberg, *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 1472.
- [118] H. Park, S. Walta, R. R. Rosencrantz, A. Körner, C. Schulte, L. Elling, W. Richtering, A. Böker, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 878.

2. Allgemeine Materialien und Analytik

2.1. Material

Die Polymerisationen wurden unter Schutzgas-Atmosphäre (N_2) durchgeführt. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet, soweit dies nicht anders in der Synthesevorschrift angegeben ist.

3-(Trimethoxysilylpropyl)-2-bromo-2-methylpropionat wurde von abcr erhalten. Dimethylformamid und 2-Aminoethylmethacrylathydrochlorid wurden von Acros Organic erhalten. Acetonitril, Acetylchlorid, Allyltriphenylphosphoniumbromid, *N*-Acetyl-D-glukosamin (GlcNAc), Natriummethanolat ($NaOCH_3$) und Silberperchlorat ($AgClO_4 \cdot H_2O$) wurden von Alfa Aesar erhalten. Hexan wurde von Chem solute erhalten. Laktose wurde von Carbosynth erhalten. Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) wurde von Dow Corning als Sylgard 184 Elastomer-Kit erhalten. Dimethylsulfoxid- d_6 wurde von Eurisotop erhalten. Ammoniumcarbonat, Methacryloylchlorid und Natriumhydrogenphosphat wurden von Fulka erhalten. 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), Ammoniak und Ethyl- α -bromoisobutyrat (EBiB) wurden von Merck erhalten. Ameisensäure, Mannose, Natriumcarbonat, Galaktose, Natriumhydrogencarbonat und Natriumtetraborat wurden von Roth erhalten. 2,2'-Bipyridin (bpy), 4,4'-Azobis-(4-cyan-valeriansäure) (ABCVA), Bis[2-(2'-bromoisobutyryloxy)ethyl]disulfid (BisBIBED), Diisopropylethylamin (DIPEA), Kupfer(I)bromid ($CuBr$), Kupfer(II)bromid ($CuBr_2$), Kupferchlorid ($CuCl$), trockenes Methanol, Methylethylketon, Methylmethacrylat (MMA), Natriumcyanoborhydrid, NileRed, Polyethylenimin (PEI), Aluminiumoxid, 4-Cyan-4-(thiobenzoylthio)-pentansäure, Dowex MAC-3, Celite ®545 und Silica Gel wurden von Sigma Aldrich erhalten. Diethylether, Ethanol, Toluol wurden von Th. Geyer erhalten. Deuteriumoxid, Silbercarbonat (Ag_2CO_3) und Tetrahydrofuran (THF) wurden von VWR erhalten.

Für die biologischen Anwendungen wurde Natriumchlorid ($NaCl$), Kaliumchlorid (KCl) und Calciumchlorid ($CaCl_2$) von VWR erhalten. Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) wurde von Sigma Aldrich und Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) wurde von Roth erhalten. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurde von Merck erhalten. Die Lektine GS II und ECL wurden von Biozol Vector Laboratories erhalten. Das Lektin Galektin-3 wurde von Dr. Sophia Rosencrantz exprimiert.

Die Siliziumnitrid-Wafer und die Mikroring-Resonatoren wurden von dem Projektpartner Moritz Kleinert, M. Sc., am Heinrich-Hertz-Institut, Abteilung Photonische Komponenten zur Verfügung gestellt.

2.2. Analytik

¹H-NMR

¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden mit einem Unity INOVA 500 NB (Varian) 50-500 MHz Gerät mit D₂O, CDCl₃ oder DMSO-d₆ als Lösungsmittel analysiert.

Elektrospray-Ionisation Massenspektroskopie (ESI-MS)

Die Massenspektroskopiemessungen wurden mit einem Perkin Elmer, Flexa UHP System mit einem Flexa SQ 300 MS Detektor durchgeführt. Alle Spannungen wurden nach Kalibration des Geräts eingestellt. Als Messmethode wurde ESI eingesetzt. Die Proben wurden in Acetonitril/Wasser (50:50) mit 0,1 % Ameisensäure gelöst und bei 300 °C mit einem Probenvolumen von 15 µL/ min vermessen.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die DLS-Messungen wurden auf einem Malvern Zetasizer NanoZS+-Titrator durchgeführt. Dafür wurden 500 µL der Probe in Wasser gelöst und bei 25 °C gemessen.

Fluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Leica DMI8 mit einem 63x Objektiv aufgenommen.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden in einem Fluoreszenz Mikroplatten Reader von Tecan Infinite M200 Pro analysiert. In die Mikrotiterplatte wurden 100 µL Lösung eingefüllt und die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 552 nm Anregung und 636 nm Emission gemessen.

Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

GPC-Analysen wurden mit einem WGE Dr. Bures SEC-3010 mit Autosampler Spectra Systems AS₃₀₀, 100 µl Probenschleife, mit dem Laufmittel DMSO + 0,1 M LiBr, einer PSS Säule mit einer Flussrate von 1 mL/min bei 80 °C und einem RI-Detektor durchgeführt. Der Kalibrierstandard war Pullulan. Die Messungen wurden von Herrn Dr. H. Wetzel durchgeführt.

Die GPC-Analyse für PHEMA über ATRP wurde mit einem WGE Dr. Bures SEC-3010 mit Autosampler Spectra Systems AS₁₀₀₀, 100 µl Probenschleife, mit dem Laufmittel DMF + 0,1 % LiBr, einer PSS Säule mit einer Flussrate von 1 mL/min bei 50 °C und einem RI-Detektor durchgeführt. Der Kalibrierstandard war Polystyrol. Die Messungen wurden von Frau S. Stegmann durchgeführt.

Die GPC-Analyse für die PEI Polymere (PEI und PEI-Laktose) wurden mit einem WGE Dr. Bures SEC-3010 mit Autosampler Spectra Systems AS₃₀₀₀, 111 µl Probenschleife, mit dem Laufmittel 0,2 M KCl + 0,02 M Ameisensäure, einer TSK Gel Guard Säule mit einer Flussrate von 1 mL/min und einem RI-Detektor durchgeführt. Der Kalibrierstandard war Dextran-PSS-Polymer-Standard. Die Messungen wurden von Frau S. Stegmann durchgeführt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Messungen wurden mit einem Perkin Elmer, Flexar UHPLC System mit einem Flexar SQ 300 MS Detektor durchgeführt. Alle Spannungen des ESI-MS-Detektors wurden nach Kalibration des Geräts eingestellt. Die Proben wurden in einem Lösungsmittelgemisch von Acetonitril/Wasser (Start: 5 %: 95 % bis 50 %: 50 %) und 0,1 % Ameisensäure bei 30 °C mit einem Probenvolumen von 10 µL vermessen. Der Detektor misst in einem Wellenlängenbereich und der Zucker wurde bei einer Wellenlänge von 200 nm detektiert.

***In situ* IR-Reaktionsverfolgung**

Die Kinetik der Polymerisation der Homopolymere von PMMA, PManAMA und PLacAEMA wurden mit einem Mettler Toledo Multiplex React IR verfolgt.

Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Bindungsaffinität von einem Protein zum Glykopolymer wurde über die Micro Cal PEAQ-ITC von Malvern gemessen. Dafür wurden 0,04 mg/µL Polymer in einem 10 mM PBS + 0,1 mM CaCl₂ Puffer gegen 20 µM Protein analysiert. Als Negativkontrolle wurde nur Polymer gegen Puffer und Puffer gegen Puffer gemessen.

Kontaktwinkel (CA)

Die Kontaktwinkelmessungen wurden mit einem OCA 15 Dataphysics durchgeführt. Dafür wurde ein Wassertropfen (2 µL) auf die Oberfläche des Wafers platziert und der Kontaktwinkel analysiert.

Kryo-Rasterkraftmikroskop (Kryo-REM)

Die flüssigen Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im gefrorenen Zustand wurden die Proben bei -120 °C gebrochen und bis -90 °C sublimiert. Die frei sublimierte Oberfläche wurde mit einer Platinschicht (Dicke 4 nm) beschichtet, um elektrische Aufladungen zu vermeiden. Bei -180 °C wurden die Proben mit einem Rasterelektronenmikroskop GeminiSEM 300 (Fa. Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 2.3 kV untersucht. Für die Bildgebung wurde ein InLens-Detektor verwendet. Die Messungen wurden von Frau S. Grunst durchgeführt.

Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Die SPR-Messungen wurden auf einem SPR-Gerät der Firma Reichert SR7000DC durchgeführt. Für die Messungen wurden Gold-Sensorchips der Firma XanTec bioanalytics GmbH und Ssens bv verwendet. Die Bindungsversuche wurden mit einer Flussrate von 25 µL/min, einer Assoziationszeit von 150 s und einer Dissoziationszeit von 200 s durchgeführt. Die Messungen wurden von Frau Dr. S. Rosencrantz durchgeführt.

Rasterkraftmikroskop (SFM)

SFM-Messungen wurden mit einem Dimension Icon Mikroskop von Bruker Cooperation im Tapping Mode aufgenommen.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

XPS-Messungen wurden mit einem Gerät der Firma Kratos (Analytical, UK) AXIS165-Gerät durchgeführt. Für die Anregung wurde eine monochromatische AlK(alpha)-Strahlung (300 W) verwendet. Das Gerät wurde in einem Hybridmodus mit magnetischen und elektrostatischen Linsen, in einem Winkel von 90° betrieben. Die Probenladung wurde mit thermischen Elektronen aus einem Filament neutralisiert. Zur Datenauswertung wurde die CASA-XPS-Software (2.3.16) angewendet. Hierbei wurden alle Quantifizierungen nach Abzug einer linearen Basislinie durchgeführt und die Peaks mit Gaußschen Funktionen angepasst. Die Messungen wurden von Herrn Dr. A. Holländer durchgeführt.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Proben wurden auf Gitternetze aufgetropft und an Luft getrocknet. Sie wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop JEM-1400 Plus (Fa. JEOL) bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV untersucht. Die Messungen wurden von Frau S. Grunst durchgeführt.

3. Darstellung von Glykomonomeren

3.1. Einleitung

Die Anwendung von Glykomonomeren entwickelte sich in den letzten Jahren immer weiter.^[1] Durch die Funktionalisierung der Monomere und der später resultierenden Polymere mit einer Zuckereinheit, wurden neue Biopolymere zur Darstellung der Glykan-Protein-Wechselwirkung erschlossen. Die Zuckereinheit in der Seitenkette des Polymers erhöht die Hydrophilie und dadurch die Wasserlöslichkeit. Aufgrund ihrer Biokompatibilität sind sie potenziell in der Medizin einsetzbar.

Die ersten Glykomonomere wurden mit Hilfe von Schutzgruppen synthetisiert.^{[2][3]} Dafür wurden die OH-Gruppen am Glykan geschützt und nur die Gruppe am anomeren C-Atom aktiviert, um eine polymerisierbare Gruppe einzufügen. Da diese Synthesestrategie sehr zeitaufwendig und kostenintensiv ist, wurden weitere Möglichkeiten zur Synthese von Glykomonomeren eruiert. Vazquez *et al.* synthetisierten ein Glykomonomer über Schutzgruppenchemie, über die Zwischenstufe eines Oxazolins.^[4]

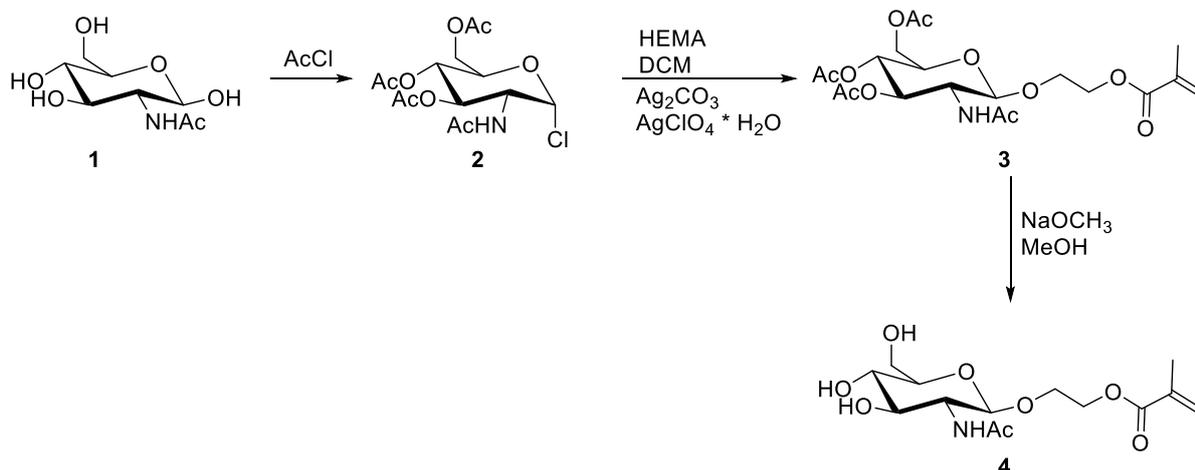
Narain *et al.* publizierten im Jahr 2002 eine schutzgruppenfreie Monomersynthese.^[5] Sie ließen Glucono-1,5-lacton mit 2-Aminoethylmethacrylat in Methanol bei 20 °C reagieren und erhielten das Glykomonomer 2-Gluconamidoethylmethacrylat (GAMA), bei dem die Glukose in der offenkettigen Form vorliegt. Im Jahr 2003 veröffentlichten Narai *et al.* die gleiche Synthese mit Laktose, um 2-Lactobioamidoethylmethacrylat (LAMA) zu erhalten.^[6] Über eine Kochetkov-Aminierung wurde das anomere C-Atom mit einem Amin funktionalisiert, um nachträglich eine polymerisierbare Gruppe am Amin einfügen zu können. Kim *et al.* zeigten die Funktionalisierung eines Glykans über diese Methode und erhielten das Glykomonomer 2-Acetamido-*N*-(*N*-acryloylglyciny)-2-deoxy- β -D-glukopyranosylamin.^[7] Auch Ghadban *et al.* nutzen die Kochetkov-Aminierung und funktionalisierten Glukose mit einer Acrylat-Gruppe über ein Acryloylchlorid.^[8] Brun *et al.* und Bejugam *et al.* nutzten die Kochetkov-Aminierung als mikrowellengestützte Synthese, um den Zucker zu aminieren.^[9,10] Die Mikrowellenreaktion konnte in 90 min Reaktionszeit und mit einem 5-fachen Überschuss an Ammoniumcarbonat durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit, um Glykopolymere zu erhalten, ist die nachträgliche Funktionalisierung eines Polymers durch Zuckermoleküle an den Seitenketten. Schlaad *et al.* nutzen diese Methode, um hydrophile Polybutadien Polymere zu funktionalisieren und Glykopolymer-vesikel aus Glukose und Poly(ethylenoxid) zu erhalten.^{[11][12]} Sie nutzten eine freie radikalische Addition oder Photoaddition um die Polymere mit der Zuckereinheit zu funktionalisieren.

In diesem Kapitel wurden vier verschiedene Syntheserouten evaluiert, um den besten Zugang zu verschiedenen Glykomonomeren zu erhalten. Dabei sollte die Synthese möglichst schnell, kosteneffizient und quantitativ sein.

3.2. Ergebnisse und Diskussion

Eine Synthese, die anfangs zur Herstellung von Glykomoneren benutzt wurde, ist die Königs-Knorr-basierte Synthese (**Schema 3**). Hierbei wird der Zucker GlcNAc **1** durch eine Horton-Reaktion^[9] geschützt und das anomere C-Atom aktiviert **2**. Danach erfolgt die Kopplung mit einem Alkohol über eine Königs-Knorr-Reaktion **3**.^[2] Anschließend wird der Zucker entschützt **4**. Die polymerisierbare Gruppe wird O-glykosidisch am anomeren C-Atom in β -Stellung eingefügt.



Schema 3: Synthese des Glykomonomer GlcNAcEMA über die Königs-Knorr-Reaktion.

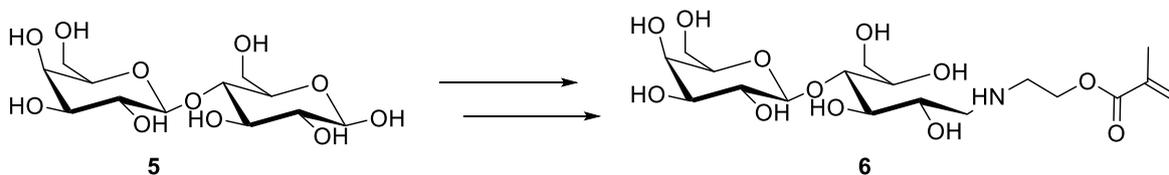
Die Königs-Knorr-Synthese zeigt signifikante Nachteile. Der limitierende Reaktionsschritt ist die zweite Synthesestufe. Hier werden lediglich 10 % Ausbeute von Zuckermonomer **3** erhalten. Bei dem ersten Reaktionsschritt, der Acetylierung wird eine Ausbeute von 72 % und bei der Deacetylierung eine Ausbeute von 78 % erhalten. Bei der Königs-Knorr-Reaktion wird der geschützte und halogenierte Zucker mit einem Alkohol in Gegenwart von Silbersalzen umgesetzt.^[13] Bei dieser Reaktion entsteht Wasser, welches den halogenierten Zucker hydrolysiert und die Ausbeute verringert.^[14] Ein weiterer Nachteil ist, dass die Synthese aufgrund des Einsatzes von Silberkatalysatoren kostenintensiv ist. Nachteilig ist auch die lange Reaktionszeit, die bis zu zwei Wochen betragen kann. Für die Entschützung wurden verschiedene Synthesebedingungen variiert (**Tabelle 1**). Das Verhältnisse von Zuckermonomer zu Base (Natriummethanolat) wurde detailliert betrachtet. Zuerst wurden drei unterschiedliche Verhältnisse bei gleicher Reaktionszeit und unterschiedlicher Reaktionstemperatur variiert (**Eintrag 1-3**). Dabei war zu beobachten, dass mit einem höheren Monomer zu Base Verhältnis, eine Ester-Spaltung auftritt (**Eintrag 1-2**). Außerdem wurde die Reaktionstemperatur verringert. Bei niedriger Temperatur verläuft die Reaktion langsamer und kein Produkt entsteht (**Eintrag 3**). Das Verhältnis von Monomer zu Base wurde verringert, um eine Ester-Spaltung zu unterdrücken. Ein Verhältnis von 1:0,1 wurde angenommen (**Eintrag 4-6**). Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 60 min (**Eintrag 4**), 40 min (**Eintrag 5**) und 30 min (**Eintrag 6**) getestet. Bei längerer Reaktionszeit wurde die Ester-Spaltung beobachtet. Ein Verhältnis von 1:0,1 (Monomer: Base), eine Reaktionszeit von 30 min und Raumtemperatur wurden als ideale Bedingungen ermittelt (**Eintrag 6**). Durch die Optimierung der Deacetylierung konnte die Ausbeute um 40 % im Vergleich zur Literatur gesteigert werden.^[15]

Tabelle 1: Synthesebedingungen der Entschützungsreaktion von Ac-GlcNAcEMA 3; bei verschiedenen Monomer zu Base (Natriummethanolat) Verhältnissen, verschiedener Reaktionszeit und Reaktionstemperatur.

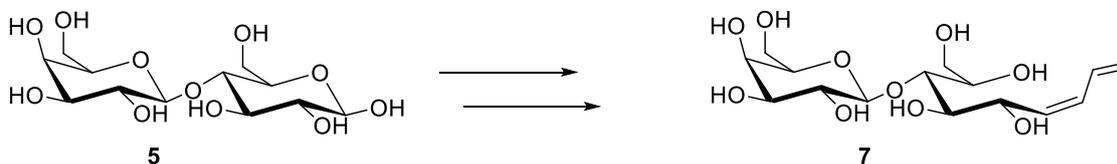
Eintrag	Monomer/Base	Reaktionszeit [min]	Temperatur	Ergebnisse	Ausbeute [%]
1	1 : 0,6	25	Eisbad	Ester-Spaltung	34
2	1 : 0,5	25	RT	Ester-Spaltung	--
3	1 : 0,3	25	Eisbad	Edukt	31
4	1 : 0,1	60	RT	Ester-Spaltung	--
5	1 : 0,1	40	RT	Produkt	--
6	1 : 0,1	30	RT	Produkt	78

Die Monomersynthese sollte optimiert werden. Dafür wurden drei verschiedene Syntheserouten aufgestellt (**Schema 4**).

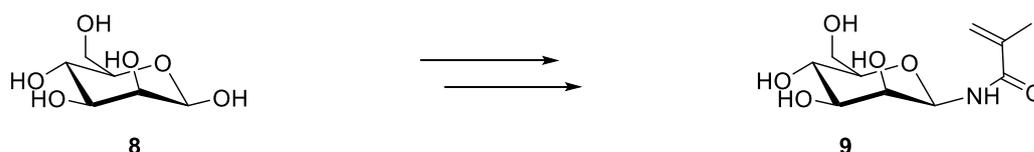
Synthese a: Reduktive Aminierung



Synthese b: Wittig-Reaktion

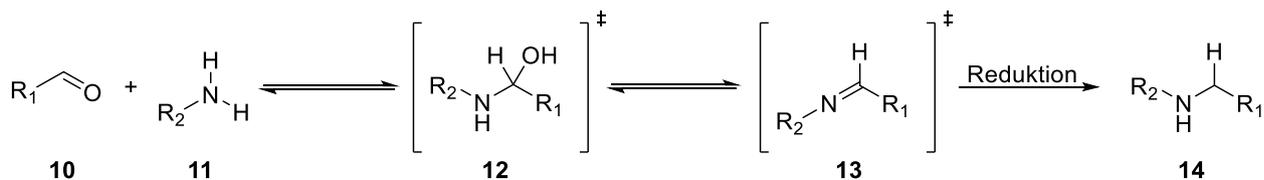


Synthese c: Kochetkov-Aminierung



Schema 4: Synthesewege zur Herstellung von Glykomonomeren. Synthese a) reduktive Aminierung, det. Schema 5 Mechanismus der reduktiven Aminierung; Synthese b) über einer Wittig-Reaktion, det. Schema 6 Mechanismus der Wittig-Reaktion; Synthese c) Kochetkov-Aminierung, det. Schema 7 Mechanismus der Kochetkov-Aminierung.

Die erste Syntheseroute **a** erfolgt nach einer reduktiven Aminierung. Die Reaktion verläuft über zwei Übergangszustände, dem Carbinolamin **12** als Additionsprodukt aus Aldehyd **10** und Amin **11**. Unter sauren Bedingungen und Wasserabspaltung reagiert das Carbinolamin **12** weiter zum Imin **13**. Das Imin **13** wird mit Natriumcyanoborhydrid reduziert und das stabile Amin **14** erhalten (**Schema 5**).

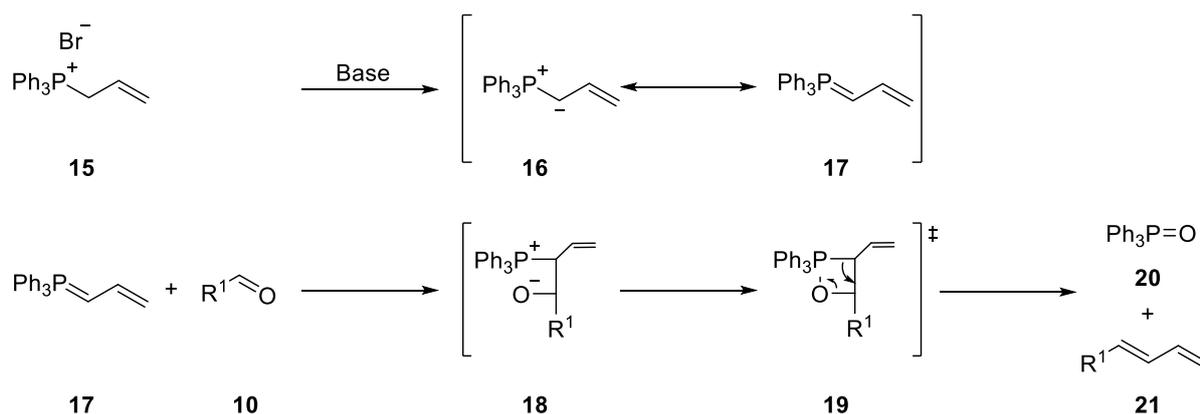


Schema 5: Mechanismus der reduktiven Aminierung.

Dalpathado *et al.* nutzte die reduktive Aminierung um Glukose mit *N*-(2-Diethylamino)ethyl-4-aminobenzamid (DEAEAB) zu verknüpfen.^[16] Dabei verwendeten sie NaBH(OAc)₃ und NaBH₃CN als Reduktionsmittel. Sie stellten heraus, dass beide Reduktionsmittel für die Synthese geeignet sind. Mees *et al.* verwendeten die reduktive Aminierung um Glukose und Maltose an die sekundären Amine von PEI in PEtOx-PEI zu binden.^[17] Sie erreichten eine Funktionalisierung von 85 % mit Glukose und 96 % mit Maltose an PEI.

Die Laktose wird als reduzierender Zucker verwendet. Durch die Ringöffnung der Laktose im wässrigen Medium, kann die gebildete Aldehyd-Gruppe mit einem Amin (2-Aminoethylmethacrylat-hydrochlorid) über eine reduktive Aminierung reagieren. Vorteile der Syntheseroute sind die kurze Reaktionszeit von 2 h und die moderaten Synthesebedingungen. Ein Nachteil der reduktiven Aminierung ist, dass nur reduzierende Zucker verwendet werden können, um eine Ringöffnung zu bewirken. Weiter wird durch die Ringöffnung bei Monosacchariden die Struktur zerstört und in späteren biologischen Anwendungen könnte der Zucker von den Lektinen nicht mehr erkannt werden. Deswegen sollten bei der Synthese über eine reduktive Aminierung mindestens Disaccharide verwendet werden. Ein weiterer Nachteil der Synthese ist die Verwendung von Natriumcyanoborhydrid, welches sehr umweltschädlich ist. Durch die Nachteile kann die Syntheseroute für einen späteren Scale-Up-Prozess nicht angewendet werden. Narai *et al.* nutzten für die Kopplung mit 2-Aminoethylmethacrylat D-Gluconolacton^[6] und Lactobionolacton^[18]. Sie erhielten Ausbeuten von 75 % für GAMA und von 78 % für LAMA. Auch Narai *et al.* erhielten offenkettige Zucker. Die Lactone als Ausgangsstoffe für die reduktive Aminierung sind kostenintensiv und die Synthese zeitaufwendig. Aus diesem Grund sollte hier eine Ringöffnung im wässrigen Medium ausgenutzt und eine reduktive Aminierung mit NaBH₃CN durchgeführt werden.

Die zweite Route **b** ist die Synthese unter Verwendung einer Wittig-Reaktion. Die Wittig-Reaktion ist eine [2+2] Cycloaddition, bei der aus Phosphoryliden **17** und Aldehyden/Ketonen **10**, Alkene **21** resultieren (**Schema 6**).



Schema 6: Mechanismus der Wittig-Reaktion.

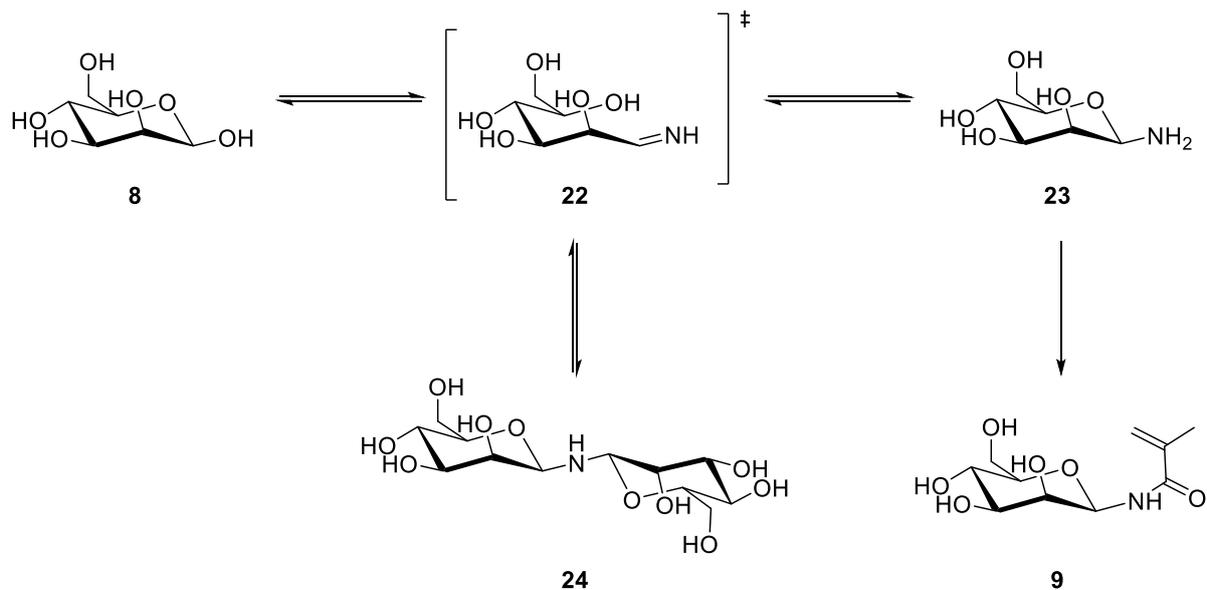
Unter basischen Bedingungen reagiert das Triphenylphosphoniumsalz **15** zum Ylid **16,17**. Das negativ polarisierte C-Atom des Ylids **17** greift die Carbonyl-Gruppe **10** an und es entsteht das Betain **18** als geladener Zwischenzustand. Dieser reagiert weiter zum Oxaphosphetan **19** als cyclischer Zwischenzustand. Durch Umlagerung der Bindungen wird das Alken **21** erhalten. Antrieb bei der Wittig-Reaktion ist die Ausbildung der Phosphor-Sauerstoff-Doppelbindung **20**.^[19]

Die Wittig-Reaktion wird in einem binären Gemisch aus Wasser/Acetonitril unter basischen Bedingungen durchgeführt. Die Edukte und Produkte sind in Wasser gut löslich. In dem Jahr 2005 publizierten Dambacher *et al.*, dass Wasser ein effizientes Medium für die Wittig-Reaktion sei. Sie erreichten einen Umsatz von bis zu 98 % und ein moderates E/Z-Verhältnis.^[20] Mc Nulty *et al.* veröffentlichten 2009 eine Wittig-Reaktion im wässrigen Medium, bei der 1,3-Diene und 1,3,5-Triene mit NaOH als Base hergestellt wurden.^[21] Sie erreichten Umsätze von bis zu 85 % und eine hohe Chemoselektivität der Olefinierung.

Die Reaktion wird in einem binären Gemisch durchgeführt, um die Nebenreaktionen und Nebenprodukte zu unterdrücken und die Stereo- und Enantioselektivität zu verbessern. Um die basischen Bedingungen einzustellen wurden zwei verschiedene Basen getestet (Natriumcarbonat (Na₂CO₃) und Diisopropylethylamin (DIPEA)).

Bei der Wittig-Reaktion wird Laktose als reduzierender Zucker eingesetzt und die Ringöffnung im wässrigen Medium ausgenutzt. Das Phosphoniumsalz kann mit dem gebildeten Aldehyd der offenkettigen Laktose reagieren. Vorteile der Wittig-Reaktion zur Herstellung von Glykomonomeren sind die moderaten und umweltfreundlichen Synthesebedingungen. Nachteile sind, dass wiederum nur reduzierende Disaccharide verwendet werden können, sowie die lange Reaktionszeit von 20 h und die schwierige Aufreinigung der Produkte. Polymerisierbare Glykomonomere wurden bis heute noch nicht über eine Wittig-Reaktion hergestellt. Könnte eine kosteneffiziente Aufreinigungsmethode gefunden werden, wäre die Wittig-Reaktion eine weitere Option, Glykomonomere zu synthetisieren.

Die dritte Syntheseroute **c** ist eine mikrowellenunterstützte Kochetkov-Aminierung. Sie verläuft bei basischen Bedingungen mit einem Imin **22** als Zwischenstufe, das durch den Ringschluss des Zuckers zum Amin **23** umgewandelt wird. Als Nebenprodukt kann das Dimer **24** entstehen (**Schema 7**).



Schema 7: Mechanismus der Kochetkov-Aminierung.

Im Jahr 1986 präsentierte Kochetkov *et al.* eine einfache Methode, um einen aminierten Zucker an der C₁-Position herzustellen.^[22] Dabei wurde der Zucker direkt mit Ammoniumhydrogencarbonat ((NH₄)₂CO₃) bei 30 °C und einer Reaktionszeit von 6 Tagen umgesetzt. Die Ausbeute betrug 60 %. Bejugam *et al.*^[9] und Brun *et al.*^[10] nutzten die mikrowellenunterstützte Kochetkov-Aminierung, um den Zucker zu aminieren. Durch die Mikrowelle wurden 90 min Reaktionszeit und ein 5-facher Überschuss von (NH₄)₂CO₃ benötigt. Sie stellten heraus, dass die Reaktion in DMSO und MeOH bei 40 °C am effizientesten abläuft. Wird die Temperatur erhöht, entsteht in höheren Ausbeuten das Dimer. Brun *et al.* nutzten MeOH anstatt DMSO als Lösungsmittel und testeten die Aminierung verschiedener Zucker.

Die Reaktion wurde in Methanol mit einem 5-fachen Überschuss von (NH₄)₂CO₃, einer Reaktionszeit von 60 min und 50 °C durchgeführt. Der Vorteil der Reaktion ist, dass keine Schützung der Hydroxyl-Gruppen am Glykan notwendig ist. Mannose und Galaktose wurden getestet. Das ManNH₂ wurde in einer Ausbeute von 64 % und das GalNH₂ in einer Ausbeute von 67 % erhalten. Die erhaltenen Ausbeuten der aminierten Zucker korrelieren mit den in der Literatur angegebenen. So erhielten Brun *et al.* bei ähnlichen Reaktionsbedingungen Ausbeuten an ManNH₂ von 87 % und an GalNH₂ von 56 %.^[10] Bejugam *et al.* erreichten für das GlcNAc-Amin Ausbeuten von 87 %.^[9] Beide Forschungsgruppen koppelten die erhaltenen aminierten Zucker über das Amin mit einer funktionellen Gruppe.

Um ein Glykomonomer herzustellen wurde das Amin mit Methacryloylchlorid über eine Schotten-Baumann-Reaktion zum Methacrylamid umgesetzt. Dabei wird das Amin mit einem Säurechlorid umgesetzt. Die dabei entstehende Salzsäure wird unter basischen Bedingungen neutralisiert. Es wird ein Lösungsmittelgemisch aus MeOH/H₂O und Na₂CO₃ verwendet, um den Angriff des Säurechlorids an den anderen OH-Gruppen des Zuckers zu unterdrücken. Die Kopplungsreaktion läuft bei 0 °C mit einer Reaktionszeit von 30 min. Das Mannosemethacrylamid ManAMA und Galaktosemethacrylamid GalAMA wurden in einer Ausbeute von 68 % erhalten. Die polymerisierbare Gruppe wird *N*-glykosidisch am anomeren C-Atom eingefügt. Ghadban *et al.*

synthetisierten über eine ähnliche Syntheseroute *N*-(Prop-2-enoyl)- β -D-glukopyranosylamin und erhielten es in einer Ausbeute von 52 %.^[8] Sie stellten das Amin über die Kochetkov-Aminierung innerhalb von 30 h her und koppelten dieses mit Acryloylchlorid. Die Amine konnten durch die mikrowellenunterstützte Synthese erheblich schneller, innerhalb von 2 h, synthetisiert werden. Außerdem wurden die Ausbeute in dem Kopplungsprozess mit Methacryloylchlorid im Vergleich zur Literatur um 10 % gesteigert.^[8]

Für das Monomer ManAMA **9** wurde im ersten Syntheseschritt, das Amin in α - und β -Stellung erhalten. Im ¹H-NMR ist ein Verhältnis von 1:2 (α : β) zu erkennen (**Abbildung 6b**). Nach der Funktionalisierung mit der polymerisierbaren Gruppe ist der Anteil an β -Mannose größer. Das β -Mannose Monomer dominiert, da es begünstigt gebildet wird. Für das α -Mannose Monomer ist die Bildung sterisch gehindert. In **Abbildung 6** sind die ¹H-NMR-Spektren von Mannose **a/a'**, ManNH₂ **b/b'** und Mannosemethacrylamid **c/c'** abgebildet. Die Signale der H-Atome am anomeren C-Atom (C₁) sind für die Mannose bei 5,18 (α) und 4,90 (β) ppm und für das ManNH₂ bei 4,50 (α) und 4,30 (β) ppm zu erkennen. Das H-Atom am anomeren C-Atom ist für ManNH₂ Hochfeld verschoben. Das Spektrum für ManAMA zeigt die Bindung zur polymerisierbaren Gruppe, durch die Entstehung der zwei Signale um 5,50 ppm, welche der C-C-Doppelbindungen entsprechen. Das H-Atom am anomeren C₁-Atom ist Tieffeld verschoben und liegt bei 5,27 ppm. Das Signal gibt die β -Verknüpfung der polymerisierbaren Gruppe wieder. Die Verknüpfung über α -Mannose liegt bei 5,47 ppm. Die beiden Monomere liegen in einem Verhältnis von 1:10 (α : β) vor.

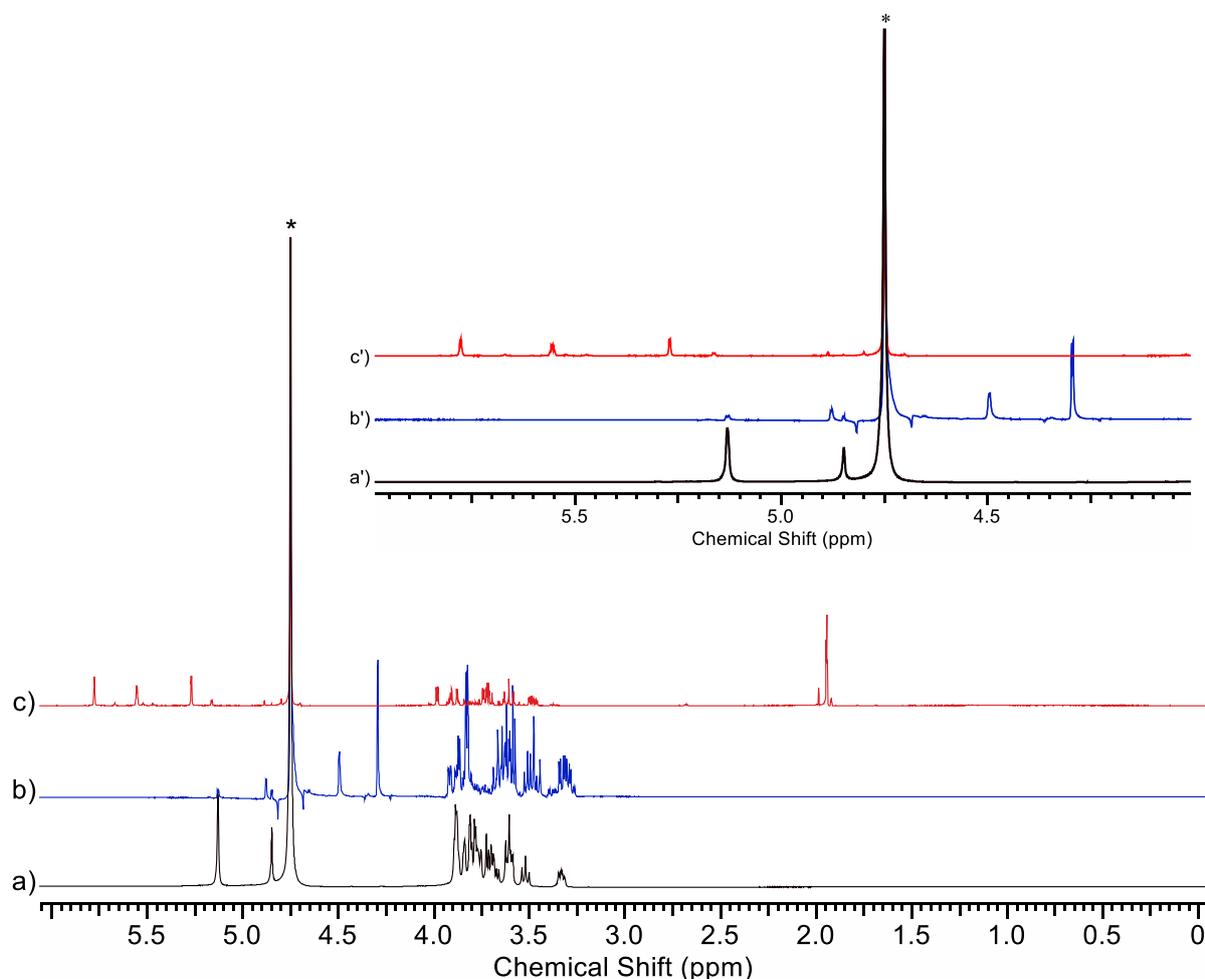


Abbildung 6: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bei 0 ppm - 6,0 ppm von a) Mannose (**8**), b) ManNH_2 (**23**) und c) ManAMA (**9**); D_2O (*). Oben reingezoomtes $^1\text{H NMR}$ Spektren bei 4,0 ppm – 6,0 ppm von a') Mannose (**8**), b') ManNH_2 (**23**) und c') ManAMA (**9**); D_2O (*).

Das Monomer GalAMA **32** wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ charakterisiert. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist zu erkennen, dass die polymerisierbare Gruppe (5,80 ppm, 5,57 ppm) am anomeren C-Atom (4,99 ppm) gebunden ist und das Monomer als β -Galaktose (4,99 ppm) erhalten wird (Anhang, Abb. 55).

Zur Kontrolle, ob die Monomere rein erhalten wurden, wurde eine HPLC-Messung mit einem Acetonitril/Wasser-Gradient (Start: 5 %: 95 % bis 50 %: 50 %) und Ameisensäure (0,1 %) durchgeführt. Das Monomer wird bei einer Retentionszeit von 6 min erhalten (**Abbildung 7**). Wie in dem Elugramm zu erkennen ist, wird das Monomer ManAMA **9** mit hinreichender Reinheit erhalten und kann zur weiteren Synthese verwendet werden. Das Elugramm für das Monomere GalAMA **32** ist ebenfalls rein und kann für weitere Synthesen verwendet werden (Anhang, Abb. 59).

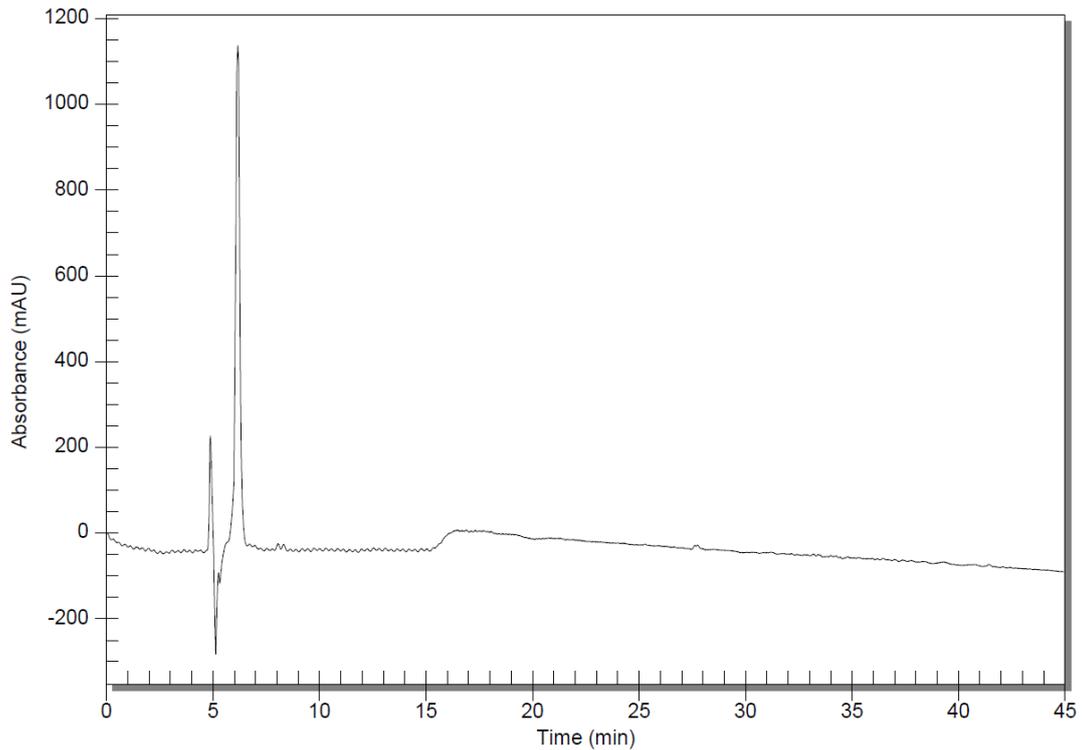


Abbildung 7: HPLC-Elugramm von ManAMA (9) in Acetonitril/Wasser (Start: 5 %: 95 % bis 50 %: 50 %) mit 0,1 % Ameisensäure. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 200 nm und für 45 min.

Vorteile der Glykomonomerherstellung über eine mikrowellenunterstützte Kochetkov-Aminierung ist die kurze Reaktionszeit in der Mikrowelle und der nachträglichen Kopplung. Weiter können reduzierende Mono- und Disaccharide über die Reaktion mit einer polymerisierbaren funktionellen Gruppe verknüpft werden. Die cyclische Form des Zuckers wird durch die Verknüpfung nicht verändert und kann in späteren biologischen Anwendungen genutzt werden. Das Glykomonomer wird in moderater Ausbeute und Reinheit erhalten, sodass der Syntheseweg wirtschaftlich ist. Nachteil der Syntheseroute ist, dass nur Verknüpfungen über einen N-glykosilierten Zucker am anomeren C-Atom in β -Stellung hergestellt werden können. Die Synthese kann für Scale-Up-Prozesse eingesetzt werden.

3.3. Zusammenfassung

Das Ziel war es eine Syntheseroute zu entwickeln, um Glykomomere in großer Ausbeute und Reinheit herzustellen. Außerdem sollten die Synthesebedingungen und Reaktionszeit möglichst moderat und kurz gehalten werden, um spätere Anwendungen in der Industrie und Scale-Up Prozesse zu gewährleisten.

Verglichen wurden vier verschiedene Syntheserouten. Die Königs-Knorr-Synthese, die reduktive Aminierung, die Wittig-Reaktion und eine mikrowellenunterstützte Kochetkov-Aminierung. Die Glykomomere konnten über die unterschiedlichen Syntheserouten synthetisiert werden und die Vor- und Nachteile wurden herausgestellt (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Syntheserouten.

Eintrag	Syntheseroute	Zeit [h]	Bedingungen	Zucker	Ausbeute [%]	Wirtschaftlich	Scale-Up
1	Königs-Knorr	240	Azide, Schutzgruppen	GlcNAc	10	Nein	Nein
2	Reduktive Aminierung	2	Azide, Nutzung von NaBH ₃ CN	Disaccharide	Aufreinigung nicht möglich	Ja	Nein
3	Wittig-Reaktion	20	Basische	Disaccharide	Aufreinigung nicht möglich	Ja	Nein
4	Kochetkov-Aminierung	1,5	Basische	Mono-, Disaccharide	68	Ja	Ja

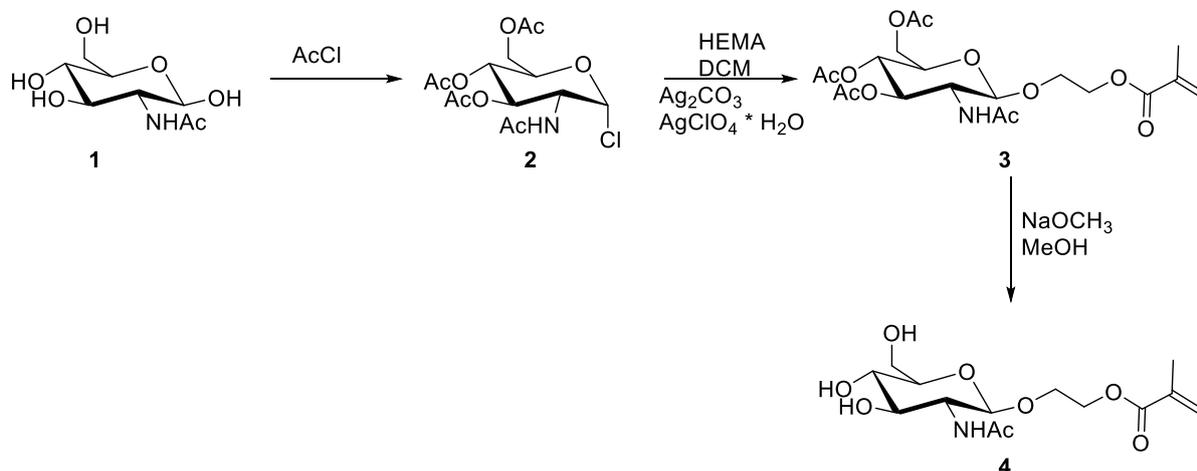
Die Königs-Knorr-Reaktion (**Eintrag 1**) ist mit der langen Reaktionszeit und sehr geringen Ausbeute zu unwirtschaftlich. Deswegen wurden die anderen drei Syntheserouten getestet (**Eintrag 2-4**). Alle drei erhöhten die Ausbeute und verringerten die Reaktionszeit. Sie waren alle kosteneffizienter und wirtschaftlicher als die Königs-Knorr-Reaktion. Jedoch konnte bei der reduktiven Aminierung (**Eintrag 2**) und der Wittig-Reaktion (**Eintrag 3**) nur Disaccharide funktionalisiert werden, da durch die Ausnutzung der Ringöffnung die cyclische Form des Zuckers verloren geht. Des Weiteren konnte keine geeignete synthetische Aufreinigung für die Monomere gefunden werden. Die Kochetkov-Aminierung (**Eintrag 4**) zeigte, dass eine hohe Ausbeute von 68 % und eine hinreichende Reinheit des Glykomomers erreicht werden konnte. Sie konnte für verschiedene Zucker angewendet werden. Aufgrund dieser Vorteile wurde die Kochetkov-Aminierung für die weiteren Synthesen der Glykomomere verwendet. Außerdem wurde die reduktive Aminierung für die Synthese des Glykomomers LacAEMA und für die nachträgliche Funktionalisierung von Polyethylenimin (PEI) mit Laktose angewandt.

Durch die mikrowellenunterstützte Kochetkov-Aminierung konnte eine kosteneffiziente und schnelle Syntheseroute gefunden werden. Im Gegensatz zu den häufig genutzten geschützten Zuckersynthesen^[4], konnte das Glykomomer ohne Schutzgruppen hergestellt werden. Außerdem wurde der Zucker am anomeren C₁-Atom funktionalisiert, um das Glykan für eine mögliche biologische

Anwendung zu erhalten. Bordege *et al.*^[23] funktionalisierten D-(+)-Glukosaminhydrochlorid mit 2-Hydroxyethylacrylat-*p*-nitrophenylcarbonat an der C₂-Position des Zuckers. Durch die Blockierung der OH-Gruppe an C₂-Position kann das Glykan nicht mehr von Proteinen erkannt werden. Auch Albertin *et al.*^[24] nutzen nicht das anomere C₁-Atom um den Zucker zu funktionalisieren. Sie funktionalisierten Methyl- α -D-glukosid mit Vinylmethacrylat an der C₆-Position des Zuckers. Auch hier kann das funktionalisierte Glykan nicht mehr für biologische Erkennungen verwendet werden.

3.4. Experimenteller Teil

3.4.1. Synthese des Glykomonomers 2-O-(*N*-Acetyl- β -D-glukosamin)ethyl methacrylat (GlcNAcEMA) über die Königs-Knorr-Reaktion



Schema 8: Synthese des Glykomonomers GlcNAcEMA (4) über die Königs-Knorr-Reaktion.

Im ersten Syntheseschritt wurde Acetylchlorid (AcOCl, 40,0 mL) unter Feuchtigkeitsausschluss vorgelegt und trockenes *N*-Acetylglucosamin **1** (GlcNAc, 20,0 g, 90,4 mmol) unter starkem Rühren hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Chloroform (160 mL) wurde hinzugegeben und die Lösung unter starkem Rühren auf Eis (80,0 g) und Milli-Q-Wasser (40,0 mL) gegossen. Die organische Phase wurde mit Eis (80,0 g) gequench und mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (160 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, die Lösung in Diethylether (200 mL) umkristallisiert und Ac-GlcNAc-Cl (**2**) als Feststoff erhalten (23,8 g, 65,1 mmol, 72 %).^[3]

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 6,19 (d, J = 3,66 Hz, 1H, α -H¹); 6,17 (d, J = 3,66 Hz, 0,4H, β -H¹); 5,85 (d, J = 8,55 Hz, 1H, NH); 5,32 (t, J = 9,52 Hz, 1H, H³); 5,22 (m, 1H, H⁴); 4,53 (m, 1H, H²); 4,26 (m, 2H, H⁵/H⁶); 4,12 (m, 1H, H⁶); 2,10 (s, 3H, OCH₃), 2,05 (s, 6H, 2xOCH₃); 1,99 (s, 3H, NHCH₃) ppm.

Im zweiten Syntheseschritt wurde Molekularsieb 3 A (9,50 g) mit Ag₂CO₃ (17,2 g, 62,3 mmol) in trockenem DCM (48,0 mL) und HEMA (11,0 mL, 93,4 mmol) vorgelegt und für 2 h gerührt. Ac-GlcNAc-Cl **2** (22,0 g, 62,3 mmol) und AgClO₄·H₂O (0,74 g, 3,11 mmol) wurden hinzugegeben und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde über Celite®545 filtriert, mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Zur Kristallisation wurde das Öl in Diethylether gelöst. Ac-GlcNAcEMA **3** wurde als Feststoff erhalten (3,20 g, 6,96 mmol, 10 %).^[2]

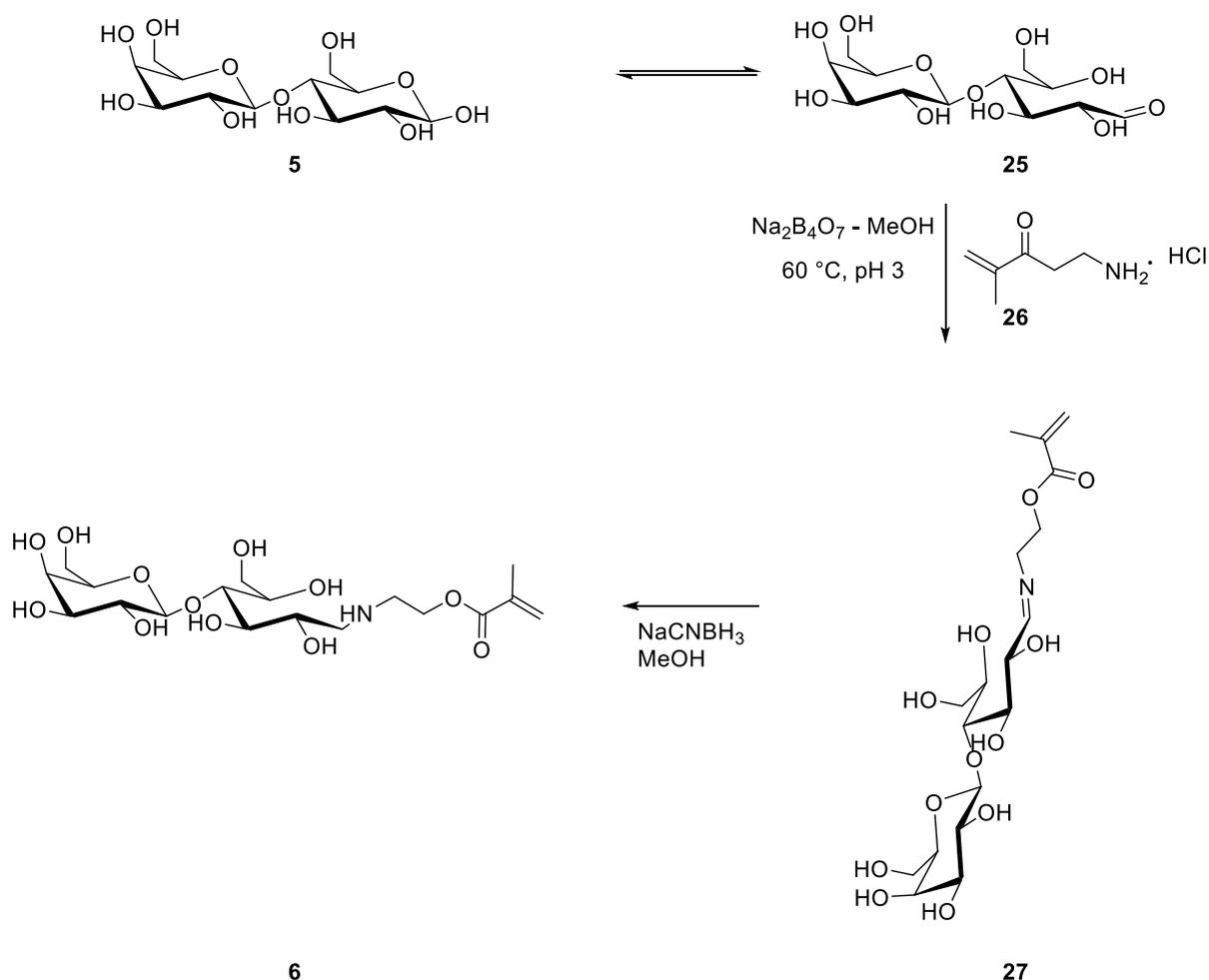
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 6,12 (s, 1H, C=CH₂); 5,62 (d, J = 8,79 Hz, 1H, NH); 5,59 (t, J = 1,46 Hz, 1H, C=CH₂); 5,28 (m, 1H, H³); 5,07 (t, J = 9,70 Hz, 1H, H⁴); 4,75 (d, J = 8,30 Hz, 1H, H¹); 4,40 (m, 1H, CH₂OCO); 4,24 (m, 2H, H⁵/H⁶); 4,12 (dd, J = 2,22, 14,65, 1H, H²); 4,03 (m, 1H, H⁶); 3,85 (m,

2H,OCH₂); 3,71 (m, 1H, CH₂OCO); 2,09 (s, 3H, OCH₃), 2,02 (s, 6H, 2xOCH₃); 1,91 (s, 3H, NHCH₃) ppm.

Zur Deacetylierung wurde Ac-GlcNAcEMA **3** (3,66 g, 7,97 mmol) in trockenem Methanol (20,0 mL) gelöst. NaOCH₃ (42,5 mg, 0,788 mmol) wurde in MeOH (1,00 mL) gelöst und zur Lösung hinzugefügt. Die Reaktion wurde 30 min gerührt. Die Lösung wurde mit DOWEX-MAC-3 auf pH 6-7 neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und an der Gefriertrocknung getrocknet. GlcNAcEMA **4** wurde als Feststoff erhalten (2,06 g, 6,16 mmol, 78 %).

¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): 6,10 (s, 1H, C=CH₂); 5,69 (s, 1H, C=CH₂); 5,50 (d, J = 8,55 Hz, 1H, H¹); 4,26 (m, 1H, H⁴); 4,06 (m, 1H, H³); 3,87 (m, 2H, CH₂OCO); 3,65 (m, 3H, H⁵/H^{6a/b}); 3,49 (m, 1H, H²); 3,39 (m, 2H, OCH₂); 1,91 (s, 3H, OCH₃); 1,88 (s, 3H, NHCH₃) ppm.

3.4.2. Synthese des Glykomonomers Laktosaminethylmethacrylat (LacAEMA)



Schema 9: Reduktive Aminierung von Laktose (5) mit Methacryloylchlorid (26).

Das Laktosemonomer (Laktosaminethylmethacrylate, LacAEMA) wird über eine reduktive Aminierung synthetisiert. Laktose **5** (0,800 g, 2,33 mmol) wurde mit 2-Aminoethylmethacrylathydrochlorid **26** (0,740 g, 4,47 mmol) in einer Natriumtetraborat-Lösung (4,00 mL, 50,0 mM) und Methanol (2,50 mL) bei 60 °C vorgelegt. Der pH-Wert wurde mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt. Natriumcyanoborhydrid (1,30 g, 20,7 mmol, 5,00 eq.) wurde in Methanol (1,20 mL) gelöst und unter langsamem Rühren zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 2 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, die Lösung mit Diethylether gewaschen und an der Gefriertrocknung getrocknet. Ein weißes Pulver LacAEMA **6** (2,20 g, 4,67 mmol) wurde erhalten.

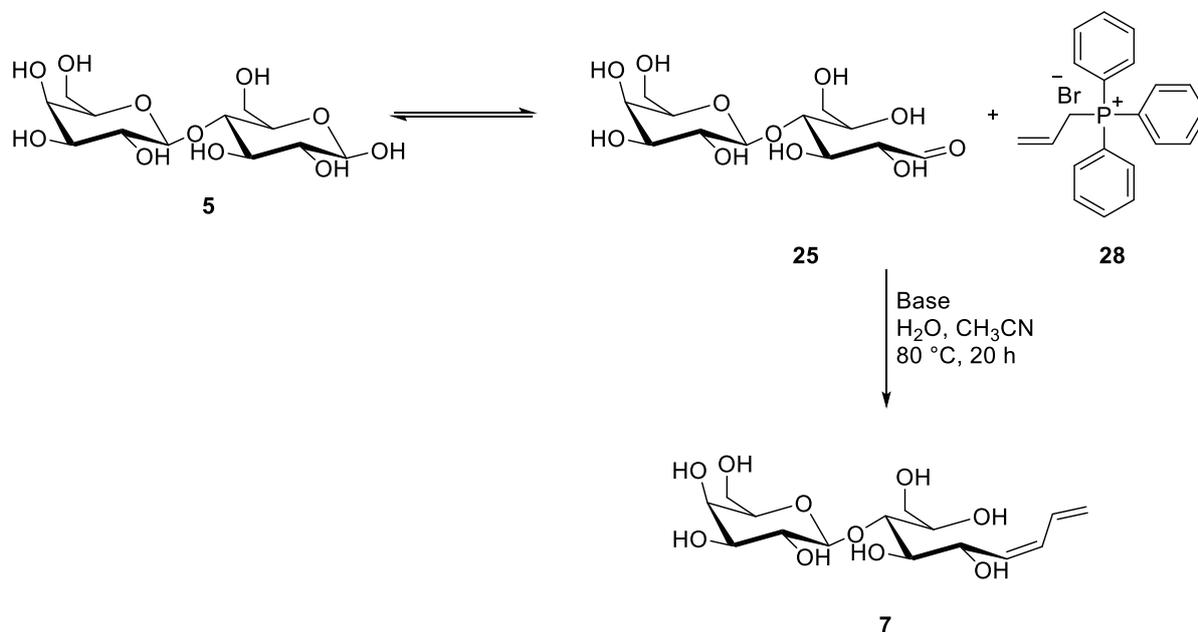
¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): 6,19 (s, 1H, C=CH₂); 5,77 (s, 1H, C=CH₂); 4,50-3,09 (m, NCH₂/H₂CO/Zucker/OH); 1,94 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 400 MHz): 171,12 (NH); 169,42 (C¹-Gal); 127,77 (C=CH₂); 127,66 (C=CH₂); 74,97-46,08 (Laktose); 41,78 (C¹-Glu); 38,57 (H₂CO); 38,39 (HNCH₂); 14,01(CH₃) ppm.

ESI-MS: theor.: 455,46 g/mol [LacAEMA];

erhalten: 454,19 g/mol [LacAEMA-H]; 490,17 g/mol [LacAEMA + Cl];
 492,21 g/mol [LacAEMA+ K₂H]; 500,20 g/mol [LacAEMA+FA-H].

3.4.3. Synthese des Glykomonomers Laktose über Wittig-Reaktion



Schema 10: Wittig-Reaktion mit Laktose (5).

Allyltriphenylphosphoniumbromid **28** (575,0 mg, 1,500 mmol) wurde in Wasser (0,6000 mL) vorgelegt: D-Laktose **5** (360,0 mg, 1,000 mmol), Na₂CO₃/DIPEA (216,8 mg/229,1 mg, 2,045 mmol/1,770 mmol) und eine Mischung aus Wasser/Acetonitril (3,400 mL/4,000 mL) wurden hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 80 °C für 20 h gerührt, dann das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und an der Gefriertrocknung getrocknet. Das Monomer **7** wurde als Feststoff erhalten.

Tabelle 3: Reaktionsansatz mit verschiedenen Basen für die Wittig-Reaktion.

Base	Menge [mg]	Molarität [mmol]	Äquivalente
Na ₂ CO ₃	216,8	2,045	2,045
DIPEA	229,1	1,77	1,77

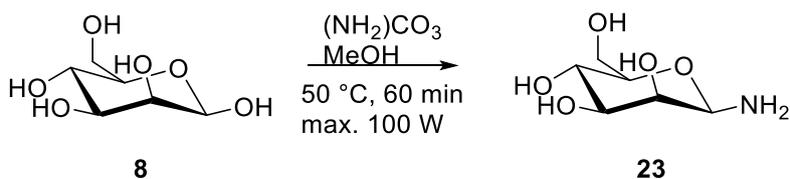
Base Na₂CO₃:

IR (neat) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3315 (m), 2968 (w), 2169 (w), 2169 (w), 2120 (w), 1990 (w), 1587 (m), 1484 (w), 1437 (w), 1396 (w), 1188 (w), 1111 (m), 1037 (w), 996 (w), 817 (w), 747 (w), 720 (w).

Base DIPEA:

IR (neat) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3339 (m), 2932 (w), 2696 (w), 2170 (w), 1989 (w), 1586 (w), 1484 (w), 1438 (m), 1401 (w), 1314 (w), 1111 (m), 1064 (m), 997 (w), 816 (w), 749 (w), 721 (w).

3.4.4. Synthese des Glykomonomers Mannosemethacrylamid (ManAMA)



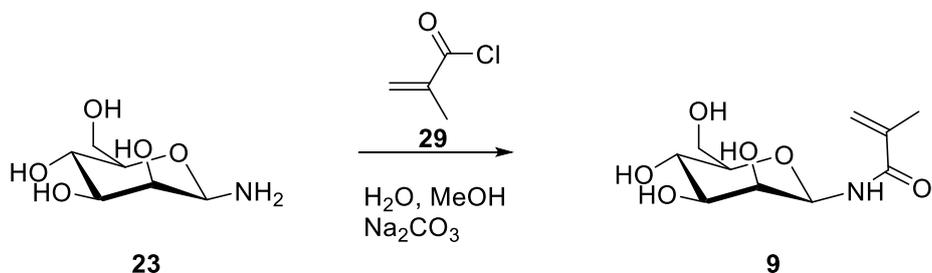
Schema 11: Mikrowellensynthese von ManNH₂ (23).

Zur Synthese des ManNH₂ wurde eine mikrowellenunterstützte Kochetkov-Aminierung angewandt. Mannose **8** (0,500 g, 2,78 mmol) wurde mit Ammoniumcarbonat (5,00 gew. eq., 2,50 g, 2,60 mmol) in Methanol (12,0 mL) vorgelegt. Die Lösung reagierte für 60 min bei 50°C mit einer maximalen Leistung von 50 Watt in der Mikrowelle. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (10,0 mL) versetzt, unter vermindertem Druck reduziert und am Hochvakuum getrocknet. Ein weißes Pulver von ManNH₂ **23** (0,322 g, 1,80 mmol, 64 %) wurde erhalten. ^{[9][10]}

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): 4,50 (d, J = 0,75 Hz, 0,5 H, α-H¹); 4,30 (d, J = 1,13 Hz, 1H, β-H¹); 3,91 (dd, J = 4,33, 0,94 Hz, 1H, H³ o. H⁴); 3,82 (d, J = 2,26 Hz, 1H, H²); 3,67 (m, 3H, H³ o. H⁴/ H^{6a/b}); 3,48 (t, J = 9,61 Hz, 1H, H⁶); 3,32 (m, 1H, H⁵) ppm.

ESI-MS: theor.: 179,17 g/mol [ManNH₂];

erhalten: 180,07 g/mol [ManNH₂ + H⁺]; 162,04 g/mol [C₆H₁₂NO₄⁺]; 145,02 g/mol [C₆H₉O₄⁺];
127,02 g/mol [C₆H₇O₃⁺].



Schema 12: Synthese von ManAMA (9).

Für den zweiten Schritt wurde ManNH₂ **23** (1,00 g, 5,58 mmol) mit Natriumcarbonat (3,30 g, 31,1 mmol) in einer Lösung aus Methanol (30,0 mL) und Wasser (30,0 mL) vorgelegt. Unter starkem Rühren und Kühlung im Eisbad wurde Methacryloylchlorid (1,90 mL, 19,5 mmol) in THF (16,0 mL) innerhalb von 5 min hinzugegeben. Die Lösung wurde 30 min im Eisbad gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Silicagel (30,0 g), Wasser (30,0 mL) und Isopropanol (30,0 mL) versetzt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde über eine Silicagel-Säule mit Acetonitril/Wasser (9:1) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, die Lösung mit Diethylether gewaschen und an der Gefriertrocknung getrocknet. Ein weißes Pulver ManAMA **9** (0,94 g, 3,80 mmol, 68 %) wurde erhalten.^[8]

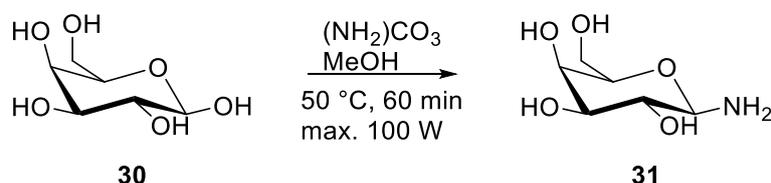
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz): 5,78 (m, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$); 5,56 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$); 5,27 (d, $J = 1,25$ Hz, 1H, $\beta\text{-H}^1$); 5,47 (d, $J = 2,26$ Hz, 0,1 H, $\alpha\text{-H}^1$); 3,99 (dd, $J = 1,25, 4,52$ Hz, 1H, H^2); 3,90 (m, 1H, H^3 o. H^4), 3,73 (m, 2H, H^3 o. H^4/H^6); 3,61 (t, $J = 9,7$ Hz, 1H, H^6); 3,48 (m, 1H, H^5); 1,95 (s, 3H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 400 MHz): 173,37 (NH); 140,14 ($\text{C}=\text{O}$); 123,93 ($\text{C}=\text{C}$); 95,57 ($\alpha\text{-C}^1$); 95,19 ($\beta\text{-C}^1$); 79,36 (C^5); 74,81 (C^3); 71,69 (C^2); 67,98 (C^4); 62,46 (C^6); 19,12 (CH_3) ppm.

ESI-MS: theor.: 247,25 g/mol [ManAMA]

erhalten: 248,16 g/mol [ManAMA + H^+]; 270,09 [ManAMA + Na^+].

3.4.5. Synthese des Glykomonomers Galaktosemethacrylamid (GalAMA)



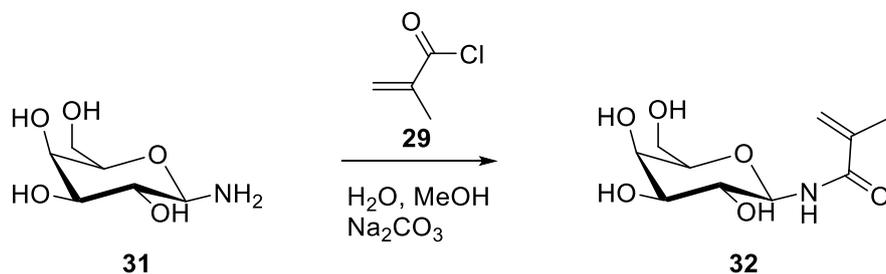
Schema 13: Mikrowellensynthese von GalNH_2 (**31**).

Zur Synthese des GalNH_2 wurde eine mikrowellenunterstützte Kochetkov-Aminierung angewandt. Galaktose **30** (0,500 g, 2,78 mmol) wurde mit Ammoniumcarbonat (5,00 gew. eq., 2,50 g, 2,60 mmol) in Methanol (12,0 mL) vorgelegt. Die Lösung reagierte für 60 min bei 50°C mit einer maximalen Leistung von 50 Watt in der Mikrowelle. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (10,0 mL) versetzt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und am Hochvakuum getrocknet. Ein weißes Pulver von GalNH_2 **31** (0,322 g, 1,80 mmol, 67 %) wurde erhalten.^{[9][10]}

ESI-MS: theor.: 179,17 g/mol [GalNH_2];

erhalten: 180,07 g/mol [$\text{GalNH}_2 + \text{H}^+$]; 163,19 g/mol [$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_4^+$]; 145,09 g/mol [$\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_4^+$];

127,08 g/mol [$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_3^+$].



Schema 14: Synthese von GalAMA (**32**).

Für den zweiten Schritt wurde GalNH_2 **31** (0,900 g, 5,02 mmol) mit Natriumcarbonat (3,30 g, 31,1 mmol) in einer Lösung aus Methanol (30,0 mL) und Wasser (30,0 mL) vorgelegt. Unter starkem Rühren und Kühlung im Eisbad wurde Methacryloylchlorid **29** (1,90 mL, 19,5 mmol) in THF (16,0 mL) innerhalb von 5 min hinzugegeben. Die Lösung wurde 30 min im Eisbad gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Silicagel (30,0 g), Wasser (30,0 mL) und Isopropanol (30,0 mL) versetzt und das

Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde über eine Silicagel-Säule mit Acetonitril/Wasser (9:1) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, die Lösung mit Diethylether gewaschen und an der Gefriertrocknung getrocknet. Ein weißes Pulver GalAMA **32** (0,860 g, 3,48 mmol, 69 %) wurde erhalten.^[6]

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): 5,80 (s, 1H, C=CH₂); 5,57 (s, 1H, C=CH₂); 4,99 (t, J= 4.2 Hz, 1H, H¹); 3,99 (d, J= 2.01 Hz, 1H, H²); 3,81 (m, 1H, H³ o. H⁴), 3,73 (m, 4H, H³ o. H⁴/ H⁶/ H⁵); 1,95 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (D₂O, 400 MHz): 174,54 (NH); 140,36 (C=O); 123,97 (C=C); 81,66 (C¹); 78,35 (C⁵); 74,97 (C³); 70,74 (C²); 70,26 (C⁴); 62,51 (C⁶); 19,23 (CH₃) ppm.

ESI-MS: theor.: 247,25 g/mol [GalAMA]

erhalten: 248,16 g/mol [GalAMA +H⁺]; 270,09 g/mol [GalAMA+Na⁺].

3.5. Literatur

- [1] a) W. M. J. Kloosterman, S. Roest, S. R. Priatna, E. Stavila, K. Loos, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1837;
b) I. Gill, R. Valivety, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 692.
- [2] W. Koenigs, E. Knorr, *Mitteilung aus dem chemischen Laboratorium der Königl. Akademie der Wissenschaft zu München* **1901**, 957.
- [3] D. Horton, *Org. Synth.* **1966**, *46*, 1.
- [4] V. Vázquez-Dorbatt, H. D. Maynard, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2297.
- [5] R. Narain, S. P. Armes, *Chem. Commun.* **2002**, 2776.
- [6] R. Narain, S. P. Armes, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1746.
- [7] J.-S. Kim, Y. K. Park, K. H. Chun, J. E. Nam Shin, *Bull. Korean Chem. Soc* **2001**, *22*, 758.
- [8] A. Ghadban, L. Albertin, R. W. Moussavou MOUNGUENGUI, A. Peruchon, A. Heyraud, *Carbohydrate research* **2011**, *346*, 2384.
- [9] M. Bejugam, S. L. Flitsch, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4001.
- [10] M. A. Brun, M. D. Disney, P. H. Seeberger, *ChemBioChem.* **2006**, *7*, 421.
- [11] Z. Hordyjewicz-Baran, L. You, B. Smarsly, R. Sigel, H. Schlaad, *Macromolecules* **2007**, *40*, 3901.
- [12] H. Schlaad, L. You, R. Sigel, B. Smarsly, M. Heydenreich, A. Manton, A. Masić, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2009**, 1478.
- [13] K. H. Büchel, L. Ellinghaus, J. Falbe, K. Gassen, H. Hagemann, *Methods of Organic Chemistry*, Thieme, **2014**.
- [14] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213.
- [15] H. Park, R. R. Rosencrantz, L. Elling, A. Böker, *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 45.
- [16] D. S. Dalpathado, H. Jiang, M. A. Kater, H. Desaire, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1130.
- [17] M. A. Mees, C. Effenberg, D. Appelhans, R. Hoogenboom, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 4027.
- [18] R. Narain, S. P. Armes, *Macromolecules* **2003**, *36*, 4675.
- [19] T. Laue, A. Plagens, *Namen- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **2004**.
- [20] J. Dambacher, W. Zhao, A. El-Batta, R. Anness, C. Jiang, M. Bergdahl, *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 4473.
- [21] J. McNulty, P. Das, *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 5737.
- [22] L. M. Likhoshesterov, O. S. Novikova, V. A. Derevitskaja, N. K. Kochetkov, *Carbohydrate research* **1986**, *146*, C1-C5.
- [23] V. Bordegé, A. Muñoz-Bonilla, O. León, M. Sánchez-Chaves, R. Cuervo-Rodríguez, M. Fernández-García, *React. Funct. Polym.* **2011**, *71*, 1.
- [24] L. Albertin, Martina Stenzel, C. Barner-Kowollik, L. John R. Foster, D. Thomas P., *Macromolecules* **2004**, *37*, 7530.

4. Synthese von Homoglykopolymeren über radikalische Polymerisationen

4.1. Einleitung

Die Glykanfunktionalität in den Seitenketten eines Glykopolymers ermöglicht das Imitieren und Analysieren der Glykan-Protein-Wechselwirkung.^[1-9] Auf der Zelloberfläche bilden Glykane Oligosaccharide und werden dort als „*Glycocode*“ für die Erkennung und Entschlüsselung von spezifischen Proteinen, wie z. B., Lektine, verwendet.^[10-12] Die Glykan-Protein-Wechselwirkung ist verantwortlich für viele biologische Prozesse wie z. B. die zelluläre Erkennung, die Zell-Adhäsion und die Infektion von Pathogenen.^{[13][14][11]} In Glykopolymeren sind Glykane multivalent vorhanden und erhöhen die Stärke der Glykan-Protein-Wechselwirkung, woraus der sogenannte „*cluster glycoside effect*“ resultiert.^{[13][15]} Die Natur nutzt diese Multivalenz durch Bildung von Glykokonjugaten.^{[16][15]}

Die Synthese von Glykopolymeren kann über kontrolliert/lebende freie radikalische Polymerisation wie ATRP, RAFT oder *Nitroxide-mediated polymerization* (NMP) verlaufen.^{[3][17-21]} Außerdem kann die Synthese eines Glykopolymers über zwei Stufen erfolgen, bei der eine Stufe aus einer nachträglichen Funktionalisierung besteht.^{[1][22]} Vorteil der lebenden radikalischen Polymerisation ist, dass das Molekulargewicht und die Funktionalität genau einstellbar ist. ^[23]

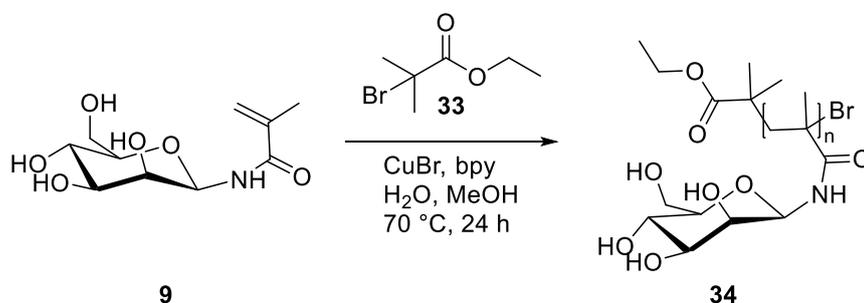
In diesem Kapitel der Dissertation, werden die synthetisierten Glykomonomere aus Kapitel 3 zur Herstellung von Glykopolymeren verwendet. Dabei wurde die *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP) und die *Reversible Addition-Fragmentation Chain-Transfer* (RAFT) Polymerisation evaluiert.

Die Glykomonomere ManAMA und LacAEMA wurden mittels ATRP zu Glykopolymeren synthetisiert. Über RAFT-Polymerisation wurden die Glykomonomere ManAMA und GalAMA polymerisiert. Diese wurden in weiterführenden Anwendungen, mittels der Trithiocarbonat-Gruppe am *Chain Transfer Agent* (CTA), auf Goldoberflächen angebunden (**Kapitel 5**). Des Weiteren wurde ein Glykopolymer über die nachträgliche Funktionalisierung eines Polymers mit Laktose über eine reduktive Aminierung hergestellt.

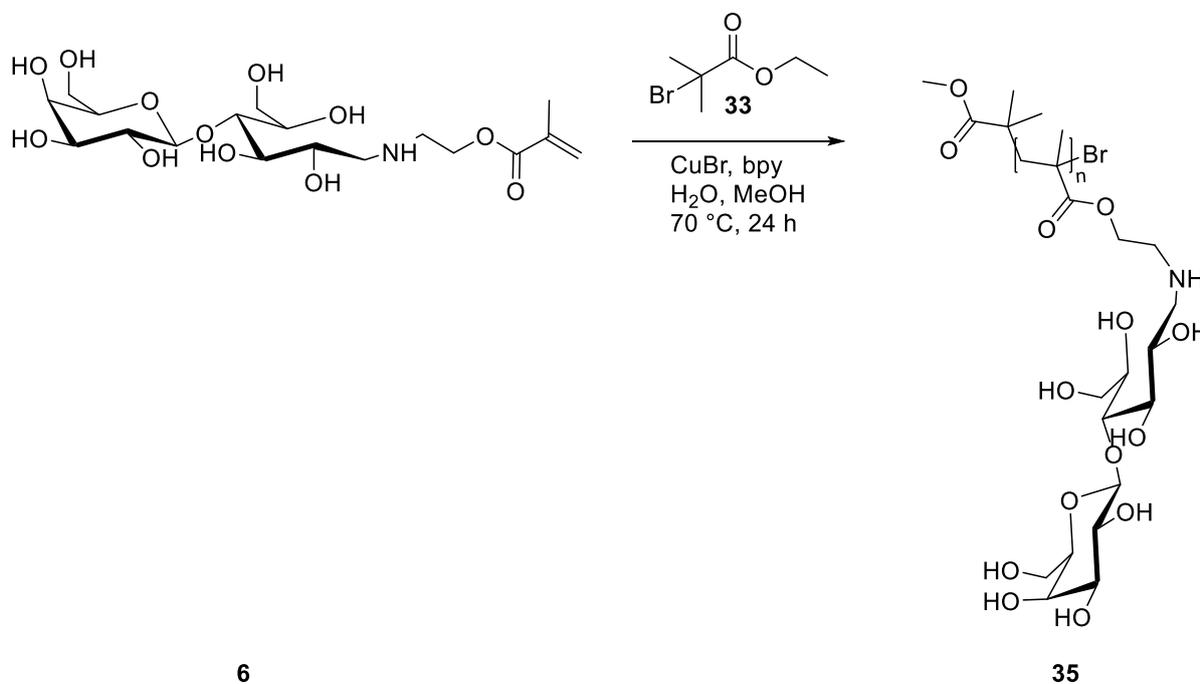
4.2. Glykopolymere über *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP)

Die Glykopolymere PManAMA **34** und PLacAEMA **35** wurden aus den Glykomonomeren (**Kapitel 3**) hergestellt. Dazu wurde eine ATRP-Reaktion verwendet. Die Polymerisation verläuft bei 70 °C über 24 h und als Initiator wurde Ethyl- α -bromoisobutyrate **33** eingesetzt (**Schema 15**). Um das reine Homopolymer **34** und **35** zu erhalten, wurde die Lösung gegen destilliertes Wasser dialysiert. Jedes Glykomonomer wurde mit einer Methacryl-Gruppe funktionalisiert. Die ATRP-Reaktion wurde mittels *in situ* IR-Messungen (React IR, Abbildung 8) verfolgt, um die Kinetik der Reaktionen zu analysieren. Dabei wurde die Carbonyl-Schwingung (C=O, 1850-1600 cm^{-1}) der Methacryl-Gruppe (1750-1715 cm^{-1}) untersucht. Die Homopolymere wurden mittels GPC analysiert, um den Polymerisationsgrad zu bestimmen.

a)



b)



Schema 15: ATRP der Glykomonomere a) ManAMA (**9**) und b) LacAEMA (**6**), mit (**33**) als Initiator, einem CuBr-Katalysator und bpy als Ligand. Die Polymerisation wurde bei 70 °C für 24 h in H₂O/MeOH durchgeführt.

Die *in situ* IR-Messungen des Homopolymers PManAMA **34** zeigen, dass die Reaktion langsam abläuft. Nach einer *Lag*-Phase von 200 min, startet die Reaktion mit einem linearen Verlauf, bis sie bei 600 min ein Plateau erreicht. Ein Umsatz von 90 % wird bei einer Normierung auf 1 bei 520 min erhalten. Die Polymerisationsreaktion des Glykopolymeres startet nach einer Zeit von 200 min. Ein Grund könnte die Glykan-Gruppe sein, die dicht an der polymerisierbaren Gruppe liegt. Das Glykan verursacht durch die sterische Hinderung einen langsamen Start der Polymerisation. Ab einer längeren Polymerkette und einer größeren Anzahl von gestarteten Polymerketten, verläuft die Polymerisation konstant. Ab 250 min folgt die Kinetik bis 600 min einem linearen Verlauf und einer Kinetik erster Ordnung. Außerdem könnte das Glykan mit dem Kupferkatalysator wechselwirken und so die lange *Lag*-Phase bedingen. Hierbei beeinflusst die Wechselwirkung mit dem Katalysator die Polymerisation, deswegen weil die polymerisierbare Gruppe nah an dem Glykan liegt und sterische Hinderung auftreten kann. Für das Homopolymer PManAMA wurden ein Molekulargewicht von $M_w = 3879$ g/mol und $M_n = 459$ g/mol mit einer Dispersität von $\mathcal{D} = 8,46$ und einem Polymerisationsgrad $P_n = 15$ erhalten. Der Kettenstart wird quantitativ initiiert, aber wenige Ketten gehen in die Propagationsphase über. Ab einer bestimmten Kettenlänge ist die Polymerisation kontrolliert und höhere Molekulargewichte können erreicht werden. Durch dieses Verhältnis an initiierten Polymerketten und Polymeren mit größerem Molekulargewicht, kommt eine große Dispersität zustande.

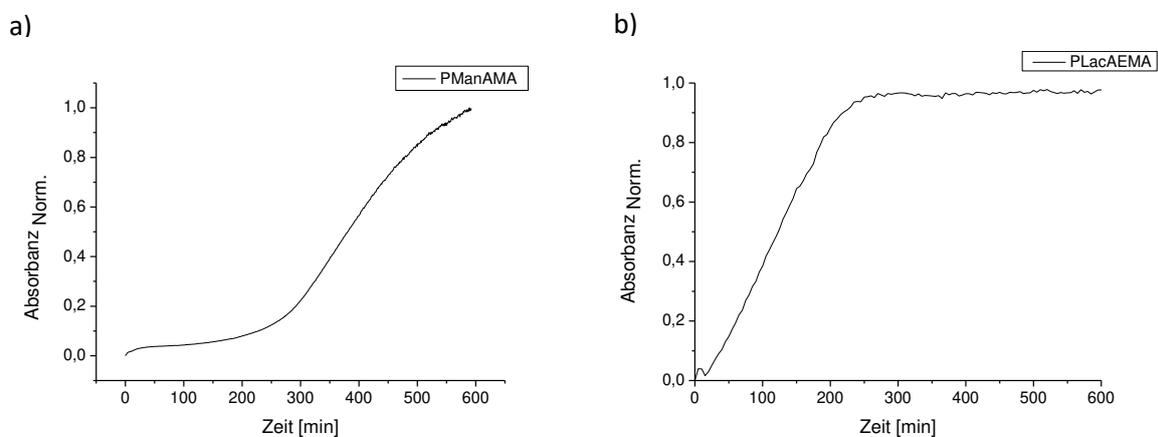


Abbildung 8: Kinetikmessung von PManAMA (**34**) und PLacAEMA (**35**) über die Zeit. Dargestellt ist die normierte Intensität der Absorbanz der C=O-Schwingung. a) PManAMA (**34**), normierte Intensität der Absorbanz der C=O-Schwingung in Abhängigkeit von der Zeit; b) PLacAEMA (**35**), normierte Intensität der Absorbanz C=O-Schwingung Abhängigkeit von der Zeit; gemessen mit *in situ* IR. Für die Kinetikmessungen wurde die C=O-Schwingung bei 1850-1600 cm^{-1} beobachtet.

Das Homopolymer PLacAEMA **35** zeigt nach der *in situ* IR-Messungen einen linearen ansteigenden Verlauf der C=O-Schwingung. Ab Start 0 min bis 250 min steigt der Verlauf stetig an, bis bei 250 min ein Plateau erreicht wird. Ein Umsatz von 90 % wird bei einer Normierung auf 1 bei 200 min erhalten. Im Vergleich zum PManAMA **34** Homopolymer verläuft die Kinetik der PLacAEMA Hexamers von Beginn an nach einer Kinetik erster Ordnung ab. Beim PLacAEMA Polymer liegt die Glukose als offenkettige Form vor und fungiert als Spacer zwischen dem Glykan und der polymerisierbaren

Gruppe. Die Laktose wechselwirkt aufgrund der offenkettigen Form der Glukose weniger mit dem Kupferkatalysator und es tritt keine sterische Hinderung auf. Für das PLacAEMA Hexamer wurde ein Molekulargewicht von $M_w = 2904$ g/mol und $M_n = 1355$ g/mol mit einer Dispersität von 2,14 erhalten. Daraus ergibt sich ein Polymerisationsgrad von 6. Die Molekulargewichtsverteilung ist breit, welches auf eine schwach kontrollierte Polymerisation schließen lässt.

Tabelle 4: Analysedaten der Polymere über ATRP PManAMA (34) und PLacAEMA (35). Die GPC-Messung wurden in DMSO bei 80 °C durchgeführt.

Eintrag	Substrat	Ausbeute [%]	t [h]	M_w [g/mol]	M_n [g/mol]	\bar{D}	DP
1	PManAMA	4	24	3879	459	8,46	15
2	PLacAEMA	2	24	2904	1355	2,14	6

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist das Polymer PLacAEMA zugeordnet (Anhang, Abb. 62). Die Signale zwischen 4,25-3,30 ppm sind die Glykan Signale und die Signale um 1,17-0,76 ppm die $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$ Signale des Polymerrückgrats.

In situ IR-Verfolgung der Polymerisationskinetik von Glykopolymeren wurde noch nicht untersucht. Jedoch gibt die *in situ* IR-Verfolgung Auskunft über das Polymerisationsverhalten von verschiedenen Polymerisationsarten.^{[24][25]} Kütahya *et al.* verfolgten eine lichtkontrollierte ATRP von MMA mit IR-Spektroskopie.^[26] Sie erhielten große Molekulargewichte und eine enge Molekulargewichtsverteilung. Holland *et al.* untersuchte die Kinetik der PMMA Polymerisation über FT-IR-Spektroskopie.^[27] Sie untersuchten die thermische Zersetzung von PMMA, dafür wurden in regelmäßigen Abständen IR-Proben genommen und vermessen. Hier wurde keine *in situ* IR-Verfolgung durchgeführt.

Narain *et al.* polymerisierte PEG-GAMA als Diblockcopolymer und erhielten M_n von 8.300 g/mol bis 18.000 g/mol mit einer Dispersität von 1,19 bis 1,37 je nach Lösungsmittel und Reaktionszeit.^[28] Auch polymerisierten sie LAMA als Homopolymere und erhielten M_n von 8.600 g/mol bis 34.800 g/mol mit einer Dispersität von 1,22 bis 1,60.^[29] Bei den Polymerisationen von Narain *et al.* lagen die Glykane an der polymerisierbaren Gruppe offenkettig vor. Im Gegensatz zu den cyclischen Glykanen, fungiert das offenkettige Glykan als Spacer zwischen der polymerisierbaren Einheit und dem cyclischen Glykan, das durch ein Lektin erkannt werden kann. Dieses Glykan wechselwirkt nicht mit dem Kupferkatalysator und es tritt keine sterische Hinderung auf. Aus diesem Grund können höhere Molekulargewichte mit einer engen Molekulargewichtsverteilung erreicht werden. Außerdem verläuft die Polymerisation kontrolliert, von Beginn an, nach einer Reaktion erster Ordnung ab.

Weitere Gründe für das geringe Molekulargewicht und die große Molekulargewichtsverteilung könnte eine noch nicht für Glykopolymere standardisierte GPC-Analyse sein. Viele Parameter, wie der Standard, das Säulenmaterial und das Lösungsmittel nehmen Einfluss auf die Ergebnisse. Außerdem werden ungeschützte Zucker analysiert, die durch die freien OH-Gruppen mit dem Säulenmaterial wechselwirken können. Daraus resultieren keine aussagekräftigen Ergebnisse der GPC-Analyse für die Glykopolymere. Die GPC-Analyse wurde mit dem Lösungsmittel DMSO bei 80 °C und einem

Pullulan Standard durchgeführt. Narain *et al.*^{[28][29]} nutzten für die PEG-GAMA Diblockcopolymeren eine wässrige GPC-Analyse mit Polyethylenoxid als Standard und für die LAMA Homopolymere DMF als Lösungsmittel für die GPC-Analyse mit PMMA als Standard. Aufgrund der unterschiedlichen GPC-Methoden können die unterschiedlichen Ergebnisse nur bedingt miteinander verglichen werden.

Zwei Glykooligomere wurden mittels ATRP synthetisiert und die Reaktion mit *in situ* IR beobachtet. Die Beobachtungen geben Aufschluss darüber, wie die Polymerisation von Glykopolymeren verläuft. Durch die Messungen wurde herausgestellt, dass das Glykan mit dem Kupferkatalysator wechselwirkt. Je größer der Spacer zwischen dem Glykan und der polymerisierbaren Gruppe ist, desto schneller verläuft die Reaktion und desto leichter kann die Polymerisation kontrolliert werden.

4.2.1. Biologische Untersuchungen der Glykopolymeren

Die biologische Aktivität des Glykopolymeren PManAMA **34**, das über ATRP synthetisiert wurde, wurde durch Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Dabei wurde die Bindungsenergie des Homopolymers PManAMA zu dem Lektin ConA bestimmt. ConA ist ein α -Mannose bindendes Lektin.^{[30][31]} In Abbildung 9 sind die ITC-Experimente dargestellt. Die Isotherme Titrationskalorimetrie misst die Veränderung der Temperatur, wenn die Produkte A und B einen Komplex bilden. Es wird Wärme frei oder aufgenommen. Die Wärmeänderung wird in der ITC reguliert. Ein Graph der Heizleistung in Abhängigkeit von der Temperatur wird erhalten (Abbildung 9 a und b). Aus der Temperaturänderung wird durch Integration die freigesetzte Wärmemenge ermittelt. In Abbildung **9c** ist die freigesetzte Wärmemenge gegen die molare Konzentration des zu messenden Produktes aufgetragen. Durch Anfügen einer theoretischen Kurve, kann die Dissoziationskonstante K_D und die Bindungsenthalpie bestimmt werden.^[32] Des Weiteren kann die Entropieänderung über die Gleichung:

$$-RT \ln K = \Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad \text{(d)}$$

hier ist R die universelle Gaskonstante, T die Temperatur, K die Bindungskonstante, ΔG die freie Reaktionsenthalpie, ΔH die Reaktionsenthalpie und ΔS die Reaktionsentropie, bestimmt werden.^[32] Da die Titration von Puffer zu der Polymerlösung schon Wärme freisetzt, wurde eine Negativkontrolle von Polymer zu Puffer durchgeführt **9b**. Die Bindungsenergie von ConA zu dem PManAMA Polymer ergab einen $K_{D(\text{app})}$ von $2,53 \cdot 10^{-3} \pm 1,69 \cdot 10^{-4}$ mM zu einer Mannoseeinheit. In der Literatur wurde ein K_D Wert von 200 μM von ConA zu immobilisierter Mannose publiziert.^{[33][34][35]} Die gefundene Dissoziationskonstante weicht von der Literatur ab. Der optimale Ligand für ConA ist die α -Mannose. Bei dem synthetisierten Glykopolymer liegen α - und β -Mannoseeinheiten in einem Verhältnis von 1:10 vor. Die β -Mannose wird von ConA schwach gebunden. Das ConA bindet an der α -Mannose wodurch eine höhere Dissoziationskonstante als in der Literatur zustande kommt. Die Bindungsaffinität des ConA wird positiv von der Multivalenz des Glykans im Polymer beeinflusst und somit kann eine Dissoziationskonstante für das Oligomer PManAMA detektiert werden.

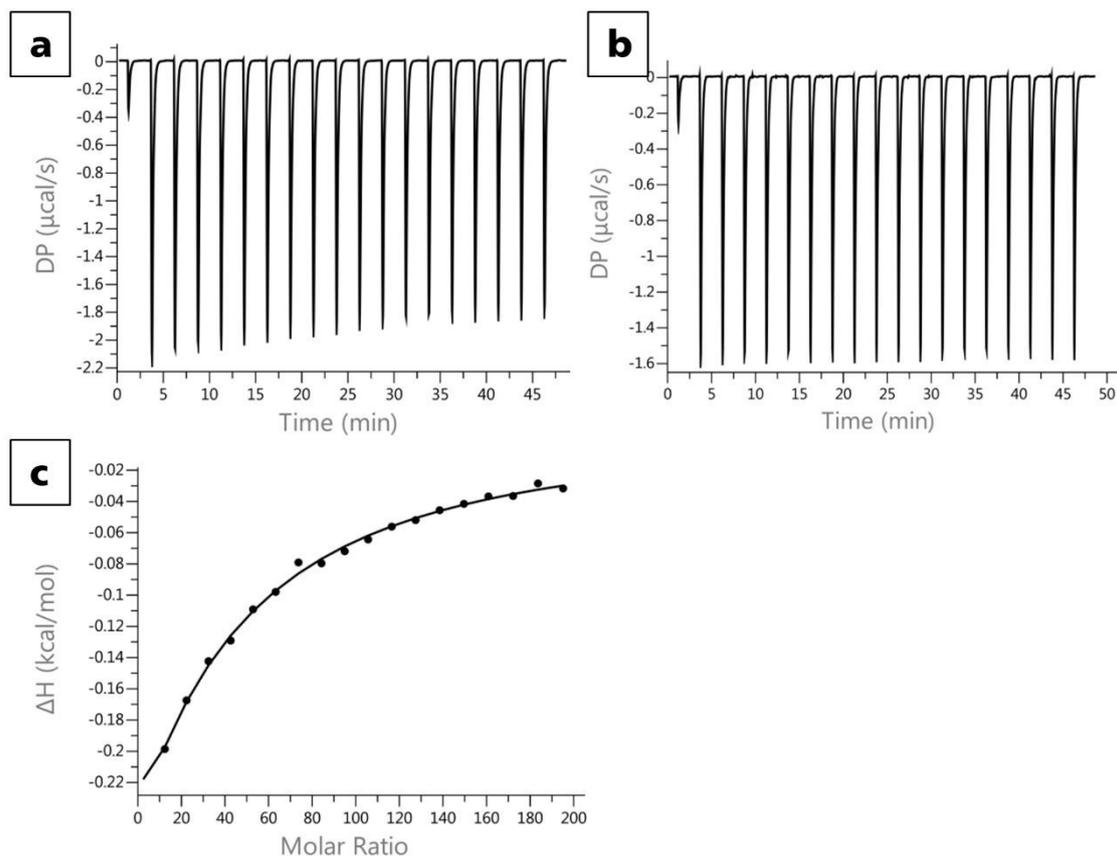
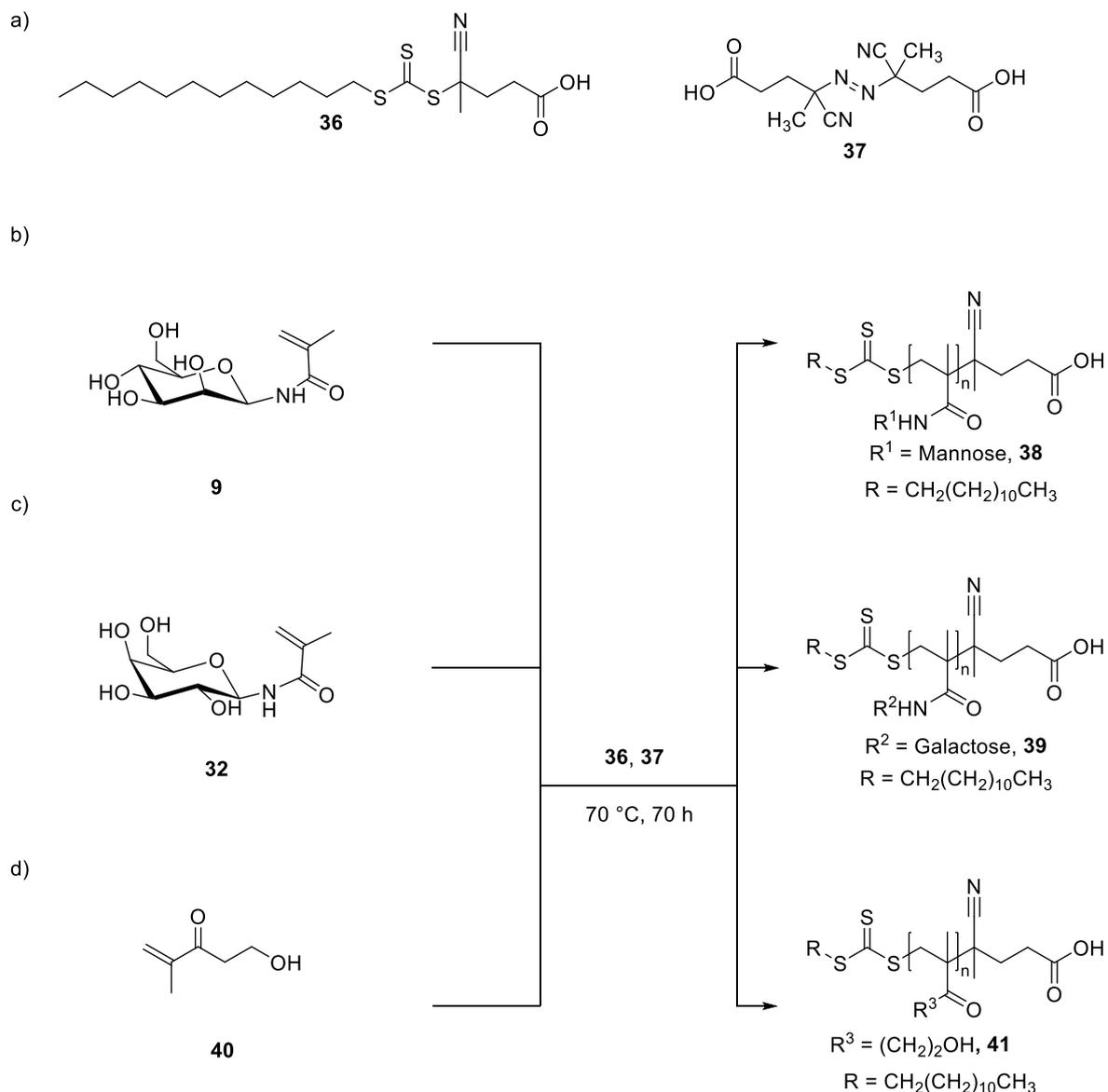


Abbildung 9: ITC-Messung des Homopolymers PManAMA (34) gegen Con A; a) ITC-Messung von PManAMA gegen ConA; b) ITC-Messung der Negativkontrolle PManAMA gegen Puffer; c) freigesetzte Wärmemenge gegen die molare Konzentration des zu messenden Produktes und die Anpassung der Daten an eine theoretische Kurve.

4.3. Glykopolymere über RAFT-Polymerisation

Die Glykopolymere PManAMA **38** und PGalAMA **39** wurden aus den Monomeren in Kapitel 3 über eine RAFT-Polymerisation synthetisiert. Außerdem wurde Polymer PHEMA **41** über RAFT synthetisiert. Die Polymerisation der Glykomomere verläuft bei 70 °C und 70 h. Dabei wird 4,4'-Azobis-(4-cyan-valeriansäure) (ABCVA) **36** als Initiator und 4-Cyan-4-(thiobenzoylthio)-pentansäure **37** als CTA benutzt (**Schema 16**). Nach Dialyse gegen destilliertes Wasser wurden die Homopolymere erhalten. Um die Synthese zu optimieren wurde die Reaktionszeit und Temperatur variiert. Die Temperatur muss hoch genug sein, damit der temperatur-sensitive Initiator zerfallen kann und die Polymerisation startet. Die höchste Ausbeute wurde bei einer Reaktionszeit von 70 h und einer Reaktionstemperatur von 70 °C erhalten. Die Synthesebedingungen wurden für die weiteren RAFT-Polymerisationen verwendet.



Schema 16: RAFT-Polymerisation der Glykomonomere, a) CTA (**36**) und Initiator (**37**) für die RAFT-Polymerisation; b) RAFT-Polymerisation von ManAMA (**38**), c) RAFT-Polymerisation von GalAMA (**39**), d) RAFT-Polymerisation von PHEMA (**41**).

Tabelle 5: Analysedaten der Polymere über RAFT PManAMA (**38**), PGalAMA (**39**) und PHEMA (**41**) (GPC-Messung in DMSO bei 80 °C).

Eintrag	Substrat	Ausbeute [%]	t [h]	M _w [g/mol]	M _n [g/mol]	Đ	DP
1	PManAMA	18	70	214262	2409	88,96	9-866
2	PGalAMA	3,7	70	152127	811	187,58	3-61
3	PHEMA	63	5	42062	11188	3,76	86

Die Polymere wurden mittels GPC in DMSO bei 80 °C analysiert. Für die Polymere PManAMA **38** und PGalAMA **39** wurden sehr breite Molekulargewichtsverteilungen mit zwei Peaks erhalten (Abbildung 10, Beispiel PManAMA). Für die GPC-Analyse wurde DMSO als Lösungsmittel genutzt und die Analyse musste bei 80 °C durchgeführt werden, da die Polymere in keinem anderen geeigneten GPC-Lösungsmittel löslich waren. Für die GPC-Analyse der Glykopolymere konnte kein

geeigneter Standard gefunden werden und es wurde Pullulan ein Polysaccharid als Standard verwendet. Für das Glykopolymer PManAMA **38** wurde ein $M_w = 214262$ g/mol und ein $M_n = 2409$ g/mol gefunden. Daraus resultiert eine große Dispersität von $\mathcal{D} = 88,96$ und ein Polymerisationsgrad der zwischen 9 und 866 liegt. Auch für PGalAMA **39** wurde eine breite Molekulargewichtsverteilung gefunden. Es wurde ein $M_w = 152127$ g/mol und ein $M_n = 811$ g/mol erhalten (Anhang, Abb. 64). Durch die Signale wurde eine Dispersität von 187,58 erreicht. Daraus resultiert ein Polymerisationsgrad von 3 bis 61. Eine Dispersität von 187,58 ist für eine kontrollierte Polymerisation auch im Rahmen der Fehler zu groß. Einige Gründe, die zu diesem Ergebnis geführt haben, werden folgend erläutert.

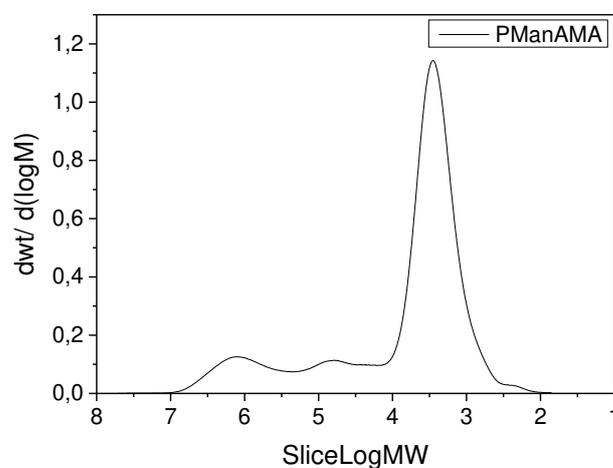


Abbildung 10: GPC-Spektrum der Molekulargewichtverteilung von PManAMA (38) in DMSO bei 80 °C.

Die GPC-Analyse ist für die Glykopolymere nicht standardisiert und viele Parameter, wie der Standard, das Säulenmaterial und das Lösungsmittel nehmen Einfluss auf die Ergebnisse. Außerdem werden ungeschützte Zucker analysiert, die durch die freien OH-Gruppen mit dem Säulenmaterial wechselwirken können. Daraus resultieren keine aussagekräftigen Ergebnisse der GPC-Analyse für die Glykopolymere. Es kann geschlussfolgert werden, dass Oligomere oder auch Polymere in einer nicht kontrollierten Polymerisation entstanden sind. Des Weiteren hat das verwendete RAFT-Agens Einfluss auf eine kontrollierte RAFT-Polymerisation. Bei der Synthese wurde 4-Cyan-4-(thiobenzoylthio)-pentansäure **36** als CTA verwendet, welches hydrophob ist. Dies könnte ebenfalls eine Änderung in der GPC-Analyse hervorrufen.

Das Polymer PHEMA **41** wurde ebenfalls über RAFT synthetisiert und mit GPC unter den gleichen Bedingungen der Glykopolymere analysiert (Anhang, Abb. 65). Es wurde ein $M_w = 42062$ g/mol und ein $M_n = 11188$ g/mol erhalten. Daraus ergibt sich eine Dispersität von $\mathcal{D} = 3,76$ und ein $P_n = 86$. Die Dispersität von 3,76 ist für eine kontrollierte RAFT-Polymerisation zu hoch. Dies könnte an einem nicht geeigneten CTA für das Polymer liegen. Außerdem hat auch das Lösungsmittel Einfluss auf die Kontrolle der Reaktion. In weiterführenden Arbeiten sollte die RAFT-Polymerisation optimiert werden und ein geeigneter CTA für die Glykopolymere und einer Polymerisation in Wasser gefunden werden. Albertin *et al.*^[36] polymerisierten Methyl-6-O-methacryloyl- α -D-glukosid mit (4-Cyanopentansäure)-4-dithiobenzoat als CTA in Ethanol. Sie erhielten moderate Molekulargewichtsverteilungen, die mit

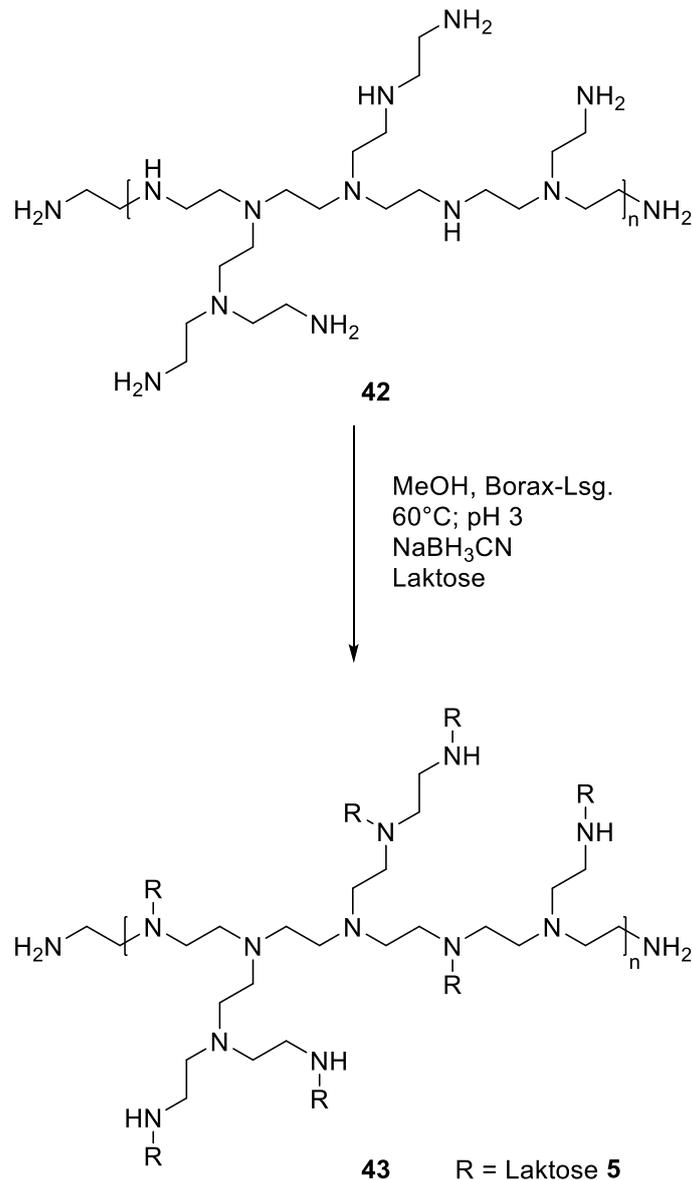
längerer Reaktionszeit enger wurden ($M_n = 21.100$ g/mol, $\bar{D} = 1,10$). Hier wurde im Gegensatz die RAFT-Polymerisation in Ethanol durchgeführt und ein anderes RAFT-Agens verwendet. Auch Housni *et al.*^[20] synthetisierten Glykopolymere über RAFT-Polymerisation mit enger Molekulargewichtsverteilung. Sie synthetisierten PGAMA und PLAMA in Wasser/DMF mit *S,S'*-Bis(α,α' -dimethyl- α'' -essigsäure)-trithiocarbonat als CTA bei 60 °C und erhielten für PGAMA $M_n = 14.070$ g/mol und $\bar{D} = 1,19$ und PLAMA $M_n = 4.730$ g/mol und $\bar{D} = 1,22$. Hier wurde ein anderer CTA verwendet und die GPC-Analyse in einem wässrigen System mit 0,1 M Natriumnitrat als Lösungsmittel mit einem Polyethylenoxid-Standard durchgeführt. Die Abweichungen können Einfluss auf die Polymerisation und GPC-Analyse haben.

Für die weitere Verwendung der Glykopolymere war der Erhalt der Trithiocarbonat-Gruppe wichtig. Über die Trithiocarbonat-Gruppe sollten die Polymere auf Goldoberflächen gebunden werden. Dabei binden zwei Schwefelatome der Trithiocarbonat-Gruppe über Chemisorption an die Goldoberfläche.^{[37][38]}

Die entstandenen Homopolymere PManAMA **38**, PGalAMA **39** und PHEMA **41** wurden in späteren Anwendungen verwendet (**Kapitel 6**).

4.4. Herstellung von Glykopolymeren über reduktive Aminierung

Das Glykopolymer PEI-Laktose **43** wurde durch reduktive Aminierung von PEI **42** mit Laktose **5** synthetisiert. Dabei wurde das Polymer Polyethylenimin **42** ($M_n \sim 60.000$ g/mol; $M_w \sim 750.000$ g/mol) mit Laktose **5** funktionalisiert. Die Reaktanden, Laktose **5** und PEI **42** wurden in einem Gemisch aus Methanol und 50 mM Natriumtetraborat-Lösung vorgelegt und mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Als Reduktionsmittel wurde NaBH_3CN hinzugefügt und die Reaktion bei 60 °C für 2 h gerührt. Die Laktose liegt im wässrigen Medium offenkettig vor und kann mit den sekundären und primären Aminen des PEI-Polymers reagieren. Zuerst wird ein Imin gebildet, das durch weitere Reduktion zum stabilen Amin reagiert (**Schema 17**). Ein Glykan-funktionalisiertes Polymer wird erhalten, bei dem die Laktose in offenkettiger Form vorliegt.



Schema 17: Synthese von PEI (42) mit Laktose (5) über reduktive Aminierung zur PEI-Laktose (43). Die Synthese wurde bei 60 °C, bei pH 3 für 2 h durchgeführt.

Die Synthesebedingungen für die reduktive Aminierung wurden variiert, um einen optimierten Prozess zu erhalten. Der Einfluss von pH-Wert, dem Lösungsmittelsystem, dem Reduktionsmittel und dem Verhältnis von Laktose zum Reduktionsmittel wurde untersucht (**Tabelle 6**).

Zuerst wurde untersucht, ob die Reaktion im basischen oder sauren Milieu bevorzugt verläuft. Bei einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol/Wasser (1:1) und NaBH₃CN als Reduktionsmittel, wurde der pH-Wert 9 und 3 getestet (**Eintrag 1, 2**). Außerdem wurde bei Methanol/Wasser (1:4) der Einfluss des Reduktionsmittel Natriumascorbat bei pH 8 und 3 untersucht (**Eintrag 4, 5**). Durch die Erhöhung des pH-Werts wurde die Bildung von Nebenprodukten begünstigt. Hier wurden während der Reaktion Niederschlag beobachtet. Ein pH-Wert von 3 minimierte die Bildung von Nebenprodukten, da unter sauren Bedingungen der gebildete Übergangszustand schneller zum Imin reagiert (siehe Monomersynthese, Schema 5). Durch den Einsatz von Natriumascorbat wurde versucht ein umweltfreundliches, nicht toxisches und günstiges Reduktionsmittel einzusetzen, was jedoch zu

keinem positiven Ergebnis führte. Da NaBH_3CN toxisch und umweltschädlich ist, sollte das Verhältnis an Reduktionsmittel zu Laktoseeinheit minimiert werden. In früheren Synthesen wurde ein Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Bei einem Verhältnis von 5:1 (**Eintrag 6**) konnten durch die GPC-Analyse herausgefunden werden, dass mehr Laktoseeinheiten an das PEI-Polymer geknüpft werden. Zwei Laktoseeinheiten pro Wiederholungseinheiten wurden an das PEI-Polymer funktionalisiert. Außerdem wurden der Einfluss von den Lösungsmittelsystemen MeOH/ H_2O (**Eintrag 1, 2** und **Eintrag 4, 5**) und MeOH/Borax-Lösung (Natriumtetraborat) (**Eintrag 3, 6**) untersucht. Bei dem Lösungsmittel MeOH/Borax-Lösung (**Eintrag 3, 6**) wurde über GPC-Analyse erkannt, dass mehr Laktoseeinheiten an das Polymer geknüpft wurden.

Tabelle 6: Synthesebedingungen der reduktiven Aminierung von PEI mit Laktose.

Eintrag	Lösungsmittel	Reduktionsmittel	Laktose/Reduktionsmittel Verhältnis	pH-Wert
1	MeOH/ H_2O (1:1)	NaBH_3CN	1:10	9
2	MeOH/ H_2O (1:1)	NaBH_3CN	1:10	3
3	MeOH/Natriumborat (400 mM, 1:1)	NaBH_3CN	1:10	3
4	MeOH/ H_2O (1:4)	Natriumascorbat	1:10	8
5	MeOH/ H_2O (1:4)	Natriumascorbat	1:10	3
6	MeOH/Natriumborat (50 mM, 1:1)	NaBH_3CN	1:5	3

Die optimierten Bedingungen (**Eintrag 6**) wurden für die reduktive Aminierung des PEIs mit Laktose angewendet. Ein Scale-Up-Prozess wurde durchgeführt und 86 g des Glykopolymeres hergestellt. Das Molekulargewicht für PEI-Polymer ergab $M_w = 640000$ g/mol, $M_n = 4900$ g/mol und für das PEI-Laktose-Polymer $M_w = 857400$ g/mol, $M_n = 10710$ g/mol (Anhang, Abb.67). Im PEI-Polymer wurden zwei primäre oder sekundäre Amine pro Wiederholungseinheit mit Laktose funktionalisiert.

Das synthetisierte Glykopolymer wurde in späteren Anwendungen, zum Spinnen von Nanofasern und zur Beschichtung von Polystyroloberflächen verwendet.

4.5. Zusammenfassung

Die Synthesen von Glykopolymeren bzw. Oligomeren konnten erfolgreich mit ATRP und RAFT realisiert werden. Die Polymere PManAMA **34** und PLacAEMA **35** wurden über ATRP synthetisiert und mit *in situ* IR verfolgt. Die Polymerisation von PManAMA **34** startet aufgrund sterischer Hinderung von dem Glykan zur polymerisierbaren Gruppe und der Wechselwirkung von dem Kupferkatalysator zu dem Glykan erst nach 200 min. Die Polymerisation von PLacAEMA **35** hingegen wird aufgrund des Spacers nicht sterisch gehindert. Die offenkettige Form der Glukose wird als Spacer ausgenutzt. Sie bewirkt, dass das Glykan und die polymerisierbare Gruppe nicht in unmittelbarer Nähe zueinander sind. Aus diesem Grund tritt bei der Reaktion keine sterische Hinderung auf und die Polymerisation verläuft nach einer Reaktion erster Ordnung. Auch die Polymerisation über RAFT von PManAMA **38** und PGalAMA **39** konnte durchgeführt werden. Die Oligomere werden in Kapitel 6 als Beschichtung von Oberflächen und zur Untersuchung von biologischen Prozessen verwendet.

Außerdem wurde ein kommerzielles Polymer mit Glykanen funktionalisiert. Es konnten durch eine schnelle und kosteneffiziente Synthese hohe Ausbeuten eines Glykopolymers erhalten werden. PEI **42** wurde mit Laktose **5** über eine optimierte reduktive Aminierung funktionalisiert. Die optimierte Synthese wurde in einem größeren Maßstab durchgeführt und es konnten 86 g Glykopolymer synthetisiert werden. Zur weiteren Verwendung wurde das Glykopolymer zum Spinnen von Nanofasern und Beschichtung von Oberflächen von Projektpartnern angewandt.

4.6. Experimenteller Teil

4.6.1. Synthese des Glykopolymers PManAMA über ATRP

ManAMA **9** (2000 mg, 8,099 mmol) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus H₂O/MeOH (1:1, 15,00 mL) vorgelegt. CuBr (21,60 mg, 0,150 mmol) und 2,2'-Bipyridin (43,30 mg, 0,2770 mmol) wurden hinzugegeben und die Lösung wurde auf 70 °C erhitzt. Ethyl- α -bromoisobutyrat **33** (0,0200 mL, 0,1360 mmol) wurde als Initiator hinzugegeben und die Reaktion für 24 h bei 70 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über eine Silicagel-Säule gefiltert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und die Lösung gegen destilliertes Wasser in einer 0,5-1 kDa Cellulose-Membran dialysiert. Die Lösung wurde an der Gefriertrocknung getrocknet und das Homopolymer PManAMA **34** als weißer Feststoff erhalten (74,60 mg, 0,019 mmol, 4 %).

$M_w = 3879$ g/mol, $M_n = 459$ g/mol, $\bar{D} = 8,46$, $P_n = 15$.

4.6.2. Synthese des Glykopolymers PLacAEMA über ATRP

LacAEMA **6** (2000 mg, 4,391 mmol) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus MeOH/H₂O (1,5:1, 12,00 mL) vorgelegt. CuBr (12,12 mg, 0,0084 mmol) und 2,2'-Bipyridin (26,49 mg, 0,1696 mmol) wurden hinzugegeben und die Lösung wurde auf 60 °C erhitzt. Ethyl- α -bromoisobutyrat **33** (12,59 μ L, 0,0850 mmol) wurde als Initiator hinzugegeben und die Reaktion für 24 h bei 70 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über eine Silicagel-Säule gefiltert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und die Lösung gegen destilliertes Wasser in einer 0,5-1 kDa Cellulose-Membran dialysiert. Die Lösung wurde an der Gefriertrocknung getrocknet und das Homopolymer PLacAEMA **35** (37,6 mg, 0,01 mmol, 2 %) als weißer Feststoff erhalten.

¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): 4,25-3,30 (m, Zucker, CH₂O, CH₂N); 1,17-0,76 (m, CH₃ backbone) ppm.

$M_w = 2904$ g/mol, $M_n = 1355$ g/mol, $\bar{D} = 2,14$; $P_n = 6$.

4.6.3. Synthese der Glykopolymere PManAMA und PGalAMA über RAFT-Polymerisation

ManAMA **9** (200,0 mg, 0,8100 mmol) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus H₂O/DMF (3:2, 5,000 mL) vorgelegt. 4-Cyan-4-(thiobenzoylthio)-pentansäure als CTA **36** (2,420 mg, 6,000 μ mol) und 4,4'-Azobis-(4-cyan-valeriansäure) als Initiator **37** (0,1600 mg, 0,600 μ mol) wurden hinzugegeben und die Lösung wurde auf 70 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde 70 h bei 70 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde gegen destilliertes Wasser in einer 0,5-1 kDa Cellulose-Membran dialysiert. Die Lösung wurde an der Gefriertrocknung getrocknet und das Homopolymer PManAMA **38** (36 mg, 1,7·10⁻⁴ mmol, 18 %) als weißer Feststoff erhalten. $M_w = 214262$ g/mol, $M_n = 2409$ g/mol, $\bar{D} = 88,96$, $P_n = 9 - 866$.

Das Homopolymer PGalAMA **39** wurden analog zum Polymer PManAMA **38** synthetisiert.

PGalAMA (7,2 mg, 4,7·10⁻⁵ mmol, 3,7 %): $M_w = 152127$ g/mol, $M_n = 811$ g/mol, $\bar{D} = 187,58$, $P_n = 3-61$.

Über diese Methode wurden noch andere Glykomonomere wie PLacAMA (hergestellt von Jo Sing Julia Tang, M. Sc., $M_w = 25865$ g/mol, $M_n = 13118$ g/mol, $\bar{D} = 1.97$, $P_n = 32$) synthetisiert.

4.6.4. Synthese von PHEMA über RAFT-Polymerisation

HEMA **40** (5000 mg, 38,42 mmol) wurde über Silicagel gefiltert und in trockenem Ethanol (10,00 mL) vorgelegt. 4-Cyan-4-(thiobenzoylthio)-pentansäure als CTA **36** (153,4 mg, 0,3800 mmol) und 4,4'-Azobis-(4-cyan-valeriansäure) als Initiator **37** (21,50 mg, 0,0768 mmol) wurden hinzugegeben und die Lösung wurde auf 65 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 65 °C für 5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde abgekühlt und in Diethylether ausgefällt. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet und das Homopolymer PHEMA **41** als Feststoff erhalten (3,130 g, 0,2798 mmol, 63 %).

$M_w = 42062 \text{ g/mol}$, $M_n = 11188 \text{ g/mol}$, $D = 3,76$, $P_n = 86$.

4.6.5. Synthese von PEI-Laktose über reduktive Aminierung

Polyethylenimin (PEI) Lösung **42** (20,00 g, 0,1670 mmol, 50-wt. %; $M_n \sim 60.000 \text{ g/mol}$; $M_w \sim 750.000 \text{ g/mol}$) und Laktose **5** (38,03 g, 105,5 mmol, 5 eq. zur Wiederholungseinheit von PEI) wurden in einer Natriumtetraborat Lösung (100,0 mL, 50,00 mM) und Methanol (70,00 mL) bei 60 °C vorgelegt. Der pH-Wert wurde mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt. Natriumcyanoborhydrid (33,15 g, 527,5 mmol) wurde in Methanol (30,00 mL) gelöst und unter Rühren langsam zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Lösung wurde bei 60 °C für 2 h gerührt. Die erhaltene Lösung wurde gegen destilliertes Wasser in einer 10 kDA Cellulose-Membran dialysiert. Das Produkt wurde an der Gefriertrocknung getrocknet und das PEI-Laktose Polymer **43** als Feststoff erhalten (17,00 g, 1,587 mmol, 85 %).

$M_w = 857,4 \text{ kg/mol}$, $M_n = 10,71 \text{ kg/mol}$

IR (neat) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3366 (m); 2866 (w); 2339 (w); 2171 (w); 1559 (w); 1406 (w); 1119 (w); 1040 (m); 888 (w).

4.7. Literatur

- [1] Y. Miura, *Polym. J.* **2012**, *44*, 679.
- [2] A. Ghadban, L. Albertin, *Polymers* **2013**, *5*, 431.
- [3] Y. Miura, Y. Hoshino, H. Seto, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1673.
- [4] K.-S. Krannig, H. Schlaad in *Polymer Chemistry Series* (Eds.: C. R. Becer, L. Hartmann), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 77–95.
- [5] H.-J. Gabius, *Naturwissenschaften* **1995**, *82*, 533.
- [6] G. Yilmaz, C. R. Becer, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2014**, *2*, 39.
- [7] H. Park, R. R. Rosencrantz, L. Elling, A. Böker, *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 45.
- [8] S. R. S. Ting, G. Chen, M. H. Stenzel, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1392.
- [9] Y. Nagasaki, K. Yasugi, Y. Yamamoto, A. Harada, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1067.
- [10] H.-J. Gabius, S. André, J. Jiménez-Barbero, A. Romero, D. Solís, *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 298.
- [11] A. Dondoni, A. Marra in *Polymer Chemistry Series* (Eds.: C. R. Becer, L. Hartmann), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 96–148.
- [12] T. K. Lindhorst in *Polymer Chemistry Series* (Eds.: C. R. Becer, L. Hartmann), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 1–16.
- [13] Y. Miura, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2007**, *45*, 5031.
- [14] D. Appelhans, J. Cladera, M. Rogers, B. Voit in *Polymer Chemistry Series* (Eds.: C. R. Becer, L. Hartmann), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 149–177.
- [15] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555.
- [16] A. M. Eissa, N. R. Cameron in *Advances in Polymer Science* (Ed.: H. Schlaad), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**, pp. 71–114.
- [17] K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1998**, *36*, 2473.
- [18] R. B. Grubbs, *Polymer Reviews* **2011**, *51*, 104.
- [19] Y. Miura, H. Seto in *Polymer Chemistry Series* (Eds.: C. R. Becer, L. Hartmann), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 257–269.
- [20] A. Housni, H. Cai, S. Liu, S. H. Pun, R. Narain, *Langmuir* **2007**, *23*, 5056.
- [21] U. Y. Lau, E. M. Pelegri-O'Day, H. D. Maynard, *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *39*.
- [22] Z. Hordyjewicz-Baran, L. You, B. Smarsly, R. Sigel, H. Schlaad, *Macromolecules* **2007**, *40*, 3901.
- [23] K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921.
- [24] J. J. Haven, T. Junkers, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 6474.
- [25] A. M. Alb, M. F. Drenski, W. F. Reed, *Polym. Int.* **2008**, *57*, 390.
- [26] C. Kütahya, C. Schmitz, V. Strehmel, Y. Yagci, B. Strehmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7898.
- [27] B. J. Holland, J. N. Hay, *Polymer* **2001**, *42*, 4825.
- [28] R. Narain, S. P. Armes, *Chem. Commun.* **2002**, 2776.
- [29] R. Narain, S. P. Armes, *Macromolecules* **2003**, *36*, 4675.
- [30] C.F. Brewer, L. Bhattacharyya, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7306.
- [31] K. A. Maupin, D. Liden, B. B. Haab, *Glycobiology* **2012**, *22*, 160.
- [32] G. J. K. Praefcke, C. Herrmann, *BIOspektrum* **2005**, *11*, 44.
- [33] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140.
- [34] R. V. Weatherman, K. H. Mortell, M. Chervenak, L. L. Kiessling, E. J. Toone, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3619.
- [35] G. J. K. Praefcke, C. Herrmann, *BIOspektrum* **2005**, *11*, 44.

- [36] L. Albertin, M. Stenzel, C. Barner-Kowollik, Foster, L. J. R. Foster, T. P. Davis, *Macromolecules* **2004**, *37*, 7530.
- [37] A.-S. Duwez, P. Guillet, C. Colard, J.-F. Gohy, C.-A. Fustin, *Macromolecules* **2006**, *39*, 2729.
- [38] B. Ebeling, P. Vana, *Macromolecules* **2013**, *46*, 4862.

5. Glykopolymere als Teil von Blockcopolymeren und deren Selbstassemblierung zu Mizellen

5.1. Einleitung

Die Biokompatibilität und die Biofunktionalität von Glykopolymeren und darauf basierend die Synthese von Biomaterialien hat sich zu einer neuartigen Technologie entwickelt.^[1-5] Die Biofunktionalität von Glykopolymeren eröffnet ein interessantes Feld für Anwendungen in der medizinischen Diagnostik, als Oberflächenfunktionalität oder für Einkapselungsprozesse für den Transport und die Freisetzung von Teilchen.^{[1][6][7]}

Glykopolymere als hydrophiler Block in Blockcopolymeren wurden bereits detailliert untersucht und in Biomaterialien eingesetzt.^[8-11] Aufgrund der starken und selektiven Glykan-Protein-Wechselwirkung können sie in Diblockcopolymeren als biomedizinische Transporter Verwendung finden.^{[1][6][7]} Polymermizellen aus Blockcopolymeren selbstassemblieren in Lösung in verschiedenen Morphologien, wie z. B. sphärische Mizellen, zylindrische Mizellen oder Polymersome.^[12-14] Die Form der Mizellen wird dabei von der Länge der einzelnen hydrophoben und hydrophilen Polymerblöcke und der gesamten Amphiphilie der Blockcopolymeren bestimmt.^{[12][15]}

Gupta *et al.* synthetisierten Poly(propylensulfid-*b*-*N,N*-dimethylacrylamid)-Mizellen und beluden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff (NileRed) oder 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyaninperchlorat (DiO), als Transportmodell.^[16] Sie zeigten, dass Polymermizellen mit einem hydrophoben Stoff reversibel beladen werden können. Radzevicius *et al.* veröffentlichten die Synthese von hydrophilen Pentablockcopolymeren mit Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (PHEMA) und Poly(2-(Dimethylamino)ethylmethacrylat) (PDEMAEMA) als Blöcke. Sie studierten das Selbstassemblierungsverhalten der Blockcopolymeren in wässriger Lösung.^[17] Die Blockcopolymeren aggregierten in eine Wolken ähnliche Form, wenn sich der PHEMA-Block an der Mizellenaußenseite befand. Zehm *et al.* stellten Blockcopolymeren aus Poly(2-hydroxyethylmethacrylat-*b*-benzylmethacrylat) (PHEMA-*b*-PBzMA) und Poly(2-hydroxypropylmethacrylat-*b*-benzylmethacrylat) (PHPMA-*b*-PBzMA) her.^[18] Sie stellten die Morphologie nach der Selbstassemblierung unter dem Einfluss von Molekulargewicht, Zusammensetzung und Lösungsmittel heraus.

Poly(propylenoxid)-*b*-2-gluconamidoethylmethacrylat (PPO) selbstassembliert in wässriger Lösung zu konventionellen Mizellen, wie Armes *et al.* veröffentlichten.^[19] Sie zeigten, dass das Diblockcopolymer in Mizellen mit PPO-Kern und Glykaneinheiten auf der Außenseite der Mizellen assemblierte. Schlaad *et al.* synthetisierten glykosilierte Polybutadien-*b*-Poly(ethylenoxid) Blockcopolymeren, die spontan Glykopolymervesikel mit Glukose an der Vesikeloberfläche formten.^[20]

Wenn Blockcopolymeren eine Glykaneinheit auf der Außenseite tragen, können diese Glykane-Wechselwirkungen zu Proteinen, Pathogenen oder Organismen eingehen.^{[10][6]}

In früheren Arbeiten der Gruppe wurde gezeigt, dass doppelt hydrophile Diblockcopolymeren Poly(2-hydroxyethylmethacrylat-*b*-*N*-acetylglukosaminethylmethacrylat) (PHEMA-*b*-PGlcNAcEMA) Mizellen in wässriger Lösung formten.^[21] Die Mizellen wurden mit dem hydrophoben Farbstoff NileRed

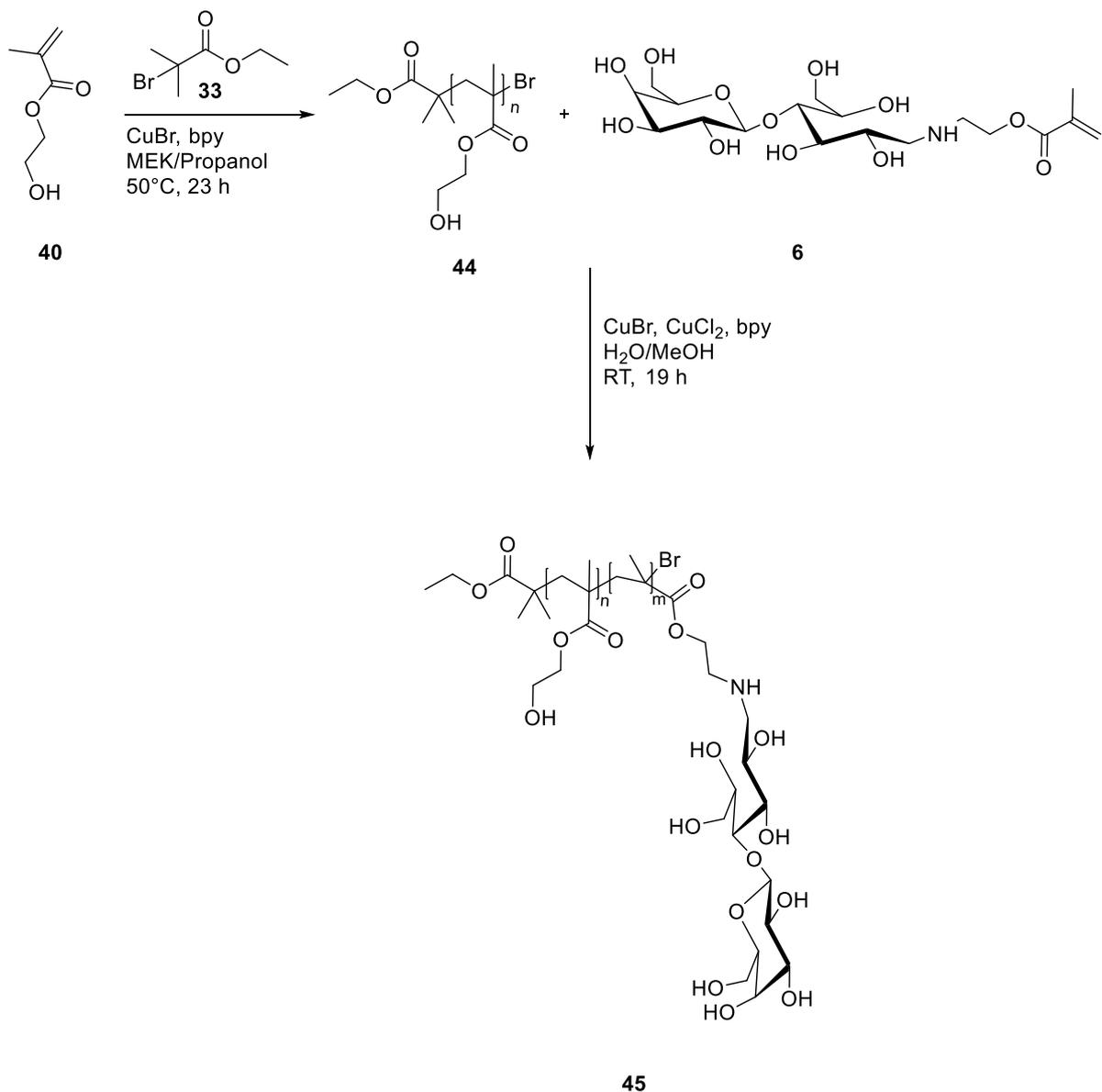
beladen und es konnte herausgestellt werden, dass der Glykopolymerblock an der Außenseite der Mizellen sitzt. Sie zeigten eine spezifische Bindung zu dem Pflanzenlektin GS-II. Dadurch sind die Glykane frei zugänglich und für biomolekulare Erkennungsprozesse geeignet.

In diesem Kapitel der Dissertation wurden Glykopolymermizellen aus verschiedenen Diblockcopolymeren hergestellt. Die Diblockcopolymeren wurden aus den Glykomonomeren aus Kapitel 3 über eine ATRP Reaktion synthetisiert. Es wurden Poly(2-hydroxyethylmethacrylat-*b*-laktosaminethylmethacrylat) PHEMA-*b*-PLacAEMA und verschiedene Poly(methylmethacrylat-*b*-mannosemethylacrylamid) (PMMA-*b*-PManAMA) Diblockcopolymer synthetisiert und deren Selbstassemblierung in wässriger Lösung untersucht.

5.2. Synthese des Diblockcopolymers PHEMA-*b*-PLacAEMA und seine Selbstassemblierung zu Mizellen

In früheren Veröffentlichungen wurde das Blockcopolymer PHEMA-*b*-PGlcNAcEMA synthetisiert und die Bildung von Mizellen beobachtet.^[21] Es wurde berichtet, dass das doppelt hydrophile Diblockcopolymer in wässriger Lösung zu Mizellen mit einer Größe von 16 nm assemblierte. Außerdem wurden die Bindungsaffinität des Diblockcopolymers zu dem Lektin GS-II und die Einkapselung kleiner hydrophober Moleküle in die Mizellen getestet. Dazu wurde die Mizellenlösung mit einem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff versetzt und die Verschiebung des Emissionsspektrums beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass der hydrophobe Farbstoff von den Mizellen eingekapselt wird. Diese Eigenschaft der Diblockcopolymeren zeigt, dass sie potenziell als Nanokapseln für Wirkstoffe oder Farbstoffe fungieren können.

Hier wurde ein ähnliches Polymer synthetisiert. Das Monosaccharid *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc) wurde durch das Disaccharid Laktose als biofunktionelle Gruppe im Polymer ersetzt. Für die Herstellung des Diblockcopolymers wurde HEMA **40** über eine ATRP-Reaktion polymerisiert. Das entstandene Polymer PHEMA **44** wurde als Makroinitiator für die Synthese des Blockcopolymers PHEMA-*b*-PLacAEMA **45** verwendet. Der zweite Block wurde mit dem Monomer LacAEMA **6** (**Kapitel 3**) synthetisiert. Dabei verlief die Polymerisation des zweiten Blocks über eine ATRP-Reaktion (**Schema 18**).



Schema 18: Blockcopolymerisation von PHEMA-*b*-PLacAEMA (45). Im ersten Syntheseschritt wird HEMA (40) in MEK/Propanol bei 60 °C für 23 h polymerisiert. Im zweiten Syntheseschritt wird PHEMA (44) als Makroinitiator zu Polymerisation von PHEMA-*b*-PLacAEMA (45) in H₂O/MeOH bei RT für 19 h verwendet.

Die Polymere **44** und **45** wurden mittels GPC-Analyse analysiert und die Ergebnisse in Tabelle 7 zusammengefasst. Für den Makroinitiator PHEMA **44** wurde ein $M_w = 20610$ g/mol und ein $M_n = 15760$ g/mol mit einer Dispersität von 1,30 erhalten (**Eintrag 1**). Daraus wurde ein Polymerisationsgrad von 158 errechnet. Für das Diblockcopolymer PHEMA-*b*-PLacAEMA **45** wurde ein $M_w = 16292$ g/mol und ein $M_n = 8891$ g/mol mit einer Dispersität von 1,83 erhalten (**Eintrag 2**). Das kleinere Molekulargewicht für das Diblockcopolymer im Vergleich zu dem Makroinitiator deutet auf die Bildung von Mizellen oder Aggregate in Lösung hin.

Tabelle 7: Analysedaten der Polymere aus dem Makroinitiator PHEMA (44) (GPC-Messung in DMF) und dem Diblockcopolymer PHEMA-*b*-PLacAEMA (45). Die GPC-Messungen wurden in DMSO bei 80 °C durchgeführt.

Eintrag	Substrat	Ausbeute [%]	t [h]	M _w [g/mol]	M _n [g/mol]	Đ	DP	Verhältnis [M/CuBr/Cu ₂ Br /bpy]
1	PHEMA	31	24	20610	15760	1,30	158	50:1:1:0:2
2	PHEMA- <i>b</i> -LacAEMA	12	19	16292	8891,0	1,83	--	250:5:4:1:10

Das Blockcopolymer PHEMA-*b*-PLacAEMA **45** wurde mit ¹H-NMR analysiert. In dem ¹H-NMR-Spektrum (**Abbildung 11**) können die Signale des Blocks PHEMA bei 4,5 ppm -OH, 4,0 ppm -O-CH₂-, 3,5 ppm -CH₂-CH₂-OH, 2,0 ppm -CH₂- und 1,0 ppm -CH₃ zugeordnet werden. Die Signale für den Glykanblock PLacAEMA werden von den PHEMA-Signalen überlagert, da der PLacAEMA-Block im Verhältnis kurz ist. Das Spektrum zeigt zwei schwache Signale bei 3,0 ppm und um 1,5 ppm, die dem PLacAEMA-Block zugeordnet werden können.

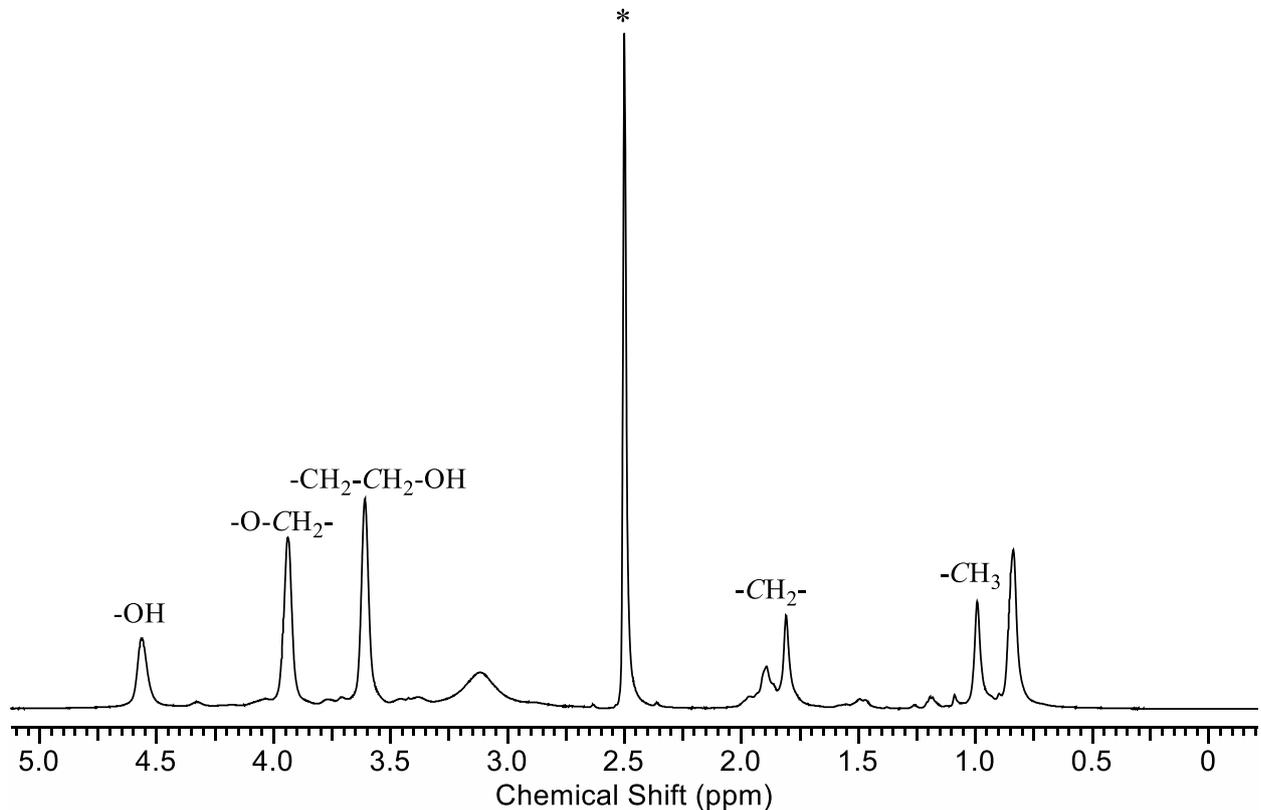


Abbildung 11: ¹H-NMR-Spektrum von PHEMA-*b*-PLacAEMA (48), DMSO-d₆ (*). Signale des PHEMA-Blocks, 4,5 ppm -OH, 4,0 ppm -O-CH₂-, 3,5 ppm -CH₂-CH₂-OH, 2,0 ppm -CH₂- und 1,0 ppm -CH₃ und Signale des PLacAEMA-Blocks 3,0 ppm und um 1,5 ppm.

Für die Charakterisierung der Aggregate oder Mizellen wurde das Diblockcopolymer in Wasser gelöst und mit TEM und Kryo-REM analysiert. Das Polymer PHEMA wurde als hydrophober Block und das Polymer PLacAEMA als hydrophiler Block betrachtet. In Abbildung 12 sind die TEM-Aufnahmen des Diblockcopolymers abgebildet. Für die TEM-Aufnahmen wurden die Proben auf einem Gitternetz aufgetropft und an Luft getrocknet. Dann wurden sie mit einem Transelektronenmikroskop untersucht.

Durch das Austrocknen des Lösungsmittels, werden auch die Mizellen ausgetrocknet und kollabieren auf der Oberfläche. Dementsprechend können über die TEM-Aufnahmen nicht die ganzen Mizellen betrachtet werden, sondern nur die kollabierten Blockcopolymer-Partikel auf der Oberfläche.

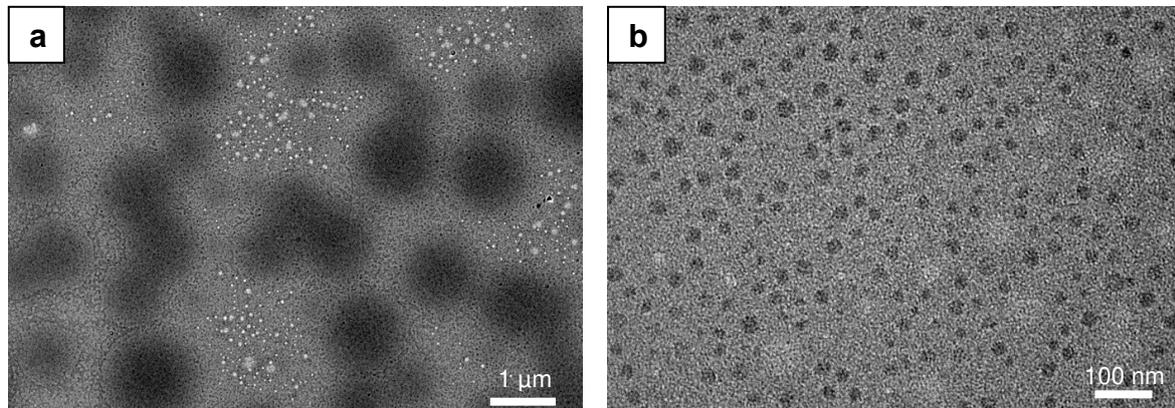


Abbildung 12: TEM-Aufnahmen des Diblockglykopolymers PHEMA-*b*-PLacAEMA (45) in a) und b) sind Partikel mit einem Durchmesser von 500 nm – 1 µm zu erkennen.

In beiden TEM-Aufnahmen **a** und **b** sind uniforme schwarze Partikel zu erkennen. Der Durchmesser der Partikel beträgt 500 nm – 1 µm. Die Partikel haben einen schwach verschwommenen Rand, welches durch die Selbstassemblierung des Diblockcopolymers PHEMA-*b*-PLacAEMA erzeugt wird. Um die Partikel genauer zu identifizieren und die Bildung von Mizellen aus dem Diblockcopolymer zu überprüfen, wurden Kryo-REM-Aufnahmen gemacht. Der Vorteil der Kryo-REM-Aufnahmen ist, dass die Mizellen in eingefrorener Lösung gemessen werden. Somit bleibt die Form der Mizellen erhalten. In Abbildung 13 sind die Kryo-REM-Aufnahmen dargestellt.

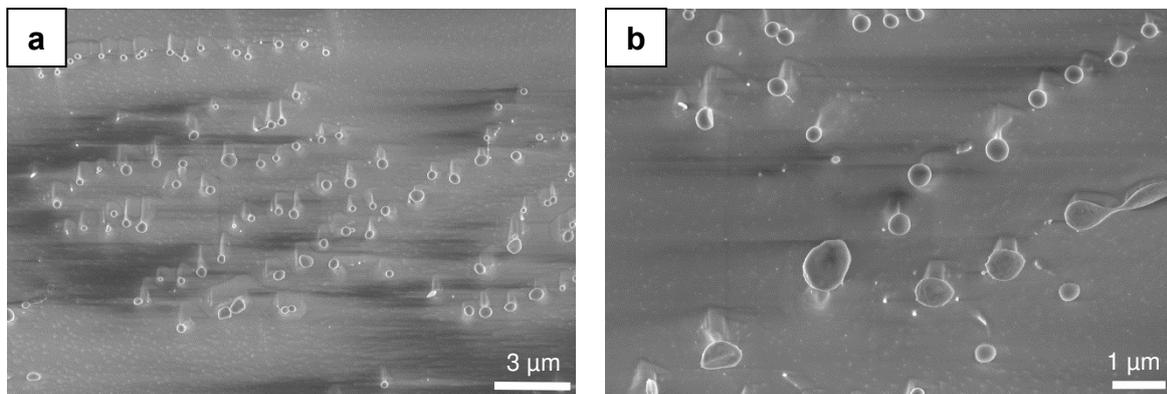


Abbildung 13: Kryo-REM-Aufnahmen des Diblockglykopolymers PHEMA-*b*-PLacAEMA (45) in a) und b) sind die Blockcopolymermizellen mit einem Partikeldurchmesser von 500 nm – 1 µm zu erkennen.

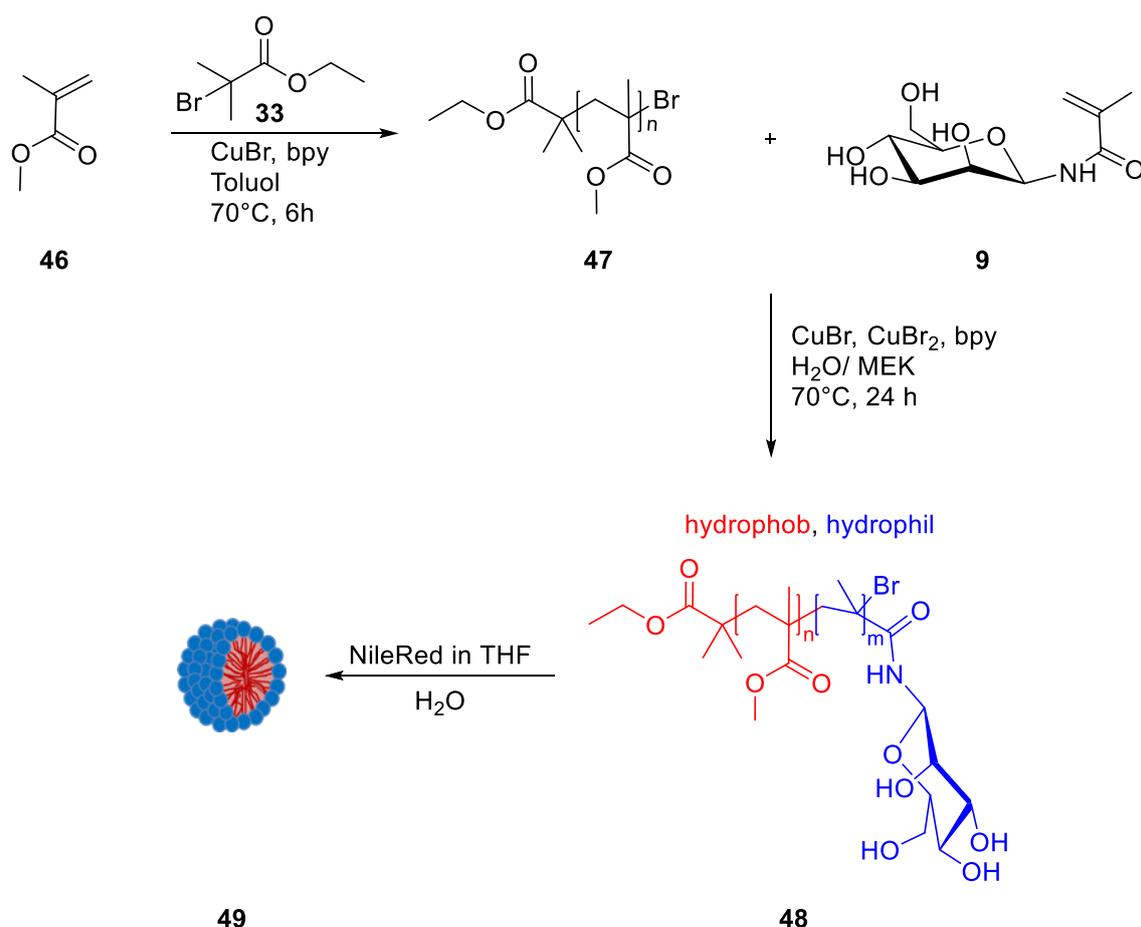
In beiden Bildern sind runde Partikel zu beobachten. Es ist eine Partikelgröße von 500 nm – 1 µm zu erkennen, wobei die Partikel mit einem Durchmesser von 500 nm überwiegen. Aufgrund der Stabilität der Partikel in Lösung, kann von einer Mizellenbildung ausgegangen werden. Weaver *et al.* synthetisierten verschiedene PHEMA Homopolymere und untersuchten die Löslichkeit in Wasser.^[22] Sie publizierten, dass PHEMA mit niedrigem Polymerisationsgrad wasserlöslich ist und PHEMA bei pH 6,5 mit einem Polymerisationsgrad über 40, nur partiell wasserlöslich ist. Mit steigendem Polymerisationsgrad sinkt die Wasserlöslichkeit der PHEMA Homopolymere. Der PHEMA-Block im

Diblockcopolymer hat einen Polymerisationsgrad von 158 und ist somit nicht wasserlöslich.^[22] Das Diblockcopolymer formt in wässriger Lösung sphärische Partikel. Es wurden Mizellen hergestellt, die einen hydrophilen PHEMA-Block als Kern und einen noch hydrophileren PLacAEMA-Block als Hülle, mit Glykanen an der Mizellenoberfläche, besitzen.

Die Bildung von Mizellen des Diblockcopolymer PHEMA-*b*-PLacAEMA **45** konnte nachgewiesen werden. In früheren Publikationen wurde gezeigt, dass ein doppelt hydrophiles Diblockcopolymer PHEMA-*b*-PGlcNAcEMA Mizellen bildet, bei dem der hydrophilere Block PGlcNAcEMA mit der Glykaneinheit an der Mizellenoberfläche sitzt.^[21] Dies wurde erneut mit dem Diblockcopolymer PHEMA-*b*-PLacAEMA **45** analysiert. Hierbei war der PHEMA-Block länger und es wurde ein Disaccharid mit einem offenkettigen Glykan verwendet. Auch hier konnte eine Mizellenbildung nachgewiesen werden, bei der sich der hydrophilere Glykanblock an der Mizellenoberfläche befindet.

5.3. Synthese der Diblockcopolymeren PMMA-*b*-PManAMA und ihre Selbstassemblierung zu Mizellen

Um ein amphiphiles Blockcopolymer zu erhalten, wurde ein Diblockcopolymer mit Poly(methylmethacrylat) (PMMA) **47** als hydrophober und Poly(mannosemethylacrylamid) (PManAMA) als hydrophiler Block synthetisiert. Im Vergleich zum PHEMA in PHEMA-*b*-PLacAEMA **45** ist PMMA hydrophober. Es sollte die Mizellenbildung mit einem amphiphilen Diblockcopolymer untersucht werden. In Schema 18 ist die Polymerisation und die Mizellenbildung des Diblockcopolymeren PMMA-*b*-PManAMA **48** dargestellt.



Schema 19: Blockcopolymerisation und Mizellenbildung (**49**) von PMMA-*b*-PManAMA (**48**). Im ersten Syntheseschritt wird MMA in Toluol bei 70 °C für 6 h polymerisiert. Im zweiten Syntheseschritt wird PMMA als Makroinitiator zu Polymerisation von PMMA-*b*-PManAMA (**48**) in H₂O/MEK bei 70 °C für 24 h verwendet. Das amphiphile Polymer bildet in Wasser Mizellen und kapselt den hydrophoben Farbstoff NileRed ein.

PMMA **47** wurde als hydrophober Block gewählt, da die gleiche polymerisierbare Gruppe wie bei dem Zuckermonomer vorhanden ist. Der erste Block wurde über eine ATRP-Reaktion polymerisiert. In Tabelle 8 sind die Synthese- und GPC-Daten der verschiedenen PMMA-Blöcke zusammengefasst. Es wurden vier verschiedene PMMA-Blöcke synthetisiert. Dabei wurden die Reaktionszeit und das Verhältnis von Monomer zu Initiator geändert. Bei dem Verhältnis M/I = 50:1 wurden die Reaktionszeiten 180 min und 30 min betrachtet (**Eintrag 1, 2**). Für eine Reaktionszeit von 180 min wurde PMMA₈₄ mit einer Ausbeute von 9,4 g und einem Molekulargewicht M_w = 8422 g/mol mit einem

$\bar{D} = 1,34$ erhalten (**Eintrag 1**). Bei einer Reaktionszeit von 30 min wurde PMMA₆₉ mit einer Ausbeute von 2,9 g und einem Molekulargewicht $M_w = 6908$ g/mol und einem $\bar{D} = 1,25$ erhalten. Je kürzer die Reaktionszeit, desto kleiner wurde das Molekulargewicht und eine geringere Ausbeute an Polymer mit einem geringeren Polymerisationsgrad wurde erhalten. Bei einem Verhältnis $M/I = 50:2$ wurde das Monomer MMA durch eine Aluminiumoxidsäule gereinigt. Hier wurden die Reaktionszeiten 90 min und 60 min betrachtet. Für die Reaktionszeit von 90 min wurde PMMA₅₆ mit einer Ausbeute von 1,3 g und einem Molekulargewicht $M_w = 5569$ g/mol und einem $\bar{D} = 1,35$ erhalten (**Eintrag 3**). Bei einer Reaktionszeit von 60 min wurde PMMA₅₄ mit einer Ausbeute von 2,3 g und einem Molekulargewicht $M_w = 5403$ g/mol und einem $\bar{D} = 1,37$ erhalten (**Eintrag 4**). Der Polymerisationsgrad ändert sich bei den Polymeren PMMA₅₆ und PMMA₅₄ nicht signifikant. Ein Grund hierfür ist die Reaktionszeit, die bei 60 min und 90 min liegen. Mit steigendem Monomer- zu Initiator-Verhältnis werden mehr Polymerketten gestartet und ein kleineres Molekulargewicht wird erhalten. Die Reaktionszeit beeinflusst die Länge der Polymerketten, je länger die Reaktion läuft, desto länger werden die Polymerketten.

Tabelle 8: Synthese- und GPC-Daten der vier verschiedenen PMMA (47) Makroinitiatoren. Die GPC-Analyse wurde in DMF durchgeführt.

Eintrag	Polymer	Ausbeute [%]	t [min]	M_w [g/mol]	M_n [g/mol]	\bar{D}	P_n	Verhältnis [M/I/CuBr/bpy]
1	PMMA ₈₄	100	180	8422	6266	1,34	84	50:1:1:2
2	PMMA ₆₉	60	30	6908	5548	1,25	69	50:1:1:2
3	PMMA ₅₆	28	90	5569	4120	1,35	56	50:2:2:4
4	PMMA ₅₄	50	60	5403	3951	1,37	54	50:2:2:4

PMMA wurde als Makroinitiator für die Blockcopolymerisation verwendet. Um eine anschließende Blockcopolymerisation zu starten, muss der Makroinitiator eine aktive Endgruppe besitzen. Um die PMMA-Polymerisation zu untersuchen wurde eine Kinetikmessung durchgeführt. Die ATRP-Polymerisation wurde mit einem *in situ* IR-Messgerät beobachtet.^{[23][24]} Die beiden Homopolymere PMMA **47** und PManAMA **34** besitzen die gleiche polymerisierbare Methacryl-Gruppe. Dadurch können die Unterschiede des Polymerisationsverhaltens von PManAMA **34** (**Kapitel 4**) mit dem bekannten PMMA **47** verglichen werden. Die C=O-Schwingung bei $1760-1716$ cm^{-1} der MMA **46** Polymerisation wurde analysiert (Abbildung 14). Die Intensität der Absorbanz wurde in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Eine exponentiell steigende Bande ist über die Zeit zu beobachten, welches für eine Polymerisationskinetik 1. Ordnung spricht. Um den Umsatz zu bestimmen, wurde die Intensität der Absorbanz auf 1 normiert. Nach 30 min wurden 50 %, nach 60 min 60 %, nach 90 min 70 % und nach 180 min 90 % MMA **46** zu PMMA **47** umgesetzt. Damit PMMA als Makroinitiator genutzt werden kann, muss die Endgruppe am PMMA aktiv sein. Dazu wurden vier verschiedene PMMA Polymere mit einem Umsatz von 90 %, 70 %, 60 % und 50 % synthetisiert. Holland *et al.* zeigten ähnliche IR-Daten. Sie untersuchten die Kinetik thermischer Zersetzung von PMMA über FT-IR-Spektroskopie.^[25]

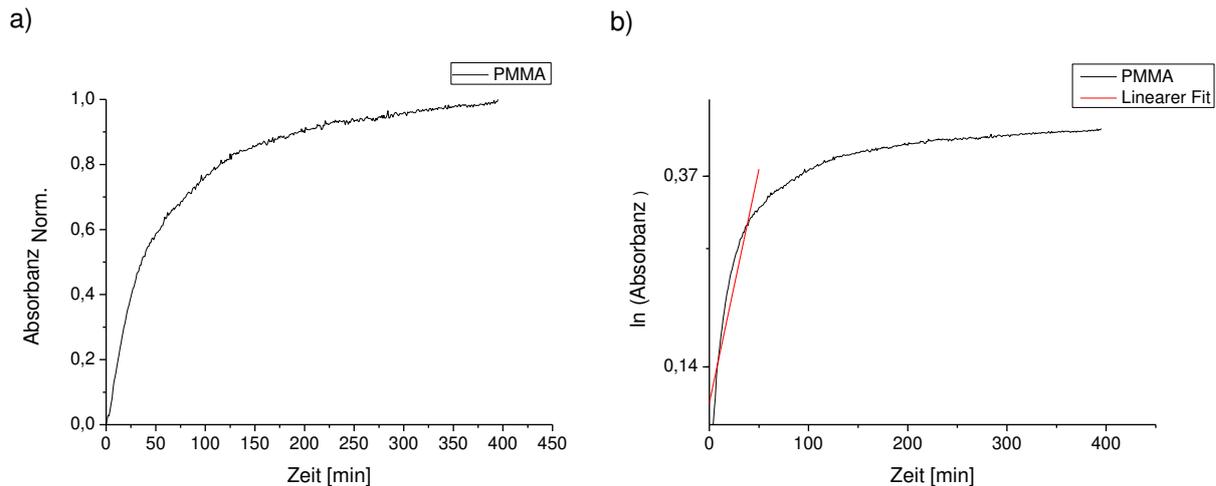


Abbildung 14: Kinetikmessung von PMMA (47); a) normierte Intensität der Absorbanz der C=O-Schwingung in Abhängigkeit von der Zeit, b) Umsatz in Abhängigkeit von der Zeit, an der Steigung wurde ein linearer Fit angelegt; gemessen mit *In-situ* IR. Für die Kinetikmessungen wurde die C=O-Schwingung bei 1760-1716 cm^{-1} beobachtet.

Der PMMA 47 Makroinitiator wurde mit GPC-Analyse analysiert (**Tabelle 6**). Vier verschiedene PMMA Makroinitiatoren wurden erhalten. Für PMMA₈₄ bei 90 % Umsatz wurde ein $M_w = 8422$ g/mol, $M_n = 6266$ g/mol und eine kleine Dispersität (\mathcal{D}) von 1,34 erhalten (**Eintrag 1**). Hieraus ergibt sich ein Polymerisationsgrad von 84. Für PMMA bei 50 % Umsatz, ergibt sich eine kleinere Dispersität \mathcal{D} (1,25) als für PMMA₈₄ mit einem Polymerisationsgrad von 69. Ein Molekulargewicht von $M_w = 6908$ g/mol und $M_n = 5548$ g/mol wurden erhalten (**Eintrag 2**). Die Polymere PMMA bei 70 % und 60 % Umsatz wurden mit vorher gereinigtem MMA polymerisiert. Der Inhibitor im MMA Monomer wurde über eine Aluminiumoxidsäule entfernt. Für den Makroinitiator bei 70 % Umsatz wurde ein Molekulargewicht von $M_w = 5569$ g/mol, $M_n = 4120$ g/mol und eine niedrige Dispersität von $\mathcal{D} = 1,35$ erhalten. Hieraus ergibt sich ein Polymerisationsgrad von 56 (**Eintrag 3**). Für PMMA bei 60 % Umsatz wurde ein Polymerisationsgrad von 54 erhalten. Das Molekulargewicht liegt bei $M_w = 5403$ g/mol, $M_n = 3951$ g/mol und die Dispersität bei $\mathcal{D} = 1,37$ (**Eintrag 4**). Der Polymerisationsgrad der beiden Polymere ändert sich nicht signifikant. Vier PMMA Makroinitiatoren (PMMA₈₄, PMMA₆₉, PMMA₅₆ und PMMA₅₄) wurden synthetisiert. Diese wurden für die weitere Blockcopolymerisationen mit ManAMA verwendet. Für die Blockcopolymerisationen wurde das Monomer ManAMA 9 (**Kapitel 3**) eingesetzt. Die Kinetik des Homopolymers PManAMA 34 wurde auch mittels *in situ* IR analysiert (**Kapitel 4**). Hierbei war auffällig, dass die Polymerisation nach einer langen *Lag*-Phase von 200 min startete. Aus diesem Grund wurde die Blockcopolymerisation mit einer Reaktionszeit von 24 h durchgeführt. Um verschiedene Blocklängen des Glykopolymerblocks zu erhalten, wurde PMMA₆₉ mit einer größeren Menge an ManAMA polymerisiert. Die Analyse- und GPC-Daten der Diblockcopolymeren sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Synthese- und GPC-Daten der Diblockcopolymeren PMMA-*b*-PManAMA (48). Die GPC-Analyse wurde in DMF durchgeführt.

Eintrag	Polymer	Ausbeute [%]	Monomer [mg]	M _w [g/mol]	M _n [g/mol]	Đ	P _n	Verhältnis [M/MI/CuBr/CuBr ₂ /bpy]
1	PMMA ₈₄ - <i>b</i> -ManAMA	34	500	4645	2396	1,94		250:5:4:1:10
2	PMMA ₆₉ - <i>b</i> -ManAMA	6	500	4951	2670	1,85		250:5:4:1:10
3	PMMA ₆₉ - <i>b</i> -ManAMA+	73	1000	5774	1696	3,40		500:5:4:1:10
4	Precursor PMMA ₅₆ - <i>b</i> -ManAMA	6	100	5425; 439376	4161; 163149	1,30; 2,69	643	250:5:4:1:10
5	Precursor PMMA ₅₄ - <i>b</i> -ManAMA	6	100	5360; 455355	4153; 143059	1,29; 3,18	562	250:5:4:1:10

Das Molekulargewicht wurde mit GPC-Analyse bestimmt. In den GPC-Daten sind zwei Signale im Elugramm zu erkennen (Anhang, Abb. 72-76). Bei den ersten drei Blockcopolymeren ist die erste Spezies so gering, dass sie nicht betrachtet wird (**Eintrag 1-3**). Bei den Polymeren 4 und 5 ist ein klares Signal erkennbar.

Die Molekulargewichte für die ersten drei Polymere waren kleiner als die der Makroinitiatoren PMMA (**Tabelle 9, Eintrag 1-3**). Hier ist die Schlussfolgerung auf die Diblockcopolymer schwierig. Der Dispersitätsindex war bei den ersten beiden Diblockcopolymeren kleiner als 2, nur bei Diblockcopolymer mit einer höheren ManAMA Menge (**Eintrag 3**) lag dieser bei 3,40. Aus den kleineren Molekulargewichten für das Diblockcopolymer im Vergleich zu den PMMA Makroinitiatoren kann geschlussfolgert werden, dass sich aggregierte Strukturen in Lösung gebildet haben.

Für die Diblockcopolymeren **4** und **5** wurden kleinere und größere Molekulargewichte gefunden (**Tabelle 9, Eintrag 4** und **5**). Die kleineren Molekulargewichte von M_w = 5425 g/mol und 5360 g/mol mit einer Dispersität von Đ = 1,30 und 1,29 lässt auf den nicht umgesetzten Makroinitiator PMMA schließen. Die größeren Molekulargewichte von M_w = 439.376 g/mol und 455.355 g/mol mit einer Dispersität von Đ = 2,69 und 3,18 lässt auf das Entstehen von Diblockcopolymeren schließen. Aus diesen Daten ergibt sich ein P_n von 643 und 562 des ManAMA Monomers.

Das entstandene Diblockcopolymer ist aufgrund der Amphiphilie schwer löslich in verschiedenen Lösungsmitteln. Für die GPC-Analyse wurde das Polymer in DMSO bei 80 °C gelöst und über eine PSS-Säule mit Pullulan als Standard vermessen. Die GPC-Analyse ist für die Glykopolymeren noch nicht standardisiert und kann nur als Vergleich herangezogen werden.

Die Blockcopolymeren wurden mit ¹H-NMR analysiert (**Abbildung 15**). Dafür wurden die Polymere bei 80 °C in DMSO-d₆ gelöst und vermessen. Die Signale für PMMA bei 3,5 ppm -O-CH₃, 2,0 ppm für -CH₂- und 1,0 ppm für -CH₃ können zugeordnet werden. Die Signale für den zweiten Block PManAMA werden von den PMMA Signalen überlagert. Dennoch zeigen beide Spektren bei 0,5 – 2,0 ppm Signale für den PManAMA-Block. In Spektrum **b** von Blockcopolymer PMMA₈₄-*b*-PManAMA sind zwei Signale bei 3,0 ppm und 1,5 ppm erkennbar, die im Spektrum **a** vom PMMA₅₄-*b*-PManAMA nicht zu erkennen sind. Das Blockcopolymer PMMA₈₄-*b*-PManAMA hat eine höhere Hydrophobizität als das Blockcopolymer PMMA₅₄-*b*-PManAMA. Die Signale des zweiten Blocks PManAMA können besser

detektiert werden und sind in dem NMR-Spektrum sichtbar. Dieser Trend ist auch in den übrigen ^1H -NMR-Spektren der Blockcopolymeren zu beobachten (Anhang, Abb. 77).

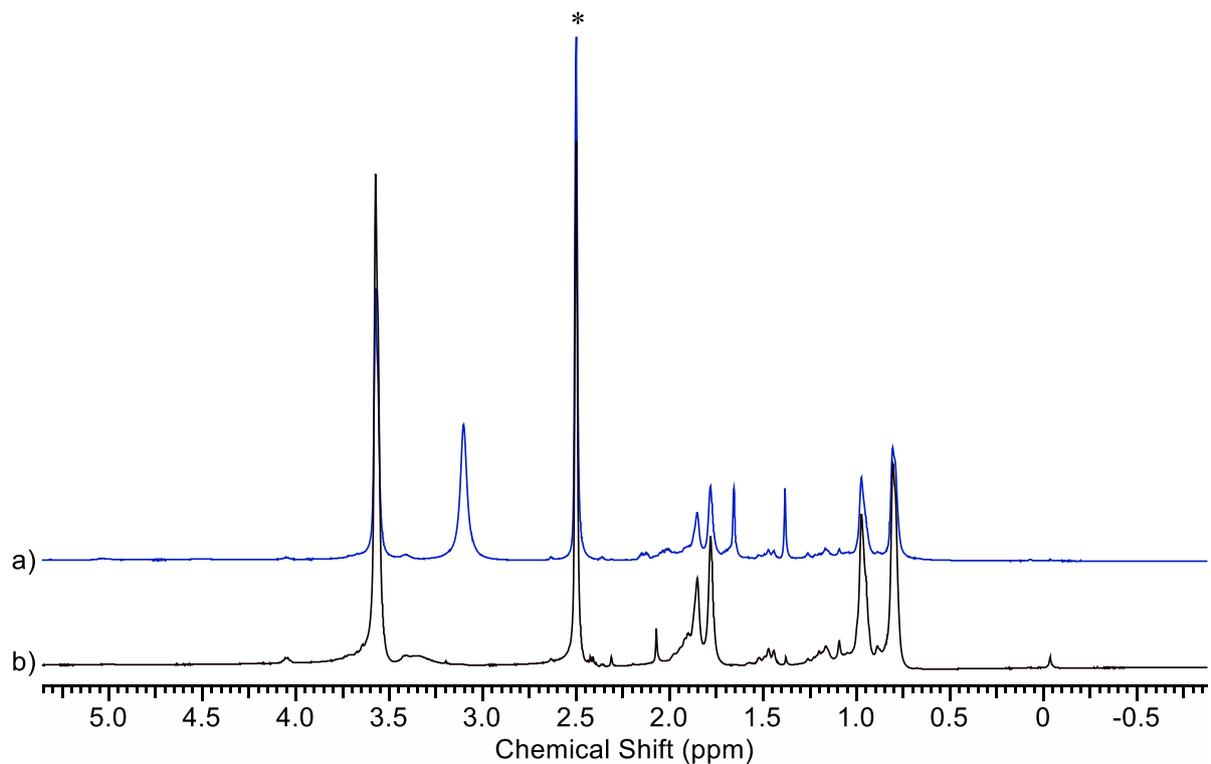


Abbildung 15: ^1H -NMR-Spektren der Diblockcopolymeren a) $\text{PMMA}_{54}\text{-}b\text{-PManAMA}$ und b) $\text{PMMA}_{84}\text{-}b\text{-PManAMA}$, (*) D_2O .

Um die Mizellenbildung zu belegen und zu charakterisieren wurden DLS-, Fluoreszenzspektroskopie-, TEM- und Kryo-REM-Messungen durchgeführt. Die Diblockcopolymeren können bei langsamer Hinzugabe von Wasser gelöst werden.

Die Mizellen wurden mit dem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff NileRed beladen. Dadurch kann die Bildung der Mizellen mit optischen bildgebenden Messmethoden untersucht werden. Außerdem kann die Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) analysiert werden. Dafür wurden 2 mg des Diblockcopolymeren $\text{PMMA}\text{-}b\text{-PManAMA}$ in 1 mL Wasser gelöst und 5 μL NileRed Lösung (THF; 1mg/mL) hinzugegeben.

Der hydrodynamische Durchmesser D_h der unterschiedlichen Mizellen wurde über die DLS des Zetasizers bestimmt (Tabelle 10). Für die DLS-Messung wurden 500 μL der Mizellenlösung analysiert.

Tabelle 10: Hydrodynamischer Durchmesser D_h mit der Uneinheitlichkeit U der verschiedenen Mizellen der Diblockcopolymeren $\text{PMMA}\text{-}b\text{-PManAMA}$. Dreifachbestimmung mit Malvern Zetasizer NanoZS+-Titratoren, 500 μL Lösung bei 25 °C.

Eintrag	Mizellenspezies	D_h [nm]	U
1	$\text{PMMA}_{84}\text{-}b\text{-PManAMA}$	263	0,205
2	$\text{PMMA}_{69}\text{-}b\text{-PManAMA}$	256	0,202
3	$\text{PMMA}_{69}\text{-}b\text{-PManAMA}^+$	200	0,180
4	$\text{PMMA}_{56}\text{-}b\text{-PManAMA}$	332	0,208
5	$\text{PMMA}_{54}\text{-}b\text{-PManAMA}$	316	0,166

Die DLS-Ergebnisse zeigen, dass mit sinkendem Verhältnis von PMMA- zu PManAMA-Block (PMMA/PManAMA) der Mizellendurchmesser größer wird. Das Diblockcopolymer mit dem längeren PMMA₈₄-Block (**Eintrag 1**) bildete kleine Mizellen mit einem Durchmesser von 263 nm und einer Dispersität von 0,205. Bei kleinerem PMMA-Block, PMMA₅₆/PMMA₅₄ (**Eintrag 4, 5**), wurden größere Glykopolymermizellen mit 332 nm und 316 nm bei einer Dispersität von 0,208 oder 0,166 gebildet. Die Mizellengröße wurde bei dem Diblockcopolymer mit einem längeren PManAMA-Block (**Eintrag 3**) kleiner. Es wurde eine Mizellengröße von 200 nm und eine Dispersität von 0,180 gefunden. Das Verhältnis der beiden Blöcke PMMA/PManAMA ist kleiner als bei den anderen Diblockcopolymeren, was auf einen längeren PManAMA-Block schließen lässt. Dies führt zu kleineren Mizellen. Durch den kürzeren PMMA-Block nimmt die Hydrophobizität des Diblockcopolymers ab und die Abschirmung des PManAMA-Blocks führt zu Mizellen mit einem kleineren Durchmesser.^[26]

Die Mizellenbildung wird in Lösung, durch das spontane Zusammenlagern von Blockcopolymeren zu Mizellen mit definierter Größe und Form hervorgerufen.^[27] Dabei beeinflusst, die Größe des Blockcopolymers, die Länge der einzelnen Blöcke und die Funktionalität der Blöcke direkt die Mizellengröße und Form.^[28] Die aggregierten Strukturen können durch den Packungsparameter p bestimmt werden:

$$p = \frac{v}{a_0 \cdot l_c} \quad (\text{e})$$

mit v als Volumen des hydrophoben Blocks, a_0 als Fläche der hydrophilen Kopfgruppe (hydrophiler Block) und l_c als Länge des hydrophoben Blocks.^{[12][29]} Ist der Packungsparameter klein, werden sphärische Mizellen gebildet ($p \leq 1/3$). Bei einem Packungsparameter von $1/3 \leq p \leq 1/2$ werden zylindrische Mizellen und bei einem Packungsparameter von $1/2 \leq p \leq 1$ werden membrane Strukturen gebildet.^[12] Wird der hydrophile Block, bei gleichbleibendem hydrophobem Block, größer, resultiert ein kleinerer Packungsparameter und kleine sphärische Mizellen werden gebildet.

Zur Bestimmung der CMC wurden verschiedene Mizellenkonzentrationen von 4 mg/mL bis 0,017 mg/mL mit dem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff NileRed versetzt (5 μ L in THF, 1 mg/mL) und mit Fluoreszenzspektroskopie (Tecan) analysiert. Die Intensität der Fluoreszenz wurde gemessen und gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen (**Abbildung 16**). Die CMC wurde aus dem Schnittpunkt der zwei Geraden errechnet.^[16]

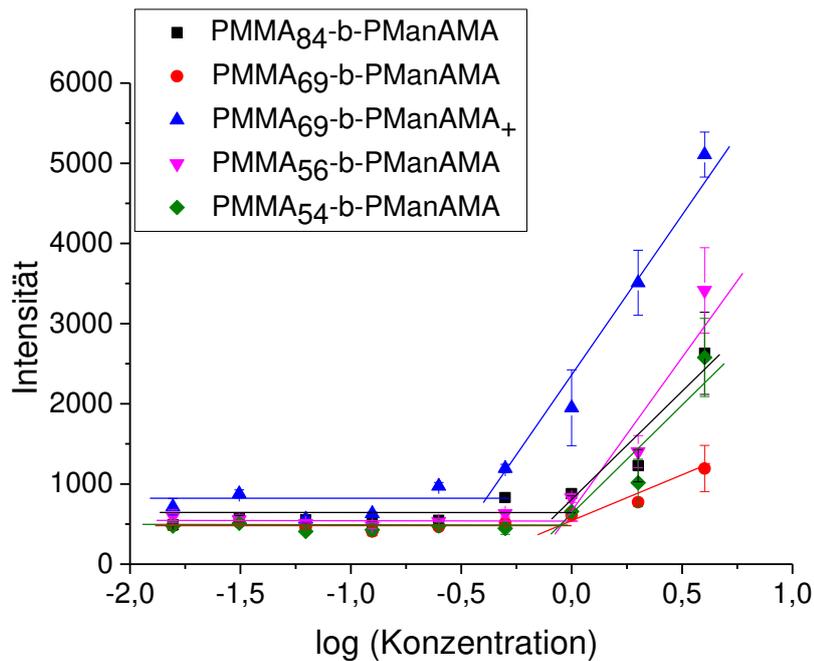


Abbildung 16: CMC-Bestimmung der verschiedenen Diblockcopolymermizellen, PMMA-*b*-PManAMA. Aufgetragen ist die Intensität gegen den Logarithmus der Konzentration. Der Schnittpunkt aus den zwei Graden, der konstanten Intensität und der steigenden Intensität ergibt die CMC.

Die kritische Mizellenkonzentration der fünf Diblockcopolymere liegt zwischen 0,47 und 0,99 mg/mL (**Tabelle 11**). Bei einer Konzentration größer als 0,99 mg/mL selbstassemblieren die Diblockcopolymere zu Mizellen. Bei einer Konzentration kleiner 0,47 mg/mL sind die Polymerstränge frei in Lösung. Die CMC steigt mit Abnahme der Blocklänge des PMMA-Blocks. Für PMMA₈₄-*b*-ManAMA (**Eintrag 1**) wurde eine CMC von 0,52 mg/mL, für PMMA₆₉-*b*-ManAMA (**Eintrag 2**) eine CMC von 0,79 mg/mL und für PMMA₅₆-*b*-ManAMA/ PMMA₅₄-*b*-ManAMA (**Eintrag 4/5**) eine CMC von 0,98/0,99 mg/mL erhalten. Das Verhältnis von PMMA zu PManAMA wird mit Abnahme der PMMA Blocklänge kleiner.

Die Diblockcopolymere assemblieren zu größeren Mizellen, dies wurde schon in den DLS-Messungen bestätigt. Die CMC von dem Diblockcopolymer PMMA₆₉-*b*-ManAMA+ (**Eintrag 3**) ist mit 0,47 mg/mL geringer als die CMC der anderen Diblockcopolymere. Bei dem Diblockcopolymer wurde die doppelte Menge des Monomers ManAMA eingesetzt, um einen längeren PManAMA-Block zu erhalten. Das Verhältnis zwischen dem PMMA-Block zu dem PManAMA-Block ist bei diesem Copolymer signifikant kleiner. Das Diblockcopolymer hat einen längeren PManAMA-Block, weshalb kleinere Mizellen gebildet werden. Dies wurde in den DLS-Messungen bestätigt. Hier wurden Glykopolymermizellen mit einem Durchmesser von 200 nm erhalten.

Tabelle 11: CMC der für Diblockcopolymer PMMA-*b*-PManAMA.

Eintrag	Polymere	CMC [mg/mL]
1	PMMA ₈₄ - <i>b</i> -ManAMA	0,520
2	PMMA ₆₉ - <i>b</i> -ManAMA	0,790
3	PMMA ₆₉ - <i>b</i> -ManAMA+	0,470
4	PMMA ₅₆ - <i>b</i> -ManAMA	0,980
5	PMMA ₅₄ - <i>b</i> -ManAMA	0,990

Um die Form der gebildeten Diblockcopolymeren zu analysieren wurden TEM- und Kryo-REM-Aufnahmen gemacht.

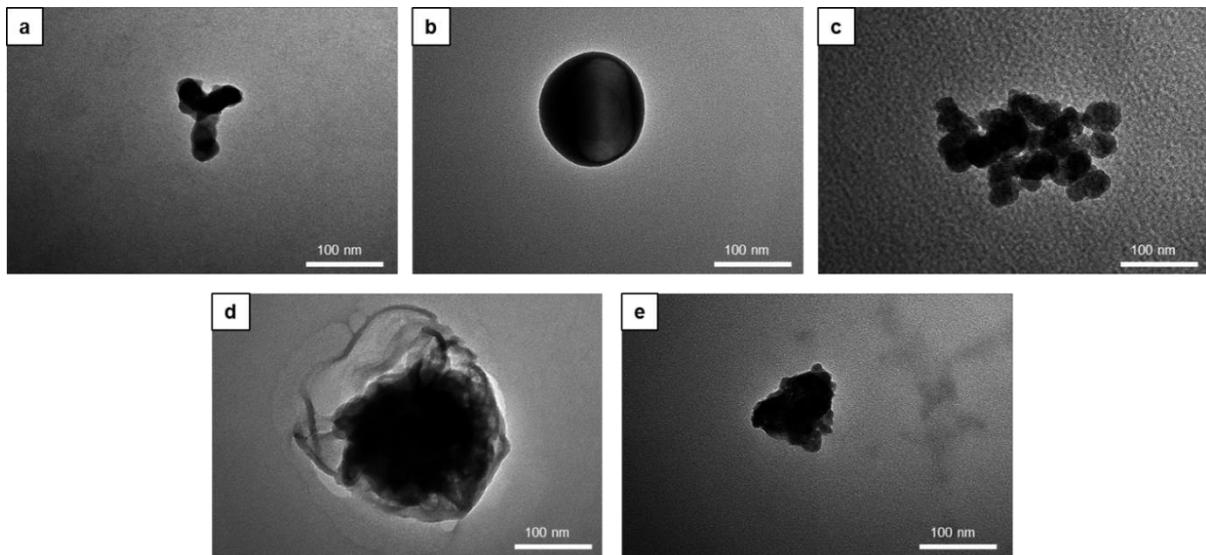


Abbildung 17: TEM-Aufnahmen der Diblockglykopolymermizellen, Proben mit 2 mg/ mL; a) $\text{PMMA}_{84}\text{-}b\text{-PManAMA}$, b) $\text{PMMA}_{69}\text{-}b\text{-PManAMA}$, c) $\text{PMMA}_{69}\text{-}b\text{-PManAMA}^+$, d) $\text{PMMA}_{56}\text{-}b\text{-PManAMA}$, e) $\text{PMMA}_{54}\text{-}b\text{-PManAMA}$.

In den TEM-Aufnahmen sind für alle Diblockcopolymeren-Partikel zu erkennen (**Abbildung 17**). Die TEM-Aufnahmen **a**, **c** und **e** zeigen Partikelaggregationen mit einem Durchmesser von 100-200 nm. In Aufnahme **b** ist ein runder Partikel mit einem Durchmesser von 150 nm und in Aufnahme **d** ein Partikel mit einem Durchmesser von 200 nm zu beobachten. Der Partikel besitzt einen schwarzen Kern und eine hellere wolkenförmige Struktur an der Partikelperipherie. Bei den TEM-Messungen werden die Partikel im trockenen Zustand gemessen. Dadurch kollabiert die Form der Partikel, da die Mizellen nur in Lösung stabil sind. Aufgrund des Trocknungseffekts werden die Mizellen kleiner und lagern sich zusammen. Für alle $\text{PMMA-}b\text{-PManAMA}$ Diblockcopolymeren konnten Partikel in den TEM-Aufnahmen gefunden werden. Die genaue Form der Mizellen wurde durch Kryo-REM-Aufnahmen bestimmt. Zur Aufnahme der Kryo-REM-Messung wird die Lösung bei $-180\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und bei $-120\text{ }^\circ\text{C}$ gebrochen. Durch diese Methode bleibt die Form der Mizellen erhalten und die Mizellen können charakterisiert werden.

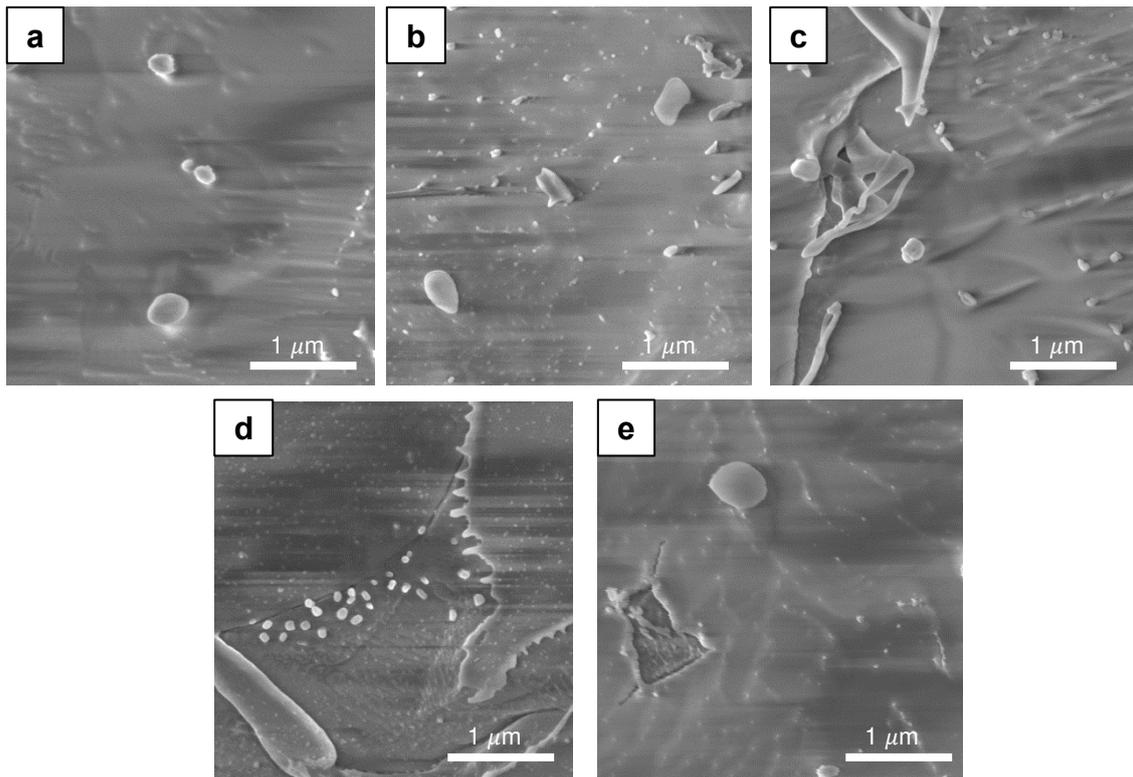


Abbildung 18: Kryo-REM-Aufnahmen der Diblockglykopolymermizellen, Proben mit 2 mg/mL; a) PMMA₈₄-*b*-PManAMA, b) PMMA₆₉-*b*-PManAMA, c) PMMA₆₉-*b*-PManAMA+, d) PMMA₅₆-*b*-PManAMA, e) PMMA₅₄-*b*-PManAMA.

In Abbildung 18 sind die Kryo-REM-Aufnahmen dargestellt. Für alle fünf Diblockcopolymeren konnten runde Partikel mit einem Durchmesser von 200-300 nm beobachtet werden. In den Aufnahmen sind Partikel mit einer ovalen Form zu sehen, welches auf zylindrische Mizellen schließen lässt. Die kleinen Mizellen sind die dominierende Spezies. Eine uniforme und monodisperse Größenverteilung der Partikel wird erhalten. Diese Ergebnisse stützen die Beobachtungen aus den DLS-Messungen, hier wurden Partikel mit einem Durchmesser von 200 nm – 335 nm und einem kleinen PDI erhalten.

In Abbildung 18c sind die Mizellen des Diblockcopolymeren PMMA₆₉-*b*-PManAMA+ abgebildet. Im Vergleich zu den anderen Diblockcopolymer-Mizellen werden kleinere Partikel erhalten. Dieses Ergebnis wurde bereits in den CMC- und DLS-Messungen beobachtet. Durch den längeren PManAMA-Block wird das Verhältnis des PMMA-Blocks zum PManAMA-Block kleiner und kleinere Mizellen entstehen.

Eine biologische Anwendung wurde mit dem Glykopolymer PManAMA in Kapitel 3 über die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht. Dabei wurde die Bindungsenergie des Homopolymers PManAMA zu dem Lektin ConA bestimmt. Für die Bindungsenergie von ConA zu dem PManAMA Polymer wurde ein $K_{D(app)} 2,53 \cdot 10^{-3} \pm 1,69 \cdot 10^{-4}$ mM zu einer Mannoseeinheit ermittelt. Wie schon in Kapitel 3 erwähnt, ist der optimale Ligand für ConA die α -Mannose. Das synthetisierte Glykopolymer trägt α - und β -Mannoseeinheiten, wobei β -Mannose in einem höheren Verhältnis (1:10, α : β) vorliegt. Das ConA bindet schwach an der β -Mannose und stärker an der α -Mannose, wodurch eine höhere Dissoziationskonstante als in der Literatur zustande kommt. Aufgrund der Bindungsaffinität des Lektins ConA zu der Multivalenz der Glykane im Polymer kann eine

Dissoziationskonstante für das Oligomer PManAMA detektiert werden. Die Bindungsaffinität kann auf die Diblockcopolymer-Mizellen übertragen werden. Die Mizellen binden an ConA aufgrund der vorhandenen α -Mannose als Funktionalität.

Diblockcopolymere aus einem PMMA- und einem PManAMA-Block konnten synthetisiert werden. Die Mizellenbildung der Diblockcopolymere wurde in wässriger Lösung beobachtet. Die Mizellen konnten mit dem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff NileRed beladen werden. Außerdem konnte eine Bindungsaffinität zu ConA beim Homopolymer PManAMA beobachtet werden, welches auf die Glykopolymermizellen übertragen wurde.

In früheren Publikationen wurde ein doppelt hydrophiles Diblockcopolymer PHEMA-*b*-PGlcNAcEMA synthetisiert und daraus Mizellen gebildet. Bei dem Diblockcopolymer sitzt der hydrophile Block PGlcNAcEMA mit der Glykaneinheit an der Mizellenoberfläche.^[21] Im ersten Teil des Kapitels wurde erneut ein doppelt hydrophiles Diblockcopolymer PHEMA-*b*-PLacAEMA **45** synthetisiert und die Mizellenbildung beobachtet. Hierbei war der PHEMA-Block länger und es wurde ein Disaccharid mit einem offenkettigen Glykan verwendet. Auch hier konnte eine Mizellenbildung nachgewiesen werden, bei der sich der hydrophilere Glykanblock an der Mizellenoberfläche befindet. Im zweiten Teil des Kapitels wurde eine amphiphile Diblockcopolymer PMMA-*b*-PManAMA **48** synthetisiert und die Mizellenbildung wurde analysiert. Gupta *et al.* synthetisierten ebenfalls amphiphile Diblockcopolymere Poly(PS-*b*-DMA).^[16] Auch Sie beobachteten die Mizellenbildung der Polymere und erhielten eine CMC von 0,09 mg/mL. Diese ist im Gegensatz zu den oben erhaltenen CMCs um den Faktor 10 kleiner. Ebenfalls untersuchten sie die Beladung der Mizellen mit einem hydrophoben Farbstoff und zeigten, dass die Mizellen mit den Farbstoffen beladen werden konnten. Rijcken *et al.* synthetisierten PEG-*b*-(HEMAm-Lac₂) Polymere und assemblierte diese zu Mizellen.^[30] Sie erhielten CMCs von 0,4 mg/mL und einen Mizellendurchmesser von 124 nm. Diese Ergebnisse entsprechen annähernd den erhaltenen Daten. Die leichten Abweichungen kommen durch die unterschiedlichen Polymere und unterschiedlichen Blocklängen zustande.

5.4. Zusammenfassung

Die Synthese von zwei verschiedenen Blockcopolymeren aus Glykopolymeren, PHEMA-*b*-PLacAEMA und PMMA-*b*-PManAMA wurde etabliert. Für beide Diblockcopolymeren konnte die Selbstassemblierung in wässriger Lösung zu Mizellen, über TEM und Kryo-REM gezeigt werden. Außerdem konnte bestätigt werden, dass sich die Glykaneinheiten auf der Außenseite der Mizelle befinden. Für das Diblockcopolymer PMMA-*b*-PManAMA wurden verschiedene PMMA-Blocklängen synthetisiert und der Einfluss auf die Mizellenbildung evaluiert. Des Weiteren wurden die Mizellen mit dem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff NileRed beladen und mit DLS und Fluoreszenzspektroskopie analysiert.

Für das Diblockcopolymer PHEMA-*b*-PLacAEMA wurde gezeigt, dass es in wässriger Lösung Mizellen formt. Dabei wird die Mizelle aus dem hydrophilen PHEMA-Block als Kern und dem noch hydrophileren PLacAEMA-Block als Hülle gebildet. Die Glykane sitzen an der Mizellenoberfläche.

Auch für das Diblockcopolymer PMMA-*b*-PManAMA konnte gezeigt werden, dass sich Mizellen in wässriger Lösung bilden können, wobei die Glykaneinheiten an der Mizellenoberfläche sitzen. Mit Abnahme des Verhältnisses von PMMA- zum PManAMA-Block wurden die Mizellen größer. Das konnte in den DLS- und CMC-Messungen bestätigt werden. Bei einem Verhältnis von PMMA zu PManAMA-Block kleiner als 1 wurden kleinere Mizellen geformt.

Zwei Diblockcopolymeren mit verschiedenen Glykanen als Biofunktionalität wurden synthetisiert. Für den PManAMA-Block wurde die Biofunktionalität über ITC-Messung mit dem Lektin ConA bestätigt. Hier stellte sich heraus, dass eine geringe Bindungskonstante erhalten wird. Das Lektin ConA bindet nur an α -Mannose, aber das Polymer wird von β -Mannose dominiert.

Die Biofunktionalität könnte durch andere Glykane geändert werden und eine spezifische Glykan-Protein-Wechselwirkung zu anderen Proteinen adressiert werden. Die Anwendung der Polymer-Glykan-Mizellen kann in der medizinischen Diagnostik für Markierungen von Pathogenen oder für Einkapselungsprozesse zum spezifischen Transport von hydrophoben Farbstoffen oder Wirkstoffen angewendet werden. Außerdem kann das PMMA-*b*-PManAMA Blockcopolymer als antiadsorptive Mizelle eingesetzt werden, da die dominierende β -Mannose als Glykaneinheit keine spezifische Bindung zu Proteinen zeigt.

5.5. Experimenteller Teil

5.5.1. Synthese des Diblockcopolymeren PHEMA-*b*-PLacAEMA

HEMA **40** (16,05 g, 123,3 mmol) wurde in Methylethylketon (MEK) und 1-Propanol (7:3, 15,00 mL) vorgelegt und auf 50 °C erhitzt. CuBr (354,3 mg, 2,470 mmol) und 2,2'-Bipyridin (771,0 mg, 4,940 mmol) wurden hinzugegeben und die Lösung auf 50 °C erhitzt. Ethyl- α -bromoisobutyrat **33** (0,362 mL, 2,467 mmol) wurde als Initiator hinzugegeben und die Reaktion bei 50 °C für 23 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über eine Silicagel-Säule gefiltert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt in Diethylether gefällt. Das Produkt wurde unter vermindertem Druck getrocknet und PHEMA **44** als weißes Pulver erhalten (5 g, 0,317 mmol, 31 %).

$M_w = 2,061 \cdot 10^4$ g/mol; $M_n = 1,576 \cdot 10^4$ g/mol; $\bar{D} = 1,308$; $P_n = 158$.

Das Blockcopolymer PHEMA-*b*-PLacAEMA **45** wurde über eine ATRP Reaktion mit PHEMA **44** als Makroinitiator synthetisiert. Der Makroinitiator PHEMA **44** (700,0 mg, 0,0440 mmol) wurde zusammen mit CuBr (5,900 mg, 0,0350 mmol), CuBr₂ (2,300 mg; 0,0080 mmol) und 2,2'-Bipyridin (16,30 mg; 0,0870 mmol) vorgelegt und mit LacAEMA **6** (1000 mg, 2,190 mmol) in einer Mischung aus H₂O und Methanol (1:1, 10,00 mL) versetzt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 19 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Abkühlen gestoppt, über eine Silicagel-Säule gefiltert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reaktionslösung wurde in einer 3,5 kDa Cellulose-Membran für 3 Tage dialysiert. Das Produkt wurde an der Gefriertrocknung getrocknet und das Blockcopolymer PHEMA-*b*-PLacAEMA **45** als Feststoff erhalten (210,0 mg, 0,0200 mmol, 12 %).

$M_w = 16292$ g/mol; $M_n = 8891$ g/mol; $\bar{D} = 1,83$.

5.5.2. Synthese der Diblockcopolymeren PMMA-*b*-PManAMA

MMA **46** (4700 mg, 46,94 mmol) wurde in Toluol (10,00 mL) vorgelegt. CuBr (200,0 mg, 1,390 mmol) und 2,2'-Bipyridin (500,0 mg, 3,200 mmol) wurden hinzugegeben und die Lösung auf 90 °C erhitzt. Ethyl- α -bromoisobutyrat **33** (0,27 mL, 1,839 mmol) wurde als Initiator hinzugegeben und die Reaktion bei 70 °C für 1 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über eine Silicagel-Säule gefiltert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in kaltem Methanol ausgefällt und unter vermindertem Druck getrocknet. PMMA **47** wurde als weißes Pulver erhalten.

Bei PMMA₅₄ und PMMA₅₆ wurde vor der Polymerisation der Standard mit einer Aluminiumoxidsäule entfernt.

Tabelle 12: Analysedaten und GPC-Daten des Makroinitiatoren PMMA (47).

Eintrag	Polymer	Ausbeute [mg/%]	t [min]	M_w [g/mol]	M_n [g/mol]	\bar{D}	DP	Verhältnis [M/I/CuBr/bpy]
1	PMMA ₈₄	9410/ 100	180	8422	6266	1,34	84	50:1:1:2
2	PMMA ₆₉	2860/ 60	30	6908	5548	1,25	69	50:1:1:2
3	PMMA ₅₆	1330/ 28	90	5569	4120	1,35	56	50:2:2:4
4	PMMA ₅₄	2330/ 50	60	5403	3951	1,37	54	50:2:2:4

Die Blockcopolymeren wurden über eine ATRP-Reaktion mit PMMA **47** als Makroinitiator synthetisiert. ManAMA **9** (500,0 mg, 2,022 mmol) wurde in einer Mischung aus H₂O und Methylethylketon (MEK)

(1:1, 10,00 mL) vorgelegt und auf 70 °C erhitzt. Der Makroinitiator PMMA **47** (500,0 mg, 0,0390 mmol) wurde mit CuBr (4,800 mg, 0,0330 mmol), CuBr₂ (2,000 mg, 0,0080 mmol) und 2,2'-Bipyridin (13,00 mg, 0,0830 mmol) vorgelegt. Die Reaktionslösung wurde hinzugefügt und bei 70 °C für 24 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Abkühlen gestoppt und die Lösung in einer 3,5 kDa Cellulose-Membran für 3 Tage dialysiert. Das Produkt wurde an der Gefriertrocknung getrocknet und das Blockcopolymer PMMA-*b*-PManAMA **48** als Feststoff erhalten.

Tabelle 13: Analysedaten und GPC-Daten der Diblockcopolymeren PMMA-*b*-PManAMA (48).

Eintrag	Polymer	Ausbeute [mg/%]	Monomer [mg]	M _w [g/ mol]	M _n [g/ mol]	Đ	P _n	Verhältnis [M/MI/CuBr/ CuBr ₂ /bpy]
1	PMMA ₈₄ - <i>b</i> -ManAMA	341.0/ 34	500	4645	2396	1,94		250:5:4:1:10
2	PMMA ₆₉ - <i>b</i> -ManAMA	62.00/ 6	500	4951	2670	1,85		250:5:4:1:10
3	PMMA ₆₉ - <i>b</i> -ManAMA+	733.7/ 73	1000	5774	1696	3,40		500:5:4:1:10
4	Precursor PMMA ₅₆ - <i>b</i> -ManAMA	57.30/ 6	100	5425; 439376	4161; 163149	1,30; 2,69	643	250:5:4:1:10
5	Precursor PMMA ₅₄ - <i>b</i> -ManAMA	60.60/ 6	100	5360; 455355	4153; 143059	1,29; 3,18	562	250:5:4:1:10

5.5.3. Herstellung der Mizellen mit NileRed

Das Polymer PMMA-*b*-PManAMA **48** (2,00 mg) wurde in Wasser (1,00 mL) bei 40 °C über Nacht gelöst. Dann wurde die Lösung für 30 min im Ultraschallbad dispergiert. Eine Lösung aus NileRed in THF (5,00 µL, 1,00 mg/mL) wurde hinzugegeben und über Nacht gerührt. Es wurden Mizellen **49** aus dem Diblockcopolymer PMMA-*b*-PManAMA **48** mit NileRed beladen erhalten. Die Mizellen wurden mit Fluoreszenzspektroskopie, DLS, TEM und Kryo-REM Messungen analysiert.^[31]

5.5.4. Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration (CMC)

Die kritische Mizellenkonzentration (CMC) der Glykopolymermizellen wurde bestimmt, indem NileRed als hydrophobischer Farbstoff benutzt wurde. Eine Mizellenkonzentration von 4,00 mg/mL bis 0,017 mg/mL wurde analysiert. 500 µL der Mizellenlösung wurde mit einer NileRed Lösung in THF (5,00 µL, 1 mg/mL) versetzt und über Nacht geschüttelt. Die Fluoreszenz der verschiedenen Mizellenlösungen wurde mit einem Fluoreszenzspektroskop (TECAN) bestimmt. Daraus wurde die CMC errechnet, indem der Schnittpunkt der beiden Geraden bestimmt wurde.^[16]

5.6. Literatur

- [1] Y. Miura, Y. Hoshino, H. Seto, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1673.
- [2] V. Vazquez-Dorbatt, H. D. Maynard, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2297.
- [3] A. M. Eissa, N. R. Cameron, *Adv. Polym. Sci.* **2013**, *253*, 71.
- [4] L. Bes, S. Angot, A. Limer, D. M. Haddleton, *Macromolecules* **2003**, *36*, 2493.
- [5] S. R. S. Ting, E. H. Min, P. Escalé, M. Save, L. Billon, M. H. Stenzel, *Macromolecules* **2009**, *42*, 9422.
- [6] H. Park, R. R. Rosencrantz, L. Elling, A. Böker, *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 45.
- [7] S. R. S. Ting, G. Chen, M. H. Stenzel, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1392.
- [8] Z.-C. Li, Y.-Z. Liang, G.-Q. Chen, F.-M. Li, *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 375.
- [9] O. León, A. Muñoz-Bonilla, V. Bordegé, M. Sánchez-Chaves, M. Fernández-García, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2011**, *49*, 2627.
- [10] N. Li, X. Cai, J. Chen, X. Hu, L. Xu, *Polymers* **2016**, *8*, 379.
- [11] K. Kempe, S. D. Xiang, P. Wilson, M. A. Rahim, Y. Ju, M. R. Whittaker, D. M. Haddleton, M. Plebanski, F. Caruso, T. P. Davis, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 6444.
- [12] A. Blanz, S. P. Armes, A. J. Ryan, *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 267.
- [13] C. LoPresti, H. Lomas, M. Massignani, T. Smart, G. Battaglia, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3576.
- [14] K. Kita-Tokarczyk, J. Grumelard, T. Haefele, W. Meier, *Polymer* **2005**, *46*, 3540.
- [15] O. Onaca, R. Enea, D. W. Hughes, W. Meier, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 129.
- [16] M. K. Gupta, T. A. Meyer, C. E. Nelson, C. L. Duvall, *J. Control Release.* **2012**, *162*, 591.
- [17] P. Radzevicius, M. Steponaviciute, T. Krivorotova, R. Makuska, *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 7217.
- [18] D. Zehm, L. P. D. Ratcliffe, S. P. Armes, *Macromolecules* **2013**, *46*, 128.
- [19] R. Narain, S. P. Armes, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1746.
- [20] H. Schlaad, L. You, R. Sigel, B. Smarsly, M. Heydenreich, A. Manton, A. Masic, *Chem. Commun.* **2009**, 1478.
- [21] H. Park, S. Walta, R. R. Rosencrantz, A. Korner, C. Schulte, L. Elling, W. Richtering, A. Böker, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 878.
- [22] J. V. M. Weaver, I. Bannister, K. L. Robinson, X. Bories-Azeau, S. P. Armes, M. Smallridge, P. McKenna, *Macromolecules* **2004**, *37*, 2395.
- [23] J. J. Haven, T. Junkers, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 6474.
- [24] a. M. Alb, M. F. Drenski, W. F. Reed, *Polym. Int.* **2008**, *57*, 390.
- [25] B. J. Holland, J. N. Hay, *Polymer* **2001**, *42*, 4825.
- [26] S. Burke, A. Eisenberg, *High Perform. Polym.* **2000**, *12*, 535.
- [27] S. Förster, T. Plantenberg, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 712.
- [28] F. H. Schacher, P. A. Rugar, I. Manners, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8020.
- [29] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, Academic Pr, London, **1991**.
- [30] C. J. F. Rijcken, T. F. J. Veldhuis, A. Ramzi, J. D. Meeldijk, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2343.
- [31] Y. Q. Yang, L. S. Zheng, X. D. Guo, Y. Qian, L. J. Zhang, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 116.

6. Glykopolymere auf Oberflächen

6.1. Einleitung

Polymerbürsten auf einem festen Substrat (Gold- oder Silizium-Wafer) sind dünne Polymerfilme, die mit einem Polymerende über Chemisorption (kovalent) oder über Physisorption an der Oberfläche gebunden sind.^[1-4] Über verschiedene Strategien können Polymerbürsten auf der Oberfläche gebunden werden. Eine dieser Methoden ist das „*Grafting from*“, bei der wird ein Initiator kovalent auf die Oberfläche gebunden. Die Monomere werden über eine kontrolliert/lebende radikalische Polymerisation von der Oberfläche polymerisiert. Diese Polymerisationsstrategie wird auch *Surface-Initiated-Polymerisation* (SI) genannt.^[5] Für die *Surface-Initiated-Polymerisation* können die kontrolliert radikalischen Polymerisationen *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP), *Reversible Addition-Fragmentation Chain-Transfer* (RAFT), *Ring Opening Metathesis Polymerization* (ROMP) und *Nitroxide-Mediated Polymerization* (NMP) angewendet werden. Die Vorteile der „*Grafting from*“-Methode bestehen in der genauen Einstellung der Polymerbürsten durch das Molekulargewicht und die Zusammensetzung.^[1] Außerdem wird durch „*Grafting from*“ eine hohe Bürstendichte auf der Oberfläche erreicht. Hierfür ist die Adsorption des Initiators als Monolayer verantwortlich.^[6] Die zweite Strategie ist die „*Grafting to*“ Methode.^[7] Bei ihr wird ein synthetisiertes Polymer über eine Endgruppe kovalent an der Oberfläche gebunden. Durch sterische Abstoßung werden bei der „*Grafting to*“-Methode geringere Polymerdichten auf der Oberfläche erhalten als beim „*Grafting from*“.^[5]

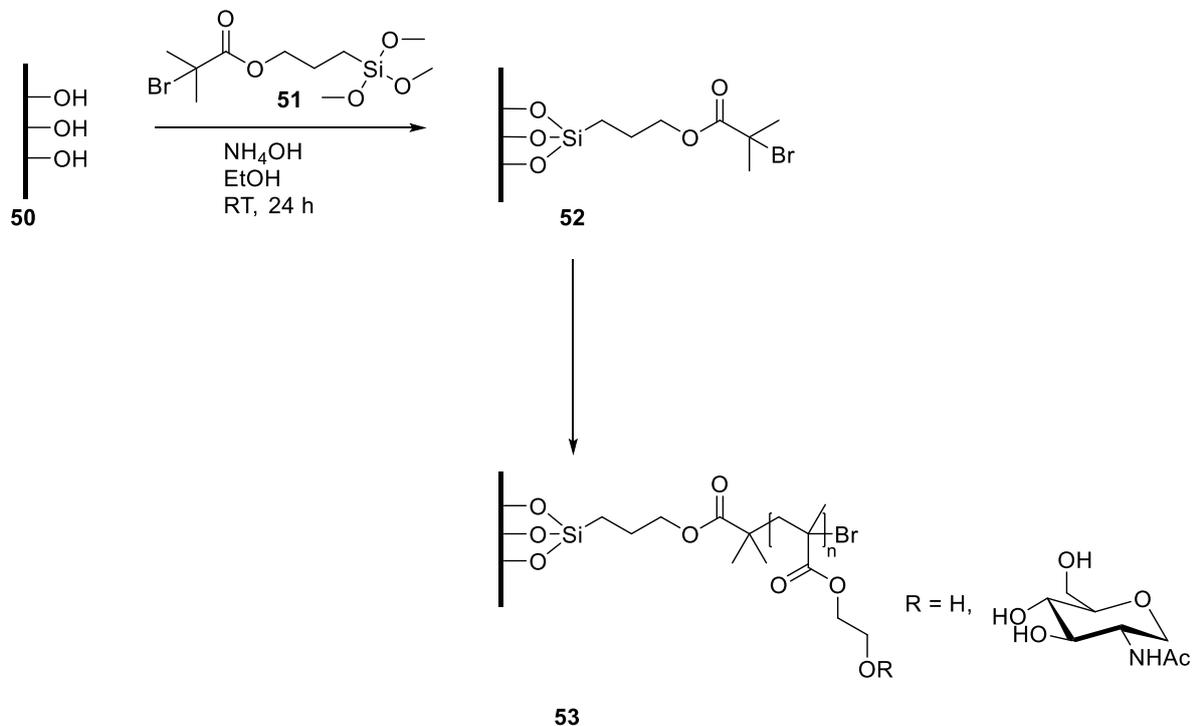
Durch die Oberflächenfunktionalisierung und Oberflächenmodifikation über kovalent bindende Polymere können die Oberflächeneigenschaften beeinflusst werden.^[4] Die Oberflächenbeschaffenheit und die Funktionalität der Oberfläche können genau bestimmt werden. Dadurch werden die Adhäsion, die Benetzung und die Bioverträglichkeit der Oberfläche beeinflusst. Das eröffnet neue Anwendungsgebiete für Polymeroberflächen, die als Wellenleiter, in der Biotechnologie oder in Biosensoren Anwendung finden.^{[4][8]} Dabei können nicht nur Gold- und Siliziumoberflächen funktionalisiert werden, sondern auch Oberflächen aus Polymeren oder härteren Materialien wie z.B. Siliziumnitrid (Si_3N_4).^{[5][9-13]} Über die Funktionalisierung der Polymere können Oberflächen mit antiadsorptiven Eigenschaften hergestellt werden, die in der Biochemie und bei Bioimplantaten angewendet werden können.^{[8][14-16]} Vorteile dieser Oberflächen bestehen darin, dass keine Zellen oder Partikel auf der Oberfläche adhären können.^[17]

Glykopolymere können auch als Oberflächenfunktionalisierung genutzt werden.^{[18][19]} Dies bietet die Möglichkeit die Glykan-Protein-Wechselwirkungen genauer zu analysieren.^[20] Die Glykan-Protein-Wechselwirkung ist verantwortlich für biologische Prozesse wie z.B. die zelluläre Erkennung, Zell-Adhäsion und die Infektion von Pathogenen.^[21-23] Durch Glykopolymere auf den Oberflächen können diese biologischen Prozesse über die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) oder den optischen Mikroring-Resonator untersucht werden.^{[24][25][26]} Die Glykan-Protein-Wechselwirkung ermöglicht es, neue Biosensoren zu entwickeln, die in der medizinischen Diagnostik eingesetzt werden können.

In diesem Kapitel der Dissertation wurde die Bindung verschiedener Glykopolymere auf unterschiedlichen Oberflächen dargestellt. Die Glykopolymerbürsten wurden mit XPS-, Kontaktwinkel- und SFM-Messungen untersucht. Außerdem wurden die Schichtdicken der Glykopolymerbürsten bestimmt. Die Biofunktionalität der Oberflächen wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht und die biologische Anwendung in der Diagnostik über SPR und Mikroring-Resonatoren getestet.

6.2. Glykopolymere auf Siliziumoberflächen

Die Bindung von Glykopolymeren auf Siliziumoberflächen wurde über die „*Grafting from*“-Methode durch eine SI-ATRP-Reaktion erreicht (**Schema 20**). Dabei wird als erstes der Initiator auf der Oberfläche gebunden und dann das Monomer durch SI-ATRP-Reaktion von der Oberfläche polymerisiert.



Schema 20: SI-ATRP über die „*Grafting from*“-Methode. Im ersten Syntheseschritt wurde der Initiator (**51**) auf der Oberfläche gebunden. Im zweiten Syntheseschritt wurden die Monomere über „*Grafting from*“ von der Oberfläche polymerisiert.

Der Initiator **51** wird kovalent auf der Oberfläche gebunden. Hierfür wird die Oberfläche mit Luftplasma aktiviert (**50**) und über Nacht in einer Lösung aus Ethanol, Ammoniak und Initiator **51** eingelegt. Die Oberfläche wird gewaschen und die Bindung des Initiators über XPS- und Kontaktwinkelmessungen analysiert.

Durch die Aktivierung der Oberfläche mit Luftplasma werden reaktive Hydroxid-Gruppen auf der Oberfläche **50** generiert. Die Siloxan-Gruppen des Initiators **51** reagiert mit den Hydroxid-Gruppen an der Oberfläche, dadurch wird der Initiator kovalent an der Oberfläche gebunden (**52**). Die XPS-Daten sind in Abbildung 19 dargestellt.

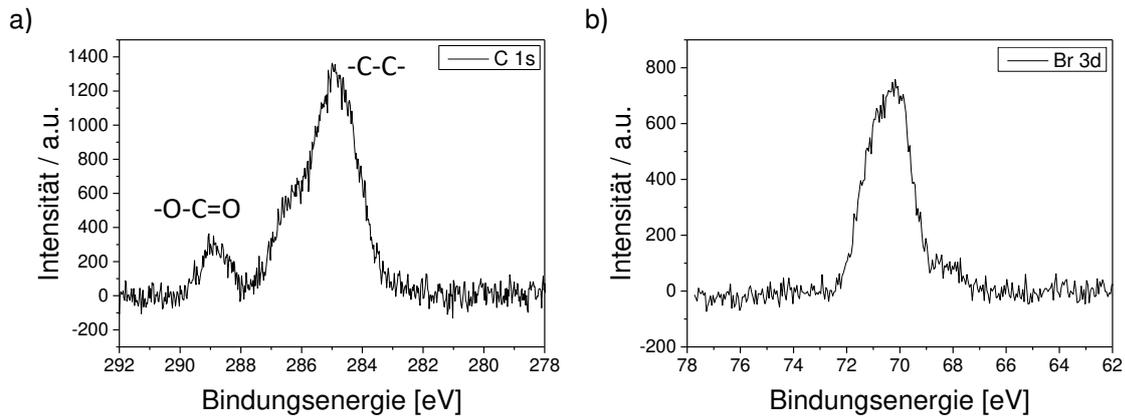


Abbildung 19: XPS-Daten der Si-Wafer mit Initiator, a) Spektrum der detektierten Elektronen aus dem 1s-Orbital des Kohlenstoffatoms; b) Spektrum der detektierten Elektronen aus dem 3d-Orbital des Bromatoms.

Das Kohlenstoffspektrum **a**, bei dem die Elektronen aus dem 1s-Orbital herausgelöst werden, zeigt zwei erkennbare Signale. Das erste Signal bei 289 eV wird von Elektronen der Ester-Gruppe (-C-O-C=O) hervorgerufen. Das zweite, große Signal bei 285 eV wird von den Elektronen der C-C-Bindung hervorgerufen. Die Ester-Gruppe des Initiators kann den resultierenden Signalen des XPS-Spektrums zugeordnet werden. Auch im XPS-Spektrum des Bromatoms **b**, bei dem die Elektronen aus dem 3d-Orbital herausgelöst werden, ist ein deutliches Signal bei 71 eV zu erkennen. Durch die XPS-Analyse kann nachgewiesen werden, dass der Initiator auf der Oberfläche vorhanden ist. Die mit Initiator funktionalisierten Siliziumoberflächen wurden über eine SI-ATRP mit GlcNAcEMA **4** und HEMA **40** polymerisiert. Die kovalente Bindung der Polymerbürsten auf der Oberfläche wurde mit XPS nachgewiesen. Die XPS-Daten sind in Abbildung 20 dargestellt.

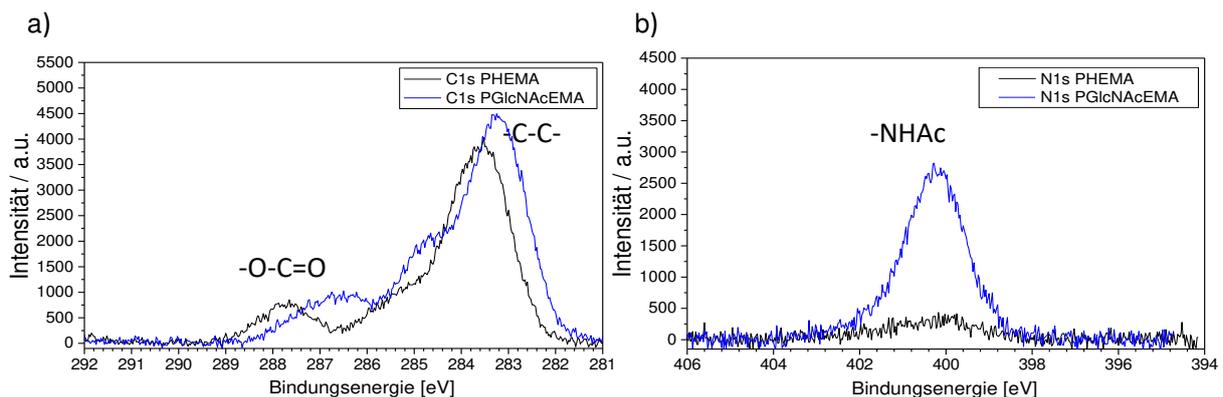


Abbildung 20: XPS-Daten der Si-Wafer mit den Polymeren PHEMA (schwarz) und PGlcNAcEMA (blau); a) Spektrum der detektierten Elektronen aus dem 1s-Orbital des Kohlenstoffatoms; b) Spektrum der detektierten Elektronen aus dem 1s-Orbital des Stickstoffatoms.

Im XPS-Spektrum der detektierten Elektronen aus dem 1s-Orbital des Kohlenstoffatoms **a** ist für beide Polymere das Signal der Ester-Gruppe bei 289-287 eV zu erkennen. Auch das Signal der Elektronen der C-C-Bindung bei 285-283 eV ist in beiden Spektren erkennbar. Die Spektren sind leicht verschoben, was an den unterschiedlichen Polymerisationsgraden der Polymere liegt. In dem XPS-Spektrum für die detektierten Elektronen aus dem 1s-Orbital des Stickstoffatoms **b**, ist für das PGlcNAcEMA Polymer ein starkes Signal bei 400 eV zu erkennen. Das Polymer PGlcNAcEMA besitzt aufgrund der *N*-Acetyl-Gruppe am Glykan ein Stickstoffatom. Dieses wird in den XPS-Daten detektiert. Für das PHEMA Polymer ist ein schwaches Signal für das Stickstoffatom zu erkennen. Das Polymer PHEMA besitzt hingegen kein Stickstoffatom, das schwache Signal resultiert von leichten Verunreinigungen auf der Oberfläche. Über die XPS-Daten konnte nachgewiesen werden, dass sowohl der Initiator als auch die Polymere PHEMA und PGlcNAcEMA sich auf der Siliziumoberfläche befinden.

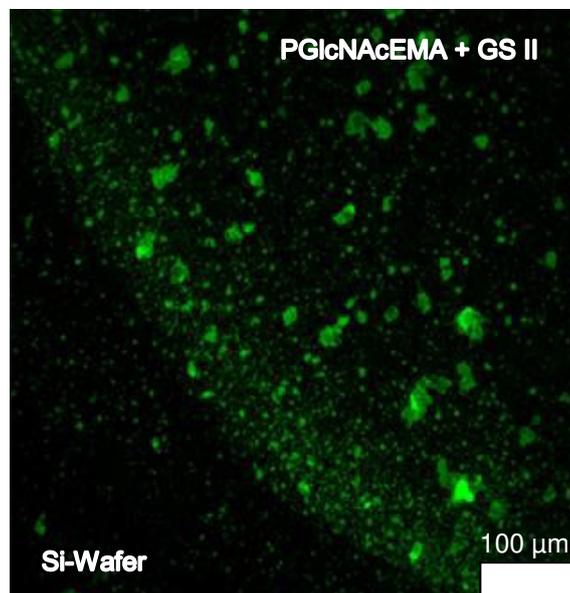


Abbildung 21: Fluoreszenzaufnahme des mit PGlcNAcEMA funktionalisierten Si-Wafer, Bindung mit dem Lektin GS II.

Für die biologische Anwendung wurde die Oberfläche mit einem spezifisch und selektiv bindenden Lektin GS-II inkubiert. Das GS-II Lektin war fluoreszenzmarkiert und die Bindung an das Glykopolymer PGlcNAcEMA konnte über Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. In Abbildung 21 ist die Fluoreszenzaufnahme abgebildet. Eine starke inhomogene Fluoreszenz auf der rechten Seite des Wafers ist erkennbar. Dies zeigt an, dass das Lektin GS-II nur an das Glykan GlcNAc bindet. Jedoch ist die Fluoreszenz nicht homogen, dies lässt darauf schließen, dass nicht alle Glykane in den Polymerbürsten adressiert werden. Ein Grund hierfür, ist der Abstand der einzelnen Glykane, der für das Protein zu klein ist. Es können nicht alle Glykane vom Protein erreicht werden, deswegen wird keine homogene Fluoreszenz erhalten.

Über die XPS-Analyse konnte gezeigt werden, dass der Initiator auf der Siliziumoberfläche bindet. Auch die Polymerisation mit PHEMA und PGlcNAcEMA über „*Grafting from*“ war erfolgreich. Dies konnte über XPS- und Fluoreszenzmessungen nachgewiesen werden. Die Glykopolymerbürsten

wurden als Bioanwendung mit dem Lektin GS-II getestet. Es wurde gezeigt, dass das Lektin vereinzelt Glykan adressieren kann und an dem Glykopolymer bindet.

Für eine bessere Analyse und um eine intrinsische Negativkontrolle zu generieren, wurde der Initiator über Mikrokontaktdruck (μ CP) auf die Oberfläche aufgetragen. Dafür wurde der Initiator mit Hilfe eines Poly(dimethylsiloxan)-Stempels (PDMS) auf die Oberfläche gedrückt. Der PDMS-Stempel wurde in Initiatorlösung eingelegt und nochmals mit Initiatorlösung inkubiert. Danach wurde der Stempel auf die Oberfläche gedrückt. Dieser Prozess wurde optimiert, indem drei Parameter geändert wurden: i) die Einlegezeit, ii) die Inkubationszeit und iii) die Stempelzeit. Die besten Ergebnisse, bei denen eine homogene Initiator-/Polymer-Schicht entsteht, wurden als optimierte Prozesse herausgestellt. Der Initiator wurde mit einem feuchten Stempel und einem Gewicht von 15 g auf die Oberfläche gedrückt. Zum Schutz der ungestempelten Seite wurde die Oberfläche 1 h in eine APTES-Lösung eingelegt. Anschließend wurde über SI-ATRP das Polymer PHEMA und PGlcNAcEMA auf die Oberfläche synthetisiert. Zur Kontrolle der Reaktionen wurde nach jedem Schritt der Kontaktwinkel gemessen (**Abbildung 22, 23**).

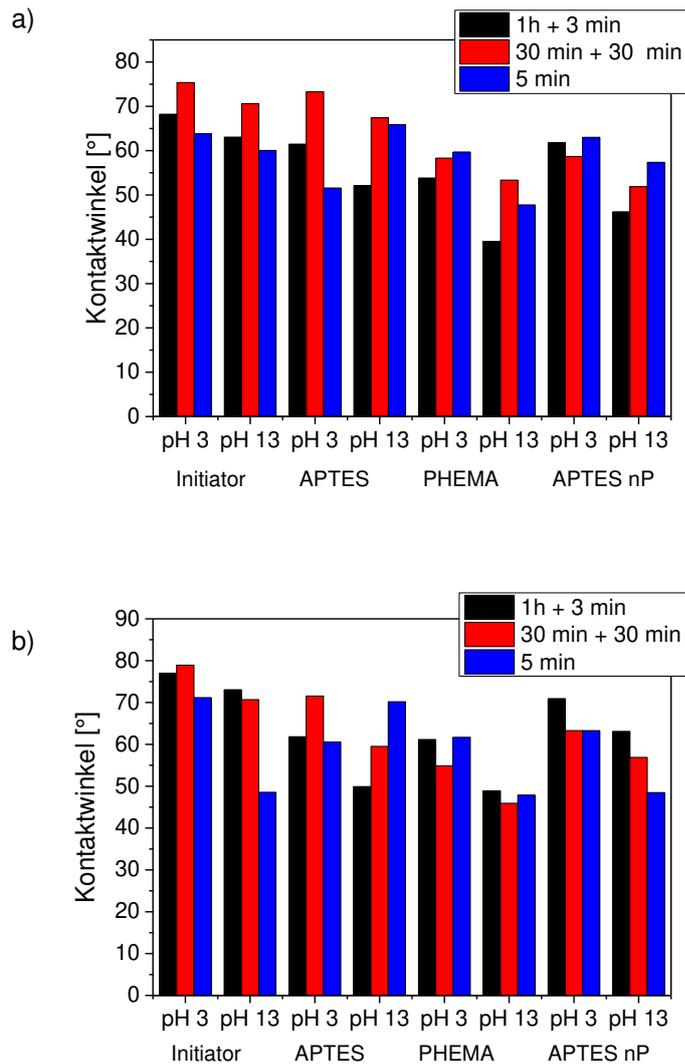


Abbildung 22: Kontaktwinkel Daten der verschiedenen Parameter 1h + 3 min Einlege und Inkubationszeit, 30 min + 30 min Einlege und Inkubationszeit und 5 min Inkubationszeit, bei verschiedenen pH-Werten, pH 3 und pH 13; a) Stempeldauer 20 s; b) Stempeldauer 30 s. Gestempelt wurde mit einem feuchten Stempel und einem Gewicht von 15 g. Die Daten sind für die Polymerisation mit PHEMA.

In Abbildung 22 sind die Kontaktwinkelmessungen der Oberfläche mit PHEMA funktionalisiert dargestellt. Der Kontaktwinkel wurde jeweils bei zwei verschiedenen pH-Werten, pH 3 und pH 13, gemessen. Es sollte geprüft werden, ob die Oberflächenbeschaffenheit sich im basischen oder aziden Milieu ändert. Für alle drei Stempelprozesse war die Oberfläche nach der Funktionalisierung mit dem Initiator, sowohl für pH 3 als auch für pH 13 hydrophob. Der Kontaktwinkel liegt bei 70°. Nach der Polymerisation mit PHEMA sank der Kontaktwinkel der Oberfläche ab und die Oberflächen wurden bei beiden pH-Werten hydrophiler. Der Kontaktwinkel sank bei pH 3 auf 60° und bei pH 13 auf 50° ab. Der Kontaktwinkel der PHEMA-Bürsten auf der Oberfläche nimmt mit steigender Polymerschichtdicke ab.^[27] Bei einer Polymerschichtdicke von 20 nm wird ein Kontaktwinkel von 20° erreicht.^[27] Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass hier eine PHEMA-Schicht von ungefähr 10 nm erreicht wurde.

Die Kontaktwinkeldaten für die Oberflächen, die mit GlcNAcEMA polymerisiert wurden, sind in Abbildung 23 dargestellt. Auch hier wurde die Oberflächenbeschaffenheit im basischen und aziden Milieu untersucht (pH 3 und pH 13). Aus den Kontaktwinkeldaten konnte für alle drei Stempelprozesse

keine aussagekräftigen Ergebnisse erhalten werden. Die Kontaktwinkel der Oberfläche, die mit Initiator beschichtet wurden, waren hydrophob und liegen bei einem kontaktwinkel von über 50°. Der Kontaktwinkel nach der Polymerisation mit dem Glykopolymer zeigt keine signifikante Änderung. Auf der Seite der Negativkontrolle (APTES) war der Kontaktwinkel der Oberfläche jedoch niedriger und damit ist die Oberfläche hydrophiler. Der Kontaktwinkel der Glykopolymer sollte aufgrund der OH-Gruppen im Glykan klein, also hydrophil sein. Über die Kontaktwinkelergebnisse ist nachweisbar, dass sich der Initiator auf der Oberfläche befindet. Ob eine erfolgreiche Polymerisation stattgefunden hat, konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

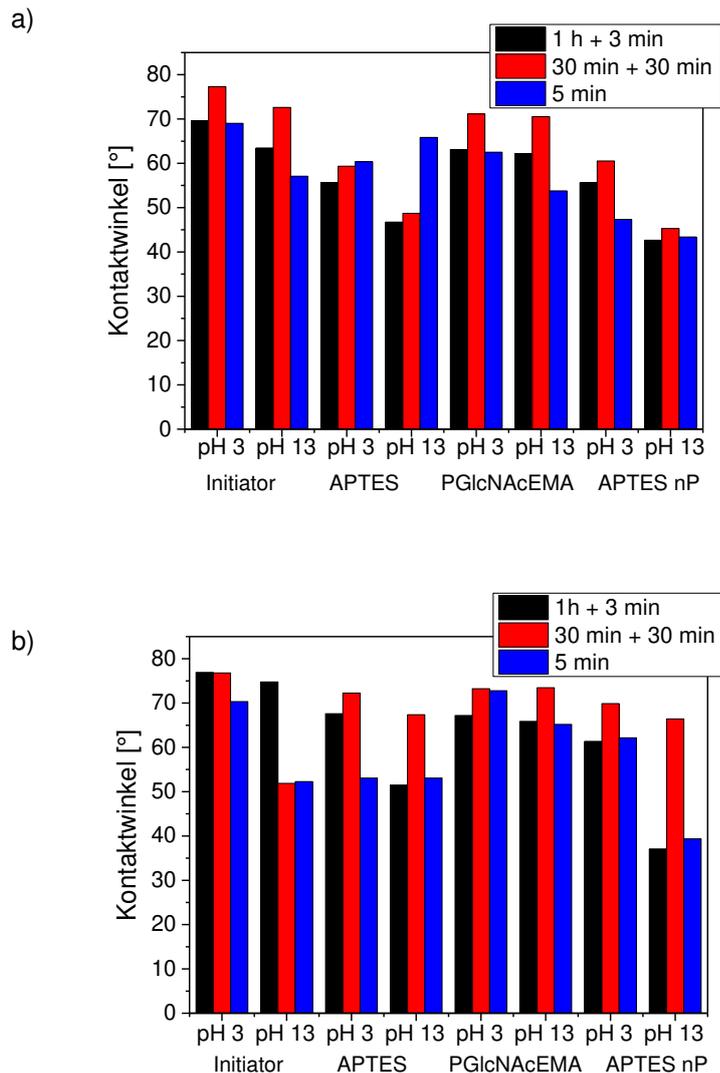


Abbildung 23: Kontaktwinkel-Daten der verschiedenen Parameter 1h + 3 min Einlege und Inkubationszeit, 30 min + 30 min Einlege und Inkubationszeit und 5 min Inkubationszeit, bei verschiedenen pH -Werten, pH 3 und pH 13; a) Stempeldauer 20 s; b) Stempeldauer 30 s. Gestempelt wurde mit einem feuchten Stempel und einem Gewicht von 15 g. Die Daten sind für die Polymerisation mit PGlcNAcEMA.

Die mit GlcNAcEMA polymerisierten Oberflächen wurden über Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dafür wurde ein fluoreszenzmarkiertes Lektin GS-II auf die Oberfläche aufgetragen. Das Lektin GS-II bindet selektiv und spezifisch an GlcNAc. Um eine unspezifische Bindung auszuschließen wurden die Oberflächen nach der Lektininkubation gewaschen. Das Lektin bindet auf der Seite der Oberfläche, die mit dem Glykopolymer PGlcNAcEMA beschichtet wurde. In Abbildung 24 sind die Fluoreszenzaufnahmen der besten Stempelprozessparameter dargestellt. In allen drei Aufnahmen ist eine Abgrenzung zwischen gestempelter und nicht gestempelter Seite zu erkennen. Allerdings ist die Stärke und Homogenität der Fluoreszenz unterschiedlich. In Abbildung **24a** ist eine homogene und starke Fluoreszenz sichtbar, hier wurde der Initiator mit einer Einlegzeit von 1 h, einer Inkubationszeit von 3 min und einer Stempeldauer von 30 s gestempelt. Für die Fluoreszenzbilder in Abbildung **24b** und **24c** ist eine schwache und inhomogene Fluoreszenz sichtbar.

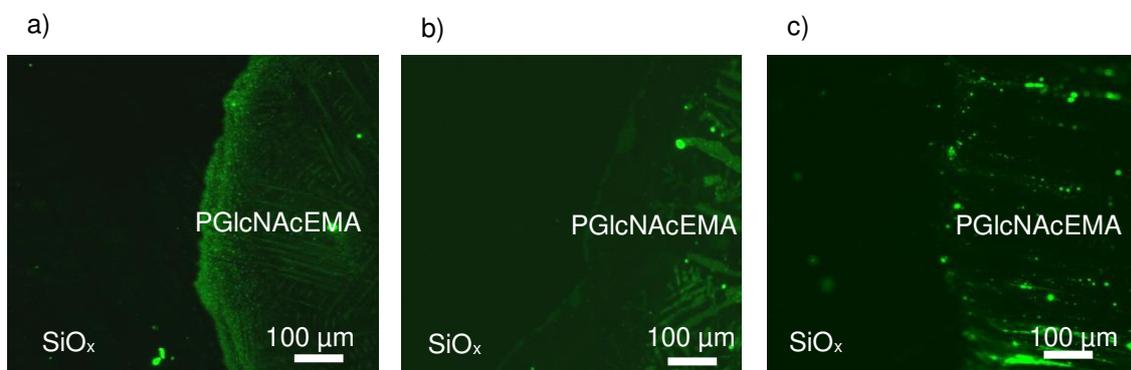
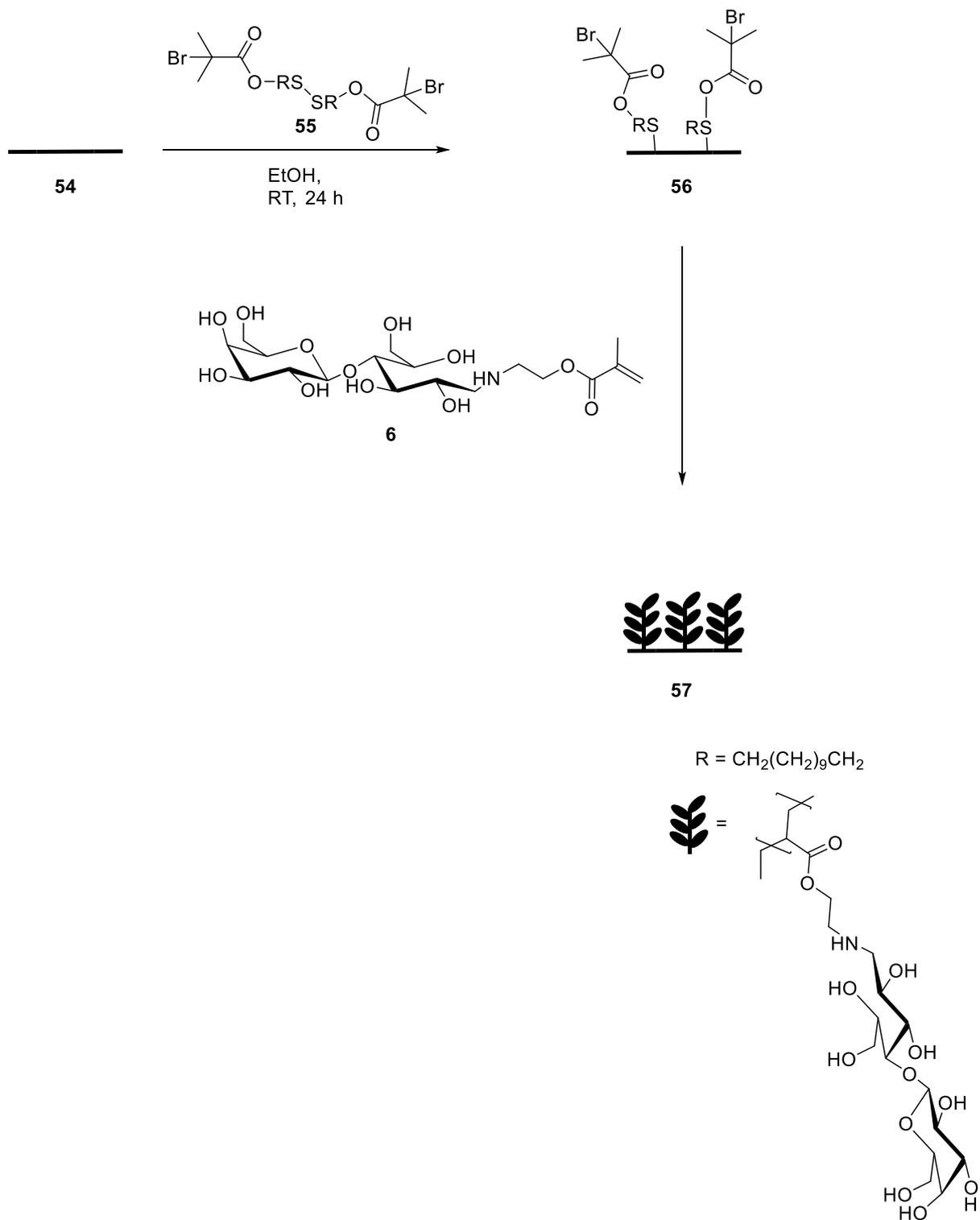


Abbildung 24: Fluoreszenzaufnahme SiW nach SI-ATRP mit PGLcNAcEMA und Lektinbindung mit GS-II; a) μ CP mit 1 h + 3 min Einlegzeit und 30 s Stempeldauer; b) μ CP mit 5 min Einlegzeit und 20 s Stempeldauer; c) μ CP mit 30 min + 30 min und 30 s Stempelzeit.

Die Fluoreszenzmikroskopieergebnisse zeigen für alle drei Parameter eine Fluoreszenz. Das Lektin GS-II bindet an das Glykopolymer PGlcNAcEMA und die Negativkontrolle (APTES) wird nicht von dem Lektin GS-II gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass der Initiator erfolgreich auf die Siliziumoberfläche gestempelt werden konnte und dass die Polymere PHEMA und PGlcNAcEMA auf die Oberfläche gebunden wurden. Der optimierte Stempelprozess, bei dem eine homogene Initiator- und Polymerschicht auf der Oberfläche erhalten wurde, war die Methode mit 1 h Einlegzeit, 3 min Inkubation und 30 s Stempelzeit.

6.3. Glykopolymere auf Goldoberflächen

Die Polymerisation eines Glykopolymers auf Goldoberflächen (Au-Oberfläche) wurde mit dem Monomer LacAEMA **6** (Kapitel 3) über „Grafting from“ und eine SI-ATRP auf der Oberfläche erreicht. Zuerst wurde der Initiator auf der Oberfläche gebunden. Die Goldoberfläche **54** wird in eine Lösung aus Bis[2-(2'-bromoisobutyryloxy)ethyl]disulfid (**55**) und Ethanol über Nacht eingelegt. Dabei binden die Dithio-Gruppen des Initiators kovalent an der Oberfläche (**56**). Danach wurde das Monomer LacAEMA **6** über eine SI-ATRP auf die Goldoberfläche polymerisiert (**57**).



Schema 21: SI-ATRP-Reaktion von PLacAEMA auf Goldoberflächen (57) mit dem Initiator aus Bis[2-(2'-bromoisobutyryloxy)ethyl]disulfid (55). Zuerst wird der Initiator (55) auf der Goldoberfläche kovalent gebunden. Dann polymerisiert Lactide (6) über SI-ATRP von der Oberfläche.

Die Goldoberflächen wurden mit Kontaktwinkelmessungen, Ellipsometrie- und SFM-Messungen analysiert. In Abbildung 25 ist die Kontaktwinkelmessung der Goldoberflächen, die mit dem Initiator und PLacAEMA funktionalisiert wurden, dargestellt. Der Kontaktwinkel für die Oberfläche, an der der Initiator gebunden ist, beträgt 45-50°. Für die Oberfläche, die mit dem Polymer PLacAEMA

funktionalisiert wurde, beträgt der Kontaktwinkel 50-60°. Nach der Adsorption des Initiators auf der Oberfläche wird die Oberfläche hydrophober. Bei einer sauberen und unbeschichteten Goldoberfläche liegt der Kontaktwinkel bei 10°. Durch die Initiatorfunktionalisierung wird ein Kontaktwinkel bis 50° erhalten. Das bestätigt, dass der Initiator auf der Oberfläche ist.

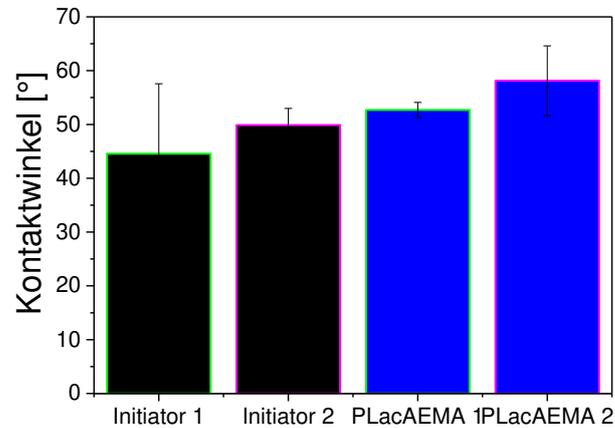


Abbildung 25: Kontaktwinkelmessung der Goldoberfläche, schwarz) Initiator (56) und blau) PLacAEMA (57) gebunden sind.

Nach der Polymerisation mit LacAEMA wird der Kontaktwinkel auf der Oberfläche größer und deutet eine Zunahme der Hydrophobie an. Das Glykopolymer PLacAEMA besitzt aufgrund der Laktoseeinheiten viele OH-Gruppen, was zu einer hydrophileren Oberfläche führen sollte. Die Laktose liegt im Polymer mit der Glukose als offenkettige Form vor. Dadurch wird ein Spacer zwischen der Galaktose und der polymerisierbaren Gruppe eingebaut. Aufgrund dessen kann sich das Polymer auf der Oberfläche bewegen und bildet eine Knäuelstruktur. Das kann zu einer hydrophoben Oberfläche führen. Außerdem wurde der Kontaktwinkel nach 30s Verweilzeit des Wassertropfens auf der Oberfläche aufgenommen. Bei einer längeren Verweilzeit des Wassertropfens könnten die Polymerbürsten quellen und ein kleinerer Kontaktwinkel könnte erreicht werden. Weitere Messungen der Oberfläche wurden durchgeführt, um zu belegen, dass das Glykopolymer auf der Oberfläche gebunden ist. Die Schichtdicke des Polymers PLacAEMA auf der Goldoberfläche wurde mit Ellipsometriemessung bestimmt (**Tabelle 14**). Zwei Goldoberflächen wurden an drei Stellen vermessen (**Eintrag 1,2,3**). Für die Polymerschichtdicke wurde ein Mittelwert von 39 nm und 40 nm erhalten. Die Ellipsometriemessungen belegen eine Polymerschicht auf der Goldoberfläche.

Tabelle 14: Ellipsometriemessung der Schichtdicke des Glykopolymers PLacAEMA auf der Goldoberfläche.

Eintrag	Au-Wafer 1 Schichtdicke [nm]	Au-Wafer 2 Schichtdicke [nm]
1	40,2	40,9
2	39,5	40,6
3	39,0	41,4
Mittelwert	39,6	41,0

Die Struktur und Polymerschichtdicke auf den Goldoberflächen wurden mit SFM-Messungen untersucht. Für die SFM-Messungen wurde die Oberfläche an einer Stelle eingeritzt. Über diese Vertiefung kann der Höhenunterschied zwischen Goldoberfläche und Polymerschicht bestimmt werden, woraus die Polymerschichtdicke abgeleitet werden kann. In Abbildung 26 sind die SFM-Aufnahmen einer Goldoberfläche, die mit PLacAEMA beschichtet wurde, dargestellt.

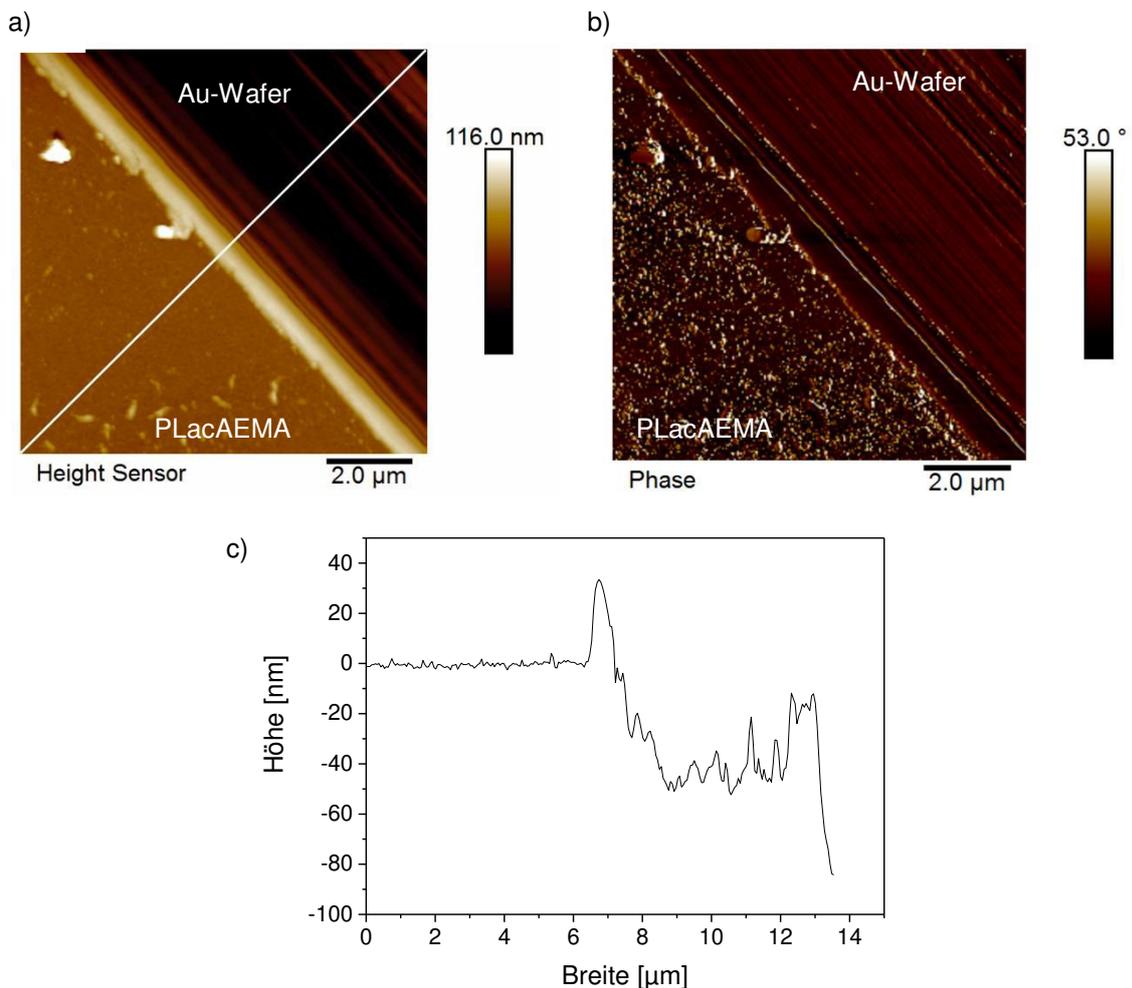


Abbildung 26: SFM-Aufnahmen des Glykopolymers PLacAEMA auf der Goldoberfläche; a) SFM-Höhenbild, b) SFM-Phasenbild, c) Höhenprofil der Polymerschicht. Die weiße Linie im Höhenbild (a) gibt an, an welcher Stelle das Höhenprofil aufgenommen wurde.

In der Abbildung 26 ist das Höhenbild **a**, Phasenbild **b** und Höhenprofil **c** zu erkennen. Es ist eine klare Vertiefung durch das Einritzen der Polymerschicht zu erkennen. Im Phasenbild **b** sind auf der Glykopolymerseite hellere und kleine Punkte sichtbar, die anzeigen, dass Polymerbürsten vorhanden sind. Auf der Seite des Au-Wafers ist eine glatte Fläche zu sehen. Das Höhenbild zeigt zwei verschiedene Bereiche. Die Seite der Glykopolymerschicht weist eine hellere Fläche auf. Diese Bildgebung zeigt, dass Polymerbürsten auf der Goldoberfläche entstanden sind. Über die Kante konnte eine Polymerschicht von 40 nm bestimmt werden. Diese Ergebnisse stützen die Ellipsometriemessungen, bei denen auch eine Polymerschichtdicke von 39-40 nm bestimmt wurde.

Die Polymerisation eines Glykopolymers auf einer Goldoberfläche über „*Grafting from*“ konnte nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass der Initiator über die Thiol-Gruppen kovalent an der Goldoberfläche bindet und über SI-ATRP ein Glykopolymer auf der Goldoberfläche aufgebracht werden kann. Goldoberflächen werden in Biosensoren eingesetzt wie z.B. in der SPR. Bei der SPR wird die Veränderung des Brechungsindex gemessen. Binden Lektine an dem Glykopolymer ändert sich der Brechungsindex und so kann die Moleküladsorption an der Oberfläche analysiert werden.

6.4. Glykopolymere auf optischen Mikroring-Resonatoren

Die Anwendung von Glykopolymeren auf Biosensoren wurde für optische Mikroring-Resonatoren untersucht. Dafür wurde das Glykomonomer GlcNAcEMA (**Kapitel 3**) verwendet. Für die Funktionalisierung des Mikroring-Resonators werden aufgrund der Größe von ca. 300 μm des Resonators geringe Mengen an Polymer benötigt. Die Mikroring-Resonatoren wurden vom Projektpartner Moritz Kleinert, M. Sc., am Heinrich-Hertz-Institut, Abteilung Photonische Komponenten zur Verfügung gestellt. Die Mikroring-Resonator-Messungen wurden am Heinrich Hertz Institut durchgeführt.

In Abbildung 27 sind eine schematische Darstellung und eine SFM-Aufnahme eines Mikroring-Resonators dargestellt.

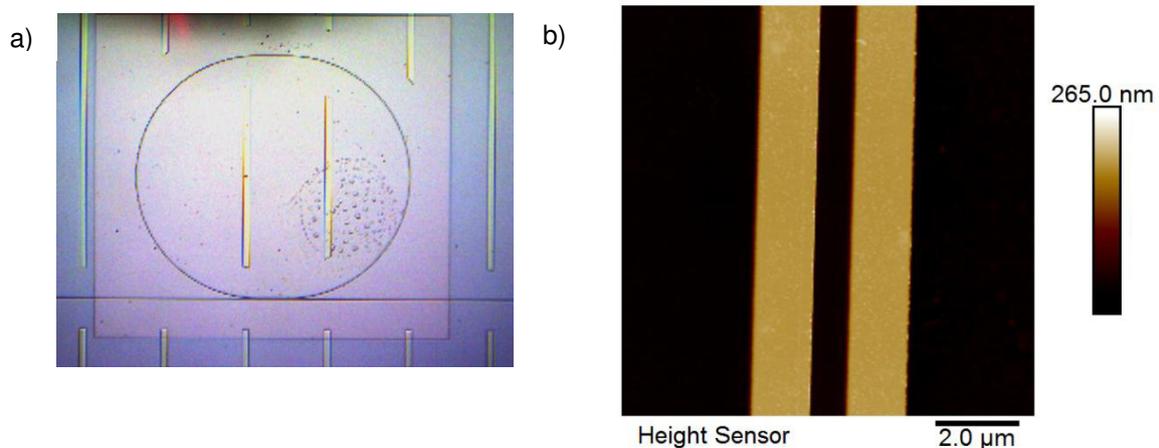


Abbildung 27: Darstellung eines Mikroring-Resonators, a) Mikroskop-Aufnahme eines Mikroring-Resonators von oben; b) SFM-Aufnahmen eines Mikroring-Resonators, zusehen sind die parallel laufenden Stege des Ringes und des Lichtstegs. Ein Höhenprofil des Mikroring-Resonators ist im Anhang (Abb.85) dargestellt.

Der Mikroring-Resonator detektiert die Änderung des Brechungsindex auf der Oberfläche. Dazu koppelt polarisiertes Licht auf dem Wellenleiter mit dem Mikroring-Resonator. Die Resonanz der Wellenlänge wird detektiert. Wird die Funktionalität der Oberfläche des Mikrorings verändert, ändert sich auch der Brechungsindex. Die Folge daraus ist eine Verschiebung der Resonanz der Wellenlänge. In den Messungen wird eine Wellenlänge zwischen 1500 nm und 1550 nm verwendet und alle 3 Sekunden ein Signal aufgenommen. Die Resonanz der Wellenlänge wird als Funktion der Zeit detektiert.

Das Ziel der Untersuchung war es die Oberfläche des Resonators zu funktionalisieren, ohne dass die Eigenschaften zerstört werden. Dabei wird untersucht, ob die Funktionalisierung der Siliziumoberfläche für die Oberfläche des Resonators, der aus Siliziumnitrid besteht, angewendet werden kann. Der Resonator wurde mit Luftplasma aktiviert, um aktive Hydroxid-Gruppen auf der Oberfläche zu generieren. Danach wurde der Resonator in einer Lösung aus Ethanol, Ammoniak und Initiator über Nacht eingelegt. Der Initiator reagiert mit seinen Silanol-Gruppen mit den Hydroxid-Gruppen und bindet kovalent an der Oberfläche.

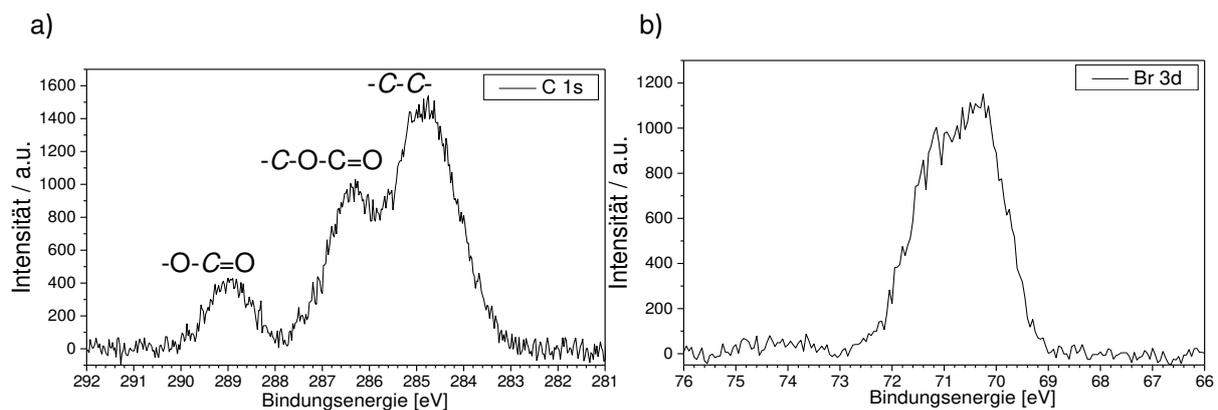


Abbildung 28: XPS-Daten der Si_3N_4 -Oberfläche mit angebondenem Initiator, a) Spektrum der detektierten Elektronen aus dem 1s-Orbital des Kohlenstoffatoms; b) Spektrum der detektierten Elektronen aus dem 3d-Orbital des Bromatoms.

Über XPS wurde geprüft, ob der Initiator auf der Oberfläche vorhanden ist. In Abbildung 28 sind die XPS-Spektren dargestellt. Die Abbildung **a** (**Abb. 28, a**) zeigt das C1s-Spektrum der detektierten Elektronen, die aus dem 1s-Orbital des Kohlenstoffatoms herausgelöst wurden. Die Abbildung **b** (**Abb. 28, b**) zeigt das Br3d-Spektrum der detektierten Elektronen, die aus dem 3d-Orbital des Bromatoms herausgelöst wurden. In beiden Spektren ist zu erkennen, dass der sich Initiator auf der Oberfläche befindet. In den XPS-Daten für das Kohlenstoffatom **a** sind drei Signale zu erkennen. Das erste Signal bei 289 eV wird von den Elektronen der Ester/Carbonyl-Gruppe (-C-O-C=O), das zweite Signal bei 287 eV von den Elektronen der Ester-Gruppe (-C-O-C=O) und das dritte Signal bei 285 eV von den Elektronen der C-C-Bindung hervorgerufen. Die resultierenden Signale im XPS-Spektrum können dem Initiator, der eine Ester- und eine Carbonyl-Gruppe besitzt, zugeordnet werden. Auch im XPS-Spektrum des Bromatoms **b** ist ein deutliches Signal bei 71 eV zu erkennen. Die XPS-Analyse bestätigt, dass der Initiator auf der Oberfläche vorhanden ist.

Um die Oberfläche genauer zu analysieren wurde der Kontaktwinkel der Oberfläche gemessen. Dabei wurde jeweils die Kontaktwinkelmessung, nach der Plasmabehandlung, nach der Initiatorbeschichtung

und nach der Polymerisation mit PGlcNAcEMA durchgeführt (**Abbildung 29**). Nach der Plasmabehandlung ist die Oberfläche hydrophil mit einem Kontaktwinkel um 10° und nach der Adsorption des Initiators steigt die Hydrophobizität der Oberfläche stark an (80°). Der Kontaktwinkel änderte sich nach der Polymerisation signifikant (70°). Nach der Polymerisation auf der Oberfläche nimmt die Hydrophobizität der Oberfläche, im Gegensatz zur Initiator-beschichteten Oberfläche, ab. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sich Glykopolymerbürsten auf der Oberfläche gebildet haben. Die OH-Gruppen der Glykane im Polymer bewirken auf der Oberfläche eine Erhöhung der Hydrophilie. Über den Kontaktwinkel konnte belegt werden, dass eine Oberflächenbeschichtung mit dem Initiator und eine Polymerisation stattgefunden hat.

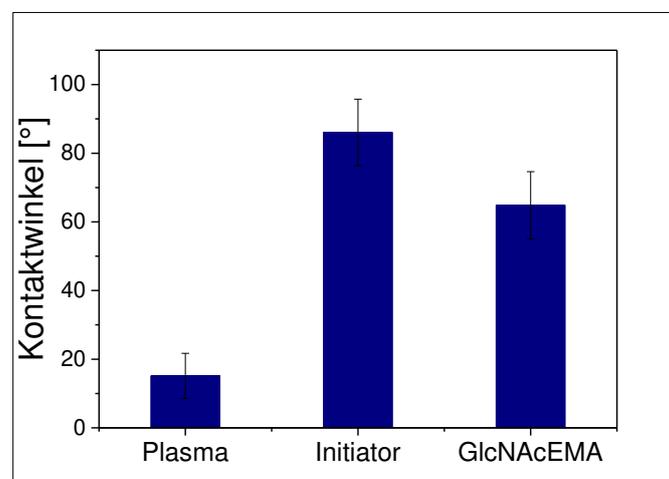


Abbildung 29: Kontaktwinkeldaten eines Si_3N_4 -Wafers, nach der Plasmabehandlung, mit Initiator beschichtet und polymerisiert mit GlcNAcEMA.

Um den Mikroring-Resonator auf dem Ring zu beschichten und eine optimierte Analyse durchführen zu können, wurde der Initiator über Mikrokontaktdruck (μCP) auf eine Si_3N_4 -Oberfläche aufgetragen. Hierbei wurde eine intrinsische Negativkontrolle ohne Polymer erhalten. Für den Mikrokontaktdruck wurde eine Einlegezeit von 1 Stunde, eine Inkubationszeit von 3 Minuten und einer Stempelzeit von 30 s angewendet.

Auf der mit Initiator modifizierten Si_3N_4 -Seite wurde über eine SI-ATRP-Reaktion das Monomer GlcNAcEMA (**Kapitel 2**) über „*Grafting from*“ polymerisiert. Das Polymer wurde über SFM-Messungen, Kontaktwinkelmessungen und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Durch das Druckverfahren konnte die Dicke der Polymerschicht über SFM-Messungen bestimmt werden. In **Abbildung 30** ist das Höhenbild und das Höhenprofil der SFM-Messung gezeigt. Auf der rechten Seite, auf der das Glykopolymer vorhanden ist, sind hellere, kleine Punkte zu erkennen. Auf der linken Seite, bei der die reine Si_3N_4 -Oberfläche vorhanden ist, ist eine glatte, braune Fläche erkennbar. Über die Kante konnte eine Dicke der Polymerschicht von 10 nm bestimmt werden. Dadurch konnte die Polymerisation des Glykopolymers auf der Oberfläche bestätigt werden.

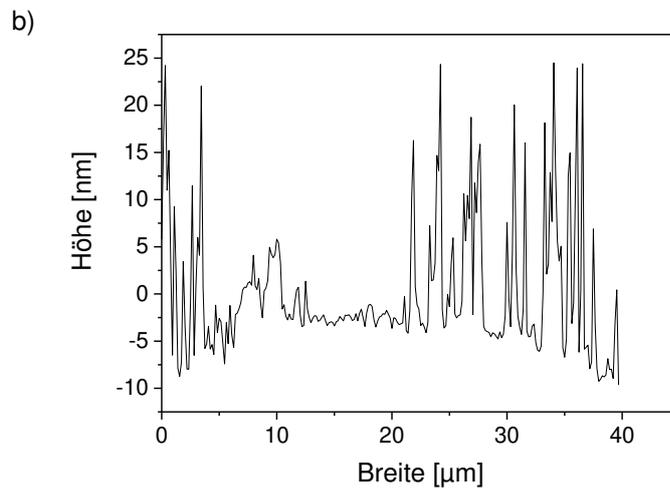
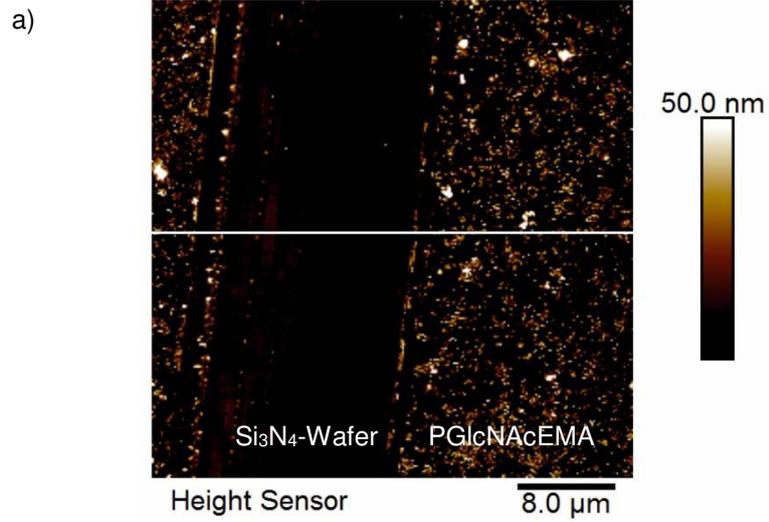


Abbildung 30: a) SFM-Höhenbild des Si₃N₄-Wafers, Mitte ist der reine Si₃N₄-Wafer, die rechte Seite ist beschichtet mit Glykopolymer PGLcNAcEMA, b) Höhenprofil der polymerbeschichteten Oberfläche. Die weiße Linie im Höhenbild (a) gibt an, an welcher Stelle das Höhenprofil aufgenommen wurde.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Bindung eines fluoreszenzmarkierten Lektins GS-II an das Glykopolymer PGlcNAcEMA untersucht (**Abbildung 31**). Das Lektin GS-II bindet spezifisch und selektiv an dem Glykan GlcNAc. Ein Signal sollte nur auf der glykopolymerbeschichteten Oberfläche zu erkennen sein. Nach der Inkubation mit GS-II wurde die Oberfläche gewaschen, um eine unspezifische Bindung des Lektins auszuschließen.

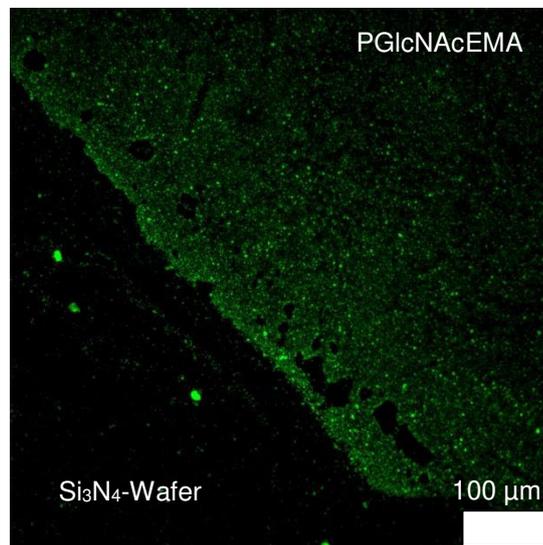


Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahme des Si₃N₄-Wafers, rechte Seite ist beschichtet mit dem Glykopolymer und Inkubiert mit GS-II, die linke Seite ist die reine Si₃N₄-Oberfläche.

In Abbildung 31 ist die Fluoreszenzaufnahme gezeigt. Nur die mit dem Glykopolymer PGlcNAcEMA beschichtete Seite, zeigt eine deutliche Fluoreszenz. Daraus folgt, dass das Glykopolymer von dem fluoreszenzmarkiertem Lektin GS-II gebunden wird. Die andere Seite der Oberfläche zeigt keine Fluoreszenz, da sich hier die saubere, unbeschichtete Si₃N₄-Oberfläche befindet. Die Analytik zeigte eine erfolgreiche Funktionalisierung der Si₃N₄-Oberfläche mit einem Glykopolymer PGlcNAcEMA. Die Si₃N₄-Oberfläche konnte mit dem Polymer über „*Grafting from*“ funktionalisiert werden. Der Mikroring-Resonator besteht ebenfalls aus einer Si₃N₄-Oberfläche und wurde mit der gleichen Methode mit dem Glykopolymer PGlcNAcEMA funktionalisiert. Über den Mikroring-Resonator wurde die Bindung der Lektine GS-II und ECL auf der funktionalisierten Oberfläche analysiert. Dafür wurde ein Tropfen der Lektinlösung mit 20 µg/mL Lektin auf den beschichteten Mikroring-Resonator getropft. Hieraus resultiert ein einfaches und schnelles Messprinzip. Die Verschiebung der Resonanz der Wellenlänge wurde in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Drei Messungen wurden durchgeführt. Einmal wurde die Bindung des GlcNAc bindenden Lektins GS-II auf der Glykopolymeroberfläche analysiert. Außerdem wurde als Referenz ein unbehandelter Mikroring-Resonator verglichen und es wurde die Bindung eines nicht bindenden Lektins ECL an das Glykan GlcNAc auf der Glykopolymeroberfläche analysiert.

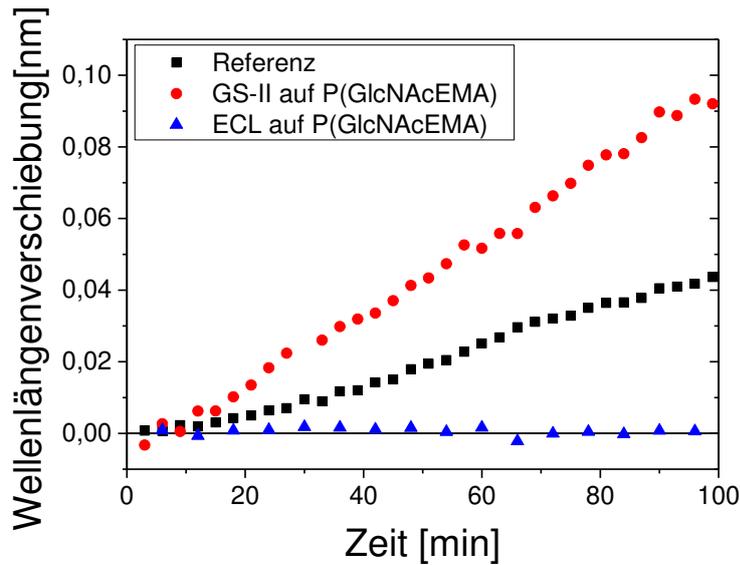


Abbildung 32: Mikroring-Resonator-Messungen, Verschiebung der Wellenlänge in Abhängigkeit von der Zeit; schwarz) Referenzring, Bindung von GS-II auf unbeschichteter Oberfläche; rot) Bindung von GS-II auf Mikroring-Resonator mit PGlcNAcEMA beschichtet; blau) Bindung von ECL auf Mikroring-Resonator mit PGlcNAcEMA beschichtet.

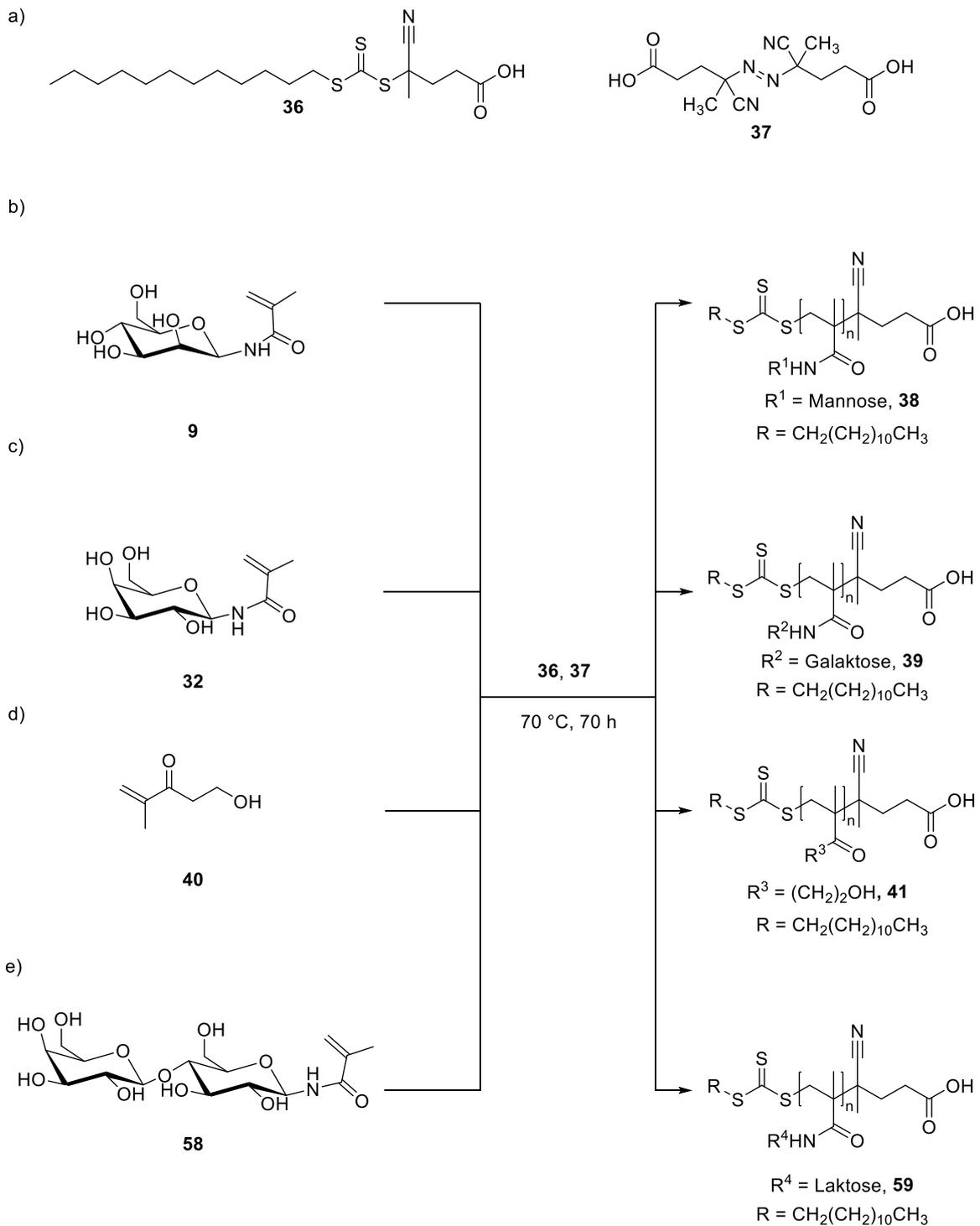
In Abbildung 32 sind die drei Messungen der Verschiebung der Wellenlänge in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Das Lektin GS-II zeigt eine stärkere Bindung auf der mit glykopolymerbeschichteten Oberfläche als auf dem Referenzring. Auf dem Referenzring wurde die Bindung des Lektins GS-II auf einem nicht funktionalisierten Mikroring-Resonator gemessen. Hier wurde eine unspezifische Bindung von GS-II zum unfunktionalisierten Mikroring-Resonator beobachtet. Da das System so einfach wie möglich gehalten wurde, wurden keine weiteren Waschschrte mit Pufferlösung oder Blockschrte mit BSA, als Unterdrückung der unspezifischen Lektinbindung, angewandt. Die unspezifische Bindung des GS-II auf dem reinen Mikroring-Resonator muss abgezogen werden. Lektine zeigen eine hohe unspezifische Adsorption auf Oberflächen insbesondere da die Oberfläche nach Lektinapplikation nicht gewaschen wurde. Dafür wurde die Bindung des Lektins ECL als nicht bindendes Lektin auf der mit PGlcNAcEMA funktionalisierten Oberfläche analysiert. Es wurde ein Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung festgestellt. Wie in Abbildung 30 zu erkennen ist, wurde kein Signal mit dem Lektin ECL auf der Glykopolymeroberfläche detektiert. Dieses Ergebnis beweist einerseits die geringe unspezifische Bindung von Lektinen auf Glykopolymeroberflächen und belegt andererseits die spezifische Glykan-Wechselwirkung des GS-II zu dem Glykopolymer. Die Messzeit für die Detektion betrug 100 s. Auch kürzere Messzeiten wären für die Detektion der Unterschiede in den Lektinbindungen möglich. Längere Messzeiten von über 150 s bewirken eine Abnahme des Signals, da die Pufferlösung verdampft. Daher wurden für eine einfache und schnelle Messung, ohne Messzelle oder Mikrofluidik, kurze Messzeiten genutzt. Die Messungen von glykopolymerbeschichteten Mikroring-Resonatoren geben Ja oder Nein Antworten für eine Lektinbindung mit einem einfachen Messaufbau. Die Messungen wurden mit einer Lektinkonzentration von 20 µg/mL durchgeführt und es wurde mit einer Messzeit von 3 min deutliche Signale erhalten. Im Vergleich zu der Referenz mit dem nicht bindenden Lektin ECL konnte die Lektinkonzentration um das 5-fache gesenkt werden und es wurde dennoch eine ausreichende Signalintensität erhalten. Das

Ergebnis biete die Möglichkeit, Lektine mit einer Konzentration im nM Bereich zu analysieren. Im Gegensatz hierzu wird in Publikationen oft ein kleiner Ringresonator mit kleinem Ringdurchmesser verwendet, bei denen komplexe und teure Lasersysteme für die Messung genutzt werden.^[26] Das hier verwendete System nutzt Wellenlängen um 1550 nm, dies ermöglicht die Nutzung von kostengünstigen und optoelektronischen Komponenten als Laser und Detektor, die auch als Standard in der Telekommunikation eingesetzt werden. Somit wird eine schnelle und kostengünstige Analysemethode von Proteinbindungsverhalten erreicht.

Eine einfache und kurze Analyse für eine Lektinbindung an Glykopolymeren wurde gezeigt. Über den optischen Mikroring-Resonator, der mit Glykopolymeren beschichtet wurde, konnte eine Lektinbindung über einen Tropf-Test in nur 3 min analysiert werden. In Zukunft könnte dieses System für eine einfache und schnelle Analyse in der Lektindiagnostik eingesetzt werden. Besonders um schnell zu erkennen, ob ein Lektin vorhanden ist oder nicht. Das System könnte mit einer Mikrofluidik ausgestattet werden, damit kinetische Analysen oder weitere Messungen durchgeführt werden könnten. Das System sollte mit anderen Glykanliganden und mit Lektinen, die medizinisch interessant sind, getestet werden.

6.5. Glykopolymere über „*Grafting to*“ auf Goldoberflächen zur Anwendung in SPR-Messungen

Die Homopolymere, die über RAFT synthetisiert (**Kapitel 4**) wurden, wurden für die Beschichtung von Goldoberflächen verwendet. Die Homopolymere PManAMA **38**, PGalAMA **39**, PLacAMA **59** (zur Verfügung gestellt von Jo Sing Julia Tang, M. Sc.) und PHEMA **41** wurden mit dem CTA 4-Cyan-4-(thiobenzoylthio)-pentansäure **36** synthetisiert (**Schema 22**). Über den CTA, der eine Trithio-Gruppe besitzt, wurden die Polymere **38**, **39**, **59** und **41** über „*Grafting to*“ an die Goldoberfläche gebunden.



Schema 22: a) CTA (36) und Initiator ABCVA (37) für die RAFT-Polymerisation; b) RAFT-Polymerisation von ManAMA (38), c) RAFT-Polymerisation von GalAMA (39), d) RAFT-Polymerisation von PHEMA (41), e) RAFT-Polymerisation von LacAMA (59).

Die Goldoberflächen wurden für 24 h in eine Lösung eingelegt, in der 5 % des Polymers in einer Mischung aus Wasser und Ethanol gelöst war. Danach wurden die Oberflächen gewaschen und analysiert. SFM-Messungen der PHEMA- 41 und PManAMA-38-beschichteten Goldoberflächen wurden zur Untersuchung der Oberflächenstruktur durchgeführt. Die SFM-Messungen wurden einmal

im trocknen Zustand und für die Entknäuelung des Polymers im nassen Zustand aufgenommen. Des Weiteren wurde die Polymerschichtdicke über die Kante einer Vertiefung bestimmt.

In Abbildung 33 sind die SFM-Aufnahmen des Homopolymers PHEMA auf der Goldoberfläche abgebildet. In beiden Höhenbildern im trockenen Zustand **33a** und im nassen Zustand **33c** ist eine homogene Schicht von kleinen, helleren Punkten zuerkennen. Auch in den 3D-Aufnahmen **33b** und **33d** sind Höhenunterschiede einzelner Signale sichtbar. Das zeigt, dass das Homopolymer PHEMA auf der Oberfläche gebunden ist und Polymerbürsten entstanden sind.

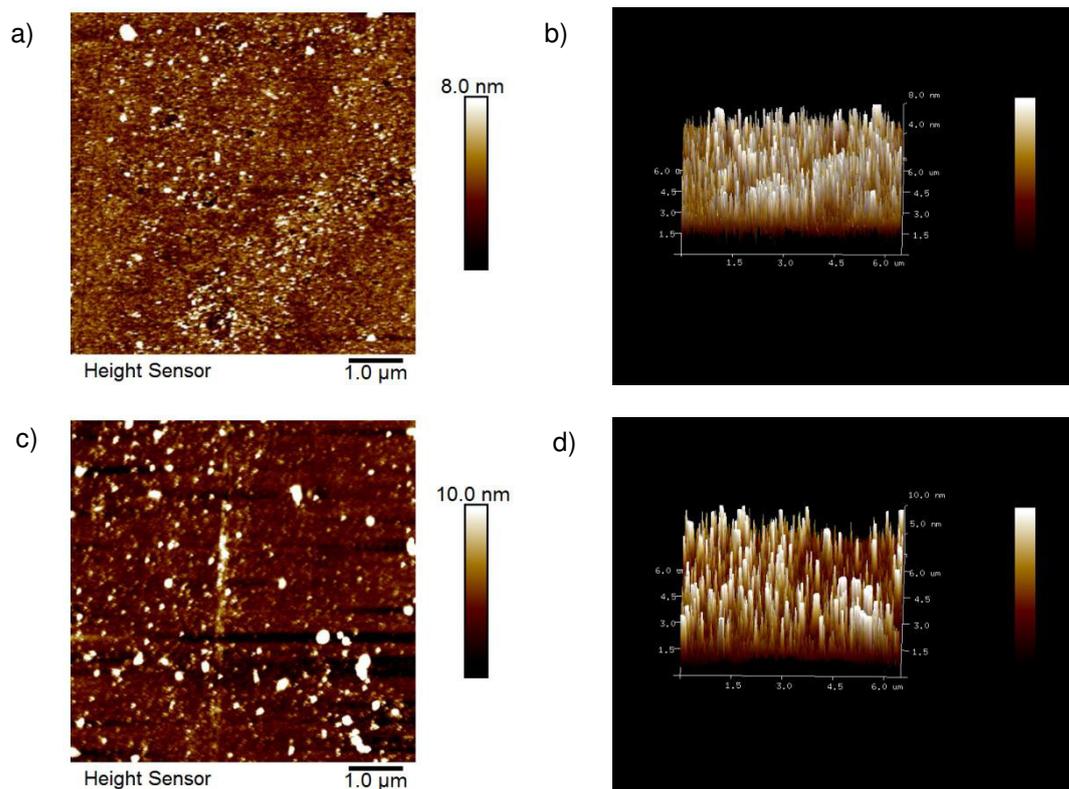


Abbildung 33: SFM-Aufnahmen, PHEMA (41) auf der Goldoberfläche; a) Höhenbild im trockenem; b) 3D-Bild im trockenem; c) Höhenbild in Wasser; d) 3D-Bild in Wasser. Ein Höhenprofil für die mit PHEMA-beschichtete Goldoberfläche für den trockenen und nassen Zustand ist im Anhang (Abb.86, 87) dargestellt.

In Aufnahme **33a** ist ein Höhenunterschied von 8,0 nm und in Aufnahme **33c** ein Höhenunterschied von 10,0 nm der Polymerschicht zu erkennen. Im nassen Zustand quellen die Polymerbürsten auf und strecken sich, dadurch sind sie nicht mehr dicht an der Oberfläche verknäuel. Somit ist der Höhenunterschied der Polymerschicht im nassen Zustand dicker als im trockenem. Um die Polymerschichtdicke zu bestimmen wurde die Polymerschicht im trockenem Zustand eingeritzt und der Höhenunterschied gemessen. In Abbildung 34 ist das SFM-Höhenbild und Höhenprofil abgebildet. Die Vertiefung der Polymerschicht konnte über eine Kante bestimmt werden und es wurde eine Dicke von 36 nm der PHEMA-Schicht bestimmt.

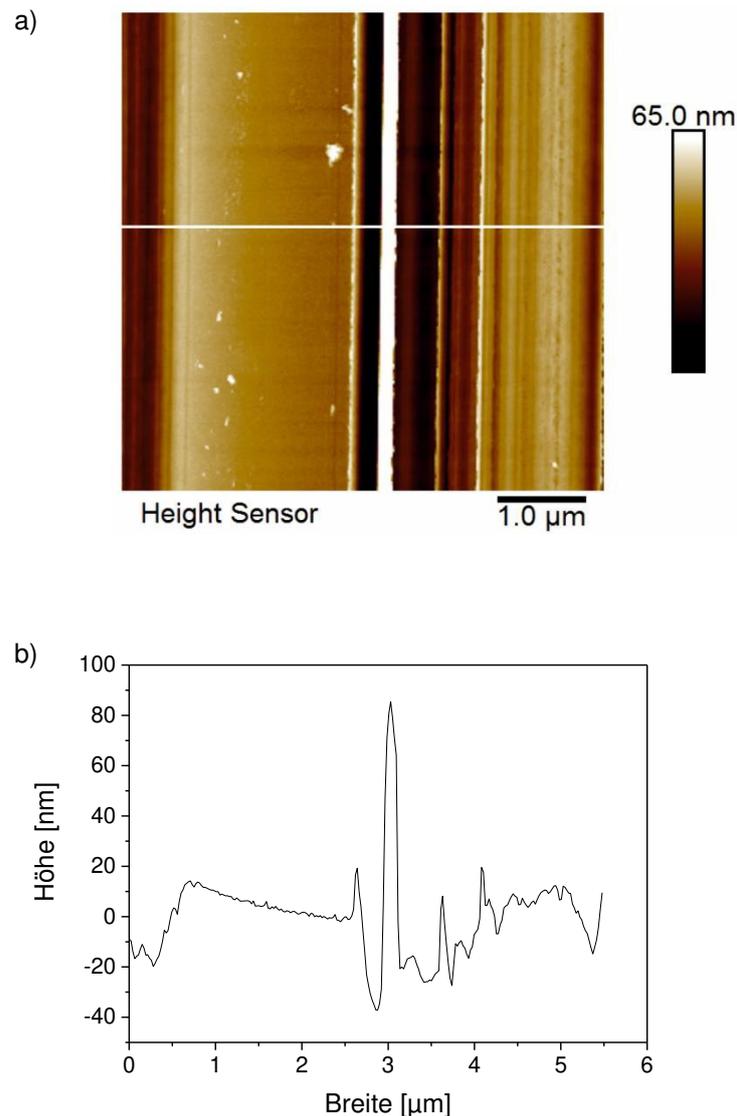


Abbildung 34: a) SFM-Höhenbild des Kratzers in der Polymerschicht von PHEMA (41), b) Höhenprofil der PHEMA-beschichteten Oberfläche. Die weiße Linie im Höhenbild (a) gibt an, an welcher Stelle das Höhenprofil aufgenommen wurde.

Die SFM-Aufnahmen des Homopolymers PManAMA **38** auf der Goldoberfläche sind in Abbildung 35 abgebildet. In **35a** und **35b** sind die Aufnahmen in trockenem Zustand und in **35c** und **35d** sind die Aufnahmen im nassen Zustand abgebildet. In beiden Höhenbildern ist eine homogene Schicht von kleinen, helleren Punkten zuerkennen. Auch in den 3D-Aufnahmen sind Höhenunterschiede einzelner Signale zu erkennen. In der Aufnahme **35a** im trockenem Zustand ist ein Höhenunterschied von 7,0 nm und in der Aufnahme **35c** ein Höhenunterschied von 12,0 nm der Polymerschicht zu erkennen. Die Polymerschicht ist im nassen Zustand dicker als im trockenem Zustand. Der Grund für die dickere Schicht ist das Aufquellen der nassen Polymerbürsten.

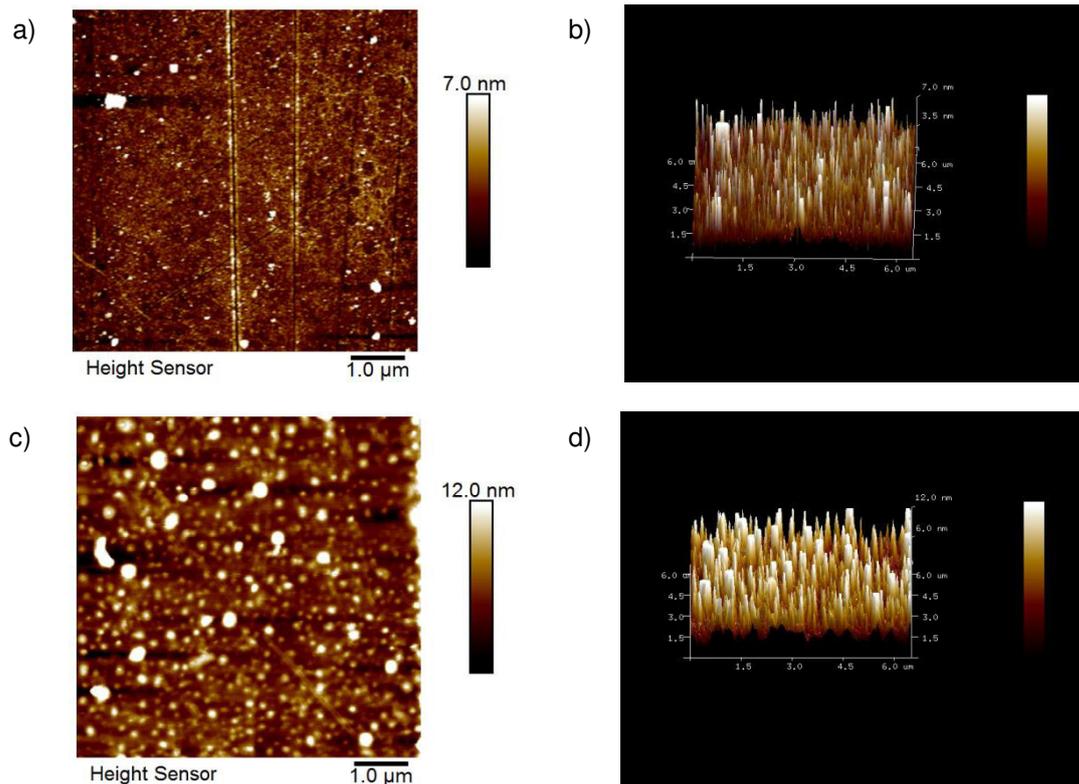


Abbildung 35: SFM-Aufnahmen, PManAMA (**38**) auf der Goldoberfläche; a) Höhenbild im trockenem; b) 3D-Bild im trockenem; c) Höhenbild in Wasser; d) 3D-Bild in Wasser. Ein Höhenprofil für die mit PManAMA-beschichtete Goldoberfläche für den trockenem und nassen Zustand ist im Anhang (Abb.88, 89) dargestellt.

Die Polymerschichtdicke wurde über den Höhenunterschied eines Kratzers in der Polymerschicht im trockenem Zustand bestimmt (**Abbildung 36**). In Abbildung 36 ist das SFM-Höhenbild und Höhenprofil der Vertiefung in die Polymerschicht abgebildet, wobei über die Kante eine Dicke von 41 nm der PManAMA-Schicht bestimmt werden konnte.

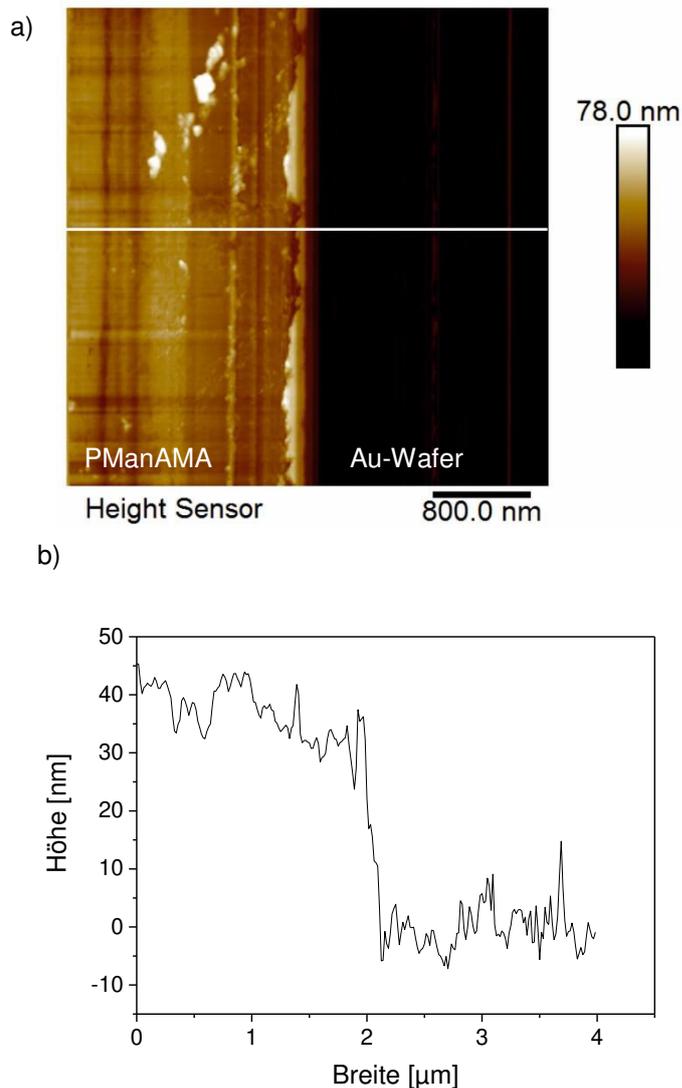


Abbildung 36: a) SFM-Höhenbild des Kratzers in der Polymerschicht von PManAMA (38), b) Höhenprofil der polymerbeschichteten Oberfläche. Die weiße Linie im Höhenbild (a) gibt an, an welcher Stelle das Höhenprofil aufgenommen wurde.

Die Homopolymere binden über den CTA und dessen Trithio-Gruppe ohne weitere Modifikation an der Goldoberfläche. Hierbei wurden dickere Schichtdicken als über eine SI-ATRP-Reaktion erreicht. Die Homopolymere, die über RAFT-Polymerisation synthetisiert wurden, konnten einfach und schnell an der Goldoberfläche gebunden werden.

Die Glykopolymere PManAMA 38, PGalAMA 39, PLacAMA 59 (hergestellt von Jo Sing Julia Tang, M. Sc., $M_w = 25865$ g/mol, $M_n = 13118$ g/mol, $\bar{D} = 1.97$, $P_n = 32$) und das Polymer PHEMA 41, die über RAFT synthetisiert wurden, wurden für die SPR-Messungen verwendet. Dafür wurden die Polymere auf einem Gold-Sensorchip immobilisiert. Die SPR-Messungen wurden von Dr. Sophia Rosencrantz durchgeführt. Nach der Funktionalisierung der Goldoberfläche mit den Polymeren war ein Anstieg des SPR-Signals erkennbar. Daraus lässt sich schließen, dass die Polymere auf der Oberfläche binden. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls mit den oben gezeigten SFM-Aufnahmen belegt.

Für die ersten Bindungsanalysen wurde das humane Lektin Galektin-3 in verschiedenen Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 μM) mit einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ über die

Oberfläche geleitet. In Abbildung 37 sind die gemittelten absoluten SPR-Signale für die polymerbeschichteten Gold-Sensorchips gegen die unterschiedlichen Galektin-3-Konzentrationen dargestellt. Die Polymere PManAMA und PHEMA sollten keine Bindung zu Galektin-3 zeigen.^[28] Das Diagramm zeigt kaum Bindung des Galektin-3 auf dem Gold-Sensorchips, die mit PManAMA und PHEMA beschichtet wurden. Lediglich ab einer Konzentration von 2,5 mM bis 10 mM steigt das SPR-Signal an. Der Anstieg könnte durch unspezifische Bindung des Galektin-3 auf der Oberfläche hervorgerufen werden. Die beiden Polymere können als Referenz zu den bindenden Glykopolymeren PGalAMA und PLacAMA genutzt werden. Zum besseren Vergleich wird in späteren Messungen das Glykopolymer PManAMA als Referenz genutzt.

Galektin-3 sollte spezifisch an Galaktose binden, bindet aber am besten an Laktose oder *N*-Acetyl-D-Laktoseamin.^[29-30] Aus diesem Grund wurde das Bindeverhalten auf beschichteten Gold-Sensorchips mit PGalAMA und PLacAMA untersucht. In Abbildung 35 ist zu erkennen, dass mit steigenden Galektin-3-Konzentrationen das SPR-Signal für PGalAMA und PLacAMA steigt. Je größer das SPR-Signal ist, desto stärker ist die Bindung des Lektins auf der Oberfläche. Für die polymerbeschichtete Oberfläche mit PGalAMA ist das SPR-Signal gegenüber der beschichteten Oberfläche mit PManAMA und PHEMA nur leicht erhöht. Auf PManAMA und PHEMA sollte Galektin-3 nicht binden. Die Signale werden durch unspezifische Bindung des Galektin-3 auf der Oberfläche hervorgerufen. Diese unspezifische Bindung steigt auch mit Erhöhung der Lektinkonzentration. Aus diesem Grund kann für die PGalAMA-Oberfläche keine deutliche spezifische Bindung des Galektin-3 detektiert werden, da eine unspezifische Bindung des Galektin-3 auf der Oberfläche möglich ist und somit das detektierte SPR-Signal zu klein ist. Das SPR-Signal für die PLacAMA-beschichtete Oberfläche steigt mit zunehmender Konzentration stark an. Hier wird eine spezifische Bindung des Galektin-3 an Laktose erkannt. Galektin-3 bindet spezifisch an Galaktose.^{[29][31]} Sowohl die Polymere PGalAMA als auch PLacAMA besitzen Galaktose als endständigen Zucker, der zugänglich für Galektin-3 ist. Galektin-3 besitzt eine große Bindetasche, in der am besten Tetrasaccharide binden.^[29] Aus diesem Grund könnte die Bindung für PLacAMA deutlich stärker sein als für PGalAMA.

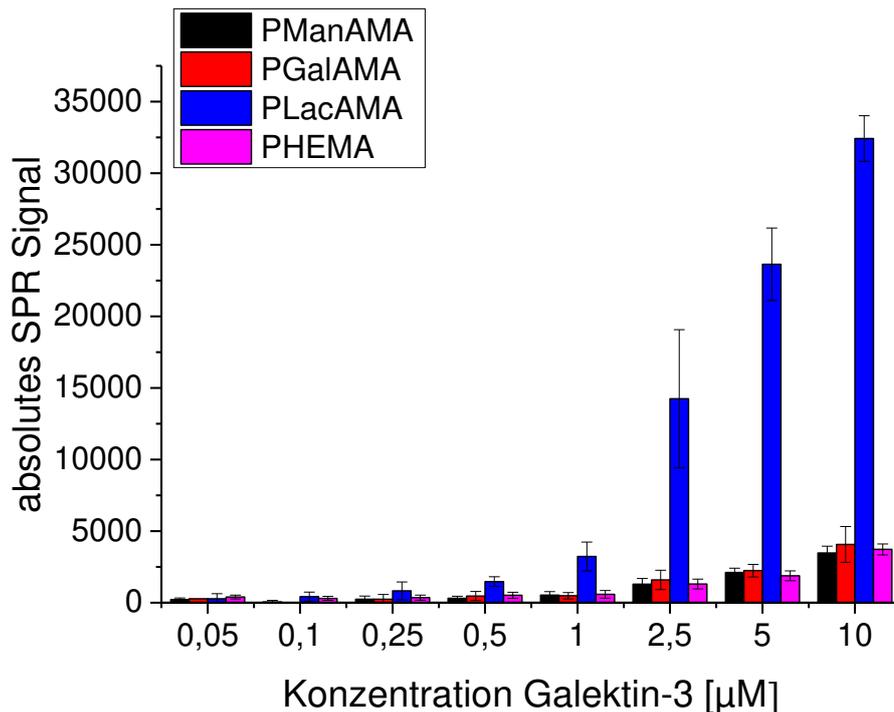


Abbildung 37: SPR-Messung der polymerbeschichteten Gold-Sensorchips mit unterschiedlichen Galektin-3-Konzentrationen. Angegeben ist auf der y-Achse das gemittelte absolute SPR-Signal nach mind. 2 Messungen. Die x-Achse zeigt die unterschiedlichen Galektin-3-Konzentrationen, bei denen das Bindungsverhalten analysiert wurde.

Die zweite SPR-Messung wurde mit PGalAMA und PLacAMA jeweils gegen die Referenz PManAMA durchgeführt. Zur Bindungsanalyse wurde das Lektin ECL genutzt. In Abbildung 38 ist das SPR-Diagramm dargestellt. Das absolute SPR-Signal für PGalAMA und PLacAMA abzüglich des Signals der Referenz PManAMA ist gegen unterschiedliche ECL-Konzentrationen (1; 5; 10; 20; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aufgetragen. Zu erkennen ist, dass mit steigender ECL-Konzentration, für beide Polymere auch das SPR-Signal steigt. Je größer das SPR-Signal ist, desto höher ist auch die Bindung des Lektins auf der Oberfläche. Für PGalAMA ist nur ein leichter Anstieg des SPR-Signals mit der ECL-Konzentration zu erkennen. Hier kann keine deutliche spezifische Bindung des ECL an Galaktose detektiert werden. Die unspezifische Bindung des ECLs auf der Oberfläche wird durch den Abzug der Referenz vernachlässigbar, jedoch ist das detektierte SPR-Signal schwach. ECL bindet nur schwach an PGalAMA. Im Gegensatz zu PGalAMA steigt das SPR-Signal für PLacAMA mit steigender ECL-Konzentration stark an. Auch hier wurde die Referenz PManAMA abgezogen, sodass die unspezifische Bindung vernachlässigbar ist. Auf dem PLacAMA Polymer ist eine spezifische Bindung von ECL an Laktose zu detektieren. ECL bindet spezifisch an Galaktose.^[32] Jedoch bindet ECL stärker an Fucosyllaktose und Fucosyllaktosamin als an Galaktose oder Laktose. Fucosyllaktose und Fucosyllaktosamin sind Trisaccharide, dementsprechend bindet ECL ebenso wie Galektin-3 stärker an größere Zucker.^[32] PGalAMA und PLacAMA besitzen Galaktose als endständigen Zucker, so sollte ECL an beiden Polymeren binden. Außerdem ist die Galaktose beim PLacAMA in einem Disaccharide enthalten, so wird sie stärker vom ECL gebunden. Aufgrund dessen ist die höhere SPR-Signalstärke für PLacAMA als für PGalAMA erklärbar.

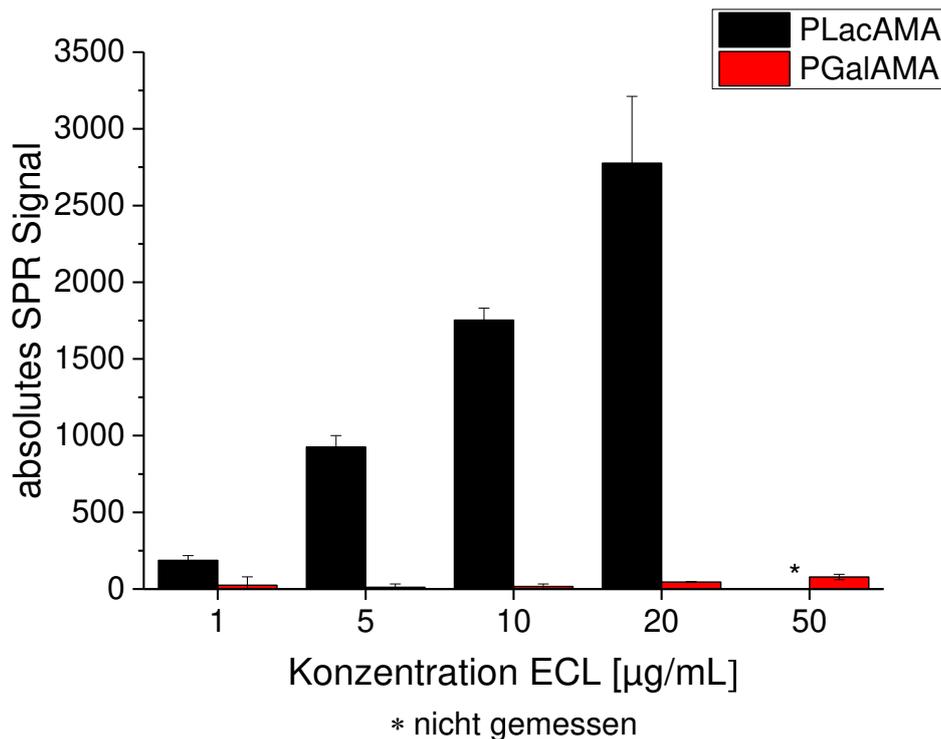


Abbildung 38: SPR-Messung der polymerbeschichteten Gold-Sensorchips mit unterschiedlichen ECL-Konzentrationen. Angegeben ist auf der y-Achse das gemittelte absolute SPR-Signal nach mind. 2 Messungen, mit Abzug des Referenzsignals von PManAMA. Die x-Achse zeigt die unterschiedlichen ECL-Konzentrationen, bei denen das Bindungsverhalten analysiert wurde.

Weitere Gründe für das stärkere SPR-Signal für PLacAMA sind zum einen, dass die Galaktose für die Lektine schlechter zugänglich ist. Bei PGalAMA sind die Zuckermoleküle eng an den Polymerbürsten gebunden. Hier wird nur ein Monosaccharid ohne Spacer in die Polymere eingebaut, aus dem Grund werden die Lektine an der Bindung sterisch gehindert. Zum anderen könnte die Unterschiedlichkeit der Polymere, ein weiterer Grund für das stärkere SPR-Signal sein. Für PGalAMA wurde eine $M_w = 152127 \text{ g/mol}$, $M_n = 811 \text{ g/mol}$ mit $\bar{D} = 187,58$ und $P_n = 3-61$ und für PLacAMA eine $M_w = 25865 \text{ g/mol}$, $M_n = 13118 \text{ g/mol}$ mit $\bar{D} = 1.97$ und $P_n = 32$ gefunden. Das Polymer PGalAMA hat eine breite Dispersität und einen großen Polymerisationsgrad von 3-61, wohingegen das Polymer PLacAMA eine enge Dispersität und einen Polymerisationsgrad von 32 besitzt. Diese Unterschiede können die Bindung der Lektine beeinflussen, da für PGalAMA nicht die genaue Anzahl an Glykanen in den Polymerbürsten auf der Oberfläche bekannt ist. Hier variiert die Größe der Polymerbürsten auf der Oberfläche. Ein weiterer Grund des verschiedenen Bindungsverhaltens für Galektin-3 oder ECL an PGalAMA und PLacAMA ist die Inkubation des Gold-Sensorchips mit den Polymeren. Die Glykopolymere wurden über Nacht auf den Sensorchip inkubiert. Jedoch konnte durch die SFM-Messungen und das ansteigende SPR-Signal analysiert werden, dass die Polymere an der Oberfläche binden. Die Dichte der Polymerbürsten auf der Oberfläche wurde nicht analysiert.

Smith *et al.* untersuchten die Glykan-Protein-Wechselwirkung über SPR.^[25] Sie inkubierten α -Mannose und α -Galaktose Derivate auf Goldoberflächen und analysierten die Bindung zu ConA und Jacalin. Für beide Glykane erhielten sie eine Dissoziationskonstante, so konnten sie die Glykan-Protein-Wechselwirkung nachweisen. In dieser Arbeit wurde eine Wechselwirkung zwischen

Galektin-3/ECL und PGalAMA/PLacAMA beobachtet. Jedoch war das Bindesignal für PGalAMA sehr schwach. Park *et al.* berichteten, dass ein höheres Bindesignal mit einer längeren Glykankette erreicht wurde.^[20] So stellten sie da, dass ECL am besten an Di-, Tetra- oder Hexasacchariden bindet. Die diskutierten Ergebnisse zeigen diesen Trend ebenfalls auf. Würde die Glykankette verlängert, könnte ein höheres Bindesignal erhalten werden. Die Experimente sollten mit Tri- oder Tetrasacchariden durchgeführt werden, um eine genaue Aussage über das Bindeverhalten treffen zu können. Außerdem könnten andere Glykan-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden. So könnte die Wechselwirkung von *N*-Acetyl-D-laktosamin mit Galektin-3^[28] oder Fucosyllaktose mit ECL^[32] getestet werden, um ein höheres Bindesignal zu erhalten.

Die Lektinbindung von Galektin-3 und ECL wurde zu den Polymeren PHEMA, PManAMA, PGalAMA und PLacAMA über SPR untersucht. Für die Polymere PManAMA und PHEMA konnte keine spezifische Bindung zu Galektin-3 oder ECL detektiert werden. Für PGalAMA ist nur eine schwache Bindung für beide Lektine zu erkennen, die auch durch eine unspezifische Adsorption hervorgerufen werden kann. Im Gegensatz dazu wurde für PLacAMA ein starkes Bindesignal von Galektin-3 und ECL detektiert. Dieses Signal steigt mit Zunahme der Lektinkonzentration. Hier liegt eine spezifische Bindung von Galektin-3 und ECL zu dem Glykan Laktose vor.

6.6. Zusammenfassung

Die Glykopolymere konnten über „*Grafting from*“ und „*Grafting to*“ auf verschiedene Oberflächen gebunden werden. Über die „*Grafting from*“ Methode wurden Silizium- und Goldoberflächen mit PHEMA, PGlcNAcEMA und PLacAEMA funktionalisiert. Dafür wurde zuerst ein Monolayer des Initiators auf die Oberfläche aufgetragen und anschließend über SI-ATRP die jeweiligen Monomere polymerisiert. Das gebundene Polymer wurde über XPS-, Kontaktwinkel- und SFM-Messungen charakterisiert. Das gebundene PGlcNAcEMA wurde über ein fluoreszenzmarkiertes Lektin GS-II auf der Oberfläche nachgewiesen. Auf der Goldoberfläche konnten Polymerschichtdicken von bis zu 40 nm erreicht werden. Um eine Negativkontrolle zu erhalten, wurde der Initiator über einen Stempelprozess auf die Oberfläche aufgebracht. Dieser Stempelprozess wurde optimiert und eine Methode mit 1 h Einlegezeit, 3 min Inkubation und 30 s Stempelzeit herausgestellt. Der Stempelprozess wurde angewendet um Mikroring-Resonatoren mit Polymeren zu funktionalisieren. Das Glykopolymer PGlcNAcEMA wurde auf der Oberfläche gebunden und spektroskopischen Messungen, Mikroring-Resonator-Messungen, durchgeführt. Eine Lektinbindung von GS-II auf dem Glykopolymer PGlcNAcEMA und auf der Referenz konnte beobachtet werden. Bei der Referenz traten unspezifische Bindungen des Lektins auf der Oberfläche auf. Diese Bindungen sind für Lektine charakteristisch, da sie eine hohe unspezifische Adsorption auf Oberflächen zeigen. Die Bindung des Lektins ECL auf der PGlcNAcEMA Oberfläche wurde gemessen. Hier konnte keine Bindung detektiert werden. Das Glykan GlcNAc wird nicht von dem Lektin ECL gebunden. Über den Mikroring-Resonator können mit einem einfachen Aufbau Ja oder Nein Antworten über die Bindung von Lektinen zu Glykopolymeren erhalten werden. Dieses System könnte zukünftig in der medizinischen Analytik eingesetzt werden.

Die Glykopolymere PManAMA, PGalAMA, PLacAMA und PHEMA wurden über „*Grafting to*“ auf Goldoberflächen gebracht. Die Oberflächen mit PManAMA und PHEMA wurden mit SFM-Messungen im nassen und trockenen Zustand charakterisiert. Im nassen Zustand war die Polymerschicht dicker als im trockenen Zustand. Die Polymere verändern im nassen Milieu ihre Morphologie quellen auf und strecken sich. Somit wird ein Höhenunterschied der Polymerschicht im nassen und im trockenen Zustand erreicht. Über „*Grafting to*“ wurden Polymerschichten für PHEMA von 36 nm und für PManAMA von 40 nm bestimmt. Die Lektinbindung von Galektin-3 und ECL wurde zu den Polymeren PHEMA, PManAMA, PGalAMA und PLacAMA über SPR untersucht. Für die Polymere PManAMA und PHEMA konnte keine spezifische Bindung zu Galektin-3 und ECL detektiert werden. Sie wurden in den weiteren Messungen als Standard eingesetzt. Für PGalAMA konnte sowohl für Galektin-3 als auch für ECL nur eine schwache Bindung detektiert werden. Hier konnte keine klare spezifische Bindung erkannt werden, da die Signale auch durch unspezifische Adsorption hervorgerufen werden könnten. Für PLacAMA war für beide Lektine Galektin-3 und ECL eine spezifische Bindung zu erkennen.

6.7. Experimenteller Teil

6.7.1. Glykopolymere auf Oberflächen

Für die Polymerisation auf den Oberflächen wurden für „*Grafting from*“ und „*Grafting to*“ die Monomere aus Kapitel 3 verwendet.

6.7.1.1. Polymerbürsten auf Oberflächen über „*Grafting from*“

6.7.1.1.1. Anbindung der Initiatoren auf den Oberflächen

6.7.1.1.1.1. Aufbringen des Initiators auf Siliziumoberflächen/Si₃N₄-Oberflächen

Die Reaktion ist für Si- und Si₃N₄-Oberflächen identisch. Die Si-Oberflächen wurden in 1 x 1 cm² große Stücke geschnitten und mit einem Snow-Jet gereinigt. Die Oberflächen wurden 5 min in Luftplasma (0,2 mbar) oxidiert. Die Oberflächen wurden in eine Lösung aus 3-(Trimethoxysilylpropyl)-2-bromo-2-methylpropionat **51** (TMSPBMP, 200 µL), Ammoniak (29 %, 2,10 mL) und Ethanol (25,0 mL) eingelegt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Oberflächen wurden mit Ethanol und Milli-Q Wasser gewaschen und unter Stickstoffstrom getrocknet. Eine mit Initiator-beschichtete Oberfläche **52** wurde erhalten.

6.7.1.1.1.2. Aufbringen des Initiators auf Goldoberflächen

Die Goldoberflächen wurden mit Isopropanol, Ethanol und Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Oberfläche wurde in eine Lösung aus Bis[2-(2'-bromoisobutyryloxy)ethyl]disulfid **55** (BisBIBED, 6,12 µL, 0,020 mmol) und Ethanol (10,0 mL) bei Raumtemperatur über Nacht eingelegt. Die mit Initiator-beschichtete Oberfläche wurde mit Ethanol und Hexan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Eine mit Initiator-beschichtete Oberfläche **56** wurde erhalten.

6.7.1.1.1.3. Aufbringen des Initiators auf Oberflächen über einen Stempelprozess

PDMS wurde in Stücke geschnitten und mit Luftplasma (0,2 mbar, 5 min) aktiviert. Dann wurden die PDMS-Stempel in eine Lösung aus Ethanol (25,0 mL), Ammoniak (2,10 mL) und 3-(Trimethoxysilylpropyl)-2-bromo-2-methylpropionat (250 µL) für 1h eingelegt. Die Stempel wurden im Stickstoffstrom getrocknet und für 3 min mit einer Lösung aus Ethanol (2,28 mL), Ammoniak (0,24 mL) und 3-(Trimethoxysilylpropyl)-2-bromo-2-methylpropionat (120 µL) inkubiert. Die Stempel wurden im Stickstoffstrom getrocknet und auf eine frisch präparierte Oberfläche, die mit Luftplasma (0,2 mbar, 5 min) aktiviert wurde, für 30 s mit einem Gewicht von 15 g gestempelt. Die Oberfläche wurde mit Ethanol und Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Das Aufbringen des Initiators über den Stempelprozess wird für die Mikroring-Resonatoren angewendet. Eine mit Initiator-beschichtete Oberfläche wurde erhalten.

6.7.1.1.2. Polymerisation der Polymerbürsten auf die Oberflächen über „Grafting from“

Die Polymere/Glykopolymere wurden über eine SI-ATRP auf der Oberfläche gebracht. Die mit Initiator modifizierte Oberfläche wurde vorgelegt. Das Glykomonomer (1,1 g, 3,140 mmol) wurde in einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1/3:1, 10,00 mL) gelöst. CuCl (25,00 mg, 0,250 mmol), CuBr₂ (14,10 mg, 0,060 mmol) und 2,2'-Bipyridin (98,40 mg, 0,6300 mmol) wurden hinzugegeben und 20 min gerührt. Die Lösung wurde zu der Oberfläche transferiert. Ethyl- α -bromoisobutyrat **33** (9,300 μ L, 0,060 mmol) wurde in Methanol/Wasser (1:1, 1,000 mL) vorgelegt und zu der Lösung hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Die Oberfläche wurde mit Wasser und DMF gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Eine mit polymerbeschichtete Oberfläche **53** wurde erhalten.

6.7.1.1.3. Synthese von Glykopolymeren auf optischen Mikroring-Resonatoren

Die Polymere/Glykopolymere wurden über eine SI-ATRP auf die Oberfläche gebracht. Die mit Initiator-modifizierte Oberfläche wurde vorgelegt. GlcNAcEMA **4** (500 mg, 1,56 mmol), CuBr₂ (6,80 mg, 0,031 mmol), CuCl (12,0 mg, 0,125 mmol) und 2,2'-Bipyridin (48,8 mg, 0,312 mmol) wurden in einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1, 15,0 mL) gelöst. Die Lösung wurde zu der Oberfläche transferiert. Ethyl- α -bromoisobutyrate **35** als freier Initiator (4,57 μ L, 0,031 mmol) wurde hinzugefügt und die Reaktionslösung bei 0 °C für 16 h gerührt. Die Oberfläche wurde mit Ethanol und Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Der Mikroring-Resonator mit dem Glykopolymer funktionalisiert wurde erhalten und für weitere Messungen verwendet.

6.7.1.1.3.1. Bindungsanalyse für optische Mikroring-Resonatoren

Die Mikroring-Resonatoren wurden von dem Projektpartner Moritz Kleinert, M. Sc., am Heinrich-Hertz-Institut, Abteilung Photonische Komponenten zur Verfügung gestellt. Auch die Mikroring-Resonator-Messungen wurden am Heinrich-Hertz-Institut durchgeführt.

Für die Analyse der Bindung der Lektine an das Glykopolymer wurde der Mikroring-Resonator mit einer Puffer Lösung (PBS + CaCl₂) gewaschen. Zur Messung wurde ein Tropfen der Puffer Lösung (PBS + CaCl₂, 1980 μ L/1992 μ L) und Lektin (20 μ g/mL; GS II, 20 μ L oder ECL, 8 μ L) auf den Mikroring-Resonator getropft. Über 3 min wurde die Verschiebung der Resonanz der Wellenlänge gemessen.

Transversal elektrisches polarisiertes Licht von einem Yenista TUNICS T110R abstimmbarem Laser wurde über einem dünnen optischen Lichtleiter in den Wellenleiter eingespeist und koppelt mit dem Mikroring. Die Resonanzverschiebung der Wellenlänge wurde von einem zweiten dünnen optischen Lichtleiter gesammelt und mit einem Yenista CT400 optischer Komponente detektiert. Eine Wellenlänge zwischen 1500 nm und 1550 nm wurde benutzt und alle 3 Sekunden die Resonanzverschiebung detektiert. Die Resonanz der Wellenlänge wird als Funktion der Zeit aufgenommen.

6.7.1.2. Polymerbürsten auf Goldoberflächen über „Grafting to“

Um das Polymer über „Grafting to“ auf die Goldoberfläche zu bringen wurde die Polymer PHEMA **41** (30,0 mg, $7,13 \cdot 10^{-4}$ mmol) / PManAMA **38** (5,00 mg, 0,012 mmol) in Ethanol (10,0 mL) / Wasser (1,00 mL) gelöst. Die Goldoberfläche wurde in die Lösung gelegt und bei Raumtemperatur 24 h gerührt. Die Oberfläche wurde mit Ethanol und Wasser ab gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Eine polymerbeschichtete Oberfläche wurde erhalten, die für weitere Messungen verwendet wurde.

6.7.1.3. Biologische Untersuchungen über SPR-Messungen

Für die SPR-Messungen werden die Gold-Sensorchips (XanTec bioanalytics GmbH und Ssens bv) mit 2 mg/mL Glykopolymeren (PManAMA **38**/ PGalAMA **39**/ PLacAMA **59**) oder Polymer (PHEMA **41**) in Wasser/Ethanol inkubiert. Für die Bindungsversuche wurde Galektin-3 in EPBS Puffer und ECL in HEPES Puffer über den Sensorchip mit einer Flussrate von 25 μ L/min geleitet. Es wurden Lektinkonzentrationen von 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 und 5 μ M für Galektin-3 und 1; 5; 10; 20 und 50 μ g/mL für ECL untersucht. Die Lektinkonzentrationen wurden nacheinander injiziert, wobei mit der niedrigsten begonnen wurde. In der der SPR-Messung wurde die Lektinlösung erst über die Glykopolymerseite geleitet und anschließend über eine Referenz, die aus PManAMA oder PHEMA bestand. Jede Messung wurde zwei Mal wiederholt. Dabei betrug die Assoziationszeit 150 s und die Dissoziationszeit 200 s. Mit 20 mM HCl wurde die Goldoberfläche regeneriert.

6.8. Literatur

- [1] R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu, H.-A. Klok, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5437.
- [2] W.-L. Chen, R. Cordero, H. Tran, C. K. Ober, *Macromolecules* **2017**, *50*, 4089.
- [3] M. Stamm, *Polymer Surfaces and Interfaces*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2008**.
- [4] M. Stamm, S. Minko, *Chapter 11 Polymer surfaces and interfaces. Characterization, modification and applications*, Springer, Berlin, **2007**.
- [5] O. Azzaroni, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2012**, *50*, 3225.
- [6] I. Luzinov, S. Minko, V. V. Tsukruk, *Soft Matter* **2008**, *4*, 714.
- [7] B. Zdyrko, I. Luzinov, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 859.
- [8] A. R. Kuzmyn, A. de los Santos Pereira, O. Pop-Georgievski, M. Bruns, E. Brynda, C. Rodriguez-Emmenegger, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4124.
- [9] G. Masci, L. Giacomelli, V. Crescenzi, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 559.
- [10] D. Bontempo, N. Tirelli, G. Masci, V. Crescenzi, J. A. Hubbell, *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 417.
- [11] A. T. Nguyen, J. Baggerman, J. M. J. Paulusse, C. J. M. van Rijn, H. Zuilhof, *Langmuir* **2011**, *27*, 2587.
- [12] A. Arafat, M. Giesbers, M. Rosso, E. J. R. Sudhölter, K. Schroën, R. G. White, L. Yang, M. R. Linford, H. Zuilhof, *Langmuir* **2007**, *23*, 6233.
- [13] J. Gustavsson, G. Altankov, A. Errachid, J. Samitier, J. A. Planell, E. Engel, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2008**, *19*, 1839.
- [14] M. H. Lee, D. A. Brass, R. Morris, R. J. Composto, P. Ducheyne, *Biomaterials* **2005**, *26*, 1721.
- [15] Andres de los Santos Pereira.
- [16] T. Riedel, P. Májek, Z. Riedelová-Reicheltoová, M. Vorobii, M. Houska, C. Rodriguez-Emmenegger, *Anal. Methods* **2016**, *8*, 6415.
- [17] A. de los Santos Pereira, S. Sheikh, C. Blaszykowski, O. Pop-Georgievski, K. Fedorov, M. Thompson, C. Rodriguez-Emmenegger, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 1179.
- [18] T. T. Kursun, D. Cimen, T. Caykara, *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134*, 45238.
- [19] K. Yu, J. N. Kizhakkedathu, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3073.
- [20] H. Park, R. R. Rosencrantz, L. Elling, A. Böker, *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 45.
- [21] Y. Miura, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2007**, *45*, 5031.
- [22] D. Appelhans, J. Cladera, M. Rogers, B. Voit in *Polymer Chemistry Series* (Eds.: C. R. Becer, L. Hartmann), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 149–177.
- [23] A. Dondoni, A. Marra in *Polymer Chemistry Series* (Eds.: C. R. Becer, L. Hartmann), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 96–148.
- [24] R. R. Rosencrantz, V. H. Nguyen, H. Park, C. Schulte, A. Böker, U. Schnakenberg, L. Elling, *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 5633.
- [25] E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6140.
- [26] F. Ghasemi, E. S. Hosseini, X. Song, D. S. Gottfried, M. Chamanzar, M. Raeiszadeh, R. D. Cummings, A. A. Eftekhar, A. Adibi, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *80*, 682.
- [27] T. Ren, Z. Mao, J. Guo, C. Gao, *Langmuir* **2013**, *29*, 6386.
- [28] N. Ahmad, H.-J. Gabius, S. Sabesan, S. Oscarson, C. F. Brewer, *Glycobiology* **2004**, *14*, 817.
- [29] H. Leffler, S. Carlsson, M. Hedlund, Y. Qian, F. Poirier, *Glycoconjugate Journal* **2004**, *19*, 433.

- [30] S. R. Stowell, C. M. Arthur, P. Mehta, K. A. Slanina, O. Blixt, H. Leffler, D. F. Smith, R. D. Cummings, *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283*, 10109.
- [31] H. Halimi, A. Rigato, D. Byrne, G. Ferracci, C. Sebban-Kreuzer, L. ElAntak, F. Guerlesquin, *PloS one* **2014**, *9*, e111836.
- [32] K. Turton, R. Natesh, N. Thiyagarajan, J. A. Chaddock, K. R. Acharya, *Glycobiology* **2004**, *14*, 923.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Dissertation behandelt die Synthese und Anwendung von Glykopolymeren. Durch funktionalisierte Monomere mit verschiedenen Zuckern wie z.B. Mannose, Laktose, Galaktose und *N*-Acetyl-glukosamin wurden verschiedene Glykomonomere erhalten.

Um eine optimale Synthese in Bezug auf Effizienz, Sicherheit und Qualität zu erreichen, wurden verschiedene Synthesestrategien zur Glykomonomerherstellung evaluiert. Eine mikrowellenunterstützte Kochetkov-Aminierung konnte als optimierte Syntheseroute herausgestellt werden. Ebenfalls wurde eine Syntheseroute über reduktive Aminierung zur Verknüpfung von Disacchariden mit einer polymerisierbaren Gruppe entwickelt.

Aus den synthetisierten Glykomonomeren wurden Glykopolymere über ATRP-Reaktion und RAFT-Polymerisation polymerisiert. Die ATRP-Reaktionen von ManAMA und LacAEMA wurde mit *in situ* IR-Spektroskopie untersucht. Dabei wurden Erkenntnisse über das Polymerisationsverhalten verschiedener Glykan-modifizierter Monomere erhalten. Außerdem wurde ein kommerziell erhältliches Polymer nachträglich mit einer Glykaneinheit in einer polymeranalogen Umsetzung funktionalisiert.

Die synthetisierten Glykopolymere wurden als Block in Blockcopolymeren angewendet. Hier wurde die Selbstassemblierung der Blockcopolymeren in wässriger Lösung untersucht. Zwei verschiedene Blockcopolymeren PHEMA-*b*-PLacAEMA und PMMA-*b*-PManAMA wurden synthetisiert. Beide Polymere formten in wässriger Lösung Mizellen, bei denen sich der Zuckerblock an der Oberfläche der Mizellen befand. Die Selbstassemblierung wurde durch TEM- und Kryo-REM-Messungen gezeigt. Die PMMA-*b*-PManAMA-Mizellen wurden mit einem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff beladen, dadurch konnte die CMC der Mizellenbildung bestimmt werden.

Über spektroskopische Messmethoden wurde die Glykan-Protein-Wechselwirkung untersucht. Dafür wurden Glykopolymere über „*Grafting from*“ mit SI-ATRP oder über „*Grafting to*“ auf verschiedene Oberflächen gebunden. Durch XPS-, AFM- und Kontaktwinkelmessungen konnte die kovalente Bindung der Polymere auf den Oberflächen nachgewiesen. Die selektive Bindung der Glykane und Proteine wurde über ein fluoreszenzmarkiertes Lektin beobachtet. Mit SPR- und Mikroring-Resonator-Messungen wurde die spezifische und selektive Bindung der Lektine an die Glykopolymere nachgewiesen und die Bindungsstärke untersucht.

Eine Reihe von Glykopolymeren wurde hergestellt. Diese wurden in Mizellen als hydrophiler Block und für die Oberflächenfunktionalisierung eingesetzt. Die synthetisierten Polymere könnten durch Austausch der Glykaneinheit für andere Lektine adressierbar gemacht werden, was sie für andere Proteine zugänglich macht. So würden sie in biologischen Prozessen als Transporter für Medikamente oder Farbstoffe in den Körper dienen. Außerdem könnten die glykopolymerbeschichteten Oberflächen in der Diagnostik für die Erkennung von Lektinen eingesetzt werden. Die Glykane, die keine selektive und spezifische Bindung zu Proteinen eingehen, könnten als antiadsorptive Oberflächenbeschichtung wie z. B. in der Zellbiologie angewendet werden.

Conclusion and Outlook

The present doctoral thesis focuses on the synthesis and application of glycopolymers. To obtain different glycopolymers a variation of sugar moieties e.g. mannose, lactose, galactose and *N*-acetyl-glucoseamine were introduced into glycomonomers. Various synthesis strategies for the production of the glycomonomers were investigated. The aim was to find an efficient and cost-effective synthesis. A microwave-assisted Kochetkov amination was turned out to be the best synthetic strategy. Furthermore, a synthesis for linking disaccharides with a polymerizable group was highlighted. The glycomonomers were polymerized via ATRP and RAFT. A commercially available polymer was functionalized with a glycan group. The synthesis of polymers with a glycan unit on a large scale was achieved. The ATRP of ManAMA and LacAEMA were investigated with *in situ* IR spectroscopy. This opportunity gave the chance of monitoring the polymerization behavior of the different glycan-modified monomers.

The glycopolymers were used as block in block copolymers. Two different block copolymers (PHEMA-*b*-PLacAEMA and PMMA-*b*-PManAMA) were synthesized. The self-assembly of the block copolymers in aqueous solution was investigated. Both polymers form in aqueous solution micelles, in which the sugar block is located on the outer surface. The self-assembly was characterized by TEM and cryo-SEM measurements. The PMMA-*b*-PManAMA micelles were loaded with a hydrophobic fluorescent dye. Thus, the CMC formation of the micelles was determined.

The glycan-protein interaction was investigated using spectroscopic measurements. For this purpose, glycopolymers were bound to different surfaces via “grafting from” with Si-ATRP or via “grafting to”. By XPS, AFM and contact angle measurements the covalent binding of the polymers on the surfaces was confirmed. In addition, the selective binding of the glycans and proteins was investigated using fluorescence labelled lectin. SPR and microring resonator measurements were used to detect the specific and selective binding of lectins to the glycopolymers.

Glycopolymers are synthetic polymers that carry a glycan group in the side chain of the polymer. It was shown that the glycopolymers were obtained through a variation of different glycomonomers. The glycopolymers could be used in micelles as hydrophilic blocks and for surface functionalization. This glycopolymers could become addressable for other lectins by exchanging the glycan unit. This led to a broader application for different proteins. In biological processes they could be used as drug delivery containers. Also, the glycopolymer coated surfaces could be used in diagnostics for lectin detection. The glycans which do not bind selective and specific to proteins could be used as anti-adsorptive surface coatings in cell biology.

8. Anhang

8.1. Glykomonomere

Glykomonomer *N*-Acetylglukosaminethylmethacrylat (GlcNAcEMA)

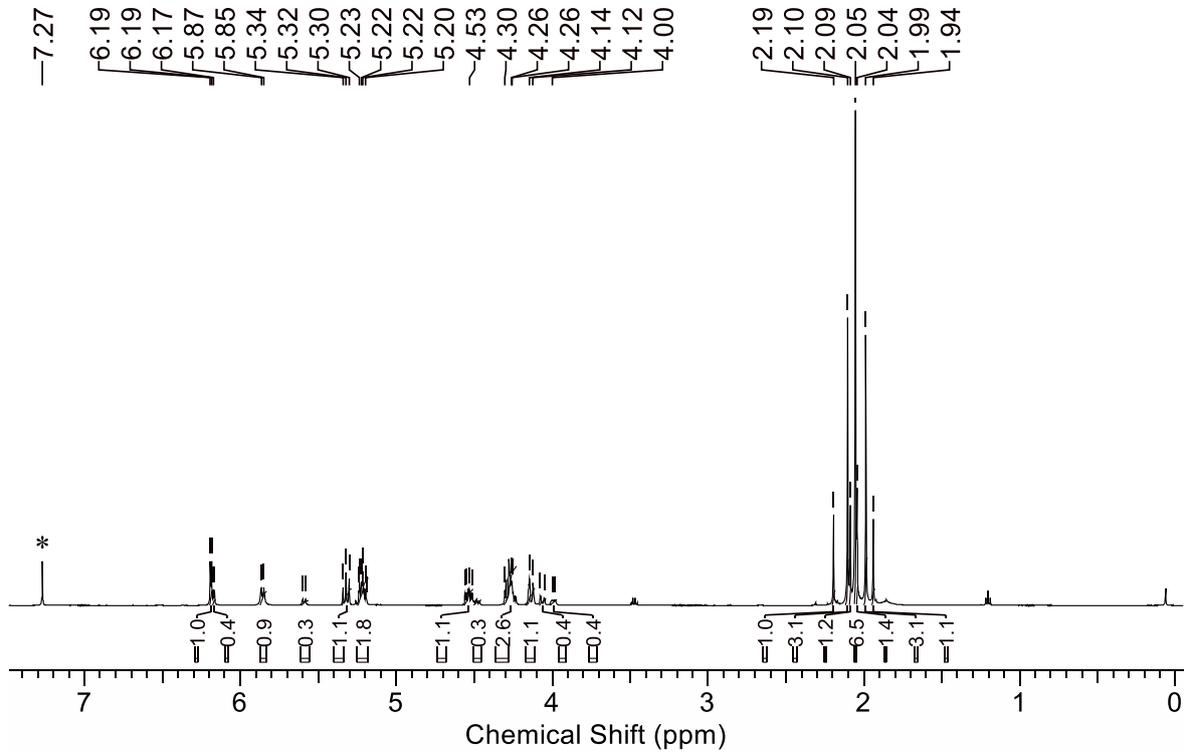


Abbildung 39: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Ac-GlcNAc-Cl (2), (*) CDCl_3 .

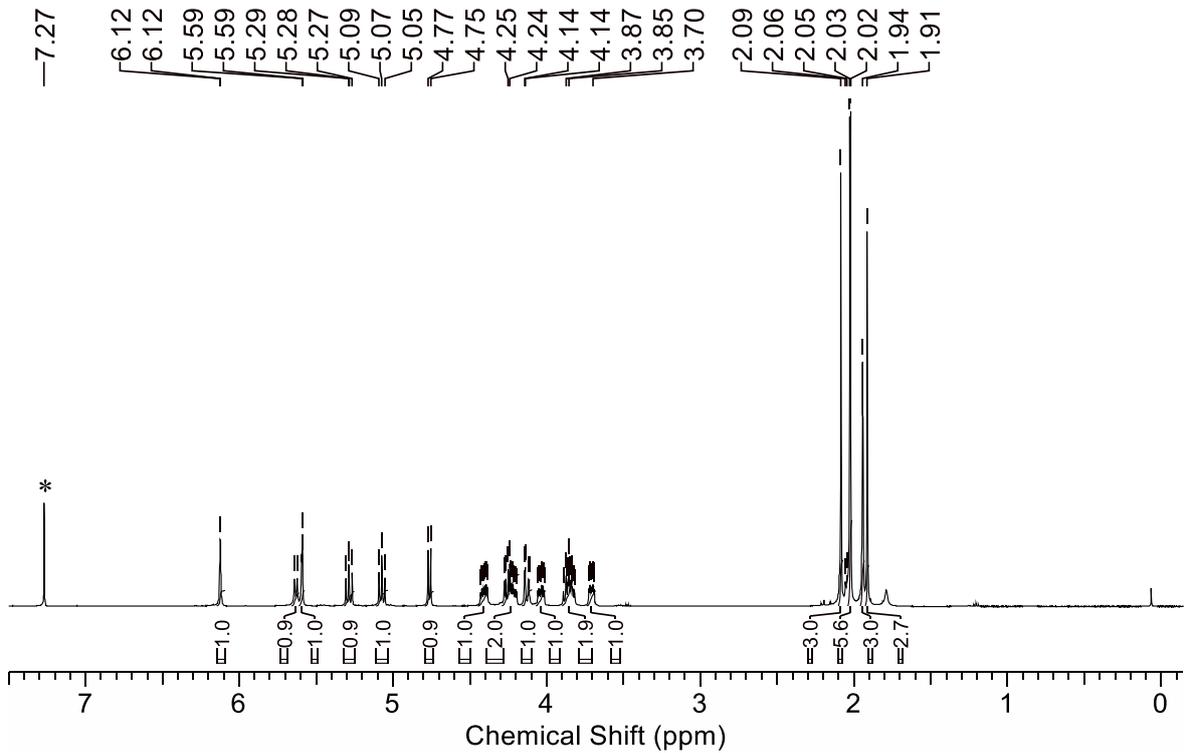


Abbildung 40: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Ac-GlcNAcEMA (3), (*) CDCl_3 .

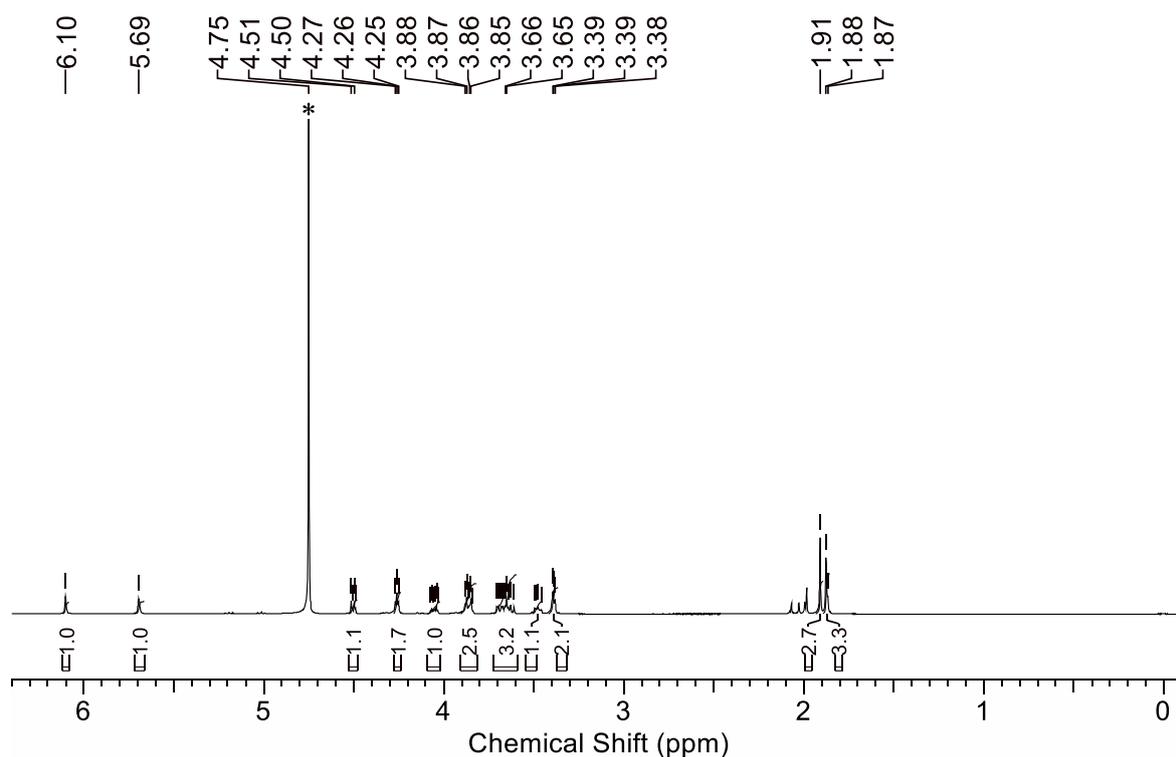


Abbildung 41: ^1H -NMR-Spektrum von GlcNAcEMA (4), (*) CDCl_3 .

Monomer Laktosaminethylmethacrylat (LacAEMA)

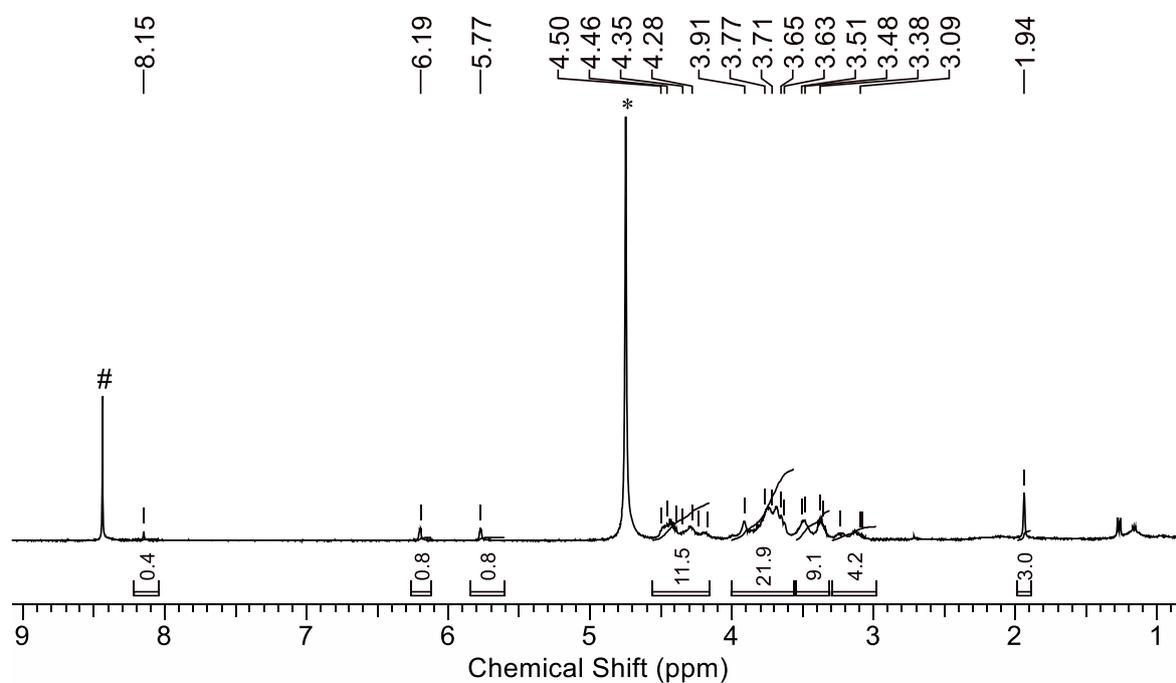


Abbildung 42: ^1H -NMR-Spektrum von LacAEMA (6), (*) D_2O , (#) CHCl_3 .

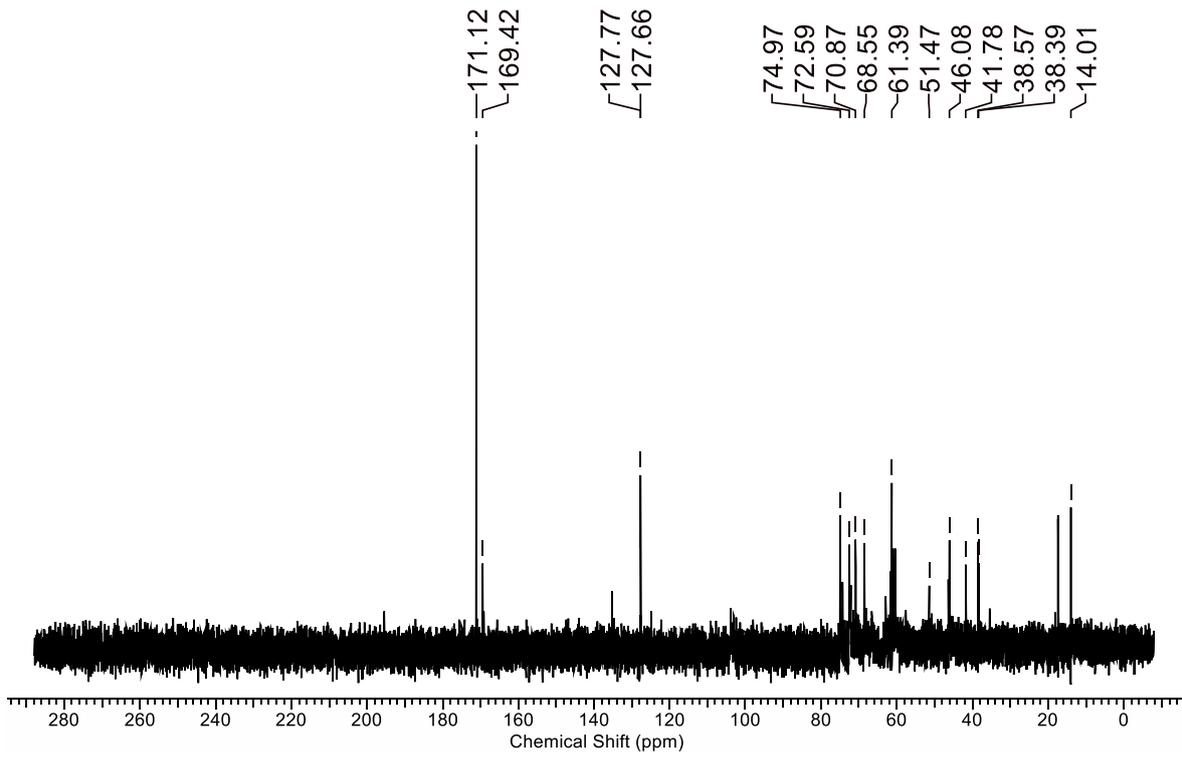


Abbildung 43: ^{13}C -NMR-Spektrum von LacaEMA (6) in D_2O .

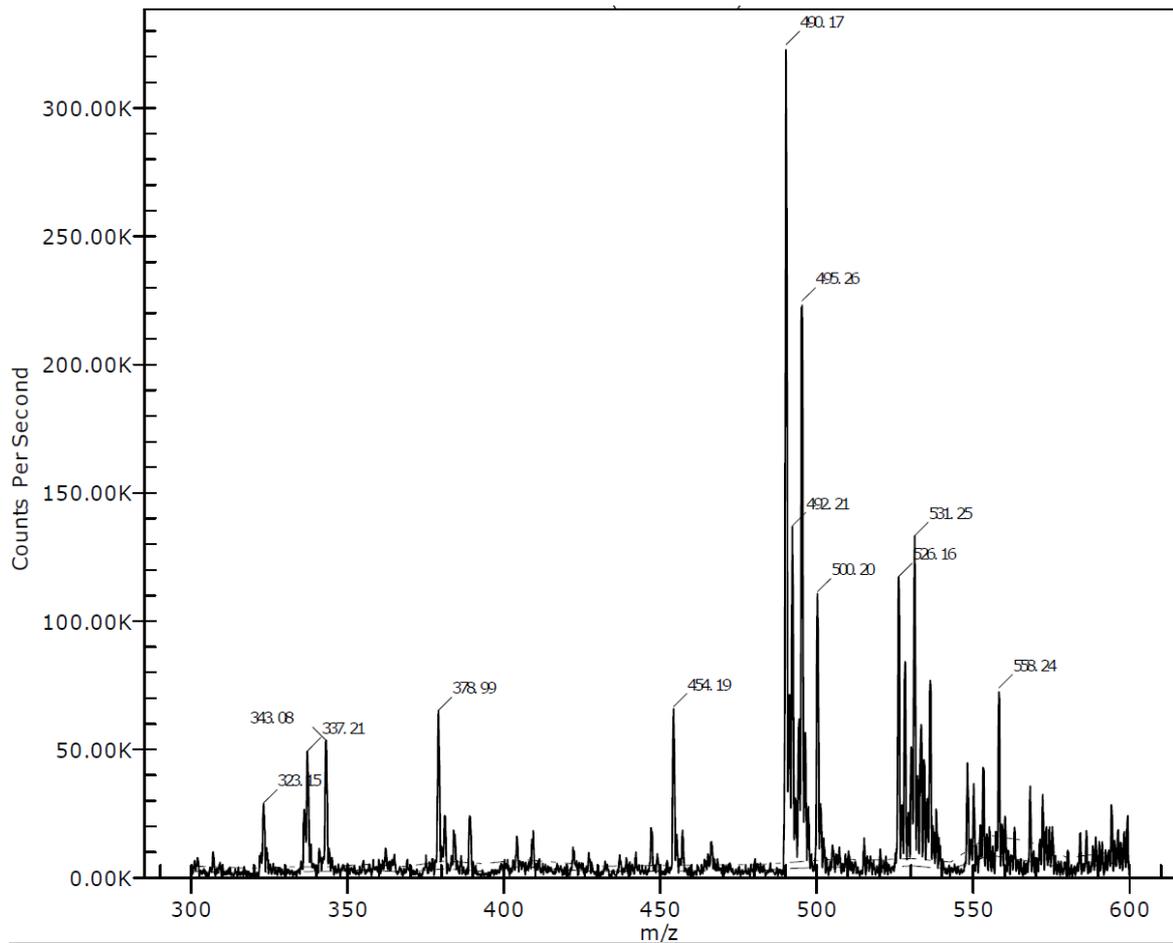


Abbildung 44: ESI-MS-Spektrum von LacAEMA (6).

Monomer über Wittig-Reaktion

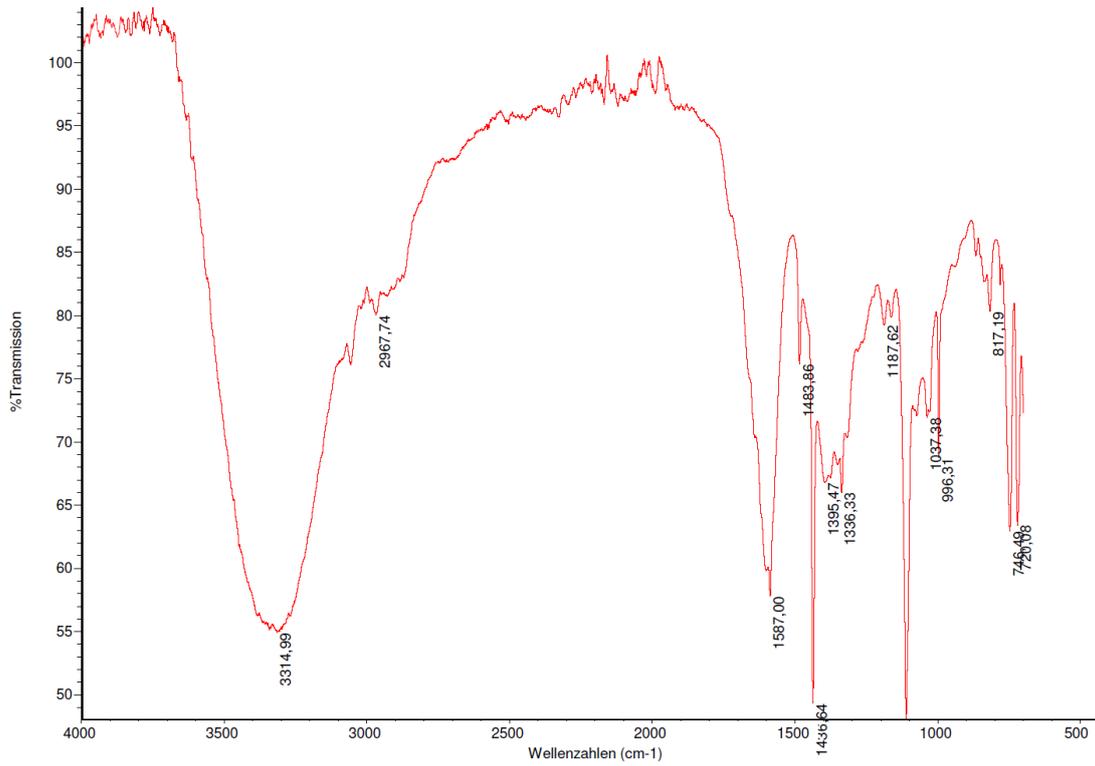


Abbildung 45: IR-Spektrum des Glykomonomers über Wittig-Reaktion (7) mit Na₂CO₃.

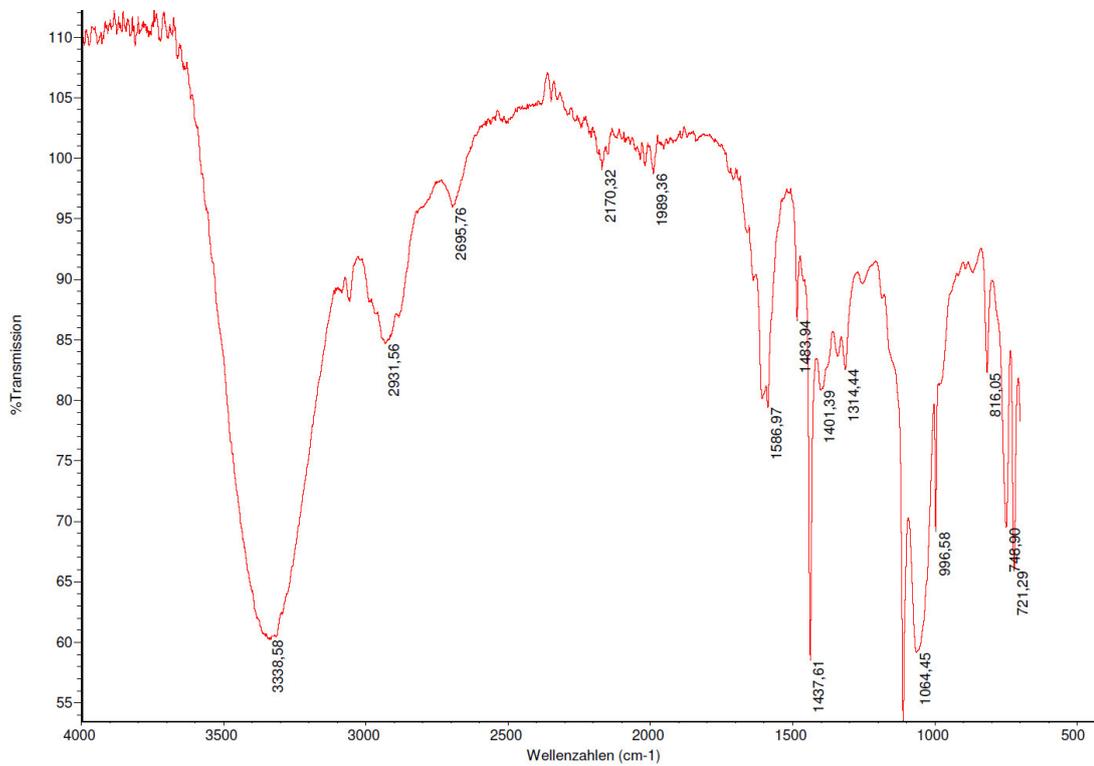


Abbildung 46: IR-Spektrum des Glykomonomers über Wittig-Reaktion (7) mit DIPEA.

Monomer Mannosemethacrylamid (ManAMA)

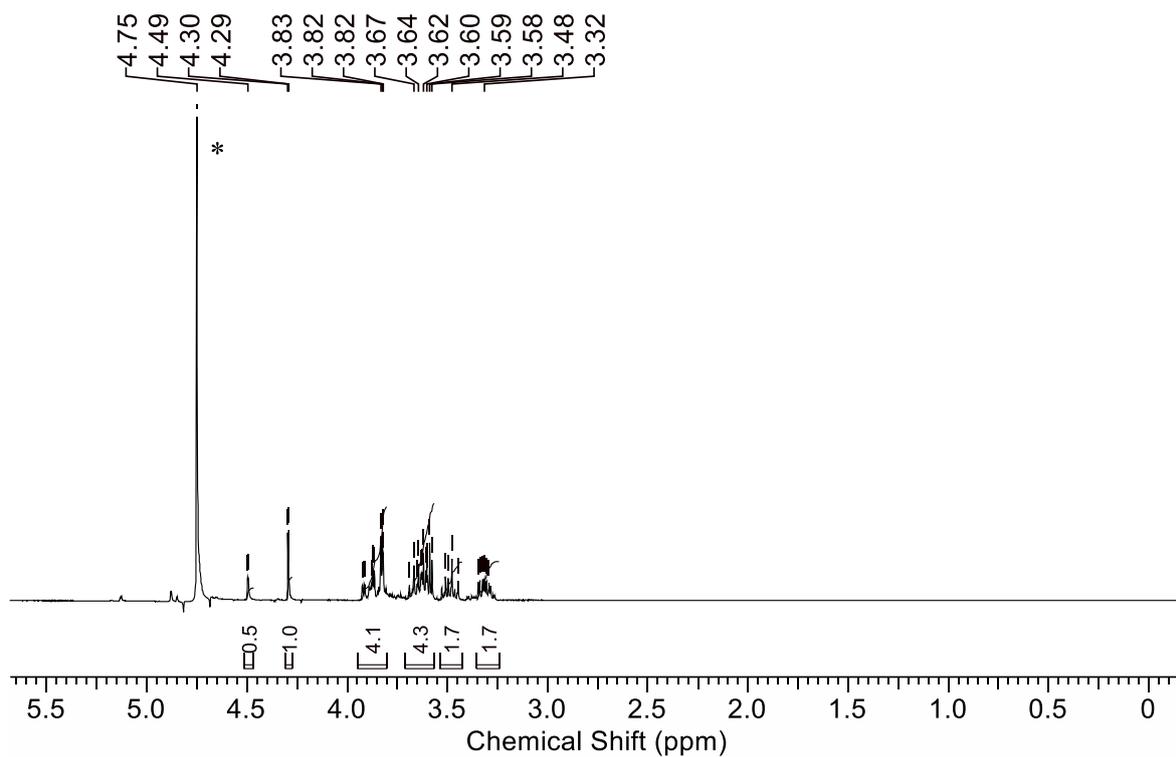


Abbildung 47: ¹H-NMR-Spektrum von ManNH₂ (23), (*) D₂O.

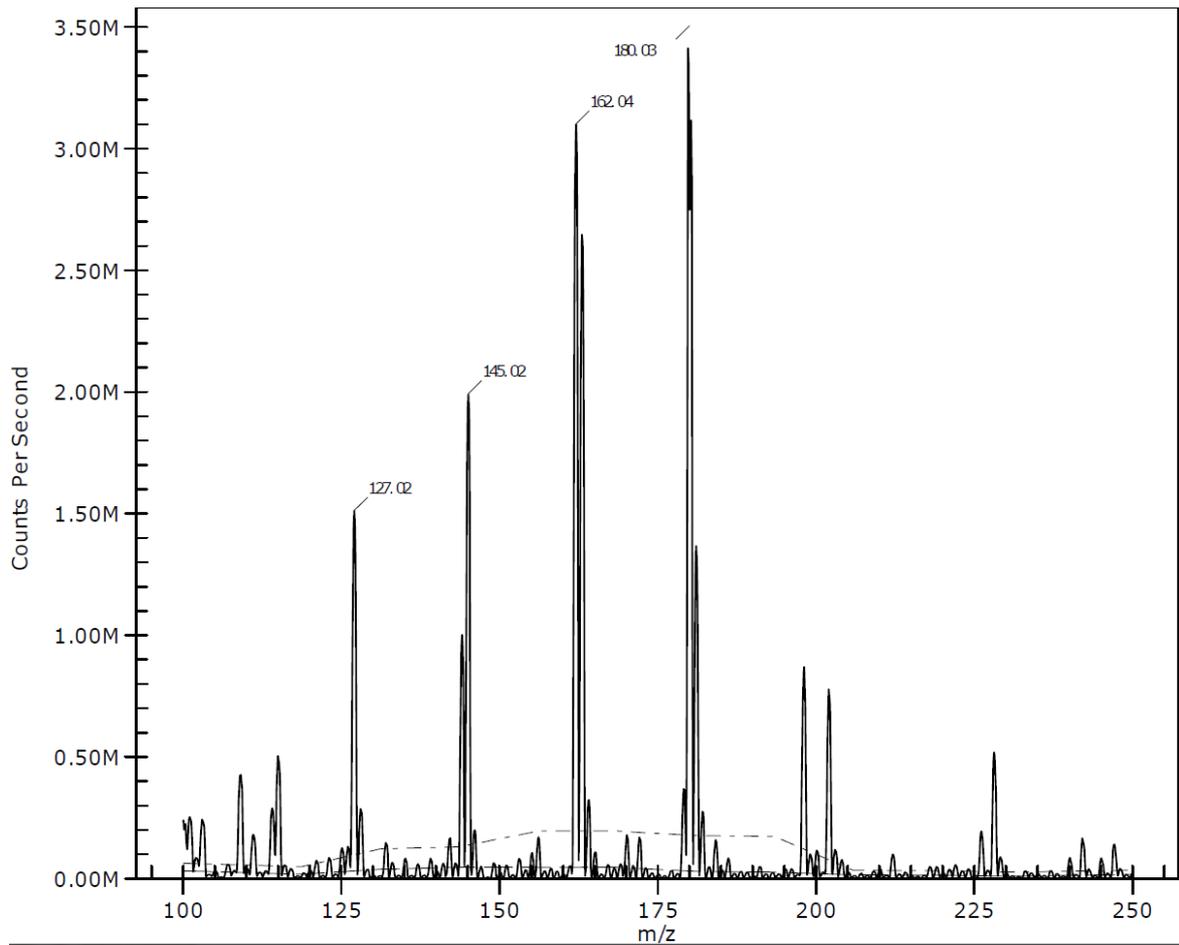


Abbildung 48: ESI-MS-Spektrum von ManNH₂ (23).

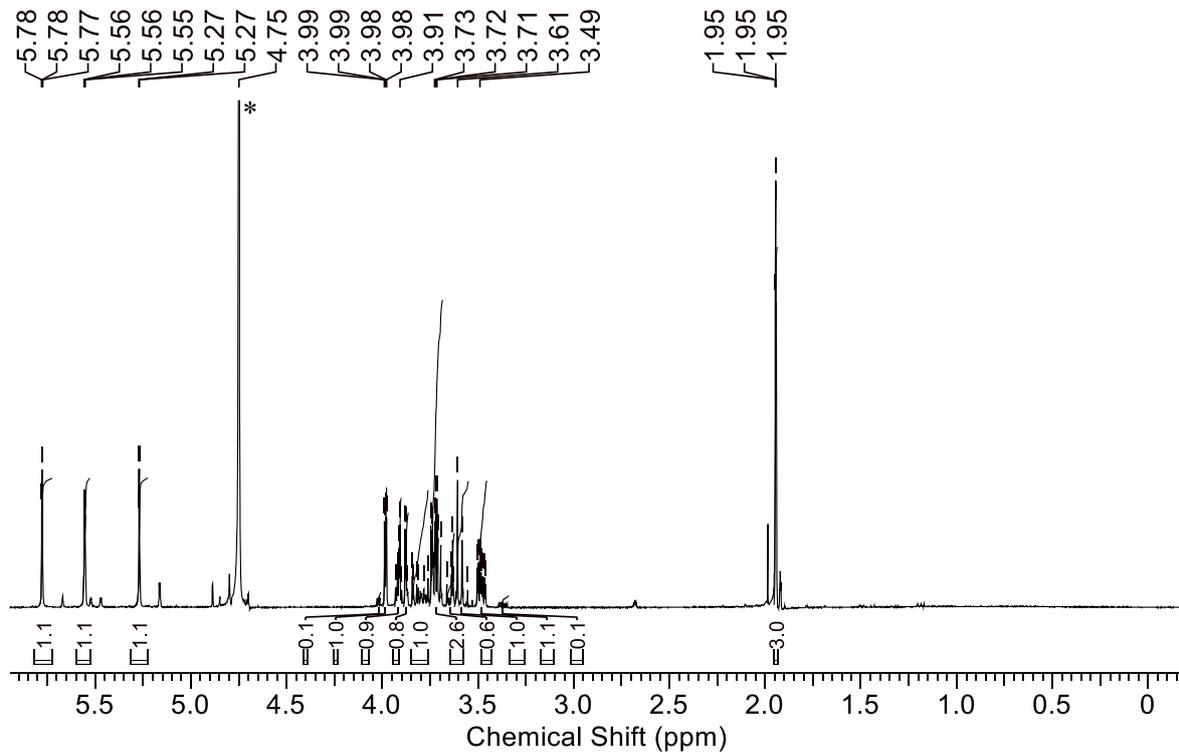


Abbildung 49: ¹H-NMR-Spektrum von ManAMA (9), (*) D₂O.

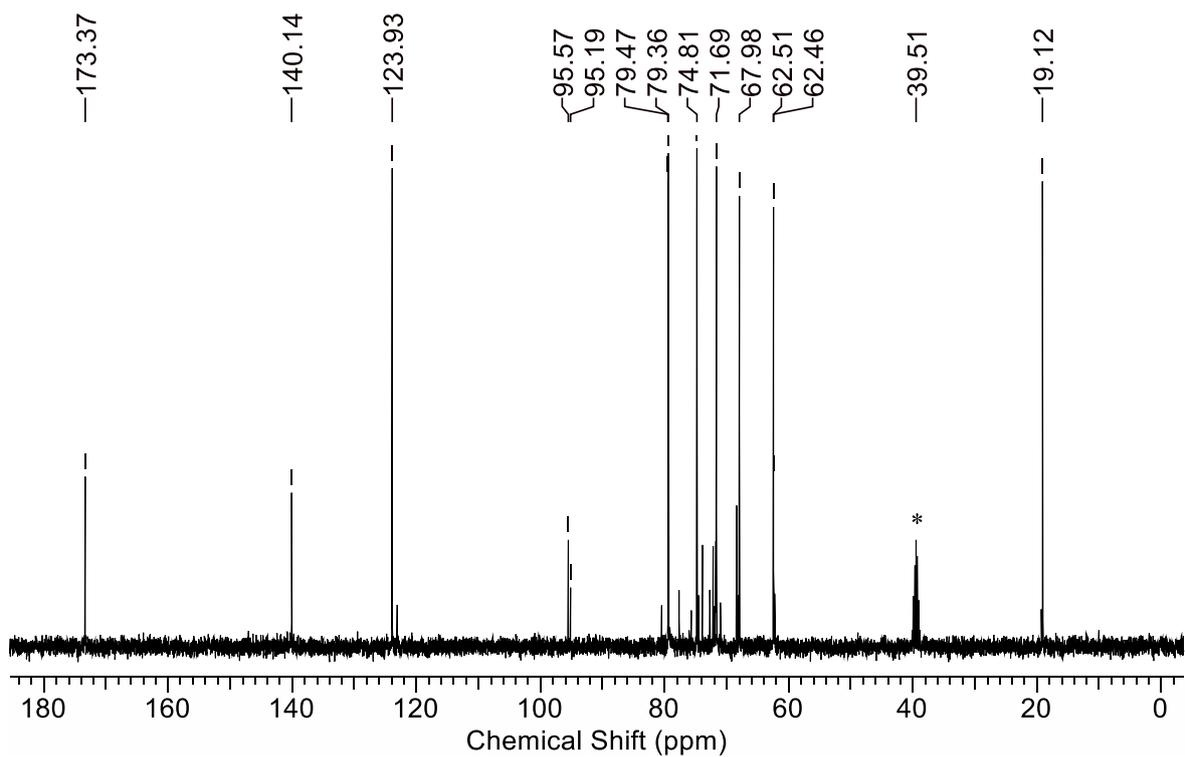


Abbildung 50: ^{13}C -NMR-Spektrum von ManAMA (9) in D_2O ; (*) DMSO als Standard.

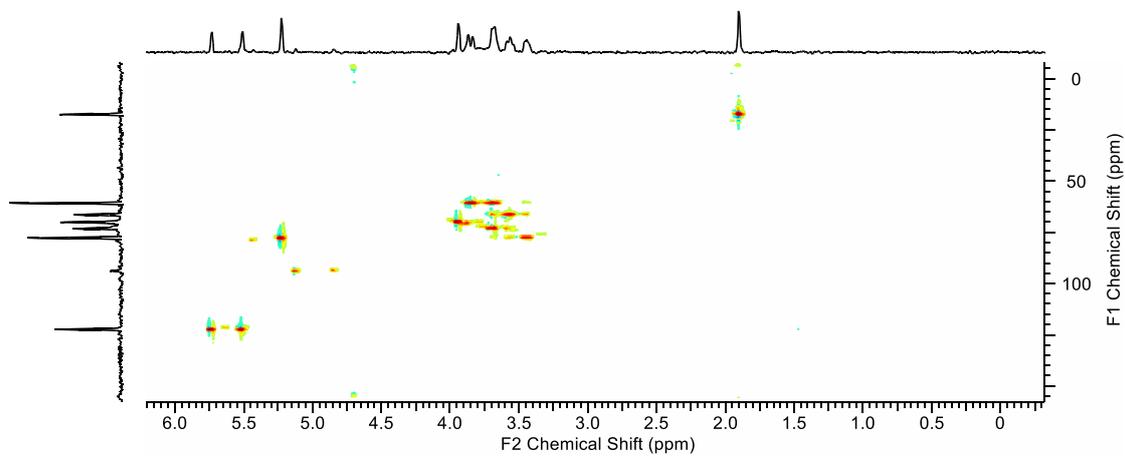


Abbildung 51: HSQC-Spektrum von ManAMA (9).

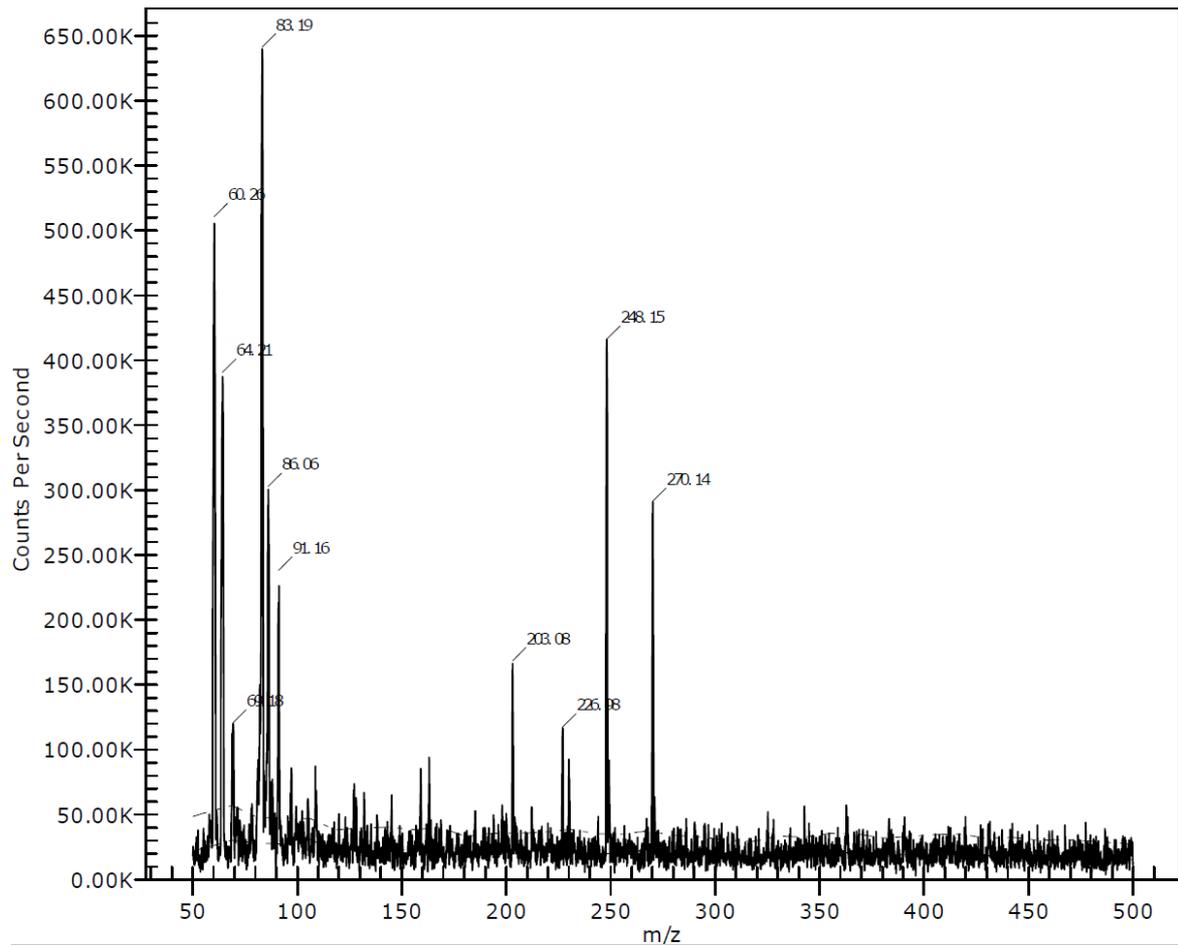


Abbildung 52: ESI-MS-Spektrum von ManAMA (9).

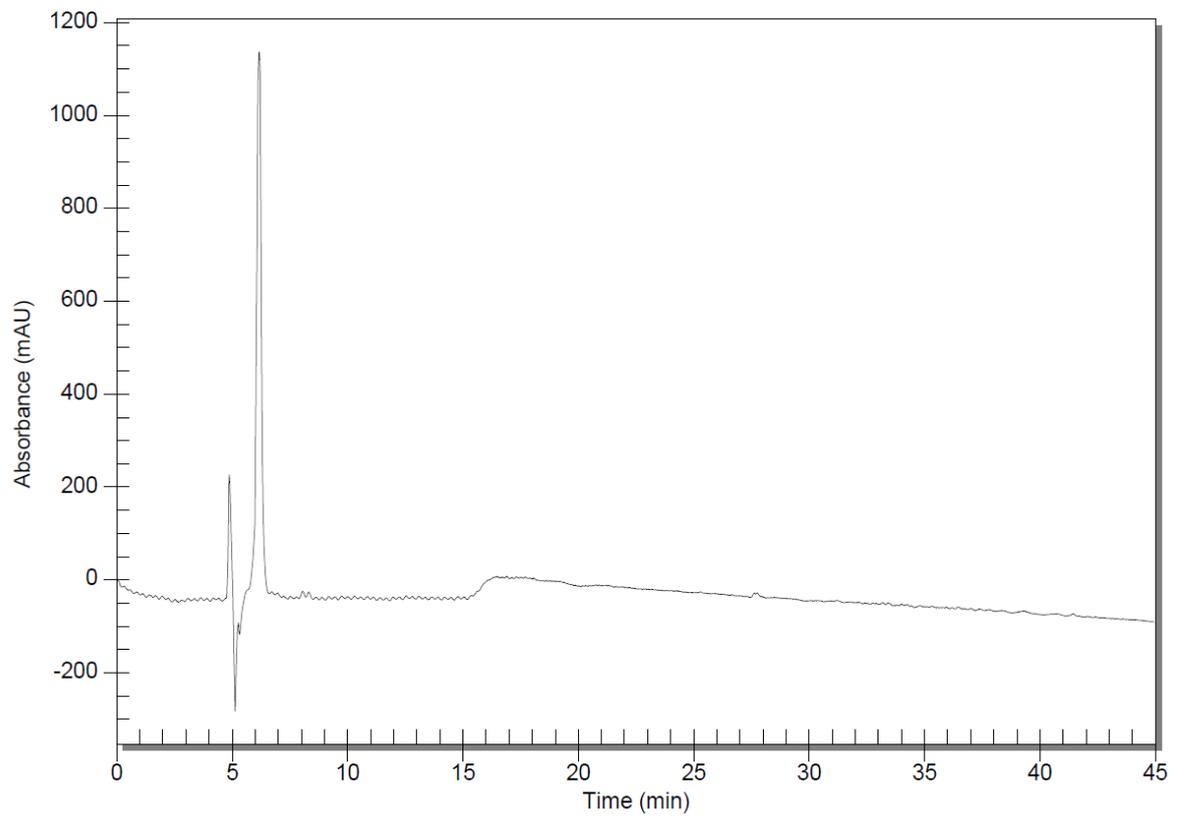


Abbildung 53: HPLC-Elugramm von ManAMA (9) in Acetonitril/Wasser (Start: 5 %: 95 % bis 50 %: 50 %) mit 0,1 % Ameisensäure. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 200 nm.

Monomer Galaktosemethacrylamid (GalAMA)

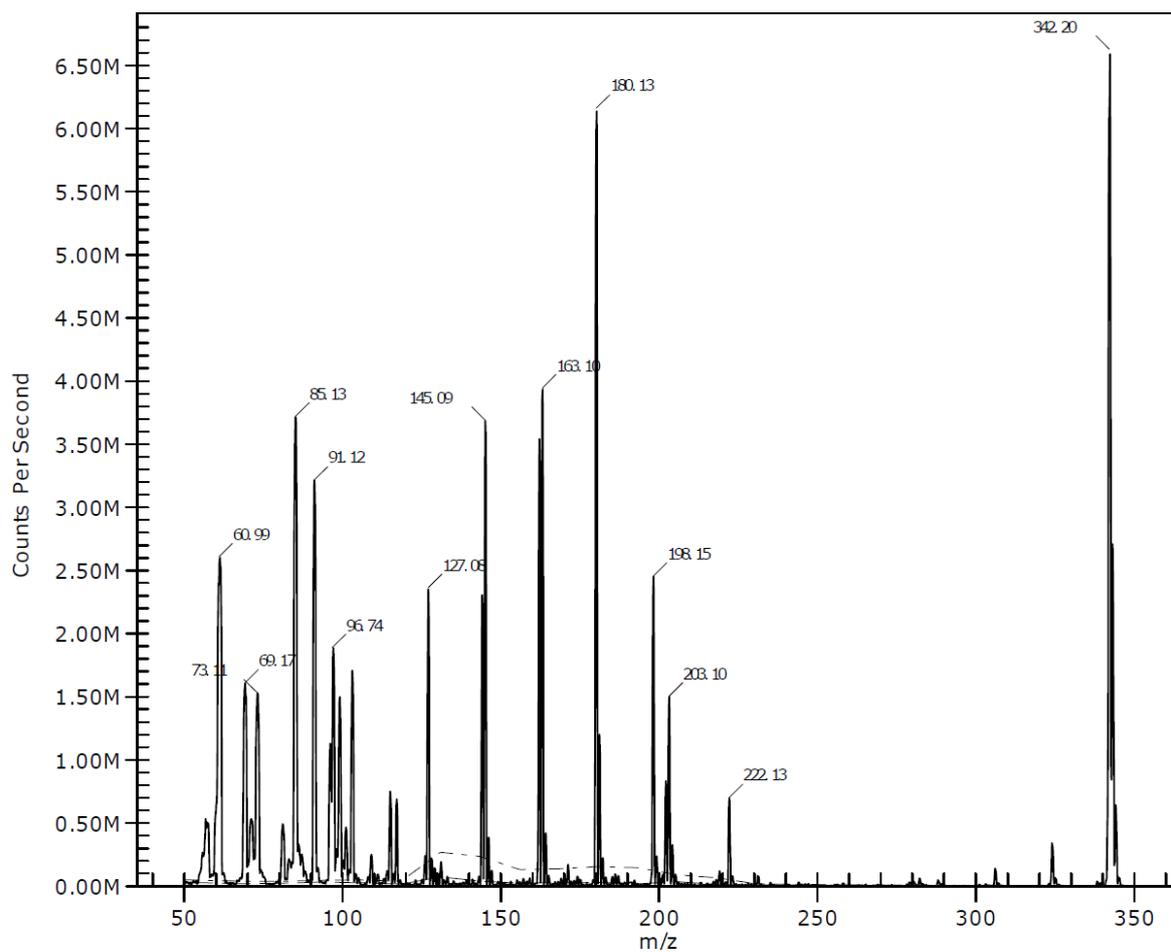


Abbildung 54: ESI-MS-Spektrum von GalNH₂ (31).

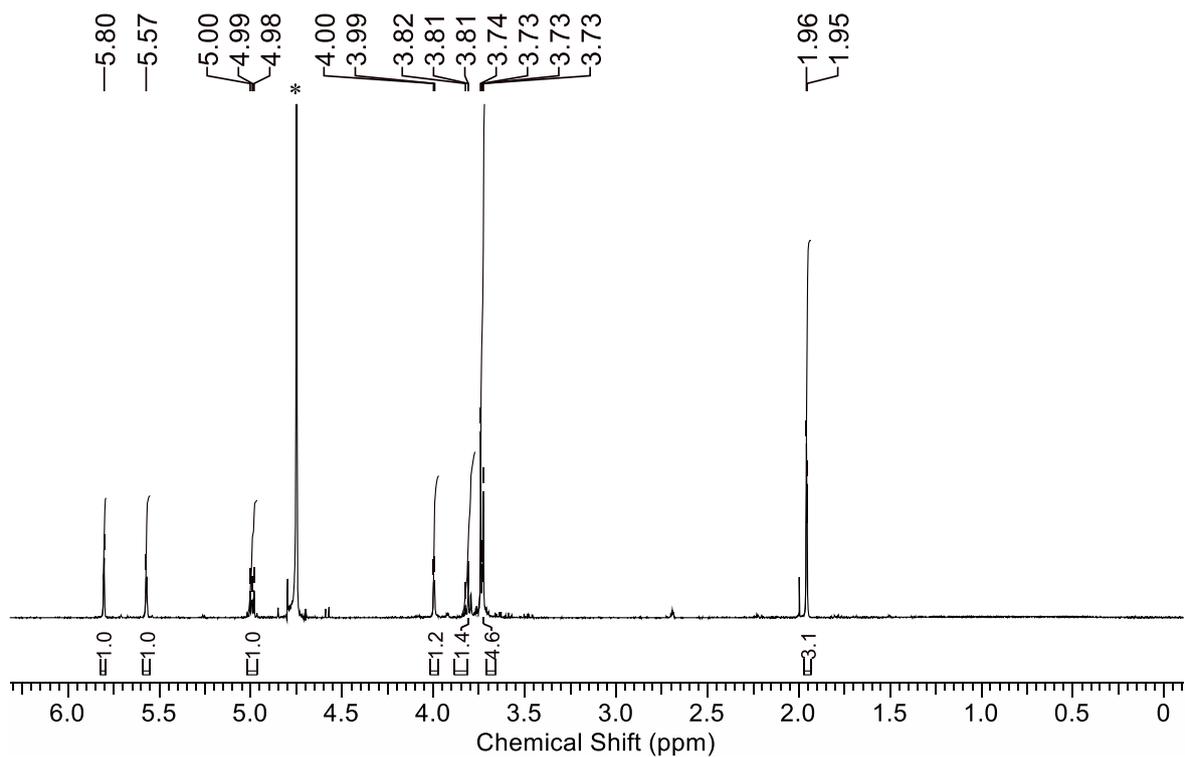


Abbildung 55: ^1H -NMR-Spektrum von GalAMA (32), (*) D_2O .

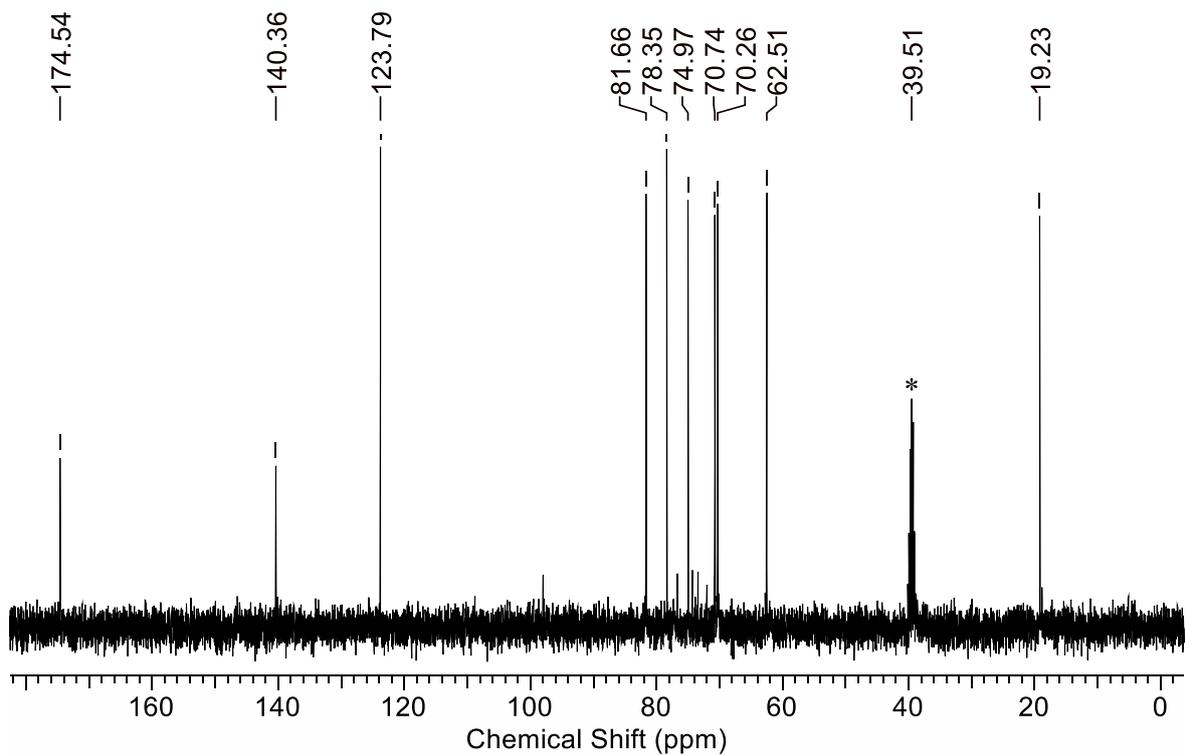


Abbildung 56: ^{13}C -NMR-Spektrum von GalAMA (32) in D_2O ; (*) DMSO als Standard.

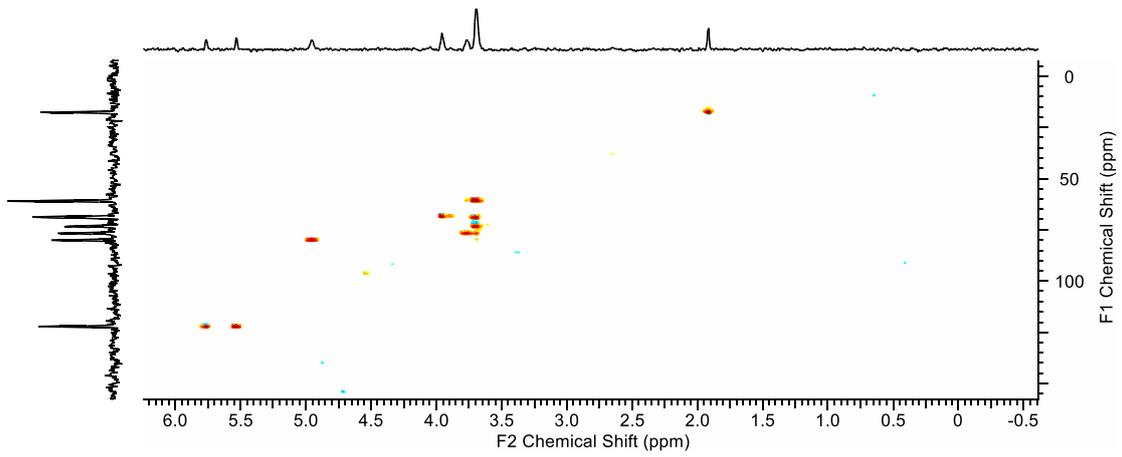


Abbildung 57: HSQC-Spektrum von GalAMA (32).

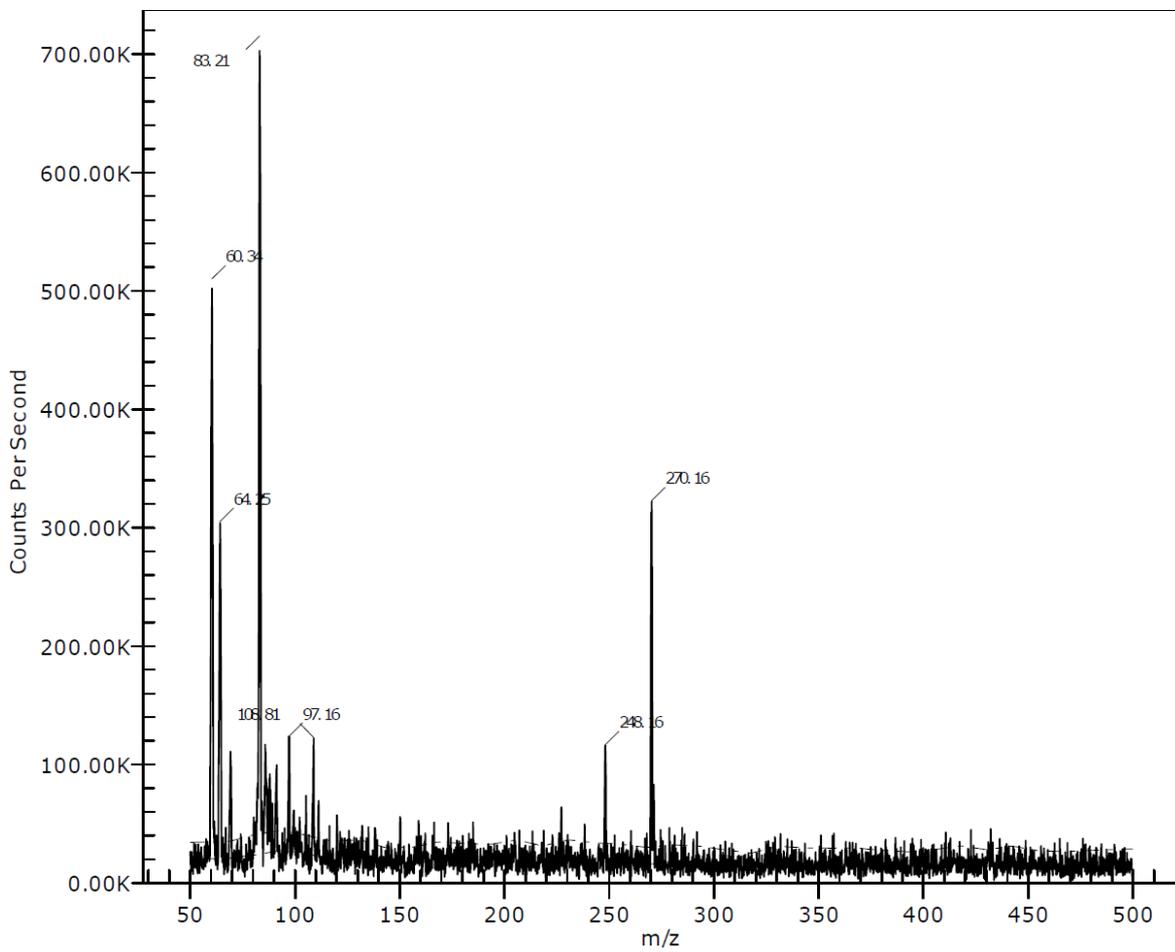


Abbildung 58: ESI-MS-Spektrum von GalAMA (32).

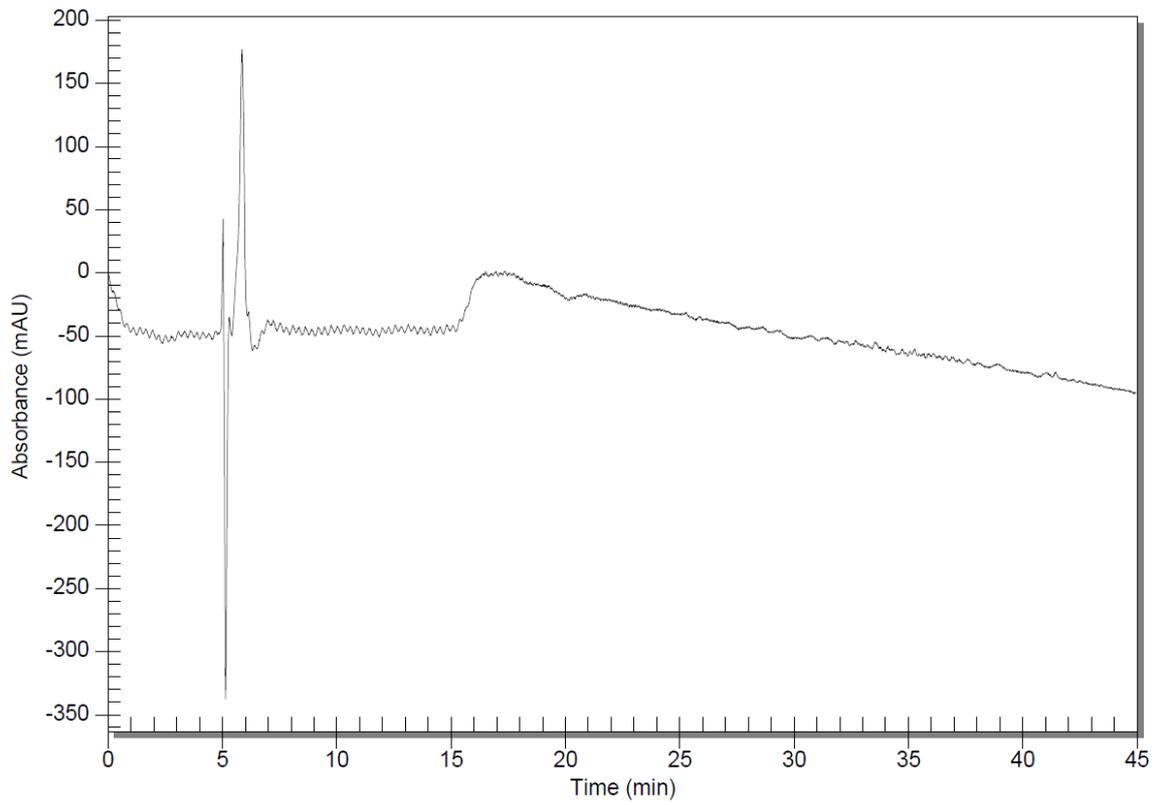


Abbildung 59: HPLC-Elugramm von GalAMA (32) in Acetonitril/Wasser (Start: 5 %: 95 % bis 50 %: 50 %) mit 0,1 % Ameisensäure. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 200 nm.

8.2. Glykopolymere

PManAMA und PLacAEMA über ATRP

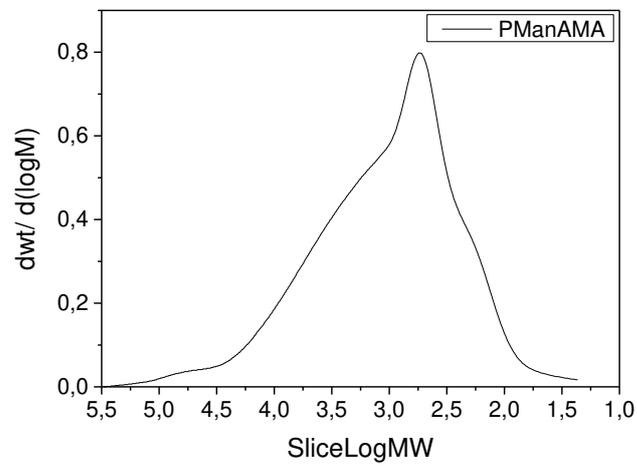


Abbildung 60: GPC-Spektrum PManAMA (34) über ATRP, DMSO, 80°C.

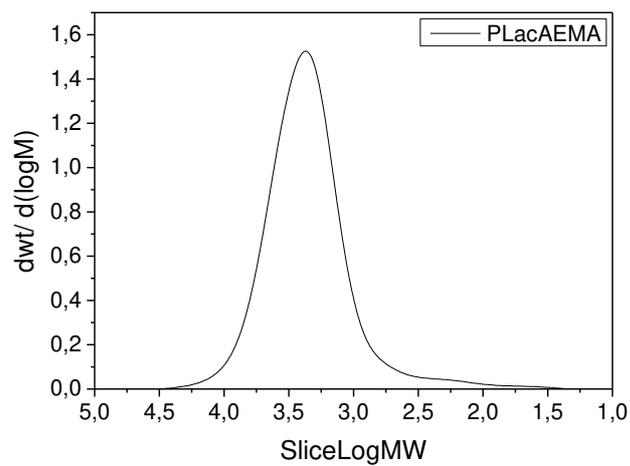


Abbildung 61: GPC-Spektrum PLacAEMA (35) über ATRP, DMSO, 80°C.

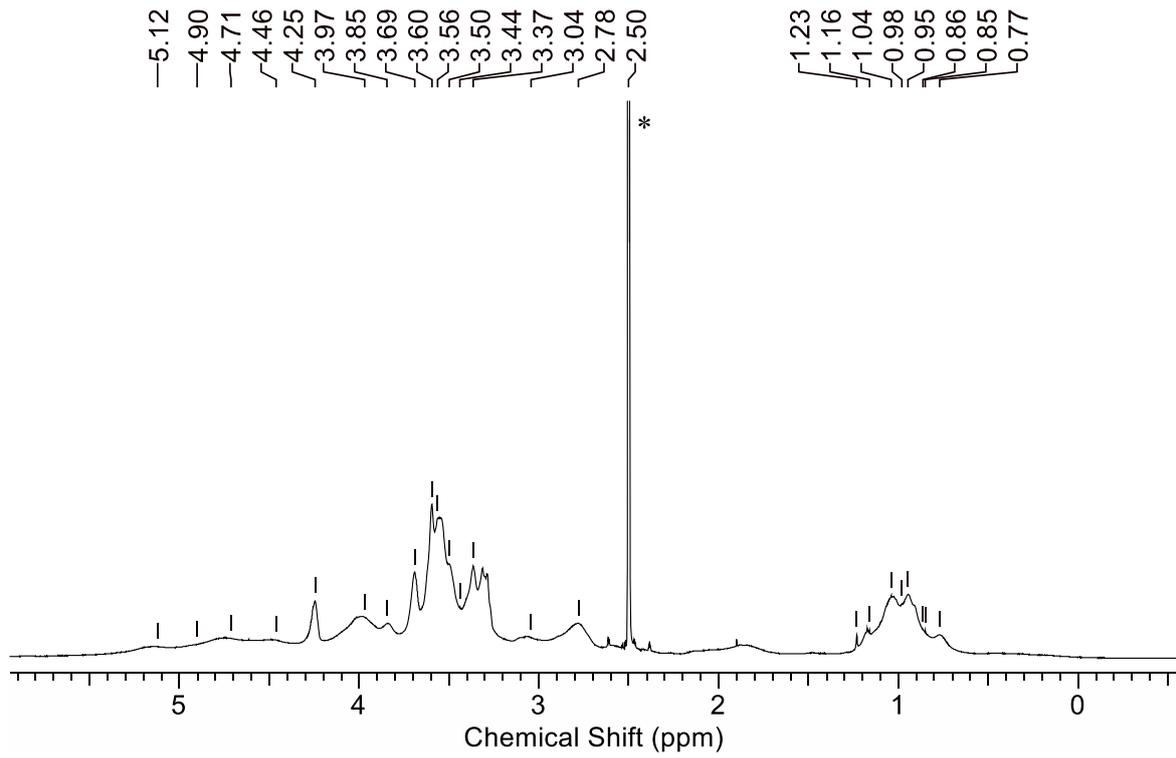


Abbildung 62: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PLacAEMA (35), (*) DMSO.

PManAMA, PGalAMA und PHEMA über RAFT

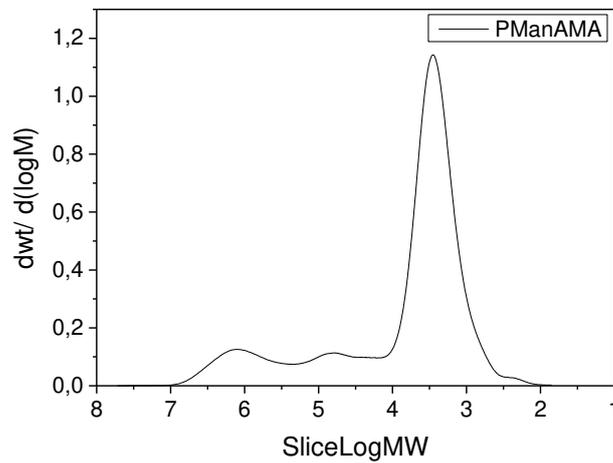


Abbildung 63: GPC-Spektrum PManAMA (38) über RAFT, DMSO, 80°C.

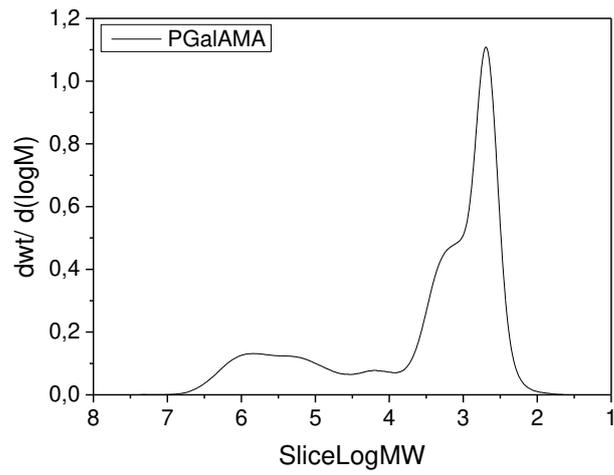


Abbildung 64: GPC-Spektrum PGalAMA (39) über RAFT, DMSO, 80°C.

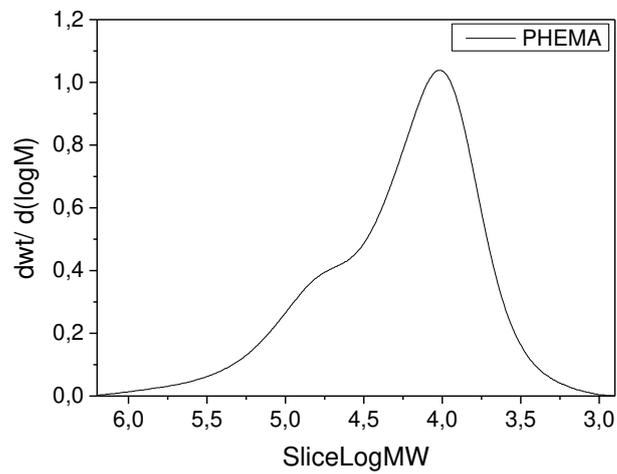


Abbildung 65: GPC-Spektrum PHEMA (41) über RAFT, DMSO, 80°C.

PEI-Laktose

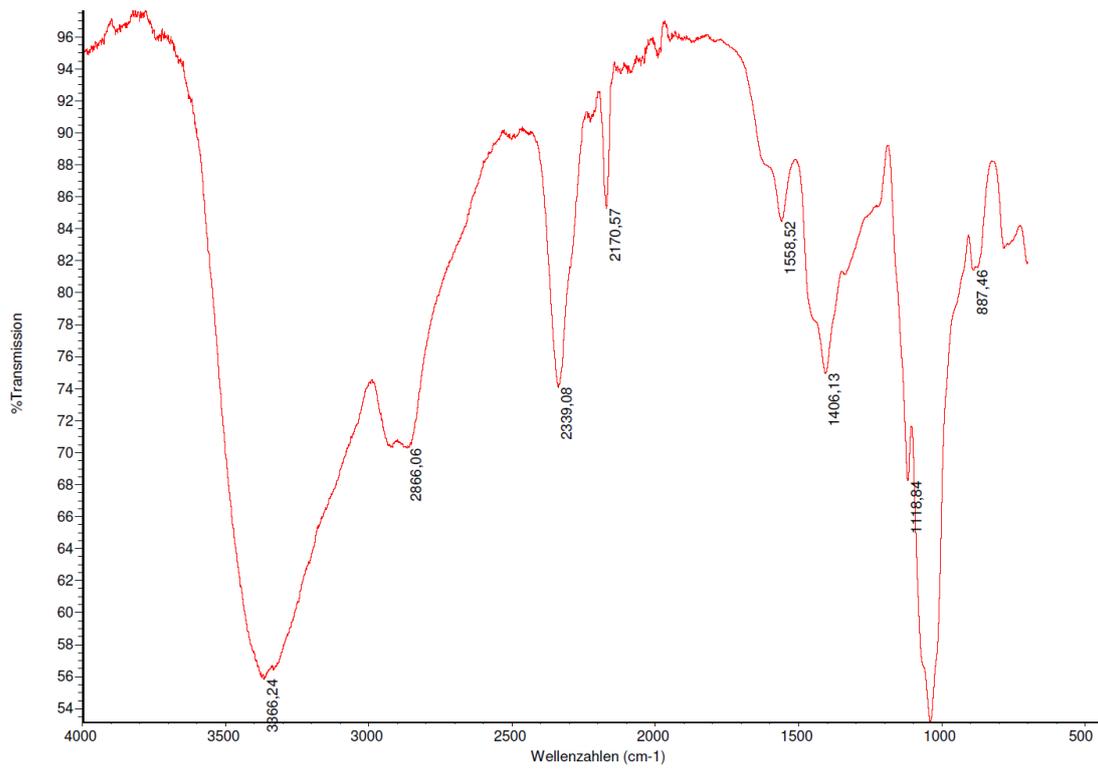


Abbildung 66: IR-Spektrum von PEI-Laktose (43).

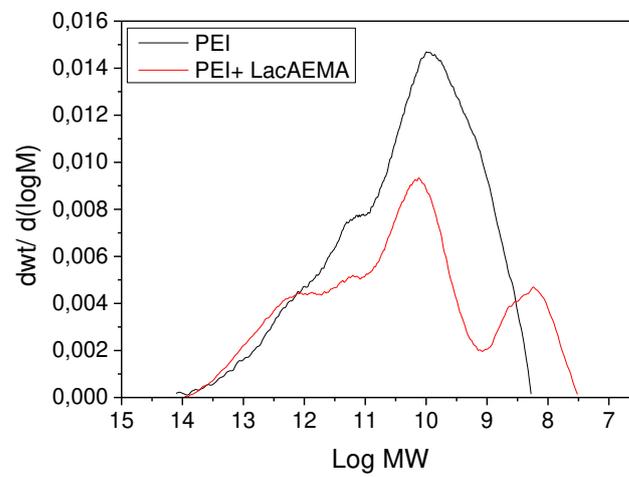


Abbildung 67: GPC-Spektrum, schwarz) PEI (42), rot) PEI-Laktose (43), Wasser mit 0,2 M KCl und 0,02 M Ameisensäure.

8.3. Diblockcopolymer

PHEMA-*b*-PLacAEMA

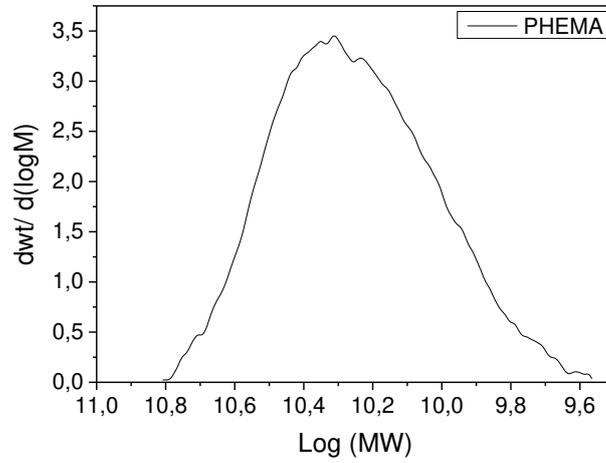


Abbildung 68: GPC-Spektrum PHEMA (44), DMF.

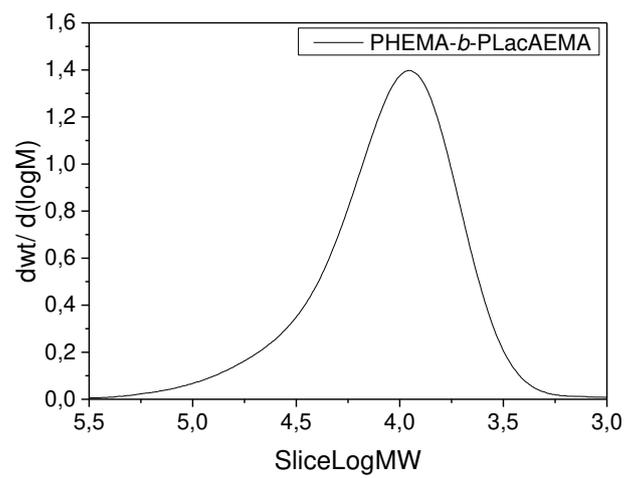


Abbildung 69: GPC-Spektrum PHEMA-*b*-PLacAEMA (45), DMSO, 80°C.

PMMA-*b*-PManAMA

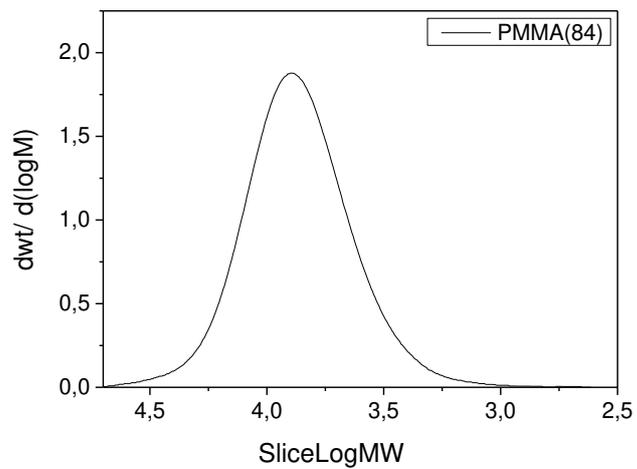


Abbildung 70: GPC-Spektrum PMMA₈₄, DMSO, 80°C.

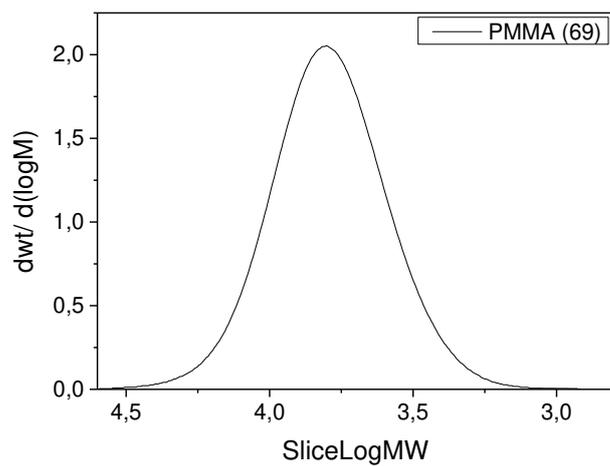


Abbildung 71: GPC-Spektrum PMMA₆₉, DMSO, 80°C.

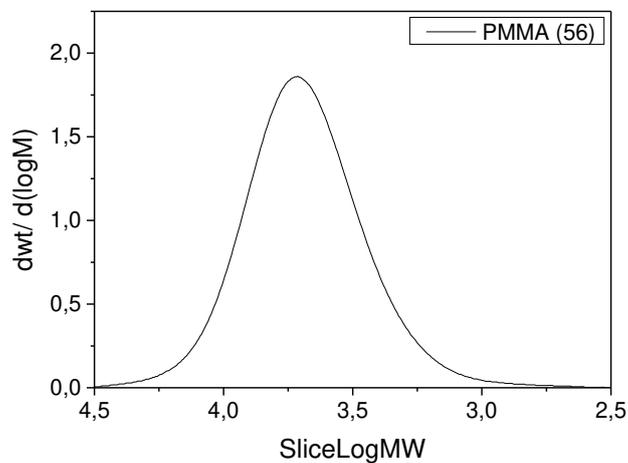


Abbildung 72: GPC-Spektrum PMMA₅₆, DMSO, 80°C.

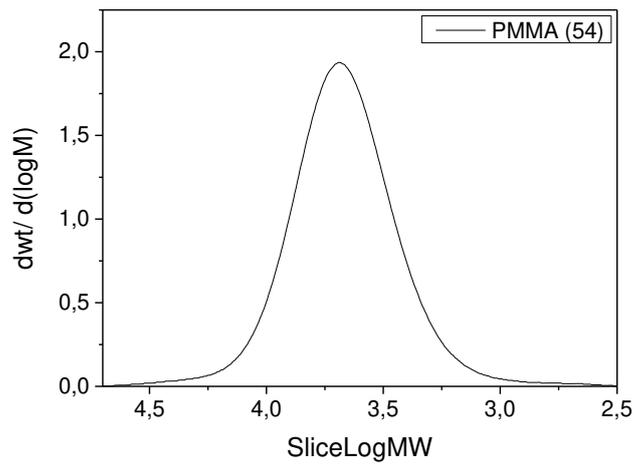


Abbildung 73: GPC-Spektrum PMMA₅₄, DMSO, 80°C.

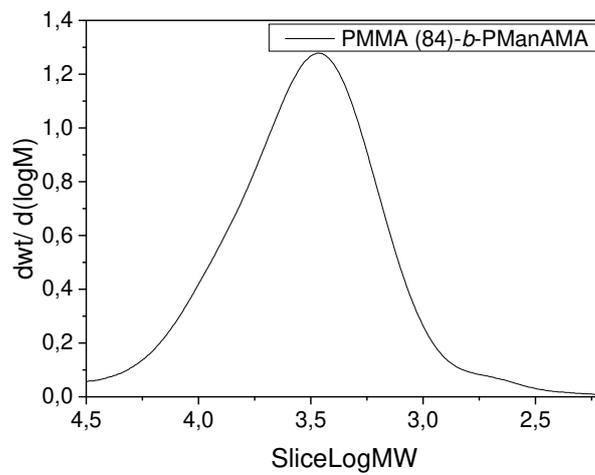
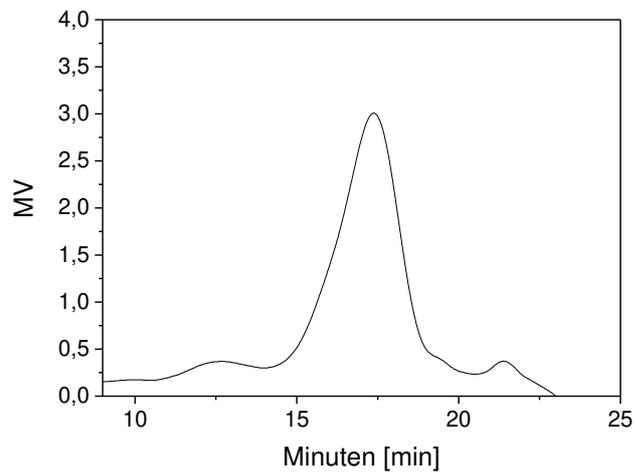


Abbildung 74: Eluogramm und GPC-Spektrum PMMA₈₄-b-PManAMA, DMSO, 80°C.

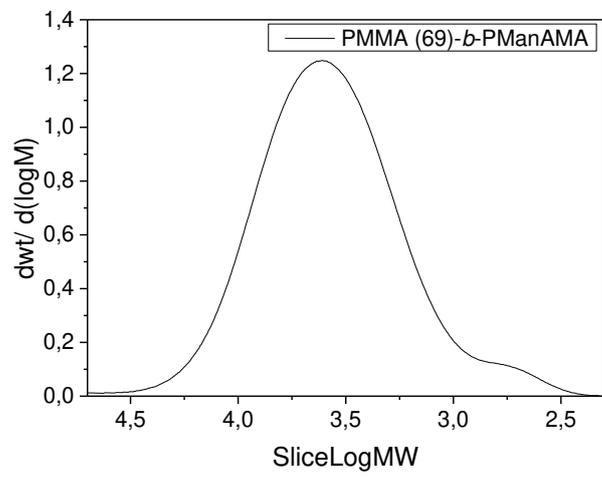
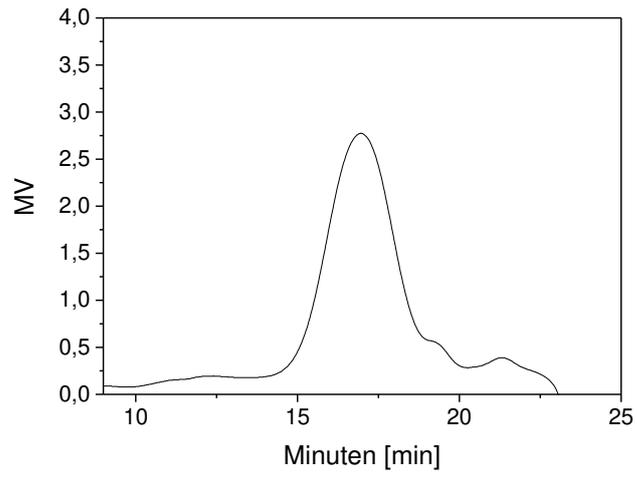
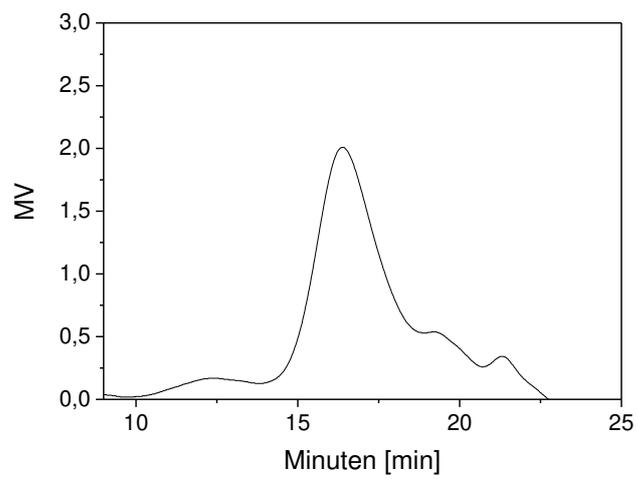


Abbildung 75: Eluogramm und GPC-Spektrum PMMA₆₉-*b*-PManAMA, DMSO, 80°C.



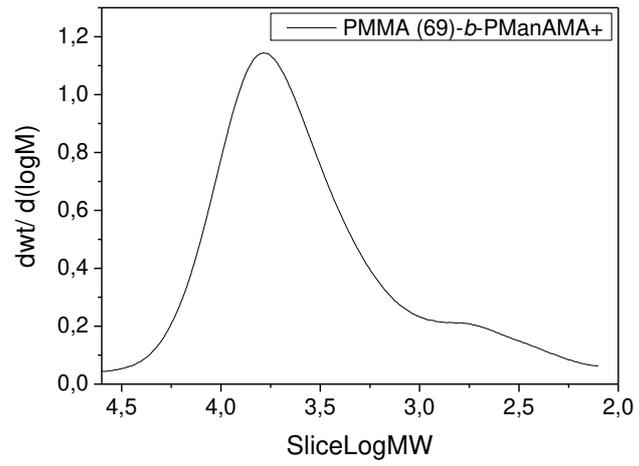
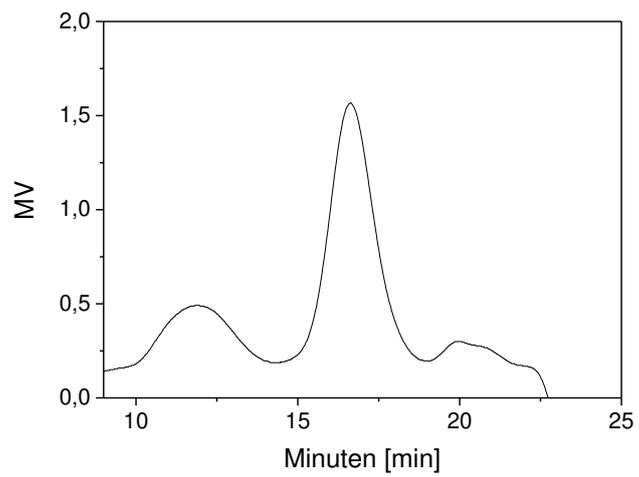


Abbildung 76: Eluogramm und GPC-Spektrum PMMA₆₉-*b*-PManAMA+, DMSO, 80°C.



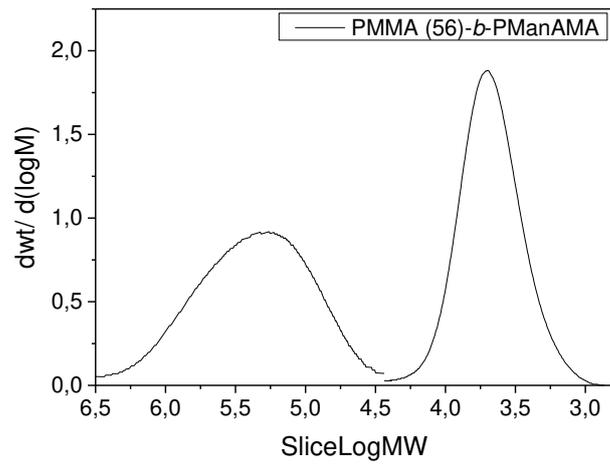
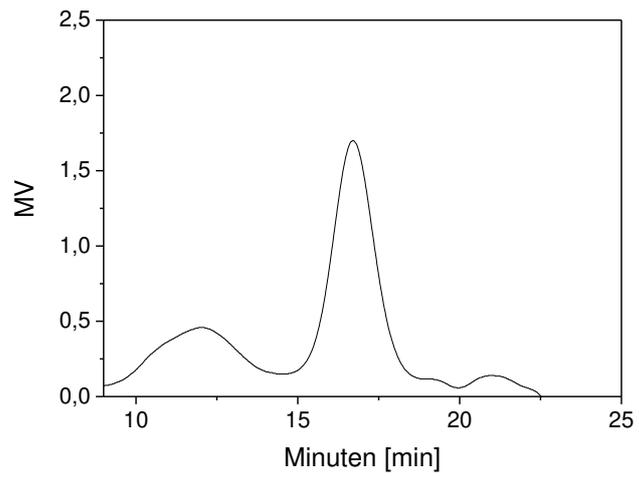


Abbildung 77: Elogramm und GPC-Spektrum PMMA₅₆-*b*-PManAMA, DMSO, 80°C.



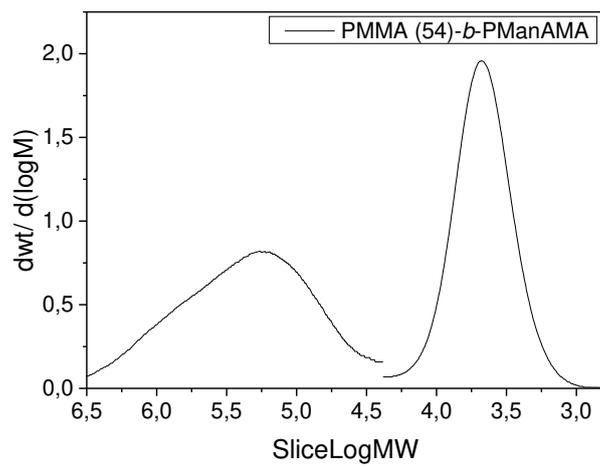


Abbildung 78: Elogramm und GPC-Spektrum PMMA₅₄-*b*-PManAMA, DMSO, 80°C.

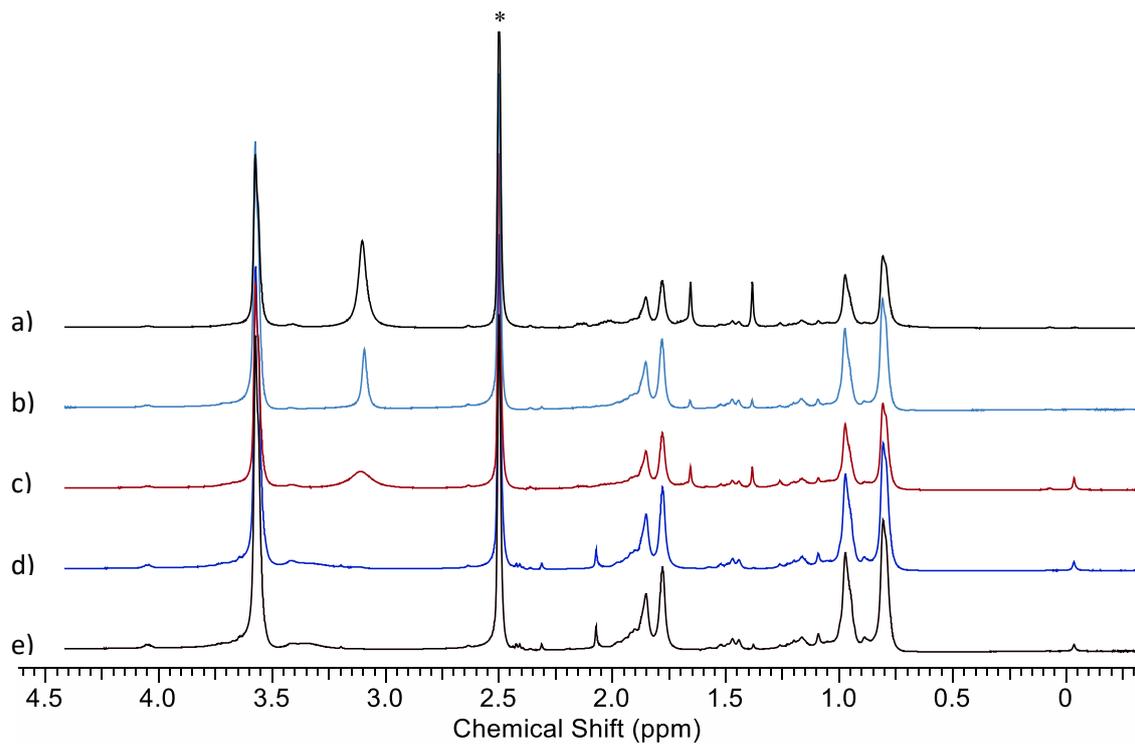


Abbildung 79: ¹H-NMR-Spektrum von PMMA-*b*-PManAMA (48), (*) D₂O; a) PMMA₈₄-*b*-PManAMA, b) PMMA₆₉-*b*-PManAMA, c) PMMA₆₉-*b*-PManAMA+, d) PMMA₅₆-*b*-PManAMA, e) PMMA₅₄-*b*-PManAMA.

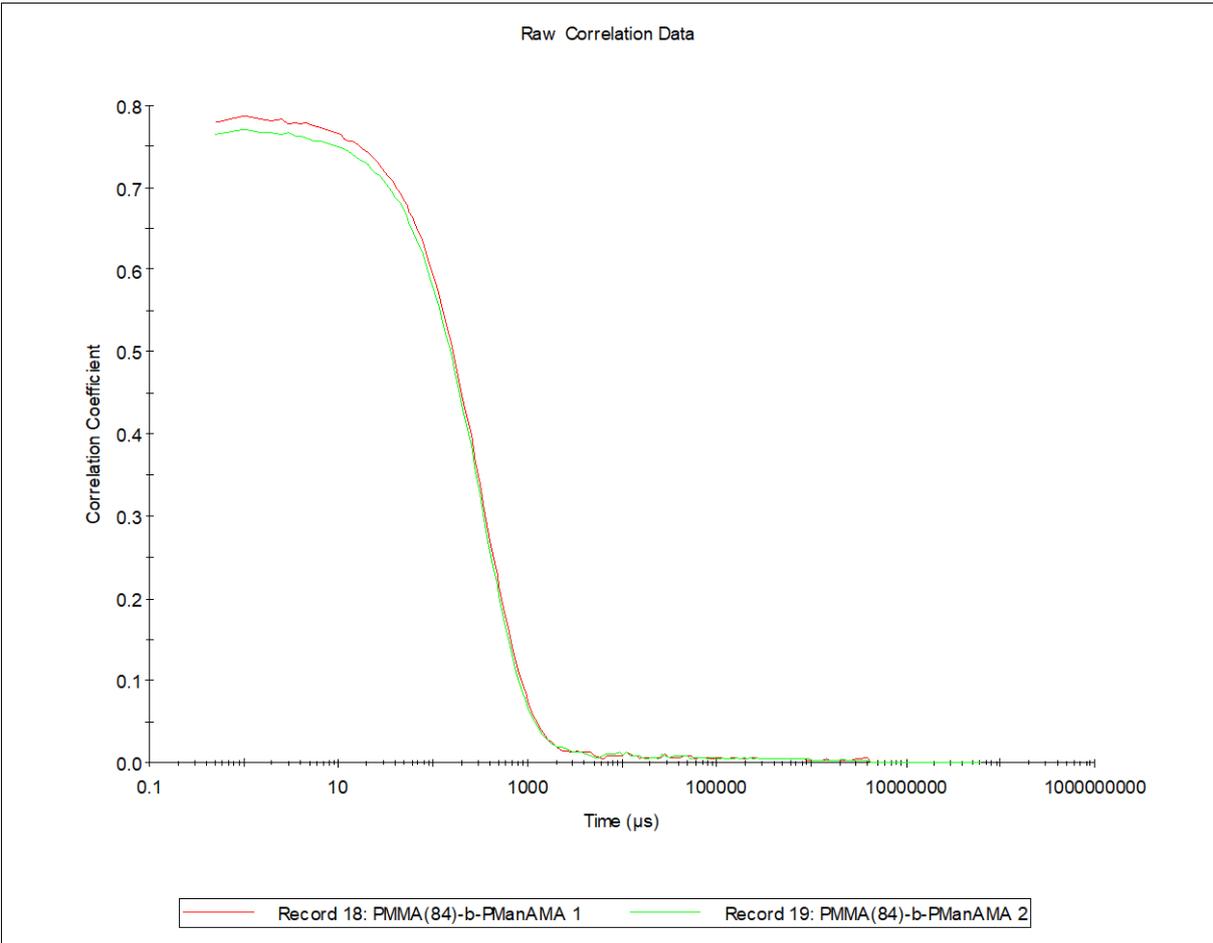
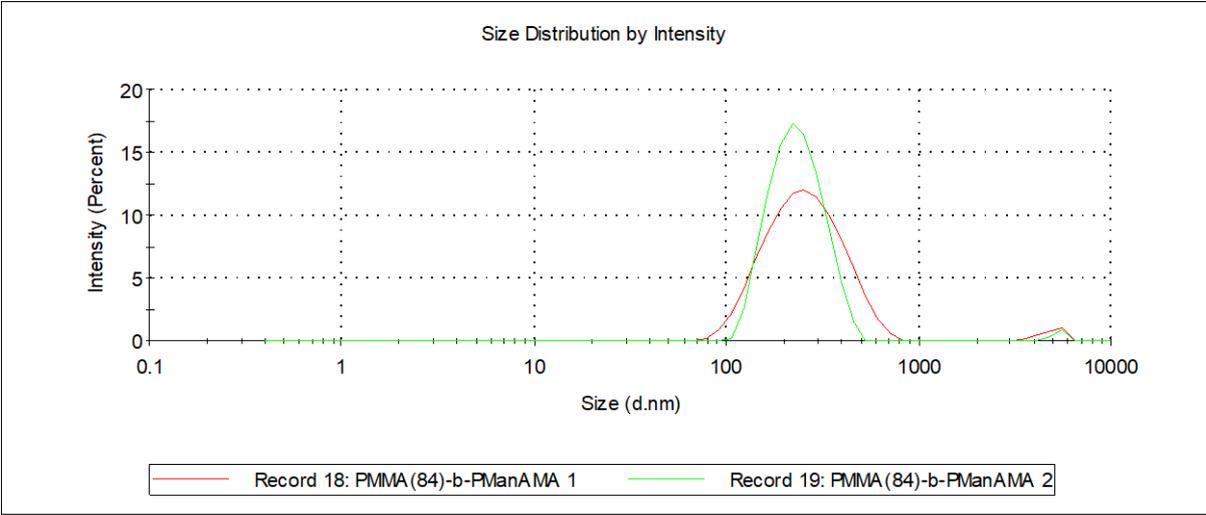


Abbildung 80: DLS-Messung von PMMA₈₄-b-PManAMA, Größenverteilung der Intensität und der Korrelationsgraph.

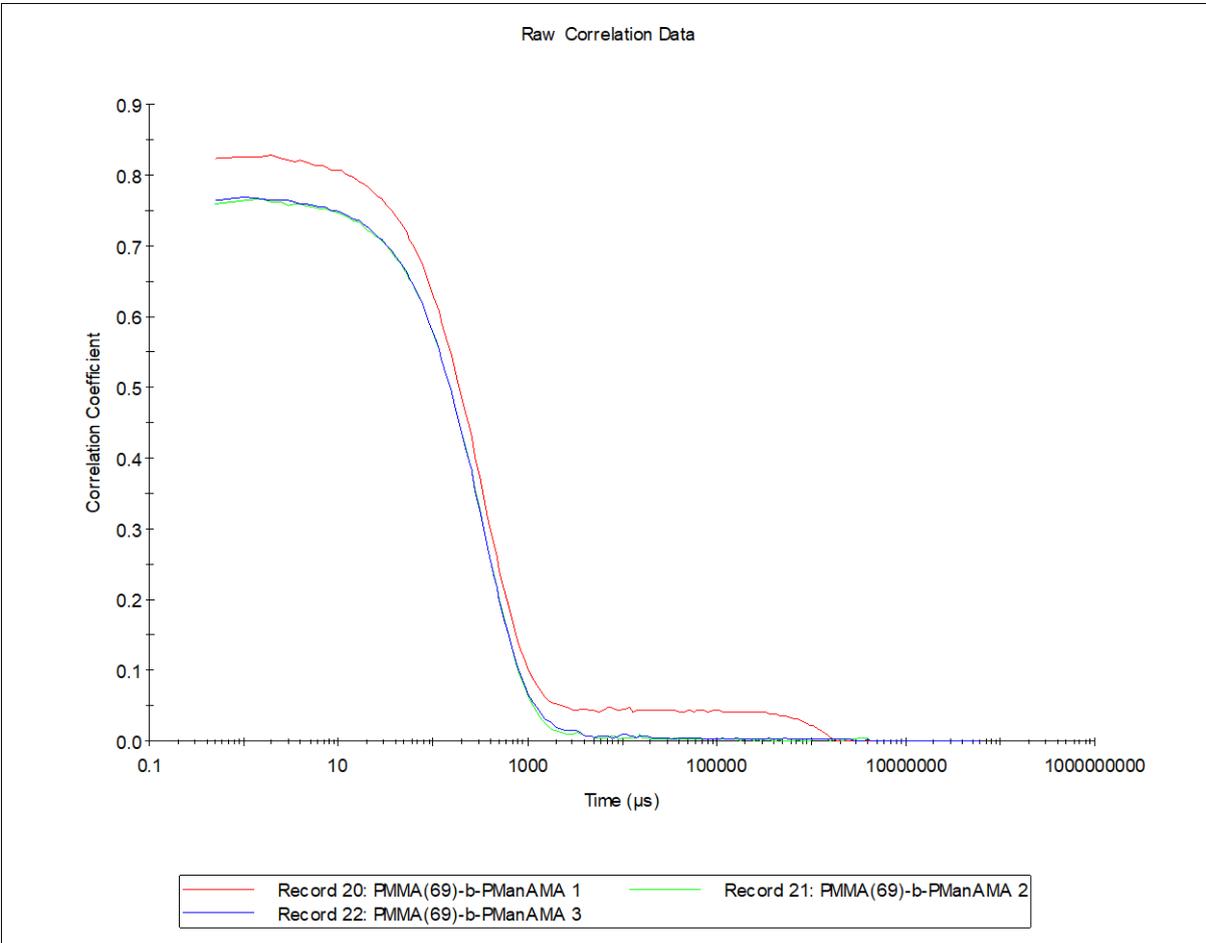
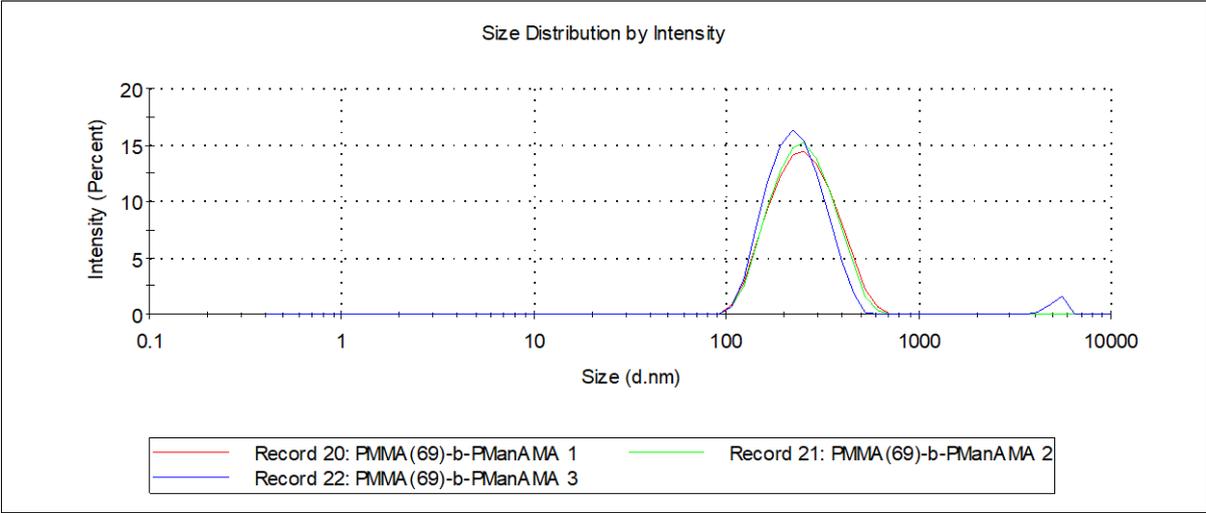


Abbildung 81: DLS-Messung von PMMA₆₉-*b*-PManAMA, Größenverteilung der Intensität und der Korrelationsgraph.

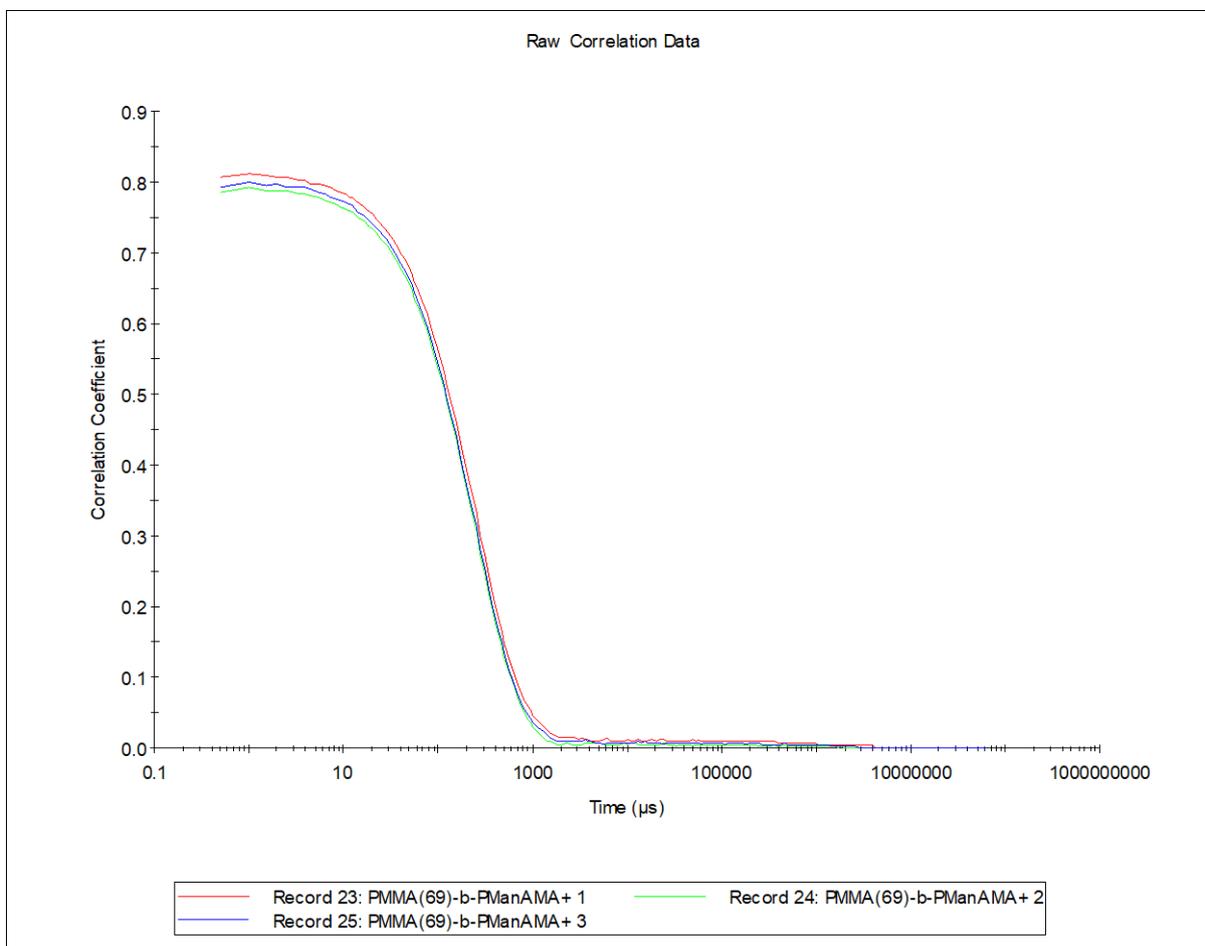
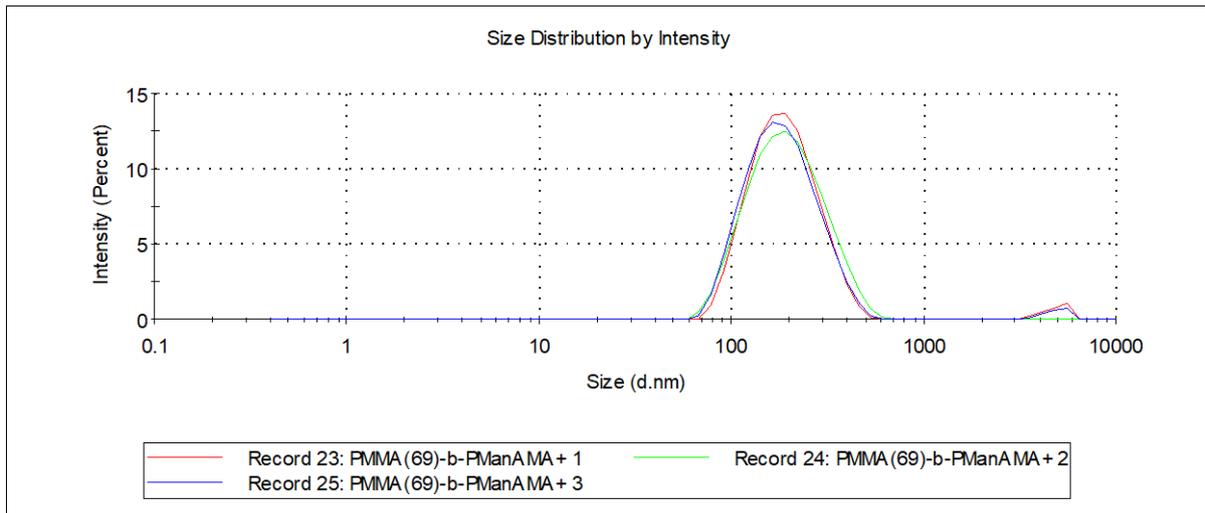


Abbildung 82: DLS-Messung von PMMA₆₉-b-PManAMA+, Größenverteilung der Intensität und der Korrelationsgraph.

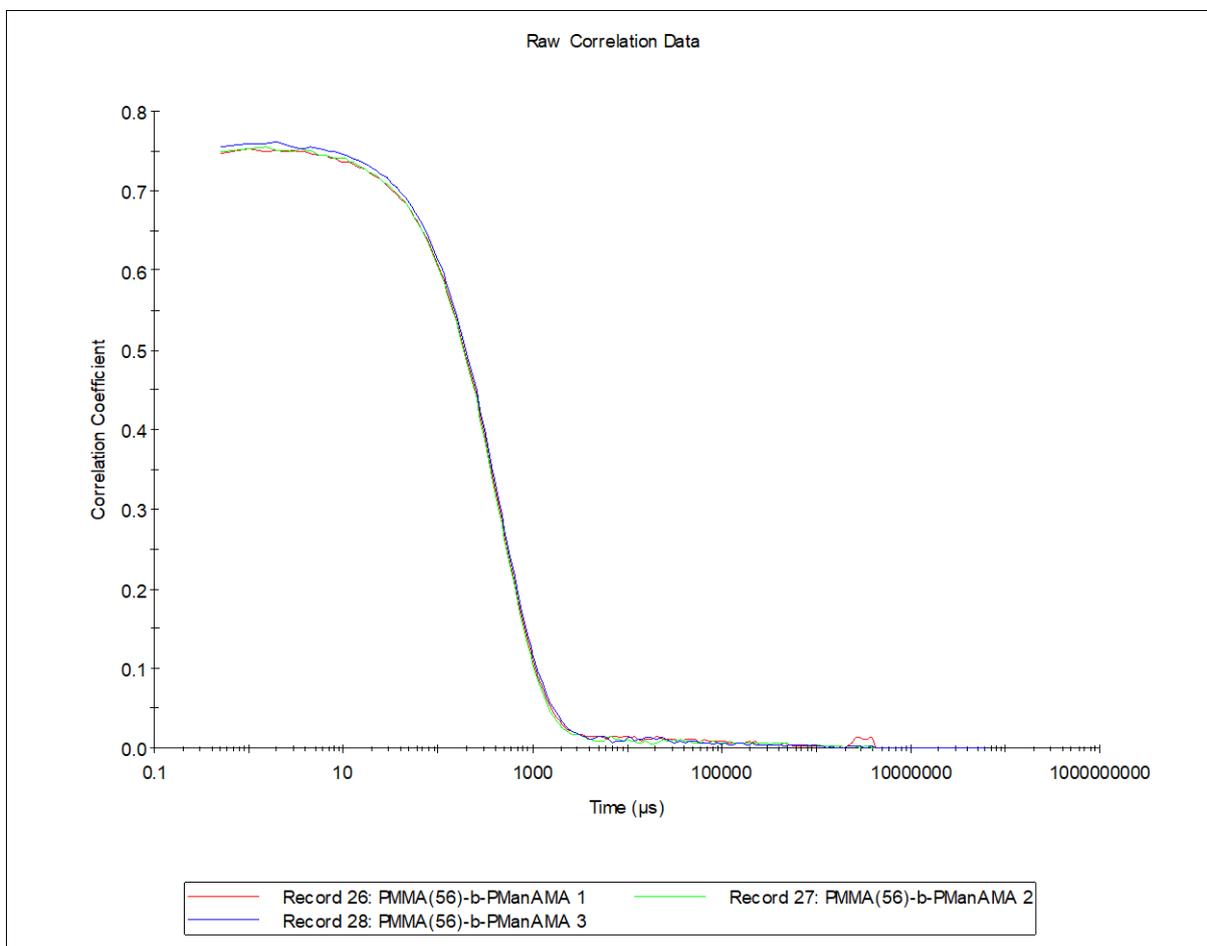
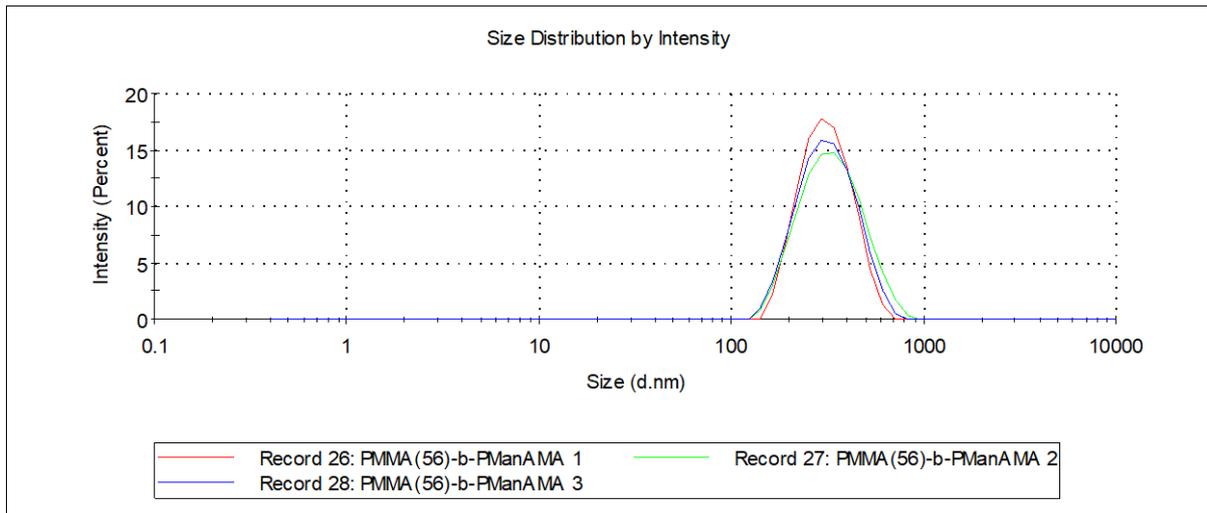


Abbildung 83: DLS-Messung von PMMA₅₆-*b*-PManAMA, Größenverteilung der Intensität und der Korrelationsgraph.

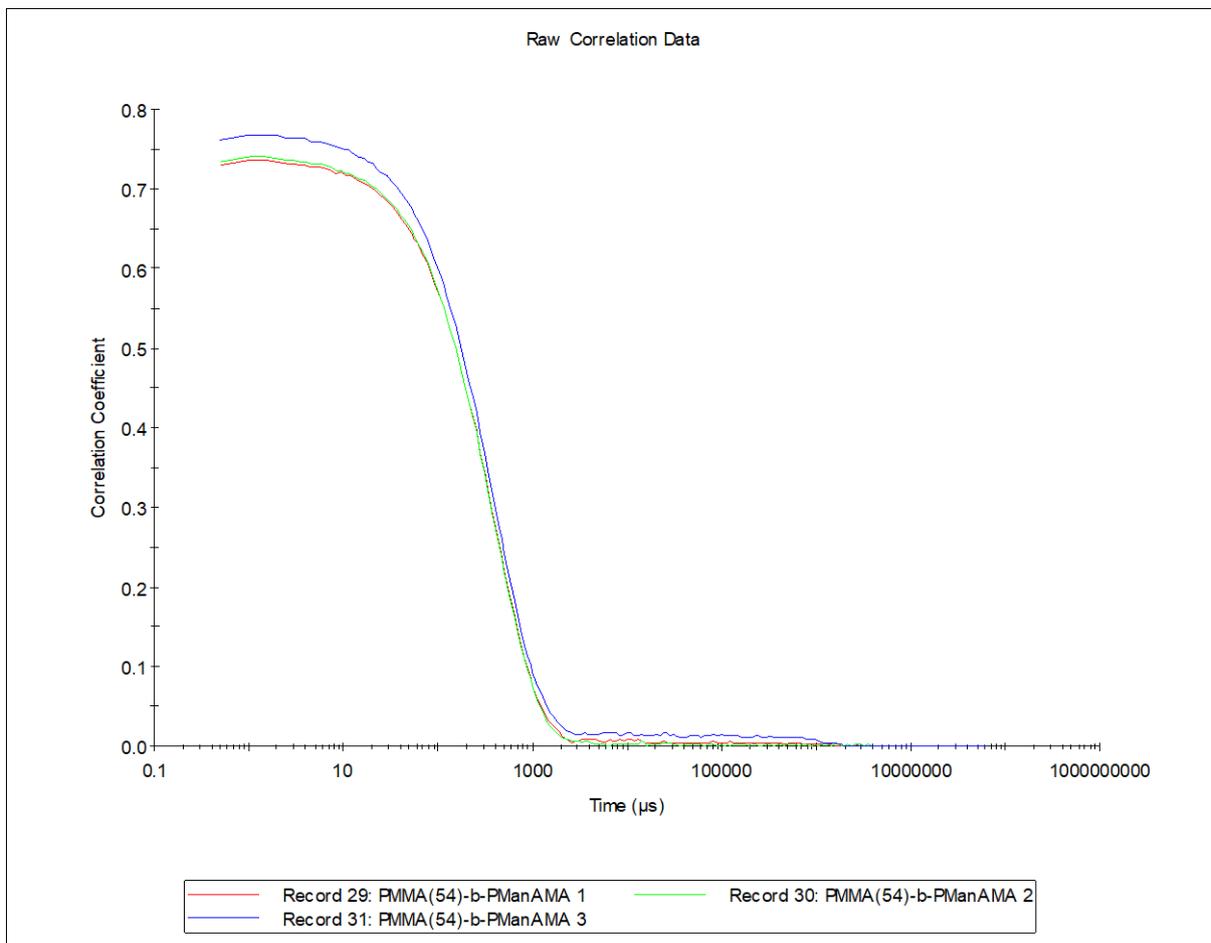
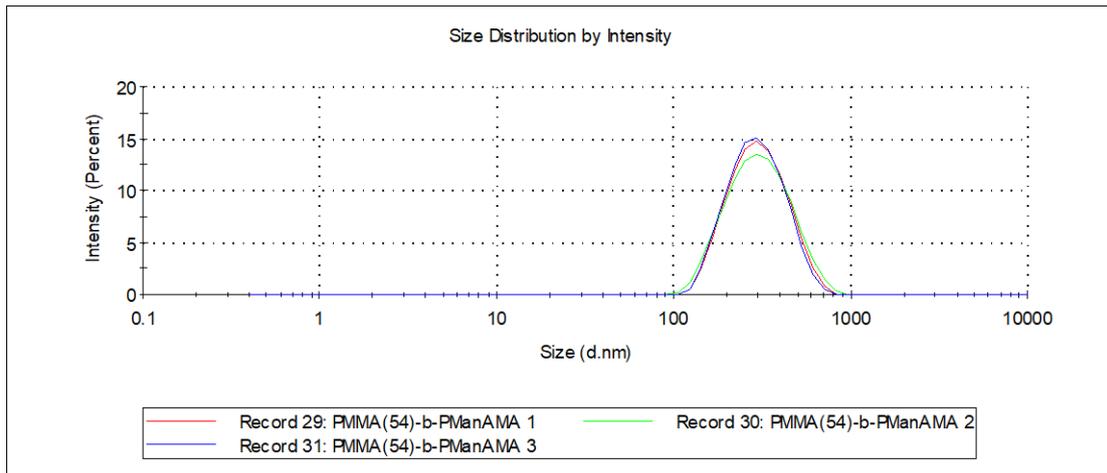


Abbildung 84: DLS-Messung von PMMA₅₄-b-PManAMA, Größenverteilung der Intensität und der Korrelationsgraph.

8.4. Glykopolymere auf Oberflächen

Mikroring-Resonator

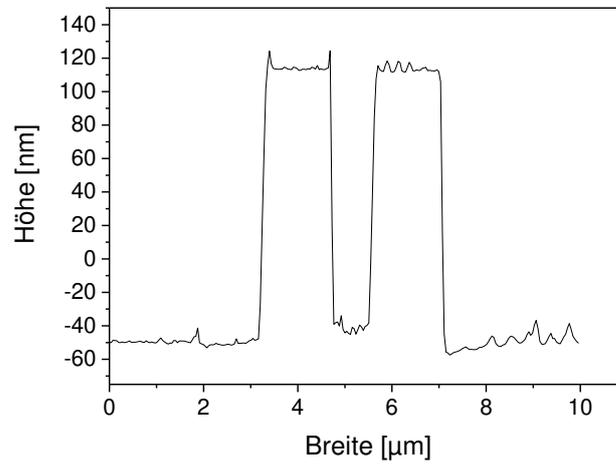
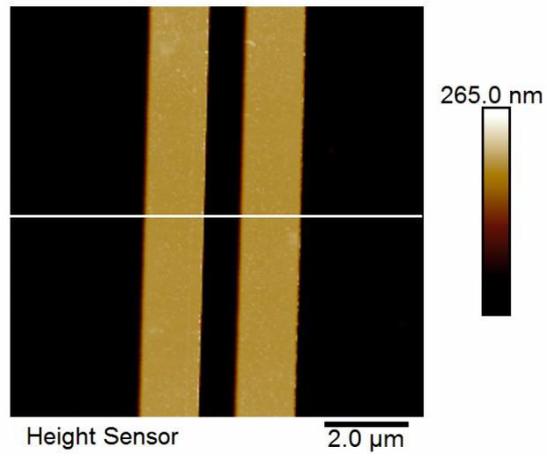


Abbildung 85: SFM-Höhenbild und Höhenprofil des Mikroring-Resonators.

PHEMA auf der Goldoberfläche

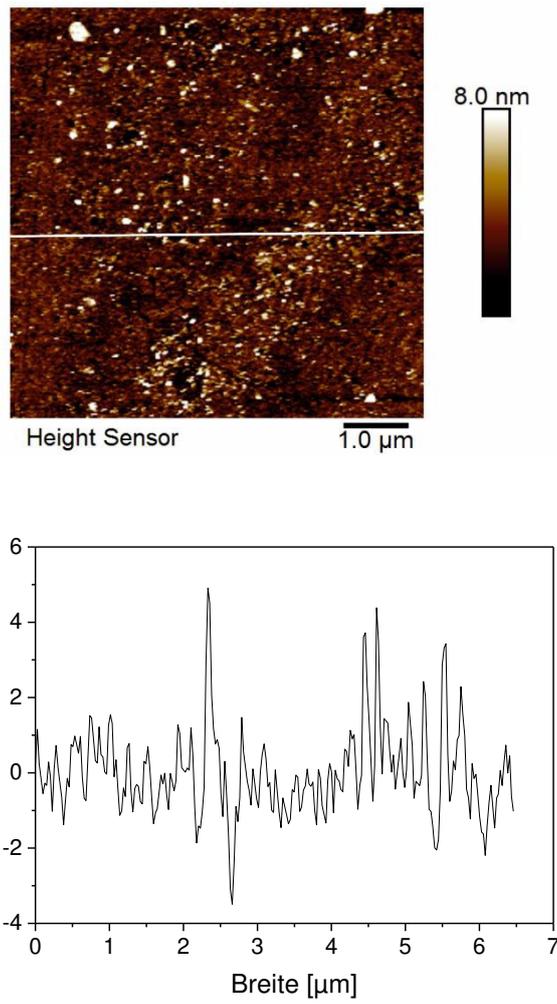


Abbildung 86: SFM-Höhenbild und Höhenprofil einer mit PHEMA-beschichteten Goldoberfläche. Die Aufnahmen wurden im trockenen Zustand gemacht. Die weiße Linie gibt den Bereich an, in dem das Höhenprofil aufgenommen wurde.

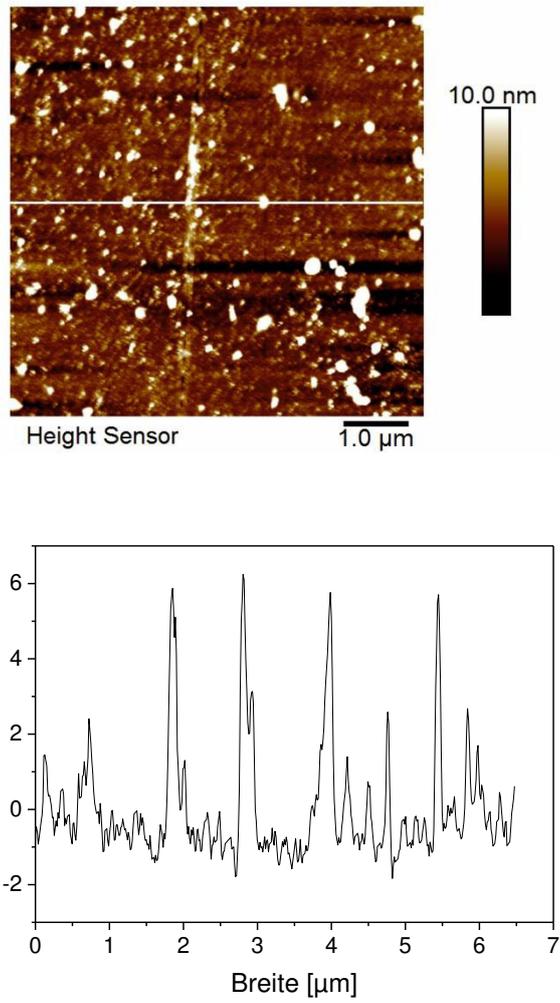


Abbildung 87: SFM-Höhenbild und Höhenprofil einer mit PHEMA-beschichteten Goldoberfläche. Die Aufnahmen wurden im nassen Zustand gemacht. Die weiße Linie gibt den Bereich an, in dem das Höhenprofil aufgenommen wurde.

PManAMA auf der Goldoberfläche

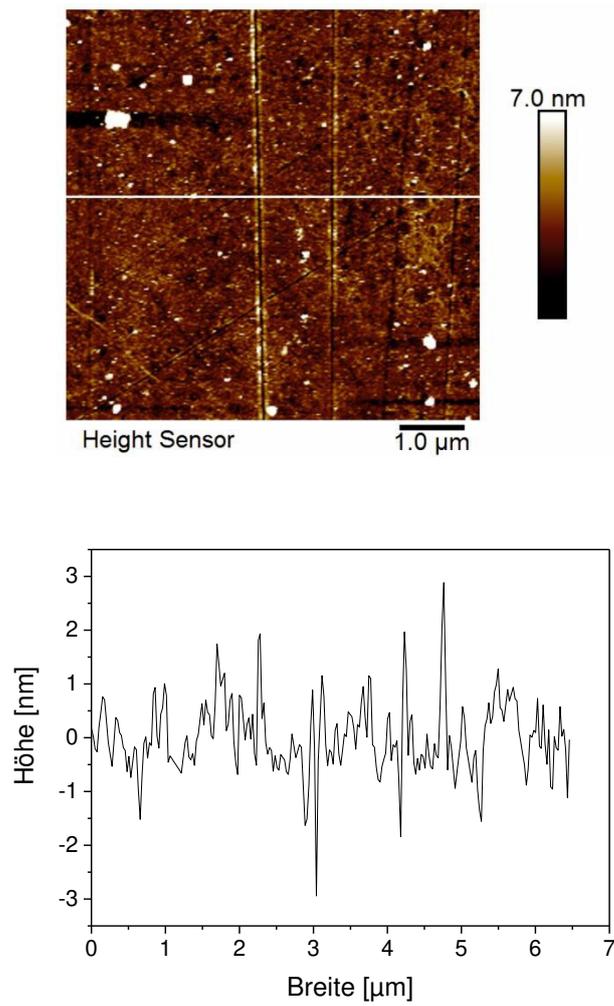


Abbildung 88: SFM-Höhenbild und Höhenprofil einer mit PManAMA-beschichteten Goldoberfläche. Die Aufnahmen wurden im trockenen Zustand gemacht. Die weiße Linie gibt den Bereich an, in dem das Höhenprofil aufgenommen wurde.

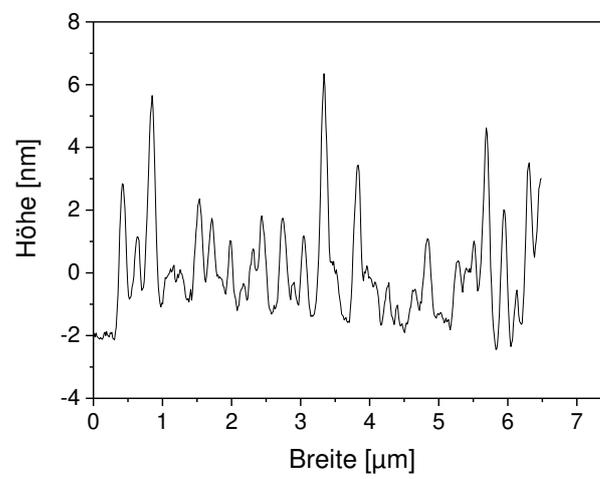
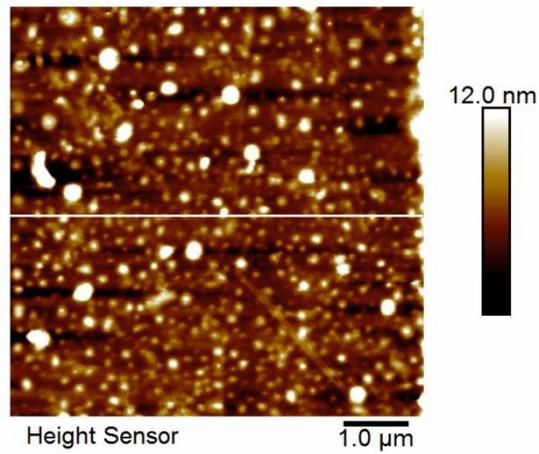


Abbildung 89: SFM-Höhenbild und Höhenprofil einer mit PManAMA-beschichteten Goldoberfläche. Die Aufnahmen wurden im nassen Zustand gemacht. Die weiße Linie gibt den Bereich an, in dem das Höhenprofil aufgenommen wurde.