

Technische Universität München  
Fakultät für Chemie  
Lehrstuhl für Makromolekulare Stoffe

# **Design und Synthese von multifunktionellen Polymeren als Träger für immunstimulierende DNA**

Daniel Käsmayr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

## **Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

*Vorsitzender:* Univ.-Prof. Dr. K. Köhler  
*Prüfer der Dissertation:* 1. Univ.-Prof. Dr. O. Nuyken, i. R.  
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Die Dissertation wurde am 14. September 2006 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 25. Oktober 2006  
angenommen.







für meine Eltern



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 2002 bis September 2006 am Lehrstuhl für Makromolekulare Stoffe an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. O. Nuyken angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr.-Ing. Oskar Nuyken* für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Im Besonderen möchte ich mich für das mir stets entgegengebrachte Vertrauen, die grosszügige Bereitstellung aller nötigen Mittel sowie die grenzenlose Freiheit bei der Bearbeitung meines Themas bedanken.

Bei Herrn *Dr. Ralf Weberskirch* bedanke ich mich für seine intensive Betreuung, zahlreiche Diskussionen und seine Ermutigungen in schwierigen Phasen der Arbeit.

Herrn *Prof. Dr. Gunther Hartmann* danke ich für sein Interesse, seine Anregungen, zahlreiche Diskussionen zu immunologischen Fragestellungen sowie die Bereitstellung aller nötigen Mittel.

Frau *Dr.-Ing. Heidi Samarian* danke ich für den freundschaftlichen Umgang, zahllose Diskussionen und Unterhaltungen zu allen Themen, besonders aber auch für ihre große Hilfsbereitschaft und ihre unermüdliche Unterstützung am Lehrstuhl für Makromolekulare Stoffe.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Stefan Endres* von der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Ludwig-Maximilians-Universität München für seine Unterstützung. Ein grosser Teil dieser Arbeit entstand in seinen Labors im Keller des Bettenhauses der Medizinischen Klinik.

Ebenso danke ich Herrn *Dr. Martin Bidlingmaier* und Herrn *Dr. Jörg Eppinger* für die jeweilige Bereitstellung ihrer chromatographischen Anlagen.

Meinen Laborkollegen *Dr. Anton Förtig*, *Dr. Karin Lüdtke*, *Dr. Tobias Zarka* und *Alexander Kurek* danke ich für die angenehme und freundschaftliche Laboratmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft in allen Lagen.

Meinen Kollegen von der Abteilung für Klinische Pharmakologie möchte ich ebenfalls für die tolle Arbeitsatmosphäre danken, welche mir die Zeit im „Exil“ immer versüßt hat. Besonders danken möchte ich den Apothekerinnen *Christine Richter* und *Meike Schäfer* für ihre Unterstützung in allen Lagen und ihre Freundschaft. Grosser Dank gebührt auch *Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding*, *Dr. Veit Hornung* und *Rosemarie Kiefl*.

Darüberhinaus gebührt allen *Makros* Dank für die schöne Zeit am Lehrstuhl, insbesondere für die vielen lehrreichen und unterhaltsamen Kaffeepausen und *Bullshit-Kinoabende*.

Bei *Gerhard Richter*, *Bernd Diebl*, *Philipp Pitschi* und *Silvana Rach* bedanke ich mich für ihre Mitarbeit im Labor in Garching und bei *Konstanze Hanusch* und *Alexandra Rehn* für ihre Mithilfe in den Labors links der Isar.

Den Firmen *Polymer Laboratories* und *Shodex* danke ich für die kostenfreie Überlassung von Säulen für die Chromatographie. Besonders danke ich Herrn *Dr. Thomas Kaiser* für seine Geduld und viele Ratschläge.

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion im Rahmen eines Promotionsstipendiums danke ich dem *Freistaat Bayern* sowie dem *Landkreis Dachau* und der *Landeshauptstadt München* für das zusätzlich gewährte Wohngeld.

*Paul Mazac* danke ich für seine Freundschaft während der letzten Jahre und all die wilden Unternehmungen, die wir zusammen erlebt und geschaffen haben.

Sehr großer Dank gebührt auch *Susanne Seefried* für ihre Liebe und Unterstützung in den dunkelsten Phasen, vor allem aber für ihren Beitrag an den schönsten Zeiten! ♡

Schließlich gebührt der größte Dank meinen Eltern, welche mich immer unterstützten und mir dieses Leben, samt Studium und Promotion, ermöglicht haben.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Vorbemerkung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>II</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Grundlegende Konzepte</b>	<b>9</b>
3.1	Allgemeiner Überblick . . . . .	9
3.1.1	Der Ursprung der Immunologie als Wissenschaft . . . . .	9
3.1.2	Das humane Immunsystem . . . . .	10
3.1.3	Evolution . . . . .	10
3.2	Die Zellen des Immunsystems . . . . .	12
3.2.1	Leukozyten (Weiße Blutzellen) . . . . .	12
3.3	Das angeborene Immunsystem . . . . .	16
3.3.1	Aufgabe und Funktion . . . . .	16
3.3.2	Erkennung von Fremdkörpern durch Mustererkennung . . . . .	20
3.3.3	Modulation der Immunantwort . . . . .	22
3.4	Das adaptive Immunsystem . . . . .	24
3.4.1	Funktion der T-Zellen . . . . .	25
3.4.2	Funktion der B-Zellen . . . . .	26
3.4.3	Antikörper . . . . .	26
3.5	Immunstimulierende DNA . . . . .	27
3.5.1	Struktur . . . . .	28
3.5.2	Verschiedene Typen . . . . .	29
3.5.3	Verschiedene Wirkungen . . . . .	32
3.5.4	Antivirale Immunantwort durch Interferone . . . . .	33
3.6	Membrantransport . . . . .	34
3.6.1	Transmembran-Transport . . . . .	35
3.6.2	Endozytose . . . . .	35
3.6.3	Wege zur Aufnahme von DNA in eine Zelle . . . . .	38
3.7	Multi-/Polyvalente Effekte . . . . .	39
3.7.1	Beispiele aus der Humanbiologie . . . . .	40
3.7.2	Thermodynamik . . . . .	40

3.7.3	Funktionelle Vorteile polyvalenter Wechselwirkungen . . . . .	42
<b>4</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>45</b>
4.1	Adsorption von CpG-DNA an Poly(styrol)-Partikeln . . . . .	45
4.1.1	Kationische Poly(styrol)-Partikeln . . . . .	45
4.1.2	Mögliche Ursachen – Hypothesen . . . . .	45
4.2	Multifunktionelle Polymere als Träger für Typ-B Oligonukleotide . . . . .	46
<b>III</b>	<b>Ergebnisse &amp; Diskussion</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse &amp; Diskussion</b>	<b>51</b>
5.1	Analyse der Aufgabenstellung . . . . .	51
5.2	Evaluierung der bekannten Systeme für DNA-Transport . . . . .	52
5.3	Konzept: Design der Polymere . . . . .	53
5.3.1	Konzept . . . . .	54
5.3.2	Poly-(2-Oxazolin)e . . . . .	54
5.3.3	Polymerarchitekturen . . . . .	57
5.3.4	Zielsetzung: Polymerarchitekturen . . . . .	58
5.3.5	Kupplungsmöglichkeiten . . . . .	59
5.4	Die Bestandteile der hergestellten Polymere . . . . .	62
5.5	Synthese der Monomere . . . . .	63
5.6	Synthese der Initiatoren . . . . .	65
5.6.1	Initiatoren für Sternpolymere . . . . .	65
5.6.2	Initiatoren für Bürstenpolymere . . . . .	69
5.7	Synthese der Terminationsreagenzien . . . . .	72
5.8	Synthese der Polymere . . . . .	73
5.8.1	Bemerkung zur Nomenklatur . . . . .	73
5.8.2	Bemerkungen zur Termination . . . . .	75
5.8.3	Lineare Polymere . . . . .	76
5.8.4	Sternpolymere . . . . .	81
5.8.5	Bürstenpolymere . . . . .	84
5.9	Gelelektrophorese von Poly(2-Oxazolin)en . . . . .	86
5.9.1	Grundlegende Gedanken . . . . .	86
5.9.2	Wirkungsprinzip . . . . .	87
5.9.3	Methoden zur Trennung . . . . .	90
5.9.4	Methoden zur Detektion . . . . .	92
5.9.5	Vergleich der Methoden . . . . .	102
5.10	Kupplung von DNA an die Polymere . . . . .	104
5.10.1	Reaktion einer Thiol-Gruppe mit einem Maleinimid . . . . .	104
5.10.2	Reaktion einer Carbonsäure- mit einer Amino-Gruppe . . . . .	110
5.10.3	Präparative Reinigung der Konjugate . . . . .	121
5.10.4	Zusammenfassung der Kupplungsexperimente . . . . .	122
5.11	<i>in vitro</i> -Ergebnisse . . . . .	123

5.11.1 Toxizität . . . . .	123
5.11.2 Erste immunologische Ergebnisse . . . . .	124
<b>IV Zusammenfassung &amp; Ausblick</b>	<b>131</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>133</b>
<b>7 Summary</b>	<b>139</b>
<b>8 Ausblick</b>	<b>143</b>
<b>V Experimentalteil</b>	<b>147</b>
<b>9 Verwendete Stoffe</b>	<b>149</b>
9.1 Grundchemikalien . . . . .	149
9.2 Biochemische Reagenzien . . . . .	149
9.3 Blutproben . . . . .	150
<b>10 Geräte und Hilfsmittel</b>	<b>153</b>
<b>11 Verwendete Methoden</b>	<b>157</b>
11.1 Gelelektrophoresen . . . . .	157
11.1.1 Elektrophorese . . . . .	157
11.1.2 Gelelektrophorese . . . . .	158
11.1.3 Native Methoden . . . . .	160
11.1.4 Denaturierende Methoden . . . . .	165
11.1.5 Visualisierung der Gel-Banden . . . . .	166
11.2 Präparative Gelfiltration . . . . .	168
11.2.1 Verwendete Materialien . . . . .	168
11.2.2 Vorgehensweise . . . . .	168
11.3 Ultrafiltration . . . . .	169
11.4 Entschützen der Thiolgruppen an der DNA . . . . .	170
11.4.1 mit DTT . . . . .	170
11.4.2 mit REDUCTACRYL . . . . .	170
11.5 Zellversuche . . . . .	171
11.5.1 Bestimmung der Zellkonzentration mittels Trypanblau-Färbung . . . . .	171
11.5.2 Isolierung von PBMC . . . . .	171
11.5.3 Zellkultur . . . . .	173
11.5.4 Hämolytischer Assay . . . . .	173
11.5.5 Bestimmung der Zytokin-Sekretion mit einem ELISA . . . . .	173
<b>12 Synthesen</b>	<b>177</b>
12.1 Synthese der Monomeren . . . . .	177

## Inhaltsverzeichnis

12.1.1	<i>N</i> -Boc-6-Aminohexansäure	177
12.1.2	<i>N</i> -Boc-6-Aminohexansäure-2-Chlorethylamid	178
12.1.3	2-( <i>N</i> -Boc-5-Aminohexyl)-2-Oxazolin	178
12.1.4	Bernsteinsäuremonomethylester-2-chlorethylamid	179
12.1.5	2-(Propionsäuremethylester)-2-oxazolin	180
12.1.6	Adipinsäuremonomethylester-2-chlorethylamid	180
12.1.7	2-Pentansäuremethylester-2-oxazolin	181
12.1.8	2-Ethylphenyl-2-oxazolin	181
12.2	Synthese der Terminatoren	182
12.2.1	<i>N</i> -Maleinsäuremonoamido-6-aminohexansäure	182
12.2.2	<i>N</i> -Maleinimido-6-aminohexansäure	183
12.2.3	<i>N</i> -Boc-Piperazin	183
12.2.4	<i>N</i> -Boc-4-Aminobenzoessäure	184
12.2.5	4-Maleinsäuremonoamido-Benzoesäure	185
12.2.6	4-Maleinimido-Benzoesäure	185
12.3	Synthese der Initiatoren	187
12.3.1	Pentaerythritol-tetrakis(triflat)	187
12.3.2	<i>N</i> -Methyl-methyloxazolinium-triflat	187
12.3.3	Lineare Makroinitiatoren auf Basis von <i>PS-stat-CMS</i>	188
12.4	Weitere niedermolekulare Verbindungen	189
12.4.1	3-Maleinimido-propansäure-succinimid	189
12.4.2	3-Maleinimido-buttersäure-succinimid	190
12.5	Synthese der Polymere	191
12.5.1	Polymerisation von 2-Oxazolinen	191
12.5.2	Bürstenpolymere	192
12.6	Polymeranaloge Entschützung der Polymere	193
12.6.1	Polymeranaloge Entschützung der Boc-Gruppe	193
12.6.2	Hydrolyse der Ester-Gruppe	193
12.7	Kupplungsexperimente	194
12.7.1	Kupplung von DNA mit einer Thiolgruppe an Polymere	194
12.7.2	Kupplung von DNA mit einer Aminogruppe an Polymere	194
<b>VI</b>	<b>Anhang</b>	<b>197</b>
<b>A</b>	<b>Rezepturen</b>	<b>199</b>
<b>B</b>	<b>Protokolle &amp; Vorschriften</b>	<b>203</b>
<b>C</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>205</b>
<b>D</b>	<b>Originaldaten und Übersichten</b>	<b>207</b>
<b>E</b>	<b>Übersicht: relevante Strukturformeln</b>	<b>215</b>

**Wichtige Begriffe aus der Immunologie**

**217**



# Abbildungsverzeichnis

3.1	Organe des Immunsystems . . . . .	11
3.2	Schematischer Stammbaum der Immunzellen. . . . .	14
3.3	Zeitskala der verschiedenen Immunantworten. . . . .	17
3.4	Schematische Zeichnung eines einfachen Antikörpers. . . . .	27
3.5	Chemische Struktur eines CpG-Motivs. . . . .	28
3.6	Schematische Zeichnung der Strukturmerkmale der drei unterschiedlichen Typen von CpG-DNA. . . . .	29
3.7	Hoogsteen-Basenpaarung in G-Tetraden. . . . .	30
3.8	Schemazeichnung zum Membrantransport. . . . .	34
3.9	Clathrin-vermittelte Endozytose. . . . .	37
4.1	Schematische Darstellung der möglichen strukturellen Ursachen der veränderten Wirkung des Oligonukleotids 2006, welches auf Poly(styrol)-Partikeln gebunden wurde. . . . .	46
4.2	Schematische Darstellung der Zielstruktur eines multifunktionellen Trägerpolymers. . . . .	47
5.1	Mechanismus der Polymerisation von 2-Alkyl-2-Oxazolinen. . . . .	56
5.2	Vergleich der Strukturmerkmale, die in der Mikro- bzw. der Makrostruktur betrachtet werden. . . . .	57
5.3	Mögliche Architekturen für DNA-Polymer-Konjugate . . . . .	58
5.4	Mögliche Methoden zur Kupplungen der DNA an die Polymere. . . . .	61
5.5	Allgemeiner Zugang zu 2-Alkyl-2-Oxazolinen. . . . .	63
5.6	Synthese-Schema des säurefunktionalisierten Monomers ( <b>MO2</b> ). . . . .	64
5.7	Synthese-Schema des aminfunktionalisierten Monomers ( <b>MN</b> ). . . . .	65
5.8	<sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (300.13 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) der Verbindung ( <b>MN</b> ). . . . .	66
5.9	Synthese-Schema des UV-aktiven Monomers ( <b>MF</b> ). . . . .	67
5.10	<sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (300.13 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) der Verbindung ( <b>MF</b> ). . . . .	67
5.11	Synthese-Schema des vierfach funktionalisierten Initiators ( <b>I4</b> ). . . . .	68
5.12	Schematische Darstellung der versuchten Synthesen, um Initiatoren mit >10 Triflat-Gruppen zu erzeugen. . . . .	68
5.13	Synthese-Schema der Makroinitiatoren ( <b>Mi80</b> ) und ( <b>Mi50</b> ). . . . .	70
5.14	<sup>1</sup> H-NMR-Spektrum (300.13 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) von ( <b>Mi50</b> ). . . . .	71
5.15	Synthese-Schema des Terminationsreagenz mit einer Maleinimidfunktion ( <b>TS</b> ). . . . .	72
5.16	Synthese-Schema des aromatischen Terminationsreagenzes mit einer Maleinimidfunktion ( <b>TSar</b> ). . . . .	73

## Abbildungsverzeichnis

5.17	Synthese-Schema des am Amin geschützten Terminationsreagenzes ( <b>1</b> ) . . . . .	73
5.18	Schema zur Erläuterung der deskriptiven Polymer-Nomenklatur. . . . .	74
5.19	Termination der Polymerisation; verwendete Reagenzien und deren relative Mengen . . . . .	76
5.20	Synthese des säurefunktionalisierten, linearen Polymers ( <b>L8*</b> ) (geschützt) bzw. ( <b>L8</b> ) (entschützt) mit UV-aktiven Gruppen. . . . .	77
5.21	Vergleich der <sup>1</sup> H-NMR-Spektren eines ester-geschützten Säurepolymers vor und nach der Entschützung . . . . .	79
5.22	Vergleich der <sup>1</sup> H-NMR-Spektren eines Boc-geschützten Aminopolymers vor und nach der Entschützung . . . . .	80
5.23	Molmassen und PDIs der Sternpolymere. . . . .	83
5.24	Schema zur Erklärung der Verbreiterung der Molmassenverteilung bei der Kupplung von DNA an die Polymere. . . . .	87
5.25	Schema zu Definitionen der verwendeten Begriffe in der Gelelektrophorese. . . . .	88
5.26	Schematische Darstellung der Detektion von UV-aktiven Polymerbanden. . . . .	93
5.27	SDS-AGE: Detektion mit UV-Licht. . . . .	94
5.28	Beispiel für eine Detektion mit dem Farbstoff <i>Coomassie-Brilliant-Blau</i> . . . . .	96
5.29	SDS-PAGE: Detektion mit Silber. . . . .	97
5.30	Fluoreszenzmarkierung von Amin-funktionalisierten Poly(2-Oxazolin)en. . . . .	98
5.31	SDS-PAGE: Detektion von TRITC-Polymer-Konjugaten. . . . .	99
5.32	SDS-PAGE, Stufen, TRITC/UV. . . . .	101
5.33	10 % SDS-PAGE der Sephadex-Fractionen; Detektion im UV. . . . .	102
5.34	Kupplung von Thiol-DNA an ein Polymer mit einer Acryl- bzw. einer Maleinimid-Funktion. . . . .	104
5.35	AGE einer Kupplung von Polymer-Maleinimid und Thiol-DNA mit einem FITC-Label. . . . .	107
5.36	Trivalente Linker von C. Richter. . . . .	108
5.37	Schematische Darstellung des Verhaltens von DNA-Bürsten oder -Sternen im elektrischen Feld. . . . .	109
5.38	Mechanismus Kupplungsreagenz BOP. . . . .	111
5.39	Schema der Kupplung von DNA an COOH-haltige Polymere mit BOP. . . . .	114
5.40	Zeitlicher Verlauf der Kupplung von DNA mit BOP als Kupplungsreagenz an Polymer ( <b>L8</b> ). . . . .	115
5.41	Plot der GPC-Elutionszeiten eines DNA-Standards. . . . .	119
5.42	GPC Elugramm eines DNA-Polymer-Konjugats. . . . .	120
5.43	Reinigung eines Kupplungsansatzes über Sephadex. . . . .	122
5.44	Hämolytischer Assay zur Bestimmung der Zell-lytischen Toxizität. . . . .	125
5.45	Schemazeichnung eines ELISAs. . . . .	127
5.46	Stimulation von IFN- $\alpha$ in PBMCs. . . . .	130
11.1	Chemische Struktur der Agarose. . . . .	159
11.2	Chemische Struktur der Poly(acrylamid)-Gelmatrix. . . . .	160
11.3	Poly(acrylamid)-Gele. . . . .	162
11.4	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	164



11.5	Coomassie Brilliant Blau. . . . .	166
11.6	Schematische Zeichnung der Versuchsanordnung für die Gelfiltration. . . . .	169
12.1	<i>N</i> -Boc-6-Aminohexansäure ( <b>2</b> ). . . . .	177
12.2	<i>N</i> -Boc-6-Aminohexansäure-2-Chlorethylamid ( <b>3</b> ). . . . .	178
12.3	2-( <i>N</i> -Boc-5-Aminohexyl)-2-Oxazolin ( <b>MN</b> ). . . . .	178
12.4	Bernsteinsäuremonomethylester-2-chlorethylamid ( <b>4</b> ). . . . .	179
12.5	2-(Propionsäuremethylester)-2-oxazolin ( <b>MO2</b> ). . . . .	180
12.6	Adipinsäuremonomethylester-2-chlorethylamid ( <b>5</b> ). . . . .	180
12.7	2-Pentansäuremethylester-2-oxazolin ( <b>MO4</b> ). . . . .	181
12.8	2-Ethylphenyl-2-oxazolin ( <b>MF</b> ). . . . .	181
12.9	<i>N</i> -Maleinsäuremonoamido-6-aminohexansäure ( <b>6</b> ). . . . .	182
12.10	<i>N</i> -Maleinimido-6-aminohexansäure ( <b>TS</b> ). . . . .	183
12.11	<i>N</i> -Boc-Piperazin ( <b>1</b> ). . . . .	183
12.12	<i>N</i> -Boc-4-Aminobenzoessäure ( <b>7</b> ). . . . .	184
12.13	4-Maleinsäuremonoamido-Benzoesäure ( <b>8</b> ). . . . .	185
12.14	4-Maleinimido-Benzoesäure ( <b>TSar</b> ). . . . .	185
12.15	Pentaerythritol-tetrakis(triflat) ( <b>I4</b> ). . . . .	187
12.16	<i>N</i> -Methyl-methyloxazolinium-triflat ( <b>I1</b> ). . . . .	187
12.17	Linearer Makroinitiator PS- <i>stat</i> -CMS. . . . .	188
12.18	3-Maleinimido-propansäure-succinimid ( <b>9</b> ). . . . .	189
12.19	3-Maleinimido-buttersäure-succinimid ( <b>10</b> ). . . . .	190
12.20	Bürstenpolymere ( <b>11</b> ). . . . .	192
12.21	Schema zur Entschützung der Aminofunktion am Polymer. . . . .	193
12.22	Schema zur Entschützung der Carbonsäurefunktion am Polymer. . . . .	194
D.1	Zusammenhang $OD_{260}$ und Konzentration des Oligonukleotids 2006. . . . .	213



# Tabellenverzeichnis

3.1	Beispiele für Pathogene und deren Infektionswege. . . . .	18
3.2	Übersicht: Toll-like-Rezeptoren . . . . .	23
3.3	Typen von CpG-Oligonukleotiden. . . . .	31
5.1	Analytische Daten der beiden Makroinitiatoren ( <b>Mi80</b> ) und ( <b>Mi50</b> ). . . . .	71
5.2	Verwendete Kürzel für die Bausteine der Polymere. . . . .	75
5.3	Übliche Methoden zur Detektion von Biopolymeren in Gelen. . . . .	92
5.4	Vergleich der Methoden zur Detektion der Polymer-Banden im Gel. . . . .	103
5.5	Reaktionsansätze zur Kupplung des Oligonukleotids $\star$ -2006-SH an endständige Maleinimid- oder Acrylat-Gruppen. . . . .	105
5.6	Masse/Ladungs-Verhältnis der DNA-Polymer-Konjugate aus Abbildung 5.35	107
5.7	Porengrößen in Gelen für die Elektrophorese. . . . .	110
5.8	Reaktionsansatz zur Kupplung von 2006-NH <sub>2</sub> an die Carboxylgruppen des Polymers ( <b>L8</b> ); Reaktionsmedium war wasserfreies DMF. . . . .	112
5.9	Reaktionsansatz zur Kupplung von 2006-NH <sub>2</sub> an die Carboxylgruppen verschiedener Polymere mittels verschiedener Kupplungsreagenzien; Reaktionsmedium war wasserfreies DMF. . . . .	116
5.10	Liste der Elutionszeiten der gefundenen Peaks in der SEC. . . . .	117
5.11	Reaktionsansatz für die Gelfiltration. . . . .	121
5.12	Reaktionsansätze für die ersten Immunstimulationen. . . . .	128
9.1	Verwendete Oligonukleotide. . . . .	151
11.1	Trennbereiche bei Verwendung von Agarose-Gelen. . . . .	159
11.2	Trennbereiche bei Verwendung von Poly(acrylamid)-Gelen. . . . .	161
11.3	Sephadex zur Gelfiltration. . . . .	168
D.1	Liste der hergestellten linearen Polymere. . . . .	208
D.2	Liste der hergestellten Sternpolymere. . . . .	209
D.3	Liste der hergestellten Bürstenpolymere. . . . .	210
D.4	Elutionszeiten der DNA-Größenmarker in der wässrigen GPC. . . . .	211
D.5	Elutionszeiten der einzelnen Verbindungen als Reinstoffe gelöst in DMF in der wässrigen GPC. . . . .	211
D.6	Daten zur Abbildung 5.43. . . . .	212
D.7	Daten zur Abbildung D.1. . . . .	212



# Liste der Abkürzungen

AGE	Agarose-Gelelektrophorese
AIBA	Azobisisobutyroamidin ist ein Radikalinitiator mit einer protonierbaren Amidgruppe
AIBN	Azobisisobutyronitril
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK	Arbeitskreis
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zellen vor allem dendritische Zellen und Makrophagen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Attenuated Total Reflection
AU	Arbitrary Units
bis	Methylenbisacrylamid ist ein Vernetzer zur Herstellung von Poly(acrylamid)-Gelen.
Boc	t-Butyloxycarbonyl
BOP	(1-Benzotriazolyl)oxy tris(dimethylamino) Hexafluorophosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation Bezeichnung für Oberflächenrezeptoren.
CD4	Cluster of Differentiation 4, ein Zellmarker von T-Zellen; bindet MHC2-Moleküle.
CD8	Cluster of Differentiation 8, ein Zellmarker von T-Zellen; bindet MHC1-Moleküle.
CME	Clathrin Mediated Endocytosis

## Tabellenverzeichnis

CMS	$\alpha$ -Chlormethyl-Styrol
CpG	Allgemein verwendet für Oligonukleotide mit Cytosin-PO <sub>4</sub> (p)-Guanosin-Motiven
d	Dublett
Da	Dalton entspricht g/mol
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	dendritische Zelle (vom englischen <i>Dendritic Cell</i> )
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd-H <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser; entionisiertes Wasser; steriles Wasser.
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPE	1,1-Diphenylethylen
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (ein Kupplungsreagenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FG	Funktionelle Gruppe
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GPC	Gelpermeationschromatographie
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HIV	Human Immune Deficiency Virus
HOBT	1-Hydroxy-1H-Benzotriazol
HP	Hewlett Packard

HPLC	<b>H</b> igh <b>P</b> ressure/ <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography
HPLC-MS	<b>H</b> igh <b>P</b> ressure/ <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography in Kombination mit <b>M</b> ass <b>S</b> pectroscopy
HRP	Meerrettich-Peroxidase vom englischen <i><b>H</b>orseradish <b>P</b>eroxidase</i> .
IFN	<b>I</b> nterferon (eine Klasse von Zytokinen)
IFN- $\alpha$	Interferon $\alpha$
IL	<b>I</b> nterleukin (eine Klasse von Zytokinen)
kDa	Kilodalton entspricht $10^3$ g/mol
LMU	<b>L</b> udwig- <b>M</b> aximilians- <b>U</b> niversität
LPS	<b>L</b> ipopolysaccharid
LRR	<b>L</b> eucine <b>R</b> ich <b>R</b> epeats
m	Multipllett
MBS	<b>M</b> aleinimidobuttersäuresuccinimid
MHC	<b>M</b> ajor <b>H</b> istocompatibility <b>C</b> omplex
MPS	<b>M</b> aleinimidopropionsäuresuccinimid
NCA	<b>N</b> - <b>C</b> arboxy- <b>A</b> nhydrid
NHS	<b>N</b> - <b>H</b> ydroxysuccinimid
NMR	<b>N</b> uclear <b>M</b> agnetic <b>R</b> esonance
nt	<b>N</b> ukleotide
OD	<b>O</b> ptische <b>D</b> ichte
PAGE	<b>P</b> oly( <b>a</b> crylamid)- <b>G</b> elektrophorese
PAMAM	<b>P</b> oly( <b>a</b> mido <b>a</b> min)
PAMP	<b>P</b> athogen <b>A</b> ssociated <b>M</b> olecular <b>P</b> atterns
PBMC	<b>P</b> eripheral <b>B</b> lood <b>M</b> ononuclear <b>C</b> ells Mononukleare Zellen des peripheren Bluts
PBS	Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer vom englischen <i><b>P</b>hosphate <b>B</b>uffered <b>S</b>aline</i> .
PEI	<b>P</b> oly( <b>e</b> thylen <b>i</b> min)

## Tabellenverzeichnis

poly-K	Poly(L-Lysin) (der Einbuchstaben-Code für Lysin ist <b>K</b> )
ppm	<b>p</b> arts <b>p</b> er <b>m</b> illion
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
q	Quartett
RI	Brechungsindex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<b>R</b> oswell <b>P</b> ark <b>M</b> emorial <b>I</b> nstitute Die Abkürzung wird für ein Zellkulturmedium zur Kultur von normalen und neoplastischen Leukozyten sowie anderen humanen und tierischen Zelltypen verwendet.
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<b>S</b> ize <b>E</b> xclusion <b>C</b> hromatography
ssDNA	einzelsträngige DNA
t	Triplett
TAE	<b>T</b> ris/ <b>A</b> acetat/ <b>E</b> DTA (siehe Rezeptur <b>I</b> <sup>1</sup> )
TBE	<b>T</b> ris/ <b>B</b> orat/ <b>E</b> DTA (siehe Rezeptur <b>II</b> <sup>2</sup> )
TE	<b>T</b> ris/ <b>E</b> DTA-Puffer (siehe Rezeptur <b>IV</b> <sup>3</sup> )
TEA	<b>T</b> riethylamin
TEAA	<b>T</b> riethylammoniumacetat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - <b>T</b> etramethyldiamin Diese Abkürzung wird meist im biochemischen Kontext verwendet.
THF	<b>T</b> etrahydrofuran
TLR	<b>T</b> oll-like <b>R</b> ezeptor
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> - <b>T</b> etramethyldiamin eine andere Abkürzung für TEMED, welche meist im chemischen Kontext verwendet wird.

---

<sup>1</sup>Seite 199

<sup>2</sup>Seite 199

<sup>3</sup>Seite 199



Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	<b>T</b> etramethyl <b>r</b> hodamin- <b>i</b> sothiocyant ein roter Fluoreszenzfarbstoff
TUM	<b>T</b> echnische <b>U</b> niversität <b>M</b> ünchen
TWEEN	siehe TWEEN-20
TWEEN-20	ein polymeres ungeladenes Detergenz. Auch bekannt als <i>Polysorbat 20</i> , <i>PEG(20)sorbitan monolaurat</i> oder <i>Polyoxyethylenesorbitan monolaurat</i> .
UV	<b>U</b> ltraviolette <b>S</b> Licht mit Wellenlängen $< 400$ nm
Vis	sichtbares Licht der Wellenlängen 400 nmbis 800 nm
X	Abgangsgruppe



**Teil I**

**Einleitung**



# 1 Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit umspannt ein relativ breites Gebiet der Naturwissenschaften – von der präparativen organischen Chemie über die präparative Polymerchemie bis hin zur Immunbiologie. Im Folgenden wird daher ein breiterer Hintergrund dargestellt, als dies sonst üblich ist. Dabei wird versucht, die notwendigen Grundlagen der Immunologie sowie wichtige Konzepte zu erläutern, um das Verständnis für die immunologische Fragestellung zu erleichtern.

Zusätzlich ist im Experimentalteil ein Exkurs in die Methoden der Biochemie und Immunologie zu finden.

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. G. Hartmann (Abteilung für Klinische Pharmakologie, Klinikum Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München, seit 01/2006 Abteilung für Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn) sowie Herrn Prof. S. Endres (Abteilung für Klinische Pharmakologie, Klinikum Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt.

## **Hinweis**

Viele wichtige immunologische Begriffe sind in einem Anhang ab Seite [221](#) ausführlich erläutert.



## 2 Einleitung

Im Zeitalter der modernen Medizin und Pharmazie finden sich zahlreiche Ansätze zur Therapie von Krankheiten. Naturstoffe werden entdeckt und als Arzneien eingesetzt, und neue Inhibitoren für Enzyme werden durch aufwändige kombinatorische Verfahren im Labor entwickelt oder *in-silico*<sup>1</sup> mit Hilfe von neuesten Erkenntnissen der Proteinstrukturen und des *Molecular Modelings* entwickelt.

Die gesamte Pharmaindustrie sieht sich zunehmend unter Druck gesetzt: Patente laufen aus, neue Entwicklungen sind sehr teuer, die Investoren beharren auf hohen Renditen[1] und die öffentlichen Gesundheitssysteme haben immer weniger Geld, um die neuen, teuren Hi-Tech-Therapien zu finanzieren. Skandale über die Sicherheit von neuen Medikamenten sowie über Fälle von Korruption haben deutlich zum Schwinden des öffentlichen Ansehens der Branche beigetragen.[2] Daher stehen die Firmen vor dem Problem, immer höhere Forschungsausgaben mit teuren Preisen für Medikamente und Therapien ausgleichen zu müssen – bei einer zeitgleichen Reduktion der Mittel in den Krankenkassen. Gibt es Auswege aus dieser Kostenspirale?

Aktuelle Entwicklungen in der Pharmazie beschäftigen sich nicht nur mit der *Genomik*, der Studien des Humangenoms, sondern auch mit Individual-Genomen – zahlreiche Tests auf bestimmte defekte Gene sollen individuelle Risiken bestimmen und patientenspezifische Therapien und Vorsorgemaßnahmen aufzeigen. Ein weiteres aktuelles Gebiet der Forschung ist die *Proteomik*, welche sich nicht nur mit den Genen beschäftigt, sondern vor allem mit den daraus resultierenden Proteinen. Auch hier gibt es den Trend zur Individualmedizin – möglicherweise effizienter, aber durchaus teurer.

Ein großes Problem in den westlichen Zivilisationen ist nach wie vor die Bekämpfung von Tumorerkrankungen, bei denen gesundes Zellgewebe mutiert und unkontrolliert zu wachsen anfängt. Die üblichen Therapieansätze wie Operation, Bestrahlung und Chemotherapie werden angewandt und verbessert, jedoch setzt sich langsam auch die Erkenntnis durch, daß es vielleicht möglich wäre, die *Verteidigungsmechanismen des menschlichen Körpers* zu mobilisieren, um die, den Körper stark beanspruchenden, Therapien möglicherweise zu unterstützen oder sogar zu ersetzen. Mögliche Ansätze

---

<sup>1</sup>analog zu in vivo: im Computer

## 2 Einleitung

befassen sich z.B. mit einer *ex vivo* Aktivierung von Immunzellen gegen den Tumor, welche dann in Kombination mit einer Chemotherapie – bereits erfolgreich bei Mäusen – eingesetzt werden.[3] Alternativ können immunstimulierende Stoffe *in vivo* Immunzellen aktivieren und rekrutieren, um den Tumor zu bekämpfen.[4, 5]

Das Immunsystem ist nicht nur in der Tumorthherapie von Interesse für die Forschung. Besonders in den letzten Monaten war in der internationalen Presse immer wieder die Frage nach einem Impfstoff gegen die Vogelgrippe[6] angesprochen worden: nicht nur ein Impfstoff für Vögel sondern auch für Menschen gegen eine potentielle Chimäre eines humanen Grippevirus mit den letalen Folgen der Vogelgrippe sind gefordert. Durch Einsatz eines speziellen Vakzine-Adjuvanses gelang es der Firma *GlaxoSmithKline*, die übliche Menge eines Influenza-Antigens von etwa 30  $\mu\text{g}$  auf 3.8  $\mu\text{g}$  zu reduzieren – eine wichtige Voraussetzung zur Bekämpfung einer möglichen Grippe-Epidemie.[7]

Diese Adjuvanzen können Stoffe sein wie Aluminiumoxid, Extrakte aus Bakterien oder sogar auch Mineralöl<sup>2</sup>, wobei in den letzten Jahrzehnten elegantere und effektivere Adjuvanzen entdeckt wurden. So werden z.B. immunstimulierende DNA-Sequenzen (sogenannte CpG<sup>3</sup>-DNA<sup>4</sup>) als Adjuvanzen in der Vakzinierung verwendet.

Diese CpG-DNA ist ein potentes und vielseitiges Mittel zur Manipulation des Immunsystems. Verschiedene Typen dieser kurzkettigen, einzelsträngigen DNA können entweder eine anti-zelluläre<sup>5</sup> oder eine anti-partikuläre<sup>6</sup> Immunantwort auslösen. Auch als Gegenmittel bei Allergien und Autoimmunerkrankungen ist ein Einsatz denkbar.

Zum besseren individuellen Anpassung von immunologischen Tumorthapien und Impfstoffen ist es jedoch notwendig, die zugrunde liegenden Mechanismen der Aktivierung des Immunsystems besser als bisher zu verstehen. Immunstimulierende Substanzen als Adjuvanzen[8], müssen in Kombination mit Antigenen zu einem Stimulus verarbeitet werden, welcher eine gezielte Aktivierung des Immunsystems gegen dieses spezifische Antigen erreicht – ohne Nebenreaktionen zu verursachen.

Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, Grundlagen für ein polymeres Trägersystem zu entwickeln, welches die Erforschung der essentiellen und grundlegenden Aktivierung des Immunsystems erleichtern sollte.

---

<sup>2</sup>Mineralöl wird häufig als Adjuvans zur Produktion von Antikörpern in Tieren verwendet.

<sup>3</sup>Allgemein verwendet für Oligonukleotide mit Cytosin-PO<sub>4</sub>(p)-Guanosin-Motiven

<sup>4</sup>Desoxyribonukleinsäure

<sup>5</sup>Zytotoxische T-Zell-Antwort

<sup>6</sup>Humorale B-Zell-Antwort



**Teil II**

**Grundlagen**



# 3 Grundlegende Konzepte

Im Folgenden sollen zuerst die grundsätzliche Zusammenhänge der Immunologie erläutert werden, bevor dann – *in medias res* – die Aufmerksamkeit des Lesers auf weitere Details der Immunologie gelenkt wird.

Das folgende Kapitel 3.1 soll daher einen allgemeinen Überblick über die Entwicklung der Immunologie und ihrer Konzepte geben. In Kapitel 3.2 sind die aktiven Zellen des Immunsystems beschrieben. Anschließend folgen Beschreibungen der beiden Hauptklassen der Immunität: das angeborene, unspezifische Immunsystem ist in Kapitel 3.3 zu finden, während das adaptive Immunsystem in Kapitel 3.4 kurz erläutert ist.

Die im Titel der Arbeit genannte immunstimulierende DNA wird in Kapitel 3.5 beschrieben, wobei dort nicht nur die Strukturen und Wirkungen dargestellt sind, sondern auch weitere Erläuterungen zu den antiviralen Effekten einer Subklasse gegeben und mögliche Wege, wie die DNA von Immunzellen aufgenommen werden kann, aufgezeigt werden.

Ein weiteres Kapitel (3.6) widmet sich den verschiedenen Wegen, auf denen Zellen Stoffe aufnehmen können.

Abgeschlossen wird dieser Teil der Arbeit mit einem Exkurs über multi- bzw. polyvalente Wechselwirkungen (3.7) – ein Phänomen, welches viele Befunde der Immunologie und Biochemie erklären kann, aber auch in der Entwicklung von polymeren Therapeutika eine Rolle spielt.

## 3.1 Allgemeiner Überblick

### 3.1.1 Der Ursprung der Immunologie als Wissenschaft

Der Ursprung der Immunologie als Wissenschaft liegt in **Edward Jenner's** Entdeckung im Jahr 1796: Menschen, die an den harmlosen bovinen Pocken („vaccinia“) erkrankt waren, hatten einen natürlichen Schutz gegen die oft letale, humane Form der Pocken.<sup>[9]</sup> Er wendete die gezielte Infektion mit den harmlosen Kuhpocken erfolgreich an und konnte somit einen ersten immunologischen Schutz gegen eine Krankheit erreichen. **E. Jenner** nannte diesen Prozeß „Vakzinierung“; dieser Fachbegriff wird heute noch für den

### 3 Grundlegende Konzepte

Impfvorgang verwendet. Im Jahr 1979 verkündete die **World Health Organization** die Ausrottung der Pocken auf dem Globus – einer der großen Triumphe der modernen Medizin.[10]

Erst im späten 19. Jahrhundert entdeckte **Robert Koch**, daß infektiöse Krankheiten von Mikroorganismen verursacht werden.[11, 12] Heute werden diese sogenannten Pathogene in vier Kategorien eingeteilt: *Viren*, *Bakterien*, pathogene *Pilze* und andere, relativ große und komplexe, eukaryotische *Parasiten*.

Aus der Kombination der Erkenntnisse von **E. Jenner** und **R. Koch**, sowie anderer Mikrobiologen des späten 19. Jahrhunderts, wurden dann weitere Impfstoffe gegen andere Krankheiten entwickelt. So erfand **Louis Pasteur** in den 80er Jahren des 19. Jahrhunderts Impfstoffe gegen Cholera und Tollwut.[13, 14] Auf der Suche nach dem Wirkungsmechanismus für diese Impfstoffe entdeckten **Emil von Behring** und **Shibasaburo Kitasato** zehn Jahre später, daß im Blutserum Stoffe von „antitoxischer Aktivität“ – die Antikörper – enthalten sein mussten und deren Transfusion eine kurzzeitige Immunität übertragen konnte (passive Impfung).

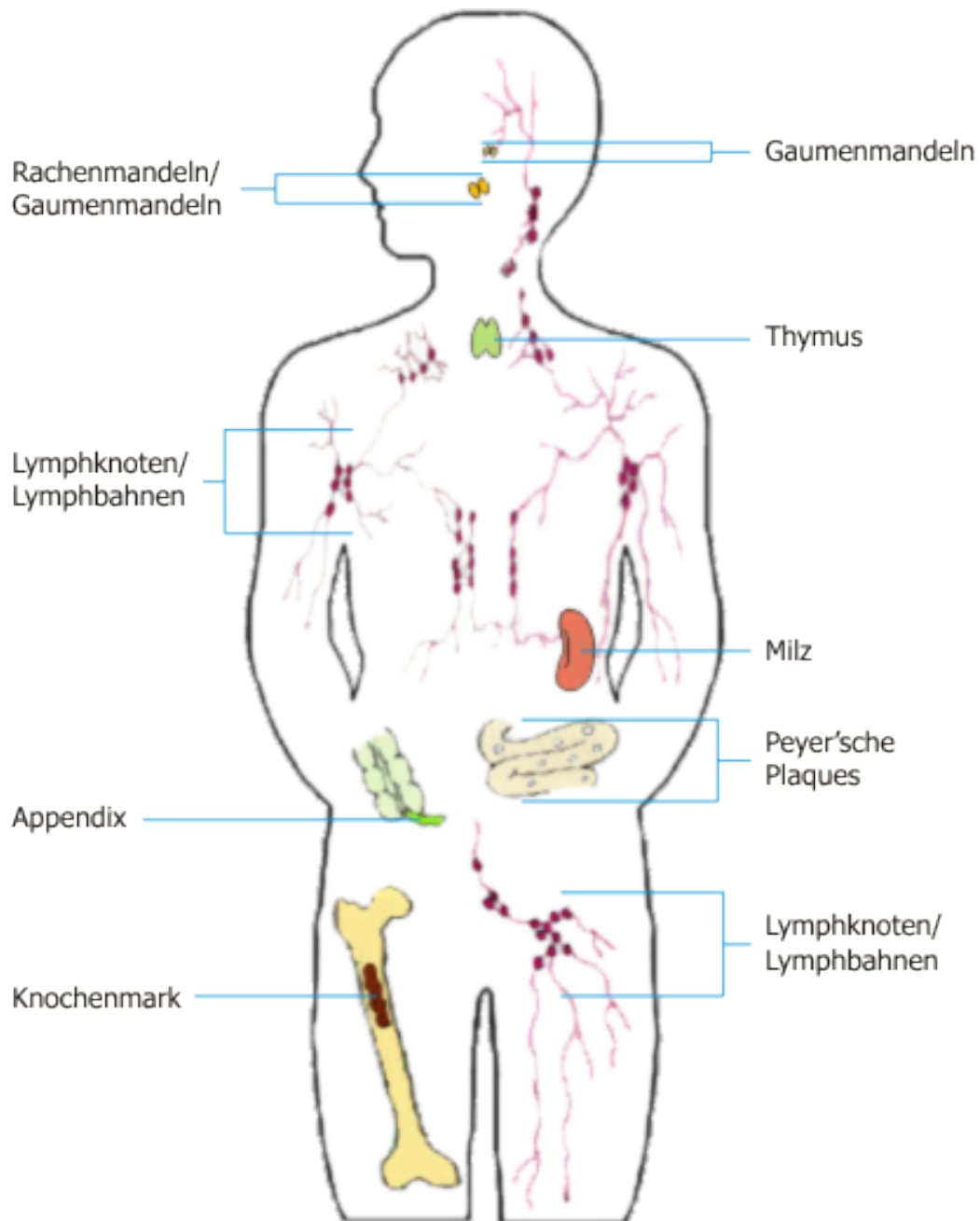
#### 3.1.2 Das humane Immunsystem

Das Immunsystem ist ein außerordentlich komplexes System aus Organen, Zellen, Molekülen und Mechanismen zur Verteidigung des Körpers gegen Infektionen durch Mikroorganismen, Viren und Parasiten, aber auch gegen fehlentwickelte Zellen, wie z.B. Tumorzellen. Die Unterscheidung zwischen „fremd“ und „selbst“ bzw. zwischen „gefährlich“ und „ungefährlich“ ist eine der Schlüsselfunktionen zur effizienten Bekämpfung einer möglichen Gefahr. Dabei spielen einerseits ein breites, unspezifisches Verteidigungsnetz (angeborenes Immunsystem, siehe Abschnitt 3.3) sowie ein lernendes, spezifisches System (adaptives Immunsystem, siehe Abschnitt 3.4) eine Rolle.

#### 3.1.3 Evolution

Auf einer Zeitskala der Evolution betrachtet ist das angeborene Immunsystem schon seit den Insekten ein Bestandteil mehrzelliger Organismen. Viele der dort zu findenden Mechanismen sind im Genom zu einem hohen Grad konserviert und auch in Wirbeltieren zu finden, wenngleich sich die Mechanismen im Laufe der Evolution verändert bzw. an neue Erreger angepasst haben. Jede Änderung fand allerdings durch Mutation einer bestehenden oder durch Schaffung einer neuen oder ähnlichen Komponente statt.

Das adaptive Immunsystem hingegen ist erheblich jünger. Der genaue Entstehungszeitraum ist nicht bekannt, jedoch wird darüber spekuliert, daß der Mechanismus der



**Abbildung 3.1:** Schematische Zeichnung der Organe mit Bedeutung für das Immunsystem.[15]

### 3 Grundlegende Konzepte

Genrekombination in somatischen Zellen<sup>1</sup> („gene shuffling“) sowie die Entstehung eines Mechanismus' zur gezielten Produktion von Klonen einer einzelnen, immun-effektiven Zelle als Startpunkt bzw. Geburtsprinzip des adaptiven Immunsystems gelten könnte.

In Wirbeltieren sind beide Arten der Immunität vorhanden, während in den älteren Spezies nur das adaptive Immunsystem vorhanden ist.

Bevor diese beiden Varianten der Immunität näher beschrieben werden, sollen erst einmal die zellulären Komponenten des Immunsystems beschrieben werden. Der folgende Abschnitt befasst sich mit dem biologischen Ursprung der Immunzellen sowie ihrer einzelnen Klassen.

## 3.2 Die Zellen des Immunsystems

Im diesem Abschnitt sollen die einzelnen Zellen des Immunsystems beschrieben sowie ihre Funktionen erläutert werden; Abbildung 3.2 gibt einen Überblick über die komplexen Zusammenhänge und unterschiedlichen Reifungs- und Wirkorte dieser Zellen. Im Blut sind neben den Immunzellen noch weitere Komponenten enthalten; die Beschreibung dieser Zellen und Stoffe würde allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengen, so daß hierzu auf die gängigen Lehrbücher der Medizin verwiesen wird.

Die Zellen des Immunsystems haben in Wirbeltieren ihren Ursprung im Knochenmark. Von dort aus wandern sie in die peripheren Gewebe, zirkulieren im Blutkreislauf und im lymphatischen System. Während dieser Wanderungen werden sie durch Signale und Botenstoffe, welche sie mit Rezeptoren auf ihrer Oberfläche erkennen, am Leben erhalten, gesteuert und in ihrer weiteren Entwicklung beeinflusst.

### 3.2.1 Leukozyten (Weiße Blutzellen)

Alle Zellen des Blutes, die roten Blutzellen (welche Sauerstoff transportieren), die Blutplättchen (die am Prozeß der Blutgerinnung beteiligt sind) und die weißen Blutzellen des Immunsystems stammen von den multipotenten<sup>2</sup> hämatopoetischen<sup>3</sup> Stammzellen im Knochenmark ab. Dabei entstehen zuerst spezialisierte Stammzellen: die myeloide und die lymphoide Stammzelle. Im Folgenden wird beschrieben, welche Zellen aus

---

<sup>1</sup>Genrekombination lebender Zellen (im Gegensatz zur Genrekombination bei der Produktion von Keimzellen), deren Genom quasi in-vivo verändert wird

<sup>2</sup>Das Differenzierungspotential von multipotenten Stammzellen ist nach gegenwärtiger Erkenntnis auf die Ausreifung genetisch determinierter Gewebe beschränkt, im Gegensatz zu den pluripotenten embryonalen Stammzellen, die noch jeden Zelltypus bilden können.

<sup>3</sup>Hämatopoese ist die medizinische Bezeichnung für die Bildung und Reifung der Blutzellen.

diesen Vorgängerzellen entstehen (Abbildung 3.2<sup>4</sup>) und welche Funktionen sie im Immunsystem erfüllen.

### Die myeloide Stammzelle

ist die Ursprungszelle der Zellen des angeborenen Immunsystems: Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen – ihre Funktionen lassen sich wie folgt beschreiben:

1. **Makrophagen** sind eine der drei Sorten von Freßzellen. Sie sind weit verbreitet in den Geweben des Körpers und spielen eine kritische Rolle im angeborenen Immunsystem. Ihre Vorgängerzellen sind die Monozyten, welche im Blut zirkulieren und sich kontinuierlich in Makrophagen ausdifferenzieren und schließlich in die Gewebe migrieren. (Abschnitt 3.3.1)
2. **Dendritische Zellen** sind spezialisiert darauf, Antigene aufzunehmen (= Freßzellen), zu prozessieren und dann auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, welche dann von den T-Lymphozyten erkannt werden können. Unreife dendritische Zellen wandern vom Blut in die Gewebe und verweilen dort; sie nehmen über Phagozytose und Mikropinozytose (siehe Abschnitt 3.6) große Mengen der sie umgebenden Flüssigkeiten auf, verarbeiten diese und reagieren auf den Inhalt. Wenn sie pathogene Antigene aufnehmen, reifen sie schnell aus, präsentieren diese Antigene auf ihrer Oberfläche, exprimieren co-stimulatorische Moleküle und wandern in die Lymphknoten, um dort weitere Immunzellen zu aktivieren.
3. **Mastzellen** differenzieren ebenfalls im Gewebe. Sie halten sich bevorzugt in der Nähe kleiner Blutgefäße auf. Nach ihrer Aktivierung schütten sie Substanzen aus, welche die vaskuläre Permeabilität<sup>5</sup> beeinflussen. Sie sind während allergischer Reaktionen sehr aktiv, haben aber wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle im Schutz der Schleimhäute gegen pathogene Erreger.
4. **Granulozyten** machen ca. 60 % aller Leukozyten aus. Ihre Lebensdauer beträgt zwei bis drei Tage. Sie können die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern, wo sie Teil der unspezifischen Abwehr von Bakterien, Parasiten und Pilzen sind. Es gibt neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, die je nach Färbeverhalten des Protoplasma beschrieben und unterteilt werden:

---

<sup>4</sup>Seite 14

<sup>5</sup>Durchlässigkeit der Gefäße für Zellen

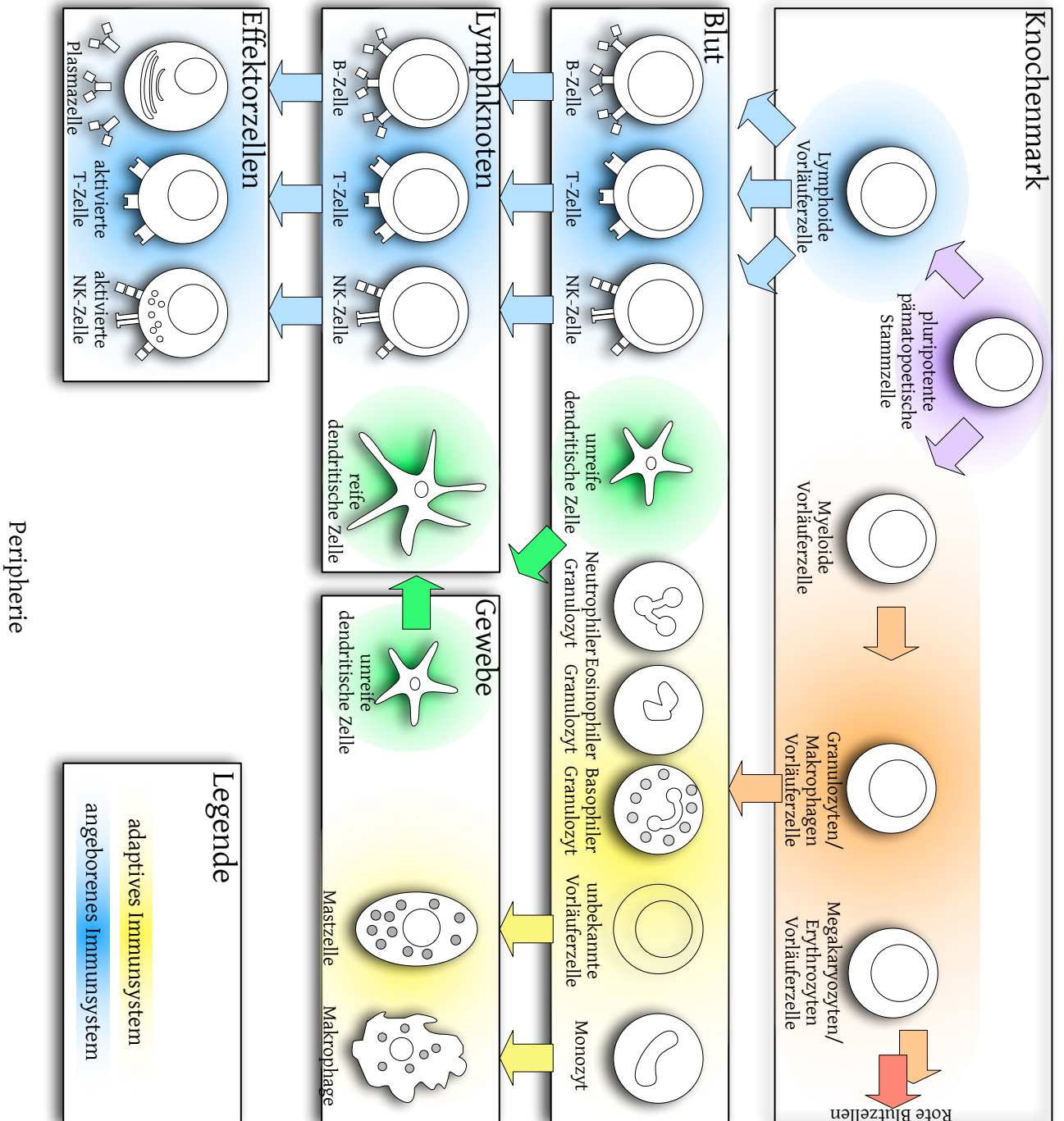


Abbildung 3.2: Schematischer Stammbaum der Immunzellen.



- a) **Neutrophile** sind ebenfalls Fresszellen und die häufigste und wichtigste Unterklasse (etwa 50 % bis 65 % der Zellen im Differentialblutbild) der Granulozyten. Ihre Verweilzeit im Blut beträgt etwa 6 bis 8 Stunden. Sie bekämpfen meist bakterielle Infektionen durch Phagozytose und durch Sekretion eines anti-bakteriellen Cocktails von Enzymen.
- b) **Eosinophile** machen etwa 5 % der Zellen im Differentialblutbild aus. Sie sind an der zellulären Immunabwehr beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten.
- c) **Basophile** machen nur einen geringen Anteil (<2 %) der Leukozyten aus. Sie spielen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Parasitenabwehr.

#### Lymphozyten

Die lymphatische Stammzelle ist die Ursprungszelle für die Lymphozyten, den Zellen des adaptiven Immunsystems, sowie für die natürlichen Killerzellen, welche zum angeborenen Immunsystem zählen. Zusätzlich können dendritische Zellen aus diesen Stammzellen entstehen – diese sind in ihrer Zellmorphologie identisch mit den oben genannten.

Die Lymphozyten sind sehr kleine Zellen, welche sich erst nach einer Aktivierung durch Antigen und co-stimulatorische Moleküle des angeborenen Immunsystems so verändern, daß sie eine wichtige Rolle im adaptiven, lernenden Immunsystem spielen. Diese Veränderung betrifft nicht nur ihre Funktion, sondern auch ihre Zellmorphologie – was erklärt, warum die Lymphozyten vor den frühen 1960er Jahren nur wenig erforscht wurden; heute sind sie aufgrund ihrer immensen Bedeutung der Hauptfokus der immunologischen Forschung.

Beide Subtypen der Lymphozyten entstehen durch somatische Rekombination: Jede Zelle kann ein spezifisches Antigen erkennen, welches für sie einzigartig ist.

1. B-Lymphozyten bzw. **B-Zellen** können zu Plasmazellen differenzieren, welche Antikörper produzieren und ausschütten. Einige B-Zellen werden auch zu langlebigen Gedächtniszellen, die bei einer wiederkehrenden Infektion im späteren Leben sehr schnell reagieren können: Der Prozeß der Selektion und Produktion geeigneter Lymphozyten wird dadurch drastisch verkürzt.
2. T-Lymphozyten bzw. **T-Zellen** existieren in zwei Hauptklassen, welche durch ihre Rezeptoren unterschieden werden können. Alle T-Zellen besitzen den T-Zell-Rezeptor, welcher ein klon-spezifisches Antigen erkennt. Die weitere Unter-

### 3 Grundlegende Konzepte

scheidung verläuft über die Anwesenheit von einem der Rezeptoren CD4 oder CD8:

- a) CD8-T-Zellen sind die sogenannten „Killerzellen“, welche Zellen töten können (z.B. virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen).
- b) CD4-T-Zellen sind die sogenannten „Helferzellen“, welche andere Zellen, wie z.B. die B-Zellen und Makrophagen aktivieren.

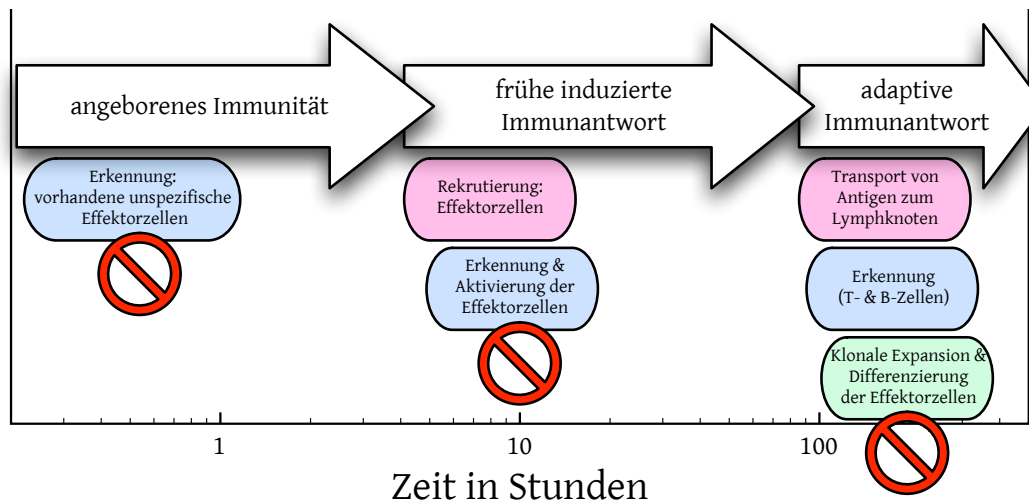
3. **Natürliche Killer-Zellen** sind antigen-unspezifisch und werden daher zum angeborenen Immunsystems gezählt, in dem sie eine Rolle spielen, die der der T-Killerzellen entspricht: Sie töten abnormale Zellen des Organismus, wie z.B. Tumorzellen und Zellen die mit bestimmten Viren (z.B. *Herpes simplex*) infiziert sind.

## 3.3 Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Immunität ist eine unspezifische Immunantwort, welche nur Grundklassen von Erregern erkennen kann. Dies geschieht durch die Erkennung molekularer repetitiver Muster („pattern recognition“) mithilfe von genetisch festgelegten Rezeptoren, welche nicht variabel sind. Dieser Zweig des Immunsystems ist daher nicht in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis anzulegen – die erregerspezifische Antwort sowie die Gedächtnisantwort sind Aufgabe des adaptiven, lernenden Immunsystems (Abschnitt 3.4).

### 3.3.1 Aufgabe und Funktion

Die primäre Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist es, eine breite unspezifische Abwehr gegen einen Erreger durchzuführen und zusätzlich dem adaptiven Immunsystem die notwendigen Signale und Informationen zu vermitteln, damit dieses effektiv gegen diesen vorgehen kann. Die eigenständige aber unspezifische Abwehrfunktion des angeborenen Immunsystems ist notwendig, weil das adaptive Immunsystem zuerst die geeigneten antigenspezifischen Zellen selektieren und vervielfältigen muß. Dies dauert im Regelfall mindestens *vier Tage*, während eine Erkennung und Bekämpfung des Erregers durch das angeborene Immunsystem sofort innerhalb der ersten *vier Stunden* stattfinden kann – ebenso wie eine Sekretion von Zytokinen. Dies führt zu der Rekrutierung weiterer Immunzellen des angeborenen Immunsystems zum Ort der Infektion. Weitere Bekämpfungsmechanismen (z.B. das Komplement) halten den Erreger in



**Abbildung 3.3:** Zeitskala der verschiedenen Immunantworten.

Schach oder können diesen schon komplett entfernen, bevor die komplexe Maschinerie des adaptiven Immunsystems in Gang gesetzt ist. Eine schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs findet sich in [Abbildung 3.3](#).

Diese früh induzierte Immunantwort führt nicht zu einem immunologischen Gedächtnis, dieses wird erst durch Beteiligung der B-Zellen ermöglicht. Allerdings ist diese Vorgehensweise durchaus ressourcenschonender, da im Regelfall viele Erreger vom angeborenen Immunsystem eliminiert werden können und sich somit die massive Mobilisierung von Lymphozyten erübrigt: Defekte im angeborenen Immunsystem führen zu häufigen und schwerwiegenden Infektionen.

### Eine erste Verteidigungslinie gegen Infektionen

Trotz konstanter Kontakte mit pathogenen Erregern führen diese doch recht selten zu einer Infektion – ein Zeichen für die wichtige Rolle des angeborenen Immunsystems zur Abwehr. Tatsächlich kommt es erst dann zu einem stabilen Infektionsherd, wenn es dem Erreger gelingt, auf irgendeine Weise das angeborene Immunsystem zu umgehen oder zu überwältigen. Beispiele für Erregerkontakte sind in [Tabelle 3.1](#) auf der nächsten Seite angegeben.

Sofern ein Erreger einen stabilen Infektionsherd bilden kann, wirkt das Immunsystem dem weiteren Ausbreiten entgegen. Durch Schaffung des Entzündungs-Milieus bewirkt das angeborene Immunsystem die Zuwanderung von Immunzellen und deren Aktivierung. Zusätzlich führt eine Verengung der angrenzenden Gefäße zu einer Eindämmung

**Tabelle 3.1:** Beispiele für Pathogene und deren Infektionswege. [16]

Eintrittsort	Übertragungsweg	Pathogener Organismus	Krankheit
<b>Schleimhäute</b>			
Atemwege	Tropfen	Influenza-Virus <i>Neisseria meningitidis</i>	Grippe Meningitis <sup>a</sup>
Gastrointestinaler Trakt	Versauchtes Wasser oder Nahrung	<i>Salmonella typhi</i> , Rotavirus Rotavirus	Typhus Durchfall
Reproduktiver Trakt	Direkter Kontakt	HIV <sup>b</sup> <i>Treponema pallidum</i>	AIDS <sup>c</sup> Syphilis
<b>Epithelzellen</b>			
Haut	Direkter Kontakt	<i>Trichophyton</i>	Fußpilz
Wunden, Schürfwunden	Stiche	<i>Clostridium tetani</i>	Wundstarrkrampf
	kleine Hautabschürfwunden	<i>Bacillus anthracis</i>	Milzbrand
Insektenbisse	Kontakt mit infizierten Tieren	<i>Francisella tularensis</i>	Tularämie <sup>d</sup>
	Moskitobisse ( <i>Aedes aegypti</i> )	Flavivirus	Gelbfieber
	Zeckenbisse	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Lyme-Krankheit <sup>e</sup>
	Moskitobisse ( <i>Anopheles</i> )	<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria

<sup>a</sup>Symptome sind Hirnhautentzündung und Blutvergiftung

<sup>b</sup>Human Immune Deficiency Virus

<sup>c</sup>Acquired Immune Deficiency Syndrome

<sup>d</sup>Unter Tularämie versteht man eine tödlich verlaufende ansteckende Erkrankung bei frei lebenden Nagetieren, Die Erkrankung kann auf den Menschen übertragen werden. Da das Beschwerdebild dem der Pest ähnelt und die Erkrankung sehr häufig Hasen und Wildkaninchen befällt, wird sie häufig auch als Hasenpest bezeichnet. Andere Namen sind Nagerpest, Lemmingfieber, Parinaudkrankheit und Hirschfliegenfieber.

<sup>e</sup>Infektionskrankheit. Der Erreger ist eng verwandt mit *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis. Die Borrelien können sich nach einer Infektion über den Blutkreislauf im gesamten Organismus ausbreiten und dabei jedes Organ, das Nervensystem, die Gelenke und das Gewebe befallen.

der Mobilität der Erreger, so daß die Infektion lokal begrenzt effektiv bekämpft werden kann.

#### **Makrophagen erkennen, fressen und verdauen Pathogene**

Sobald ein Mikroorganismus die Haut durchdrungen hat, wird dieser meist sofort von einem mononuklearen Phagozyten (Makrophagen), der sich dort aufhält, erkannt. Die Makrophagen sind immer auf der Wanderung durch das Gewebe, vor allem im Bindegewebe, in den unteren Schleimhäuten des gastrointestinalen Traktes, in der Lunge, entlang der Blutgefäße, in der Leber und in der Milz. Sie werden unterstützt von den ebenfalls phagozytierenden Neutrophilen.

Beide Zelltypen erkennen die Erreger mit ihren Oberflächenrezeptoren, welche an bestimmte Oberflächenstrukturen der pathogenen Mikroorganismen binden. Die erfolgreiche Aktivierung mehrerer dieser Rezeptoren leitet dann die Phagozytose des Erregers ein. Die Phagozytose ist ein aktiver Prozeß, bei dem die Zellmembran des Phagozyten den Erreger umschlingt, in ein Vesikel einschließt und ins Zellinnere verfrachtet. In diesem Phagosom (auch endozytische Vakuole oder Endosom genannt) wird dann der pH-Wert drastisch gesenkt, was die meisten Pathogene abtötet. Zusätzlich zur Senkung des pH-Wertes gibt es in den Makrophagen weitere Granuli, die sogenannten Lysosomen, welche anti-mikrobielle Enzyme, Proteine und Peptide enthalten. Das Phagosom verschmilzt mit einigen dieser Lysosomen und der Erreger wird zerstört.

Darüber hinaus produzieren Makrophagen und Neutrophile auch eine Vielzahl anderer toxischer Produkte, um die eingeschlossenen Mikroorganismen zu töten, darunter auch Stickoxid NO, das Superoxid-Anion  $O_2^-$  sowie  $H_2O_2$ .

Die Neutrophilen sind sehr kurzlebige Zellen und sterben auch im Normalfall nach erfolgreich abgeschlossener Phagozytose. Aus abgestorbenen Neutrophilen besteht auch der Eiter, der bei einigen Infektionen entsteht.

**Das Entzündungsmilieu** Die zweite wichtige Funktion der Makrophagen ist die Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen<sup>6</sup> und anderen Mediatoren, welche das Entzündungsmilieu herstellen und weitere Immunzellen rekrutieren. Diese Zytokine aktivieren außerdem Zellen, wie z.B. die dendritische Zelle, welche dadurch aktiviert – „scharf gemacht“ – wird, die Erreger verdaut und Antigene dieses Erregers auf ihrer Oberfläche

---

<sup>6</sup>Chemoattraktive Zytokine; Im Gegensatz zu Zytokinen dienen Chemokine der lokalen Aktivierung von anderen Immunzellen sowie der räumlichen Markierung von „Einsatzorten“, indem sie die Migration weiterer Immunzellen bewirken und beeinflussen (Attraktion).

### 3 Grundlegende Konzepte

präsentiert. Dies führt dann wiederum zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Eine Entzündung ist charakterisiert durch Schmerzen, Rötung, Hitze und eine Anschwellung des betroffenen Gewebes. Dies ist wie folgt zu erklären:

Verursacht durch die Ausschüttung der Zytokine und Chemokine finden vier Prozesse statt:

1. Die Vergrößerung der Blutgefäße führt zu einer erhöhten Durchblutung des Gewebes (Hitze und Rötung), aber auch zu einer Verringerung der Durchfließgeschwindigkeit an den Blutgefäßwänden.
2. Durch Zytokine aktiviert, exprimieren die Endothelzellen der Blutgefäße Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, welche dann die Anbindung von vorbeischwimmenden Leukozyten verstärkt und so zu einer Migration dieser Immunzellen in das infizierte Gewebe führt. Die ersten so angezogenen Zellen sind die Neutrophilen, danach die Monozyten, welche zu zusätzlichen Makrophagen ausdifferenzieren.
3. Eine Erhöhung der Durchlässigkeit der Gefäße – durch Lockerung der Bindungen zwischen den Endothelzellen – führt zu einem Eintreten von Flüssigkeit (Blut) in das betroffene Gewebe und so zu der beobachteten Anschwellung und dem gefühlten Schmerz – ebenso wie zur Anhäufung von Plasmaproteinen (Antikörper, Komplement) zur Verteidigung.
4. Als letzte Veränderung lässt sich eine Verstopfung der Mikrogefäße beobachten, welche ebenfalls zu einer Eindämmung der Infektion beiträgt, da nun der Abtransport von Zellen aus der Region behindert wird.

#### 3.3.2 Erkennung von Fremdkörpern durch Mustererkennung

Das angeborene Immunsystem hat zwar nicht die molekularen Lernfähigkeiten des adaptiven Immunsystems, kann aber durchaus fremde von nicht-fremden Zellen unterscheiden. Dies geschieht, wie schon im Fall der Makrophagen beschrieben, durch Erkennung von spezifischen, für Klassen von Erregern typischen, Oberflächenmustern mit Hilfe bestimmter Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind im Laufe der Evolution entstanden und nicht variierbar, wie dies bei den Erkennungssequenzen der B- und T-Zellen der Fall ist. Dafür sind diese Rezeptoren nicht nur auf einen einzigen Klon beschränkt, sondern treten in verschiedenen Kombinationen in jedem Zelltyp des angeborenen Immunsystems auf – was auch die schnelle Antwortmöglichkeit des angeborenen Immunsystems erklärt.

Diese Oberflächenmuster sind z.B. auf den Oberflächen von Bakterien oder Viren zu finden, aber auch einzelne Bestandteile von Pathogenen können mit Hilfe bestimmter Rezeptoren erkannt werden. Diese repetitiven Muster nennt man auch *Pathogen Associated Molecular Patterns* oder kurz PAMP<sup>7</sup>.

Die dafür verwendeten Rezeptoren dienen dazu, eine Phagozytose einzuleiten oder als chemotaktische Rezeptoren das Auffinden von Erregern zu ermöglichen – Neutrophile verfolgen entlang eines Konzentrationsgradienten einer Substanz das entsprechende Bakterium – und zur Erkennung bestimmter Erregerklassen. Diese Erkennung des „Feindes“ führt dann zur Produktion der geeigneten Zytokine, welche notwendig sind, um eine Immunreaktion gegen diese Erreger zu bewirken.

#### Die Klasse der Toll-like-Rezeptoren

Eine wichtige Klasse von Rezeptoren zur Erkennung dieser PAMP sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), welche sich evolutionär von dem Rezeptor *Toll* ableiten, der erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* gefunden wurde.[17] Dort spielt er in der Abwehr gegen Pilze eine wichtige Rolle.[18]

Eine Familie von *Toll*-homologen Rezeptoren wurde auch in Wirbeltieren gefunden.[19] In Mäusen sind 13, in Menschen sind elf dieser homologen Rezeptoren bekannt;[20, 21, 22, 23, 24] jeder dieser Rezeptoren erkennt eine eigene, typische Oberflächenstruktur (Tabelle 3.2 auf Seite 23) eines Erregers, welche in Wirbeltieren nicht vorkommt.[25, 26] Damit sind diese Muster typisch für verschiedene Erreger bzw. verschiedene Stadien einer Infektion.

**Struktur der Toll-Like-Rezeptoren** Aufgrund ihrer evidenten Wichtigkeit zum Überleben zählen die Toll-like-Rezeptoren zu den evolutionär hoch konservierten Transmembranproteinen.[27] Die intrazellulären Domänen der TLRs sind sich sehr ähnlich und gehören zur Superfamilie der IL1-Rezeptoren (die Homologie umfasst etwa 200 Aminosäuren) – die extrazelluläre Domäne hingegen ist deutlich verschieden zu der der IL1-Rezeptoren: Statt immunglobulin-ähnlichen Strukturen enthalten sie Leucinreiche Regionen (LRR<sup>8</sup>). Die Toll-like-Rezeptoren 1, 2 und 6 können durch Heterodimerisierung ihre Erkennungsmuster erweitern: Durch die Dimerisierung von zwei verschiedenen Rezeptoren entsteht eine neue Erkennungsstelle.[28] An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß dieses Phänomen, bei dem mehrere Rezeptoren akkumulieren oder aneinander binden und so eine neue oder veränderte Wirkung zeigen,

---

<sup>7</sup>Pathogen Associated Molecular Patterns

<sup>8</sup>Leucine Rich Repeats

### 3 Grundlegende Konzepte

in der Biologie – vor allem der Immunologie – weit verbreitet ist. Weitere Details zu diesem Thema werden in den Abschnitten [3.3.3](#) und [3.7](#) beschrieben.

**Vorkommen und Lokalisation** Die Toll-like-Rezeptoren zur Erkennung von Nukleinsäuren finden sich im Endosom, während die Rezeptoren zur Erkennung von Lipiden, Sacchariden und Proteinen auf der Oberfläche von Zellen sitzen. Nicht alle Immunzellen exprimieren sämtliche TLRs[20]. Eine Übersicht über die verschiedenen Mitglieder der Klasse der TLRs, ihren Liganden und die Zellen in denen sie vorkommen, findet sich in Tabelle [3.2](#) auf der nächsten Seite.

**Aktivierung und Signalverarbeitung** Die Aktivierung des Toll-like-Rezeptors führt zu einer Rekrutierung von Adaptermolekülen und der Induktion von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, was schließlich zu einer Produktion von Zytokinen des angeborenen Immunsystems führt. Diese Zusammenhänge sind sehr komplex und immer noch nicht vollständig verstanden – dies ist mitunter auch einer der Beweggründe für diese Arbeit. Eine gute Übersicht über dieses Thema findet sich in der Literatur.[29, 32, 33]

Mit Hilfe von Rezeptoren in der Zellmembran und innerhalb der Zelle wird das extrazelluläre Signal aufgenommen und in der Regel an eine oder mehrere Signalkaskaden weitergeleitet. Dies erfolgt durch koordinierte Protein-Protein-Interaktionen und basiert auf Signalmolekülen, die durch Konformationsänderung zwischen mindestens zwei Zuständen wechseln können und so als molekulare Schalter fungieren. Besondere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung von Signalproteine bei diesen Konformationsänderungen auslösen. Mitunter wird durch Signalkaskaden auch die Bildung von sekundären Botenstoffen (Second Messenger) ausgelöst, die ihrerseits bestimmte Enzyme (u.a. auch Proteinkinasen) aktivieren. Auf diese Weise wird das Primärsignal um viele Größenordnungen verstärkt.

#### 3.3.3 Modulation der Immunantwort

Die Erkennung von Erregern und potentiell gefährlichen Zellen findet zwar über molekulare Erkennung mit Hilfe eines Rezeptors statt – Strukturmerkmale des Erregers binden an einen passenden Rezeptor – sie ist jedoch vielfältiger und keineswegs binär: So können bei der Erkennung des selben Erregers unterschiedliche Zellen zu ganz anderen Reaktionen aktiviert werden; selbst dieselbe Zelle kann unterschiedliche Antworten auf einen Stimulus in Abhängigkeit ihres aktuellen Status zeigen – der z.B. davon abhängen kann, welche zusätzlichen Stimuli gleichzeitig erfolgen (z.B. T-Zell-Rezeptor *plus* Co-Stimulus) oder vorher erfolgt sind (z.B. Veränderung der Zelle durch Zytokine).



Tabelle 3.2: Toll-Like Rezeptoren mit bekannten Liganden .[26, 29, 30, 31]

TLR	Ligand	Ort	T-Zelle	NK-Zelle	Monozyten	B-Zelle	Dendr.Z.
1	<sup>a</sup> Triacyl lipopeptide	Zelloberfläche		+	++	++	
2	<sup>a</sup> Peptidoglycan	Zelloberfläche			++		
4	<sup>a</sup> Lipopolysaccharide (LPS)	Zelloberfläche		++			
5	<sup>a</sup> Flagellin	Zelloberfläche	+				
6	<sup>a</sup> Diacyl Lipopeptide, Zymosan	Zelloberfläche			+	++	+
10	<sup>a</sup> unbekannt	Zelloberfläche				++	
11	<sup>a</sup> unbekannt	Zelloberfläche					
3	<sup>b</sup> dsRNA	Endosom					
7	<sup>b</sup> ssRNA, Imidazochinolin, Loxoribin	Endosom				++	++
8	<sup>b</sup> ssRNA, Imidazochinolin	Endosom			+		
9	<sup>b</sup> Unmethylierte CpG <sup>c</sup> -DNA	Endosom				++	++

**Erläuterung:** ++entspricht einer hohen Expression, +einer geringen Expression des Rezeptors.

<sup>a</sup>erkennt Komponenten der Zellwand

<sup>b</sup>erkennt Nukleinsäuren

<sup>c</sup>Allgemein verwendet für Oligonukleotide mit Cytosin-PO<sub>4</sub>(p)-Guanosin-Motiven

### 3 Grundlegende Konzepte

Dabei spielen Adapterproteine eine große Rolle in der Modulation der Zellantwort, aber auch die Möglichkeit, multivalente Bindungen (Abschnitt 3.7) mit mehreren Erregermolekülen einzugehen kann diese Antwort beeinflussen.

#### Adapterproteine

Adapterproteine sind Hilfsproteine in einem Signaltransduktionsweg ohne eigene enzymatische Aktivität. Sie ermöglichen oder vereinfachen die Wechselwirkungen zwischen anderen Proteinen. Ein großer Teil der Spezifität der einzelnen Signaltransduktionswege wird durch Proteinkomplexe zwischen mehreren Komponenten des Weges und Proteinkinase<sup>9</sup> sowie G-Protein-GTPasen erreicht; so werden die größeren Komplexe durch die Adapterproteine erst ermöglicht.[34]

Adapterproteine haben meist mehrere unterschiedliche Domänen, die diese spezifischen Bindungen und Komplexe definieren. Durch diesen einfachen Mechanismus ist es möglich, denselben Rezeptor für verschiedene Informationen zu „recyclen“ – je nach vorheriger Aktivierung der Zelle können andere Adapterproteine produziert werden, die dann dasselbe Rezeptorsignal unterschiedlich auswerten.

Durch ein sehr komplexes Zusammenspiel vieler Adapterproteine ist eine maßgeschneiderte Zellantwort auf einen externen Stimulus möglich. Oft finden viele der Adapterproteine auf mehreren unterschiedlichen Signaltransduktionswegen ihre Anwendung.

**Beispiele:** Die Klasse der Intersektine sind Adapterproteine, welche bei Aktivierung eines Rezeptors die Endozytose an dieser Stelle einleiten.[35] Andere Adapterproteine sind an Veränderungen des Zytoskeletts beteiligt, die auf mechanische Stimuli erfolgen.[36]

## 3.4 Das adaptive Immunsystem

Ein infektiöser Organismus, welcher die körpereigenen Barrieren wie Haut oder Schleimhaut überwunden hat, wird zuerst vom angeborenen Immunsystem bekämpft, welches das adaptive Immunsystem aktiviert. Dies wird erreicht von den APC<sup>10</sup>, wie z.B. den dendritischen Zellen und den Makrophagen, welche auf ihrer Oberfläche eine Auswahl der Antigene des Erregers präsentieren, so daß antigenspezifische B- und T-Zellen durch

---

<sup>9</sup>Protein-Kinasen phosphorylieren Proteine und schalten diese an oder aus.

<sup>10</sup>Antigen-präsentierende Zellen

einen Kontakt mit den APC aktiviert werden. Diese vermehren sich dann – es kommt zur sogenannten „klonalen Selektion“.

Diese antigenspezifischen Zellen werden durch genetische Rekombination einer Gruppe von Genen erzeugt („gene shuffling“) und sind daher sehr flexibel. Jede dieser Kombinationen führt zu einer einzigartigen Zelle, welche sich erst durch den Kontakt mit einem Antigen vermehrt. So kommt es zum Lerneffekt und zur Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“: Zellen, die Antikörper gegen selbst-Antigene tragen, werden getötet (Positiv-Selektion), während Zellen, die selbst-Antigene nicht erkennen, überleben und damit eine potentielle Waffe gegen einen zukünftigen Erreger darstellen.

Das adaptive Immunsystem ist ein sehr anpassungsfähiges und auch lern- bzw. erinnerungsfähiges Teilsystem, welches vor allem gegen Viren hocheffektiv ist. Es findet sich erst in höherentwickelten Lebewesen. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind die Lymphozyten, die unterteilt sind in T- und B-Zellen (siehe Abschnitt 3.2). Beide Zelltypen entwickeln („reifen“) sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark (Abbildung 3.2<sup>11</sup>). Eine weitere Reifung durchlaufen die T-Zellen bereits im Fötus vor der Geburt im Thymus (daher *T*-Zellen); der Reifungsort der B-Zellen wurde zuerst bei Vögeln beschrieben<sup>12</sup>. Bei Säugern fehlt dieses Organ: der tatsächliche Reifungsort ist in diesem Fall ebenfalls das Knochenmark.

Die genauen Funktionen der T- und B-Zellen sind im Folgenden beschrieben:

#### 3.4.1 Funktion der T-Zellen

**T-Helferzellen** mit dem Oberflächenmarker CD4 erkennen Antigene, welche in der Bindungstasche eines MHC2-Rezeptors liegen; diese werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie z.B. von dendritischen Zellen oder Makrophagen auf ihrer Zelloberfläche getragen. Zusätzlich zur Bindung des T-Zell-Rezeptors an einen passenden MHC2-Rezeptor ist eine Wechselwirkung des Makrophagenrezeptors B7 mit einem CD28-Rezeptor an der T-Zelle notwendig, um die T-Zelle zu aktivieren. Nach erfolgreicher Aktivierung fängt die T-Helferzelle an, bestimmte Zytokine (Lymphokine) zu produzieren, welche dann die B-Zellen aktivieren; außerdem beginnt die frisch aktivierte T-Helferzelle, sich zu teilen.

---

<sup>11</sup>Seite 14

<sup>12</sup>Die *Bursa fabricii*, auch *Bursa cloacalis*, ist ein sackförmiges lymphatisches Organ am Dach der Kloake bei Vögeln.

### 3 Grundlegende Konzepte

**T-Killerzellen** mit dem Oberflächenmarker CD8 binden an MHC1-Rezeptoren, welche ihr passendes Antigen tragen. Ihre Aufgabe ist es, Zellen, welche von einem Pathogen infiziert oder krebsartig verändert sind, zu töten. Auch hier ist zur erfolgreichen Aktivierung der T-Zelle eine weitere simultane Bindung an ihren CD28-Rezeptor erforderlich. Erst nach beiden Signalen fängt die T-Killerzelle an, sich zu teilen und die Apoptose der gebundenen Zielzelle einzuleiten.

#### 3.4.2 Funktion der B-Zellen

B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche Antikörper gegen ein spezifisches Antigen; wenn dieses dort gebunden ist, können die B-Zellen durch die Zytokine, die von T-Helferzellen ausgeschüttet werden, aktiviert werden: Sie beginnen sich zu teilen und entsprechende Antikörper zu produzieren. Man spricht von aktivierten B-Zellen in diesem Stadium als Plasmazellen. Während einer Erstinfektion dauert es mindestens fünf Tage (siehe Abschnitt 3.3.1), bis sich aus B-Zellen antikörper-produzierende Plasmazellen entwickeln. Ein Teil der so aktivierten B-Zellen wird zu Gedächtniszellen, welche bei einer erneuten Infektion deutlich schneller reagieren können.

#### 3.4.3 Antikörper

B-Zellen und Plasmazellen produzieren Antikörper, welche direkt, also ohne den Umweg über eine andere Zelle und deren MHC-Moleküle, an Antigene binden können. Je nach Art des Antikörpers sind die Erreger dann entweder direkt lahmgelegt (z.B. durch Blockieren eines essentiellen Rezeptors für das Eindringen des Erregers in eine Zelle, oder durch Vernetzen des Erregers mit sich selbst) oder markiert, so daß andere Zellen (z.B. Fresszellen) des Immunsystems diese selektiv angreifen können.

Die Struktur eines Antikörpers (siehe Abbildung 3.4<sup>13</sup>) besteht aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Jede leichte Kette bildet zusammen mit einer schweren Kette das antigenbindende Motiv, die sogenannte *hypervariable Region* – diese Region wird bei der Genese einer jeden B-Zelle durch die *somatische Rekombination* neu erstellt; die schweren Ketten sind am anderen Ende für die Verankerung in einer Zellmembran, für die Multimerisierung zu bestimmten Antikörperklassen oder für die Erkennung durch Leukozyten zuständig.

---

<sup>13</sup>Seite 27

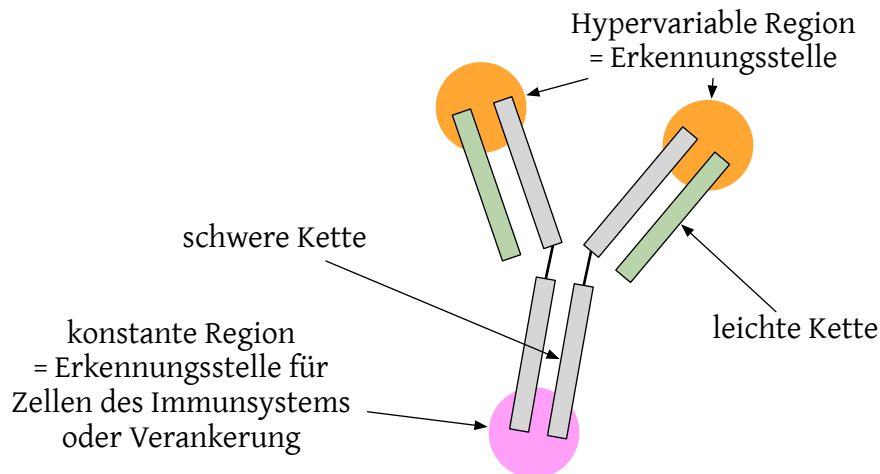


Abbildung 3.4: Schematische Zeichnung eines einfachen Antikörpers.

### 3.5 Immunstimulierende DNA

Nachdem in den vorigen Abschnitten die Komponenten des angeborenen Immunsystems beschrieben wurden, soll nun auf einen speziellen Stimulus der nativen Immunität näher eingegangen werden, die sogenannte immunstimulierende DNA.

Bakterielle DNA wird von dem Rezeptor TLR9 erkannt, welcher spezifisch für sogenannte *CpG-Motive* ist – siehe auch Tabelle 3.2 auf Seite 23. Mit diesem Begriff bezeichnet man Cytosin-Guanosin-Dinukleotide, welche in der DNA aller Organismen vorkommen, und in bakterieller DNA in statistischen Mengen ( $\frac{1}{16}$ ) vorhanden sind. In der DNA von Wirbeltieren (und damit auch in humaner DNA) sind diese Motive allerdings unterdrückt und kommen nur zu  $\frac{1}{60}$  vor — darüber hinaus sind diese meist methyliert (70-80 %). TLR9 erkennt aber nur unmethylierte CpG-Dinukleotide. Dies ermöglicht es dem Immunsystem sehr spezifisch, die Anwesenheit dieser CpG-Dinukleotide als Alarmsignal zu werten.[37]

Die Kenntnis der immunologischen Wirkung von bakteriellen Infektionen auf den Verlauf mancher Erkrankungen ist schon relativ alt. Bereits im 17. Jahrhundert wurde die Praxis, Tumorpatienten mit Bakterien zu infizieren, angewandt – mitunter auch erfolgreich, wenngleich nicht immer heilend. Im 19. Jahrhundert konnte **W. Coley** erstmals zeigen, daß bei Sarkompatienten die mit bakteriellen Lysaten behandelt wurden, ein vorübergehender Rückgang der Tumoren erreicht werden kann.[38, 39] Diese Arbeit war der Beginn der heutigen Immuntherapie von Tumoren, wurde allerdings erst wieder

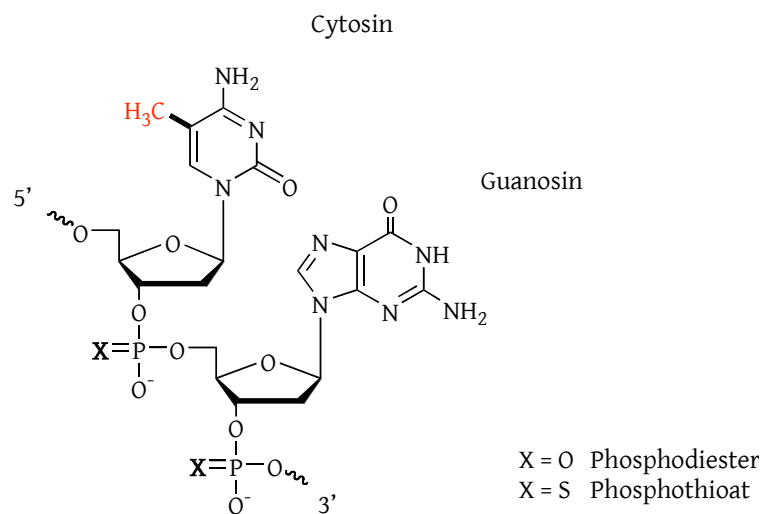
### 3 Grundlegende Konzepte

entdeckt, als die wirkende Komponente der bakteriellen Lysate, nämlich die enthaltene DNA, entdeckt und erforscht wurde.[40]

Ein wenig später wurde dann von **S. Yamamoto** entdeckt, daß nur bakterielle DNA – nicht die von Wirbeltieren – diesen Effekt hervorruft. Konsequenterweise wurde in mehreren Studien der Einsatz von bakterieller DNA als Vakzine-Adjuvans<sup>14</sup> untersucht.[41] Weitere Untersuchungen offenbarten, daß das wirkende Motiv dabei Cytosin-Guanosin-Dinukleotide ist: synthetische DNA-Sequenzen mit einem CpG-Motiv sind ebenfalls immunstimulierend.[42, 43].

Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß CpG-DNA in Hinblick auf lösliche und zelluläre Antigene ein potentes Adjuvans ist: dies wurde mit Modell-Proteinen und Peptid-Antigenen [44, 45], viralen und bakteriellen Proteinen [46, 47], Tumorantigenen [48] und Polysacchariden gezeigt.

#### 3.5.1 Struktur



**Abbildung 3.5:** Chemische Struktur eines CpG-Motivs.

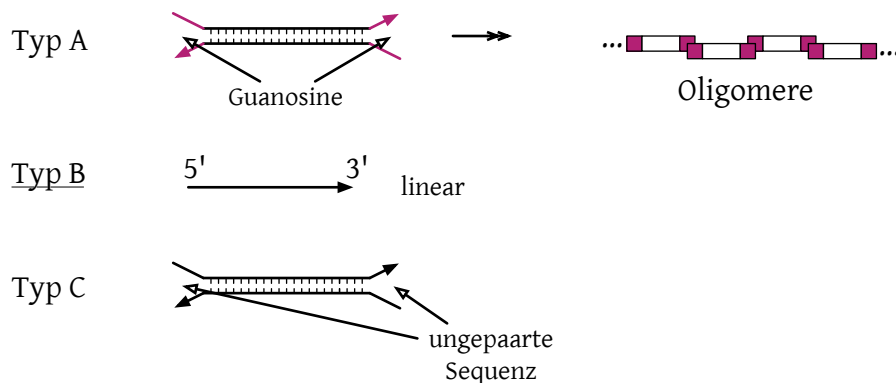
<sup>14</sup>Ein Mittel, um die Potenz eines Impfstoffes zu verstärken. Dabei wird das Immunsystem unspezifisch aktiviert und reagiert dementsprechend besser auf den eigentlichen Impfstoff.

Das notwendige Bindungsmotiv am Rezeptor TLR9 ist das Dinukleotid CpG: am 3'-Ende ein Cytosin verbunden mit einem Guanosin. Dabei ist das Cytosin unmethyliert (siehe Abbildung 3.5). Ist diese Methylierung vorhanden, findet keine Erkennung statt.

Darüberhinaus spielen in der Erkennung die angrenzenden Basen eine weitere Rolle: Die Sequenz GTCCGTT [49] ist ein Minimalmotiv, welches die optimale Erkennung beim Menschen liefert. In der Maus ist das optimale Motiv GACCGTT [50, 51]. Weitere Basen am 5'-Ende verringern die Aktivität, während bei Modifikationen am 3'-Ende nur eine geringfügige Veränderung der Wirkung festzustellen ist.

### 3.5.2 Verschiedene Typen

Wie von **Yamamoto et al.** nachgewiesen, ist das wirkende Prinzip der immunstimulatorischen bakteriellen DNA auch in synthetischen kurzkettigen DNA-Molekülen aktiv und, bezogen auf seine Dosis, deutlich potenter. Es sind drei verschiedene Typen bzw. Klassen von synthetischen CpG-Oligonukleotiden bekannt, welche sich der Sequenzfolge der Bausteine und auch in ihrer immunologischen Wirkung unterscheiden. Infolge der unterschiedlichen Sequenzen haben alle Klassen unterschiedliche Faltungsstrukturen (siehe auch die folgende Abbildung):



**Abbildung 3.6:** Schematische Zeichnung der Strukturmerkmale der drei unterschiedlichen Typen von CpG-DNA. Die gefüllten Pfeile repräsentieren die DNA-Stränge von ihrem 5'- zu ihrem 3'-Ende. Bei den Oligonukleotiden des Typs B ist eine mögliche oligomere Struktur exemplarisch gezeigt.

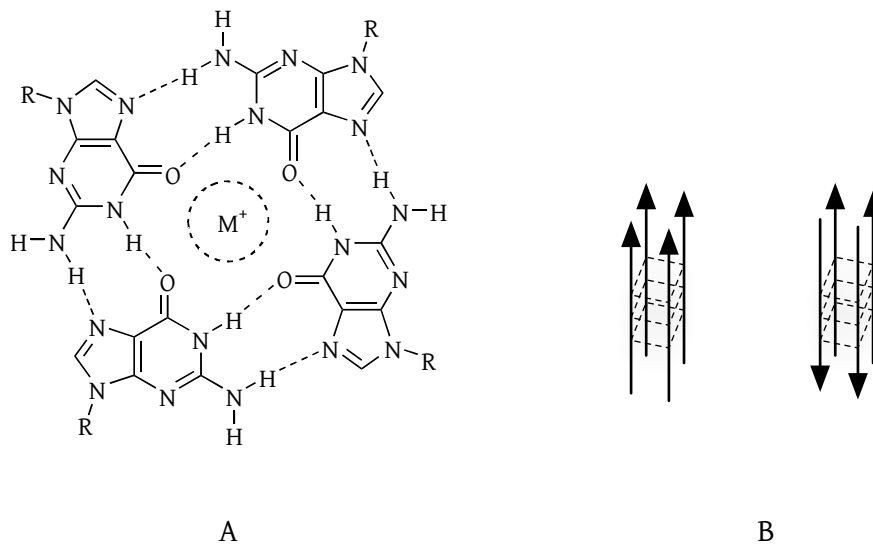
- **Typ-A-Oligonukleotide** besitzen am Anfang und Ende der Sequenz mehrere Guanosine, während der Mittelteil aus einem Palindrom (siehe Anhang) be-

### 3 Grundlegende Konzepte

steht. Dadurch dimerisieren diese Oligonukleotide und schaffen einen kurzen Doppelstrang, der an beiden Enden je zwei ungepaarte Überhangsequenzen aus einigen Guanosinen hat. Die Guanosine können sich zu sogenannten *G-Tetraden* zusammenlagern; ein Strukturmotiv, bei dem vier Guanosine über die Hoogsteen-Basenpaarung (siehe Abbildung 3.7<sup>15</sup>) aggregieren. Dadurch können in diesem Fall lange Oligomere oder Multimere entstehen.[37, 52, 53]

- **Typ-B-Oligonukleotide** besitzen keine weiteren stabilen Sekundärstrukturen und liegen daher als Einzelstrang vor.[37]
- **Typ-C-Oligonukleotide** haben eine Palindromsequenz mit überhängenden Basen, was zu einem homodimeren Doppelstrang führt.[54, 55]

Diese drei Klassen und ihre wichtigsten Vertreter sind in Tabelle 3.3 auf der nächsten Seite noch einmal zusammengestellt; dort finden sich auch ihre DNA-Sequenzen mit einer Markierung der Palindrome.



**Abbildung 3.7:** Hoogsteen-Basenpaarung in G-Tetraden:  
**A** molekulare Struktur; **B** schematische Darstellung: zwei Möglichkeiten der Ausrichtung der DNA-Stränge.

---

<sup>15</sup>Seite 30



**Tabelle 3.3:** Typen von CpG-Oligonukleotiden: Strukturmerkmale und Wirkungen.

Typ	Beispielsequenz 5'→3'	Strukturmerkmale	Wirkung	Zelltypen
<b>A</b>	GGgggacgatcgtcGGGGGg	G-Tetraden, Oligomere	Antiviral <sup>a</sup>	PDC
<b>B</b>	TCGTCGTTTGTGCGTTTGTGCGTT	Linearer Einzelstrang		B-Zellen
<b>C</b>	TCGTCGTCGTTTCGAACGACGTTGAT	Palindrom, Überhang		B-Zellen <b>und</b> PDC

**Sequenzen:** GROSSBUCHSTABEN mit Phosphothioat-Bindungen, Kleinbuchstaben mit Phosphodiester-Bindungen am 3'-Ende des Nucleosids. (Strukturformel siehe Abbildung 3.5, Schematische Zeichnung der Faltung siehe Abbildung 3.6) Ein Palindrom in der Sequenz ist unterstrichen

<sup>a</sup>durch die Sekretion von Interferon  $\alpha$

### 3.5.3 Verschiedene Wirkungen

Aufgrund ihrer unterschiedlichen räumlichen Strukturen zeigen die drei Typen von CpG-Oligonukleotiden auch unterschiedliches Verhalten in ihrer immunologischen Aktivität.

- **Typ-A-Oligonukleotide** zeigen eine hohe Aktivierung von NK-Zellen und eine hohe Sekretion von Interferon  $\alpha$ ; [56] dieses anti-virale Zytokin ist in Abschnitt 3.5.4 näher beschrieben. Durch eine selektive Verbesserung der CD8-T-Zellantwort erhöhen TypA-Oligonukleotide die anti-zelluläre Immunantwort. [57] Ihre hochmolekulare Struktur über die Poly-G-Motive erhöht die Aufnahme in die Zellen. [58, 59, 60] Sie aktivieren B-Zellen nicht.
- **Typ-B-Oligonukleotide** fördern das Überleben und die Aktivierung und Ausreifung der plasmazytoiden dendritischen Zelle. Sie stellen ein sehr potentes B-Zell-Stimulus dar, sind allerdings nur schwache Aktivatoren der NK-Zellen und stimulieren keine IFN- $\alpha$ <sup>16</sup>-Produktion.
- **Typ-C-Oligonukleotide** vereinigen die Effekte der Typen A und B. Sie zeigen eine hohe Induktion von IFN- $\alpha$  und aktivieren B-Zellen.

Typ-A-Oligonukleotide aktivieren also die anti-zelluläre Immunantwort, wie sie bei der Bekämpfung von Viren und Tumoren notwendig ist, während die Sequenzen vom Typ B die Immunantwort über B-Zellen und deren Antikörper stimuliert – die Antwort, die bei bakteriellen Infekten, Parasiten und Allergien vorherrscht.

Zusätzlich zu den beschriebenen sequenzabhängigen Effekten wird auch ein unspezifischer Effekt diskutiert, welcher durch die Phosphothioate der Oligonukleotide ausgelöst wird. [60, 61]

Die Ursache für diese unterschiedlichen Wirkungen (siehe auch Tabelle 3.3 auf der vorherigen Seite) ist noch nicht eindeutig gesichert. Verschiedene Hypothesen hierzu beschäftigen sich mit den Modalitäten der Aufnahme (Endozytose, Makropinozytose; Begriffsdefinitionen in Abschnitt 3.6) und deren Kinetik bis hin zu unterschiedlichen Erkennungsmechanismen.

---

<sup>16</sup>Interferon  $\alpha$

### 3.5.4 Antivirale Immunantwort durch Interferone

Die antivirale Wirkung der CpG-Oligonukleotide des Typs A werden durch die Ausschüttung von Interferonen erreicht. Diese Klasse der Zytokine soll im Folgenden etwas näher beschrieben werden.

**Typ-I Interferon** Die Familie der Interferon-Proteine lässt sich grundsätzlich in zwei verschiedene Unterklassen, Typ-I und Typ-II, einteilen.[62, 63] Die Typ-I Interferone sind die antiviral agierenden Zytokine IFN<sup>17</sup>- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\omega$ . Hauptproduzenten von endogenem IFN- $\alpha$  sind im menschlichen System die plasmazytoiden dendritischen Zellen, welche nach viralem Stimulus 1000fach mehr davon produzieren als andere Zellen.

Die antiviralen Effekte beruhen auf einer Hemmung der viralen Proteinsynthese in der Wirtszelle durch zwei Mechanismen: Einerseits wird die Produktion eines Enzyms induziert, welches virale RNA<sup>18</sup> degradiert, andererseits werden die zellulären Proteine durch Phosphorylierung deaktiviert, die sonst die virale Proteinsynthese initiieren.[64, 65, 66]

Neben diesem antiviralen Effekt hat Interferon auch noch eine Reihe weiterer immunmodulierender Wirkungen:

- Die Expression von MHC<sup>19</sup>-I-Molekülen auf Zelloberflächen wird erhöht, dies führt zu einer verstärkten Präsentation viraler Antigene.[67, 68]
- Typ-I-Interferone steigern die Zytotoxizität der Makrophagen und NK-Zellen[69] und fördern indirekt die Aktivierung von Gedächtnis-T-Zellen.[70]
- IFN- $\alpha$  führt zur Ausreifung von myeloiden dendritischen Zellen [71], fördert das Überleben aktivierter T-Zellen [72] und begünstigt die Antikörperproduktion durch B-Zellen.

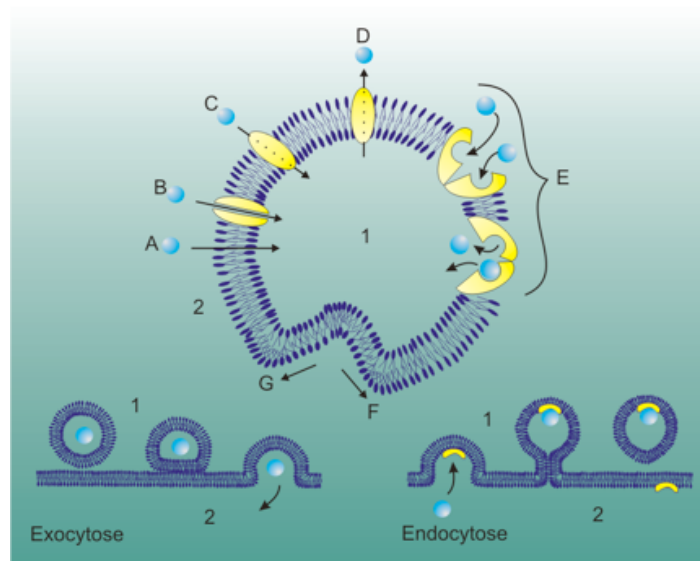
Rekombinantes Typ-I-Interferon ist bei der Therapie der Viruserkrankung Hepatitis B und C im Einsatz, wird aber auch bei der Therapie von Multipler Sklerose und bestimmten Tumorarten verwendet. Ansätze, das rekombinante Interferon durch körpereigenes und *in situ* hergestelltes zu ersetzen, sind in der Entwicklung: Die Firma Coley testet zur Zeit das CpG-Oligonukleotid Actilon<sup>TM</sup> in klinischen Studien der Phase II zur Therapie von Hepatitis C.[73]

---

<sup>17</sup>Interferon

<sup>18</sup>Ribonukleinsäure

<sup>19</sup>Major Histocompatibility Complex



**Abbildung 3.8:** Schematische Darstellung der Möglichkeiten des Membrantransports. Quelle: [74]

1 bezeichnet das Zellinnere, 2 das Zelläußere.

### 3.6 Membrantransport

Als ein möglicher Grund für den Unterschied in der Wirkung von Typ A- und Typ B-Oligonukleotiden wird ein Wechsel des Aufnahmemechanismus diskutiert. Außerdem wurde schon an mehreren Stellen beschrieben, daß Freßzellen Erreger aufnehmen, verdauen und dann deren Bestandteile auf ihrer Oberfläche präsentieren können. Deshalb sollen an dieser Stelle die verschiedenen Arten des Membrantransports, also den Mechanismen, mit denen Zellen Stoffe aus ihrer Umgebung aufnehmen können, geschildert werden.

Unter Membrantransport wird in der Biologie der Transport von unterschiedlichen Stoffen durch eine Zellmembran verstanden. Die Zelle stellt eine abgeschlossene Einheit dar, welche durch eine dynamische Doppelschichtmembran bestehend aus Phospholipiden von der Umgebung getrennt ist. Diese lipophile Membran ist nur für Gase und sehr kleine, meist ungeladene Moleküle permeabel. Ionen und die meisten biologisch wirksamen Substanzen können die Membran nicht durch Diffusion allein durchdringen. Allerdings stehen eine Vielzahl von Mechanismen zur Verfügung, um Stoffe in das Innere der Zelle zu befördern.

### 3.6.1 Transmembran-Transport

**Diffusion:** Lipophile und kleine ungeladene polare Moleküle (z.B.  $H_2O$ ) können durch Diffusion die Zellmembran passieren. Dieser Transport folgt dem Konzentrationsgradienten bis sich ein Diffusionsgleichgewicht einstellt. (Abbildung 3.8, Fall A)

**Passiver Transport:** Der passive Transport ist ein Spezialfall der Diffusion, da hier auch größere Moleküle und Ionen (z.B. Zucker, Aminosäuren oder Nukleotide) mit Hilfe von Membrantransport-Proteinen durch die Membran geschleust werden. Dies geschieht mit zwei Klassen von Proteinen: Ionenkanal- oder Carrier-Proteine:

**Freie Diffusion:** Ionenkanäle werden von Transmembranproteinen gebildet, welche die Membran tunnelartig durchspannen. Das Innere der Kanäle ist polar, was es kleinen geladenen oder polaren Molekülen ermöglicht, in die Zelle zu gelangen. Verschiedene Kanäle haben unterschiedliche Selektivitäten für bestimmte Ionen oder Moleküle. Meist sind die Kanäle nicht immer geöffnet; ihre Durchlässigkeit kann durch geeignete Signale gesteuert werden. Ligandengesteuerte Kanäle reagieren auf die Bindung eines Botenstoffes (z.B. Hormone), spannungsgesteuerte Kanäle öffnen in Abhängigkeit vom Membranpotential und mechanisch gesteuerte Kanäle reagieren auf Druck- oder Scherkräfte. Sind die Kanäle einmal offen, ermöglichen sie den Konzentrationsausgleich entlang des Konzentrationsgradienten. (Abbildung 3.8, Fall B)

**Erleichterte Diffusion:** Bei der erleichterten Diffusion wird das Molekül von Carriern von einer Seite auf die andere transportiert. Carrier sind substratspezifisch und agieren durch eine Konformationsänderung nach Bindung ihres Substrats. (Abbildung 3.8, Fall E)

**Aktiver Transport:** Während beim passiven Transport Moleküle die Membran eigenständig und ohne Energieverbrauch entsprechend dem Konzentrationsgefälle überwinden, kann der aktive Transport auch gegen dieses Gefälle stattfinden, verbraucht dann aber Energie in Form von ATP<sup>20</sup>. (Abbildung 3.8, Fall C bis E)

### 3.6.2 Endozytose

Als Endozytose bezeichnet man einen Einstülpungsvorgang der Zellmembran, bei dem sich eine Einzelzelle einen Flüssigkeitstropfen, bestimmte darin gelöste Substanzen, Makromoleküle oder größere Nahrungsteilchen bis hin zu kleineren anderen Zellen

---

<sup>20</sup> Adenosintri-phosphat

### 3 Grundlegende Konzepte

einverleibt.[75] Am Ende des Einstülpungsvorgangs wird eine Nahrungsvakuole ins Zellinnere abgeschnürt (Abbildung 3.8, rechts unten). Die Endozytose ist der übliche Aufnahmeweg für polymere Partikel wie sie bei dem nicht-viralen DNA-Transport verwendet werden.[76, 77, 78]

Man unterscheidet zwei verschiedene Formen der Endozytose [79]:

**Phagozytose:** (auch *Zellfressen* genannt) dabei werden feste Partikel aufgenommen.

**Pinozytose:** (das *Zelltrinken*) dient der Aufnahme von extrazellulärer Flüssigkeit und darin gelöster Partikel.

Eine andere Differenzierung der Endozytose erfolgt nach ihrem zeitlichen Verlauf und kennt die drei Formen [80]

**Flüssigphasen-Endozytose:** Eine direkte Aufnahme eines Umgebungsvolumens mit denselben Konzentrationsverhältnissen wie sie in der extrazellulären Flüssigkeit vorliegen. Dieser Prozeß ist unspezifisch und ineffizient, ganz im Gegensatz zu den beiden folgenden Möglichkeiten.

**Adsorptive Endozytose:** Hierbei nimmt die Zelle unspezifisch an der Zellmembran gebundene Makromoleküle (z.B. gebunden an Lectine oder über ihre positive Ladung<sup>21</sup>) auf.

**Rezeptor-vermittelte Endozytose:** Durch Binden von spezifische Liganden an Rezeptoren werden diese lokal konzentriert und in die Zelle aufgenommen.

#### Phagozytose

Die Phagozytose wird nur von bestimmten Zellen ausgeführt, den Fresszellen. Die dabei entstehenden Endosomen verschmelzen nach kurzer Zeit mit den Lysosomen, welche mit verdauenden Enzymen beladen sind; der pH-Wert der Lysosomen nimmt mit ihrer Reifungszeit ab, bis hin zu pH-Werten unter 2.0. Fast alle Stoffe werden in den Lysosomen verdaut oder verändert, so daß sie entweder für den zelleigenen Stoffwechsel verwendet, als Antigene prozessiert oder ausgeschieden werden können. Daher strebt die Technologieentwicklung für den DNA-Transport danach, die Endosomen möglichst früh zu destabilisieren um einen möglichst effizienten DNA-Transfer ins Zytosol oder in den Zellkern zu ermöglichen.

---

<sup>21</sup>Die Zellmembran ist negativ geladen.

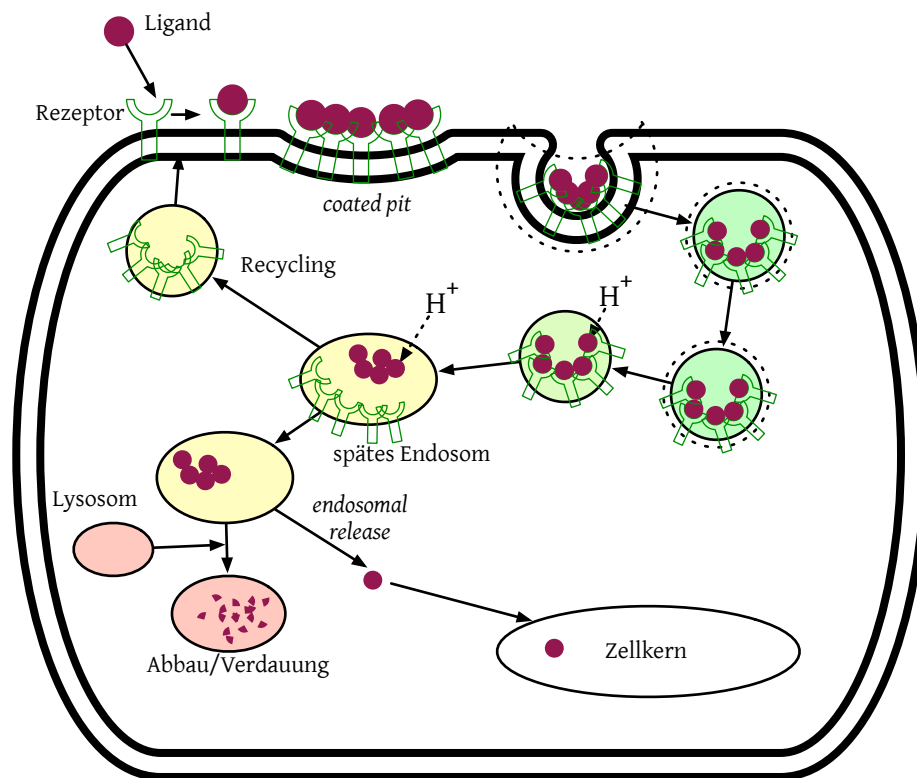


Abbildung 3.9: Clathrin-vermittelte Endozytose.

### Pinozytose

Die Pinozytose ist ein Mechanismus, welcher von allen Zelltypen zur Aufnahme von extrazellulären Stoffen verwendet wird. Oft werden die Begriffe Pinozytose und Endozytose synonym verwendet.[81] Es sind unterschiedliche molekulare Mechanismen der Pinozytose bekannt, welche sich hauptsächlich in der Verwendung der beteiligten Proteine sowie in der Größe der internalisierten Vesikel und der Verwendung ihrer Inhalte unterscheiden.

Im Folgenden sollen die wichtigsten Varianten beschrieben werden:

1. **Clathrin Mediated Endocytosis** (Abbildung 3.9<sup>22</sup>) Die CME findet in allen Zellen statt und ist für die kontinuierliche Aufnahme von Nährstoffen, Antigenen, Wachstumsfaktoren und Pathogenen zuständig.[82] Der erste Schritt zu einer Aufnahme eines Stoffes ist seine Bindung an einen Zelloberflächenrezeptor. Dies führt zu einer

<sup>22</sup>Seite 37

### 3 Grundlegende Konzepte

Anreicherung (*Clustering*) des Rezeptor-Ligand-Komplexes in den sogenannten „coated pits“ – beschichteten Gruben – Orten, an denen sich zusätzlich Membranproteine (vor allem das Clathrin) anreichern, welche dann auch zuständig für die Einstülpung der Membran sind. Die so entstandenen Endosomen sind zwischen 100 nm und 150 nm groß. Diese *frühen Endosomen* verschmelzen dann mit anderen Endosomen zu *späten Endosomen* und schließlich mit *Lysosomen*. Dabei fällt der pH-Wert vom Neutralen über pH 5.9 in den frühen Endosomen bis auf pH 5.0 in den späten Endosomen. Während dieser Prozesse werden die in dem Vesikel befindlichen Partikeln sortiert und die Rezeptoren isoliert und wiederverwendet.

2. **Makropinozytose** ist ein Vorgang, bei dem sehr große endozytotische Vesikel mit unregelmäßigen Formen gebildet werden. Sie wird induziert durch eine Actin-vermittelte Einstülpung der Zellmembran[80] und kann bis zu 5  $\mu$ m große Vesikel bilden. Bei diesem Prozeß sind weder *coated pits* noch Rezeptor-Ligand-Komplexe beteiligt. Sie wird meist dann von Zellen verwendet, wenn eine große Menge an Flüssigkeit aufgenommen werden muß, wie z.B. bei den unreifen dendritischen Zellen, die konstant auf der Suche nach Antigenen sind. Manche Pathogene lösen die Makropinozytose aus, um in eine Zelle zu gelangen.
3. **Rezeptor-vermittelte Endozytose**: Die meisten Rezeptor-Ligand-Komplexe werden über Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen. In einigen Fällen wurden jedoch auch Clathrin-unabhängige Mechanismen beschrieben;[83] die Kenntnis dieser Mechanismen konnte auch schon im gezielten Transport von Therapeutika oder DNA in Tumorzellen verwendet werden.[84, 85]

#### 3.6.3 Wege zur Aufnahme von DNA in eine Zelle

##### Technologie des DNA-Transports

Beim nicht-viralen DNA-Transport – dabei ist der Zielort der DNA das Zytoplasma oder der Zellkern – werden meist Liposomen oder kationische Polymere eingesetzt, um DNA in die Zelle zu schleusen. Dabei müssen verschiedene Barrieren überwunden werden: 1. Das DNA-Konjugat muß an die Zellmembran adsorbieren, 2. diese Membran passieren bzw. überwinden, 3. sich gegen einen Abbau im Endosom und später im Lysosom schützen, und 4. schließlich aus dem Endosom „entkommen“ und zum Zielort gelangen.

Mit gewissen Liganden im Konjugat wird daher versucht, die Rezeptor-vermittelte Endozytose einzuleiten, sowie durch Anwendung des „proton sponge effects“ das entstandene Endosom zu destabilisieren und so den Eintritt in das Zytosol zu ermöglichen.



### Aufnahme von CpG-Oligonukleotiden

CpG-DNA wird über die Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen. Aus den frühen Endosomen wird die DNA in ein Lysosom transportiert und dort vom TLR9 erkannt. Es folgt eine sequenzunabhängige Bindung der DNA an den Toll-like-Rezeptor 9, allerdings wird von Oligonukleotiden ohne das CpG-Motiv keine Aktivierung ausgelöst. Ebenso ist die Senkung des pH-Wertes notwendig, damit es zu einer Aktivierung der Immunzellen kommt.[86, 87]

Die Aufnahme der partikulären CpG-Oligonukleotide des Typus A ist deutlich erhöht gegenüber denen der Typen B und C.

**T. Roberts** spekuliert über einen längenabhängigen DNA-Aufnahmemechanismus in Makrophagen, welche als phagozytierende Zellen möglicherweise spezielle Rezeptoren zur Erkennung von DNA besitzen.[88]

## 3.7 Multi-/Polyvalente Effekte

Zum Abschluß dieser Einführung soll noch auf ein wichtiges Grundprinzip in vielen immunologischen Wechselwirkungen eingegangen werden, die sogenannten *polyvalenten Effekte*. Diese treten nicht nur bei der Phagozytose auf, bei der ein Erreger von einer Zellmembran umschlossen wird, sondern auch in vielen immunologischen Erkennungsprozessen, welche durch diese polyvalenten Effekte spezifischer und stärker werden. Dabei wird auch, zum besseren Verständnis, auf die zugrunde liegende Thermodynamik eingegangen – in Kombination mit Zahlenbeispielen zur Verdeutlichung der Effekte.

Die Valenz eines Teilchens<sup>23</sup> ist durch die Anzahl gleichwertiger Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen gegeben, die es mit anderen Teilchen eingehen kann. Die Möglichkeit eines Teilchens, mehrere dieser Bindungen einzugehen, nennt man polyvalente Wechselwirkungen. Ihre Entdeckung lieferte neue Ideen und Konzepte zur Entwicklung von Arzneimitteln, aber auch zum Verständnis komplexer biologischer Zusammenhänge.

Nur wenige Wechselwirkungen dieser Art sind bisher eindeutig als polyvalent identifiziert worden; dennoch steht die Hypothese von Whitesides im Raum, ob nicht die Wechselwirkungen zwischen biologischen Einheiten im Allgemeinen eher polyvalenter Natur sind.[89, 90]

---

<sup>23</sup>kleine Moleküle, Oligosaccharide, Proteine, Nukleinsäuren, Lipide oder deren Aggregate; Membranen oder Organellen; Viren, Bakterien oder Zellen

### 3.7.1 Beispiele aus der Humanbiologie

1. Die Bindung des Influenza-Virus an die Zelloberfläche von bronchialen Epithelzellen spielt sich über mehrere Bindungsstellen des Virus ab, welcher dann durch Endozytose von der Zelle internalisiert wird. Dies geschieht über die Wechselwirkung mehrerer Trimere des Hämagglutinins<sup>24</sup> auf dem Virus (knapp 1000 pro Viruspartikel) mit mehreren Einheiten von N-Acetylneuraminsäure auf der Epithelzelle (knapp 100 pro 100 nm<sup>2</sup>).

2. Im Falle einer Entzündung verändern sich die Gefäßwände derart, daß Neutrophile in das betroffene Gewebe einwandern können. Dabei exprimieren die Endothelzellen des Blutgefäßes durch Zytokin-Induktion mehrere Klassen von Selectinen auf ihrer Oberfläche, an welche die Neutrophilen binden und so an der Gefäßwand haften bleiben. Sie können sich nur noch durch Rollen fortbewegen und dann langsam zwischen den Endothelzellen aus dem Gefäß in das Gewebe einwandern. Zusätzlich erfolgt eine Aktivierung der Neutrophilen durch die Bindung an die Selektine.

3. Bakterien werden, wenn sie vom adaptiven Immunsystem erkannt sind, mit einer Schicht von spezifischen Antikörpern beladen. Dadurch weisen eine Menge der konstanten Fc-Teile der Antikörper nach außen in die Lösung; diese Fc-Teile können von Makrophagen erkannt werden, welche als Fresszellen dann diese Bakterien phagozytieren. Die polyvalente Erkennung der Fc-Teile der Antikörper spielt dabei eine entscheidende Rolle.

Es sind noch viele weitere Beispiele von Wechselwirkungen bekannt – vor allem aus den Bereichen der Immunologie und der Signaltransduktion.[89, 90]

### 3.7.2 Thermodynamik

Es gibt noch keine allgemein anerkannte Nomenklatur der polyvalenten Wechselwirkungen, so daß hier die von **M. Mammen et al.** eingeführte Nomenklatur[89, 90] verwendet werden soll, welche die meisten relevanten Terme aus der monovalenten Wechselwirkung ableitet und damit recht intuitiv zugänglich ist; häufig werden durchschnittliche Gibbs-Bindungsenergien  $\Delta G_{avg}^{poly}$  und Bindungskonstanten  $K_{avg}^{poly}$  verwendet, sowie ihre integralen Summenwerte  $\Delta G_N^{poly}$  und  $K_N^{poly}$  (im Fall der monovalenten Bindung sind beide Terme jeweils identisch:  $\Delta G_{avg}^{mono} = \Delta G^{mono}$  und  $K_{avg}^{mono} = K^{mono}$ ).

$$\Delta G_{avg}^{poly} = \Delta G_N^{poly} / N \text{ mit } \Delta G = -RT \ln(K)$$

---

<sup>24</sup>Hämagglutinin ist eines der drei integralen Membranproteine des Influenzavirus A. Der Name des Hämagglutinins rührt von der Entdeckung her, dass das Influenzavirus in der Lage ist, rote Blutzellen zu verklumpen. Dieser Vorgang heißt Hämagglutination.

$$K_N^{poly} = (K_{avg}^{poly})^N$$

Darüberhinaus bezeichnet *Affinität* eine Qualität mit der quantitativen Größe der *Affinitätskonstante*  $K$ . *Avidität* bezieht sich auf polyvalente Wechselwirkungen mit der *Aviditätskonstante*  $K_N^{poly}$ . Beispielsweise bindet ein Antikörper mit einem seiner beiden  $F_{ab}$ <sup>25</sup>-Teile einen Liganden mit einer bestimmten Affinität, während derselbe Antikörper eine Oberfläche – mit gebundenen Liganden-Funktionen – mit einer gewissen Avidität bindet; die Avidität kann, je nach Dichte der Liganden auf der Oberfläche deutlich höher, aber auch deutlich niedriger sein als die korrespondierende Einzel-Affinität.

Die polyvalenten Wechselwirkungen zeigen Merkmale von Kooperativität, bei der die durchschnittliche Gibbs-Bindungsenergie bei einer polyvalenten Bindung größer als (positiv kooperativ, Synergie), kleiner als (negativ kooperativ, Interferenz) oder gleich (nicht kooperativ, Additivität) der monovalenten Bindungsenergie sein kann. Die Größe  $\alpha$  bezeichnet das Maß der Kooperativität:

$$\Delta G_{avg}^{poly} = \alpha G^{mono} \text{ und } N\Delta G_{avg}^{poly} = \Delta G_N^{poly} = \alpha N G^{mono}$$

$$K_N^{poly} = (K_{avg}^{poly})^N = (K^{mono})^{\alpha N}$$

Im Folgenden sind Zahlenbeispiele angegeben, um diese Effekte zu verdeutlichen:

1. Monovalente Bindungskonstanten von Antikörpern ( $10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1}$ )
2. Bivalente Bindung eines Antikörpers gegen ein *Bacillus Subtilis* Antigen  $K_2^{bi} = 30K^{mono} < (K^{mono})^2 \text{ M}^{-1}$  (negativ kooperativ)
3. Bi- und trivalente Bindung eines Galactose-haltigen Liganden an Lectine auf Zelloberflächen  $K^{mono} = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_2^{bi} = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} = 420K^{mono}$ ,  $K_3^{tri} = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} = 2800K^{mono}$  (ebenfalls negativ kooperativ)

Es muss betont werden, daß hier zwar eine negative Kooperativität vorherrscht, die gemessene Affinität für bivalente Moleküle aber deutlich höher liegt als die für monovalente Moleküle. Eine feste Bindung erfordert also keine positive Kooperativität im traditionellen Wortsinn. Deshalb führen **M. Mammen et al.** einen neuen Parameter  $\beta$  ein, welcher die Bindungsverstärkung in polyvalenten Systemen beschreibt.

$$\beta = K_N^{poly} / K^{mono}$$

---

<sup>25</sup>Der  $F_{ab}$ -Teil enthält nur die antigen-bindenden Fragmente eines Antikörpers. Er wird durch die Verdauung des Antikörpers mit der Protease Papain erhalten.

### 3 Grundlegende Konzepte

Dieser Wert kennzeichnet den Befund, daß polyvalente Bindung möglicherweise durch eine negative Kooperativität geringere Bindungsstärken bezogen auf ihre einzelnen Bindungsstellen haben, aber dennoch als polyvalentes Gesamtmolekül viel stärker binden können. Dies lässt sich mitunter durch eine erzwungen erhöhte Lokalkonzentration der Bindungselemente erklären, die es dem polyvalenten Teilchen ermöglichen, nach Dissoziation wieder eine neue Bindung einzugehen – und somit bleibt die Art und Weise der Bindung des polyvalenten Teilchens an den polyvalenten Partner dynamisch und im Wandel, aber dennoch ohne die gesamte Bindung zu beeinträchtigen. Messungen von **F. Karush** haben ergeben, daß bei polyvalenten Bindungen die Assoziation sehr ähnlich dem Fall der monovalenten Teilchen ist (Faktor 2), während hingegen die Dissoziation deutlich verringert (Faktor  $10^4$ ) ist.[91]

#### 3.7.3 Funktionelle Vorteile polyvalenter Wechselwirkungen

1. Durch diese Kombination von mehreren Bindungsstellen sind sehr starke Bindungen mit Liganden mittlerer oder kleiner Oberfläche möglich, welche z.B. bei der zellulären Erkennung eine Rolle spielen.
2. Auch abgestufte biologische Antwort- und Signalprozesse lassen sich so realisieren, da durch Hinzunahme mehrerer ähnlicher oder identischer Bindungsstellen der Effekt verstärkt wird – und auch in heterogenen Systemen von der Bindung mehrere Bindungspartner-Klassen (Heteromere Multivalenzen, s.u.) abhängen kann:
  - a) Die Beseitigung von Pathogenen durch antikörpervermittelte Anlagerung an Makrophagen führt erst nach Bedeckung eines Großteils der Oberfläche eines Pathogens zur Phagozytose, während einzelne erkannte Fc-Teile eines Antikörpers keine Aktion des Makrophagen bewirken.
  - b) Die Auslösung der Komplementkaskade bei der Bekämpfung von Pathogenen findet erst nach Wechselwirkung eines *pentavalenten* Proteins mit fünf Antikörpern auf der Oberfläche eines Bakteriums statt.
3. Dieses Wirkprinzip ermöglicht eine besondere evolutionäre Effizienz: Durch die Vervielfältigung von bestehenden Wechselwirkungen können neue Effekte entstehen.
4. Heteromere Multivalenzen bezeichnen das Phänomen, daß nur bei Kombination von zwei polyvalenten Ligandentypen im richtigen Verhältnis eine Signalverarbeitung stattfindet.
5. Es besteht auch die Möglichkeit zur Signaltransduktion durch Induktion großer konformativer Veränderungen: IgM-Antikörper bestehen aus fünf verbundenen, bivalenten Strukturen, welche kreisförmig, mit den hypervariablen Strukturen im Außenkreis, angeordnet sind. Nach dekavalenter Bindung an eine Oberfläche weisen

alle der fünf bivalenten Strukturen, welche vorher im Inneren der planaren Struktur verborgen waren, in dieselbe Richtung im Raum und können erkannt werden.

6. Ein weiteres Beispiel findet sich in der Signaltransduktion. Durch Vernetzen von Rezeptoren auf einer Zelloberfläche kann diese in ihrer Funktion beeinflusst werden. Viele Wachstumsfaktoren und Zytokine sind polyvalente Moleküle und wirken über die Bindung und Multimerisierung von Oberflächenrezeptoren.[\[92\]](#)



## 4 Aufgabenstellung

Auf der Basis der in Kapitel 3 erläuterten Grundlagen des Immunsystems sowie der beschriebenen speziellen Erkennung von CpG-Oligonukleotiden soll nun im Folgenden auf die Fragestellung eingegangen werden, warum Interesse an einem Tool besteht, welches einen kontrollierten Zugang zu hochmolekularen Multimeren von CpG-Oligonukleotiden ermöglicht.

### 4.1 Adsorption von CpG-DNA an Poly(styrol)-Partikeln führt zu einer veränderten Wirkung

#### 4.1.1 Kationische Poly(styrol)-Partikeln

Wie die Ergebnisse von **M. Kerkmann** gezeigt haben, ist es möglich, die immunologischen Effekte eines hochmolekularen Oligomers aus Typ-A CpG-Oligonukleotiden zu simulieren, wenn einzelsträngige Typ-B-CpG-Oligonukleotide auf die Oberfläche eines kationischen Poly(styrol)-Nanopartikels adsorbiert werden. Dabei lässt sich plötzlich eine Induktion von Interferon- $\alpha$  beobachten, welche nicht von reinen Typ-B-Oligonukleotiden induziert werden kann.[52]

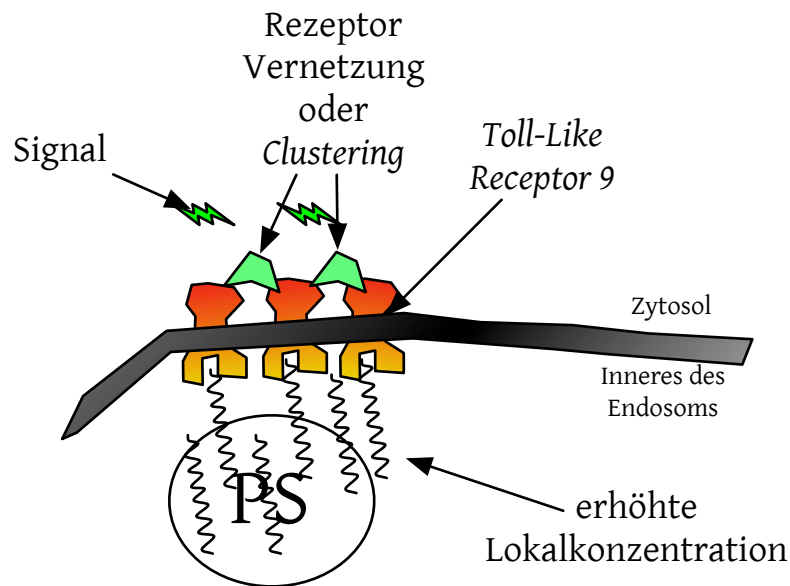
Die dabei verwendeten Poly(styrol)-Partikeln sind das Produkt einer Emulsionspolymerisation in Wasser mit dem amidgruppenhaltigen (und damit im wässrigen System kationischen) Azoinitiator AIBA<sup>1</sup>. Die dabei entstehenden Latexpartikeln sind im Mittel 250 nm (je nach Initiatormenge zwischen 100 nm und 350 nm) groß und damit in der Größenordnung von Viren. Diese Partikel wurden von **H. Fritz et al.** zur selektiven Bindung kurzer Antisense-DNA entwickelt.[93]

#### 4.1.2 Mögliche Ursachen – Hypothesen

Der Grund, warum die gebundenen Typ-B-Oligonukleotide plötzlich einen Typenwechsel bezüglich ihrer Wirkung zeigen, ist noch unbekannt. Allerdings lassen sich mögliche Gründe formulieren, die zu diesem Effekt beitragen könnten:

---

<sup>1</sup>Azobisisobutyramidin



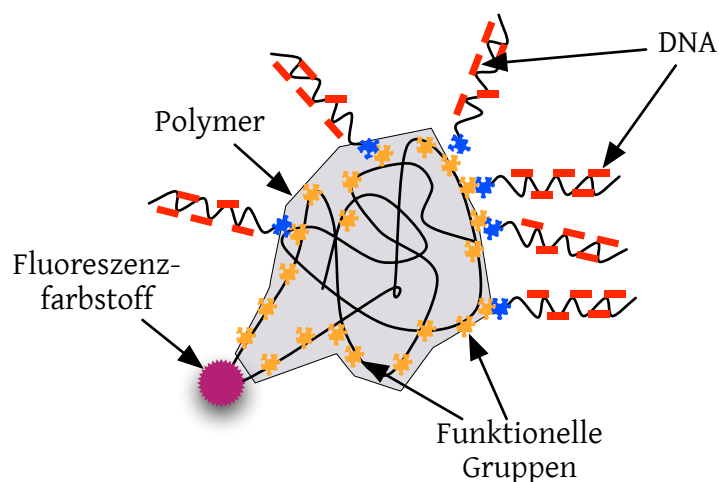
**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der möglichen strukturellen Ursachen der veränderten Wirkung des Oligonukleotids 2006, welches auf Poly(styrol)-Partikeln gebunden wurde.

- Multivalente Effekte sind ein zentraler Modulationsmechanismus in der Immunologie; nicht nur die Bindungsstärke wird erhöht, sondern auch weitere Effekte ermöglicht.
- Rezeptor-Clustering oder -Crosslinking könnte bewirken, daß auf der zytosolischen Seite des aktivierten Rezeptors, bedingt durch die räumliche Nähe eines weiteren aktivierten Rezeptors, die Wechselwirkung mit dem nächsten Element der Signalkaskade verändert wird; weiterhin könnten autokatalytische Aktivierungen oder Adapterproteine eine Rolle spielen.
- Änderung der Aufnahme des hochmolekularen Partikels in die Zellen.
- Erhöhung der lokalen Konzentration durch Aufnahme der Oligonukleotide „in Paketen“.

## 4.2 Multifunktionelle Polymere als Träger für Typ-B Oligonukleotide

Zur Ermöglichung der weiteren Untersuchung und Optimierung dieses Effekts und seiner Ursachen war es Ziel dieser Arbeit, Grundlagen für ein flexibles polymeres Trägersystem zu entwickeln, welches die Effekte, wie sie bei den Poly(styrol)-Partikeln erstmals





**Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung der Zielstruktur eines multifunktionalen Trägerpolymers.

beobachtet wurden, in einer kontrollierten Struktur nachahmen und möglicherweise verbessern kann. Die DNA sollte kovalent an das Polymer gebunden werden, um eine bessere Kontrolle über die Art der Präsentation der DNA für den Rezeptor zu ermöglichen.

Darüberhinaus war es von Interesse, Fluoreszenzfarbstoffe am Polymer anzubringen, um die Visualisierung der Polymer-Aufnahme und -Prozessierung in der Zelle zu ermöglichen.

Ein Schema eines solchen Polymers ist in [Abbildung 4.2](#) dargestellt.

Zusätzlich zur Entwicklung dieser Polymere war es wichtig zu überprüfen, welche Methoden der Analytik zur Charakterisierung der DNA-Polymer-Konjugate geeignet sein könnten: verfügbare DNA-Mengen liegen i.A. im  $\mu\text{g}$ -Maßstab vor, so daß der Fokus in der Methodenauswahl auf die biochemische Analytik zu richten war.



## **Teil III**

# **Ergebnisse & Diskussion**



## 5 Ergebnisse & Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, Grundlagen für ein flexibles polymeres Trägersystem zu entwickeln, bei dem DNA kovalent an das Polymer gebunden werden kann, um eine bessere Kontrolle über die Art der Präsentation der DNA für den Rezeptor zu ermöglichen.

### 5.1 Analyse der Aufgabenstellung

Die Analyse der Aufgabenstellung ergab folgende Spezifikationen für das zu entwickelnde Polymersystem:

1. CpG-Oligonukleotide lassen sich kovalent an das Polymer binden und zwar so, daß das 5'-Ende, welches für die Erkennung am Rezeptor essentiell ist, frei in den Raum ragt.
2. Weitere, orthogonale Bindungsstellen stehen zur Verfügung, um z.B. Fluoreszenzfarbstoffe oder Antigene an das Polymer zu binden.
3. Das Polymer ist gut wasserlöslich.
4. Das Polymer ist nicht toxisch.
5. Das Polymer ist gut und kontrolliert zugänglich, gut strukturiert und flexibel in seiner Zusammensetzung. Durch Variation von
  - a) Länge,
  - b) Molmasse,
  - c) Dichte
  - d) und Art der funktionellen Gruppenist eine Vielzahl an Strukturvariationen möglich.
6. Ein Augenmerk in der Entwicklung sollt darauf gelegt werden, daß die Beladung der Polymere mit DNA, ihre Reinigung sowie ihre Charakterisierung mit den Methoden eines biochemisch-immunologischen Labors durchgeführt werden können.
7. Dazu mussten auch die zur Verfügung stehenden Methoden der Charakterisierung der Polymere und Konjugate in diesen Labors überprüft und evtl. angepasst werden.

Dabei war es von zentraler Bedeutung, Polymere unterschiedlicher Strukturklassen, Funktionalitäten, Massen und Beladungsdichten herzustellen, um dann später in der immunologischen Testung eine vielfältige Ausgangsbasis zur Verfügung zu stellen.

## 5.2 Evaluierung der bekannten Systeme für DNA-Transport

Zuerst stellte sich die Frage, ob nicht schon ein System, welches diese Anforderungen erfüllen könnte, in der Literatur beschrieben wurde. Immerhin ist der DNA-Transport ein Forschungsgebiet, zu dem in den letzten Jahren ausgiebige Untersuchungen durchgeführt wurden.

Allerdings wurde bei der Suche nach einem geeigneten Polymer für die in Kapitel 4 beschriebenen Ziele (kovalente Anknüpfung von DNA; multivalent) in der Literatur kein geeignetes etabliertes System gefunden.

Die gängigste Kombination der Schlagworte „DNA“ und „Polymer“ bezieht sich auf den DNA-Transport, einen Oberbegriff für (a) Transfektionsreagenzien, welche verwendet werden, um Gene oder Plasmide in Zellen zu schleusen, und (b) Polymere für den Transport von Antisense-Oligonukleotiden zur selektiven Störung einzelner Gene.

Beide Systeme dienen also dem Transport von DNA an Orte in der Zelle, an dem die genetische Information prozessiert wird: Zytosol und Zellkern.

Die meisten dieser Polymere sind Polykationen (z.B. poly-K<sup>1</sup> oder PEI<sup>2</sup>)[94, 95] und zeigen damit folgende Probleme:

1. *Toxizität*: Polykationen sind in der Lage, die negativ geladene Zellmembran zu destabilisieren. Dies ist in zweierlei Hinsicht kritisch für eine Anwendung in der Immunologie:
  - a) Die Zielzelle (dendritische Zelle) ist nur in geringen Mengen im Blut enthalten und sollte nicht geschädigt werden.
  - b) Eine lysierte und damit getötete Zelle setzt ihren Inhalt frei, welcher evtl. ebenfalls immunstimulierend oder -modulierend wirken kann.

### 2. *Struktur der DNA-Polymer-Konjugate*:

---

<sup>1</sup>Poly(L-Lysin)

<sup>2</sup>Poly(ethylenimin)

- a) Sie bilden *kompakte Partikeln* und schützen die DNA gegen den Abbau durch Nukleasen.
- b) Der Zielort der DNA ist das *Zytosol*. Dies wird durch den sogenannten Protonenschwammeffekt (*proton sponge effect*)[96, 97] erreicht, welcher zur Destabilisierung des Endosoms beiträgt und somit die Verweilzeit des Polymer/DNA-Konjugats im Endosom verringert.

3. Die Bindung von DNA an diese Polymere erfolgt allein durch ionische Interaktion.

Weitere DNA-Polymer-Konjugate finden sich bei der Immobilisierung von DNA auf Oberflächen: z.B. bei Gen-Chips auf Goldoberflächen zur Detektion von komplementären DNA-Sequenzen. Die Bindung erfolgt hier entweder über ein Biotin an der DNA, welches an ein Avidin auf der Oberfläche bindet, oder direkt über eine Thiol-Modifikation der DNA am 5'-Ende, welche dann auf eine Gold-Oberfläche gebunden wird.[98]

Zwei weitere Systeme, bei denen DNA kovalent an ein Polymer gebunden ist, sind in der Literatur beschrieben:

- (a) **K. J. Watson et al.** [99] synthetisierten ein Polymer, welches mit einem Phosphoramidit funktionalisiert wurde, so daß eine *de novo* Festphasensynthese eines Oligonukleotids zu einem kovalenten DNA-Polymer-Konjugat führte. Dabei war die Anknüpfung der DNA über das 5'-Ende erfolgt.
- (b) Ein weiteres System wurde von **J. Won et al.** [100] entworfen: Lineares Poly(ethylen-glykol) wurde an einem Terminus mit einer Maleinimid-Funktionalität versehen, an welche dann eine DNA mit einer Thiolgruppe gebunden wurde. Die Kapillarelektrophorese dieses linearen DNA-Polymer-Konjugats ergab ein massenaufgelöstes Elugramm, welches in seiner Form und Aussagekraft einem MALDI-Massenspektrum ähnelt.

### 5.3 Konzept: Design der Polymere

Im folgenden Abschnitt sollen Vorüberlegungen zum Konzept, der Synthese und der Charakterisierung der multifunktionellen Polymere sowie deren Konjugate dargelegt werden. Dazu gehören Betrachtungen zu den hierfür in Frage kommenden Polymerarchitekturen sowie zu möglichen Kupplungsreaktionen, um die Wirkmoleküle an das Polymer zu binden. Ebenso findet sich ein Abschnitt über die Möglichkeiten der Charakterisierung der Konjugate, welche – bedingt durch die geringen Mengen an verfügbarer DNA – nur in  $\mu\text{g}$ -Mengen zugänglich sein werden .

### 5.3.1 Konzept

Die gewünschten Polymere sollen folgende Eigenschaften in sich vereinen:

1. Multifunktionalität: Anbindung von mehr als vier DNA-Molekülen
2. Hetero-(bi|tri)funktionalität: Anbindung von mehr als einem Typus von Biomolekülen oder Farbstoffen
3. Wasserlöslichkeit
4. keine Toxizität
5. biologische Abbaubarkeit oder Ausscheidbarkeit

Als mögliche strukturelle Basis für ein solches Polymersystem wären Polyaminosäuren denkbar; die lebende ringöffnende Polymerisation von NCA<sup>3</sup> bietet einen Zugang zu kontrollierten Polymerarchitekturen. Mögliche Nachteile sind aber darin zu sehen, daß die Poly-Aminosäuren relativ leicht im Endosom abgebaut werden können – sie sind ja auf komplett biologischer Basis bzw. Proteinbasis aufgebaut – und auch als Bruchstücke möglicherweise dann als Antigene präsentiert werden könnten, was nicht im Sinn einer kontrollierten Immunstimulation wäre und Nebenreaktionen des Immunsystems hervorrufen könnte.

Eine attraktive Alternative zu Polyaminosäuren stellen die Poly(2-Oxazolin)e dar, welche ebenfalls in kontrollierter Weise hergestellt werden können. Infolge der relativ milden und verträglichen Polymerisationsbedingungen ist es problemlos möglich, funktionelle Gruppen durch geeignete Reste am Monomer in das Polymer einzubauen. Ebenso leicht lassen sich Copolymere herstellen: Dabei sind nicht nur statistische, sondern auch Gradientenblock- und Block-Copolymere möglich. Weitere funktionelle Gruppen sind durch die Verwendung geeigneter Initiatoren und/oder Terminatoren zugänglich. Damit ist grundsätzlich die Voraussetzung für die oben genannten Eigenschaften 1, 2 und 3 gegeben.

### 5.3.2 Poly-(2-Oxazolin)e

Der Polymerisation von (funktionellen) 2-Alkyl-2-oxazolin-Monomeren liegt ein elektrophiler lebender ringöffnender Mechanismus zugrunde, welcher je nach Lösemittel und Gegenion über ionische oder kovalente Zwischenstufen führt (siehe Abbildung

---

<sup>3</sup>N-Carboxy-Anhydrid



5.1<sup>4</sup>).[101, 102] Die Monomere sind über mehrere Reaktionswege zugänglich (siehe Abbildung 5.5<sup>5</sup>) und können eine Vielzahl von funktionellen Gruppen enthalten, sofern diese nicht als Nukleophile die Polymerisationsreaktion stören. Viele funktionelle Gruppen können in einer geschützten – unreaktiven – Form im Monomer verwendet werden. So wurde bereits 1968 von **A. Levy und M. Litt** die Substanzpolymerisation eines mit einer Estergruppe substituierten Oxazolins beschrieben, welches 2003 von **T. Zarka** in einer Lösungspolymerisation zur Herstellung von säurefunktionalisierten amphiphilen Polymeren verwendet wurde.[103, 104, 105]. Außerdem ist ein, an seiner NH<sub>2</sub>-Gruppe mit Boc<sup>6</sup> geschütztes, Oxazolin bekannt, welches von **S. Cesana** im AK Nuyken erstmals hergestellt wurde.[106, 107]

Die Polymerisation wird durch elektrophile Initiatoren wie Triflate, Tosylate oder Benzylhalogenide gestartet; Nukleophile terminieren die Reaktion. Funktionelle Gruppen können demnach auch sehr leicht durch eine geeignete Wahl des Initiators bzw. des terminierenden Reagenzes eingeführt werden.

**Struktur & Eigenschaften** Im Allgemeinen sind Poly(2-Methyloxazolin) und Poly(2-Ethyloxazolin) wasserlöslich. Sie können Wasserstoffbrücken über die Amidbindung am Polymerrückgrat bilden; ebenso können sich die Dipole der Amidbindung entlang des Polymerrückgrats ausrichten. In Abwesenheit von Wasser sind selbst die hydrophilen Poly(2-Methyloxazolin)e in Dichlormethan und Chloroform löslich (allerdings lässt sich dann durch Zugabe von geringen Mengen Wasser das Polymer ausfällen).

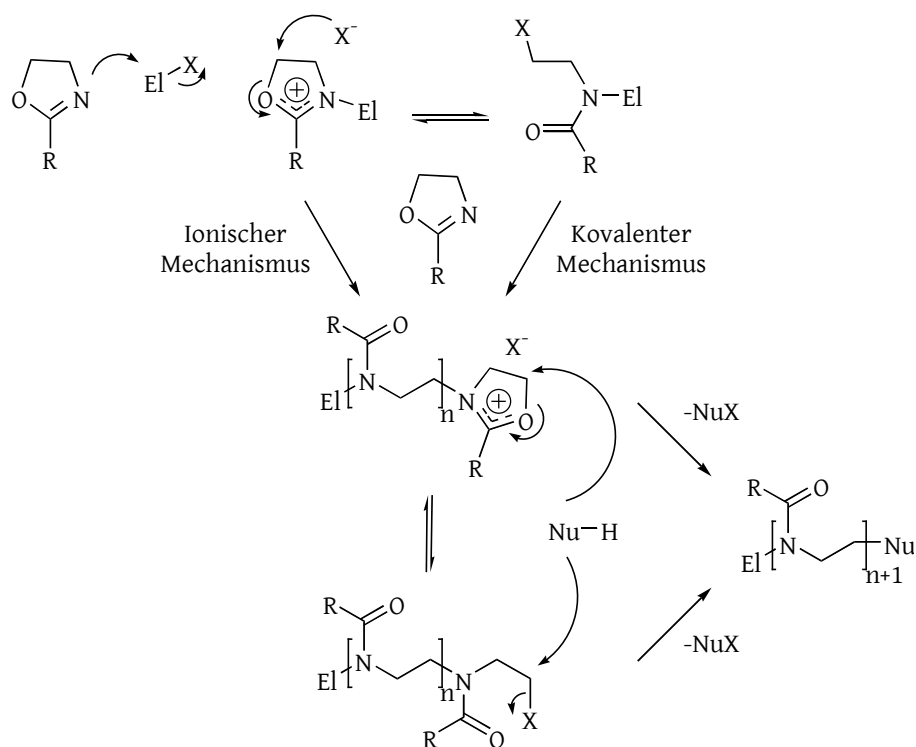
**Polymerisation & Mechanismus** Der Mechanismus der Polymerisation wird in Abbildung 5.1 auf der nächsten Seite dargestellt. Die Polymerisation wird durch den nukleophilen Angriff eines Monomer-Moleküls an ein Initiator-Molekül eingeleitet. Das dabei entstehende Oxazoliniumkation kann direkt durch ein weiteres Monomer-Molekül nukleophil angegriffen werden (*Ionischer Mechanismus*), wobei sich seine Ringstruktur öffnet. Alternativ kann auch zuerst das Gegenion X<sup>-</sup> (die Abgangsgruppe des Initiators) nukleophil angreifen – es entsteht das 2-X-Ethylamid, an dem ein weiteres Monomer-Molekül nun die Gruppe X nukleophil substituieren kann (*Kovalenter Mechanismus*). Welcher der beiden Mechanismen überwiegt, wird durch Parameter wie die Nukleophilie von X (Struktur, Solvens) und durch die Stabilität des Oxazoliniumkations (elektronische Eigenschaften des Restes am Oxazolinium-Ring) bestimmt.[101, 108]

---

<sup>4</sup>Seite 56

<sup>5</sup>Seite 63

<sup>6</sup>t-Butyloxy-carbonyl

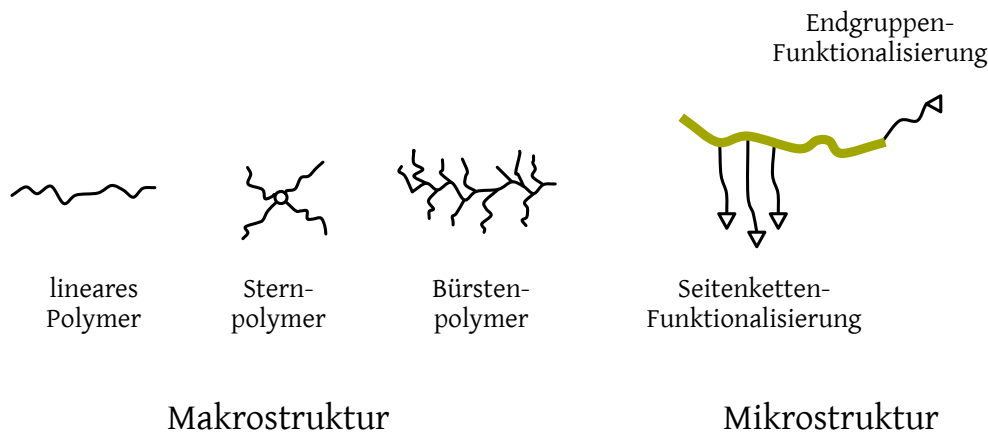


**Abbildung 5.1:** Mechanismus der Polymerisation von 2-Alkyl-2-Oxazolinen.

Die Polymerisation von Monomeren mit stark elektronenziehenden Eigenschaften, wie Perfluoralkyloxazolinen, erfolgt über einen rein ionischen Mechanismus, während stark elektronenschiebende Gruppen, z.B. bei langkettigen Alkyloxazolinen, den kovalenten Mechanismus bevorzugen. Gegenionen wie z.B. das Triflat-Anion favorisieren ebenfalls den ionischen Polymerisationsmechanismus.

Die Synthese der Monomere ist relativ vielseitig (siehe Abbildung 5.5<sup>7</sup>): Die Umsetzung einer Nitrilverbindung mit Aminoethanol in Gegenwart eines Metallkations als Lewis-Säure (z.B.  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ ) nach **W. Witte und W. Seeliger** ist besonders geeignet für die Herstellung unfunktionalisierter 2-Alkyloxazoline.[109]. Eine weitere Methode geht von der Carbonsäure des gewünschten Substituenten aus, und führt nach Kupplung mit 2-Chlorethylamin und der darauffolgenden Behandlung mit einer Base wie  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  oder  $\text{NaH}$  in DMF zum 2-Oxazolin.[103] Die dritte Methode besteht in der **Wurtz-Kupplung** eines Alkylhalogenides mit dem durch Deprotonierung mit *n*-Butyllithium erzeugten 2-Methyloxazolin-Anions.

<sup>7</sup>Seite 63



**Abbildung 5.2:** Vergleich der Strukturmerkmale, die in der Mikro- bzw. der Makrostruktur betrachtet werden.

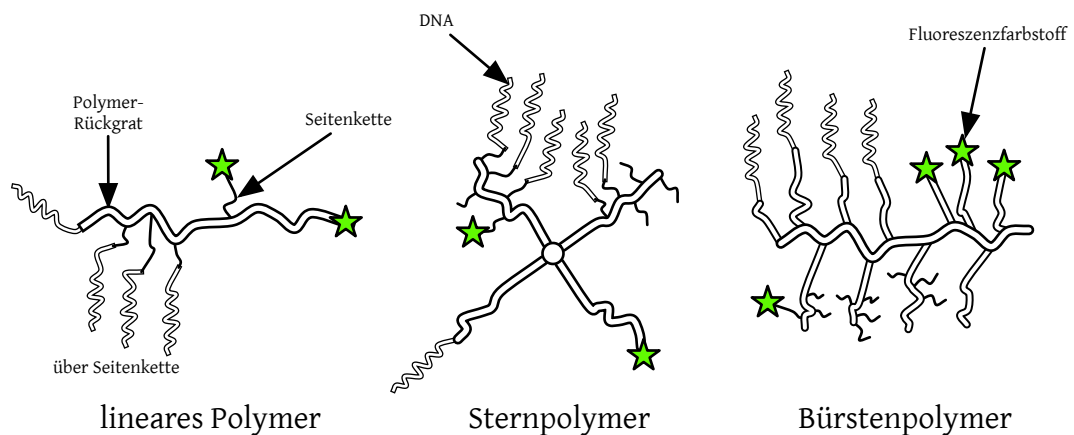
### 5.3.3 Polymerarchitekturen

Multifunktionelle Polymere lassen sich in verschiedenen Architekturen herstellen. Betrachtet man die *Mikrostruktur*,<sup>8</sup> so lassen sich die funktionellen Gruppen an unterschiedlichen Orten in das Polymer einbauen: terminal an den Ketten durch Verwendung von geeigneten Initiatoren bzw. Terminationseinheiten oder über Seitenketten am Polymerrückgrat. Die *Makrostruktur*<sup>9</sup> beschreibt dann eher die Struktur der Kette, wie sie durch Verzweigungen zu charakterisieren ist. Diese Erscheinungsbilder sind auch meist mit dem Begriff „Polymerarchitektur“ gemeint. Darunter fallen dann die Strukturtypen der Stern- oder Bürstenpolymere im Gegensatz zu linearen Polymeren, aber auch die Charakterisierung der Blöcke als Homopolymere, statistische Block- oder Gradienten-Block-Copolymere.

Kombiniert man die Betrachtungsweisen der Mikro- und der Makrostruktur, zeigt sich, daß für die hier angedachte Anwendung der Polymere als Träger von kurzen Oligodesoxyribonukleotiden (ssDNA mit 24 Basen Länge, welche Oligo-Anionen mit 24 negativen Ladungen und einer Molmasse von je 8000 g/mol darstellen) ganz unterschiedliche Varianten bezüglich der Form und Zugänglichkeit der DNA für eine spätere Erkennung im Endosom vorliegen.

<sup>8</sup>Bezogen auf Elemente in der Größenordnung der Monomere; analog der Primär-/Sekundär-Struktur der Proteine.

<sup>9</sup>Bezogen auf Elemente in der Größenordnung der Polymere; analog der Tertiär-/Quartär-Struktur der Proteine.



**Abbildung 5.3:** Die unterschiedlichen Polymerarchitekturen, definiert in Bezug auf die Anknüpfung von DNA und Fluoreszenzfarbstoffen.

Die kovalente Anbindung von größeren Molekülen an die *Seitenketten* der multifunktionalen Polymere benötigt aus sterischen Gründen relativ viel Platz. Lineare Polymere bieten hierfür die größte Flexibilität und Zugänglichkeit, während bei Stern- und Bürstenpolymeren die funktionellen Gruppen der Seitenketten mit zunehmender Nähe zum Zentrum bzw. zur Hauptkette immer unzugänglicher werden.

Dagegen stellt die kovalente Anknüpfung über *terminale Gruppen* ganz andere Anforderungen. Hier können lineare Polymere maximal bifunktional wirken, während generell bei Stern- und Bürstenpolymeren der Anzahl an freien und sterisch fast ungehinderten Gruppen kaum Grenzen gesetzt sind.

Für die Polymermodifikation mit kleineren Molekülen wie Fluoreszenzfarbstoffen spielen diese Vorüberlegungen eine geringere Rolle, da sie sterisch um mindestens eine Größenordnung weniger anspruchsvoll sind.

Abbildung 5.3 zeigt diese unterschiedlichen Fälle graphisch dargestellt.

### 5.3.4 Zielsetzung: Polymerarchitekturen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst Testpolymere aller drei Architekturen hergestellt und auf Ihre Anwendung als Trägerpolymere für DNA untersucht werden:

**Lineare Polymere** sollten eine Sorte funktionelle Gruppe als Seitenkette tragen; ein Teil dieser Polymere sollte mit einer weiteren Gruppe als Endgruppe funktionalisiert werden.

**Sternpolymere** mit vier Armen sollten funktionelle Gruppen entweder in den Seitenketten und/oder als Endgruppen tragen. Im Fall der Seitenkettenfunktionalisierung sollte ein kurzer Block aus Poly(2-Methyloxazolin) einen Abstandshalter bilden, um die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen in Lösung zu erhöhen.

**Bürstenpolymere** sollten als Pfropfblockcopolymere aus einem Poly(styrol-*stat*-chloromethylstyrol) mit Armen aus Poly(2-Methyloxazolin) bestehen; die funktionellen Gruppen sollten nur als Endgruppen eingeführt werden.

### 5.3.5 Kupplungsmöglichkeiten

Die Reaktionsbedingungen in der Biochemie sind meist viel milder und eingeschränkter als es in der „klassischen“ Chemie bzw. Polymerchemie gewöhnlich der Fall ist. Dies ist bedingt durch die Natur der Biomoleküle: Proteine sind in ihrer nativen, gefalteten Form sehr polar, zum Teil ionisch und hauptsächlich wasserlöslich, wohingegen sie unter denaturierenden Bedingungen, wie in organischen Lösemitteln, ihre Form und Funktion verlieren, hydrophobe Bereiche exponieren und evtl. sogar als Amphiphile auftreten können. DNA ist ein Polyanion und damit hauptsächlich in Wasser löslich. Dementsprechend sind die gängigen Lösemittel für biochemische Reaktionen wässrige Lösungen oder Puffer im pH-Bereich um den physiologischen pH von 7.6; allerdings sind manche Reaktionen auch in DMSO oder DMF durchführbar.

Problematisch beim Einsatz von Biokonjugaten ist auch die Verwendung nicht-bio-kompatibler oder toxischer Lösemittel, Kupplungsreagenzien und sonstiger Additive, welche nicht quantitativ entfernt werden können. Besonders im Falle einer Anwendung in der Immunologie können Fremdstoffe schon in geringsten Mengen dazu führen, daß es zu einer Immunaktivierung, einer Sekretion von Zytokinen und/oder zu einer Veränderung der zu beobachtenden Zelle kommt. Beispielsweise wirken Metallionen toxisch oder hemmen die Aktivität eines Enzyms – und das in sehr geringen Mengen. Bei der Verwendung von nur 100 000 Zellen kann schon ein nmol eines Metallkations einen durchaus starken Effekt zeigen.[110]

### Übliche Kupplungsreaktionen in der Biochemie

Seit den ersten Arbeiten zu polymeren Therapeutika von **H. Ringsdorf** sind viele verschiedene Wege zur Schaffung von neuen Polymeren und innovativen Beladungsmöglichkeiten gegangen worden.[111, 112, 113, 114] Kupplungen zwischen Polymer und Therapeutikum wurden zwischen den üblichen funktionellen Gruppen der Pro-

teine (Amine, Carbonsäuren, Thiole; [115, 116]) geknüpft, aber auch Reaktionen mit Alkoholen, Guanidinen [117] oder Alkinen [118, 119, 120] haben heute im Arsenal der Kupplungschemie einen festen Platz.

**Peptidkupplung** Die Reaktion einer aktivierten Carbonsäure mit einem primären Amin findet sich bei Biomolekülen (vor allem Proteinen) sehr häufig. In vitro wird sie meist in DMSO oder DMF unter Zuhilfenahme von Kupplungsreagenzien wie den Carbodiimiden DCC<sup>10</sup> oder EDC<sup>11</sup> durchgeführt, aber auch der Einsatz von Aktivestern als Derivate der Carbonsäure mit den Onium-Kupplungsreagenzien [36] BOP [121, 122], PyBOP oder HATU<sup>12</sup> [123, 124] ist weit verbreitet. Die meisten dieser Reagenzien sind auf hohe Umsätze und Ausbeuten sowie niedrige Racemisierungstendenz hin optimiert worden und sind ein essentieller Baustein der Festphasensynthese. [125]

**Isothiocyanate** Die Addition eines primärenamins an ein Isothiocyanat ist eine Reaktion, die sehr häufig in der Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern oder anderen Proteinen eingesetzt wird. Sie ist sehr spezifisch und verläuft sehr schnell ohne nennenswerte Nebenreaktionen.

**Addition von Thiolen an aktivierte Doppelbindungen** Häufig in der Form von Acrylaten oder Maleinimiden verwendet, stellen aktivierte Doppelbindungen (*Michael-Systeme*) sehr gute Elektrophile dar. Diese Reaktion ist bei physiologischem pH = 7.6, bei dem Amine ( $pK_s = 9.75$ ) zum größten Teil protoniert und damit deutlich weniger nukleophil sind als Thiole, um den Faktor 10 000 mal schneller als die Addition der Amine – und somit selektiv und höchst spezifisch. Sie wurde z.B. von **S. Ghosh et al.** verwendet, um DNA an HRP<sup>13</sup> zu koppeln, um eine Sonde für die DNA-Chip-Technologie zu entwickeln. [126]

### Verfügbare Gruppen

Kommerziell erhältliche Oligonukleotide sind mit diversen chemischen Modifikationen erhältlich: unreaktiven Labels wie Fluoreszenzfarbstoffen (Fluoreszein, Rhodamin), aber auch reaktiven funktionellen Gruppen, wie -NH<sub>2</sub> und -SH, oder auch biochemisch detektierbaren Markern, wie Biotin und Digoxigenin. Allerdings sind die meisten

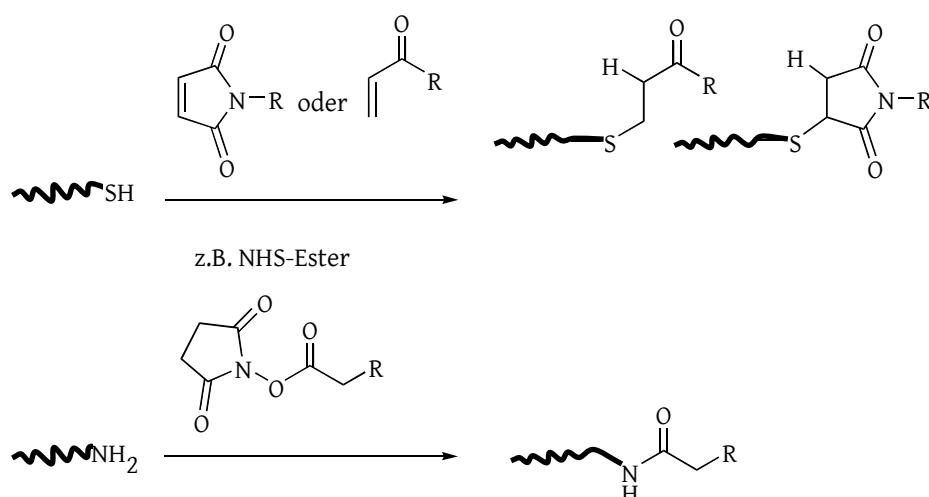
---

<sup>10</sup>Dicyclohexylcarbodiimid

<sup>11</sup>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

<sup>12</sup>O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat

<sup>13</sup>Meerrettich-Peroxidase



**Abbildung 5.4:** Möglichkeiten zur kovalenten Kupplung der DNA an multifunktionelle Polymere. Die zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen am 3'-Ende beschränken sich auf SH und NH<sub>2</sub>.

verfügbaren Modifikationen – bedingt durch die Festphasensynthese – nur am 5'-Ende der Sequenz erhältlich, während die Auswahlmöglichkeiten bei 3'-Modifikationen deutlich begrenzter sind.

Für die in dieser Arbeit relevanten Konjugate sollte das 5'-Ende der Oligonukleotide frei in Lösung vorliegen, da die Erkennung der DNA am endosomalen Rezeptor TLR<sup>14</sup> über dieses freie Ende geschieht. Dementsprechend verbleiben für eine kovalente Kupplung nur die am 3'-Ende verfügbaren funktionellen Gruppen NH<sub>2</sub> und SH.

Eine Alternative zur direkten Kupplung der DNA mit einer funktionellen Gruppe auf dem Polymer stellt die Verwendung eines heterobifunktionellen Linkermoleküls dar, welches z.B. auf der einen Seite einen Aktivester trägt und auf der anderen Seite ein Maleinimid (z.B. (9) MPS<sup>15</sup> und (10) MBS<sup>16</sup>); diese Klasse von Reagenzien ist als *Adaptermolekül* zu sehen. Diese heterobifunktionellen Linker sind ebenfalls weit verbreitet und für Kupplungen unter physiologischen Bedingungen optimiert.

<sup>14</sup>Toll-like Rezeptor

<sup>15</sup>Maleinimidopropionsäuresuccinimid

<sup>16</sup>Maleinimidobuttersäuresuccinimid

## 5.4 Die Bestandteile der hergestellten Polymere

Zur konkreten Realisierung der im Abschnitt 5.3 beschriebenen Überlegungen wurden in dieser Arbeit folgende Komponenten eingesetzt:

### Initiatoren:

- *Lineare Polymere* wurden entweder mit Methyltriflat oder mit N-Methyl-2-Methyloxazolinium-Triflat (**I1**) („Startersalz“) initiiert .
- *Sternpolymere* wurden mit **Pentaerythritol-tetrakis(triflat)** (**I4**) gestartet.
- *Bürstenpolymere* konnten durch ein *grafting-from* aus den Polymeren (**Mi80**), (**Mi50**), Copolymeren aus Styrol und CMS<sup>17</sup>, synthetisiert werden.

### Monomere:

#### Grundmonomere:

- 2-Methyl-2-Oxazolin bildet sehr wasserlösliche Polymerketten aus und wurde hauptsächlich für die Bildung von *Homoblöcken* als Abstandshalter in Sternpolymeren und Bürstenpolymeren eingesetzt.
- 2-Ethyl-2-Oxazolin wurde als *Co-Monomer* zur statistischen Copolymerisation mit den funktionellen Monomeren verwendet. Ethyloxazolin copolymerisiert mit langkettigen Oxazolinen besser als Methyloxazolin, welches hauptsächlich *Homo-* bzw. Gradientenblöcke bildet.

#### Reaktive Monomere bzw. deren geschützte Vorstufen:

- Die esterhaltigen Monomere **2-(Propionsäuremethylester)-2-oxazolin** (**MO2**) und **2-Pentansäuremethylester-2-oxazolin** (**MO4**) dienen der Einbringung von Carbonsäure-Gruppen in das Polymer.
- Mit dem geschützten Monomer **2-(N-Boc-5-Aminoheptyl)-2-Oxazolin** (**MN**) sollte eine Aminogruppe ins Polymer eingeführt werden.

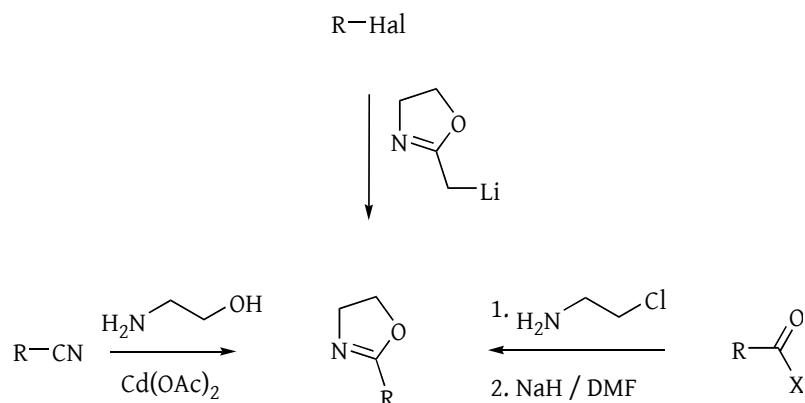
#### Unreaktive funktionelle Monomere:

- Die Verwendung des aromatischen Monomers **2-Ethylphenyl-2-oxazolin** (**MF**) verleiht den Polymeren eine Absorption bei Wellenlängen um 260 nm. Dieses Monomer wurde zur Verbesserung der Detektion der Polymere in der chromatographischen Trennung und der Elektrophorese neu synthetisiert. Es wurde kein Phenyloxazolin verwendet, da dieses nur sehr langsam polymerisiert und im Falle der Verwendung als Comonomer mit Ethyloxazolin keine statistischen Blockcopolymere ausbildet.

---

<sup>17</sup> $\alpha$ -Chlormethyl-Styrol





**Abbildung 5.5:** Allgemeiner Zugang zu 2-Alkyl-2-Oxazolinen.

### Terminationsreagenzien:

- Piperidin wurde verwendet, um die Polymerisation *ohne Einführung* einer funktionellen Gruppe zu terminieren.
- Die Termination mit Piperazin und *N-Boc-Piperazin* (**1**) resultierte in einer endständigen (geschützten) *Amin*-Gruppe.
- Die Dicarbonsäure Glykolsäure terminierte die Polymerkette mit einer freien *Carbonsäure*-Gruppe.
- Verwendung der  $\omega$ -Maleinimido-Carbonsäure (**TS**) oder Acrylsäure resultierte in *Thiol-reaktiven* Endgruppen im Polymer, da die so eingebauten aktivierten Doppelbindungen als *Michael*-Akzeptoren reagieren können (siehe Abbildung 5.4<sup>18</sup>).

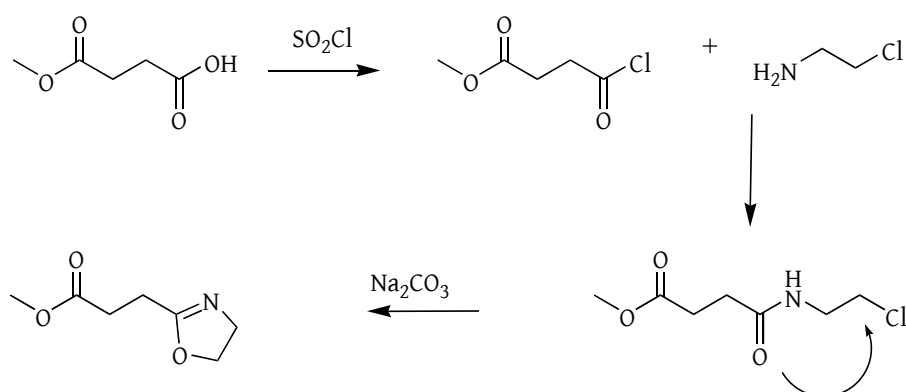
## 5.5 Synthese der Monomere

Das esterfunktionalisierte Monomer (Schema siehe Abbildung 5.6<sup>19</sup>) wurde nach einer modifizierten Vorschrift nach **T. Zarka et al.**[103] aus der mit Methanol einfach veresterten Dicarbonsäure erhalten, welche als Säurechlorid zu einer Suspension von 2-Chlor-Ethylammoniumchlorid in trockenem DCM<sup>20</sup> hinzugegeben wurde. Durch langsames Eintropfen von Triethylamin unter Eiskühlung wurde das primäre Amin deprotoniert, welches dann als Nukleophil mit dem Säurechlorid zum Peptid abreagierte.

<sup>18</sup>Seite 61

<sup>19</sup>Seite 64

<sup>20</sup>Dichlormethan



**Abbildung 5.6:** Synthese-Schema des säurefunktionalisierten Monomers (MO2).

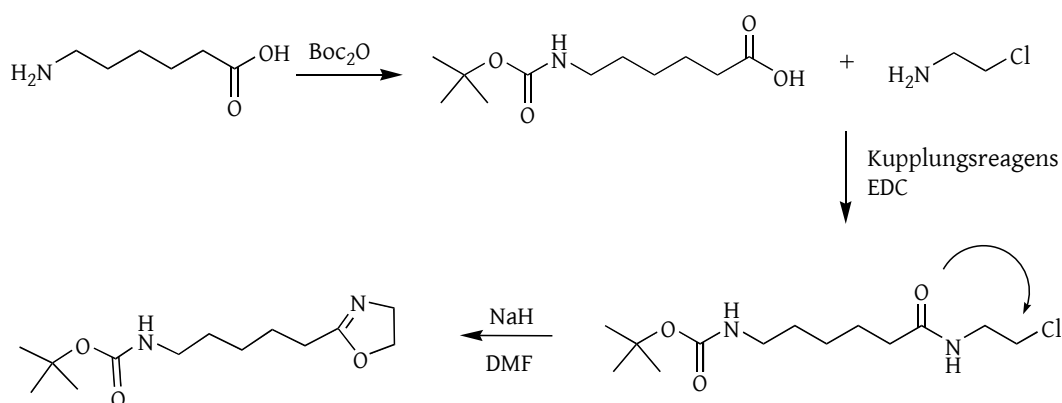
Das Produkt wurde durch Ausschütteln mit Wasser von Edukten und Nebenprodukten getrennt und in guter Ausbeute erhalten. Der Ringschluß zum Oxazolin erfolgte durch Behandeln mit wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bei  $130^\circ\text{C}$ : Die Paste aus der Vorstufe und Soda wurde im Vakuum erhitzt, wo sie unter  $\text{CO}_2$ -Entwicklung stark aufschäumt; nach Abklingen der Gasentwicklung destillierte das Produkt im Feinvakuum über und konnte als farbloses Öl isoliert werden.

Das Boc-geschützte aminofunktionalisierte Monomer wurde aus der  $\omega$ -Aminohexansäure hergestellt.<sup>[106]</sup> Dazu wurde zuerst die Aminofunktion mit  $\text{Boc}_2\text{O}$  geschützt. Diese Reaktion wurde in einer alkalischen Mischung aus Wasser und Dioxan durchgeführt, aus welcher das Produkt als voluminöser weißer Feststoff fast quantitativ ausfällt. Die so geschützte Aminosäure wurde mit Hilfe des Kupplungsreagenzes EDC<sup>21</sup> an der Carbonsäure aktiviert und mit 2-Chlorethylamin zum Amid verknüpft. Durch saures Ausschütteln konnte das entstandene Harnstoffderivat extrahiert werden und es verblieb das Amid als ein rosa-orange-farbiges Öl. Für den Oxazolin-Ringschluß wurde das *N*-Boc-6-Aminohexansäure-2-Chlorethylamid (**3**) in DMF<sup>22</sup> aufgenommen und mit wasserfreiem  $\text{K}_2\text{CO}_3$  bei  $80^\circ\text{C}$  gerührt. Nach Abfiltrieren der Pottasche wurde die organische Phase über Kieselgel getrennt: Das verwendete Laufmittel bestand aus Ethylacetat, Hexan und Triethylamin im Verhältnis 15 : 2 : 1 (v/v/v).<sup>23</sup> Die Detektion des Produkts auf der Dünnschichtchromatographie-Platte erfolgte mit Hilfe einer sauren Ninhydrin-Lösung und anschließendem Erhitzen der Platte. Das Oxazolin wird als

<sup>21</sup> 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

<sup>22</sup> *N,N*-Dimethylformamid

<sup>23</sup> Der Oxazolinring<sup>[127]</sup> sowie die Boc-Schutzgruppe<sup>[128]</sup> sind säurelabil.



**Abbildung 5.7:** Synthese-Schema des aminofunktionalisierten Monomers (MN).

bordeauxrot-gefärbter Fleck sichtbar. Das **2-(N-Boc-5-Aminohexyl)-2-Oxazolin (MN)** konnte so sauber und in guter Ausbeute (86 %) erhalten werden.

Das UV-aktive Monomer **2-Ethylphenyl-2-oxazolin (MF)** wurde durch eine **Wurtz-Kupplung** von Methyloxazolin mit Benzylbromid erhalten. Dazu wurde das Methyloxazolin langsam in eine Lösung aus Butyllithium und TMEDA<sup>24</sup> in THF<sup>25</sup> bei  $-78^{\circ}\text{C}$  getropft und zur Bildung des Methyloxazolin-Anions weiter gerührt. Anschließend wurde das Benzylbromid hinzugegeben. Nach dem Entfernen des Lösemittels konnte das Produkt destilliert und mit 60 %iger Ausbeute sauber erhalten werden.

## 5.6 Synthese der Initiatoren

### 5.6.1 Initiatoren für Sternpolymere

Der Initiator für die Darstellung der vierarmigen Sternpolymere, **Pentaerythritol-tetrakis(triflat) (I4)**, wurde aus Pentaerythritol hergestellt [129]. Dazu wurde der vierfache Alkohol Pentaerythritol in einer Mischung aus trockenem Pyridin und Acetonitril im Verhältnis 5:8 (v/v) gelöst; zu diesem Ansatz wurde vorsichtig und langsam das Trifluorsulfonsäureanhydrid gegeben und nach Ende der Reaktion mit 35 %iger HCl (m/m) gestoppt. Das Produkt konnte dann aus Wasser/Acetonitril umkristallisiert werden und fiel als weißes kristallines Pulver in moderater Ausbeute (60 %) an.

<sup>24</sup>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

<sup>25</sup>Tetrahydrofuran

5 Ergebnisse & Diskussion

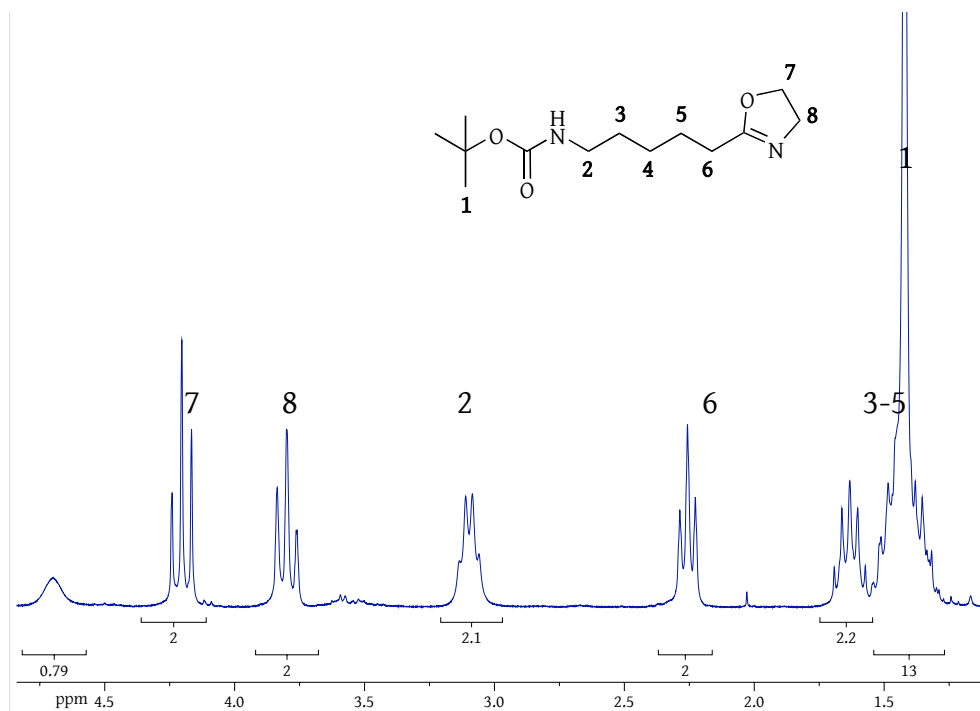


Abbildung 5.8:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) der Verbindung (MN).

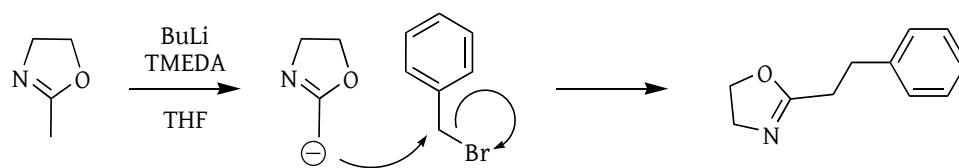


Abbildung 5.9: Synthese-Schema des UV-aktiven Monomers (MF).

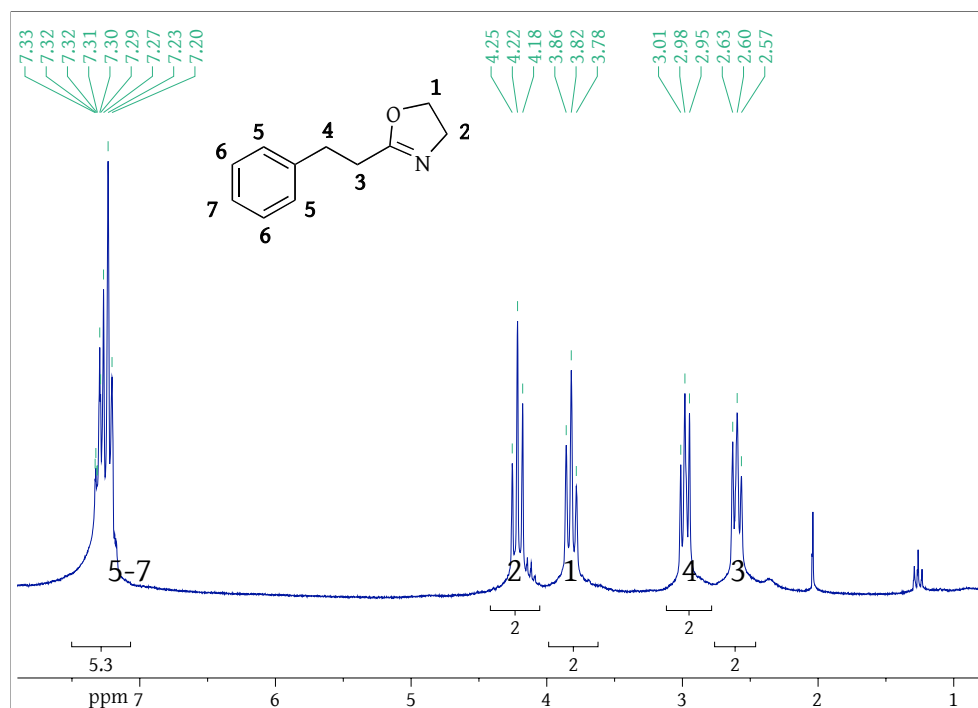
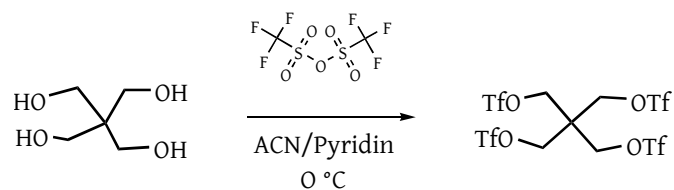


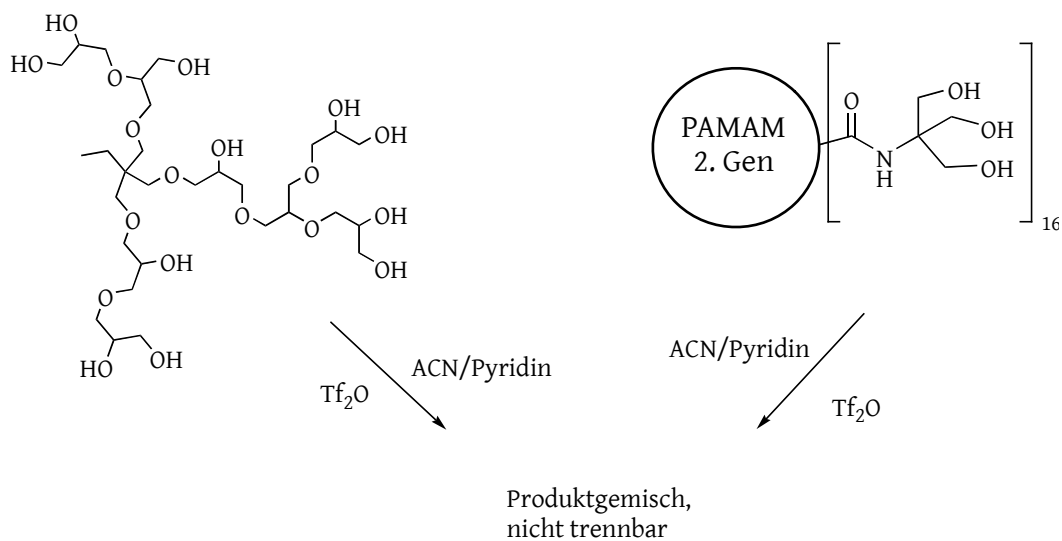
Abbildung 5.10:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) der Verbindung (MF).

Alternativ zu den vierarmigen Sternpolymeren wurde versucht, ein Initiatorsystem mit mehr als zehn Initiatorfunktionen herzustellen (Abbildung 5.12<sup>26</sup>). Dazu wurde zuerst, analog zur Synthese des Pentaerythritol-Derivats, ein hochverzweigtes Polyglycerol eingesetzt. Problematisch zeigte sich hier allerdings die Isolierung des Produktes. Das NMR-Spektrum des Rohproduktes zeigte eine deutliche Veränderung des Polyglycerols,

<sup>26</sup>Seite 68



**Abbildung 5.11:** Synthese-Schema des vierfach funktionalisierten Initiators (**I4**).



**Abbildung 5.12:** Schematische Darstellung der versuchten Synthesen, um Initiatoren mit >10 Triflat-Gruppen zu erzeugen.

allerdings konnte das Produkt nicht von den Edukten getrennt werden: die braunen, zähen, honigartigen Öle waren nicht löslich, so daß es nicht möglich war, diesen Ansatz weiter zu verfolgen. Ein weiterer Versuch mit einem PAMAM<sup>27</sup>-Derivat, welches an seiner Oberfläche 48 Alkohol-Gruppen trug, führte ebenfalls nicht zu einem reinen, als Initiator verwendbaren Produkt.

Anhand der Ergebnisse der parallel durchgeführten orientierenden Versuche zur elektrophoretischen Analytik der Polymere zeigte sich, daß es sinnvoll sein würde, in das Polymer aromatische Gruppen miteinzubauen, um eine bessere Detektion der

<sup>27</sup>Poly(amidoamin)

Polymere zu ermöglichen (siehe Abschnitt 5.9.4). Die im Folgenden beschriebenen Makroinitiatoren dienen dazu, einfache stern-ähnliche Polymere herzustellen, die diesen Anforderungen genügen.

### 5.6.2 Initiatoren für Bürstenpolymere

Die Makroinitiatoren (**Mi**) für die Synthese der Bürstenpolymere wurden mittels einer kontrolliert-radikalischen Polymerisation von Styrol mit  $\alpha$ -Chlormethylstyrol unter Verwendung der DPE-Methode gewonnen (Abbildung 5.13<sup>28</sup>) [130, 131, 132]. Wie von **A. Wörndle** gezeigt, eignen sich diese Copolymere gut zur Darstellung von Bürstenpolymeren mit Poly(oxazolin)-Armen, deren Strukturen in wässrigen Lösungen stern-ähnlich sind: die hydrophobe aromatische Hauptkette knäuelte sich in wässrigem Milieu zusammen und die aufgepfropften hydrophilen Poly(2-methyloxazolin)-Arme weisen nach außen. Zur Synthese wurde Styrol mit CMS unter für eine radikalische Polymerisation üblichen Bedingungen (Sauerstoffausschluß, Radikalinitiator AIBN<sup>29</sup>), aber in Gegenwart einer geringen Menge DPE polymerisiert.

Die entstandenen Polymere besitzen Molmassen in der Größenordnung von 20 000 g/mol mit Polydispersitätsindices von etwa 1.8 (siehe Tabelle 5.1 auf Seite 71)

Die Molverhältnisse der beiden Monomere Styrol und Chlormethylstyrol betragen in diesen Polymeren  $\text{CMS}/\text{Styrol} = 1/2,46$  (**Mi80**) bzw.  $= 1/1$  (**Mi50**). Die genauen Stoffmengenverhältnisse der beiden Monomere konnten aus dem NMR-Spektrum (Abbildung 5.14<sup>30</sup>) ermittelt werden: Dabei wurden die Integrale der Signale des Polymerrückgrats **7** und **8**, die der Signale der aromatischen Protonen **2** bis **6** sowie das Integral der Benzylgruppe **1** miteinander ins Verhältnis gesetzt und daraus die beiden Koeffizienten  $n$  und  $m$  bestimmt.

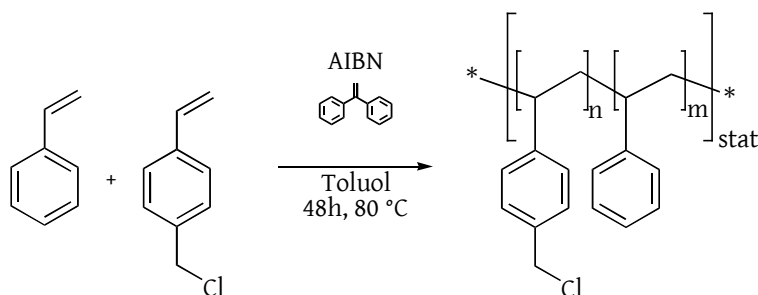
Da es sich hier nicht um ein mathematisches Gleichungssystem mit einer klar definierten Lösung handelt, muß bei der Berechnung beachtet werden, daß die Integralwerte mit einem Messfehler behaftet sind. Darüberhinaus repräsentieren die Integralwerte alle weiteren Verunreinigungen durch Homopolymere und evtl. noch enthaltenes Monomer.

---

<sup>28</sup>Seite 70

<sup>29</sup>Azobisisobutyronitril

<sup>30</sup>Seite 71



**Abbildung 5.13:** Synthese-Schema der Makroinitiatoren (Mi80) und (Mi50).

Es ist also zu erwarten, daß die drei Gleichungen zu keinem eindeutigen Ergebnis führen können!

$$2n = \int 1 = 1.0000 \quad (5.1)$$

$$5m + 4n = \sum_{i=2}^6 \int i = 8.2158 \quad (5.2)$$

$$3m + 3n = \int 7 + \int 8 = 5.1608 \quad (5.3)$$

(5.1) in (5.2):

$$5m = 6.2158; n = 1, 2432 \quad (5.4)$$

(5.1) in (5.3):

$$3m = 3, 6608; n = 1, 2203 \quad (5.5)$$

(Mittelwertbildung):

$$\bar{m} = 1, 2317 \quad (5.6)$$

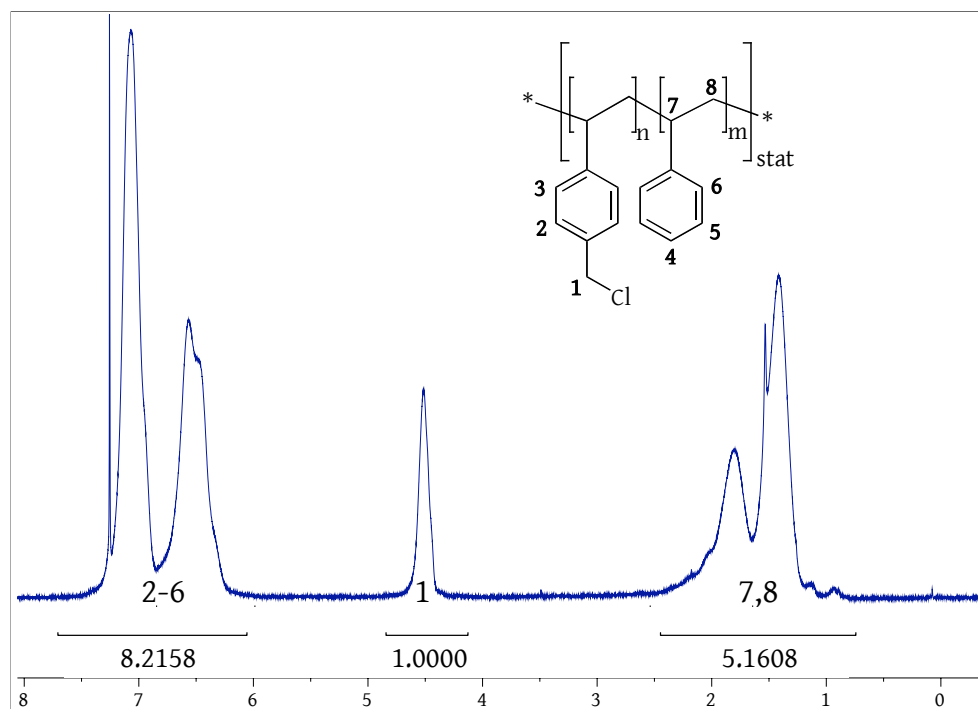
$$\frac{n}{\bar{m}} = 2, 46 \quad (5.7)$$

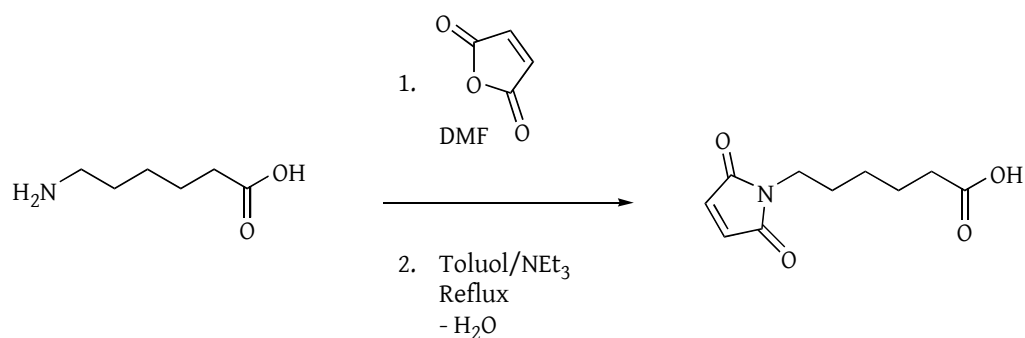
Aus den *drei Gleichungen* müssen *zwei Unbekannte* berechnet werden, aber es ergeben sich keine eindeutigen Werte. In diesem Fall kann das Signal **1**, welches nur die Protonen der benzyliischen Gruppe enthält, direkt zur Bestimmung von  $n$  verwendet werden (5.1); die Gleichungen 5.2 und 5.3 werden dann nach  $m$  aufgelöst und das Ergebnis gemittelt. Die so erhaltenen Werte für  $n$  und  $m$  machen jedoch nicht als Einzelwerte, sondern nur im *Verhältnis*  $n/m$  Sinn.



**Tabelle 5.1:** Analytische Daten der beiden Makroinitiatoren (**Mi80**) und (**Mi50**).

Verbindung	$n/m$		Chlorgehalt		$\bar{M}_n$	PDI	$\bar{P}_n$	n(Cl) pro Kette
	theor.	NMR	%	$\frac{mmolCl}{gPolymer}$				
<b>(Mi80)</b>	1/1	1/1	50	3.1	27 988	2.05	160	80
<b>(Mi50)</b>	1/3	1/2.46	29	1.8	18 600	1.85	172	50

**Abbildung 5.14:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von (**Mi50**).



**Abbildung 5.15:** Synthese-Schema des Terminationsreagenz mit einer Maleinimidfunktion (**TS**).

## 5.7 Synthese der Terminationsreagenzien

### Terminationsreagenzien zur Einführung eines Thiol-reaktiven Maleinimids

Die  $\omega$ -Maleinimid-Carbonsäure wurde in einer zweistufigen Synthese hergestellt (Abbildung 5.15<sup>31</sup>). Zunächst wurde die Aminosäure mit Maleinsäureanhydrid umgesetzt; diese einfache Reaktion verlief quantitativ durch einfaches Lösen der beiden Edukte in DMF und Rühren, bis alles gelöst war. Das entstandene Maleinsäuremonoamid (**6**) wurde dann am Wasserabscheider in einem Toluol/Triethylamin-Gemisch refluxiert. Aus der Toluolphase konnte in mehreren Schritten die Maleinimid-Carbonsäure extrahiert werden (etwa 45 %). Das zurückbleibende orange-rot gefärbte Öl enthielt weitere 10 % des Produkts. Nach Umkristallisieren aus Hexan/Essigester verblieb **N-Maleinimido-6-aminohexansäure (TS)** als ein hellgelb- bis orange-farbiger Feststoff.

Das UV-aktive Terminationsreagenz **4-Maleinimido-Benzoesäure (TSar)** wurde analog zum Hexansäurederivat hergestellt (Abbildung 5.16<sup>32</sup>).

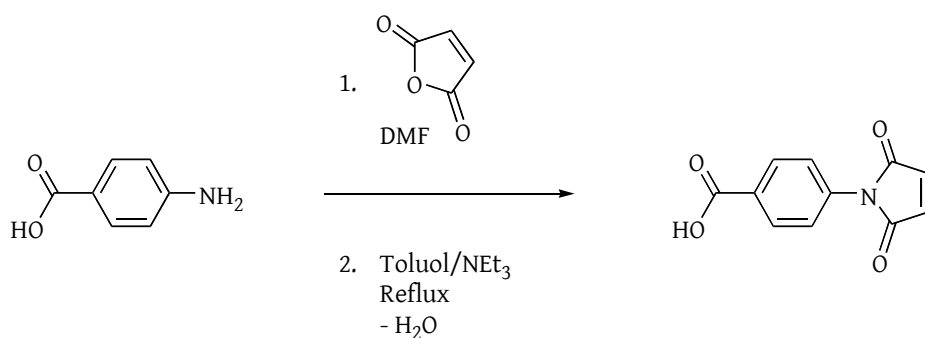
### Terminationsreagenzien zur Einführung einer geschützten Aminofunktion

Das **N-Boc-Piperazin (1)** wurde durch Zugabe von Boc-Anhydrid zu einer Lösung aus Piperazin in Wasser/Dioxan erhalten (Abbildung 5.17<sup>33</sup>); die doppelte Reaktion eines Piperazins mit dem Anhydrid konnte durch einen Überschuss von acht Äquivalenten

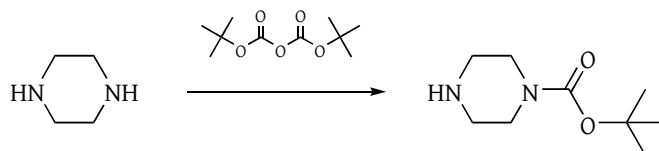
<sup>31</sup>Seite 72

<sup>32</sup>Seite 73

<sup>33</sup>Seite 73



**Abbildung 5.16:** Synthese-Schema des aromatischen Terminationsreagenzes mit einer Maleinimidfunktion (**TSar**).



**Abbildung 5.17:** Synthese-Schema des am Amin geschützten Terminationsreagenzes (**1**).

Piperazin vermieden werden. Das Produkt war ein leicht gelbliches, hygroskopisches Pulver.

## 5.8 Synthese der Polymere

### 5.8.1 Bemerkung zur Nomenklatur

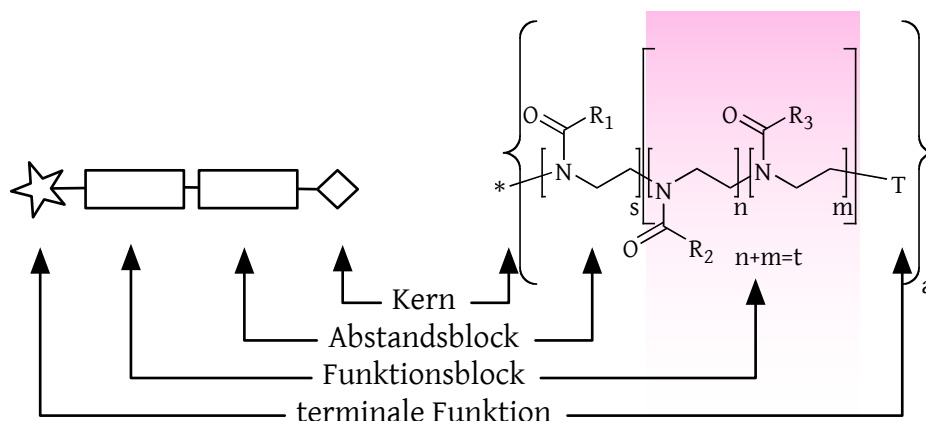
Die in dieser Arbeit genannten Polymere sind mit einem Kürzel versehen, welches sich aus einem Buchstaben (s.u.) und einer Ziffer zusammensetzt. Sind noch geschützte funktionelle Gruppen im Polymer wird dieses zusätzlich mit einem \* gekennzeichnet.

**L** Lineare Polymere (siehe Tabelle **D.1** auf Seite **208**)

**S** Sternpolymere (siehe Tabelle **D.2** auf Seite **209**)

**B** Bürstenpolymere (siehe Tabelle **D.3** auf Seite **210**)

Zusätzlich wurden die hergestellten Polymere nach einem einheitlichen deskriptiven System benannt, welches ohne chemische Strukturformeln auskommt, aber doch Hinweise auf die Struktur des Polymers gibt.



**Abbildung 5.18:** Schema zur Erläuterung der deskriptiven Polymer-Nomenklatur.

Der Schlüssel zum Verständnis der verwendeten Polymernamen lautet wie folgt: „Art des Kerns/Initiators“ – „Länge des Abstandsblocks aus  $s$  Einheiten eines Monomers  $R_1$ “ – [ „Statistischer Block aus  $n$  Einheiten eines Monomers  $R_2$  und  $m$  Einheiten eines Monomers  $R_3$ “ ] – „Art der terminierenden Gruppe“

**Nomenklatur 1**  $a-sR_1-[n:R_2 + m:R_3]-T$  ( $R_1$  ist im Regelfall Methyloxazolin und wird nur bei Abweichung gekennzeichnet.)

**Beispiel 1** Das Polymer (**L8\***) trägt die Bezeichnung 1-5:C2F-[35:C2+60:O2\*]-S. Die Bedeutung der einzelnen Teile der Bezeichnung sind wie folgt:

- Das Polymer ist linear, die „1“ bezeichnet einen monofunktionellen Initiator (in diesem Fall Methyltriflat)
- Der erste Block „5:C2F“ besteht aus fünf Einheiten des Monomers C2F, einem Monomer mit einem Phenylring (F, in Anlehnung an die Aminosäure Phenylalanin, deren Einbuchstabencode  $F$  ist.), welches über einen  $C_2$ -Spacer am Oxazolinring angebunden ist: **2-Ethylphenyl-2-oxazolin (MF)**.
- Der zweite Block „[35:C2+60:O2\*]“ ist ein statistischer Block aus den zwei Co-Monomeren C2 (Ethyloxazolin, 35 Einheiten) und O2\* (**2-(Propionsäuremethylester)-2-oxazolin (MO2)** mit geschützten (\*) COOH-Gruppen, 60 Einheiten).

**Tabelle 5.2:** Verwendete Kürzel für die Bausteine der Polymere.

Initiatoren					
<i>Abkürzung</i>	1	4	PS		
<i>Verbindung</i>	Methyltriflat	( <b>I4</b> )	( <b>Mi</b> )		
Monomere					
<i>Abkürzung</i>	C1	C2	C2F	N	O2
<i>Verbindung</i>	Methyloxazolin	Ethyloxazolin	( <b>MF</b> )	( <b>MN</b> )	( <b>MO2</b> )
Terminatoren					
<i>Abkürzung</i>	C	N	S	A	
<i>Verbindung</i>	Piperidin	Piperazin	( <b>TS</b> )	Acrylsäure	

- Terminiert wurde das Polymer mit dem Terminationsreagenz (**TS**), welches ein Maleinimid enthält.

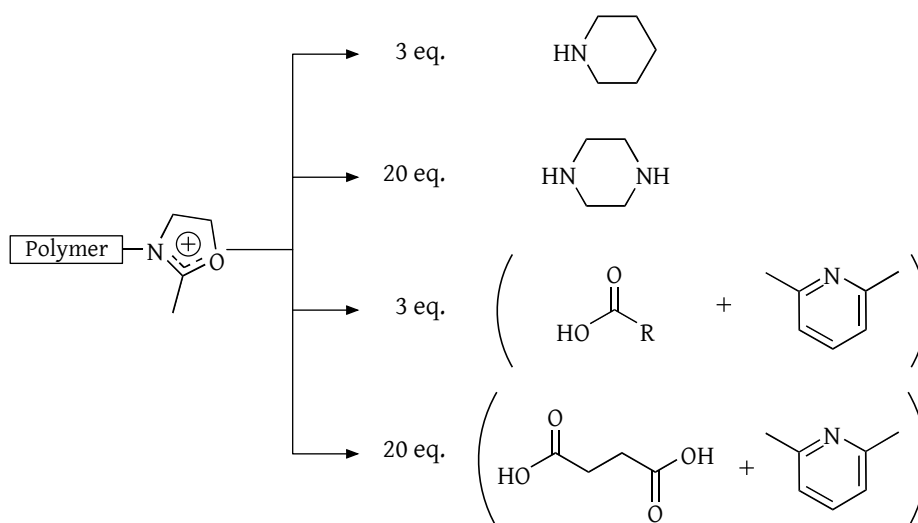
**Beispiel 2** Das Polymer (**S17**) trägt die Bezeichnung 4-30:C1-[10:C2+5:N]-C. Die Bedeutung der einzelnen Teile der Bezeichnung sind wie folgt:

- Das Polymer ist ein Sternpolymer mit vier Armen, die „4“ bezeichnet einen tetrafunktionellen Initiator (in diesem Fall (**I4**))
- Der erste Block „30:C1“ besteht aus 30 Einheiten des Monomers C1 bzw. Methyloxazolin. Es handelt sich also um einen Spacerblock.
- Der zweite Block „[10:C2+5:N]“ ist ein statistischer Block aus den zwei Co-Monomeren C2 (Ethyloxazolin, 10 Einheiten) und N (2-(*N*-Boc-5-Aminohexyl)-2-Oxazolin (**MN**) mit NH<sub>2</sub>-Gruppen, 5 Einheiten).
- Terminiert wurde das Polymer mit dem Terminationsreagenz C, also mit Piperidin. Dieses Polymer hat demnach keine terminalen funktionellen Gruppen.

Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 5.2 zu finden.

### 5.8.2 Bemerkungen zur Termination

**A. Groß** untersuchte in ihrer Dissertation, welche funktionellen Gruppen die Termination der Oxazolin-Polymerisation einleiten können:[133] Sekundäre Amine terminieren binnen weniger Minuten (<10 min) quantitativ, während Alkohole oder Carbonsäuren deutlich weniger reaktiv sind – zumindest solange keine Base anwesend ist. So ist undissoziiertes Wasser kein starkes Terminationsreagenz (selbst nach 8 Tagen war keine Termination nachweisbar!); erst die Zugabe einer Base wie Piperidin erzeugt



**Abbildung 5.19:** Termination der Polymerisation; verwendete Reagenzien und deren relative Mengen .

nukleophiles  $\text{OH}^-$ , welches dann in Konkurrenz zur Termination durch das Piperidin tritt: Nach 60 Minuten konnte eine 100%ige Termination festgestellt werden.

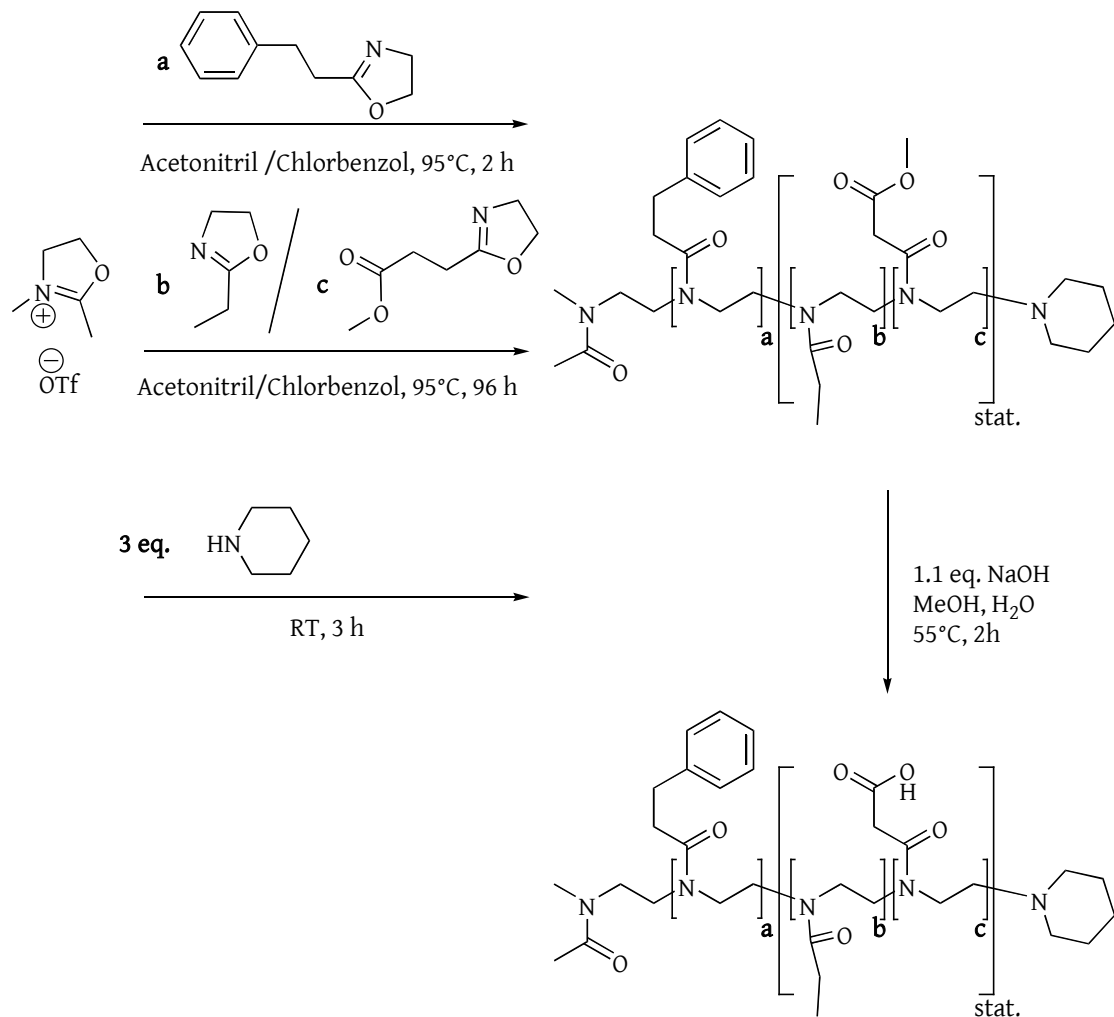
Zur Erhöhung der Nukleophilie und damit der Terminationsgeschwindigkeit wurden die verwendeten Carbonsäuren (**TS**), (**TSar**) und Acrylsäure mit der sterisch gehinderten (und damit reduziert nukleophilen) Base 2,6-Lutidin kombiniert (siehe Abbildung 5.19<sup>34</sup>). Damit konnte eine unerwünschte Termination durch die Base, wie sie bei der Verwendung von Triethylamin auftritt[106], vermieden werden.

Bifunktionelle Terminationsreagenzien wurden in einem 20fachen Überschuß, monofunktionelle in einem dreifachen Überschuß – bezüglich der aktiven Kettenenden bzw. der Konzentration der Initiatorfunktionen – zur Polymerisationsmischung gegeben. Dadurch konnten gute Terminationsgrade unter Vermeidung von Doppelterminationen eines bifunktionellen Moleküls erreicht werden.

### 5.8.3 Lineare Polymere

Lineare Poly(2-Oxazoline) wurden in verschiedenen Varianten hergestellt (Tabelle D.1 auf Seite 208).

<sup>34</sup>Seite 76



**Abbildung 5.20:** Synthese des säurefunktionalisierten, linearen Polymers (**L8\***) (geschützt) bzw. (**L8**) (entschützt) mit UV-aktiven Gruppen.

**Beispiel einer Synthese** Anhand des folgenden Beispiels wird die Synthese eines Carbonsäure-funktionalisierten Polymers näher erläutert. Abbildung 5.20<sup>35</sup> gibt das Synthese-Schema des Polymers (**L8\***) bzw. (**L8**) im Detail wieder.

Als Initiator wurde das sog. „Startersalz“ verwendet, das Reaktionsprodukt aus äquimolaren Mengen Methyltriflat und Methyloxazolin. Die Verwendung des *Startersalzes* hat den Vorteil, daß es als Feststoff leichter zu handhaben ist als Methyltriflat; generell gesehen ist diese Methode auch dann notwendig, wenn ein Monomer verwendet wird, welches durch freies Methyltriflat leicht methyliert wird (etwa an einer funktionellen Seitengruppe)[134]. Formal gesehen ist das Startersalz ein lebendes Kettenende eines „Polymers“ mit nur *einem* Monomerbaustein.

Sequentielle Zugabe der gelösten Monomere bzw. Monomermischungen führt zur Bildung von Blockcopolymeren. Dabei war es auch möglich, einzelne Blöcke als statistische bzw. Gradienten-Blöcke aufzubauen; eine genaue Bestimmung der Verteilung der einzelnen Bausteine in den Blöcken war mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich. Außerdem sind die Blöcke meist zu kurz, um große Unterschiede zwischen statistischen und Gradienten-Blöcken festzustellen. Die Polymerisationsreaktionen wurden im Regelfall in Acetonitril oder Mischungen aus Acetonitril und Chlorbenzol bei 95°C durchgeführt; dabei blieben die Polymere gelöst und man erhielt enge Molmassenverteilungen mit PDIs zwischen 1.1 und 1.3.

Eine vollständige Termination der Polymerisation wurde mit dem Terminationsreagenz, gelöst in trockenem Chloroform oder Acetonitril, über Nacht bei Raumtemperatur erreicht. Ein anschließendes Rühren der Lösung über trockenem K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ermöglichte die Abtrennung der Gegenionen der Polymerisation (Triflat-Anion), eine Deprotonierung der terminierten Kettenenden im Fall der Termination mit sekundären Aminen und durch Adsorption die Abtrennung diverser niedermolekularer Nebenprodukte.[135] Nach dem zweimaligen Fällen des Polymers in Ether (0°C) wurde dies mit wenig Chloroform oder Methanol aufgenommen, mit Benzol versetzt, bei -196°C die Lösungen eingefroren und im Feinvakuum getrocknet.

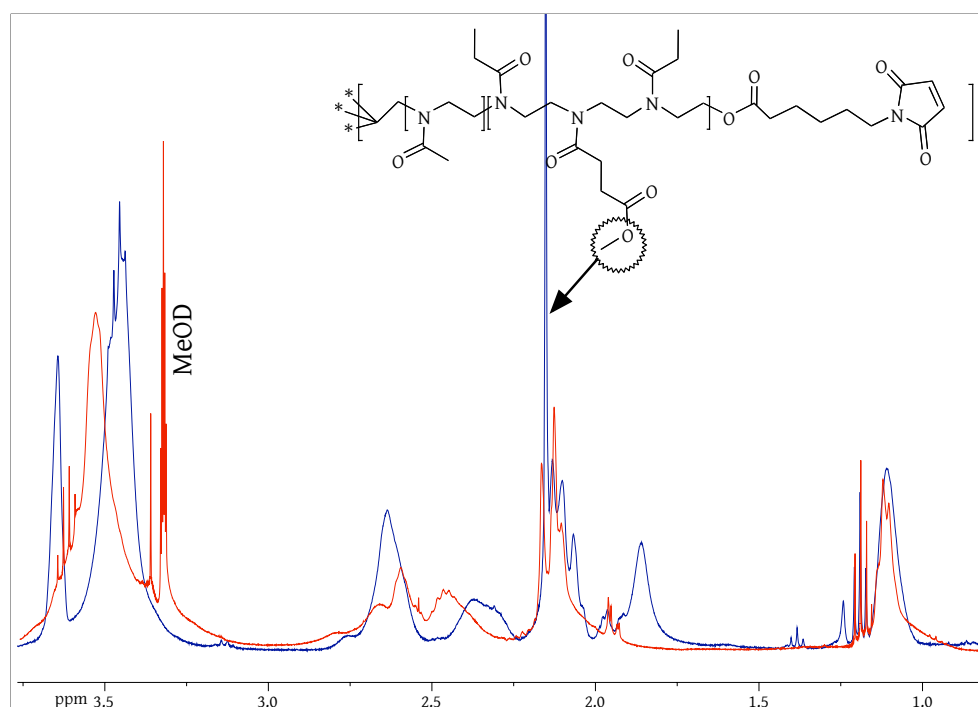
**Entschützen der Carbonsäure** Die anschließende Verseifung der Esterfunktionen wurde in Methanol/Wasser-Mischungen mit einem kleinen Überschuß an NaOH bei 55°C und Reaktionszeiten um 5 h selektiv durchgeführt. Abbildung 5.21<sup>36</sup> zeigt exemplarisch ein Spektrum vor dem Entschützen (**S11\***) und nach dem Entschützen (**S11**). Man sieht deutlich, daß das Signal der Methoxygruppe verschwindet. Ebenso zeigt sich im

---

<sup>35</sup>Seite 77

<sup>36</sup>Seite 79



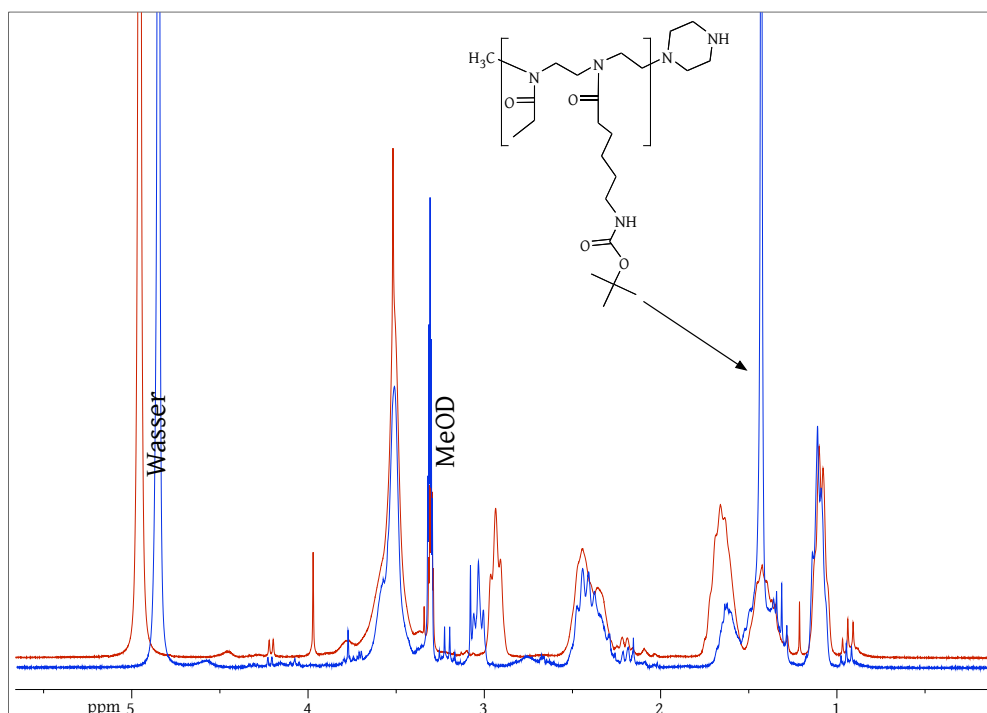


**Abbildung 5.21:** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$  bzw. MeOD) eines ester-geschützten Säurepolymers vor ((S11\*), blau) und nach ((S11), rot) der Entschützung.

GPC-Eluogramm in DMAc eine Verschiebung des Peaks von Masse 5874  $\text{g/mol}$  zu Masse 6215  $\text{g/mol}$ ; der Fortgang der Entschützungreaktion kann so auch verfolgt werden. Durch die Verschiebung zu höheren Molmassen bei einer eigentlichen Reduktion der Molmasse durch die Esterhydrolyse wird allerdings deutlich, daß die aus der GPC erhaltenen Molmassen nur einen groben Anhaltswert darstellen und die Zahlenwerte sehr abhängig von der molekularen Struktur und Zusammensetzung der Polymere sind.

Die linearen Polymere ließen sich unter diesen Reaktionsbedingungen quantitativ entschützen, während die Sternpolymere zum Teil längere Reaktionszeiten benötigten (bis zu 16 h). Wiederum wurden die Polymere in Ether gefällt und aus Methanol/Benzol gefriergetrocknet.

**Entschützen des Amins** Die Abspaltung von Boc-Schutzgruppen bei aminofunktionalisierten Polymeren wurde in Dichlormethan mit 1.1 eq Trifluoressigsäure bei  $55^\circ\text{C}$



**Abbildung 5.22:** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (300.13 MHz, MeOD) eines Boc-geschützten Aminopolymers vor ((**L9\***), blau) und nach ((**L9**), rot) der Entschützung.

und Reaktionszeiten von etwa 5 h selektiv durchgeführt. Das Lösemittel und die restliche Säure wurden im Vakuum abgezogen, das Polymer erneut in Ether ausgefällt und aus Methanol/Benzol gefriergetrocknet. Abbildung 5.21<sup>37</sup> zeigt exemplarisch ein Spektrum vor (**L9\***) und nach dem Entschützen (**L9**). Man sieht deutlich, daß das scharfe Singulett der Boc-Gruppe verschwand. Zu diesen Verbindungen konnten keine GPC-Daten gemessen werden, da sich diese Polymerklasse nicht in DMAc löst.

Die Varianten dieser Polymerklasse, wie sie in Tabelle D.1 auf Seite 208 aufgelistet sind, wurden analog hergestellt. Dabei wurde im Regelfall das funktionelle Oxazolinmonomer mit Methyloxazolin oder Ethyloxazolin als statistisches Copolymer synthetisiert und die Polymerisationsreaktion mit einem geeigneten Terminationsreagenz beendet. Lediglich im Fall der Polymere mit dem UV-aktiven Monomer **2-Ethylphenyl-2-oxazolin** (**MF**) wurde dies zuerst zu einzelnen kurzen Blöcken von 4 bis 10 Einheiten umgesetzt,

<sup>37</sup>Seite 79

bevor dann der statistisch aufgebaute Block in einem Reaktionsschritt hergestellt wurde.

#### 5.8.4 Sternpolymere

Die in der Arbeit synthetisierten Sternpolymere sollten auf zwei Arten funktionalisiert werden: Die terminale Funktionalisierung lieferte vierfach funktionale Sterne mit unterschiedlichen Molmassen bzw. Armlängen. Die Seitengruppenfunktionalisierung führte zu globulären Systemen, welche deutlich mehr funktionelle Gruppen aufweisen konnten. Sterisch gesehen ist hier jedoch zu beachten, daß der Abstands-Block vom Sternmittelpunkt aus lang genug sein musste, um den funktionellen Block sterisch frei im Raum beweglich zu lassen. Es wurden Polymere mit unterschiedlichen Blocklängen synthetisiert, um später die Untersuchungen der immunologischen Funktion in Abhängigkeit von der Länge der Blöcke sowie der Dichte der funktionellen Gruppen in den Blöcken zu ermöglichen. Eine Reihe von Polymeren für diesen Zweck stellen z.B. die Polymere (**S12**) bis (**S16**) dar, welche unterschiedliche Abstandsblöcke, sowie Kombinationen aus verschiedenen Blocklängen bzw. Dichten der Aminofunktionen aufweisen.

**Beispielsynthese** Die Synthese der Sternpolymere verlief analog der Synthese der linearen Polymere. Unter wasserfreien Bedingungen und unter Stickstoffatmosphäre wurde der Initiator (**I4**), in trockenem Acetonitril gelöst, vorgelegt und eine Lösung des Monomers des ersten Blocks, ebenfalls in trockenem Acetonitril, zugegeben. Der Ansatz wurde 24 h bei 90 °C gerührt und dann mit Eis gekühlt. Der zweite Block des Polymers wurde danach durch Zugabe einer Lösung der beiden weiteren Monomere (meistens 2-Ethyl-Oxazolin und 2-(*N*-Boc-5-Aminohexyl)-2-Oxazolin (**MN**) oder 2-(Propionsäuremethylester)-2-oxazolin (**MO2**)) und weiterem Rühren bei 90 °C anpolymerisiert. Nach 72 h wurde wieder mit Eis gekühlt, die Lösung des Terminationsreagenzes zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Schließlich wurde nach Zugabe einer Spatelspitze wasserfreier Soda weitere 5 h gerührt, abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingengt. Nach Aufnehmen des Rückstandes in etwas Chloroform wurde das Polymer in Diethylether (0 °C) gefällt, getrocknet und aus Benzol gefriergetrocknet. Die Polymere fielen im Regelfall als weiß-gelbliche pulverförmige Feststoffe an und konnten mittels GPC und NMR charakterisiert werden.

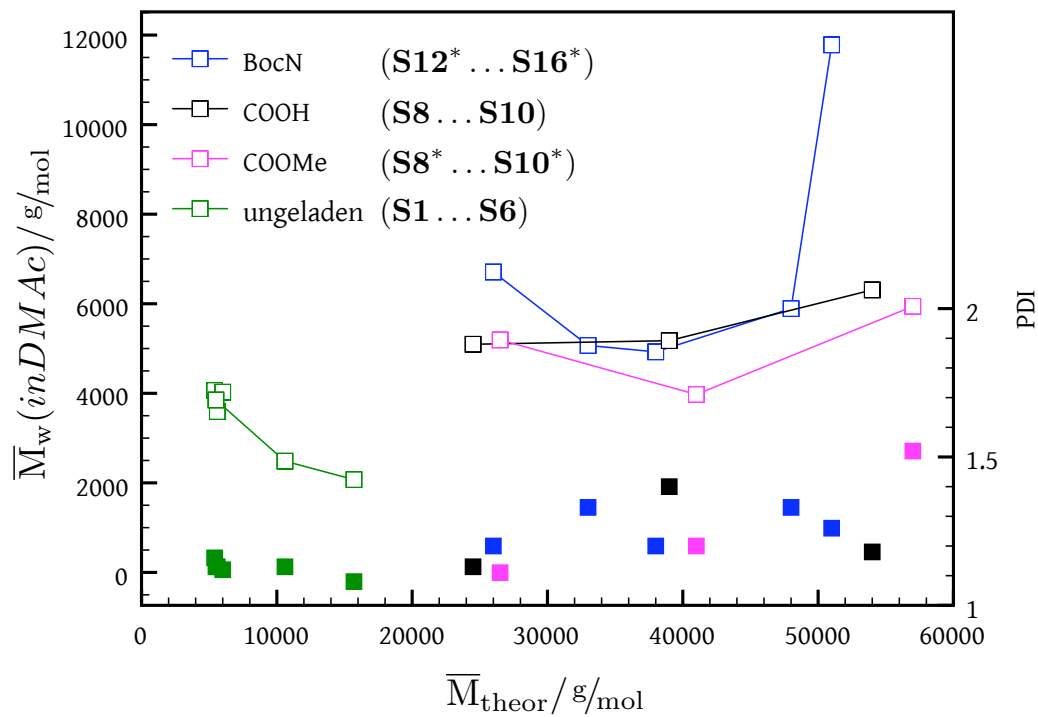
**Analytik** Die Bestimmung des mittleren Polymerisationsgrades mittels der NMR-Spektroskopie war nur in manchen Fällen erfolgreich: Diese wäre im Prinzip möglich –

unter der Voraussetzung, daß das Signal einer der Endgruppen im Spektrum deutlich sichtbar und ungestört ist. Dies war allerdings nicht immer der Fall: Das Signal der CH<sub>2</sub>-Gruppe des Initiators verschwand im Signal des Polyoxazolin-Rückgrats; die Signale der Kettenenden bzw. der Terminatoren waren meist im Verhältnis zu schwach, verbreitert und unsicher zur genauen Bestimmung des Polymerisationsgrades. Durchführbar war allerdings meist die Bestimmung der relativen Anteile der einzelnen Monomere – unter Annahme eines Polymerisationsgrades eines Monomers konnten dann die korrespondierenden Polymerisationsgrade bestimmt werden; die so gewonnenen Verhältnisse wurden dann mit den theoretischen Strukturen, die sich aus den Monomer/Initiator-Verhältnissen bestimmen ließen, kombiniert. Als problematisch stellt sich allerdings die genaue Analytik der Zusammensetzung der Polymere heraus. Die GPC-Analytik ergab keine absoluten Molmassen und zeigte darüberhinaus interessante Phänomene, welche in den folgenden Absätzen erläutert werden.

**Phänomene in der GPC** Ein besonderes Phänomen der Sternpolymere lässt sich anhand der Polymere (**S1**) bis (**S6**) veranschaulichen: Obwohl die theoretischen, über das Monomer/Initiator-Verhältnis eingestellten, Molmassen der Polymere zunahm, zeigten sich in der GPC-Analyse im Eluent DMAc gegenläufige Effekte. Offenbar können längere Ketten besser zusammenknäueln, so daß bei der GPC in Lösung eine kompaktere globuläre Struktur bzw. ein geringeres hydrodynamisches Volumen zu messen ist. Bei kürzeren Kettenlängen war dies nicht der Fall und diese Strukturen eluierten früher als ihre größeren Strukturverwandten.

Dieser Effekt trat aber bei den entschützten Carbonsäure-Sternen nicht mehr auf: Die Polymere (**S8\***) bis (**S10\***) mit den Methylestergruppen in den Seitenketten eluierten mit steigender Molmasse später, während die Polymere (**S8**) bis (**S10**) mit den freien Carbonsäuren mit steigender Masse wie erwartet – also früher – eluierten. Eine Erklärung für diese Anomalie mag darin zu sehen sein, daß die Solvation der polaren COOH-Gruppen dazu führt, daß die Arme nicht so stark knäueln und demnach keine so kompakte Struktur bilden wie die ungeladenen Ketten.

Eine weitere Erklärung könnte beim sogenannten *hydrophilic repulsion* Effekt liegen: durch die starke Erhöhung der Polarität/Hydrophilie der Polymerseitenketten nach Entschützung der Carbonsäuren werden diese von der hydrophoben Gelmatrix der Säule abgestoßen. Dadurch dürfte diesen ein geringeres Gesamtvolumen der hydrophoben GPC-Säule zur Verfügung stehen, was zu einem anderen Elutionsverhalten führen sollte.



**Abbildung 5.23:** Molmassen (leere Kästchen) und PDIs (gefüllte Kästchen) der Sternpolymere, geordnet nach funktionellen Gruppen. Daten siehe auch Tabelle D.2 auf Seite 209.

Wie man den Effekt auch begründet, man darf nicht vergessen, daß die GPC als Relativmethode nur ungenaue Ergebnisse liefern kann, wenn Polymere unterschiedlicher molekularer Struktur und Polarität miteinander verglichen werden.

Interessanterweise zeigen die Boc-geschützten Aminopolymere (**S12\***) bis (**S16\***) ähnliche Effekte. Die ersten drei Polymere werden mit zunehmender Molmasse kleiner, erst bei einer Abstandsbloklänge von 60 Einheiten steigt die hydrodynamische Größe der Polymere wieder. (**S16\***) zeigt ein deutlich früheres Elutionsverhalten als anhand der anderen Befunde in dieser Reihe erwartet; möglicherweise spielt hier die zusätzliche Verdoppelung der Dichte der funktionellen Gruppen – in diesem Fall Boc-geschützte Amino-Gruppen – eine bestimmende Rolle.

**Sterncharakter** Bei der Synthese von Sternpolymeren stellt sich immer die Frage, ob auch tatsächlich Sterne als Produkte erhalten werden. Vor allem bei einer lebenden Polymerisation sollte davon ausgegangen werden können, daß alle Initiatorfunktionen nahezu zeitgleich die Polymerisation starten. **R. Luxenhofer** verfolgte die Kinetiken der mit den hier verwendeten Initiatoren ausgelösten Polymerisation von Oxazolinen gaschromatographisch. Die Befunde weisen darauf hin, daß es sich tatsächlich um vierarmige Sterne handeln könnte.<sup>[136]</sup> Auch die geschilderten abnormen Phänomene in der GPC deuten auf sternförmige Anteile hin, wobei keine direkten Aussagen über die Verteilung der Armlängen getroffen werden können. Das Verhalten in der GPC deutet zumindest darauf hin, daß die Polymere nicht als lineare Moleküle vorliegen. Möglicherweise liegen die Polymere auch als drei- oder vier-armige Sterne vor – eine genauere Aussage kann aus den vorliegenden Daten nicht erhalten werden.

### 5.8.5 Bürstenpolymere

**Vorüberlegungen zur Struktur** Die in dieser Arbeit hergestellten Bürstenpolymere sollten zwei Grundeigenschaften in sich vereinen: Erstens sollte das Polymer eine aromatische Gruppe tragen, um eine bessere Detektion in der Gelelektrophorese sowie der chromatographischen Methoden zu ermöglichen. Des weiteren sollten über die Bürstenarchitektur sehr hohe Molmassen erzielt werden, welche bei der Aufnahme der Polymer-DNA-Konjugate in die Zelle eine Rolle spielen könnten. Die Funktionalisierung der Polymere erfolgte ausschließlich über die Endgruppen der Armpolymere.

Durch ein *grafting-from*-Experiment wurden Poly(2-Methyloxazolin)-Ketten von einem Makroinitiator, bestehend aus einem Copolymer aus Styrol und  $\alpha$ -Chlormethylstyrol, wegpolymerisiert. Die erhaltenen Polymere wiesen demnach eine amphiphile Struktur auf, bei der das hydrophobe Rückgratpolymer in wässrigen Medien nach

außen hin von den hydrophilen Poly(2-Methyloxazolin)-Ketten abgeschirmt wird. Es entsteht somit in Lösung eine sternähnliche Struktur: der hydrophobe Kern wird von den hydrophilen Poly(2-Oxazolin)-Ketten abgeschirmt und die terminalen funktionellen Gruppen zeigen nach außen. Infolge der hohen Anzahl an Pfropfarmen sind so hohe Funktionalisierungsgrade möglich, ohne daß Seitenkettenfunktionalisierungen in den Armen verwendet werden müssen.

Die Synthese der Makroinitiatoren ist in Abschnitt 5.6.2 beschrieben.

**Synthese** Ausgehend von den Makroinitiatoren wurden mehrere Bürstenpolymere synthetisiert (Tabelle D.3 auf Seite 210). Dabei wurde der Makroinitiator zusammen mit 1.1 eq. KI pro Cl-Gruppe im Polymer und der entsprechenden Menge 2-Methyloxazolin in Benzotrinitril gelöst und 48 h bei 130°C gerührt; dabei färbte sich die klare Lösung von einem leichten Gelbton nach Braunrot. Nach Zugabe des Terminationsreagenzes wurde nochmals 24 h bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde abdestilliert, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und das Polymer dann in Ether (0°C) ausgefällt. Nach weiteren zwei Umfällprozessen konnte das Polymer als Pulver erhalten werden.

Bemerkenswert bei der Synthese dieser Polymere ist vor allem die Tatsache, daß die erhaltenen Bürstenpolymere bei Poly(2-Methyloxazolin)en mit weniger als 30 Wiederholungseinheiten nicht isolierbar waren. Man erhielt, selbst nach mehrmaligem Umfällen, nur eine braune, zähe Masse. Erst ab einer Kettenlänge der Poly(2-Methyloxazolin)e von 45 Wiederholungseinheiten und größer konnten die Polymere als Feststoffe isoliert werden.

Die GPC-Analyse der Polymere zeigte allerdings eine weitere Komponente von geringer Molmasse. Wahrscheinlich hatte man es hier mit linearen Poly(2-Methyloxazolin)en zu tun, welche unspezifisch durch, im Makroinitiator als Verunreinigung enthaltenes, Chlormethylstyrol initiiert wurden. In Anbetracht der geringen Menge und des wohl monofunktionellen und linearen Charakters kann aber davon ausgegangen werden, daß die Anwesenheit dieser Nebenkompente vorerst keinen störenden Einfluß auf die weiteren Experimente (Methodenentwicklung der Bioanalytik und Kupplung mit DNA) haben sollte. Selbstverständlich sollte später, bei einem umfangreicheren Screening in der Immunologie, diese Limitierung im Auge behalten und mit geeigneten Kontrollen, z.B. Trennung der Polymeren, diese Annahme bestätigt werden.

**Nachweis bei Terminationen mit (TS)** Die Maleinimidgruppe konnte bei kurzen Polymeren im NMR-Spektrum als kleines Singulett bei etwa  $\delta = 6.5$  ppm nachgewiesen

werden. Bei längerkettigen Polymeren konnte im IR-Spektrum die Bande bei  $\nu = 1800 \text{ cm}^{-1}$  der Streckschwingung der maleinimidischen CO-Bindung zugeordnet werden.

Ebenso ist ein indirekter Nachweis über die erfolgreiche Kupplung von 2006-SH an die Maleinimidgruppen der Bürstenpolymere (siehe Abschnitt 5.10.1) erfolgt.

## 5.9 Gelelektrophorese von Poly(2-Oxazolin)en

### 5.9.1 Grundlegende Gedanken

Die erhaltenen Poly(2-Oxazolin)e können NMR-spektroskopisch (Struktur & Zusammensetzung, gemittelte Aussagen, oft nur als Relativmethode bezogen auf die einzelnen Monomere möglich) und mit der GPC (Polydispersitätsindices, Homogenität) charakterisiert werden. Jedoch werden dafür meist mehrere mg Substanz benötigt; für die GPC waren im Rahmen der Routineanalytik nur organische Eluenten möglich. Angesichts der späteren Verwendung der Polymere als Träger für DNA stellte sich jedoch die Frage, welche Methoden für diese Konjugate geeignet sind. Folgende Bedingungen mussten geeignete Methoden erfüllen:

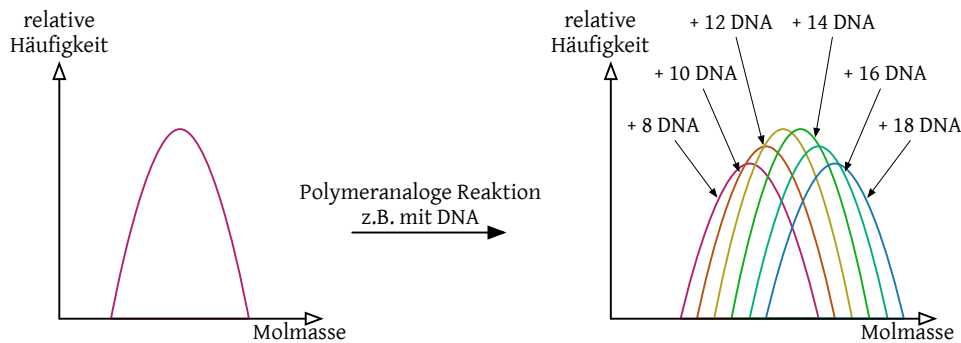
1. Die Möglichkeit, geringste Mengen Substanz zu verwenden. Die pro Versuch zur Verfügung stehende Menge DNA lag in der Größenordnung von  $\mu\text{g}$  bzw. nmol; unter Berücksichtigung des Stoffmengenverhältnisses von DNA zu Polymer ab 10 zu 1 bis 100 zu 1 ergeben sich noch geringere Mengen an Polymer in den Konjugaten
2. Polydispersität: Infolge der inhärenten Molmassenverteilung der Polymere, aber auch durch unvollständige Kupplungsreaktionen ergibt sich eine Verbreiterung der messbaren Massenverteilung (Abbildung 5.24<sup>38</sup>) und damit eine verringerte Sensitivität der Detektion.
3. Wenn möglich, sollten Methoden verwendet werden, welche beim Kooperationspartner in der Klinischen Pharmakologie durchgeführt werden konnten.

Die in Frage kommenden Methoden der Bioanalytik sollten auch bei Poly(2-Oxazolin)en anwendbar sein. Die DNA-Polymer-Konjugate bestehen zu großen Massenanteilen aus DNA. Damit lag der Schluß nahe, die Standardmethode der Protein- und DNA-Analytik, die Gelelektrophorese, zu verwenden, um die hergestellten Polymere und Konjugate zu charakterisieren.

---

<sup>38</sup>Seite 87





**Abbildung 5.24:** Darstellung der Verbreiterung der Massenverteilung eines Polymeren bzw. eines DNA-Polymer-Konjugats durch Überlagerung der Verteilungen unterschiedlicher Produkte.

Die Überlagerung kommt durch unterschiedliche Kupplungsgrade zustande, welche unter Annahme der selben Verteilung unterschiedliche Mittelwerte haben – und damit in ihrer Summe zu einer Verbreiterung der messbaren Verteilung führen.

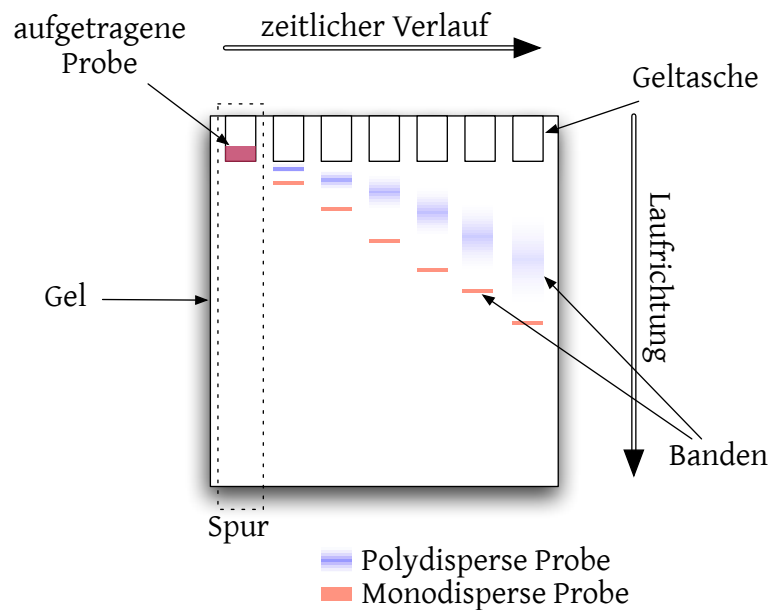
Dazu mussten zuerst Methoden gefunden werden, die Polymere in den Gelen zu visualisieren, um dann später die DNA-Polymer-Konjugate charakterisieren zu können.

## 5.9.2 Wirkungsprinzip

### Begriffsdefinitionen

Abbildung 5.25<sup>39</sup> zeigt ein Schema, welches eine Gelelektrophorese veranschaulichen soll. Zuerst werden die Proben oben links in eine Tasche im Gel aufgetragen. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proben nach unten, was auf der Abbildung sequentiell dargestellt ist. Die einzelnen Probenmoleküle laufen in einer Bande nach unten; große Moleküle bewegen sich langsamer als kleine Moleküle. Dabei ist zu beachten, daß Banden von monodispersen Proben relativ scharf auftreten und bleiben, während die Banden von polydispersen Proben im Lauf der Elektrophorese immer breiter werden: Die in der Probe enthaltenen Moleküle unterscheiden sich alle hinsichtlich ihrer Molmasse und verhalten sich daher unterschiedlich im Gel, was zu einer Verbreiterung der Bande im Gel führt. Man beachte, daß im Regelfall die Banden nicht mit dem Auge sichtbar sind, sondern erst durch eine Anfärbung nach dem Ende der Elektrophorese visualisiert werden müssen.

<sup>39</sup>Seite 88



**Abbildung 5.25:** Schema zu Definitionen der verwendeten Begriffe in der Gelelektrophorese.

Im Folgenden sind oft Fotos von Gelen abgebildet, auf denen die einzelnen Spuren mit Buchstaben, z.B. **A**, markiert sind. Im Text werden die Spuren, aber auch die Banden, mit diesem Buchstaben referenziert.

Die nächsten Abschnitte sollen kurz die der Gelelektrophorese zugrunde liegenden Prinzipien erläutern,<sup>40</sup> bevor in Abschnitt 5.9.3 auf die verwendeten Methoden zur Analytik der Polymere eingegangen wird.

### Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wird als Medium der Elektrophorese statt einer Lösung ein festes Gel verwendet. Dieses Gel kann unter anderem aus vernetztem Poly(acrylamid) oder aus Agarose bestehen.[137] Als Matrix der elektrophoretischen Trennung enthält es Poren, deren Größe von der Art und Beschaffenheit des Gels und damit von der Konzentration des Gelbildners abhängt. Es wirkt als siebendes Medium, in welchem eine Reibungskraft durch Wechselwirkungen des wandernden Teilchens mit der Gelmatrix zustande kommt und die Bewegung im Gel vermindert. Die Unterschiede

<sup>40</sup>Eine detaillierte Beschreibung findet sich bei der Methode 11.1

in den molekularen Strukturen führen so zu unterschiedlichem Verhalten im Gel und damit zu unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten (ähnlich dem  $R_f$ -Wert bei der Dünnschichtchromatographie).

Man unterscheidet zwischen *nativer* und *denaturierender* Gelelektrophorese: Bei den nativen Methoden bleiben alle Strukturmerkmale der Biomoleküle erhalten; die elektrophoretische Mobilität ist damit abhängig von Ladung und Masse, insbesondere aber auch von Form und Größe des Moleküls. Im Falle der denaturierenden Methoden wird versucht, thermisch und mittels chaotroper Stoffe (Harnstoff) und Detergenzien (SDS<sup>41</sup>) die Biomoleküle zu denaturieren und mit einem konstanten Masse-/Ladungs-Verhältnis zu versehen, so daß die elektrophoretische Mobilität ausschließlich von der Länge bzw. der Masse des Biomoleküls abhängt. Im Regelfall werden bei den denaturierenden Methoden auch Stoffe wie Mercaptoethanol zugegeben, um Disulfidbrücken in Proteinen aufzubrechen.

### Gelstrukturen

**Agarose-Gele** bestehen aus mit D-Galaktose glycosidisch verbundener 3,6-Anhydrogalactose. Sie (Abbildung 11.1<sup>42</sup>) stellt die Hauptkomponente des Agars dar und wird vor allem aus den Rotalgengattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen.

**Poly(acrylamid)-Gele** entstehen bei der Polymerisation von Acrylamid in Gegenwart kleiner Mengen eines bifunktionellen Vernetzers wie z.B. Methylenbisacrylamid. Dabei entsteht eine dreidimensionale Netzstruktur aus Acrylamidketten, die über Methylenbisacrylamid-Einheiten vernetzt sind (Abbildung 11.2<sup>43</sup>).

Die Gele werden meist durch ihren Massenprozentanteil des Gelbildners im Gel charakterisiert. Je größer diese Zahl ist, desto kleiner sind die Poren des Gels: bei hochprozentigen Gelen können kleine Moleküle gut getrennt werden, bei niedrigprozentigen Gelen große Moleküle. Eine gleichzeitige Trennung von Molekülen großer und kleiner Molmassen wird meistens in Gradientengelen oder bei zweidimensionalen Methoden erreicht. Eine Übersicht über die Trennbereiche bestimmter Gelkonzentrationen findet sich für Agarose-Gele in Tabelle 11.1 auf Seite 159 und für Poly(acrylamid)-Gele in Tabelle 11.2 auf Seite 161.

Zur Gelelektrophorese von Biomolekülen werden für Biopolymere mittlerer Massen (Proteine und Oligonukleotide) üblicherweise Gele aus Poly(acrylamid) verwendet, wäh-

---

<sup>41</sup>Natriumdodecylsulfat

<sup>42</sup>Seite 159

<sup>43</sup>Seite 160

rend zur Analytik hochmolekularer Biopolymere (dsDNA) Gele aus Agarose eingesetzt werden.

### 5.9.3 Methoden zur Trennung

#### Ziel dieser Experimente

Mithilfe der im Folgenden geschilderten Experimente sollte eine Evaluierung der Standardprotokolle in Bezug auf Ihre Anwendung bei der Charakterisierung von Poly(2-Oxazolin)en und deren Konjugaten mit Oligonukleotiden geschehen. Dazu mussten die Methoden der Gelelektrophorese untersucht werden, sowie Methoden zur Detektion der Polymere in den Gelen gefunden werden. Dabei stellte sich heraus, daß hier ein „Henne-Ei-Problem“ vorlag: Die ersten Versuche zeigten keine detektierbaren Polyoxazolin-Banden, während die parallel durchgeführten Positivkontrollen, bestehend aus Protein-Größenmarkern, gut sichtbare Banden enthielten. Es war also einerseits notwendig, eine geeignete Detektionsmethode für die Polymere zu finden, andererseits auch eine Methode, um sicherzustellen, daß die Polymere auch im Gel aufgetrennt wurden.

Dieses Problem konnte durch eine deutliche Erhöhung der Menge an Detergenz im Probenpuffer, Gel und Elektrophoresepuffer gelöst werden: Im Vergleich zum Standard-SDS-PAGE<sup>44</sup> wurde die fünffache Menge SDS im Probenpuffer benötigt, um die Polymere im Gel laufen zu lassen. Zusätzlich wurde eine Variante der ohnehin unüblichen SDS-Agarose-Gelelektrophorese (SDS-AGE<sup>45</sup>) verwendet, vor allem um die hochmolekularen Polymere zu analysieren.

#### SDS-PAGE

Ausgehend von dem ursprünglichen **Laemmli**-Protokoll[138, 139] wurde eine Variante entwickelt, welche es ermöglicht, Poly(2-Oxazolin)e zu analysieren.

Die Probenvorbereitung erfolgte analog der von Proteinen; jedoch wurden dem Probenpuffer weder Harnstoff noch Thiole zugesetzt, da davon auszugehen ist, daß die Polymere keine definierte Tertiär- bzw. Quartärstruktur aufweisen, welche aufgelöst werden müssten.

Die Gelkonzentration betrug zwischen 10 % und 12 %, was bei Proteinen einen Trennbereich zwischen 15 kDa und 100 kDa ermöglicht. Es zeigte sich bei den ersten Versuchen mit verschiedenen Polymeren, daß der reguläre **Laemmli**-Probenpuffer mit

---

<sup>44</sup>Poly(acrylamid)-Gelelektrophorese

<sup>45</sup>Agarose-Gelelektrophorese

2 % w/w SDS nur unzureichend geeignet war, Polyoxazolin-Proben ohne Eigenladung in dem Gel laufen zu lassen. Erst mit einer Konzentration von 10 % w/w SDS war die Trennung der Polymere erfolgreich.

### SDS-AGE

Für die Analytik der hochmolekularen Bürstenpolymere musste die Gelmatrix geändert werden, da diese Polymere aufgrund ihrer hohen Masse und geringen Eigenladung in einer Poly(acrylamid)-Matrix nur unzureichend getrennt wurden. Eine Penetration des Poly(acrylamid)-Gels durch die Bürstenpolymere war zwar möglich, aber nur bei Gelkonzentrationen unterhalb von 6 %. Diese Gele weisen allerdings eine sehr geringe Festigkeit auf und sind daher für eine Weiterverarbeitung sowie die Präparation auf dem Leuchttisch unbrauchbar. Gelmatrix-Varianten bestehend aus Poly(acrylamid) und Agarose sind zwar etwas fester und besser in der Handhabung, aber sehr empfindlich gegenüber der Wärmeentwicklung bei der vertikalen Elektrophorese.

Die Agarose-Gelelektrophorese wird normalerweise ohne die Zugabe von SDS durchgeführt – was bei ihrer primären Verwendung zur Trennung von Nukleinsäuren nicht verwundert. Ein Blick in die Literatur zeigt auch, daß die Agarose-Gelelektrophorese mit SDS kaum Verwendung findet. Die Arbeiten von **Raines** behandelten die Analytik von sehr großen Protein-Komplexen aus dem Harn zur Detektion von Multimeren des Willebrand-Faktors, einem Protein mit der Masse 540 kDa.<sup>[140]</sup>

Mit der Verwendung eines angepassten **Raines**-Protokolls konnte allerdings eine erfolgreiche Trennung und Analytik der Polyoxazoline in der SDS-AGE erreicht werden.

Die Gelmatrix aus gequollener Agarose bildet bei Raumtemperatur ein festes Gel. Wegen der Dicke sowie der nur begrenzten chemischen Stabilität der Gele sind Färbemethoden mit Coomassie-Brilliant-Blau und Silber nicht geeignet. Stattdessen musste auf direkte Detektionsmethoden wie die UV-Absorption oder Fluoreszenz bzw. im Fall von DNA auf das Färben mit DNA-Interkalationsfarbstoffen zurückgegriffen werden.

**Nebenbemerkung** Der Versuchsaufbau bei der AGE ist in Abbildung 11.4<sup>46</sup> schematisch gezeigt. Ein besonderer Unterschied zur PAGE ist die horizontale Gelapparatur, welche es ermöglicht, Probenmoleküle, welche nicht in das Gel eindringen können, zu isolieren bzw. detektieren. Siehe hierzu auch Abschnitt 5.10.

---

<sup>46</sup>Seite 164

**Tabelle 5.3:** Übliche Methoden zur Detektion von Biopolymeren in Gelen.

Methode	Probenmoleküle		Trennmethode	
	Proteine	DNA	PAGE	AGE
Detektion mit UV bei 254 nm	nein	ja <sup>a</sup>	ja	ja
Detektion mit VIS	nein	nein	ja	ja
*[3mm] Färbung mit Coomassie-Blau	ja	nein	ja	nein
Färbung mit Silber	ja	ja	ja	nein
Färbung mit Ethidiumbromid	nein	ja	ja	ja

<sup>a</sup>nur in präparativen Mengen > 50 µg

### 5.9.4 Methoden zur Detektion

#### Überlegungen zur Detektion

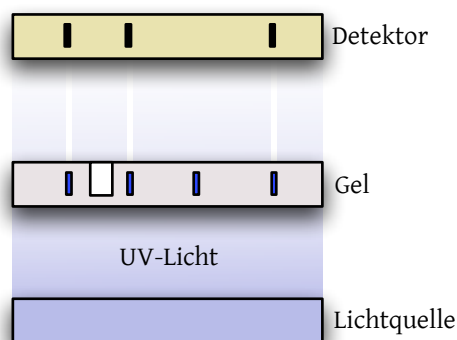
Zur Detektion von Banden in den Gelen müssen die Moleküle darin entweder optisch aktive Gruppen tragen oder durch sekundäre Farbreaktionen sichtbar gemacht werden. Die direkte Detektion durch UV-Absorption wird vor allem bei der präparativen Trennung von Oligonukleotiden verwendet, während im Regelfall für analytische Zwecke eine Vielzahl von Farbreaktionen zur direkten Detektion von Proteinen und DNA im Gel etabliert sind. Tabelle 5.3 zeigt eine Übersicht über die üblichen Methoden. Agarose-Gele lassen sich nicht mit Coomassie-Blau oder Silber anfärben, da die hierbei verwendeten Lösemittel und Reagenzien das Agarose-Gel auflösen oder zu einem sehr hohen Signalthintergrund führen würden.

#### UV-Absorption im Gel

Eine direkte Beobachtung von Polymeren mit aromatischen Gruppen ist auf dem sogenannten UV-Tisch möglich. Dabei wird das Gel von unten mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt, mit einer CCD-Kamera aufgenommen und das Foto im Computer verarbeitet. Eine schematische Zeichnung dieser Apparatur findet sich in Abbildung 5.26<sup>47</sup>. Diese Methode ist bei Poly(acrylamid)- (PAGE) sowie bei Agarose-Gelen (AGE) einsetzbar.

Da Poly(2-Methyloxazolin) nur die Absorption der Peptidbindung bei 210 nm zeigt, wurden zwei Polymervarianten entworfen, um aromatische Gruppen in das Polymer einzubauen, und so – mit diesen Gruppen – eine Absorption bei 254 nm sicherzustellen:

<sup>47</sup>Seite 93



**Abbildung 5.26:** Schematische Darstellung der Detektion von UV-aktiven Polymerbanden.

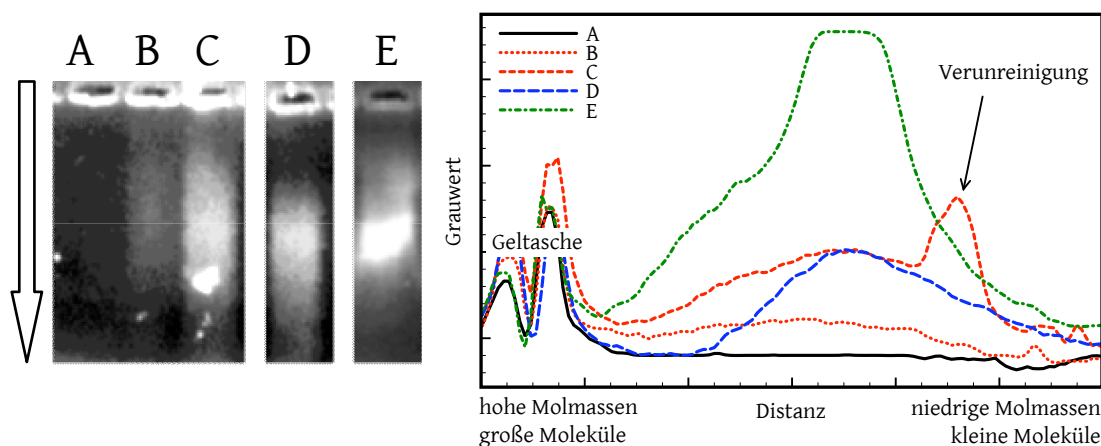
1. Einbau des **2-Ethylphenyl-2-oxazolin (MF)** in lineare oder sternförmige Polymeren.
2. Bürstenpolymere mit dem Poly(styrol)-derivat (**Mi**) als Hauptkette.

Vor allem die Polymere auf Basis des aromatischen Makroinitiators sind mit dieser Methode deutlich im Gel sichtbar. Drei Beispiele sind in [Abbildung 5.27<sup>48</sup>](#) gezeigt:

Auf der linken Seite der Abbildung sind die Fotos der Gelbanden zu sehen. Bande **A** ist eine Negativkontrolle mit einem Polymer ohne aromatische Gruppen, während die anderen Banden Bürstenpolymere verschiedener Strukturen in unterschiedlichen Mengen zeigen. Man sieht im direkten Vergleich der Banden **D** und **E**, daß das Polymer (**B5'**), welches sich in seiner Struktur von (**B6'**) nur durch die Anzahl seiner Poly(methyloxazolin)-Arme unterscheidet, trotz der höheren Molmasse weiter im Gel läuft als (**B6'**). Möglicherweise ist dies mit einer unterschiedlichen Beladung des Polymers mit SDS zu begründen. Ein weiterer Grund für dieses Phänomen könnte, analog zu den Ergebnissen bei der GPC der Sternpolymere (s.o.), in einer kompakteren Struktur *aufgrund der größeren Anzahl an Seiten-Armen* liegen, welche besser zu einer globulären Struktur knäueln können als die Arme des Polymers (**B6'**), welches durch einen geringeren Anteil an Poly(oxazolin) möglicherweise eine größere Reibung im Gel erfährt.

Der rechte Teil der Abbildung ist ein Querschnitt der Gelausschnitte – aufgetragen analog zur GPC, bei der große Moleküle links und kleinere Moleküle rechts zu finden sind. Die beiden roten Kurve **B** und **C** entsprechen demselben Polymer (**B4**) in unter-

<sup>48</sup>Seite 94



**Abbildung 5.27:** SDS-AGE, Agarosekonzentration 1.5 %; Belichtungszeit 1600 ms

*Links:* Die bearbeiteten, invertierten Bilder: Hintergrund = dunkel; Substanz = hell. Die Spuren **A** bis **D** wurden im Kontrast verstärkt, um die Banden besser sichtbar zu machen.

*Rechts:* Ein Plot, bei dem die jeweilige Absorption gegen die Lauflänge auf dem Gel aufgetragen ist; Hierzu wurde die originale unbearbeitete Fotografie des Gels verwendet. Der Peak bei Kurve **C** ist verursacht durch die kleine Verunreinigung im unteren Drittel der Bande

*Aufgetragene Proben:*

Bande	Polymer	$\bar{M}_{\text{theor}}$	Probenmenge	
		g/mol	$\mu\text{g}$	nmol
<b>A</b>	( <b>S17</b> ) <sup>a</sup>	17 704	3700	195
<b>B</b>	( <b>B4</b> )	278 850	280	1
<b>C</b>	( <b>B4</b> )	278 850	2800	10
<b>D</b>	( <b>B5'</b> )	432 000	1320	3
<b>E</b>	( <b>B6'</b> )	278 000	840	3

<sup>a</sup>ohne aromatische Gruppen

schiedlichen Konzentrationen. Die grüne Kurve der Bande **E** zeigt eine Schwachstelle dieser Methode: An ihrem Maximum ist die Gelbande etwas überbelichtet – ein Phänomen, welches öfter auftritt, wenn einzelne Banden auf einem Gel unterschiedliche Intensitäten zeigen und ein Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und genauer Abbildung der Signalintensitäten geschlossen werden muss: Die Anzahl der möglichen



Farben ist durch die digitale Fotografie in diesem Fall auf 256 verschiedene Stufen begrenzt.

Zu beachten ist außerdem, daß die Intensität der Banden nicht nur von der Menge des Polymers abhängt, sondern auch direkt proportional zur Menge der Aromaten im Polymer ist. Desweiteren ist hier auch ersichtlich, daß die Nachweisgrenze auch von der molekularen Massenverteilung – sichtbar in der Verbreiterung der Bande in ihrer Laufrichtung – abhängt und als Funktion der beobachteten Fläche/Auftrennung zu sehen ist. Je breiter die Verteilung ist, desto schwieriger wird es bei gleichem Signal/Rausch-Verhältnis, die Bande zu sehen. Ein gewisser Spielraum ist demnach auch durch die Belichtungszeit bei der Aufnahme des Gelfotos gegeben. Darüber hinaus lässt sich mit den modernen Methoden der Bildverarbeitung mittels der optimalen Nutzung des Farbraumes und einer Anpassung von Kontrast und Helligkeit die Qualität der Fotos verbessern.

### Anfärbung mit Coomassie-Blau

Das Anfärben von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen mit dem kationischen Farbstoff *Coomassie-Brilliant-Blau* (Chemische Struktur siehe Abbildung 11.5<sup>49</sup>) ist eine Routinemethode in vielen biochemischen Labors. Dabei wird das Gel zuerst mehrere Stunden in einer Lösung des Farbstoffs geschwenkt. Das ebenfalls blau gefärbte Gel wird im Anschluß in einer Lösung aus Essigsäure in Methanol wieder entfärbt, während die Protein-Banden blau gefärbt bleiben.

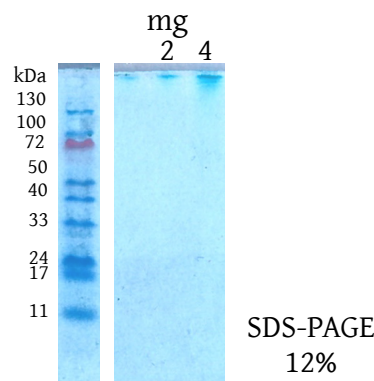
Nachdem, wie oben gezeigt, die direkte Detektion der Polymere in den Gelen mit UV-Licht nur bei Bürstenpolymeren mit einem erheblichen aromatischen Anteil möglich war, sollte die Anfärbung mit *Coomassie-Brilliant-Blau* eine Detektion von nicht-aromatischen Polymeren möglich machen.

Ein Beispiel für die Färbung der Polyoxazolin-Banden ist in Abbildung 5.28<sup>50</sup> zu sehen. Allerdings konnte gezeigt werden, daß zwar Polymere mit aromatischen Gruppen angefärbt werden können, während hydrophile bzw. ionische Polymere den Farbstoff nicht binden und so keine erkennbaren Banden zeigen. Ebenso auffällig ist die Bandenbreite im 12%igen Poly(acrylamid)-Gel: Während die Bürstenpolymere in Agarose-Gelen eine deutliche Bandenverbreiterung zeigen, liegt hier eine sehr scharfe Bande vor. Dies zeigt, daß die Porengröße und der Widerstand in den Agarose-Gelen deutlich geringer ist als in den Poly(acrylamid)-Gelen, in welchen sich Moleküle großer Massen alle ähnlich verhalten und daher in einer scharfen Bande zu sehen sind.

---

<sup>49</sup>Seite 166

<sup>50</sup>Seite 96



**Abbildung 5.28:** Beispiel für eine Detektion mit dem Farbstoff *Coomassie-Brilliant-Blau*. Das verwendete Polymer ist das Bürstenpolymer (**B3**) mit einer theoretischen Molmasse von 280 000 g/mol.

Dieser Befund beruht wahrscheinlich auf der Hydrophobizität des Farbstoffes, dessen aromatisches Grundgerüst sehr gut in (Bio-)Polymeren mit hydrophoben Regionen adsorbiert wird, jedoch nur schwach in hydrophilen Regionen gebunden bzw. dort leicht ausgewaschen wird.

Mit dieser Methode ließen sich Polymermengen  $> 500 \mu\text{g}$  nachweisen.

### Anfärbung mit Silber

Eine relativ empfindliche Methode zur Detektion von Proteinen und DNA in Poly(acrylamid)-Gelen ist der sogenannte *silver stain*. Dabei wird, ähnlich dem photographischen Prozeß, kolloidales Silber in Regionen abgeschieden, welche durch eine chemische Reaktion das Silber reduzieren können – dabei entstehen latente *Keime*. In der Literatur finden sich mehrere verschiedene Protokolle zur Silberfärbung.[141, 142] Die beiden am weitest verbreiteten Systeme unterscheiden sich im pH-Wert der Färbelösung: Die eine Variante arbeitet mit einer alkalischen Lösung eines Silber-Ammoniak-Komplexes,[143, 144] die andere im Säuren mit Silbernitrat.[145] Der Mechanismus der Keimbildung ist noch nicht verstanden. Mehrere Modelle gehen davon aus, daß  $\text{Ag}^+$ -Ionen entweder *nur* von im Protein befindlichen  $\text{NH}_2$ -, SH- oder COOH-Gruppen komplexiert werden; andere Modelle berücksichtigen eine direkte Reduktion des  $\text{Ag}^+$  *in situ* durch Aldehyde – welche von Sensibilisierungsmitteln wie z.B. Glutaraldehyd oder Formaldehyd durch Reaktion mit Nukleophilen der Probenmoleküle erzeugt werden. Die diversen Versuchsvorschriften enthalten oft einen Sensibilisierungsschritt, bei dem mit Hilfe einer reduzierenden ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) oder einer oxidierenden ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) Lösung versucht wird, den

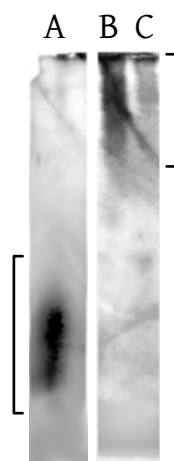
## 5.9 Gelelektrophorese von Poly(2-Oxazolin)en

Kontrast und somit die Empfindlichkeit der Färbung zu verbessern. Überentwickelte Gele können mit reduzierenden Thiosulfat-Lösungen entfärbt werden.[144, 145]

Versuche, Poly(oxazolin)e mit Silber im Gel einzufärben, waren erfolgreich für Polymere mit freien  $\text{NH}_2$ - bzw.  $\text{COOH}$ -Gruppen, während unfunktionalisierte Poly(2-Methyloxazolin)e nicht eingefärbt werden konnten.

Die Empfindlichkeit konnte durch einen längeren Entwicklungsschritt etwas verbessert werden. Dies führte aber hauptsächlich zu einer verstärkten Färbung des Gelhintergrunds und damit zu einem verschlechterten Signal/Rausch-Verhältnis; abgesehen von dieser Hintergrundfärbung entwickelten sich sehr schnell auch Druckstellen, Verunreinigungen oder Staubpartikel zu deutlich sichtbaren Banden, so daß dieser Versuch der Verbesserung der Empfindlichkeit sehr begrenzt war. Ein Beispiel für diese Art der Detektion findet sich in Abbildung 5.29<sup>51</sup>.

Die Erfassungsgrenze für diese Methode liegt in der Größenordnung von  $50 \mu\text{g}$  bei Polymeren mit Carbonsäure- oder Amino-Gruppen, die  $\text{Ag}^+$  gut komplexieren können.



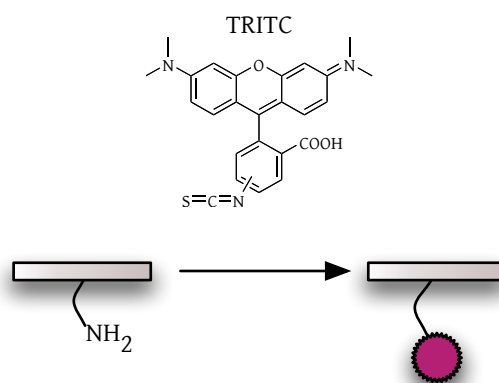
**Abbildung 5.29:** SDS-PAGE, mit Silber eingefärbt

Bande	Polymer	$\bar{M}_{\text{theor}}$	Anzahl FG	Probenmenge	
		g/mol		$\mu\text{g}$	nmol
<b>A</b>	( <b>S11</b> )	60 355	120 COOH	41	1
<b>B</b>	( <b>B6</b> )	279 555	50 $\text{NH}_2$	162	0.675
<b>C</b>	( <b>B6</b> )	279 555	50 $\text{NH}_2$	54	0.225

<sup>51</sup>Seite 97

### Fluoreszenzmarkierung

Die deutlich empfindlichste Methode zur Visualisierung von Polymeren ist deren Funktionalisierung mit einer fluoreszierenden Sonde, welche sogar Einzelmoleküldetektion ermöglicht. Der Ansatz von **K. Lüdtke** zur Fluoreszenzmarkierung von Poly(2-Oxazolin)en, welche freie Aminofunktionen tragen, mit dem Isothiocyanat des rot fluoreszierenden Tetramethylrhodamin (TRITC<sup>52</sup>), konnte ebenfalls auf die in dieser Arbeit verwendeten Polymere angewendet werden.<sup>[146]</sup>



**Abbildung 5.30:** Fluoreszenzmarkierung von Amin-funktionalisierten Poly(2-Oxazolin)en.

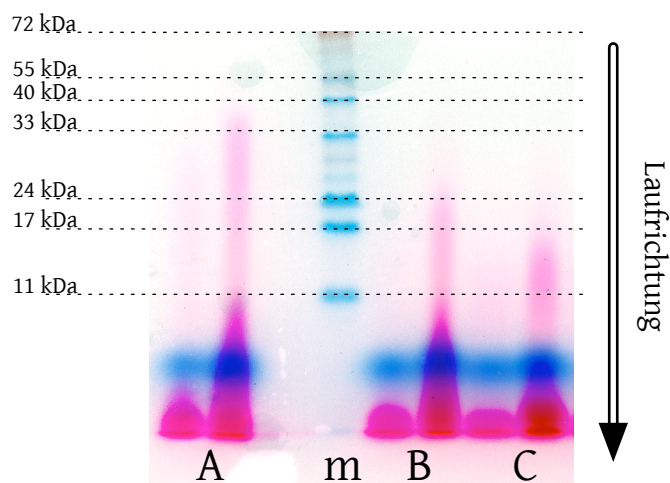
Die Reaktion des Polymers mit 5 Äquivalenten Isothiocyanat pro Aminogruppe war in DMSO oder DMF bei Raumtemperatur möglich. Diese Reaktionsansätze wurden nach 24 h in die Probenflaschen eines Poly(acrylamid)-Gels gegeben und analysiert (Abbildung 5.31<sup>53</sup>). Dabei ist bemerkenswert, daß die fluoreszenz-aktiven Polymere schon mit bloßem Auge sichtbar waren (Nachweis bis zu 30 µg, je nach Qualität der Photographie).

Man sieht auf dem Gel drei verschiedene Polymere in je zwei Konzentrationen aufgetragen. Die Banden **A** zeigt das Polymer (**S16**) welches eine recht breit verschmierte Bande aufweist. Die beiden kleineren Polymere (**S7**) (Banden **B**) und (**S5**) (Banden **C**) laufen weiter im Gel und zeigen gerade noch sichtbare Banden bei Probenmengen um 30 µg. Das Verhalten der Polymere im Gel ist analog zu ihrem Verhalten in der GPC – alle Polymere laufen wie erwartet und Anomalien treten nicht auf.

<sup>52</sup>Tetramethylrhodamin-isothiocyanat

<sup>53</sup>Seite 99

## 5.9 Gelelektrophorese von Poly(2-Oxazolin)en



**Abbildung 5.31:** Beispiel eines SDS-PAGE Gels mit TRITC-markierten Poly(2-Oxazolin)en. Die fetten blauen Banden entsprechen dem *tracking dye* Xylen-Cyanol; die fetten roten Banden am unteren Ende des Gels entsprechen dem unreaktierten TRITC.

*Aufgetragene Proben:*

Bande	Polymer	$\bar{M}_{\text{theor}}$	<i>linke Bande</i>		<i>rechte Bande</i>	
		g/mol	$\mu\text{g}$	nmol	$\mu\text{g}$	nmol
<b>A</b>	(S16)	51 464	127	2.5	637 $\mu\text{g}$	12.5
<b>B</b>	(S7)	13 924	34	2.5	172 $\mu\text{g}$	12.5
<b>C</b>	(S5)	10 620	26	2.5	132 $\mu\text{g}$	12.5

Die Empfindlichkeit der Methode lässt sich noch um eine Größenordnung verbessern, wenn die Gele mit UV-Licht bestrahlt werden. Das resultierende orangefarbige Fluoreszenzlicht ermöglichte es, die Erfassungsgrenze bis unter 1  $\mu\text{g}$  eines Polymers zu senken!

Ein Beispiel für diese Art der Detektion ist in [Abbildung 5.32<sup>54</sup>](#) zu sehen. Dieses Gel wurde außerdem mit einer Stufe gegossen: der obere Abschnitt des Geles hat eine Konzentration von 6% Acrylamid, der untere Teil hingegen die doppelte Konzentration, also 12%. Diese Gelkonstruktion ermöglicht es, der polymeren Massenverteilung entgegenzuwirken: Im oberen Teil wandern alle Moleküle schneller und werden an der

<sup>54</sup>Seite 101

Grenze zur dickeren Gel-Schicht – mit einem größeren Massenanteil Poly(acrylamid) – gesammelt. Von dort aus laufen die kleineren Moleküle deutlich schneller als die großen Moleküle weiter. Dies ermöglicht eine Erhöhung der Polymerdichte pro Flächeneinheit und damit eine Reduktion der Nachweisgrenze.

Vergleicht man die Banden **A**, **B**, und **C** der Abbildung miteinander, sieht man die relativ scharfe Bande **A** des linearen Polymers (**L8**) im oberen Teil des Gels, die Bande **B** des chemisch ähnlichen Sternpolymers (**S18**) an der Konzentrationsstufe: Trotz der um einen Faktor 1.5 erhöhten Masse verhält sich das Sternpolymer als wäre es kleiner (leichter) als das lineare Polymer – ein Befund der ebenfalls in der GPC zu beobachten ist. Die Bürstenpolymere **C** bis **E** zeigen zwei Banden: Die erste (obere) entspricht dem Bürstenpolymer mit sehr hohen Molmassen, während die zweite (untere) vom kurz-kettigen, linearen und monofunktionalen Anteil verursacht wird (siehe Abschnitt 5.8 für die Ursache), welcher aus linearem Poly(2-Methyloxazolin) besteht. Man sieht ebenfalls die unterschiedlichen Anteile der linearen Komponenten in Abhängigkeit vom verwendeten Makroinitiator: (**B5'**) (Bande **C**) ist ein Produkt von (**Mi80**), welches einen größeren Anteil der linearen Komponente zeigt als (**B6**) und (**B6'**), welche sich von (**Mi50**) ableiten.<sup>55</sup> Dieser erhöhte Anteil des linearen Poly(methyloxazolin)s erklärt möglicherweise auch den PDI von 1.7 bei (**B5'**) im Gegensatz zum PDI von 1.5 bei (**B6**) und (**B6'**) mit einem geringeren Anteil an linearem Poly(methyloxazolin).

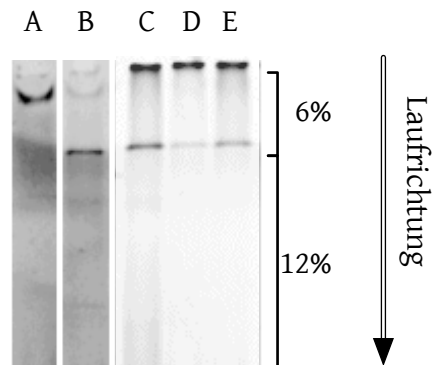
Nachteilig ist bei der Verwendung eines Stufengels zwar die Tatsache, daß bei der Akkumulation des Polymers an der Stufe jegliche Information über die Massenverteilung oder die relative elektrophoretische Mobilität in einem reinen Gel verloren geht. Wie man jedoch bei den Banden **A** und **B** gut sehen kann, ist die Information dieser Mobilität zwar abhängig von der Molmasse und der Form des Polymers, sie kann aber nicht für einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Polymerarchitekturen herangezogen werden.

**Reinigung der fluoreszenzmarkierten Polymere** Die oben gezeigten Gele wurden jeweils mit Reaktionsmischungen durchgeführt. Dabei waren noch recht große Mengen unreaktiertes TRITC im Ansatz vorhanden. Zur Reinigung der fluoreszenzmarkierten Polymere wurde nach 24 h Reaktionszeit das markierte Polymer über eine präparative Sephadex-Säule mit Methanol als Eluenten gereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und auf einem SDS-PAGE analysiert. Abbildung 5.33<sup>56</sup> zeigt exemplarisch die ersten zwei Fraktionen der Gelfiltration. Die erste Fraktion enthielt das markierte

---

<sup>55</sup>Siehe Tabelle 5.1 auf Seite 71 für Details zu den Makroinitiatoren bzw. Tabelle D.3 auf Seite 210 zu den Bürstenpolymeren

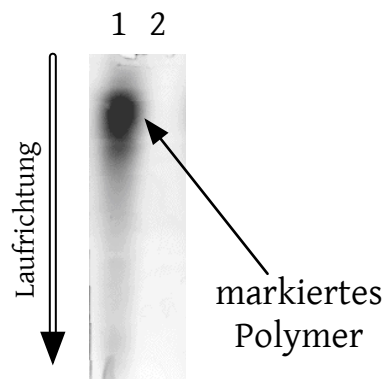
<sup>56</sup>Seite 102



**Abbildung 5.32:** SDS-PAGE mit Stufengelen; die Polymere sind mit TRITC markiert, Detektion unter Bestrahlung mit UV-Licht. Die Abbildung **C** entstammt demselben Gel wie **A** und **B** – jedoch eine Aufnahme mit geringerer Belichtungszeit.

*Aufgetragene Proben:*

Bande	Polymer	$\bar{M}_{\text{theor}}$	Probenmenge	
		g/mol	$\mu\text{g}$	nmol
<b>A</b>	<b>(L8)</b>	13 156	5.4	0.318
<b>B</b>	<b>(S17)</b>	17 704	1.5	0.079
<b>C</b>	<b>(B5')</b>	432 000	8.8	0.020
<b>D</b>	<b>(B6)</b>	279 555	1.7	0.006
<b>E</b>	<b>(B6')</b>	278 000	22.6	0.082



**Abbildung 5.33:** 10 % SDS-PAGE der Sephadex-Fractionen; Detektion im UV.

Polymer, die zweite Fraktion jedoch keinen fluoreszierenden Anteil mehr; der freie Farbstoff verblieb auf der Säule bzw. wurde teilweise erst sehr spät eluiert.

### 5.9.5 Vergleich der Methoden

Die oben geschilderten Ergebnisse zeigen, daß es grundsätzlich möglich ist, Poly(2-Oxazolin)e mit Hilfe der Gelelektrophorese zu analysieren. Die unterschiedlichen Polymere können nicht mit allen Färbemethoden gleichermassen sichtbar gemacht werden. Ebenso können nicht alle Geltypen mit allen Färbemethoden eingefärbt werden. Abschließend sollen die beschriebenen Befunde noch einmal zusammengefasst werden:

**Wahl der Trennmethode** Bei ungeladenen oder nur teilweise geladenen Poly(2-Oxazolin)en sind die Methoden mit einem Detergenz im Laufpuffer (SDS-AGE und SDS-PAGE) zu verwenden, während Poly(2-Oxazolin)e mit ausreichender Eigenladung auch mit nativen Methoden zur Wanderung im Gel gebracht werden können.

**Wahl des Detektionsmittels** Die Wahl des Detektionsmittels für die Banden im Gel ist abhängig von der chemischen Struktur des Polymers. Sind Aromaten im Polymer vorhanden, lassen sich größere Menge direkt mittels UV-Transillumination nachweisen. Die Färbung mit Coomassie-Blau gelingt nur bei unpolaren Polymeren oder Polymeren mit Aromaten, die Färbung mit Silber benötigt komplexbildende Gruppen wie  $\text{NH}_2$  oder  $\text{COOH}$ . Am empfindlichsten ist die kovalente Fluoreszenzmarkierung und konsekutive Detektion im UV-Licht, bei der z.B. Polymere über ein Amin mit dem Isothiocyanat des Fluoreszenzfarbstoffs Tetramethylrhodamin (TRITC) gekuppelt werden.



**Tabelle 5.4:** Vergleich der Methoden zur Detektion der Polymer-Banden im Gel.

Methode	minimale Probenmenge	Voraussetzung	
UV-Transillumination	10 mg	Aromaten	
Anfärbung mit Coomassie-Blau	500 $\mu\text{g}$	hydrophobe Regionen	nicht-kovalent
Anfärbung mit Silber	100 $\mu\text{g}$	Amine » COOH	
Fluoreszenzmarkierungen mit TRITC			
Detektion mit Vis	30 $\mu\text{g}$	Amin	kovalent
Detektion mit UV	< 1 $\mu\text{g}$		

Die Detektionsmethoden und ihre nachweisbaren Minimal-Probenmengen sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

**Gelmatrix** Die Wahl der Gelmatrix hängt von der Detektionsart ab: Agarose-Gele können nachträglich nicht mit Coomassie-Blau oder Silber eingefärbt werden, während Poly(acrylamid)-Gele keine Einschränkungen in Bezug auf die Detektion zeigen.

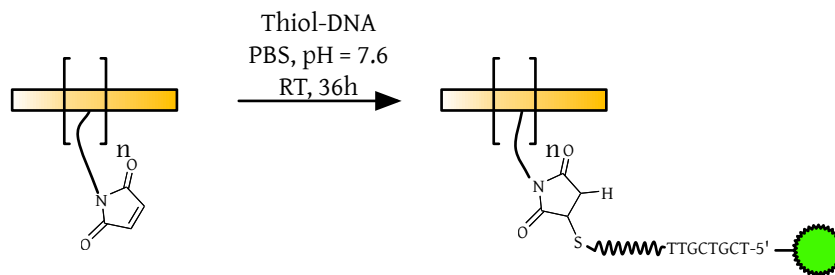
## 5.10 Kupplung von DNA an die Polymere

**Vorbemerkung** Wie schon in Abschnitt 5.3.5 angesprochen, gibt es mehrere Varianten zur Ankopplung von DNA an multifunktionelle Poly(2-Oxazolin)e. Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

**Nomenklatur der Oligonukleotide** Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 9.1 auf Seite 151 beschrieben. Generell ist das 5'-Ende am linken Ende des Namens, das 3'-Ende am rechten Ende genannt. Eine vorhandene funktionelle Gruppe ist als Summenformel geschrieben (z.B.  $\text{NH}_2$ ). Fluoreszenzmarkierungen sind als  $\star$  gekennzeichnet. *Beispiel:*  $\star$ -2006-SH kennzeichnet ein Oligonukleotid mit der Sequenz des CpG-Oligonukleotids 2006, welches am 5'-Ende eine Fluoreszenzmarkierung und am 3'-Ende eine Thiolgruppe trägt.

### 5.10.1 Reaktion einer Thiol-Gruppe mit einem Maleinimid

Die Reaktion eines Thiol-modifizierten Oligonukleotids mit einem Acryl- oder Maleinimid-Rest am Polymer kann als eine Art *Michael*-Addition an eine aktivierte Doppelbindung beschrieben werden. Die Reaktion ist in wässriger Lösung möglich. Die potentielle Konkurrenzreaktion durch Moleküle mit freien Amingruppen lässt sich durch Steuerung des pH-Werts der Lösung unterdrücken: bei  $\text{pH} = 7.0$  sind die  $\text{NH}_2$ - bzw.  $\text{NHR}$ -Gruppen protoniert, so daß die Nukleophilie der SH-Gruppe um das 1000fache höher ist.



**Abbildung 5.34:** Kupplung von Thiol-DNA an ein Polymer mit einer Acryl- bzw. einer Maleinimid-Funktion.

Erste Versuche zur Analytik von Kupplungsansätzen auf SDS-PAGE-Gelen führten verblüffenderweise zu leeren Gelen, auf denen in den jeweiligen Gelspuren weder Produkte noch Edukte zu erkennen waren. Durch Kontrollexperimente mit unreaktiver

DNA konnte nachgewiesen werden, daß die Kupplungsreaktion erfolgt sein musste, auch wenn auf den Poly(acrylamid)-Gelen keine Banden nachweisbar waren.

Erst der Wechsel zu den horizontalen Agarose-Gelen (Schematischer Aufbau siehe Abbildung 11.4<sup>57</sup>) ohne einen dazwischenliegenden Waschschrift führte zur Detektion der Produkte: Diese blieben in den Geltaschen liegen und wurden jeweils bei der Vorbereitung der Gele zur Detektion ausgewaschen. Im Fall der vertikalen Poly(acrylamid)-Gele (Schematischer Aufbau siehe Abbildung 11.3<sup>58</sup>) konnte ein Waschschrift nicht umgangen werden – womit das zu analysierende Material ausgewaschen wurde. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wird weiter unten gegeben.

### Reaktionsbedingungen

Die Reaktion ließ sich unter milden Bedingungen in PBS<sup>59</sup> bei Raumtemperatur durchführen. Nach 13 h wurden die Konjugate mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Der Erfolg dieser Vorgehensweise ist für drei Polymere in Abbildung 5.35<sup>60</sup> exemplarisch veranschaulicht.

**Tabelle 5.5:** Reaktionsansätze zur Kupplung des Oligonukleotids  $\star$ -2006-SH an endständige Maleinimid- oder Acrylat-Gruppen.

	Polymer	Maleinimid	$\star$ -2006-SH	Volumen $\mu$ l	Beladungsdichte %
<b>(S7)</b>				15	50
Äquivalente	1/4	1	0.5		
Stoffmenge/nmol	0.5	2	1		
Endkonzentration/ $\mu$ M	33	133	66		
<b>(B1)</b>				12.5	25
Äquivalente	1/80	1	0.25		
Stoffmenge/nmol	0.05	4	1		
Endkonzentration/ $\mu$ M	4	320	80		
<b>(B4)</b>				12.5	50
Äquivalente	1/80	1	0.5		
Stoffmenge/nmol	0.025	2	1		
Endkonzentration/ $\mu$ M	2	160	80		

<sup>57</sup>Seite 164

<sup>58</sup>Seite 162

<sup>59</sup>Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer

<sup>60</sup>Seite 107

## Ergebnisse

Die linke Bande **A** in Abbildung 5.35 zeigt die freie, FITC<sup>61</sup>-gelabelte DNA, die Banden **B** bis **D** zeigen Konjugate mit hohen Molmassen, die nicht in das Gel eingedrungen und in der Tasche verblieben sind. In keiner der drei Spuren konnte freie DNA mehr nachgewiesen werden. Damit verlief die Reaktion in allen Fällen quantitativ; die mittleren Beladungsdichten sind in der Tabelle oben angegeben: das Polymer (**S7**) trägt im Mittel je 2 DNA-Stränge, (**B1**) 20 und (**B3**) 40.

Die Polymerkonjugate **B** bis **D** sollten allerdings durchaus im elektrischen Feld migrieren; vor allem das, relativ gesehen, kleine Konjugat **D** sollte deutlich weiter im Gel laufen als die beiden ähnlichen Konjugate **B** und **C**. Aber offensichtlich migrierte keines der Konjugate im Gel. Diese Tatsache ist insofern verblüffend, als, wie in Abschnitt 5.9 gezeigt wurde, auch Polymere mit großen Molmassen und geringer Eigenladung grundsätzlich auf Agarose-Gelen aufgetrennt werden. Strukturanaloge Bürstenpolymere zu den hier verwendeten mit TRITC-Farbstoffmolekülen am Ende der Bürstenarme statt der DNA drangen in die Gelmatrix ein. Die hier analysierten Konjugate aus DNA und Polymer trugen allerdings eine pH-unabhängige Eigenladung durch die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats. Insofern wäre es durchaus zu erwarten, daß die Konjugate im elektrischen Feld wandern sollten. Eine kurze allgemeine Rechnung zeigt die theoretischen Ladungsmengen pro Konjugat-Molekül (siehe Tabelle 5.6 auf der nächsten Seite).

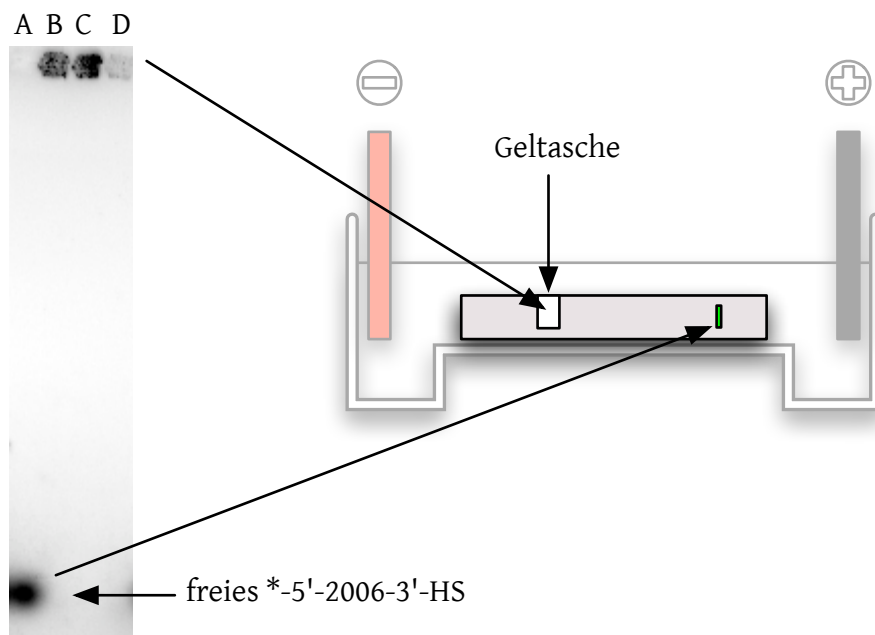
Man sieht, daß die Konjugate zwar eine beträchtliche Menge an negativer Ladung tragen, aber durch den Polyoxazolin-Teil einen großen, ungeladenen Massenanteil haben, welcher zu einer fast um den Faktor zwei erhöhten Molekulargewicht pro Ladung ( $\text{g/mol}/\ominus$ ) führt. Die Ladungsdichte bei ungeladenen Proteinen in einem SDS-Gel<sup>62</sup> ist mit  $385 \text{ g/mol}/\ominus$  im Schnitt ebenfalls deutlich geringer. Nachdem DNA und Protein-SDS-Aggregate im Regelfall ein konstantes Verhältnis aus Masse zu Ladung besitzen, wird dort angenommen, daß die Trennung grundsätzlich nur nach der Länge bzw. Größe des Moleküls erfolgt, modifiziert um einen Faktor, welcher sich aus der Form des Moleküls ableitet.

Liegt diese Beobachtung darin begründet, daß das Masse/Ladungs-Verhältnis der Konjugate so groß ist? Es wäre zu erwarten, daß diese Polymere, trotz einer geringeren

---

<sup>61</sup>Fluorescein-isothiocyanat

<sup>62</sup>Man geht davon aus, daß im Mittel 1.4 g SDS an 1.0 g Protein binden.

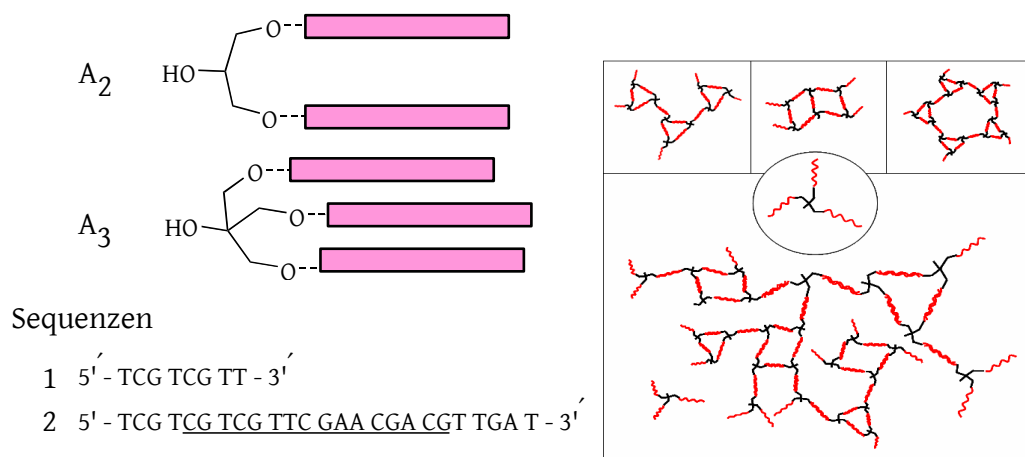


**Abbildung 5.35:** AGE von Reaktionsansätzen mit Maleinimid- und Acrylat-funktionalisierten Polymeren und Thiol-DNA. Die genauen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 5.5 auf Seite 105 aufgelistet. Die verwendete DNA war am 5'-Ende FITC-gelabelt und trug am 3'-Ende eine SH-Gruppe. Detektiert wurde unter Bestrahlung mit UV-Licht: Sichtbare Banden leuchteten gelbgrün! Das Gel enthielt 1 % Agarose

- A Kontrolle:  $\star$ -2006-HS
- B DNA (B4) mit Acrylat-Endgruppen
- C DNA (B1) mit Maleinimid-Endgruppen
- D DNA (S7)

**Tabelle 5.6:** Masse/Ladungs-Verhältnis der DNA-Polymer-Konjugate aus Abbildung 5.35

Bande	$\bar{M}_{\text{theor}}$	äq. DNA	Ladung	Masse/Ladung
	$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$			
A	8110	1	$\equiv$ 24	337
B	604 400	40	$\equiv$ 960	629
C	312 200	20	$\equiv$ 480	650
D	30 020	2	$\equiv$ 48	625
Protein+SDS	120+265		$\equiv$ 1	385



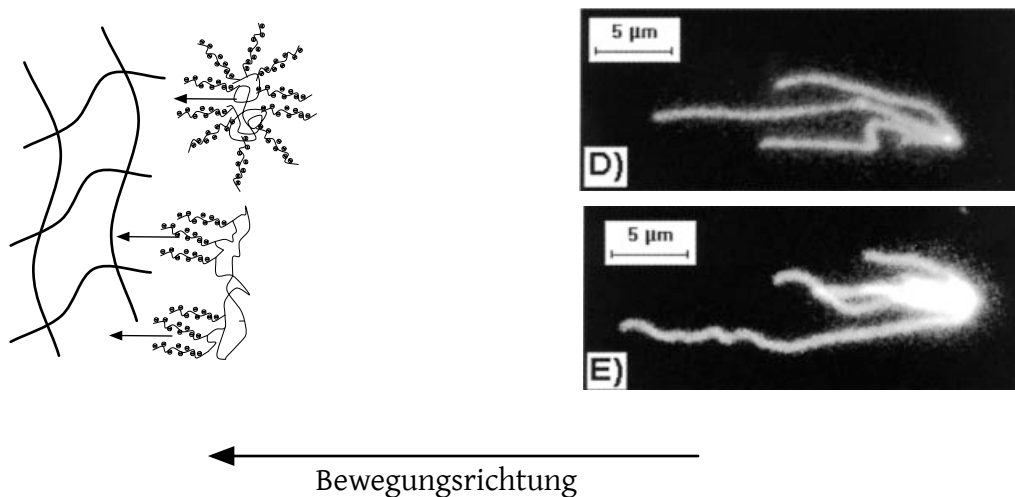
**Abbildung 5.36:** Trivalente Linker von C. Richter[55]. Die verwendeten DNA-Sequenzen sind ebenfalls gezeigt. Sequenz 1 entspricht dem humanen Minimalmotiv, Sequenz 2 entspricht einem typischen CpG-Oligonukleotid des Typus C, das Palindrom ist unterstrichen. Die trivalenten DNA-Konstrukte mit Sequenz 2 oligomerisieren durch Hybridisierung der Palindrome. Mögliche Strukturen sind im rechten Teil der Abbildung dargestellt.

Eigenladung im Gel wandern sollten – nur langsamer als Teilchen mit einem geringeren Masse/Ladungs-Verhältnis.

Ein vergleichbares Experiment, welches Antworten auf diese Frage liefern könnte, wurde von einem Kooperationspartner an der LMU durchgeführt. **C. Richter** analysierte hochverzweigte DNA-Konstrukte bestehend aus trivalenten DNA-Sequenzen mit in den Sequenzen enthaltenen Palindromen; diese Konstrukte sind formal  $A_3$ -Monomere, bei denen jedes A durch seine Palindromsequenz an eine weiteres A durch Hybridisierung binden kann (siehe Abbildung 5.36<sup>63</sup>). Folglich entstehen in Lösung hochverzweigte Strukturen hoher Molmassen. Analysiert sie diese Konstrukte, stellt sie fest, daß diese ebenfalls kaum in die Gelmatrix eindringen, während die linearen Konjugate aus  $A_2$ -Monomeren zwar zu hochmolekularen Strukturen führen, aber ins Gel eindringen.[55]

Diese DNA-Konjugate haben allerdings das für DNA übliche Masse/Ladungs-Verhältnis, somit ist wahrscheinlich der dreidimensionale Charakter der Konjugate bzw. ihr hydrodynamisches Volumen für den Effekt verantwortlich. Im Vergleich zur linearen

<sup>63</sup>Seite 108



**Abbildung 5.37:** Schematische Darstellung des Verhaltens von DNA-Bürsten oder -Sternen im elektrischen Feld.

*Links* schematische Darstellung für die DNA-Polymer-Konjugate.

*Rechts* Aufnahmen von sehr großen fluoreszenzmarkierten DNA-Sternen.[147]

DNA, welche, so wird postuliert, in einer schlängelnden Bewegung durch die Gelmatrix wandert, sind diese hochverzweigten DNA-Konjugate ebenso wie die DNA-Polymer-Konjugate dieser Arbeit deutlich größer und weniger flexibel in ihrer Struktur und zeigen daher eine erhöhte Reibung in der Gelmatrix.

Zusätzlich könnte ein Effekt auftreten, wie er von **D. Heuer** bei artifiziiellen vierarmigen DNA-Sternen beschrieben ist:[147] diese Sterne richten sich mit ihren Armen in Feldrichtung aus und wandern dann mit ihren Armen voran ins Gel. Die Arme schlängeln sich dabei analog zu linearer DNA voran bis das Konstrukt sich in den Gelmaschen verhängt. Ein ähnlicher Effekt könnte auch bei den büstenartigen Strukturen, welche durch das Anknüpfen der DNA an die Polymere entstehen, auftreten. Diese Hypothese ist in Abbildung 5.37<sup>64</sup> dargestellt.

Eine zweite Ursache könnte das hydrodynamische Volumen der DNA-Polymer-Konjugate sein: Jede DNA-Kette ist mit ihren 24 Basen im ausgestreckten Zustand etwa 15 nm lang (grobe Schätzung mit 0.7 nm Entfernung von Phosphat zu Phosphat). Da die Phosphat-Gruppen ( $pK_s = 2.1$ ) in wässriger Lösung auch deprotoniert sind, ist anzunehmen, daß hier bei der Konjugation büstenförmige Polyanionen entstehen,

<sup>64</sup>Seite 109

deren Arme recht starr vom Polymer wegweisen. Dadurch resultiert ein verhältnismäßig großer hydrodynamischer Durchmesser für Moleküle gleicher Masse.

**Tabelle 5.7:** Effektive Porengrößen in Gelen für die Elektrophorese.[148]

AGE			PAGE		Die angegebenen Werte wurden aus der
Konz	PS <sup>a</sup>	DNA <sup>b</sup>	Konz.	DNA <sup>b</sup>	
%	nm	nm	%	nm	
0.5	100	200	5	100	Extrapolation eines <i>Ferguson-Plots</i> erhalten.
1	70	150	10	19	
4	27	69	15	5.5	

<sup>a</sup>bestimmt für Poly(styrol)-Nanopartikeln [149]

<sup>b</sup>bestimmt für lineare DNA [150]

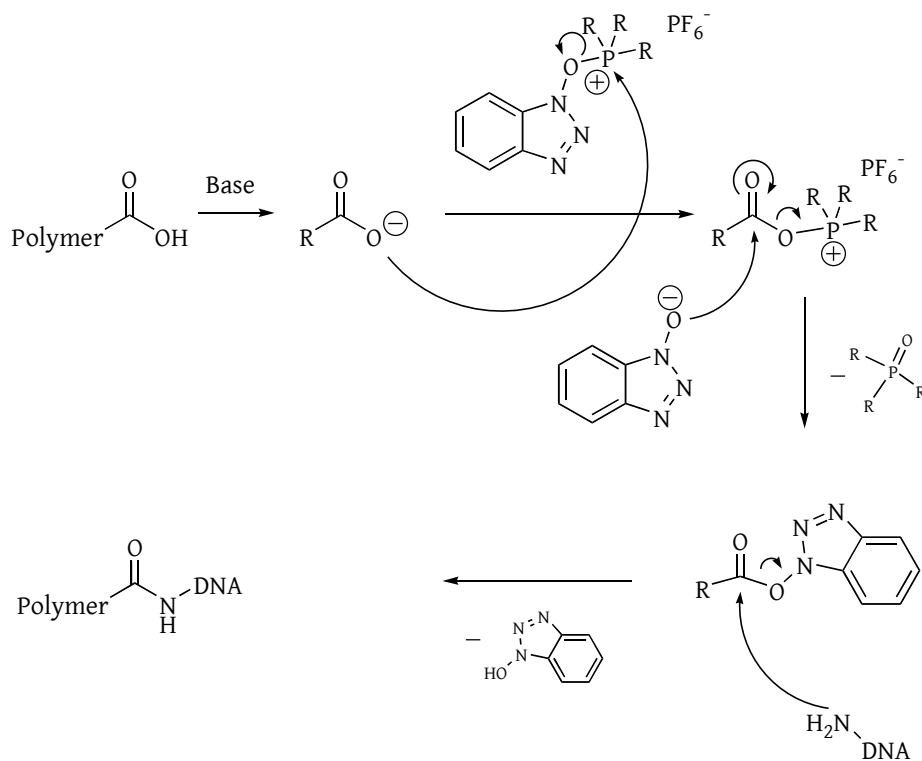
Die in der Literatur angegebenen Porengrößen für Agarose- bzw. Poly(acrylamid)-Gele sind in 5.7 aufgelistet. Man sieht deutlich, daß ein Wechsel des Mechanismus von einer schlängelnden Bewegung durch das Gel – wie sie bei linearer DNA postuliert wird – hin zu einem Sieb-Effekt – wie er wohl bei den Poly(styrol)-Nanopartikeln vorliegt – zu drastischen Veränderungen in der Migration im Gel führen muss, wie die gezeigten Experimente auch belegen. Der vorliegende Mechanismus bei den Polymeren und den DNA-Polymer-Konjugaten ist demnach wohl ein Sieben durch die Gelmatrix. Die Porengröße von 70 nm in 1%igen Agarose-Gelen scheint dann wohl in der Größenordnung der DNA-Polymer-Konjugate zu liegen, was ihr Nichteindringen in die Gelmatrix erklären könnte.

Aufgrund dieser Phänomene erschien es nicht möglich, die DNA-Polymer-Konjugate in dem zur Verfügung stehenden Gelsystem zu analysieren. Deshalb wurde bei der weiteren Charakterisierung versucht, mit Hilfe der chromatographischen Verfahren im Mikromaßstab zu arbeiten.

### 5.10.2 Reaktion einer Carbonsäure- mit einer Amino-Gruppe

Die zweite zur Verfügung stehende Funktionalisierungsvariante der Oligonukleotide am 3'-Ende war ein primäres Amin, welches über einen C<sub>7</sub>-Spacer am Oligonukleotid angebracht war. Die Carbonsäuregruppen waren als Seitenkettenfunktionalisierung bei sowohl den linearen als auch bei den Sternpolymeren angebracht. Zur Aktivierung der





**Abbildung 5.38:** Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Carboxylgruppen-Aktivierung mit Kupplungsreagenzien der BOP-Familie.

Carboxylgruppen wurden übliche Kupplungsreagenzien wie BOP, PyBOP, HATU oder DCC verwendet.

Da, wie in Abschnitt 5.10.1 gezeigt, die Gelelektrophorese als analytische Methode zwar einsetzbar war, aber nicht zu weiteren Strukturinformationen führte, wurden die Konjugate im Fall der Peptidkupplung mit Hilfe von HPLC und wässriger GPC untersucht.

### Kupplungsreagenzien

Zur Reaktion eines primären Amins mit einer Carbonsäure werden in der Regel sogenannte Kupplungsreagenzien eingesetzt, mit denen die Carboxylgruppe zu einer aktivierten Spezies wird, welche dann in einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus mit dem Amin reagiert. Dies ist in Abbildung 5.38<sup>65</sup> für die Kupplungsreagenzien der BOP-Familie schematisch dargestellt.

<sup>65</sup>Seite 111

### Reaktionsbedingungen

Die Kupplungen der aminofunktionalisierten DNA mit den Carboxylgruppen des Polymers (**L8**) wurde bei Raumtemperatur in wasserfreiem DMF oder DMSO durchgeführt. Dabei wurden je 0.87 Äquivalente des Kupplungsreagenzes BOP und der DNA mit einem Äquivalent COOH-Gruppen umgesetzt (siehe Tabelle 5.8). Die Reaktion wurde mittels einer *Reverse Phase*-Chromatographie kinetisch verfolgt (5.10.2)

**Tabelle 5.8:** Reaktionsansatz zur Kupplung von 2006-NH<sub>2</sub> an die Carboxylgruppen des Polymers (**L8**); Reaktionsmedium war wasserfreies DMF.

	Polymer	COOH	2006-NH <sub>2</sub>	BOP	Volumen μl
( <b>L8</b> )					44.3
Äquivalente	1/60	1	0.87	0.87	
Stoffmenge/nmol	0.077	4.6	4	4	
Endkonzentration/μM	1.73	103	90	90	

### Analytik mittels HPLC

Die chromatographische Trennung auf einer C<sub>18</sub>-Umkehrphasen-Säule erfolgte mit einem Gemisch von Wasser und Acetonitril; detektiert wurde mit einem UV-Detektor, welcher bei einer Wellenlänge von 254 nm arbeitete. Das Gradientenprogramm verlief dabei so, daß nach der Injektion (V = 0 mL) zuerst 10 mL reines Wasser und dann während 30 mL ein linearer Gradient bis hin zu 30 % (v/v) Acetonitril über 30 mL angewandt wurde. Die Substanzen wurden somit nach ihrer Polarität getrennt; hydrophile Stoffe eluieren zuerst und hydrophobe Stoffe später.

In Abbildung 5.40<sup>66</sup> finden sich die Elugramme der zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben des oben genannten Reaktionsansatzes. Dazu wurden je 10 μL des Ansatzes mit 190 μL Wasser verdünnt und manuell in die HPLC-Anlage injiziert.<sup>67</sup>

Man sieht, wie im Lauf der Reaktion das BOP in HOBt umgewandelt wurde. Parallel dazu entstand ein breites Signal, welches dem Polymer-HOBt-Ester entsprechen könnte, der durch die Reaktion mit dem Kupplungsreagenz BOP zu einer UV-absorbierenden Spezies wird. Da der Massenanteil des Polymers unter 5 % des Reaktionsansatzes lag (siehe auch obige Tabelle) ist das Polymer selbst nicht im Elugramm sichtbar – seine

<sup>66</sup>Seite 115

<sup>67</sup>Die kleinste Probenschleife der HPLC-Anlage hatte ein Volumen von 150 μl; beim Ansetzen der Spritze auf die Einspritzvorrichtung entstand zusätzlich ein Totvolumen von 50 μl.

Absorption im UV nimmt allerdings mit der fortschreitenden Reaktion zu: nicht nur der Aktivester absorbiert im UV, sondern vor allem das Produkt der Kupplung mit der DNA ist stark UV-aktiv. Der breite Peak, welcher im Lauf der Reaktion entsteht, könnte das entstehende DNA-Polymer-Konjugat sein, welches im Lauf der Zeit mit weiteren DNA-Molekülen reagiert: Die Verschiebung des Peaks in Richtung geringerer Elutionsvolumina deutet darauf hin, daß die betreffende Spezies polarer wird, was ausschließlich für die DNA-Konjugate zutrifft.

Nach einer Woche Reaktionszeit entstand ein deutlicher zweiter hydrophiler Peak zwischen dem Peak der freien DNA und dem Peak des Reaktionsmediums, welcher möglicherweise dem Produkt zuzuordnen ist. Beide Peaks sind noch im Bereich der isochratischen Elution mit Wasser und damit vor dem Wasser/Acetonitril-Gradienten. Darüberhinaus ist der breite Peak bei 18 ml Elutionsvolumen verschwunden. Der verbleibende DNA-Peak war noch vorhanden und hatte in seiner Intensität abgenommen – ein weiteres Zeichen für eine Reaktion der DNA zu einem DNA-Polymer-Konjugat; allerdings auch ein deutliches Indiz für eine nur unvollständig verlaufene Reaktion.

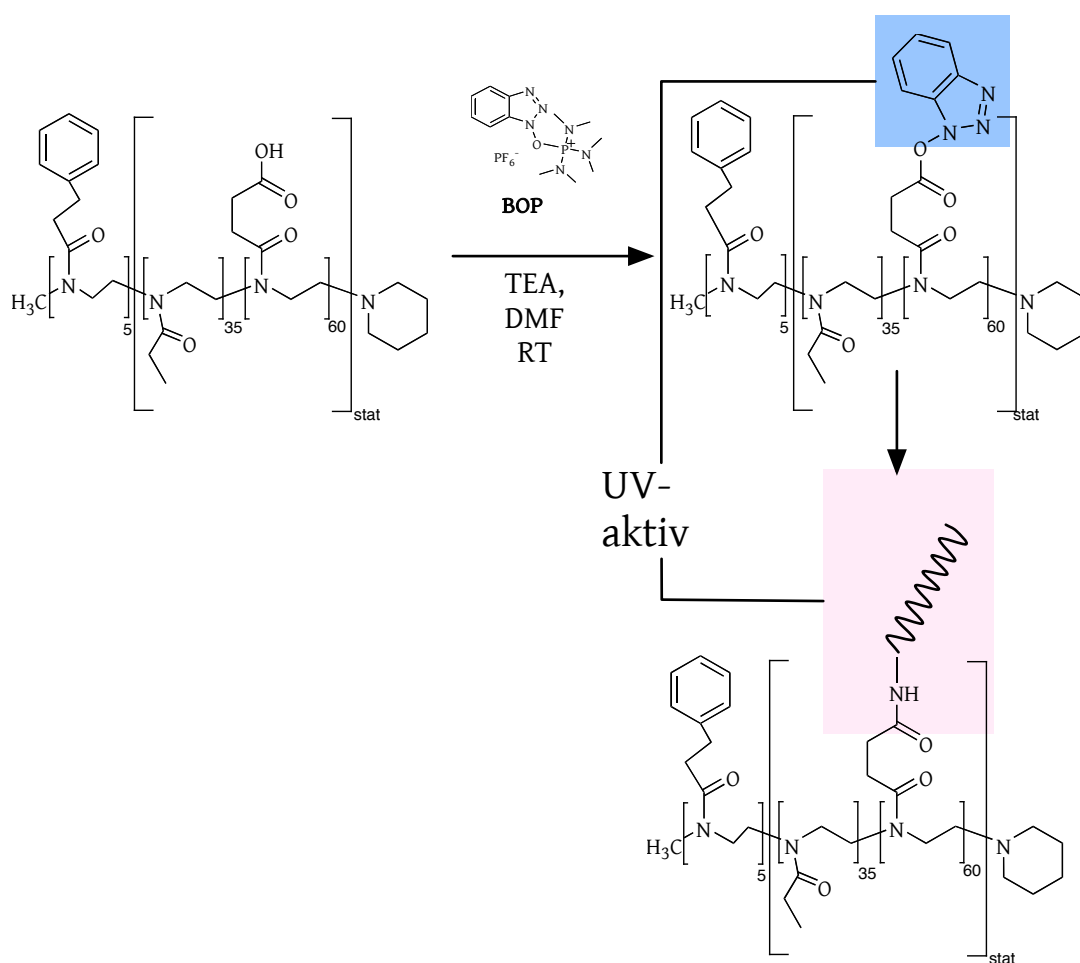
### Analytik mittels GPC

Wegen der großen DNA-Mengen, die für Untersuchungen mit der vorhandenen Säule für die RP-HPLC nötig waren, und der begrenzten Aussage über den Produktpeak wurden keine weiteren Experimente mit der RP-HPLC unternommen. Aufgrund der Hinweise aus der HPLC-Analytik auf den Erfolg der Kupplung wurde eine weitere Analysenmethode gesucht, welche bessere Aussagen über die entstandene Verbindung treffen konnte. Die Wahl fiel auf eine Größenausschlußchromatographie (SEC<sup>68</sup>), welche – da ohne geeignete Kalibrationsstandards durchgeführt – zumindest qualitative Aussagen über die Größe des entstehenden Konjugats liefern sollte. In Anbetracht der Tatsache, daß die beteiligten Makromoleküle als Anionen vorliegen und in Wasser gut löslich waren, wurde eine SEC in Wasser durchgeführt. Die hierbei verwendete Säule (PL Rapide/OH) wurde von *Polymer Laboratories* zur Verfügung gestellt. Das gewählte Modell hat ein Säulenvolumen von 6 mL und wird normalerweise im High-Throughput-Verfahren angewandt; der Trennbereich der Säule wird für Pullulane<sup>69</sup> bis 20 000 kDa angegeben.

---

<sup>68</sup>Size Exclusion Chromatography

<sup>69</sup>Pullulan ist ein Polysaccharid, welches aus Hefe hergestellt wird. Es wird in Japan seit mehr als 20 Jahren als Lebensmittelbestandteil verwendet.



**Abbildung 5.39:** Schema der Kupplung von DNA mit BOP als Kupplungsreagenz am Beispiel des linearen Polymers (**L8**) mit etwa 60 COOH-Gruppen. Die Reaktionsbedingungen sind im Text erläutert.

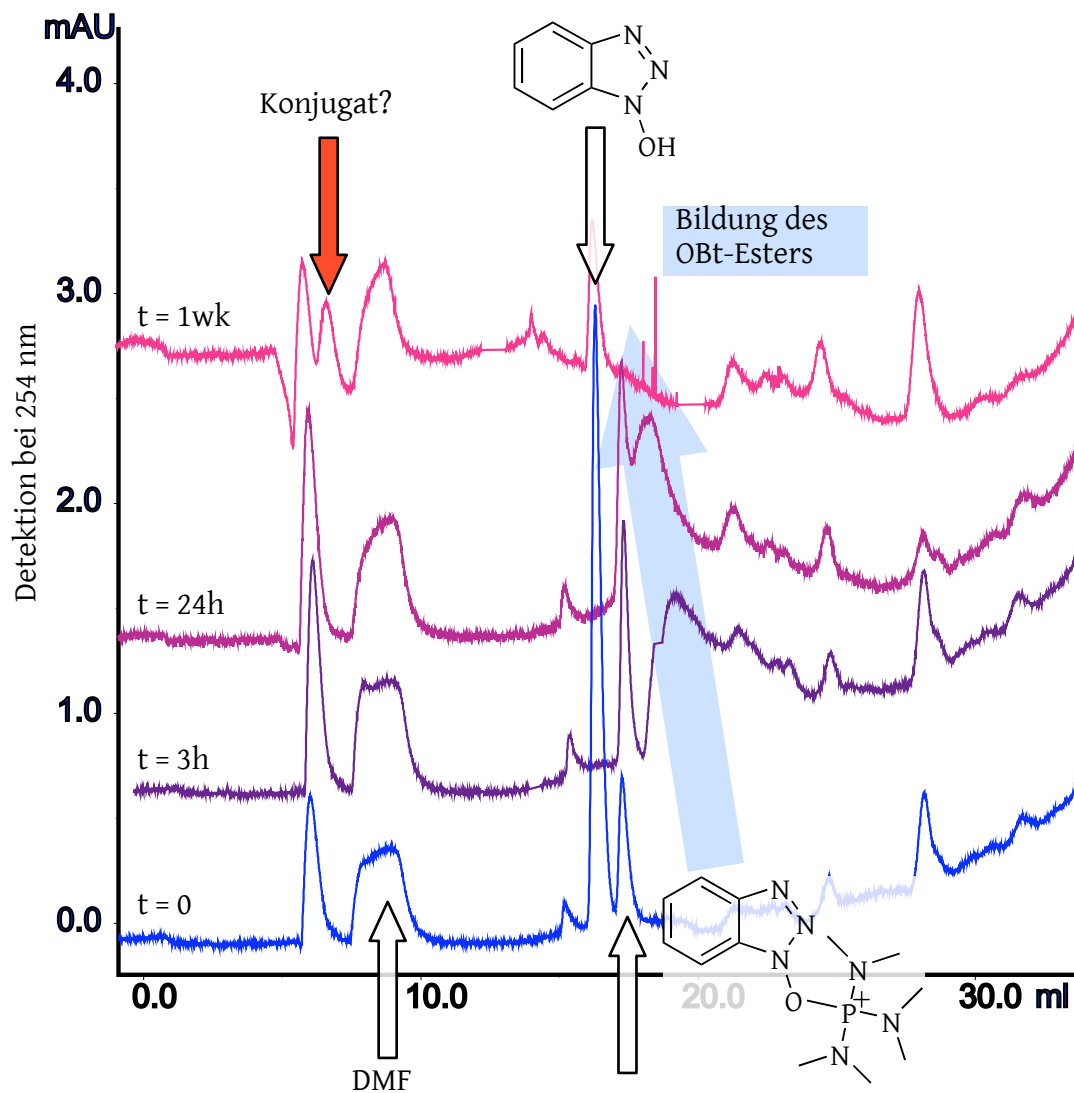
Die Analytik mit dieser Säule wurde bei Dr. Eppinger in der Anorganischen Chemie der TUM<sup>70</sup> auf einer HP<sup>71</sup> Chemstation<sup>72</sup> mit einem DAD<sup>73</sup> durchgeführt. Dadurch war es möglich, direkt eine Menge von 2  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes zu analysieren, statt wie im Fall der HPLC auf der Äkta-Anlage diese Reaktionsansätze auf 200  $\mu\text{l}$

<sup>70</sup>Technische Universität München

<sup>71</sup>Hewlett Packard

<sup>72</sup>Alte Produktbezeichnung, die Geräte werden heute von Agilent vertrieben

<sup>73</sup>Dioden-Array-Detektor



**Abbildung 5.40:** Zeitlicher Verlauf der Kupplung von DNA mit BOP als Kupplungsreagenz.

Gezeigt sind die Elugramme von verschiedenen Reaktionszeitpunkten, analysiert mittels RP-Chromatographie auf einer  $C_{18}$ -Säule. Die Reaktionsbedingungen der analysierten Probe sind im Text erläutert und in Tabelle 5.8 auf Seite 112 zusammengefasst.

Verwendete Säule: *Polymer Laboratories* PLRP-S 1000.

Eluent: Linearer Gradient von *dd*- $H_2O$  bis 30% Acetonitril. Detektion bei 254 nm.

## 5 Ergebnisse & Diskussion

zu verdünnen. Dadurch konnte eine bessere Peak-Auflösung und Trennung erreicht werden.

Es stellte sich heraus, daß eine Detektion bei Wellenlängen im Bereich um 220 nm nicht möglich war, da das im Reaktionsansatz vorhandene DMSO hier eine deutliche Störung verursachte. Wie schon im Fall der HPLC wurde deshalb im aromatischen Bereich detektiert. Aufgrund der großen Flexibilität des DAD konnte bei 260 nm gemessen werden. Diese Wellenlänge wird in der Detektion von DNA verwendet und ermöglichte damit nicht nur den Nachweis der DNA-enthaltenden Fraktionen, sondern auch des polymeren Edukts.

Die Reaktionsbedingungen für diese Kupplung wurden analog den in Abschnitt 5.10.2 genannten gewählt. Die einzelnen Reaktionskomponenten wurden jeweils in wasserfreiem DMF gelöst, vermischt und bei Raumtemperatur eine Woche inkubiert. Die genauen Mengen sind in der folgenden Tabelle 5.9 aufgelistet.

**Tabelle 5.9:** Reaktionsansatz zur Kupplung von 2006-NH<sub>2</sub> an die Carboxylgruppen verschiedener Polymere mittels verschiedener Kupplungsreagenzien; Reaktionsmedium war wasserfreies DMF.

	Polymer	COOH	2006-NH <sub>2</sub>	Kupplungsreagenz		Base	Volumen μl
<b>(S8)</b>				DCC	HOBT <sup>a</sup>	TEA <sup>b</sup>	17.2
Äquivalente	1/60	1	1	1	0.1	1	
Stoffmenge/nmol	0.017	1.02	1	1	0.1	1	
Endkonzentration/μM	0.971	58	58	58	5.8	58	
<b>(S18)</b>				HATU		TEA	16.1
Äquivalente	1/120	1	1	1		1	
Stoffmenge/nmol	0.008	1	1	1		1	
Endkonzentration/μM	0.971	62	62	62		58.25	
<b>(L8)</b>				BOP		TEA	16.1
Äquivalente	1/60	1	1	1		1	
Stoffmenge/nmol	0.017	1	1	1		1	
Endkonzentration/μM	1.058	62	62	62		58.25	
<b>(L8)</b>				HATU		TEA	16.1
Äquivalente	1/60	1	1	1		1	
Stoffmenge/nmol	0.017	1	1	1		1	
Endkonzentration/μM	1.058	62	62	62		58.25	

<sup>a</sup>1-Hydroxy-1H-Benzotriazol

<sup>b</sup>Triethylamin

## 5.10 Kupplung von DNA an die Polymere

Diese Ansätze wurden in der SEC analysiert. Dabei wurde als Fließmittel ein 50 mM Phosphat-Puffer bei pH = 7.0 mit 1 M NaCl verwendet, welcher vor dem Gebrauch entgast und mit einem Sterilfilter (Porengröße 0.22  $\mu\text{m}$ ) von partikulären Verunreinigungen befreit wurde.

Die Elutionszeiten der Peaks der vier gemessenen Ansätze sind in Tabelle 5.10 aufgeführt. Bei allen Ansätzen konnte ein neuer Peak beobachtet werden, welcher zu geringeren Elutionsvolumina verschoben war. Allerdings zeigten die verschiedenen Ansätze unterschiedliche Kupplungseffizienzen: Die besten Ergebnisse konnten mit dem Kupplungsreagenz HATU erreicht werden, wobei die Hauptkomponente des Reaktionsansatzes nach einer Woche das Produkt war; der Versuch mit BOP zeigte einen Umsatz von etwa 50 %, während der Ansatz mit dem Carbodiimid DCC nur zu einer geringeren (etwa 30 %) Ausbeute des Produktes führte.

**Tabelle 5.10:** Liste der Elutionszeiten der gefundenen Peaks in der SEC der Reaktionsansätze aus Tabelle 5.9 auf der vorherigen Seite. Die Hauptpeaks sind jeweils unterstrichen.

Verwendete Säule: *Polymer Laboratories* PL Rapide Aqua OH.

Eluent: 50 mM Phosphat-Puffer pH = 7.0 + 1.0 M NaCl. Detektion bei 260 nm.

Polymer	Kupplungsreagenz	Produktpeak $V_{el}$	Weitere Peaks $V_{el}$
		mL	mL
(S8)	DCC & HOBT	4.579 <sup>a</sup>	<u>4.908</u> <sup>b</sup>
(S18) <sup>c</sup>	HATU	<u>4.185</u> <sup>b</sup>	4.903 <sup>a</sup>
(L8)	HATU	<u>4.455</u> <sup>b</sup>	4.881 <sup>a</sup>
(L8)	BOP	4.512 <sup>a</sup>	<u>4.836</u> <sup>b</sup>

<sup>a</sup>kleinerer Nebenpeak

<sup>b</sup>Hauptpeak

<sup>c</sup>Das Elugramm dieses Experiments ist in Abbildung 5.42 dargestellt.

Abbildung 5.42<sup>74</sup> zeigt die Elutionsspektren des Reaktionsansatzes mit dem Polymer (S18) und dem Kupplungsreagenz HATU, sowie Spektren der beiden makromolekularen Edukte. Die Kurve des Reaktionsansatzes ist rot dargestellt und zeigt eine deutliche Verschiebung hin zu größeren Teilchen; Sie enthält allerdings auch noch in kleinen Mengen unreaktierte DNA (Referenzkurve grün) sowie Polymer (Referenzkurve blau). Die Referenzkurve des Polymers ist in einer 50fach höheren Konzentration aufgenommen und dargestellt, da bei derselben Konzentration wie sie im Reaktionsansatz vorliegt,

<sup>74</sup>Seite 120

nur eine schlechte Detektion möglich war; die Kurve der DNA entstammt einer Lösung derselben Konzentration wie sie im Reaktionsansatz gegeben war.

Da für die Kalibrierung der SEC keine Standard-DNA-Polymerkonjugate oder sternförmige Polymere zur Verfügung standen, wurde ohne Standards gearbeitet. Daher war über die tatsächlich vorliegenden Molmassen keine Aussage möglich. Um die entstandenen DNA-Polymer-Konjugate qualitativ einordnen zu können, wurden DNA-Längenstandards bestehend aus dsDNA für die Gelelektrophorese in der SEC analysiert; die gemessenen Elutionsvolumina sind in Abbildung 5.41<sup>75</sup> dargestellt. Dabei wurden zwei unterschiedliche kommerzielle Mischungen von Längenstandards verwendet (GeneRuler und FastRuler). Inwiefern diese Resultate eine treffende Aussage über die DNA-Polymerkonjugate geben können ist nicht klar – insbesondere da die DNA-Standards als dsDNA in einer recht stabilen Stäbchenform vorliegen, während die Konjugate büstenförmig und unter Annahme elektrostatischer Abstoßung eher als globuläre Teilchen zu sehen sind.

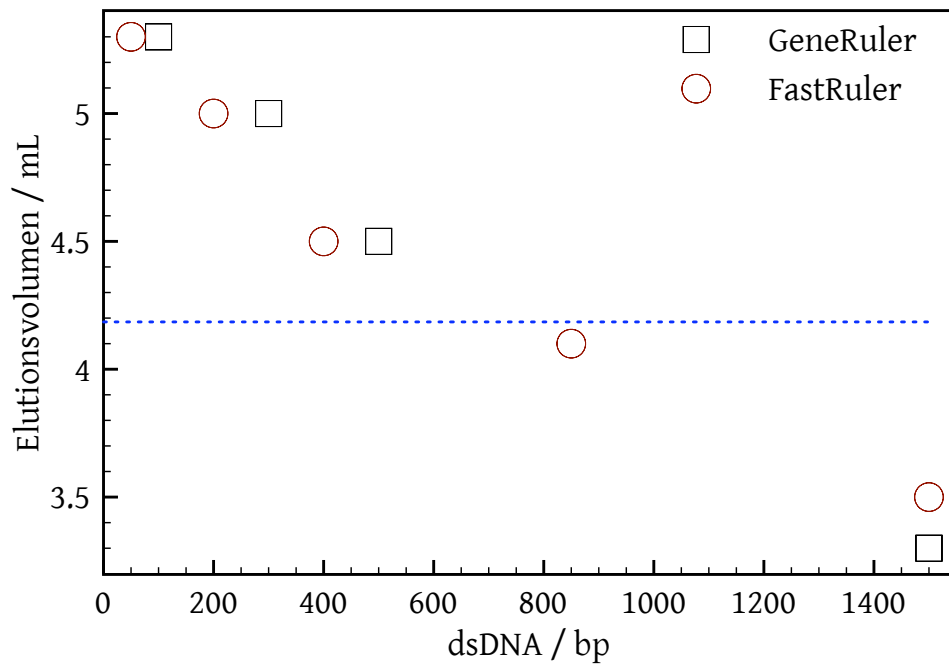
Weitere Elutionsvolumina als Referenzen sind in Tabelle D.5 auf Seite 211 angegeben.

Das Elutionsvolumen von 4.185 mL des in Abbildung 5.42 gezeigten Produktpeaks entspricht einem linearen dsDNA-Strang mit einer Länge von etwa 800 Basenpaaren. Unter der Annahme, daß sich das DNA-Polymer-Konjugat ähnlich knäuelte wie die lineare DNA, entspräche dies dem  $(800 \cdot 2) / 24 = 66.7$ fachen des Oligonukleotids 2006-NH<sub>2</sub>; dieser Wert entspricht in etwa dem erwarteten Beladungsgrad des Polymers: das Polymer hat theoretisch im Mittel 120 COOH-Gruppen, welche nicht komplett umgesetzt wurden, was aus dem verbleibenden Peak bei 4.903 mL zu schließen ist.

---

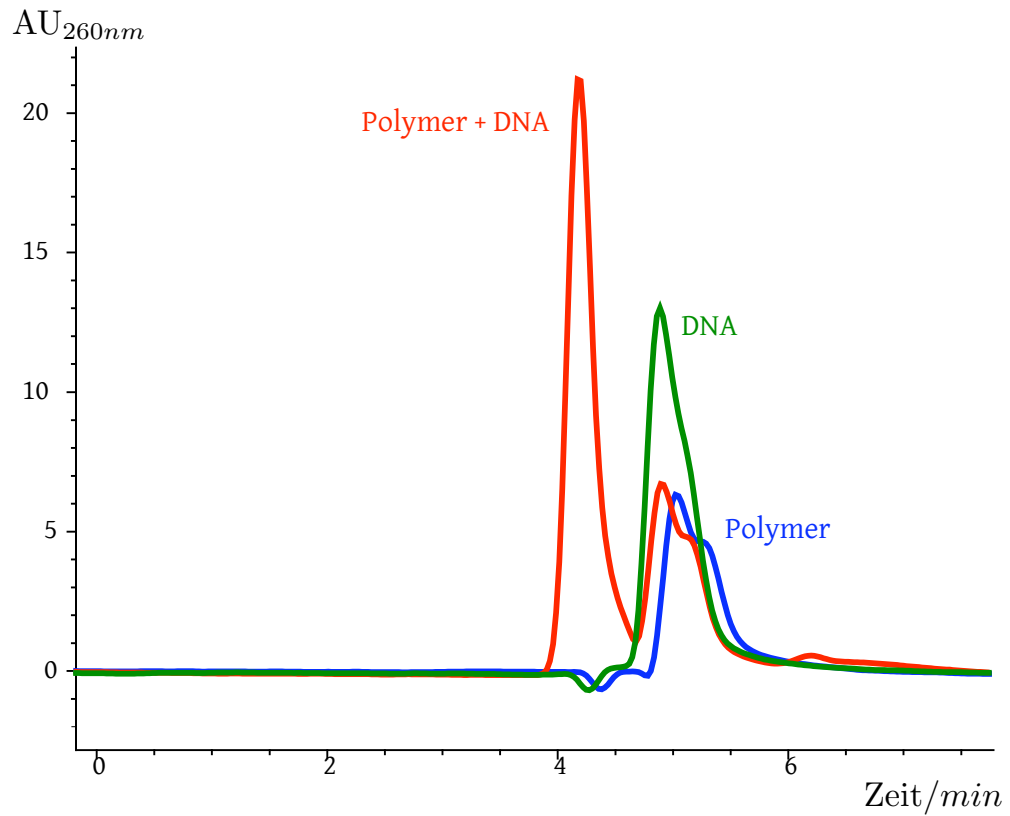
<sup>75</sup>Seite 119





**Abbildung 5.41:** Plot der Elutionszeiten zweier DNA-Standards für die Gelelektrophorese (bestehend aus dsDNA). Die horizontale blaue Linie entspricht der Elutionszeit, die zu den in Abbildung 5.42<sup>a</sup> gezeigten Produktpeaks gehört. Verwendete Säule: *Polymer Laboratories* PL Rapide Aqua OH. Eluent: 50 mM Phosphat-Puffer pH = 7.0 + 1.0 M NaCl. Detektion bei 260 nm.

<sup>a</sup>Seite 120



**Abbildung 5.42:** Vierarmiges Sternpolymer (**S18**) mit etwa 120 COOH-Gruppen. Reaktion mit 1 eq. HATU, 1 eq. DNA; Lösemittel DMSO/DMF; 7 Tage bei Raumtemperatur.

Verwendete Säule: *Polymer Laboratories* PL Rapide Aqua OH.

Eluent: 50 mM Phosphat-Puffer pH = 7.0 + 1.0 M NaCl. Detektion bei 260 nm.

### 5.10.3 Präparative Reinigung der Konjugate

Die präparative Reinigung der Konjugate war auch mit technologisch weniger anspruchsvollen Methoden als einer Hochdruckchromatographie möglich. Teil der Aufgabenstellung war es, Methoden zu finden, mit denen unter den Bedingungen des Kooperationspartners am Universitätsklinikum der Uni München Konjugate hergestellt werden konnten. Die bisher gezeigten Ergebnisse demonstrieren eindeutig, daß mit relativ einfachen präparativen Bedingungen DNA-Polymer-Konjugate hergestellt werden konnten, wenn auch deren Charakterisierung nicht so einfach möglich war.

Eine einfache Methode zur Abtrennung der freien DNA sowie jeglicher niedermolekularer Anteile war die Gelfiltration. Diese konnte präparativ einfach durchgeführt werden: die Öffnung einer Plastikspritze oder einer Pasteurpipette wurde mit einem kleinen Bällchen Glaswolle oder Papier blockiert, und diese Minisäule mit in Methanol oder Wasser gequollenem Sephadex- oder Superdex-Gel befüllt. Diese Gelfiltrationssäulenmaterialien sind in verschiedenen Porengrößen erhältlich. Die Säule wurde wie eine übliche Säule für die Chromatographie bepackt; dabei war zu beachten, daß das Säulenvolumen das zehnfache bis zwanzigfache der Probenmenge betrug. Die chromatographische Trennung konnte mithilfe der Schwerkraft oder in der Zentrifuge erfolgen.

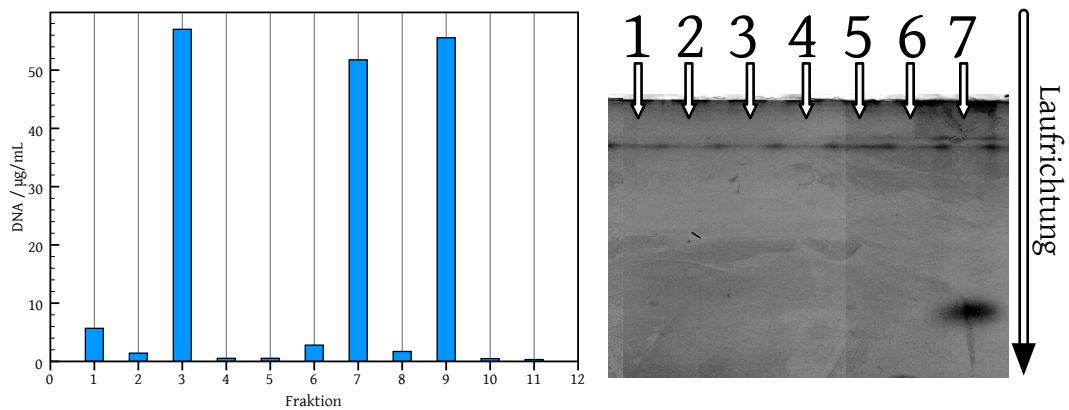
Mit dieser Methode gelang es, ein DNA-Polymer-Konjugat zu reinigen, d.h. von freier DNA und Kupplungsreagenz zu trennen.

Die Komponenten des Reaktionsansatzes, dessen Reinigung im Folgenden beschrieben ist, sind in der folgenden Tabelle genannt:

**Tabelle 5.11:** Reaktionsansatz für die Gelfiltration.

	Polymer	COOH	2006-NH <sub>2</sub>	Kupplungsreagenz	
(S11)				DCC	HOBT
Äquivalente	1/112	1	0.3	0.5	0.1
Stoffmenge/nmol	0.028	3.125	1	1.56	0.31
Endkonzentration/ $\mu$ M	3.125	350	100	174	35

Nach einer Woche Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mittels Sephadex G-75 gereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und wie folgt charakterisiert: Zuerst wurde von jeder Fraktion die optische Dichte bei 260 nm gemessen – daraus konnte die Menge an DNA in jeder Fraktion berechnet werden



**Abbildung 5.43:** Reinigung eines Kupplungsansatzes über Sephadex.

*Links:* gemessene DNA-Konzentration der Fraktionen (umgerechnet aus der gemessenen  $OD_{260}$ , siehe Abbildung D.177)

*Rechts:* SDS-PAGE der Fraktionen, mit Silber eingefärbt.

(Umrechnungsfaktoren siehe Abbildung D.176). Anschließend wurden die Fraktionen lyophilisiert, in  $5 \mu\text{l}$  PBS aufgenommen und mittels einer SDS-PAGE analysiert.

Man erkennt drei Fraktionen mit Komponenten, welche eine UV-Absorption bei 260 nm zeigen. Nur die Fraktion 7 enthält freie DNA (siehe Gelfoto rechts). Die Fraktion 3 enthält demnach das DNA-Polymer-Konjugat mit großer Molmasse, welches im SDS-PAGE ausgewaschen wird und daher nicht sichtbar ist (siehe auch Abbildung 5.10.1), während in Fraktion 9 möglicherweise das HOBt enthalten ist, welches ebenfalls keine Bande im Gel zeigt (nicht in der Abbildung zu sehen).

Dieser indirekte Nachweis ist mit einfachen Mitteln zugänglich. Zusätzlich wird auch die DNA-Menge bestimmt, so daß dann in der späteren immunologischen Anwendung eine Dosierung ermöglicht wird.

#### 5.10.4 Zusammenfassung der Kupplungsexperimente

Es konnte gezeigt werden, daß die Kupplung von DNA über das 3'-Ende an ein multifunktionelles Polymer auf zwei Arten möglich ist:

1. Die Kupplung über eine *Michael-Addition* eines Thiol-funktionalisierten Oligonukleotids an Polymere, welche mit Acrylat oder Maleinimid terminiert wurden,

<sup>76</sup>Seite 213

war erfolgreich und verlief quantitativ. Die Reaktion war in Wasser möglich und bei Raumtemperatur innerhalb von 24 h beendet.

2. Polymere mit Carboxylgruppen konnten unter Verwendung von Kupplungsreagenzien an Oligonukleotide mit terminalen  $\text{NH}_2$ -Gruppen gekuppelt werden. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Kupplungsreagenz HATU erzielt. Allerdings dauerte die Kupplungsreaktion länger als die Addition der Thiole; bei Raumtemperatur konnten erst nach einer Reaktionsdauer von einer Woche Konjugate nachgewiesen werden.

Zur Charakterisierung der DNA-Polymer-Konjugate war die Gelelektrophorese nur bedingt geeignet, da die entstandenen Konjugate nicht in die Gelmatrix eindringen konnten, und so in den Geltaschen liegen blieben. Hochdruckchromatographische Methoden wie eine RP-HPLC und SEC wurden durchgeführt, um die Konjugate besser zu untersuchen. Mit Hilfe der HPLC wurde eine Kupplungsreaktion in ihrem Zeitverlauf verfolgt, während die SEC mit wässrigem Fließmittel zeigen konnte, daß große Partikel mit hohen Molmassen entstanden waren.

Die präparative Abtrennung der DNA-Polymer-Konjugate von den Edukten konnte mit Hilfe einer Gelfiltration durch Superdex- und Sephadex-Gele erreicht werden, wobei die einzelnen Fraktionen mittels UV-Spektrometrie bei 260 nm und mittels einer SDS-Poly(acrylamid)-Gelelektrophorese untersucht und charakterisiert werden konnten.

## 5.11 *in vitro*-Ergebnisse

### 5.11.1 Toxizität

Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, ob die in dieser Arbeit hergestellten Polymere schädlich sind, wurde ihre Fähigkeit untersucht, Zellmembranen zu destabilisieren. Diese „Kurzzeit-Toxizität“ spielt vor allem im Fall der immunologischen Anwendung der Polymere eine Rolle, da verhindert werden muß, daß Zellen direkt geschädigt und lysiert werden, wenn sie mit den DNA-Polymer-Konjugaten stimuliert werden.

### Hämolytischer Assay

Beim Hämolytischen Assay werden rote Blutzellen isoliert und mit dem Polymer eine gewisse Zeit inkubiert. Anschließend wird die Menge des freigesetzten Hämoglobins photometrisch gemessen.<sup>[151]</sup> Die Methode ist eine Relativmethode und kann nur eine

grundsätzliche Einschätzung der lytischen<sup>78</sup> Eigenschaften eines Polymers geben. Als Standard für die 100%ige Lysis der Erythrozyten wurden das nichtionische Tensid Triton-X sowie *dd*-H<sub>2</sub>O<sup>79</sup> herangezogen.

Die Ergebnisse eines Screening-Versuches verschiedener Polymerstrukturen sind in Abbildung 5.44<sup>80</sup> zusammengefasst.

Man sieht, daß alle hier hergestellten Polymere nur eine minimale lytische Aktivität aufwiesen; die kationischen Polymere waren etwas toxischer als die ungeladenen oder die anionischen. Die kationischen Polymere adsorbieren besser auf der negativ geladenen Zellmembran und destabilisieren diese dadurch. Große Poly-Kationen wie das getestete Polyethylenimin waren sehr toxisch, während Poly-Kationen kleinerer Molmasse weniger toxisch waren. Dies könnte möglicherweise dadurch begründet werden, daß sie an eine kleinere Fläche der Zellmembran adsorbieren und der entstandene Schaden evtl. reparabel ist.

### 5.11.2 Erste immunologische Ergebnisse

#### Stimulation von Interferon auf PBMCs

Wie die Experimente von M. Kerkmann gezeigt haben, läßt sich durch Adsorption des Typ-B-Oligonukleotids 2006 auf kationische Poly(styrol)-Partikeln die immunologische Wirkung dieses DNA-Stranges verändern.

Die in dieser Arbeit hergestellten Polymere sollten eine ähnliche Funktion erfüllen: durch kovalente Kupplung des Oligonukleotids 2006 an die Polymere sollten diese Partikeln dendritische Zellen stimulieren, statt wie bei reinem Oligonukleotid 2006 B-Zellen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden deshalb weiße Blutzellen bzw. PBMC<sup>81</sup> isoliert, welche mit den DNA-Polymer-Konjugaten stimuliert werden sollten: Die Produktion von IFN- $\alpha$ <sup>82</sup> wäre ein Indiz für die erfolgreiche Änderung des Wirkungsmechanismus von 2006. Zum Nachweis der Menge an produziertem IFN- $\alpha$  wurde ein ELISA<sup>83</sup> verwendet (Beschreibung weiter unten ab Seite 126).

Zusätzlich wurden Kontroll-Oligonukleotide verwendet (siehe nächster Abschnitt), welche als definierte bi- oder trivalente Strukturen vorliegen, um den Einfluß der hochmolekularen Strukturen bei den DNA-Polymer-Konjugaten zu untersuchen.

---

<sup>78</sup>Der Begriff *Lysis* bezeichnet in der Biologie das Auflösen einer Zelle.

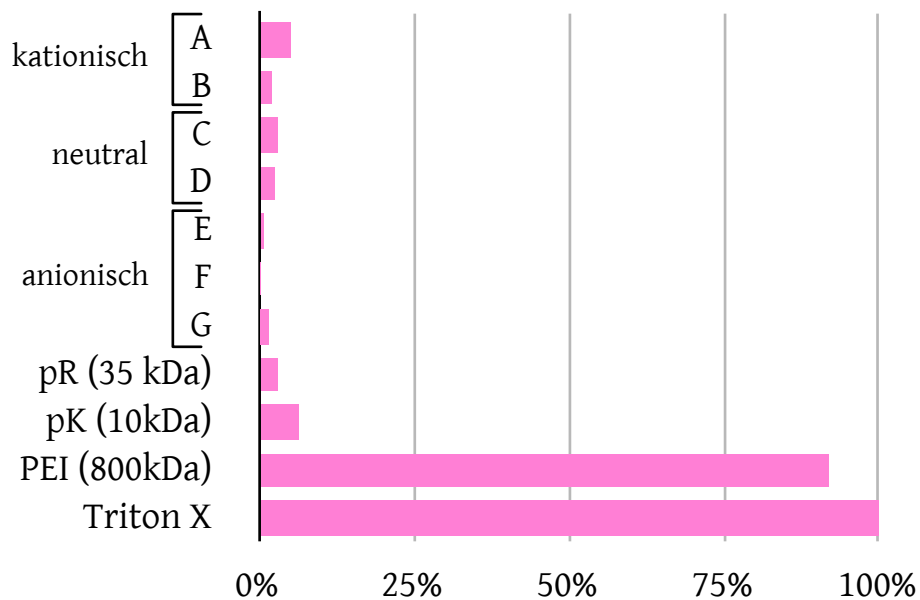
<sup>79</sup>Toxisch; Zellen platzen da sie aufgrund der Osmose zuviel Wasser aufnehmen!

<sup>80</sup>Seite 125

<sup>81</sup>Peripheral Blood Mononuclear Cells

<sup>82</sup>Interferon  $\alpha$

<sup>83</sup>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay



**Abbildung 5.44:** Hämolytischer Assay zur Bestimmung der Zell-lytischen Toxizität. Konzentration der Polymere jeweils 10 mM, Inkubationszeit = 60 min bei 37°C.

Polymer	$\bar{M}_{\text{theor}}$	
	g/mol	
<b>A</b> ( <b>S13</b> )	26 700	mit 64 NH <sub>2</sub> -Gruppen
<b>B</b> ( <b>S14</b> )	37 000	mit 60 NH <sub>2</sub> -Gruppen
<b>C</b> ( <b>B4</b> )	428 000	mit 80 Acrylat-Gruppen
<b>D</b> ( <b>S4</b> )	6000	mit 4 Maleinimid-Gruppen
<b>E</b> ( <b>S18</b> )	42 900	mit 120 COOH-Gruppen
<b>F</b> ( <b>S11</b> )	41 800	mit 120 COOH-Gruppen
<b>G</b> ( <b>S3</b> )	5600	mit 4 COOH-Gruppen

Die Ergebnisse dieses ersten Screening-Versuchs sind ab Seite 127 näher erläutert.

### Multivalente DNA mit niedermolekularen Linkern

Parallel zu dieser Arbeit wurden in Kooperation mit **C. Richter** in der Klinischen Pharmakologie der LMU<sup>84</sup> bi- und trivalente DNA-Konstrukte entworfen. Dabei wurden DNA-Sequenzen über niedermolekulare Linker miteinander verknüpft (Abbildung 5.36<sup>85</sup>), um zu untersuchen, welche Effekte allein durch diese Di- bzw. Trimerisierung verursacht werden.

**C. Richter** konnte zeigen, daß die Linker mit einem Minimal-CpG-Motiv an sich keine Stimulation von IFN- $\alpha$  in PBMCs zeigen; erst wenn sie an einen polymeren Träger wie Poly(arginin) adsorbiert wurden, konnte eine IFN-Produktion beobachtet werden. Wahrscheinlich ist die Aufnahme der DNA-Polymer-Konjugate deutlich erhöht im Vergleich mit den kleinen DNA-Trimeren.[55]

Trivalente Konstrukte mit einer DNA-Sequenz, welche ein CpG-Motiv mit Palindrom enthielten, waren immunstimulierend: durch die Möglichkeit zweier Partikel zu hybridisieren entstanden makromolekulare Aggregate dieser trivalenten DNA-Teilchen und die Aufnahme der Partikeln wurde wiederum ermöglicht oder verbessert.

### ELISA

Der **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay** ist eine Methode der Bioanalytik, die ihre Verwendung vor allem in der Immunologie findet, um die Menge eines Antikörpers oder eines Antigens zu bestimmen. Die Methode arbeitet mit zwei verschiedenen Antikörpern, von denen einer spezifisch für den Analyten ist, während der zweite Antikörper spezifisch für den ersten Antikörper und zusätzlich an ein Enzym gekuppelt ist. Dieses Enzym kann dann verwendet werden um eine Farbreaktion auszulösen, welche dann optisch gemessen werden kann.

Die am weitesten verbreitete Art des ELISAs verläuft nach folgendem Schema (siehe auch Abbildung 5.45<sup>86</sup>):

1. Adsorption der Probe auf eine Oberfläche, meist in einem *Well*<sup>87</sup> einer Mikrotiterplatte.

---

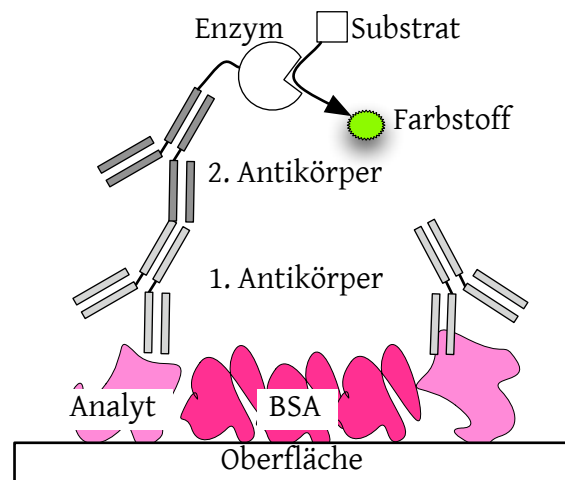
<sup>84</sup>Ludwig-Maximilians-Universität

<sup>85</sup>Seite 108

<sup>86</sup>Seite 127

<sup>87</sup>Ein *Well* ist eine der Öffnungen in einer Mikrotiterplatte. Der Begriff leitet sich ab vom englischen Wort *well* = Brunnen.





**Abbildung 5.45:** Schemazeichnung eines ELISAs.

2. Blocken der freien Oberfläche durch Inkubation mit Milchpulver oder BSA<sup>88</sup>. Waschen.
3. Binden des Analyt-spezifischen Antikörpers an Analyt-Moleküle auf der Oberfläche. Waschen.
4. Binden des zweiten Antikörpers, welcher an die an den Analyt-Molekülen „hängenden“ Antikörper kuppelt. Waschen.
5. Inkubation mit dem Substrat des am zweiten Antikörper gebundenen Enzyms (meistens HRP<sup>89</sup>); der Umsatz dieses Substrats erzeugt ein farbiges Produkt.
6. Stoppen der enzymatischen Reaktion durch Ansäuern mit 1 M Schwefelsäure.
7. Photometrische Bestimmung der Farbstoffkonzentration.

Zur Quantifikation der Analyt-Konzentrationen werden interne Standards mit bekannten Konzentrationen auf jeder Mikrotiterplatte mitanalysiert.

### Erstes Screening

In einem ersten Screeningversuch wurden verschiedene Reaktionsansätze in eine ELISA-Platte pipettiert, dort 24 h bei 37°C inkubiert und dann mit isolierten PBMC<sup>90</sup> (Anzahl Zellen: 400 000 Zellen/Well in 200 µl Medium) versehen. Nach weiteren 24 h wurden die Überstände abgenommen und die Menge an produziertem Interferon-α bestimmt.

<sup>88</sup>Bovine Serum Albumin

<sup>89</sup>Meerrettich-Peroxidase

<sup>90</sup>Peripheral Blood Mononuclear Cells

## 5 Ergebnisse & Diskussion

Der Versuch wurde mit zwei Blutspendern durchgeführt, jeder Reaktionsansatz in Duplikaten vermessen.

Die erfolgversprechendsten Ergebnisse sind in Abbildung 5.46<sup>91</sup> mit den dazugehörigen Reaktionsansätzen in Tabelle 5.12 dargestellt. Man sieht, daß die Reaktionsansätze eine geringe immunologische Aktivität zeigten, jedoch im Vergleich mit dem Typ-A-Oligonukleotid 2216 deutlich weniger IFN- $\alpha$  produzierten. Allerdings war eine Aktivität messbar, ganz im Gegensatz zur Kontrolle mit dem Typ-B-Oligonukleotid 2006 – demselben Oligonukleotid welches an die Polymere gebunden werden sollte. Dieser erste Hinweis auf eine Erhöhung der Aktivität fand sich nicht in allen Ansätzen des Screenings und ist wahrscheinlich auf die Präsenz eines DNA-Polymer-Konjugats zurückzuführen, allerdings lässt sich noch nicht ausschließen, daß immunstimulierende Verunreinigungen oder einfach nur statistische Schwankungen im Testverfahren die Ursache für dieses Ergebnis sind.

**Tabelle 5.12:** Reaktionsansätze für die ersten Immunstimulationen.

	Polymer	COOH	2006-NH <sub>2</sub>	Kupplungsreagenz		Base	Volumen $\mu$ l
<b>(L8)</b>				DCC	HOBT	TEA	17.2
Äquivalente	1/60	1	1	1	0.1	1	
Stoffmenge/nmol	0.017	1.02	1	1	0.1	1	
Endkonzentration/ $\mu$ M	0.971	58	58	58	5.8	58	
<b>(S8)</b>				HATU		TEA	16.1
Äquivalente	1/120	1	1	1		1	
Stoffmenge/nmol	0.008	1	1	1		1	
Endkonzentration/ $\mu$ M	0.971	62	62	62		58.25	
<b>(B1)</b>				BOP		TEA	16.1
Äquivalente	1/60	1	1	1		1	
Stoffmenge/nmol	0.017	1	1	1		1	
Endkonzentration/ $\mu$ M	1.058	62	62	62		58.25	

Wenn man davon ausgeht, daß tatsächlich die DNA-Polymer-Konjugate verantwortlich für den Effekt sind, sollte man allerdings auch beachten, daß das Oligonukleotid 2216 in seiner optimalen Konzentration von 3.2  $\mu$ g/mL eingesetzt wurde, während die Reaktionsansätze nur eine vergleichbare Menge DNA als Edukt enthielten. Nachdem die Reaktionszeit mit 24 h bei 37°C nicht zu einem kompletten Umsatz im Falle von **A**

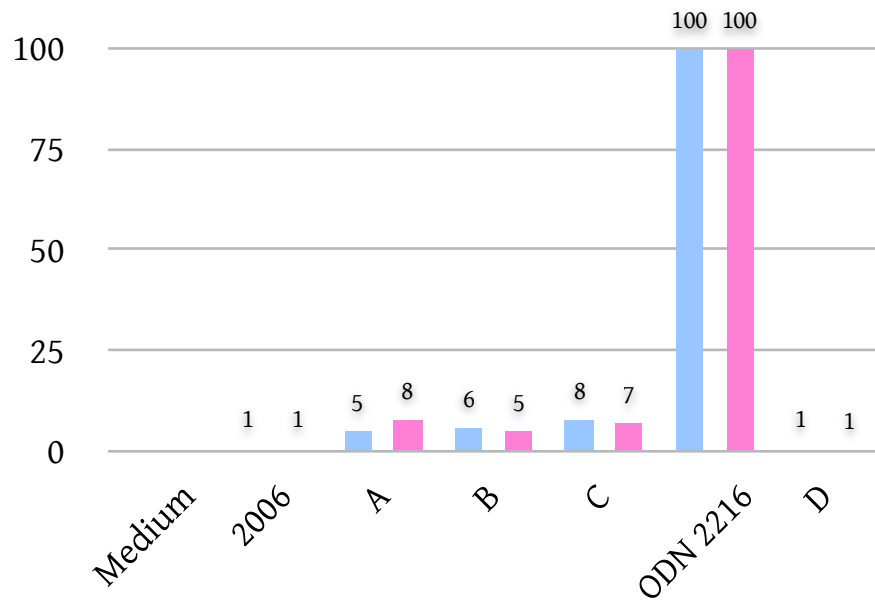
<sup>91</sup>Seite 130

und **B** führt (man beachte die Ergebnisse in Abschnitt 5.10.2: dort konnte ein Konjugat erst nach einer Woche nachgewiesen werden) könnte selbst die geringe immunologische Aktivität zu diesem Zeitpunkt positiv gewertet werden. Die nicht reagierte freie DNA selbst sollte keine immunstimulierenden Effekte zeigen, aber auch nicht die Stimulation durch die Konjugate beeinträchtigen.

Der Ansatz **C** könnte einen höheren Kupplungsgrad zwischen DNA und Polymer aufweisen; wie die Experimente in Abschnitt 5.10.1 gezeigt haben, ist die Addition der Thiol-DNA an ein Maleinimid-funktionalisiertes Polymer nach 24 h abgeschlossen.

Der Kontrollwert **D** war der eines der trimeren DNA-Konjugate von **C. Richter**, welches allein, ohne komplexierendes Transfektionsreagenz, kein IFN- $\alpha$  stimulierte.[55]

Daraus folgt, daß ein trivalenter Effekt allein keine Erhöhung der IFN- $\alpha$ -Stimulation bewirkt, sondern noch weitere Faktoren eine Rolle spielen; möglicherweise die Partikelgröße bzw. Molmasse eines polymeren Trägers. **C. Richter** konnte außerdem auch zeigen, daß diese trimeren Konjugate, wenn sie elektrostatisch an ein Poly(Arginin) gebunden wurden, zu einer Interferon-Produktion führten; ebenso erfolgreich war die Verwendung von Palindrom-DNA-Sequenzen, welche es den trivalenten Konjugaten ermöglichten, Watson-Crick-Basenpaarung zu bilden und dadurch zu multimerisieren: sie bildeten größere Partikeln welche ebenfalls immunstimulierend wirkten.



**Abbildung 5.46:** Stimulation Interferon- $\alpha$  durch Reaktionsansätze; zwei Spender. Die Messwerte sind Mittelwerte zweier Messungen. Inkubation für 24 h, 400 000 Zellen/mL. DNA-Konzentration = 3.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**A-C:** siehe Tabelle

**D:** Kontrolle mit einem Trimeren DNA-Konstrukt, siehe Text.

	Polymer	Kupplungsreagenz	Reaktionszeit	Polymerstruktur	Anzahl FG
A	(L8)	DCC	24 h	Sternpolymer	92
B	(S8)	PyBOP	24 h	Sternpolymer	60
C	(B1)	Thiol	24 h	Bürstenpolymer	80

## **Teil IV**

# **Zusammenfassung & Ausblick**



## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation widmete sich dem Design und der Synthese eines polymeren Trägersystems für immunstimulierende CpG-DNA. Das System wurde so entwickelt, daß eine große Flexibilität in der Wahl der Polymerarchitektur, der Art der funktionellen Gruppen zur Anknüpfung der DNA und in Größen wie „Dichte der funktionellen Gruppen“, „Länge der Abstandshalter“ und „Molmasse“ zur Verfügung stehen. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag zusätzlich in der Evaluierung von Methoden zur Analyse von  $\mu\text{g}$ -Mengen der hergestellten Polymere sowie ihrer DNA-Polymer-Konjugate, welche in einem immunmedizinischen Labor durchgeführt werden können.

Diese DNA-Polymer-Konjugate sollen zur weiteren Erforschung der Erkennungsmechanismen von immunstimulierender DNA eingesetzt werden. Sie könnten als Vakzine-Adjuvantien in der Impfstoffentwicklung sowie in der Immuntherapie von Tumoren eingesetzt werden.

Das Polymersystem basiert auf Poly(2-Oxazolin)en, welche in verschiedenen Polymerarchitekturen eingesetzt wurden: lineare Polymere, Stern- und Bürstenpolymere. Die funktionellen Gruppen in diesen Polymeren wurden entweder in den Seitenketten (Carbonsäuren und primäre Amine) oder als terminale Gruppen (Amine, Maleinimide oder Acrylate) eingeführt. Die *linearen Polymere* (siehe Tabelle D.1 auf Seite 208) setzten sich aus Copolymeren eines Oxazolins mit einer methylester-geschützten Carbonsäure oder einem Boc-geschützten Amin und Ethyloxazolin als „Verdüner“ zusammen. Sie konnten an einem Terminus mit einem sekundären Amin oder einem Maleinimid bzw. einem Acrylat funktionalisiert sein. Die *Sternpolymere* (siehe Tabelle D.2 auf Seite 209) waren vierarmig. Ihre Armstrukturen ähnelten denen der linearen Polymere mit dem Unterschied, daß vor dem funktionalisierten Block ein Abstandshalter-Block aus Poly(methyloxazolin) eingefügt war. *Bürstenpolymere* (siehe Tabelle D.3 auf Seite 210) waren als Pfropfblockcopolymer von einem Styrol-*stat*-Chlormethylstyrol-Copolymer (Makroinitiator) hergestellt; ihre Arme bestanden aus Poly(methyloxazolin) und waren mit einer funktionellen Gruppe (Amin, Maleinimid, Acrylat) terminiert. Zwei Makroini-

tiatoren kamen mit unterschiedlichen Funktionalisierungsdichten zum Einsatz; (**Mi80**) trug 80 und (**Mi50**) trug 50 Arme.

Zur Verbesserung der analytischen Detektion mit UV-Licht wurde das neue Oxazolin-Monomer **2-Ethylphenyl-2-oxazolin** (**MF**) synthetisiert. Es wurde in die linearen Polymere sowie in die Sternpolymere eingebaut: In den linearen Polymeren als kurzer Block (**L8**) und in den Sternpolymeren als kurzer Block am Zentrum des Sternes (**S7**), (**S18**). Die Bürstenpolymere absorbieren aufgrund der Struktur des Makroinitiators im UV-Bereich des Spektrums. Zusätzlich wurde das aromatische Maleinimid-Terminationsreagenz (**TSar**) synthetisiert.

Die Evaluierung der in Frage kommenden biochemischen analytischen Methoden betraf hauptsächlich die Anwendungsmöglichkeiten der Gelelektrophorese zur Charakterisierung der Polyoxazoline. Die Annahme, daß die standardmäßigen Protokolle der Proteinanalytik auch hier einsetzbar waren, konnte bestätigt werden. Allerdings musste zur Erhöhung der Eigenladung der Polymere die Konzentration an SDS in den Gelelektrophoresemethoden SDS-PAGE und SDS-AGE auf das fünffache in Bezug auf die Mengen der Standardprotokolle wie das von **Laemmli**[138] erhöht werden.

Als problematisch erwies sich auch die Detektion der Polymere in den Gelen. Es konnte gezeigt werden, daß je nach Detektionsmethode, unterschiedliche strukturelle Merkmale in den Polymeren notwendig waren. Die Anfärbung von Poly(acrylamid)-Gelen mit Farbstoff *Coomassie-Brilliantblau* gelang nur bei Polymeren, die aromatische Gruppen enthielten [(**S7**), (**S18**), (**L8**) und den Bürstenpolymeren **Bn**]. Diese Polymere konnten außerdem direkt, ohne die Anwendung einer Färbemethode, in den Gelen durch ihre *Absorption im UV-Spektrum* nachgewiesen werden. Die Fotografien dieser Gele konnten auch in Bezug auf ihre Massenverteilung ausgewertet werden, in dem der Grauwert der Gelbanden entlang der Laufrichtung gegen die elektrophoretische Mobilität aufgetragen wurde. Eine Anwendung der *Silberfärbung* war ebenfalls erfolgreich: Polymere mit freien COOH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen konnten mit einem AgNO<sub>3</sub>-basierten silver stain nachgewiesen werden.

Weiterhin erwies sich die Fluoreszenzmarkierung der Polymere als geeignet zur empfindlichen Detektion in den Poly(acrylamid)- und Agarose-Gelen. Diese Reaktion des Tetramethylrhodamin-Isothiocyanats mit Nukleophilen wie NH<sub>2</sub>- und NH-Gruppen konnte erfolgreich angewandt werden, um extrem geringe Mengen Polymer nachzuweisen.

Die nachweisbaren Mengen der Polymere sind in folgender Tabelle für die einzelnen Methoden zusammengefasst:



Methode	minimale Probenmenge	Voraussetzung	
UV-Transillumination	10 mg	Aromaten	
Anfärbung mit Coomassie-Blau	500 $\mu$ g	hydrophobe Regionen	nicht-kovalent
Anfärbung mit Silber	100 $\mu$ g	Amine » COOH	
Fluoreszenzmarkierungen mit TRITC			
Detektion mit Vis	30 $\mu$ g	Amin	kovalent
Detektion mit UV	< 1 $\mu$ g		

Die Anknüpfung der immunstimulierenden DNA-Sequenz 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' an die Polymere konnte nur über das 3'-Ende erfolgen, da die Erkennung der DNA vom Rezeptor TLR9 über das freie 5'-Ende erfolgt. Kommerziell erhältlich waren ausschließlich mit Thiol- oder primären Amin-Gruppen funktionalisierte Oligonukleotide als Gruppen in 3'-Position.

Die Kupplung der *Thiol-funktionalisierten DNA* an Polymere ist eine Michael-Addition des Thiols an die aktivierte Doppelbindung der Maleinimid- oder Acrylatgruppen. Sie konnte erfolgreich an die Polymere (**B1**), (**B4**), (**S7**) durchgeführt werden. Allerdings war es nicht möglich, die DNA-Polymer-Konjugate in einer Gelelektrophorese zu analysieren. In der PAGE<sup>1</sup> blieben die Konjugate in den Geltaschen liegen und wurden konsekutiv bei der Aufbereitung der Gele ausgewaschen. Erst nach Wechsel der Methode hin zu der horizontal ausgeführten AGE<sup>2</sup> konnten die, an der DNA mit Fluoreszein markierten, Konjugate in den Taschen nachgewiesen werden. Die Reaktionen wurden mit 0.25 und 0.5 Äquivalenten DNA pro Michael-Akzeptor durchgeführt und verliefen quantitativ bei Raumtemperatur nach 24 h .

Bei der Kupplung über eine *Peptidbindung* der Amino-funktionalisierten DNA mit einem Carbonsäure-funktionalisierten Polymer wurden mit Hilfe hochdruckchromatographischen Methoden analysiert: Anhand einer Messung der Kupplungskinetik in einem Ansatz mit Polymer (**L8**) und dem Kupplungsreagenz BOP gelang es, Hinweise darauf zu erhalten, daß die Reaktion bei Raumtemperatur erst nach knapp einer Woche zu höheren Umsätzen führt. Die HPLC<sup>3</sup>-Messung (C<sub>18</sub>-Reverse-Phase-Säule, Wasser/Acetonitril-Gradient, Detektion bei 254 nm) zeigte deutlich den Verbrauch des Kupplungsreagenz und die Zunahme des Nebenprodukts HOBt, ebenso wie die

<sup>1</sup>Poly(acrylamid)-Gelelektrophorese

<sup>2</sup>Agarose-Gelelektrophorese

<sup>3</sup>High Pressure/Performance Liquid Chromatography

## 6 Zusammenfassung

intermediäre Existenz einer wahrscheinlich polymeren Spezies, die in einem – wie die Lage des entsprechenden Produktpeaks zeigte – sehr hydrophilen Produkt mündete.

Eine Analyse weiterer Kupplungsversuche auf einer High-Throughput-GPC<sup>4</sup>-Säule mit einem wässrigen Eluenten zeigte (Detektion der DNA bei 260 nm) unterschiedliche Kupplungseffizienzen. Die entstandenen DNA-Polymer-Konjugate besaßen, relativ zu den Edukten, deutlich höhere Molmassen bzw. Molekülgrößen.

Die beobachteten Umsätze nach einer Woche Reaktionszeit bei Raumtemperatur sind unterschiedlich (siehe Tabelle):

Polymer	Kupplungsreagenz	Produktpeak $V_{el}$	Weitere Peaks $V_{el}$
		mL	mL
(S8)	DCC & HOBT	4.579 <sup>a</sup>	4.908 <sup>b</sup>
(S18) <sup>c</sup>	HATU	4.185 <sup>b</sup>	4.903 <sup>a</sup>
(L8)	HATU	4.455 <sup>b</sup>	4.881 <sup>a</sup>
(L8)	BOP	4.512 <sup>a</sup>	4.836 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>kleinerer Nebenpeak

<sup>b</sup>Hauptpeak

<sup>c</sup>Das Elugramm dieses Experiments ist in Abbildung 5.42 dargestellt.

Die Abtrennung der DNA-Polymer-Konjugate von unreaktiertem Polymer, DNA und niedermolekularen Produkten gelang mit einer präparativen Gelfiltration (Sephadex oder Superdex). Die dabei aufgefangenen Fraktionen wurden photometrisch bei 260 nm untersucht und aus der gemessenen optischen Dichte die jeweils darin enthaltene Menge an DNA bestimmt. Mit Hilfe einer darauffolgenden Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß in der zuerst eluierten DNA-haltigen Fraktion keine freien Oligonukleotide mehr nachweisbar waren.

Die *in vitro*-Toxizität der Polymere wurde mit einem Hämolyse-Assay bestimmt. Dabei wurde wie erwartet festgestellt, daß die anionischen Polymere nicht zell-lytisch wirken, ebenso wie die ungeladenen Polymere. Nur die Polymere mit freien NH<sub>2</sub>-Gruppen zeigten eine Wirkung; sie waren jedoch nicht nennenswert toxischer als geläufige Transfektionsreagenzien wie Poly(Lysin) oder Poly(Arginin).

Ein erstes Screening von Mischungen aus Polymer, Kupplungsreagenz und funktionalisierter DNA zeigte, daß eine, wenn auch geringe, immunstimulierende Aktivität der Konjugate in PBMC gegeben ist. Die Reaktionsansätze zeigten eine erhöhte Produktion

<sup>4</sup>Gelpermeationschromatographie

von IFN- $\alpha$  im Vergleich zur Mediumkontrolle sowie zu der unfunktionalisierten DNA, konnten jedoch das Niveau des CpG-Oligonukleotids vom Typ-A 2216 nicht erreichen. Allerdings war die Dosis von 2216 in einem auf IFN-Produktion optimierten Bereich, während die Reaktionsansätze dieselbe Menge DNA enthielten; derzeit kann aber keine weitere Aussage über den Funktionalisierungsgrad und die Menge an DNA-Polymer-Konjugate gemacht werden, so daß hier durch Optimierung möglicherweise eine höhere Produktion von IFN- $\alpha$  möglich sein wird.



## 7 Summary

The aim of this work was to design and synthesize a system of polymeric carrier molecules to transport immunostimulatory CpG-DNA. This system was designed to enable a great flexibility in possible polymer architectures. Thus it provides easy access to different functional groups for DNA attachment, to different functional group densities, spacer lengths and molecular weights. An additional focus of this work was the development of methods to analyze  $\mu\text{g}$  amounts of the synthesized polymers and DNA-polymer-conjugates.

These DNA-polymer-conjugates can be used to further study the mechanisms by which immunostimulatory DNA is recognized. They are also potential vaccine adjuvants and could be used in the development of vaccines as well as in the immunotherapy of cancer.

This system of polymers is based on poly(2-oxazoline)s which have been synthesized in different polymer architectures: linear polymers, star polymers and brush polymers. Functional groups were introduced either as side chain functionalization (carboxylic acids and primary amino groups) or as terminal groups (amine, maleimide or acrylate). *Linear polymers* were copolymers of an oxazoline with a protected functional group (a methyl ester protected carboxylic acid or a boc-protected primary amine) and ethyloxazoline. They could carry a secondary amine or a thiol-reactive acrylate/maleimide as a terminal functional group. *Star polymers* had four arms and were similar in structure to the linear polymers; an additional spacer arm consisting of poly(2-methyloxazoline) was inserted between the block carrying the functional groups and the tetravalent core group. *Brush polymers* were grafted from makroinitiators based on poly(styrene-*stat*-chloromethylstyrene). The arm polymers consisted of poly(2-methyloxazoline)-blocks that had a terminal functional group (amine, acrylate or maleimide). Two different makroinitiators were used with different densities of initiating chloromethyl groups: (**Mi80**) had 80 and (**Mi50**) had 50 initiating groups.

To improve the analytical detection of those polymers in UV light the new monomer 2-phenyl-1-(2-oxazoline)-ethane (**MF**) was synthesized and incorporated as a short block into linear (**L8**) and star polymers (**S7**), (**S18**). In addition to this monomer the

## 7 Summary

new terminating agent (**TSar**), an aromatic carboxylic acid with a maleimide, was synthesized.

The evaluation of methods for the characterization of  $\mu\text{g}$  amounts of polymer or DNA-polymer-conjugate focussed on possible applications of gel electrophoresis. The poly(2-oxazoline)s could be analyzed by these biochemical methods. Polymers with few charged functional groups needed to be solubilized by adding five times as much SDS to the sample buffers as are required for proteins (such as in the protocol by **Laemmli** [138]).

A major problem was the detection of the polymers in the gels. It could be shown that, depending on the method of detection, certain polymer structures were necessary to detect gel bands. The *Coomassie stain* of polymers in poly(acrylamide) gels was only successful for polymers containing aromatic groups (such as (**S7**), (**S18**), (**L8**) and all brush polymers **Bn**). These polymers could also be detected directly by their absorption of UV light. The digital photographs of these gels could be used to visualize the polymer's inherent distribution of molecular weights, although no calibration was possible. The application of a  $\text{AgNO}_3$  based *silver stain* was useful to stain gel bands of polymers carrying carboxylic acids or amino groups.

The direct labelling of the polymers with fluorescent labels was used to detect polymers in poly(acrylamide) and agarose gels – both in visible light and under UV irradiation. The labelling was achieved by the reaction of an  $\text{NH}_2$  group on the polymer with the isothiocyanate of tetramethyl rhodamine (TRITC).

The following table show the detection limits of these methods:

method	minimum amount of sample	necessary structure	attachment
UV transillumination	10 mg	aromatic groups	
<i>Coomassie stain</i>	500 $\mu\text{g}$	hydrophobic regions	non-covalent
<i>silver stain</i>	100 $\mu\text{g}$	NH or $\text{NH}_2$ » COOH	
labelling with TRITC			
detection by Vis	30 $\mu\text{g}$	amino groups	covalent
detection by UV	< 1 $\mu\text{g}$		

The attachment of the immunostimulatory DNA sequence 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3' to the polymers could only be realized at its 3'-end, as the 5'-end needed to be accessible for the target receptor TLR9. The only functionalizations that were commercially available on the 3' end of the oligonucleotides were amino groups or thiol groups.

The coupling of *thiol modified DNA* to polymers was achieved via a Michael-like addition of the SH-group to activated double bond of a polymer bound maleimide or acrylate group. The successful addition could be demonstrated with polymers (**B1**), (**B4**) and (**S7**), but it was not possible to analyze these resulting DNA-polymer-conjugates in a gel electrophoresis. Attempts to analyze the conjugates by PAGE were not successful, as the conjugates did not penetrate the gel matrix and were washed out of the gel pockets during the isolation of the gels. It could be shown in the horizontal agarose gel electrophoresis (AGE) that conjugates with fluorescently labeled DNA remained in the gel pockets. The quantitative addition is complete after 24 h at r.t. as could be shown in these experiments.

The coupling of amino-functionalized DNA to carboxylic acid groups on the polymers by a *peptide bond* was also successful and could be analyzed by column chromatography. A kinetic measurement of the reaction between polymer (**L8**) utilizing the coupling reagent BOP suggested that, at room temperature, a reaction time of one week was necessary for good coupling efficiencies. This analysis by HPLC ((C<sub>18</sub> reverse phase column, water/acetonitril gradient, detection at 254 nm)) clearly demonstrated the consumption of the coupling reagent and the corresponding production of the side product HOBT; an intermediate broad peak that could correspond to the activated polymer was observed, which, after one week, was converted to a very hydrophilic (based on its early elution time) peak.

Further analysis of these coupling reactions was done on a high throughput SEC column with an aqueous eluent (detection at 260 nm). Different coupling efficiencies were observed for different polymers and coupling reagents. The presence of a product peak which was significantly shifted to earlier elution volumes and thus higher molecular weight was observed, as shown in the following table (the major peaks are underlined):

polymer	coupling reagent	product peak $V_{el}$	other peaks $V_{el}$
		mL	mL
( <b>S8</b> )	DCC & HOBT	4.579 <sup>a</sup>	<u>4.908</u> <sup>b</sup>
( <b>S18</b> )	HATU	<u>4.185</u> <sup>b</sup>	4.903 <sup>a</sup>
( <b>L8</b> )	HATU	<u>4.455</u> <sup>b</sup>	4.881 <sup>a</sup>
( <b>L8</b> )	BOP	4.512 <sup>a</sup>	<u>4.836</u> <sup>b</sup>

<sup>a</sup>minor peak

<sup>b</sup>major peak

Separation of the DNA-polymer-conjugates from unreacted polymer, DNA and low molecular weight substances could be achieved by preparative gel filtration (Sephadex

## 7 Summary

or Superdex). The measured optical density at 260 nm of the collected fractions could be used to determine the amount of DNA present. A consecutive gel electrophoresis was used to prove that the first fraction containing DNA did not contain unreacted DNA.

In order to determine the *in vitro* toxicity of the polymers a hemolytic assay was performed. It could be shown that anionic polymers as well as non-ionic were not toxic, whereas cationic polymers exhibited a limited toxicity which was comparable to that of short-chain poly-arginine or poly-lysine; these cationic polymers were still less toxic than long-chain poly-lysine.

First screening experiments of reaction mixtures consisting of DNA-polymer-conjugates, unreacted polymer and DNA and coupling reagents demonstrated a limited immunostimulatory activity in PBMC. These reaction mixtures showed an increased production of IFN- $\alpha$  when compared with a medium control or with unreacted DNA. The stimulation is much less than that of oligonucleotide 2216 which was used in its optimal dose. Further studies are necessary to determine the inherent activity of purified DNA-polymer-conjugates and to optimize their effects.



## 8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein polymeres Trägersystem vorgestellt, welches die kovalente Bindung immunstimulierender CpG-DNA ermöglicht. Es wurden Methoden zur qualitativen Charakterisierung der Polymere und der DNA-Polymer-Konjugate entwickelt. Zur weiteren Evaluierung des Systems sollten einerseits die immunologischen Aktivitäten der Konjugate besser untersucht werden und andererseits bessere Methoden zur Charakterisierung der Konjugate gefunden werden.

Im Folgenden sollen Ansätze beschrieben werden, diese Fragestellungen zu untersuchen.

**Immunologische Aktivität** Mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ist es möglich, einen Pool verschiedener DNA-Polymer-Konjugate herzustellen, welche dann in ihrer immunstimulierenden Aktivität getestet werden können.

Dabei sollten die Eigenschaften zur Stimulation von Interferon  $\alpha$  in Korrelation zur Struktur der Polymere gesetzt werden, um so eine Einsicht in die Abhängigkeit der Erkennung der DNA von der Zahl und Dichte der gebundenen DNA-Moleküle auf dem Partikel, sowie in die Unterschiede bei der Aufnahme der Konjugate zu bekommen. Beim Design und der Synthese der Polymere wurde besonders darauf geachtet, daß die Polymere geeignet sind, eine spätere Auswertung der immunologischen Aktivität nach einem statistischen Versuchsplan durchzuführen.

Solange keine Möglichkeiten zur Quantifizierung des Beladungsgrades (z.B.  $n(\text{DNA})$  pro  $m(\text{Polymer})$ ) zur Verfügung stehen, wäre es sinnvoll, die Korrelation der immunologischen Aktivität mit einer messbaren Größe wie z.B. der Elutionszeit des DNA-Polymer-Konjugats durchzuführen. Auch die Korrelation mit den theoretischen bzw. erwarteten Strukturen könnte erste Hinweise auf die Struktur-Wirkungsbeziehung der Konjugate liefern.

Zusätzlich zu diesen Versuchen könnten aus Polymeren, die ein terminales Amin und eine Carbonsäure als Seitenketten tragen, fluoreszenzmarkierte DNA-Polymer-Konjugate hergestellt werden, welche dann *in vivo* durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden können. Diese weiteren Hinweise über Lokalisierung und evtl. auch

Quantifizierung der Partikel in der Zelle könnten Aufschlüsse darüber geben, wo und wie lange die Konjugate in der Zelle verbleiben. Diese Beobachtungen dürften bei einer Optimierung der Konjugate in Bezug auf ihre spätere Anwendung als Vakzine-Adjuvanzien eine Rolle spielen. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die in ihrer Aktivität abhängig vom pH-Wert sind, könnte es ermöglichen, die Umgebung (frühe vs. späte Lysosomen) der DNA-Polymer-Konjugate weiter zu charakterisieren.

**Methoden zur molekularen Charakterisierung** Um genaue Aussagen über die Strukturen der DNA-Polymer-Konjugate machen zu können, ist die Entwicklung weiterer Methoden zu ihrer Charakterisierung notwendig, vor allem zur Bestimmung der Massen der Konjugate bzw. der Anzahl gebundener DNA-Moleküle pro Polymer. Ob dies jedoch mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Methoden erreicht werden kann ist noch nicht absehbar.

Die Hauptproblematik stellt hierbei die Polydispersität der Polymere und die geringen Mengen an DNA dar: Die Kombination dieser Faktoren setzt bei den Charakterisierungsmethoden größte Empfindlichkeiten voraus.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Varianten der Gelelektrophorese waren nicht geeignet, Details Aussagen über die Konjugate zu machen, da die entstandenen Konjugate nicht mehr in den Gelen migrierten. Deshalb konnte lediglich der Erfolg der Kupplung nachgewiesen werden.

Auch die Analytik der Polymere konnte nur in Relativmethoden durchgeführt werden, da keine strukturanalogen Standards für die Gelelektrophorese oder die Größenausschluß-Chromatographie vorhanden waren.

Mögliche Ansatzpunkte für eine Verbesserung dieser Methoden sind im Folgenden angesprochen:

1. Die Verwendung von Gelen mit größeren Poren könnte die Migration der Konjugate ermöglichen. Allerdings müssen hierzu andere Geltypen oder neue Gelträger verwendet oder entwickelt werden, welche die Handhabung dieser fragilen Gele ermöglicht.
2. Auch die Kapillarelektrophorese könnte erfolgreich sein, da hierbei einerseits viel geringere Gelkonzentrationen verwendet werden können und andererseits die Detektion *in situ* durch einen optischen Detektor erfolgt.[152] Mit geeigneten Standards (s.u.) könnte so eine bessere Aussage über den Funktionalisierungsgrad der Konjugate getroffen werden.

3. Eine Analytik der Konjugate mithilfe der Massenspektroskopie ist wahrscheinlich möglich. Allerdings wird die Auswertung der Spektren hierbei sehr kompliziert, da zusätzlich zur Molmassenverteilung der Polymere die Ladung bzw.  $m/z$  der Konjugate durch die Addition der DNA verändert wird (pro DNA-Molekül 24 negative Ladungen), was zu einem hochkomplexen Überlagerungsmuster vieler verschiedener Spezies führen wird. Ob diese Spektren durch geeignete Methoden voneinander zu trennen sind, ist unklar.
4. Indirekte Methoden könnten zur Bestimmung des relativen Kupplungsgrades verwendet werden: Nach der Abtrennung der unreaktierten DNA werden die verbleibenden funktionellen Gruppen am Polymer mit einem Farbstoff gekuppelt. Nach Abtrennung des überschüssigen Farbstoffs, Isolierung des Polymerkonjugats und Bestimmung der gekuppelten Farbstoffmenge könnte so auf den Belegungsgrad des Polymers mit DNA zurückgeschlossen werden.

Die meisten dieser Methoden lassen aber nur relative Aussagen über den Belegungsgrad zu. Die Bestimmung des Zahlenmittels der durchschnittlichen Menge an DNA pro Polymer könnte mit Relativmethoden allein nicht möglich sein.

Unter Zuhilfenahme eines geeigneten Standards könnte allerdings über die Größenausschluß-Chromatographie (SEC) eine Charakterisierung möglich sein. Die dazu in Frage kommenden Standards sollten ebenfalls poly-anionische Stern- oder Bürstenpolymere sein. Zur Zeit ist allerdings kein Standard dieser Art bekannt.



## **Teil V**

# **Experimentalteil**



## 9 Verwendete Stoffe

### 9.1 Grundchemikalien

Alle Basischemikalien werden von den Firmen *Fluka*, *Aldrich*, *Lancaster*, *Advanced-ChemTech* oder *Merck* bezogen und, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung eingesetzt.

**Lösemittel** Alle technischen Lösemittel werden vor dem Gebrauch destilliert. Absolute Lösemittel werden entweder als solche bezogen oder nach Standardverfahren erhalten<sup>[153]</sup> und unter Stickstoff als Schutzgas über aktiviertem Molekularsieb 4 Å gelagert. Deuterierte Lösemittel für die NMR<sup>1</sup>-Spektroskopie werden von der Firma *Deutero* bezogen.

**Elutionsmittel** Die in der HPLC und der GPC verwendeten hochreinen Elutionsmittel werden von *Sigma-Aldrich* bezogen.

### 9.2 Biochemische Reagenzien

Alle Chemikalien werden bezogen von: *Carl Roth*, *Sigma Aldrich*, *Pierce* und *Molecular Probes*.

DNA-Größenstandards stammten von *Fermentas*.

**Oligonukleotide** Die verwendeten Oligonukleotide (siehe Tabelle 9.1 auf Seite 151) werden von der Firma *Metabion* synthetisiert, mit Hilfe der HPLC gereinigt, mittels HPLC-MS oder DMT-Monitoring analysiert und lyophilisiert geliefert. Die Oligonukleotide werden dann in PBS<sup>2</sup> aufgenommen. *Endkonzentration*: 100 µM bzw. 200 µM. *Strukturmodifikationen*: DMT<sup>3</sup>-geschützte Thiol-Gruppen werden am 3'-Ende mit

---

<sup>1</sup>Nuclear Magnetic Resonance

<sup>2</sup>Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer

<sup>3</sup>Dimethoxytrityl

## 9 *Verwendete Stoffe*

einem C<sub>3</sub>-Abstandshalter eingeführt. NH<sub>2</sub>-Gruppen werden am 3'-Ende mit einem C<sub>7</sub>-Abstandshalter eingeführt.

### **9.3 Blutproben**

Blutproben werden durch Mitarbeiter der Abteilung für Klinische Pharmakologie der LMU<sup>4</sup> von freiwilligen Probanden entnommen.

---

<sup>4</sup>Ludwig-Maximilians-Universität



**Tabelle 9.1:** Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Typ <sup>a</sup>	Sequenz 5'-3'	Länge		$M_w$ s/mol
			nt <sup>b</sup>		
2006-NH <sub>2</sub>	CpG-B	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT - NH <sub>2</sub>	24		7537
*-2006-NH <sub>2</sub>	CpG-B	* - TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT - NH <sub>2</sub>	24		8076
2006-SH	CpG-B	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT - HS	24		7572
*-2006-SH	CpG-B	* - TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT - HS	24		8110
2006	CpG-B	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT	24		7329
2216	CpG-A	ggG GGA CGA TCG TCg ggg gG	20		6320

\*: Fluoreszein; *kleine buchstaben* enthalten am 3'-Ende eine Phosphat-Gruppe, *GROSSE BUCHSTABEN* enthalten am 3'-Ende eine Phosphothioat-Gruppe (Strukturformeln in Abbildung 3.5<sup>c</sup>); Palindromsequenzen (Begriffserklärung auf Seite 29) sind unterstrichen; **Thiol**-Gruppen sind geschützt mit DMT-Gruppen. (Entschützungsverfahren siehe Methode 11.4).

<sup>a</sup>siehe Abschnitt 3.5.2

<sup>b</sup>Nukleotide

<sup>c</sup>Seite 28



# 10 Geräte und Hilfsmittel

## Software

**Recherchen:** DevonAgent, SciFinder Scholar, Beilstein Crossfire, PubMed, Google-Scholar

**NMR:** X-WIN-NMR, WIN-NMR, iNMR

**Abbildungen:** OmniGraffle, Adobe Illustrator, Adobe Photoshop, Plot.

**Literaturverwaltung:** DevonThink, Bibdesk

**Layout:** TextMate, L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X

## NMR

Spektren werden an den Geräten AC250 (250.13 MHz), ARX 300 (300.13 MHz) und ARX 400 (400.13 MHz) der Firma *Bruker* bei 298 K in deuterierten Lösemitteln (CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>, MeOD, DMF-d<sub>6</sub>) aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgte auf das Restprotonensignal des Lösemittels.<sup>[154]</sup> Für die Signalmultiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, q: Quartett, m: Multiplett.

## GPC

### Organische Eluenten

**Eluent:** CHCl<sub>3</sub> oder DMAc

**Pumpe:** Waters Modell 510

**Detektoren:**

**RI:** Waters Modell 410

**UV:** Waters Modell 486 ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ )

**Flussgeschwindigkeit:** 1 mL·min<sup>-1</sup>

**Kalibrierung:**

**CHCl<sub>3</sub>:** Poly(styrol)-Standards der Firma *Polymer Standards Services*

**DMAc:** Poly(methylmethacrylat)-Standards der Firma *Polymer Standards Services*

**Säulensätze :**

**CHCl<sub>3</sub>:** *Polymer Laboratories* PL Gel 5mm Guard, 50·7.5 mm; PL Gel 5 $\mu$ Mixed-C, 300x7.5 mm; PL Gel 5 $\mu$ Mixed-C, 600·7.5 mm. *Arbeitsbereich:*  $\bar{M}_w = 200 \text{ g/mol} - 2\,000\,000 \text{ g/mol}$

**DMAc:** *Polymer Laboratories* PL Gel 5mm Guard, 50·7.5 mm; PL Gel Mixed-B, Trennweg 90 cm. *Arbeitsbereich:*  $\bar{M}_w = 5000 \text{ g/mol} - 40\,000\,000 \text{ g/mol}$

**Hinweis:** Angegeben ist stets das Zahlenmittel  $\bar{M}_n$  der Molmasse.

**Wässrige Eluenten**

**Eluent:** wässrige Medien; diverse Puffer; *dd*-H<sub>2</sub>O

**Kooperation:** mit **Dr. M. Bidlingmeier**, Endokrinologie, Klinikum der Universität München

**Geräte:** Äkta, siehe HPLC.

**Kooperation:** mit **Dr. J. Eppinger**, Anorganische Chemie, Technische Universität München

**Geräte:** HP Chemstation, Diode Array Detektor

**Flussgeschwindigkeit :** bis zu 1 mL·min<sup>-1</sup>

**Kalibrierung:** keine

**Säulensätze :**

1. *Polymer Laboratories* PL Rapide Aqua OH, (10 mmID·100 mm).  
*Arbeitsbereich:*  $\bar{M}_w = 100 \text{ g/mol} - 20\,000\,000 \text{ g/mol}$ ; Part No 1049-2800. Flussgeschwindigkeit bis zu 3 mL·min<sup>-1</sup>
2. *Shodex* Asahipak GS-520 HQ, (7.6 mmID·300 mm) Flussgeschwindigkeit bis zu 1 mL·min<sup>-1</sup>
3. *Amersham* Superdex 30pg (16 mmID·600 mm), Flussgeschwindigkeit bis zu 1 mL·min<sup>-1</sup>

**HPLC**

**Allgemeines**

**Kooperation:** mit der Arbeitsgruppe von M. Bidlingmeier, Endokrinologie, Klinikum der Universität München

**Pumpe:** GE Modell P-900

**Detektor:** GE Modell UPC-900

**Optisch:** UV-Detektor, Hg-Optik, Filter für 254 nm oder 280 nm

**Leitfähigkeit:** 1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ -999.9 mS/cm;  $\pm 3\%$

**Fraktionensammler:** Modell GE Frac-920

**Valve:** Modell GE INV-907

**Säule:** Polymer Laboratories Modell PLRP-S 1000 Å in 5  $\mu\text{M}$  (4.6 mmID·250 mm); S/N = 5M-RPS10-459-1

**Elutionsmittel:** Verwendet wurden  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CH}_3\text{CN}$  (beides von Aldrich bezogen, Qualität *HPLC-Grade*) sowie Puffer und Mischungen basierend auf diesen.

Im Fall der Verwendung von Puffern und Lösemittelgemischen für die Elution wurden diese über 0.2  $\mu\text{M}$ -Sterilfilter vor der Verwendung von Schwebstoffen befreit und entgast.

**Puffer:** Genaue Details sind bei den einzelnen Methoden angegeben.

**Software:** UNICORN Version 5.01

## Infrarotspektren

*Bruker* IFS 55, Vector 22 (ATR<sup>1</sup>). Verwendete Software zum Auswerten: Plot

## Elementaranalysen

**H. Barth**, Mikroanalytisches Laboratorium, Department Chemie der Technischen Universität München.

---

<sup>1</sup>Attenuated Total Reflection



# 11 Verwendete Methoden

**Vorbemerkungen** Methoden, die man in einem polymerchemischen bzw. chemisch präparativen Labor im Regelfall verwendet, sind nur kurz dargestellt, während die an selbigem Ort unüblicheren Methoden im Folgenden detailliert beschrieben werden (Grundlegendes Wirkungsprinzip sowie detaillierte Beschreibungen zum Versuchsaufbau).

*Schritt-für-Schritt*-Arbeitsvorschriften bzw. -Protokolle (siehe Anhang B auf Seite 203) und Rezepturen (siehe Anhang A auf Seite 199) finden sich in den jeweiligen Anhängen.

## 11.1 Gelelektrophoresen

### 11.1.1 Elektrophorese

**Allgemeines** Die Gelelektrophorese [155, 156] wird unter nativen und denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Es kamen homogene Gele sowie Gradientengele aus vernetztem Poly(acrylamid) (PAGE) sowie Agarose-Gele zum Einsatz.

Rezepturen für die verwendeten Puffer und Konzentrate finden sich im Anhang A auf Seite 199.

**Physikalisches Wirkungsprinzip** Der Begriff *Elektrophorese* bezeichnet die Bewegung einer elektrisch geladenen Substanz mit Ladung  $q$  in einem elektrischen Feld  $\vec{E}$ . Die resultierende Bewegung wird durch die Lorentzkraft  $\vec{F}_e$  verursacht.

$$\vec{F}_e = q\vec{E} \quad (11.1)$$

Der Lorentzkraft wirkt die Reibungskraft  $\vec{F}_R$  entgegen, welche zur Migrationsgeschwindigkeit  $\vec{v}$  proportional ist.

$$\vec{F}_R = f\vec{v} \quad (11.2)$$

Die beiden entgegengesetzten Kräfte 11.1 und 11.2 wirken auf die Substanz ein, welche mit konstanter Geschwindigkeit im Gel migriert. Die Elektrophoretische Mobilität  $\mu$  ist wie folgt definiert:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \quad (11.3)$$

Gleichung 11.3 ist nur für sehr verdünnte Lösungen von Ionen in nicht-leitenden Flüssigkeiten gültig. Poly-ionische Moleküle können durch diesen simplen Ansatz nur unzureichend beschrieben werden, da sie a) nicht mehr als Punktladungen beschrieben werden können und b) von einer Wolke aus Gegenionen umgeben sind, die das anliegende elektrische Feld  $E$  verändert. Unter Berücksichtigung der wichtigsten Einflußfaktoren (effektive Mobilität  $\mu_e$ , die Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon$  des Lösemittels und  $\epsilon_0$  des Vakuums, das Zeta-Potential des Partikels  $\zeta$  und die Viskosität  $\eta$  des Lösemittels) verändert sich die Gleichung zur Beschreibung der elektrophoretischen Mobilität zu (**Smoluchowski-Gleichung**<sup>1</sup>):

$$\mu_e = \frac{\epsilon\epsilon_0\zeta}{\eta} \quad (11.4)$$

Aus den gemessenen elektrophoretischen Mobilitäten (bzw. den relativen Mobilitäten i.e.  $R_f$ -Werte bezogen auf die Laufmittelfront[157]) lässt sich mit Hilfe des *Ferguson-Plots*[158] auf das hydrodynamische Volumen bzw. die Molekülgröße schließen. Dabei wird der Logarithmus der Mobilität gegen die Gelkonzentration aufgetragen. Aus der Steigung der resultierenden Geraden (bei Agarose-Gelen kann es zu konvexen Graphen kommen[159]) kann auf die Form und Größe des Moleküls geschlossen werden.

### 11.1.2 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wird als Medium der Elektrophorese statt einer Lösung ein festes Gel verwendet. Dieses Gel kann unter anderem aus vernetztem Poly(acrylamid) oder aus Agarose bestehen.[137] Diese Matrices der elektrophoretischen Trennung enthalten Poren, deren Größe von der Art und Beschaffenheit des Gels und damit von der Konzentration des Gelbildners abhängen. Das Gel wirkt als siebendes Medium, in welchem die Reibungskraft  $F_R$  (Gleichung 11.2) durch Wechselwirkungen des wandernden Teilchens mit der Gelmatrix zustande kommt.

---

<sup>1</sup>Nach Marian Ritter von Smolan Smoluchowski, 1872-1917. Der polnische Wissenschaftler war ein Pionier der statistischen Physik.



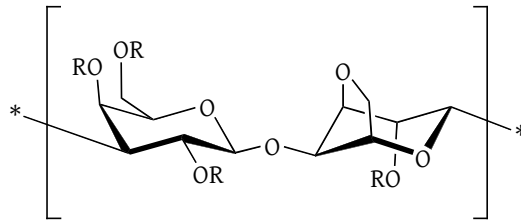


Abbildung 11.1: Chemische Struktur der Agarose.

Tabelle 11.1: Trennbereiche bei Verwendung von Agarose-Gelen.

Agarose-Konzentration	Proteinmasse	DNA-Länge
% (m/m)	g/mol bzw. Da <sup>a</sup>	bp <sup>b</sup>
2	80 000 - 40 000 000	1340
4	50 000 - 15 000 000	860
6	10 000 - 5 000 000	180

<sup>a</sup>Dalton<sup>b</sup>Basenpaare

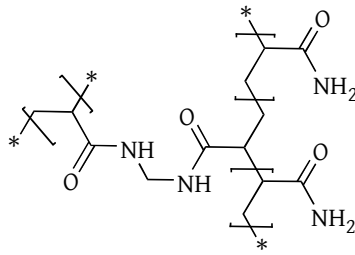
## Gelstrukturen

**Agarose** Mit D-Galaktose glycosidisch verbundene 3,6-Anhydrogalactose, Abbildung 11.1<sup>2</sup>, die sogenannte Agarose, stellt die Hauptkomponente des Agars dar und wird vor allem aus den Rotalgengattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen. Agarose ist ein starker Gelbildner und für die Gelierfähigkeit des Agars verantwortlich. Ein kurzer Überblick über die Trennbereiche verschiedener Gelkonzentrationen findet sich in Tabelle 11.1.

**Poly(acrylamid)**-Gele entstehen bei der Polymerisation von Acrylamid in Gegenwart kleiner Mengen eines bifunktionellen *Crosslinkers* wie z.B. bis<sup>3</sup>. Dabei entsteht eine dreidimensionale Netzstruktur aus Acrylamidketten, die über Methylenbisacrylamid-Einheiten vernetzt sind (Abbildung 11.2<sup>4</sup>). Weitere verwendete Vernetzer sind Piperazindiacrylat, N,N'-bisacrylcystamid und N,N'-diallyltartardiamid.

Um die Strukturen und Zusammensetzungen von Poly(acrylamid)-Gelen besser zu beschreiben, wird eine spezielle Nomenklatur eingeführt:

<sup>2</sup>Seite 159<sup>3</sup>Methylenbisacrylamid<sup>4</sup>Seite 160



**Abbildung 11.2:** Chemische Struktur der Poly(acrylamid)-Gelmatrix.

## Nomenklatur 2

**T:** Massenkonzentration aller Monomere (Acrylamid und Vernetzer)

**C:** Stoffmengen-Prozentsatz des Vernetzers bezüglich der Gesamtmenge aller Monomeren

**Beispiel:** ein 8%iges Gel mit einem  $n(\text{Acrylamid}):n(\text{Bisacrylamid})$ -Verhältnis von 19:1 hätte folgende Werte:  $T=8\%$   $C=5\%$

Tabelle 11.2 zeigt den Zusammenhang zwischen Trennbereich, Gelkonzentration und dem Verhältnis aus Monomer und Vernetzer.

### 11.1.3 Native Methoden

Die native Gelelektrophorese<sup>[160]</sup> wird unter Bedingungen durchgeführt, welche die inhärente Struktur der zu analysierenden Moleküle nicht stören – die Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Strukturen bleiben erhalten. In diesem Fall ist die elektrophoretische Mobilität einerseits durch die Masse und Ladung eines Moleküls, andererseits aber auch durch die Raumstruktur bestimmt: kompakte Strukturen erfahren weniger Reibung in der Gelmatrix als lineare oder verzweigte (ab einer gewissen Länge der Verzweigungen) Strukturen.

### Native (=nicht-denaturierende) PAGE

**Vorbereitung der Gelgießstände** Alle benötigten Teile der Gelgießstände (Platten, Abstandshalter und Käbme) werden mit Isopropanol gereinigt und zusammengesetzt (siehe Abbildung 11.3<sup>6</sup>). Mit Hilfe mehrerer Klammern wird die Konstruktion zusam-

<sup>6</sup>Seite 162

**Tabelle 11.2:** Trennbereiche bei Verwendung von Poly(acrylamid)-Gelen.

Acrylamid:bis	Gel	native DNA	denat. DNA	Protein
Verhältnis n:n'	% (m/m)	bp	bp	kDa <sup>5</sup>
19:1	4	100-1500	70-500	100-200
	6	60-600	40-400	40-150
	8	40-500	20-200	20-100
	10	30-300	15-150	15-70
	12	20-150	10-100	8-60
29:1	5	200-2000	70-800	>150
	6	80-800	50-500	50-200
	8	60-400	30-300	30-125
	10	50-300	20-200	20-100
	12	40-200	15-125	10-70
	20	<40	<40	<30
37.5:1	6			60-200
	8			50-150
	12			15-80

mengepresst und senkrecht auf ein Stück Alufolie gestellt. Mit Hilfe von 2 mL einer 1.5 %igen (m/m) Agarose-Gel-Lösung wird die Konstruktion abgedichtet.

**Herstellung von homogenen Gelen** Die benötigte Menge Acrylamid (zwischen 3 und 18 % (m/m) ) wird mit dem entsprechenden PAGE-Puffer-Konzentrat (Rezeptur VII<sup>7</sup> ohne Zugabe von SDS) in einem 100 mL Erlenmeyerkolben gemischt und mit entionisiertem Wasser auf das Endvolumen verdünnt. Nach Zugabe von APS<sup>8</sup> wird 10 Minuten im Ultraschallbad entgast und anschließend das TEMED<sup>9</sup> hinzugegeben. Die Mischung wird kurz geschwenkt und im Anschluss mit Hilfe einer Pipette in die Gelapparatur gegeben, der Kamm – zur Formung der Geltaschen in welche später die Proben gegeben werden – von oben vorsichtig in die Lösung geschoben und verdrängte Lösung nachgefüllt. Die Polymerisationszeit des Gels beträgt mindestens 3 h bei Raumtemperatur.

**Herstellung von mehrstufigen Gelen** Mehrstufige Gele werden in zwei Varianten verwendet:

<sup>7</sup>Seite 200

<sup>8</sup>Ammoniumperoxodisulfat

<sup>9</sup>N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

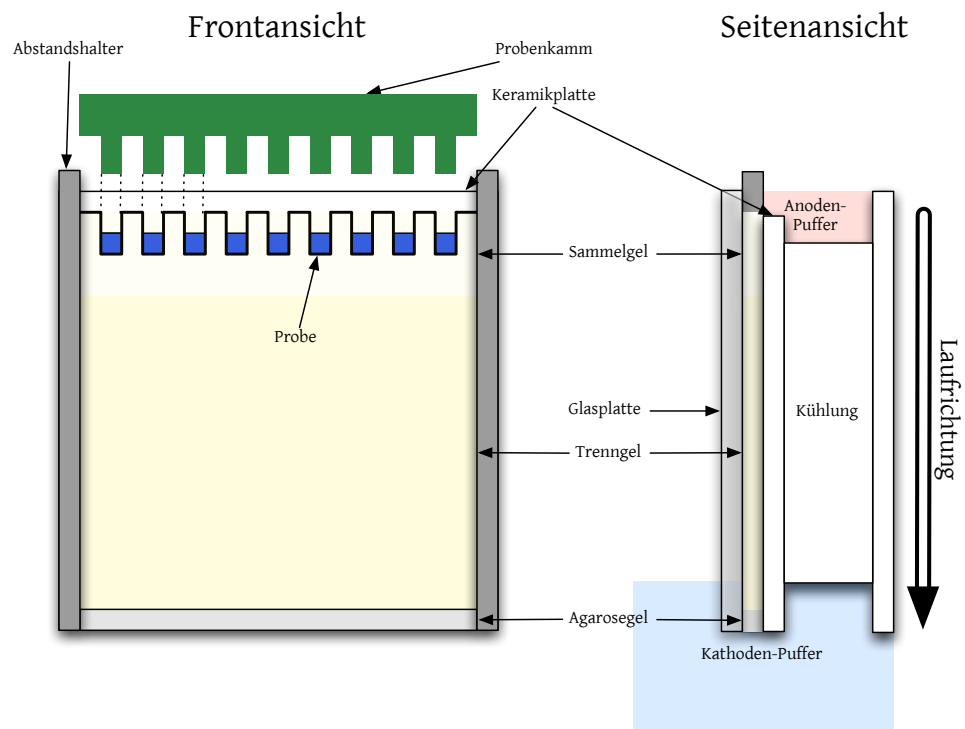


Abbildung 11.3: Poly(acrylamid)-Gele.

1. 2 Stufen: Trenngel (6-12 % (m/m) Acrylamid) und Sammelgel (3-6 % (m/m) Acrylamid) im Verhältnis 5:1 (v/v)
2. 3 Stufen: Stopgel (15 % (m/m) Acrylamid), Trenngel (6-12 % (m/m) Acrylamid) und Sammelgel (3-6 % (m/m) Acrylamid) im Verhältnis 1:4:1 (v/v/v)

Zur Herstellung wird analog der Herstellung von homogenen Gelen vorgegangen; die einzelnen Stufen werden sequentiell in absteigender Dichte gegossen (zuerst die hochprozentigen Gele) und während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet um den Kontakt der Reaktionsmischung mit Luftsauerstoff zu verringern. Nach jeweils 1.5 h wird der Alkohol dekantiert und die nächste Schicht analog polymerisiert. Bei der letzten Schicht (Sammelgel) wird der Kamm zur Formung der Probestaschen eingeführt und wie oben verfahren.

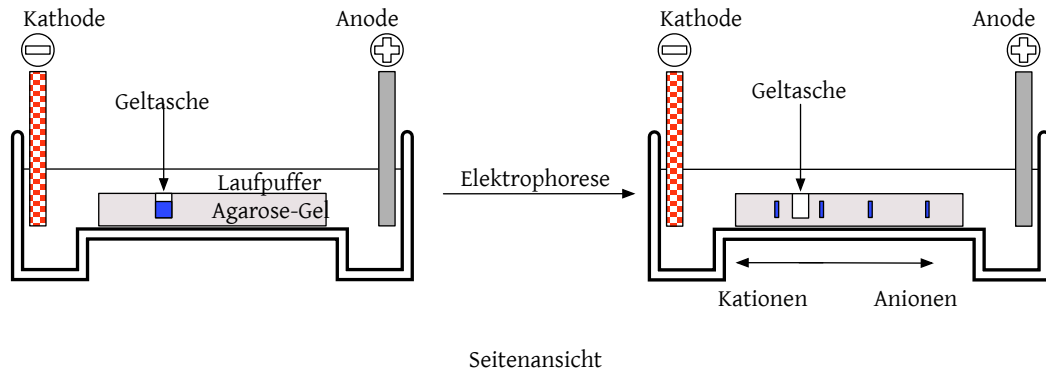
**Probenvorbereitung** Die zu analysierenden Proben werden in Wasser, TAE- oder TBE-Puffer gelöst und im Verhältnis 1:1 (v/v) mit dem konzentrierten Probenpuffer (2fach-Konzentrat, Rezeptur **XI**<sup>10</sup> ohne Zugabe von SDS) vermischt. In diesem Probenpuffer sind unter anderem blaue Farbstoffe („Tracking Dye“) enthalten, welche die Front des oberen Puffers während der Elektrophorese markieren. Pro Geltasche werden zwischen 3  $\mu$ L und 10  $\mu$ L dieser Proben aufgetragen.

**Durchführung der Elektrophorese** Die Gelträger werden aus dem Gießstand befreit und in eine horizontale Gelkammer platziert. Die Kathoden- und die Anoden-Kammern werden mit ihren jeweiligen Puffern (Rezepturen der Konzentrate siehe Anhang; Verwendung in 1X-Konzentration) aufgefüllt. Nach dem Entfernen der im Gel steckenden Kämmen werden die Proben in die Taschen der Gele pipettiert. Die Elektrophorese wird dann bei 30 mA/Gel konstant angelegtem Strom durchgeführt. Durch geeignete Farbstoffe im Probenpuffer kann der Fortgang der Elektrophorese kontrolliert werden. Die Elektrophorese wird zu dem Zeitpunkt abgebrochen, bei dem die Farbstoffbanden etwa 60 % des Gesamtweges zurückgelegt haben.

**Visualisierung der Gel-Banden** siehe Methode **11.1.5**

---

<sup>10</sup>Seite 201



**Abbildung 11.4:** Horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Die Abbildung stellt einen Querschnitt dar. Der linke Teil zeigt die Probenauftragung. Im rechten Bild ist der Zustand während der Elektrophorese zu sehen. Die Distanz der Probenbanden ist invers proportional zu ihrem Abstand vom Auftragungsort.

### native AGE

Die AGE<sup>11</sup> ist eine horizontale Methode, bei der das Gel in eine Pufferlösung gelegt wird und die Geltaschen orthogonal zur Laufrichtung ausgerichtet sind (Abbildung 11.4<sup>12</sup>).

**Herstellung der Gele** Die benötigte Menge Agarose (Endkonzentration zwischen 1 und 3% (m/m)) wird in TBE- oder TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare, schlierenfreie Lösung entsteht. Die heiße Agarose-Lösung wird unter Rühren auf etwa 60°C abgekühlt und dann in vorbereitete Gelträger gegossen, die in einem Gießstand aufgespannt und mit Kämmen zur Formung der Geltaschen versehen waren. Nach etwa 20 Minuten sind die Gele verfestigt.

**Probenvorbereitung** Die zu analysierenden Proben werden in Wasser, TAE- oder TBE-Puffer gelöst und im Verhältnis 1:1 (v/v) mit dem konzentrierten Probenpuffer (2fach-Konzentrat, Rezeptur XI<sup>13</sup> ohne Zugabe von SDS) vermischt. Pro Geltasche werden zwischen 3 µL und 10 µL dieser Proben aufgetragen.

**Durchführung der Elektrophorese** Die Gelträger werden aus dem Gießstand befreit, in eine Gelkammer platziert und mit TAE- oder TBE-Puffer überschichtet. Nach dem

<sup>11</sup> Agarose-Gelelektrophorese

<sup>12</sup> Seite 164

<sup>13</sup> Seite 201

Entfernen der im Gel steckenden Kämme werden die Proben in die Taschen der Gele pipettiert. Die Elektrophorese wird dann bei 120 V angelegter Spannung durchgeführt. Durch geeignete Farbstoffe im Probenpuffer oder mit Hilfe der UV<sup>14</sup>-Lampe kann der Fortgang der Elektrophorese kontrolliert werden.

**Visualisierung der Gel-Banden** Die in den Proben enthaltenen Substanzen werden nach einer der im Abschnitt 11.1.5 beschriebenen Methoden visualisiert.

### 11.1.4 Denaturierende Methoden

**Allgemeines** Im Gegensatz zu den nativen Methoden (beschrieben auf den Seiten 164f. bzw. 160f.), bei denen die ausgebildeten Sekundär- und Tertiärstrukturen bei der Trennung eine große Rolle spielen, trennen die denaturierenden Methoden im Regelfall (Analytik von Proteinen oder DNA) nur nach der Masse der zu untersuchenden Makromoleküle.

**Denaturierung der Proben** Erreicht werden kann die Denaturierung durch Zugabe von chaotropen<sup>15</sup> Reagenzien (z.B. Harnstoff), reaktiven Reagenzien (z.B. Formaldehyd, DTT<sup>16</sup>), Detergenzien (z.B. SDS, TWEEN) oder durch Erhitzen der Probe (meist in Verbindung mit den vorigen Reagenzien).

### SDS-PAGE

Wird PAGE<sup>17</sup> mit dem Detergenz SDS in Puffer, Gel und Probe durchgeführt, bilden sich Mizellen um die Moleküle der Probe und es stellt sich im Fall von Proteinen ein konstantes Verhältnis (1.4 g SDS pro 1 g Protein) aus negativer Ladung und Masse ein, so daß eine gleichmäßige Trennung der Proteine nach ihrer Masse ermöglicht wird.

Es wird wie oben bei der nativen PAGE beschrieben vorgegangen. Als Lauf- und Gelpuffer wurde ein Laemmli-SDS-PAGE-Laufpuffer (Rezeptur VII<sup>18</sup>) verwendet, als Probenpuffer der SDS enthaltende NOVEX-Probenpuffer (Rezeptur XI<sup>19</sup>).

---

<sup>14</sup>Ultraviolettes Licht

<sup>15</sup>chaosgenerierend; Stoffe, welche die geordnete Käfigstruktur des Wassers aufbrechen bzw. Wasserstoffbrücken lösen und damit die Denaturierung fördern.[161]

<sup>16</sup>Dithiothreitol

<sup>17</sup>Poly(acrylamid)-Gelelektrophorese

<sup>18</sup>Seite 200

<sup>19</sup>Seite 201

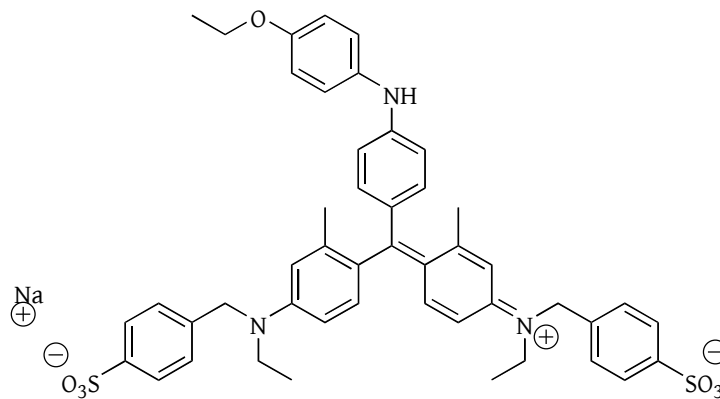


Abbildung 11.5: Coomassie Brilliant Blau.

## SDS-AGE

Es wird wie oben bei der nativen AGE beschrieben vorgegangen. Als Lauf- und Gelpuffer wurde TAE mit 1% (m/m) SDS verwendet, als Probenpuffer der SDS enthaltende NOVEX-Probenpuffer (Rezeptur XI<sup>20</sup>).<sup>[140]</sup>

### 11.1.5 Visualisierung der Gel-Banden

**Allgemeines** Da die meisten Moleküle im Gel nicht direkt mit dem Auge erkannt werden können, ist es notwendig, diese mit Hilfe einer Färbung sichtbar zu machen. Meist geschieht dies durch nicht-kovalente Bindung eines Farbstoffes an die Moleküle der einzelnen Banden. Proteine werden z.B. sehr oft mit dem Farbstoff *Coomassie-Brilliantblau* (Struktur siehe Abbildung 11.5<sup>21</sup>) eingefärbt. Dabei ist vor allem die Wechselwirkung des Farbstoffes mit den hydrophoben Bereichen der Proteine sowie die ionische Wechselwirkung zwischen dem anionischen Farbstoff und den kationischen Gruppen des Proteins verantwortlich für die Färbung, während anionische Moleküle, oder fast allgemeiner „zu hydrophile, nicht-kationische“ Moleküle nur schlecht eingefärbt werden können. Die weitestgehend gebräuchliche Alternative zur Färbung mit Farbstoffen ist die Färbung mit Silber. Beim sog. „*silver stain*“ werden Ag<sup>+</sup>-Kationen am Probenmolekül adsorbiert und mit Formaldehyd zu kolloidalem Silber reduziert. Diese Art der Färbung ist deutlich sensitiver als die Färbung mit Farbstoffen, allerdings auch deutlich aufwändiger und anfälliger in der Durchführung.

---

<sup>20</sup>Seite 201

<sup>21</sup>Seite 166



**Fluoreszenzmarkierung:** Moleküle mit fluoreszierenden Gruppen (wie z.B. TRITC (rot-orange) oder FITC (gelb-grün)) sind direkt im UV-Licht sichtbar.

**Anfärbung mit interkalierenden Farbstoffen:** Moleküle mit dsDNA oder ssDNA können mit dem Farbstoff Ethidiumbromid in fluoreszierende Interkalations-Komplexe überführt werden, welche unter UV-Bestrahlung orange-rot fluoreszieren. Das Detektionslimit für ssDNA liegt bei 10 ng/Bande, während dsDNA nur um einen Faktor 25 schlechter detektiert werden kann. Empfindlichere Farbstoffe zur Detektion von geringeren Mengen dsDNA und vor allem zur Detektion von ssDNA sind SYBRGold<sup>22</sup> (dsDNA 25 pg bzw. ssDNA 1 ng – 10fach so empfindlich wie Ethidiumbromid), VistaGreen<sup>23</sup> — beide Farbstoffe haben eine deutlich erhöhte Sensitivität im Vergleich zu Ethidiumbromid.[162]

**Anfärbung mit Ethidiumbromid:** Ethidiumbromid wird im Agarose-Gel vorgelegt. Dazu werden kurz vor dem Gießen des Gels 10  $\mu$ L einer konzentrierten Ethidiumbromid-Lösung (400  $\mu$ g/mL) pro 100 mL Gelvolumen in die heiße Agarose-Lösung gegeben. Das Gel kann direkt nach der Elektrophorese auf dem UV-Tisch untersucht werden.

**Anfärbung mit SYBRGold oder VistaGreen:** Das Gel wird nach der Elektrophorese für 20 Minuten in einer Lösung des Farbstoffes inkubiert, gewaschen und dann auf dem UV-Tisch untersucht. Zur Herstellung der Lösung wird das kommerziell erhältliche 10 000fach-Konzentrat mit TAE/TBE-Puffer 1:10 000 (v/v) verdünnt.

**Anfärbung durch Abscheiden von kolloidalem Silber (*silver stain*):** Die im Gel befindlichen Banden werden zuerst fixiert und dann mit Silbernitrat inkubiert. Dabei wird ein latentes Bild geschaffen, welches durch Adsorption von  $\text{Ag}^+$ -Kationen an die Polymermoleküle entsteht. Polymere mit Carbonsäure- oder Amin-Gruppen komplexieren die Ionen, welche im Entwicklungsschritt mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und Formaldehyd zu Silber und Silberoxid konvertiert werden. Die Färbereaktion wird durch Zugabe einer verdünnten Säure gestoppt. (siehe Anhang B<sup>24</sup>)

**Nachträgliches Färben des Gels:** Die im Gel gebundenen Banden der Analytmoleküle können auch durch nachträgliche Behandlung mit Farbstofflösungen sichtbar gemacht werden. Besonders bekannt ist das Färben von Proteinen mit *Coomas-*

<sup>22</sup>Produktbezeichnung von *Invitrogen* #S11494

<sup>23</sup>nicht mehr kommerziell verfügbar

<sup>24</sup>Seite 203

**Tabelle 11.3:** Sephadex zur Gelfiltration.

Bezeichnung	Trennbereich		Volumen ml/g
	Proteine	Dextrane	
	Da bzw. g/mol	Da bzw. g/mol	
G-15	< 1500	< 1500	3.0
G-25	1000 - 5000	100 - 5000	5.0
G-75	30 000 - 80 000	1000 - 50 000	12.0

*sie-Brilliantblau* (bindet an kationische Domänen und hydrophobe Regionen im Protein) oder Methylblau (bindet an anionische Domänen) [163, 164]. Dabei wird das Gel mehrere Stunden in einer Coomassie-Färbelösung (Rezeptur XII<sup>25</sup>) unter Schütteln inkubiert. Nach dem Abwaschen der blauen Färbelösung wird das Gel in einer Entfärbelösung (Rezeptur XIII<sup>26</sup>) entfärbt, wobei die hydrophoben Polymerbanden blau bleiben. Beim Entfärben ist darauf zu achten, daß die Lösung nach jeweils 90 Minuten erneuert werden muss.

## 11.2 Präparative Gelfiltration

### 11.2.1 Verwendete Materialien

*Sephadex:* Die verwendeten Typen von Sephadex sind in Tabelle 11.3 zusammengestellt.  
*Superdex:* Es wird Superdex 30 (Trennbereich < 10 kDa) und Superdex 75 (Trennbereich 3 kDa < 70 kDa) verwendet.

### 11.2.2 Vorgehensweise

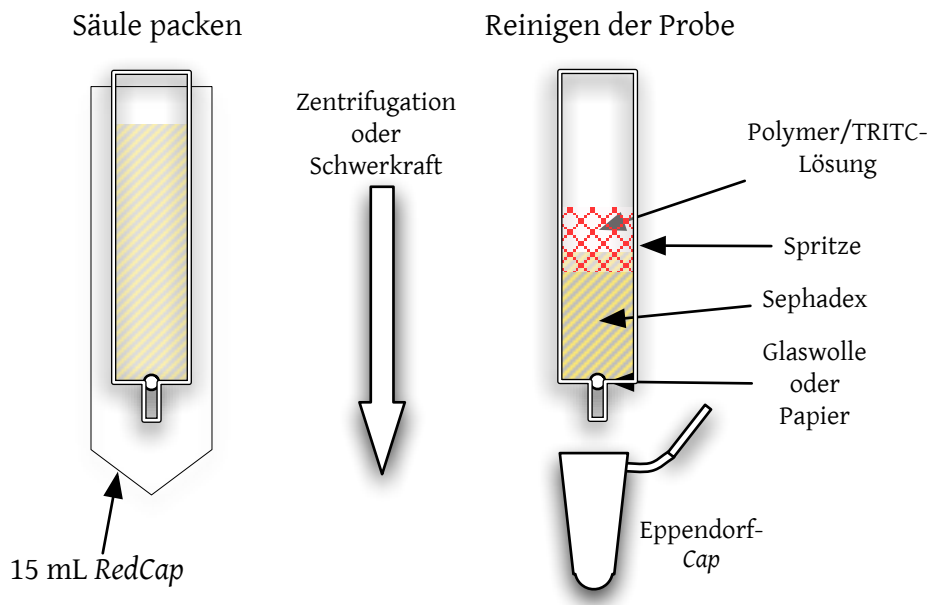
Die Reinigung eines Reaktionsansatzes von niedermolekularen Stoffen (wie z.B. Kupplungsreagenzien, Salzen und Pufferkomponenten) kann mit Hilfe einer Gelfiltration über Sephadex erfolgen.

**Vorbereitung** Dazu wird die Spitze einer 5 mL-Spritze mit einem kleinen Ball aus Filterpapier blockiert. Das Sephadex wird eine Stunde lang in Methanol gequollen. Von dieser Suspension werden dann etwa 5 mL in die Spritze gegeben. Die Spritze wird in ein 15 mL-Reaktionsgefäß (*Red-Cap*) ohne Deckel gegeben (Abbildung 11.6<sup>27</sup>) und

<sup>25</sup>Seite 201

<sup>26</sup>Seite 201

<sup>27</sup>Seite 169



**Abbildung 11.6:** Schematische Zeichnung der Versuchsausrüstung für die Gelfiltration.

15 min lang stehen gelassen. Das eluierte Methanol wird dabei nachgefüllt, so daß sich langsam ein kompakter Füllkörper bildete.

**Trennung** Die Probe wird in wässriger Lösung direkt auf die Säule gegeben und dann vorsichtig mit Methanol eluiert. Das eluierte Gemisch wird in nummerierten 1.5 mL Eppendorf-Caps aufgefangen. Die Fraktionen werden über Nacht lyophilisiert und die Proben im Anschluß in *dd*-H<sub>2</sub>O aufgenommen und direkt weiterverwendet. Für Proben, in denen DNA vorhanden ist, ist es sehr hilfreich, während der chromatographischen Trennung direkt im UV-Spektrometer die OD<sup>28</sup> der Fraktion bei  $\lambda = 260$  nm zu bestimmen, sowie wenn möglich, ebenso das gesamte UV-Spektrum von 200 nm bis 600 nm zu messen.

### 11.3 Ultrafiltration

Zur Abtrennung von niedermolekularen Stoffen können ebenfalls Ultrafiltrationskartuschen für die Zentrifuge verwendet werden. Die Einsätze stammten von *VIVAScience*

<sup>28</sup>Optische Dichte

(Sartorius Group). Produktbezeichnungen: Vivaspin 500 Polyethersulfon, MWCO 5000 bzw. 50 000.

**Vorgehensweise** Die Reaktionsmischungen werden direkt in die Einsätze gegeben und drei Mal bei 10 000 U/min konzentriert. Die Filtrate werden jeweils gesammelt und analysiert; der Rückstand wird in 100  $\mu$ L PBS aufgenommen und direkt weiter verwendet bzw. analysiert.

## 11.4 Entschützen der Thiolgruppen an der DNA

### 11.4.1 mit DTT

1. Aufnehmen des Oligonukleotids in 0.1 M TEAA-Puffer, pH = 6.5 mit einer Endkonzentration von etwa 100 AU/mL ( $A_{260}$ ).
2. Zugabe von 0.15 eq (v/v) einer 1 M AgNO<sub>3</sub>-Lösung; gut durchmischen und bei Raumtemperatur 30 min stehen lassen.
3. Anschließend 0.2 eq (v/v) einer 1 M wässrigen DTT-Lösung zugeben, gut durchmischen und wiederum bei Raumtemperatur 5 min lang stehen lassen.
4. Den Ag-DTT<sup>29</sup>-Komplex abzentrifugieren und den Überstand abnehmen. Den Niederschlag (das Pellet) mit einem Volumen 0.1 M TEAA<sup>30</sup> waschen. Erneut abzentrifugieren und den Überstand mit dem vorigen Überstand vereinen.
5. Das überschüssige DTT aus dem Überstand mittels Ultrafiltration/Gelfiltration (z.B. Vivaspin 500 PES MWCO 5000, s.o.) entfernen.
6. Das entschützte Thiol kann direkt verwendet werden. Zum Lagern sofort aliquotieren und einfrieren.

Literaturhinweise: [165, 166, 167, 168]

Problematisch hierbei ist die Verunreinigung durch niedermolekulares Thiol, welches abgetrennt werden muß.

### 11.4.2 mit Reductacryl

Besonders vorteilhaft ist die Verwendung des polymergetragerten Reduktionsmittels REDUCTACRYL (DTT ist auf einer Poly(acrylamid)-Gelmatrix immobilisiert): Die Zugabe einer niedermolekularen Substanz bzw. eines später abzutrennenden Thiols wird vermieden. Außerdem können die Oligonukleotide so direkt über einer Suspension des REDUCTACRYLS gelagert werden und stehen sofort entschützt zur Verfügung.

---

<sup>29</sup>Dithiothreitol

<sup>30</sup>Triethylammoniumacetat

**Verwendete Materialien** Cleland's REDUCTACRYL™ Reagent, Calbiochem, Cat.No. 233 175

### Vorgehensweise

1. Ein Aliquot von 10  $\mu\text{L}$  einer 1 mM Lösung (in PBS pH = 7.5) des geschützten Thiols wird mit 2 mg REDUCTACRYL vermischt.
2. Die Suspension wird bei Raumtemperatur für 1 h geschüttelt.
3. Abzentrifugieren des REDUCTACRYLS.
4. Probe aus dem Überstand abnehmen und direkt verwenden.
5. Lagerung bei 4°C über REDUCTACRYL!
6. Regeneration des REDUCTACRYLS mit  $\text{NaBH}_4$  (100 – 200 mg/g) in *dd*- $\text{H}_2\text{O}$  für 15 min. Waschen mit *dd*- $\text{H}_2\text{O}$  oder Puffer und Abfiltrieren oder Abzentrifugieren des Harzes.

## 11.5 Zellversuche

### 11.5.1 Bestimmung der Zellkonzentration mittels Trypanblau-Färbung

Die Zellen werden mit einer Lösung aus Trypanblau in PBS eingefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer<sup>31</sup> unter dem Mikroskop gezählt. Dabei werden intakte Zellen nicht eingefärbt, wohingegen defekte oder tote Zellen blau gefärbt werden. Durch Zurückrechnen kann auf die Zellkonzentration in der Stammlösung geschlossen werden.

### 11.5.2 Isolierung von PBMC

Die Isolation peripherer Blutlymphozyten (PBMC<sup>32</sup>) erfolgt aus dem Vollblut gesunder Probanden, denen bis zu 200 mL Blut abgenommen wird. In der verwendeten Spritze ist 100  $\mu\text{L}$  Heparin pro 10 mL Blut vorgelegt, um die Blutgerinnung zu unterbinden. Mittels Dichtegradientenzentrifugation über eine Ficoll-Hypaque Lösung werden die mononuklearen Zellen (Lymphozyten und Monozyten) von dem Blutserum und den Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Ficoll ist ein synthetisches Polysaccharid, welches eine spezifische Dichte von 1.077 g/mL besitzt. Erythrozyten und Granulozyten passieren aufgrund der höheren Dichte die Ficoll-Phase und sedimentieren. Dieser Prozess wird durch das Ficoll zusätzlich beschleunigt, weil es als hochpolymerer Zucker eine Agglutination der Erythrozyten bewirkt. Die mononuklearen Zellen befinden sich

<sup>31</sup>Eine Vorrichtung aus Glas mit bekanntem Volumen und einem eingravierten Raster zum leichten Auszählen der Zellen pro eingesetztem Volumen.

<sup>32</sup>Peripheral Blood Mononuclear Cells

aufgrund ihrer Dichte an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Plasma und werden dort als leicht grau-gefärbter Ring sichtbar, wohingegen sich die Thrombozyten wegen ihrer höheren Dichte oberhalb der Grenzschicht im Plasma anreichern. Da sich die Dichten teilweise überschneiden, kann eine - wenn auch geringe - Restkontamination der PBMC mit Granulozyten und Thrombozyten nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Für die PBMC-Isolation werden 15 mL Ficoll-Lösung (Raumtemperatur!) in konischen 50 mL Röhrchen (*blue caps*) vorgelegt. Das frisch abgenommene Blut wird in 50 mL *blue caps* 1:2 (v/v) mit steriler 0.9% NaCl verdünnt und dann je 35 mL verdünntes Blut vorsichtig auf die Ficoll-Phase geschichtet, wobei eine Verwirbelung von Blut und Ficoll unbedingt zu vermeiden ist. Nach dem folgenden Zentrifugationsschritt (30 Minuten, 2000 rpm, Beschleunigung 4, Bremsung 0, 20°C) wird der PBMC-Ring an der Phasengrenze Ficoll-Plasma sichtbar und kann vorsichtig abpipettiert werden. Dabei sollte möglichst wenig Ficoll überführt werden, da es eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen hat. Die aus je zwei *blue caps* gewonnenen PBMCs werden in einem neuen *blue cap* auf 50 mL mit NaCl aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (15 Minuten, 1600 rpm, Beschleunigung 4, Bremsung 1, 20°C). Nun folgen zwei weitere Waschschrte, bei denen die Überstände dekantiert, die Zellpellets aus jeweils zwei *blue caps* in einem Röhrchen zusammenpipettiert und mit NaCl resuspendiert werden bis schließlich ein Gesamtpellet im letzten *blue cap* übrig bleibt. Zentrifugiert wird 10 Minuten bei 1000 rpm<sup>33</sup>, Beschleunigung 4, Bremsung 4, 4°C. Falls erforderlich wird das Zellpellet vor dem letzten Waschschrte in 3 mL Erythrozyten-Lysepuffer (hypotoner Lysepuffer) resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eventuell störende Erythrozytenkontamination zu minimieren.

Schließlich wird das Pellet in 50 mL NaCl resuspendiert und die Zellen mit Hilfe der Neubauerzählkammer und der Trypanblaufärbung gezählt. Es werden nur solche Zellfraktionen weiterverwendet, deren Vitalität über 95% beträgt. Das bedeutet, dass mehr als 95% aufgrund ihrer intakten Zellmembran den Supravitalfarbstoff Trypanblau ausschließen und lichtmikroskopisch farblos erscheinen. Die erwartete Ausbeute an PBMCs beträgt je nach Spender im Durchschnitt circa  $10^6$  Zellen/mL Vollblut. Für PBMC-Versuche wird die gewünschte Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/mL mit Kulturmedium und 2% (v/v) autologem Serum eingestellt.

### 11.5.3 Zellkultur

PBMCs oder aufgereinigte Zellpopulationen werden in 96-Well-Mikrotiterplatten in RPMI<sup>34</sup> Vollmedium mit 2 % (v/v) autologem Serum kultiviert. Die Zellkultur wird bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>/Luft-Gemisch in einem Begasungsbrutschrank (Fa. Heraeus, Hanau, D) durchgeführt. Die Vitalität der Zellen wird durch die Trypanblaufärbung (siehe Kapitel 11.5.1 auf Seite 171) ermittelt.

PBMC werden in den Experimenten stets in der Konzentration  $2 \times 10^6$  Zellen/mL eingesetzt.

### 11.5.4 Hämolytischer Assay

Zur Bestimmung der zell-lytischen Eigenschaften von Stoffen kann der hämolytische Assay verwendet werden. Dazu werden Erythrozyten<sup>35</sup> aus menschlichem Blut isoliert (s.o. als Nebenprodukt der PBMC-Isolierung) und jeweils 400 µL dieser Lösung mit der zu untersuchenden Menge des betreffenden Stoffes inkubiert. Nach 30 Minuten Inkubation werden die Feststoffanteile abzentrifugiert und der rote und klare Überstand, welcher das aus lysierten Zellen freigesetzte Hämoglobin enthält, spektrophotometrisch gemessen. Ein interner Standard wird verwendet: Proben, die mit destilliertem Wasser bzw. einer Detergenzlösung inkubiert werden entsprechend aufgrund der vollständigen Zell-Lyse dem Wert 100 %.

### 11.5.5 Bestimmung der Zytokin-Sekretion mit einem ELISA

**Vorbereitung** Zur Bestimmung der immunologischen Aktivität der CpG-Komplexe werden Immunkzellen in Gegenwart dieser Komplexe inkubiert. Nach einer gewissen Zeit, im Normalfall 24 oder 48 Stunden, werden die Zellen abzentrifugiert und die zellfreien Überstände abgenommen. Die Konzentration des Zytokines IFN- $\alpha$  wird mit Hilfe eines spezifischen ELISA<sup>36</sup> festgestellt.

**Prinzip der Methode** Beim ELISA werden die in der Probe enthaltenen Proteine auf eine Oberfläche unspezifisch adsorbiert. Anschließend wird mit einem spezifischen Antikörper gegen das Zielprotein inkubiert, welcher dann spezifisch an dieses bindet. Zur Detektion und damit zur Quantifizierung der Menge an gebundenem Antikörper wird dieser entweder direkt oder indirekt mittels eines zweiten Antikörpers markiert.

---

<sup>34</sup>Roswell Park Memorial Institute

<sup>35</sup>Rote Blutkörperchen

<sup>36</sup>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Die Markierung ist für gewöhnlich eine Konjugation an oxidierende Enzyme wie HRP<sup>37</sup>, oder AP<sup>38</sup>, welche farblose Substrate in farbige Produkte überführen. Die Messung der Absorption der entstandenen Farbstoffe in Lösung ermöglicht so die Bestimmung der Konzentration des Zielproteins.

Das Protokoll zu diesem ELISA ist im Anhang B auf Seite 203 zu finden.

Eine schematische Darstellung dieser Methode findet sich in Abbildung 5.45<sup>39</sup>

**Auswertung** Die Messung der Absorption des Farbstoffes lässt nur eine Bestimmung seiner Konzentration zu; der genaue Zusammenhang zwischen der Farbstoffkonzentration und der Proteinkonzentration ist aber nicht so einfach zu bestimmen. Deshalb wird der ELISA als Relativmethode mit internem Standard durchgeführt: eine geometrische Verdünnungsreihe einer bekannten Probe wird als sog. *Standardkurve* parallel zu den unbekannt Proben mitbearbeitet. Aus dieser Standardkurve kann dann durch lineare Regression direkt die Proteinkonzentration der unbekannt Proben bestimmt werden. Darüberhinaus ermöglicht diese Standardkurve die Bestimmung der Standardabweichung des ELISAs; der Kalibrierungsbereich wird ebenfalls durch den Konzentrationsbereich der Standardkurve vorgegeben. Liegen Probenkonzentrationen außerhalb diese Konzentrationsbereichs, müssen Verdünnungen (im Regelfall 1:3 bis 1:10 (v/v) ) der Proben gemessen werden, um den Messfehler zu minimieren.

**Generelle Vorgehensweise** Die zellfreien Kulturüberstände werden nach der gewünschten Inkubationszeit bzw. Stimulationszeit abgenommen und bei Bedarf mit einer bestimmten Menge Medium verdünnt. Im Fall des Sandwich-ELISAs wird die 96-Well-ELISA-Platte zuerst mit einem spezifischen Antikörper beschichtet (*Coating*); die Restoberfläche, die nicht mit dem Antikörper beschichtet ist, wird mit Milchpulver oder BSA<sup>40</sup> behandelt (*Blocking*). Nach mehrmaligem Waschen wird die Probensubstanz in die Reaktionsgefäße pipettiert und mehrere Stunden inkubiert. Dabei bindet das Zielprotein spezifisch an die Antikörper auf der Plattenoberfläche. Weiteres Waschen und Beschichtung mit dem Enzym-Konjugat produziert eine katalytische Oberfläche für die Umsetzung des Substrats zum detektierbaren Farbstoff. Diese Reaktion wird anschließend durchgeführt und durch Veränderung des pH-Wertes abgebrochen, wenn eine deutliche Farbe in der Standardkurve erkennbar ist. Im Multi-Well-Reader wird

---

<sup>37</sup>Meerrettich-Peroxidase

<sup>38</sup>Alkalische Phosphatase

<sup>39</sup>Seite 127

<sup>40</sup>Bovine Serum Albumin



### 11.5 Zellversuche

dann für jedes *Well* der Platte die Absorption des Farbstoffs gemessen. Diese Daten werden dann in eine vorbereitete Excel-Datei überführt und dort ausgewertet (s.o.).



# 12 Synthesen

## 12.1 Synthese der Monomeren

### 12.1.1 *N*-Boc-6-Aminohexansäure

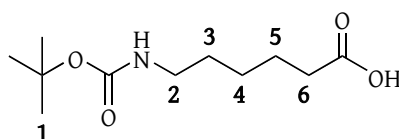
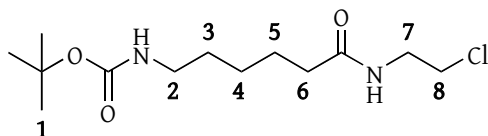
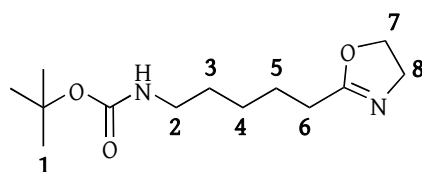


Abbildung 12.1: *N*-Boc-6-Aminohexansäure (2)

Vorschrift	34.04 g (259.5 mmol) 6-Aminohexansäure werden in einer Mischung aus 200 mL Dioxan, 100 mL H <sub>2</sub> O und 50 mL einer gesättigten Lösung aus Natriumhydroxid in Wasser teilweise gelöst und auf 0°C gekühlt. Unter Rühren werden 56.63 g Boc-Anhydrid zugegeben und bei 0°C für 20 h gerührt. Dabei fällt ein weißer Niederschlag aus, der sodann abfiltriert wird. Die wässrige Phase wird mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> vorsichtig angesäuert und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit dem Feststoff vereint, das Lösemittel entfernt und das Produkt getrocknet.
Ausbeute	58 g (97% d. Th.) weißer Feststoff.
Molmasse	231.3 g/mol; C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>
NMR	<sup>1</sup> H in DMSO: δ/ppm = 1.55 (s, <b>1</b> , 9H), 1.8-1.3 (br m, <b>3-5</b> , 6H), 2.45 (t, <b>6</b> , 2H), 3.05 (q, <b>2</b> , 2H), 3.8 (s, NH), 7.9 (br, COOH), <sup>13</sup> C in DMSO: δ/ppm = 24 ( <b>5</b> ), 26 ( <b>4</b> ), 29 ( <b>1</b> ), 30 ( <b>3</b> ), 35 ( <b>6</b> ), 67 ( <b>2</b> ), 77 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 156 (NHCOOR), 175 (COOH).

12.1.2 *N*-Boc-6-Aminohexansäure-2-ChlorethylamidAbbildung 12.2: *N*-Boc-6-Aminohexansäure-2-Chlorethylamid (**3**).

Vorschrift	50.9 g (220 mmol) der Verbindung ( <b>2</b> ) werden in 600 mL Dichlormethan gelöst; darin suspendiert man 25.560 g (1 eq.) 2-Chlorethylamin-Hydrochlorid und 42.13 g (1 eq.) EDC-Hydrochlorid. Die Suspension wird mit einem starken Rührer gerührt und auf $-78^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Langsames Zutropfen von 66 g Triethylamin (3 eq.) führt zu einer sichtbaren Reaktion, in deren Verlauf ein feiner, weißer Niederschlag ausfällt. Die Suspension wird 20 h gerührt und während dieser Zeit langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Zugabe von 500 mL $\text{H}_2\text{O}$ löst den Niederschlag und die organische Phase wird abgetrennt und mit angesäuertem Wasser gewaschen und anschließend mit $\text{Na}_2\text{SO}_4$ getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels verbleibt ein rosa-orange-farbenes Öl.
Ausbeute	59.06 g (91 % d. Th.)
Molmasse	292.8 g/mol; $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_3$
NMR	$^1\text{H}$ in DMSO: $\delta/\text{ppm} = 1.55$ (s, <b>1</b> , 9H), 1.8-1.3 (br m, <b>3-5</b> , 6H), 2.45 (t, <b>6</b> , 2H), 3.05 (q, <b>2</b> , 2H), 3.45 (t, <b>7</b> , 2H), 3.75 (t, <b>8</b> , 2H).

12.1.3 2-(*N*-Boc-5-Aminoheptyl)-2-OxazolinAbbildung 12.3: 2-(*N*-Boc-5-Aminoheptyl)-2-Oxazolin (MN).

Vorschrift	32 g der Verbindung ( <b>3</b> ) werden in 50 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 25 g $\text{K}_2\text{CO}_3$ wird die Suspension 5 h bei $80^{\circ}\text{C}$ gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert und die DMF-Phase eingengt. Eine Säulenchromatographie
------------	---

(Kieselgel, Ethylacetat : Hexan : Triethylamin = 15 : 2 : 1 (v/v/v); Detektion auf der Dünnschichtchromatographieplatte mit einer sauren Ninhydrin-Lösung und anschließendem Erhitzen) liefert ein sauberes Produkt ( $R_f=0.8$ ).

Ausbeute	27.52 g (86 % d. Th.) eines leicht gelblichen Öls
Molmasse	256.3 g/mol; $C_{13}H_{24}N_2O_3$
NMR	$^1H$ in DMSO: $\delta$ /ppm = 1.55 (s, <b>1</b> , 9H) 1.3-1.8 (br m, <b>3-5</b> , 6H), 2.4 (t, <b>6</b> , 2H), 3.0 (q, <b>2</b> , 2H), 3.8 (t, <b>8</b> (J = 9.5 Hz) ), 4.2 (t, <b>7</b> , (J = 9.5 Hz) ), 6.9 (br, OCONH), $^{13}C$ in DMSO: $\delta$ /ppm = 25 ( <b>5</b> ) 26 ( <b>4</b> ), 27 ( <b>3</b> ), 28 ( <b>1</b> ), 30 ( <b>6</b> ), 45 ( <b>2</b> ), 54 ( <b>8</b> ), 67 ( <b>7</b> ), 77 (C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 156 (NHCOOR), 167 (CON Oxazolin).

#### 12.1.4 Bernsteinsäuremonomethylester-2-chlorethylamid

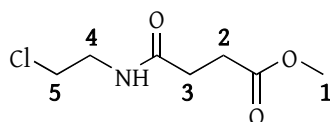


Abbildung 12.4: Bernsteinsäuremonomethylester-2-chlorethylamid (4).

Vorschrift	20.6 g (115 mmol) Bernsteinsäuremonomethylesterchlorid und 13.36 g (115 mmol) 2-Chlor-ethylammonium-hydrochlorid werden in 200 mL trockenem Dichlormethan suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Unter Kühlung bei 0 °C wird 26 g (260 mmol) Triethylamin langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 45 min bei 0 °C gerührt, dann auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht weiter gerührt. Nach Zugabe von 50 mL Wasser wird die organische Phase abgetrennt, gewaschen, und über Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels erhält man ein hellgelbes Öl.
Ausbeute	16.9 g (76 % d. Th.)
Molmasse	193.63 g/mol; $C_7H_{12}ClNO_3$
NMR	$^1H$ in DMSO: $\delta$ /ppm = 2.2 (t, <b>3</b> , 2H) 2.3 (t, <b>2</b> , 2H), 3.55 (m, <b>4,5</b> , 4H), 3.6 (s, <b>1</b> , 3H), 6.6 (s, NH 1H).

## 12.1.5 2-(Propionsäuremethylester)-2-oxazolin

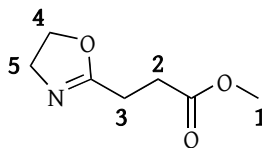
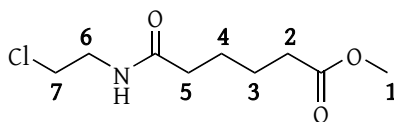


Abbildung 12.5: 2-(Propionsäuremethylester)-2-oxazolin (MO2).

Vorschrift	17.6 g (79 mmol) der Verbindung ( <b>5</b> ) wird mit 6.5 g (60 mmol) wasserfreiem $\text{Na}_2\text{CO}_3$ vermennt und im Feinvakuum vorsichtig erhitzt. Es kommt zu einem starken Schäumen. Nach dem Ende der Gasentwicklung wird das Produkt abdestilliert (Ölbad $>160^\circ\text{C}$ ). Nach dem Abkühlen erhält man das Oxazolin als klares Öl.
Ausbeute	7.2 g (58 % d. Th.)
Molmasse	157.17 g/mol; $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_3$
NMR	$^1\text{H}$ in DMSO: $\delta/\text{ppm} = 2.2$ (t, <b>3</b> , 2H) 2.3 (t, <b>2</b> , 2H), 3.6 (s, <b>1</b> , 3H), 3.74 (t, <b>4</b> , 2H), 4.15 (t, <b>5</b> , 2H).

## 12.1.6 Adipinsäuremonomethylester-2-chlorethylamid

Abbildung 12.6: Adipinsäuremonomethylester-2-chlorethylamid (**5**).

Vorschrift	20.6 g (115 mmol) Adipinsäuremonomethylesterchlorid und 13.36 g (115 mmol) 2-Chlor-ethylammonium-hydrochlorid werden in 200 mL trockenem Dichlormethan suspendiert und auf $0^\circ\text{C}$ gekühlt. Unter Kühlung werden 26 g (260 mmol) Triethylamin langsam zugetropft, weitere 45 min bei $0^\circ\text{C}$ gerührt und dann auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht weiter gerührt. Nach Zugabe von 50 mL Wasser wird die organische Phase abgetrennt, gewaschen, und über $\text{Na}_2\text{SO}_4$ getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels erhält man ein hellgelbes Öl.
Ausbeute	19.3 g (76 % d. Th.) hellgelbes Öl.
Molmasse	178.61 g/mol; $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{ClO}_3$

NMR  $^1H$  in DMSO:  $\delta/ppm = 1.6$  (m, **3,4**, 4H), 2.2 (t, **5**, 2H) 2.3 (t, **2**, 2H), 3.55 (m, **6,7**, 4H), 3.6 (s, **1**, 3H), 6.6 (s, NH 1H).

### 12.1.7 2-Pentansäuremethylester-2-oxazolin

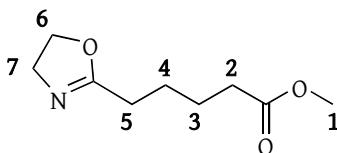


Abbildung 12.7: 2-Pentansäuremethylester-2-oxazolin (MO4).

Vorschrift 17.6 g (79 mmol) der Verbindung (**5**) werden mit 6.5 g (60 mmol) wasserfreiem  $Na_2CO_3$  vermengt und im Feinvakuum vorsichtig erhitzt. Es kommt zu einem starken Schäumen. Nach dem Ende der Gasentwicklung wird das Produkt abdestilliert (Ölbad  $>160^\circ C$ ). Nach dem Abkühlen erhält man das Oxazolin als weißen Feststoff (Schmelzpunkt ca.  $10^\circ C$ ).

Ausbeute 8.7 g (60% d. Th.)

Molmasse 185.22 g/mol;  $C_9H_{15}NO_3$

EA ber.: C = 58.36 H = 8.16 N = 7.56 gef.: C = 58.15, H = 8.00, N = 7.66

NMR  $^1H$  in DMSO:  $\delta/ppm = 1.6$  (m, **3,4**, 4H), 2.25 (m, **2,5**, 4H) 3.6 (s, **1**, 3H), 3.75 (m, **7**, 2H), 4.15 (m, **6**, 2H),

### 12.1.8 2-Ethylphenyl-2-oxazolin

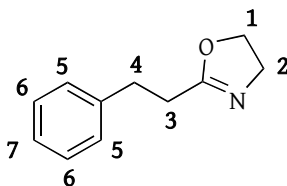


Abbildung 12.8: 2-Ethylphenyl-2-oxazolin (MF).

Vorschrift In einen ausgeheizten Rundkolben (250 mL) werden unter Stickstoffatmosphäre 60 mL THF gegeben und auf  $-78^\circ C$  gekühlt. Anschließend gibt man 13 mL (30 mmol) einer 2.5 M Lösung von Butyllithium in Hexan und 4 mL TMEDA<sup>1</sup> hinzu und rührt für 15 min. 2.07 g (23.5 mmol)

<sup>1</sup> $N,N,N',N'$ -Tetramethyldiamin

2-Methyl-2-oxazolin werden langsam zugetropft und die Reaktionsmischung weitere 2 h in der Kälte gerührt. Dann tropft man langsam eine Lösung aus 3 mL (25 mmol) Benzylbromid in 20 mL THF hinzu und rührt weitere 2 h in der Kälte. Das Lösemittel wird abgetrennt, der Rückstand mit Wasser und Dichlormethan ausgeschüttelt und das Produkt destilliert.

Ausbeute	2.46 g (60 % d. Th.)
Molmasse	175.2 g/mol; C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO
NMR	<sup>1</sup> H in CDCl <sub>3</sub> : δ/ppm = 2.5 (t, <b>3</b> , 2H), 3.0 (t, <b>4</b> , 2H), 3.7 (t, <b>1</b> , 2H), 4.3 (t, <b>2</b> , 2H), 7.2 (m, <b>5-7</b> , 5H). <sup>13</sup> C in CDCl <sub>3</sub> : δ/ppm = 38 ( <b>3</b> ), 39 ( <b>4</b> ), 60 ( <b>2</b> ), 75 ( <b>1</b> ), 132, 135 ( <b>5-7</b> ), 148 (quartäres C <sub>aromat</sub> ), 175 (NCO).

## 12.2 Synthese der Terminatoren

### 12.2.1 N-Maleinsäuremonoamido-6-aminohexansäure

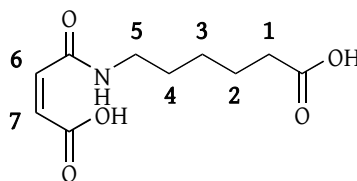
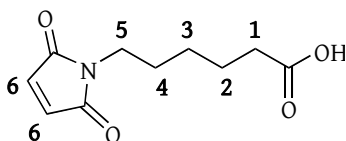


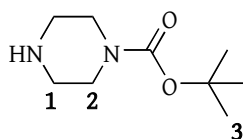
Abbildung 12.9: *N*-Maleinsäuremonoamido-6-aminohexansäure (**6**).

Vorschrift	4.45 g (0.05 mol) Maleinsäureanhydrid werden in 40 mL DMF gelöst. Dazu gibt man 6.71 g (0.051 mol) 6-Aminohexansäure und rührt, bis sich die Säure gelöst hat. Im Anschluss wird das Lösemittel entfernt und das Rohprodukt direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.
Ausbeute	11.4 g (99 % d. Th.)
Molmasse	229.2 g/mol; C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub>
NMR	<sup>1</sup> H in DMSO: δ/ppm = 1.5 (m, <b>3</b> , 2H) 1.7 (m, <b>2,4</b> , 4H), 2.4 (m, <b>1</b> , 2H), 3.4 (m, <b>5</b> , 2H), 6.4 (d, <b>7</b> , 1H), 6.6 (d, <b>6</b> , 1H), 9.3 (br, 1H).



12.2.2 *N*-Maleinimido-6-aminohexansäureAbbildung 12.10: *N*-Maleinimido-6-aminohexansäure (TS).

- Vorschrift 32 g (0.152 mmol) des Maleinsäuremonoamids (**6**) werden in 500 mL trockenem Toluol und 35 g (2 eq.) Triethylamin suspendiert. Man refluxiert diese Mischung am Wasserabscheider unter heftigem Rühren für 1 h. Nach dem Abkühlen wird die Toluolphase von dem vorliegenden Feststoff bzw. zähflüssigen Öl dekantiert. Am Rotationsverdampfer wird aus dieser Phase das Toluol abdestilliert, dem verbliebenen Feststoff bzw. zähflüssigen Öl wieder zugesetzt und die so entstandene Suspension weiter refluxiert. Nach dreimaligem Wiederholen dieser Extraktion werden alle Rückstände der Toluol-Destillationen vereint, in Ethylacetat gelöst und mit Wasser (pH = 2) extrahiert. Die organische Phase wird isoliert, getrocknet und das Lösemittel entfernt. Es verbleibt ein zähes, gelbes Öl.
- Ausbeute 5 g (16 % d. Th.) eines zähen gelben Öls.
- Molmasse 211.2 g/mol; C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>
- NMR <sup>1</sup>H in CDCl<sub>3</sub>: δ/ppm = 1.0 (m, **3**, 2H) 1.4 (m, **2,4**, 4H), 2.0 (m, **1**, 2H), 3.3 (m, **5**, 2H), 6.5 (s, **7**, 2H), 10.9 (br, COOH, 1H).

12.2.3 *N*-Boc-PiperazinAbbildung 12.11: *N*-Boc-Piperazin (**1**).

- Vorschrift 12.99 g (174 mmol) Piperazin werden in 70 mL Dioxan mit einigen Tropfen Wasser gelöst. Unter Rühren werden langsam 4.91 g (22 mmol) Boc-Anhydrid (gelöst in 145 mL Dioxan) zugegeben und das Gemisch zwei

Tage gerührt. Das Lösemittel wird im Grobvakuum abdestilliert, der Feststoff in 50 mL Dichlormethan gelöst und mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösemittel entfernt. Man erhält 3.44 g eines hygroskopischen, gelblich-weißen Feststoff.

Ausbeute	3.44 g (81 % d. Th.)
Molmasse	186.3 g/mol; $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$
NMR	$^1\text{H}$ in $\text{CDCl}_3$ : $\delta/\text{ppm} = 1.23$ (s, <b>3</b> , 9H) 2.56 (t, <b>1</b> , 4H, ( $J = 4.8$ Hz) ), 3.14 (t, <b>2</b> , 4H, ( $J = 5.0$ Hz) ), 3.45 (a, <b>NH</b> , 1H). $^{13}\text{C}$ in DMSO: $\delta/\text{ppm} = 28.6$ ( <b>3</b> ), 46.1 ( <b>1</b> ), 67.2 ( <b>2</b> ), 79.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 154.9 (NCOO).

#### 12.2.4 N-Boc-4-Aminobenzoesäure

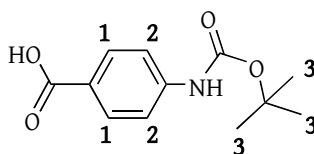


Abbildung 12.12: N-Boc-4-Aminobenzoesäure (**7**).

Vorschrift	4.112 g (30 mmol) 4-Aminobenzoesäure und 6.547 g (30 mmol) Boc-Anhydrid werden in 100 mL Methanol gelöst. Die leicht gelbe Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wird eingengt und der Rückstand in 50 mL Methanol aufgenommen. Bei Zugabe von 50 mL Wasser fällt eine weiß-oranger Feststoff aus, der abgetrennt wird. Nach Zugabe von 30 mL Dichlormethan und 10 mL Aceton wird die organische Phase mit Wasser gewaschen und mit $\text{Na}_2\text{SO}_4$ getrocknet. Das Lösemittel wird entfernt und der Rückstand mit dem zuvor ausgefällten Produkt vereint. Nach weiterem Trocknen im Feinvakuum erhält man einen hellorange-gefärbten Feststoff.
Ausbeute	4.98 g (69.9 % d. Th.) helloranger Feststoff.
Molmasse	237.3 g/mol; $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$
NMR	$^1\text{H}$ in DMSO: $\delta/\text{ppm} = 1.5$ (s, <b>3</b> , 9H), 7.55 (m, <b>2</b> , 2H), 7.85 (m, <b>1</b> , 2H), 9.85 (br, COOH).

## 12.2.5 4-Maleinsäuremonoamido-Benzoesäure

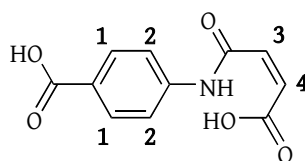


Abbildung 12.13: 4-Maleinsäuremonoamido-Benzoesäure (8).

Vorschrift	1.37 g 4-Aminobenzoesäure (10 mmol) und 0.98 g Maleinsäureanhydrid (10 mmol) werden in DMF suspendiert und bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Lösen gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels fällt eine weißer Feststoff aus.
Ausbeute	2.2 g (95 % d. Th.)
Molmasse	235.2 g/mol; C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>
NMR	<sup>1</sup> H in DMSO: δ/ppm = 6.4 (d, <b>3</b> , 1H), 6.6 (d, <b>4</b> , 1H), 7.8 (d, <b>2</b> , 2H), 8.0 (d, <b>1</b> , 2H), 11 (s, <b>NH</b> ), 12.8 (br, <b>COOH</b> ).

## 12.2.6 4-Maleinimido-Benzoesäure

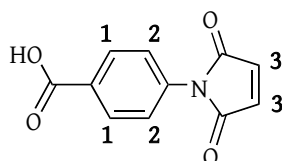


Abbildung 12.14: 4-Maleinimido-Benzoesäure (TSar).

Vorschrift	34.7 g (147 mmol) der Verbindung (8) werden in 200 mL Toluol suspendiert und mit 51 mL Triethylamin versetzt. Man refluxiert diese Mischung am Wasserabscheider unter heftigem Rühren für 1 h. Nach dem Abkühlen wird die Toluolphase von dem vorliegenden Feststoff bzw. zähflüssigen Öl dekantiert. Am Rotationsverdampfer wird aus dieser Phase das Toluol abdestilliert, dem verbliebenen Feststoff bzw. zähflüssigen Öl wieder zugesetzt und die so entstandene Suspension weiter refluxiert. Nach dreimaligem Wiederholen dieser Extraktion werden alle Rückstände der Toluol-Destillationen vereint, in Ethylacetat gelöst und mit Wasser (pH = 2) extrahiert. Die organische Phase wird
------------	---

## 12 Synthesen

isoliert, getrocknet und das Lösemittel entfernt. Man erhält einen gelben Feststoff.

Ausbeute 3.3 g (10.2 % d. Th.)

Molmasse 217.2 g/mol; C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub>

NMR <sup>1</sup>H in DMSO: δ/ppm = 6.3 (d, **1**, 2H), 6.8 (d, **2**, 2H), 6.95 (s, **3**, 2H).

## 12.3 Synthese der Initiatoren

### 12.3.1 Pentaerythritol-tetrakis(triflat)

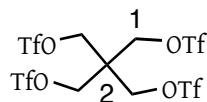


Abbildung 12.15: Pentaerythritol-tetrakis(triflat) (I4).

**Vorschrift** 1.0 g (7.35 mmol) Pentaerythritol wird in 10 mL eines Gemischs aus Pyridin und Acetonitril im Verhältnis 5:8 (v/v) gelöst und auf 0°C gekühlt. 10 g (35 mmol, 5 eq.) Trifluorsulfonsäureanhydrid werden unter Wasserausschluss und unter Eiskühlung während 1 h sehr langsam zuge tropft und weitere 2 h bei 0°C gerührt. Die Lösung färbt sich während dieser Zeit von farblos klar über gelb ins Rötliche. Die Reaktion wird durch Zugabe von 25 mL einer 3%igen (m/m) HCl-Lösung gestoppt und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei fällt ein orange-gelber Niederschlag aus, der abgetrennt und aus Wasser/Acetonitril umkristallisiert wird.

**Ausbeute** 2.31 g (47% d. Th.) weiße Kristalle

**Molmasse** 664.6 g/mol; C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub>F<sub>12</sub>

**NMR** <sup>1</sup>H in CH<sub>3</sub>CN: δ/ppm = 5.15 (1),  
<sup>13</sup>C in CH<sub>3</sub>CN: δ/ppm = 70.6 (1), 117 (CF<sub>3</sub>).

### 12.3.2 N-Methyl-methyloxazolinium-triflat

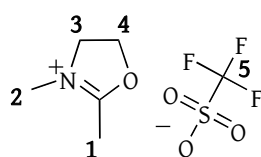


Abbildung 12.16: N-Methyl-methyloxazolinium-triflat (I1).

**Vorschrift** Unter Eiskühlung wird eine Lösung von 2-Methyl-2-oxazolin (23.16 mmol) in 16 mL Diethylether zu einer Lösung von 3 mL Trifluorsulfonsäureanhydrid (27.67 mmol) getropft. Der Ansatz wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt, bis sich das ausgefallene Produkt wieder löst. Nach Zugabe

von weiteren 60 mL Diethylether kristallisiert bei 4°C über Nacht das farblose Produkt aus, das abfiltriert, zweimal mit je 30 mL Diethylether gewaschen und getrocknet wird.

Ausbeute 1.58 g (10.5 % d. Th.)

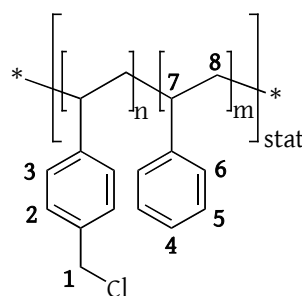
Molmasse 249.2 g/mol; C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>4</sub>S

NMR <sup>1</sup>H in DMSO: δ/ppm = 2.4 (s, **1**, 3H) 3.4 (s, **2**, 3H), 4.2 (t, **3**, 2H), 4.9 (t, **4**, 2H).

### 12.3.3 Lineare Makroinitiatoren auf Basis von Poly(styrol-*stat*-chlormethylstyrol)

**Allgemeine Arbeitsvorschrift** Die linearen Makroinitiatoren wurden nach der DPE-Methode hergestellt. Dazu werden 88 mmol einer Mischung aus Styrol und 4-Chlormethylstyrol zusammen mit 42 mg (0.26 mmol) AIBN und 46 μl (0.26 mmol) 1,1-Diphenylethen in 32 mL Toluol gelöst und im Druckkolben für 3 d bei 80°C gerührt. Das erhaltene Polymer wird in Methanol ausgefällt und abgetrennt, in Chloroform aufgenommen und erneut in Methanol gefällt, abgetrennt und getrocknet. Der Gehalt an Chlormethyl-Einheiten im Polymer wird aus dem Integralverhältnis der Signale der Aromaten im <sup>1</sup>H-NMR -Spektrum, der Chlormethylgruppe und des Rückgrats ermittelt. Eine Elementaranalyse ermöglicht die Bestimmung des Chlorgehalts.

#### Linearer Makroinitiator PS-*stat*-CMS



**Abbildung 12.17:** Linearer Makroinitiator PS-*stat*-CMS (**Mi**) (mit n,m); (**Mi80**) mit n:m = 1:2,46 ; (**Mi50**) mit n:m = 1:1.

(**Mi80**)

Ausbeute 3.7 g (37 % d. Th.) weißes Pulver

Struktur n:m = 1:2,46 (theor. 1:3)

## 12.4 Weitere niedermolekulare Verbindungen

GPC in  $\text{CHCl}_3$ :  $\overline{M}_n = 20\,000 \text{ g/mol}$  PDI = 1.85

DP 170, dies entspricht im Mittel 50 Cl-Atome/Kette

NMR  $^1\text{H}$  in DMSO:  $\delta/\text{ppm} = 1.2$  bis  $1.7$  (br s, **8**,  $2\text{H} \cdot (n + m)$ )  $1.7$  bis  $2.4$  (br s, **7**,  $1\text{H} \cdot (n + m)$ )  $4.5$  (br s, **1**,  $2\text{H} \cdot n$ )  $6.2$  bis  $7.5$  (br m, **2-6**).

IR  $\nu = 3024, 2919, 2848, 1600, 1582, 1510, 1492, 1450, 1420, 1313, 1263, 1213, 1181, 1154, 1110, 1070, 1027, 964, 909, 822, 756, 697, 674$ .

(Mi50)

Ausbeute 5.5 g (43 % d. Th.) weißes Pulver

Struktur n:m = 1:1 (theor. 1:1)

GPC in  $\text{CHCl}_3$ :  $\overline{M}_n = 18\,600 \text{ g/mol}$  PDI = 1.75

DP 180, dies entspricht im Mittel 80 Cl-Atome/Kette

NMR  $^1\text{H}$  in DMSO:  $\delta/\text{ppm} = 1.2$  bis  $1.7$  (br s, **8**,  $2\text{H} \cdot (n + m)$ )  $1.7$  bis  $2.4$  (br s, **7**,  $1\text{H} \cdot (n + m)$ )  $4.5$  (br s, **1**,  $2\text{H} \cdot n$ )  $6.2$  bis  $7.5$  (br m, **2-6**).

IR  $\nu = 3024, 2919, 2848, 1600, 1582, 1510, 1492, 1450, 1420, 1313, 1263, 1213, 1181, 1154, 1110, 1070, 1027, 964, 909, 822, 756, 697, 674$ .

## 12.4 Weitere niedermolekulare Verbindungen

### 12.4.1 3-Maleinimido-propansäure-succinimid

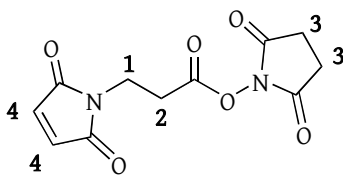


Abbildung 12.18: 3-Maleinimido-propansäure-succinimid (**9**).

Vorschrift 4.9 g (50 mmol) Maleinsäureanhydrid werden in 50 mL DMF gelöst. Dazu werden 4.45 g (50 mmol)  $\beta$ -Alanin gegeben und solange gerührt bis sich alles gelöst hat. In diese Reaktionsmischung werden nun 21 g DCC

und 7 g NHS<sup>2</sup> gegeben und 2 h bei 0 °C gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, die organische Phase mit Ethylacetat ausgeschüttelt und das Produkt aus Hexan/Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute 3.4 g (26 % d. Th.)

Molmasse 266.2 g/mol; C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

NMR <sup>1</sup>H in DMSO: δ/ppm = 2.75 (s, **3**, 4H) 3.1 (t, **2**, 2H), 3.75 (t, **1**, 2H), 7.0 (s, **4**, 2H).

### 12.4.2 3-Maleinimido-buttersäure-succinimid

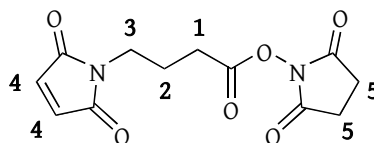


Abbildung 12.19: 3-Maleinimido-buttersäure-succinimid (**10**).

Vorschrift Analog der Synthese des 3-Maleinimido-propansäure-succinimids

Ausbeute 4.21 g (33 % d. Th.)

Molmasse 280.2 g/mol; C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

NMR <sup>1</sup>H in DMSO: δ/ppm = 1.3 (m, **2**, 2H) 2.75 (s, **5**, 4H), 3.1 (t, **1**, 2H), 3.75 (t, **3**, 2H) 7.0 (s, **4**, 2H),

---

<sup>2</sup>N-Hydroxysuccinimid



## 12.5 Synthese der Polymere

**Anmerkung** Die folgenden Polymersynthesen sind, *pro Typus*, jeweils nur mit einem Beispiel angegeben; im Anhang findet sich eine Tabelle mit den realisierten Varianten und deren korrespondierenden Daten.

### 12.5.1 Polymerisation von 2-Oxazolinen

**Bemerkung zu den verwendeten Chemikalien** Die Lösemittel wurden jeweils über  $\text{CaH}_2$  getrocknet, destilliert und über Molekularsieb unter Stickstoff gelagert. Die Monomere wurden soweit möglich wasserfrei gehalten und/oder frisch destilliert.

**Gross [133]** hat gezeigt, daß reines  $\text{H}_2\text{O}$  kein effektives Terminationsreagenz für die Polymerisation darstellt; hingegen das  $\text{OH}^-$ -Ion sehr schnell zu einer Termination der Reaktion führt — es ist demnach zu vermeiden, daß Spuren einer Base in Verbindung mit Wasser im Reaktionsgemisch zu finden sind.

**Allgemeine Versuchsvorschrift** Der Initiator wird im Lösemittel gelöst und auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt. Der kalten Lösung wird die Monomermischung für den ersten Block zugegeben, der Behälter druckdicht verschlossen und in das vorgeheizte Ölbad gegeben. Am Ende der Reaktionszeit wird die Reaktionsmischung wiederum auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt. Dann wird entweder das Monomergemisch für den nächsten Block zugegeben und wie oben verfahren, oder es wird das Terminationsreagenz im drei- bis zwanzigfachen Überschuß zugegeben und drei bis zwanzig Stunden gerührt; dann wird etwas  $\text{K}_2\text{CO}_3$  hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des Carbonats wird das Lösemittel entfernt, der feste Rückstand in etwas Lösemittel aufgenommen und das Polymer in kaltem Diethylether ausgefällt (und evtl. über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  nachgefällt). Das Polymer wird abfiltriert, in etwas Methanol aufgenommen, mit Benzol vermengt, mit flüssigem Stickstoff gefroren und im Feinvakuum gefrieretrocknet.

NMR  $^1\text{H}$  in  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta/\text{ppm} = 1.8\text{-}2.2$  (br,  $\text{CH}_3$  des Methyloxazolins) 3.2-3.6 (br,  $\text{CH}_2$  des Polymer-Rückgrats)

## 12.5.2 Bürstenpolymere

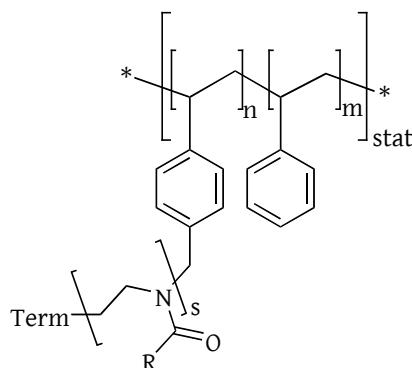


Abbildung 12.20: Bürstenpolymere (11).

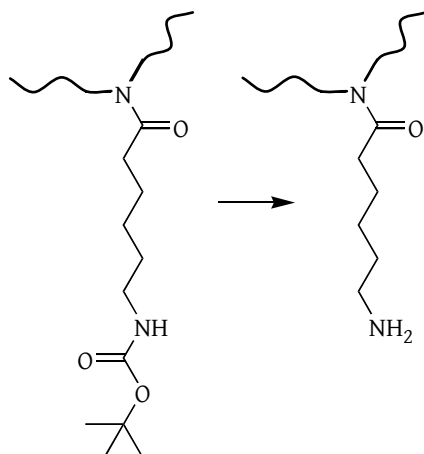
**Anmerkung** Bürstenpolymere, die auf einem hydrophoben Initiortypen (**Mi**) (siehe 12.3.3) und hydrophilen Monomeren wie 2-Methyl- oder 2-Ethyl-2-oxazolin basieren, sind amphiphil. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Polymertypen sind erst dann fällbar und damit handhabbar, wenn die Länge der Oxazolin-Bürstenarme 30 oder mehr Monomereinheiten beträgt.

**Synthesebeispiel**

**Vorschrift** 360 mg (1.177 mmol Cl) des Initiators (**Mi50**), 194 mg Kaliumjodid und 3 g 2-Methyl-2-oxazolin werden in einem ausgeheizten Druckkolben unter Stickstoffatmosphäre in 20 mL trockenem Benzonitril bei 0°C gelöst und in ein auf 90°C vorgeheiztes Ölbad überführt. Der Ansatz wird 4 d gerührt und dann in einem Eisbad gekühlt. Durch die Zugabe einer Lösung aus 2.48 g (10 eq./Cl) 6-Maleinimido-Hexansäure (Verbindung (**TS**), 12.2.2) und 3.2 g (30 eq./Cl) Lutidin in Acetonitril und das anschließende 24stündige Rühren bei Raumtemperatur wird die Polymerisation terminiert. Das Benzonitril wird im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in etwas Chloroform aufgenommen, 0.5 g  $K_2CO_3$  hinzugegeben und 5 Stunden gerührt. Der Feststoff wird abgetrennt, das Polymer in Diethylether gefällt und aus Chloroform/Benzol lyophilisiert.

## 12.6 Polymeranaloge Entschützung der Polymere

### 12.6.1 Polymeranaloge Entschützung der Boc-Gruppe

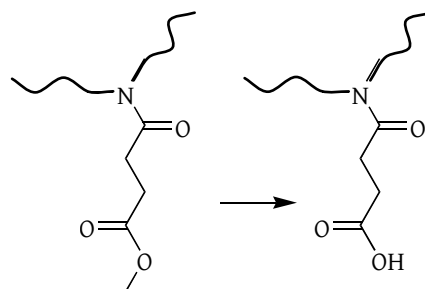


**Abbildung 12.21:** Schema zur Entschützung der Aminofunktion am Polymer.

Vorschrift	Das Polymer wird in 50 %iger (v/v) Trifluoressigsäure in Dichlormethan gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wird im Grobvakuum entfernt, das Polymer in etwas Methanol aufgenommen, in Diethylether gefällt, und aus Methanol/Benzol gefriergetrocknet.
Ausbeute	etwa 90 % d. Th.
NMR	<sup>1</sup> H in MeOD: δ/ppm = 1.3-1.5 (CH <sub>2</sub> und CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> der Seitenketten) 1.9 (CH <sub>3</sub> CO der Seitenketten), 2.2-2.4 (CH <sub>2</sub> CO der Seitenketten), 2.8-3.0 (CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> der Seitenketten), 3.4-3.6 (NCH <sub>2</sub> des Polymerrückgrats),
GPC	nicht möglich, da die Produkte (meist) unlöslich in DMAc und Chloroform sind.

### 12.6.2 Hydrolyse der Ester-Gruppe

Vorschrift	Das Polymer wird in 30 mL Methanol gelöst und mit 1,4 eq. einer 0.1 M wässrigen Natriumhydroxidlösung versetzt. Man rührt zwei Stunden bei 55 °C. Dann wird mit 1,4 eq. 0.1 M Salzsäure neutralisiert. Man dampft die Lösung bis zur Trockne ein. Das Polymer ist zunächst schwerlöslich in Chloroform, wird aber nach mehrmaligem Aufnehmen und Eindampfen schließlich als lösliches Produkt erhalten und aus Methanol/Benzol gefriergetrocknet.
------------	---



**Abbildung 12.22:** Schema zur Entschützung der Carbonsäurefunktion am Polymer.

Ausbeute etwa 90% d. Th.

NMR  $^1H$  in MeOD:  $\delta$ /ppm = 1.3-1.5 ( $CH_3CH_2$  der Seitenketten) 1.9 ( $CH_3CO$  der Seitenketten), 2.2-2.4 ( $CH_2CO$  der Seitenketten), 2.8-3.0 ( $CH_2COOH$  und  $NCOCH_2$  der Seitenketten), 3.4-3.6 ( $NCH_2$  des Polymerrückgrats)

## 12.7 Kupplungsexperimente

Im Folgenden sind allgemeine Arbeitsvorschriften zur Kupplung der DNA an multifunktionelle Polymere beschrieben.

### 12.7.1 Kupplung von DNA mit einer Thiolgruppe an Polymere

Die lyophilisierte DNA mit einer Thiolgruppe wurde in PBS gelöst, so daß sie in einer Endkonzentration von  $200 \mu M$  vorlag. Zur Entschützung der Thiolgruppe sowie der Reduktion der gebildeten Disulfidbrücken wurde die DNA mit Reductacryl behandelt (siehe Methode 11.4)

Die Polymere lagen in DMF gelöst vor, mit einer molaren Konzentration von 10 mM bezogen auf ihre theoretischen Molekulargewichte. Beide Lösungen wurden in den entsprechenden Äquivalentverhältnissen vermischt. Die Reaktionsmischungen wurden 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach analysiert.

Die Äquivalentmengen sind im Ergebnisteil angegeben.

### 12.7.2 Kupplung von DNA mit einer Aminogruppe an Polymere

Die lyophilisierte DNA wurde in DMF gelöst, so daß sie in einer Endkonzentration von  $200 \mu M$  vorlag.

## 12.7 Kupplungsexperimente

Die Polymere lagen in DMF gelöst vor, mit einer molaren Konzentration von 10 mM bezogen auf ihre theoretischen Molekulargewichte. Die Lösungen der DNA, des Polymers, der Kupplungsreagenzien und der benötigten Base wurden in den entsprechenden Äquivalentverhältnissen vermischt. Die Reaktionsmischungen wurden bei Raumtemperatur inkubiert und danach analysiert.

Die Äquivalentmengen sind im Ergebnisteil angegeben.



**Teil VI**

**Anhang**





# A Rezepturen

**Allgemeines** Im Folgenden sind Rezepturen der in dieser Arbeit verwendeten Lösungen angegeben. Dabei sind die Rezepturen auch als Vorschriften lesbar. Die Abkürzung  $nX$  mit der ganzen Zahl  $n$  steht für ein Konzentrat, welches im Verhältnis 1 zu  $n$  verdünnt werden muß.

## Rezeptur I 50X TAE-Puffer

- 242.0 g Tris<sup>1</sup>-Base
- 57.1 mL Eisessig
- 18.6 g EDTA<sup>2</sup>
- ad 1000 mL *dd*-H<sub>2</sub>O

## Rezeptur II 10X TBE-Puffer

- 108.0 g Tris-Base
- 55.0 g Borsäure
- 9.3 g EDTA
- ad 1000 mL *dd*-H<sub>2</sub>O

## Rezeptur III 1X PBS<sup>3</sup> (bezogen über die Apotheke des Klinikums der Universität München)

- 8.0 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- pH mit konzentrierter HCl einstellen auf pH = 7,4
- ad 1000 mL mit *dd*-H<sub>2</sub>O
- Autoklavieren

## Rezeptur IV 1X TE<sup>4</sup>

- 990 mL *dd*-H<sub>2</sub>O

---

<sup>1</sup>Tris(hydroxymethyl)aminomethan

<sup>2</sup>Ethylendiamintetraacetat

<sup>3</sup>Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer

<sup>4</sup>Tris/EDTA-Puffer

## A Rezepturen

- 10 mL 1 M Tris-HCl (pH = 8,0)
- 400  $\mu$ l 0.25 M EDTA

### Rezeptur V Acrylamid Premix

- 29.0 g Acrylamid
- 1.0 g Bis-Acrylamid
- 100.0 mL *dd*-H<sub>2</sub>O
- Lagerung bei 4°C unter Ausschluß von Licht

### Rezeptur VI SDS-PAGE Probenpuffer (2X Laemmli Puffer + SDS)

- 2.5 mL einer 3.0 M Tris-HCl-Lösung (pH = 8,45)
- 1 g SDS
- 4 mL Glycerin
- 0.01 %<sup>(m/m)</sup> Bromophenolblau
- ad 10 mL *dd*-H<sub>2</sub>O

### Rezeptur VII SDS-PAGE-Laufpuffer (1X Laemmli-Puffer)

- 3.03 g Tris-Base (=0.025 M)
- 14.4 g Glycin
- 400 mL *dd*-H<sub>2</sub>O
- pH mit konzentrierter HCl einstellen auf pH = 8,3
- 10 mL einer 10 %<sup>(m/m)</sup> SDS Lösung
- ad 500 mL *dd*-H<sub>2</sub>O

### Rezeptur VIII Tricin-SDS-PAGE-Gelpuffer

- 181.7 g Tris-Base
- 1.5 g SDS
- 400 mL *dd*-H<sub>2</sub>O
- pH mit konzentrierter HCl einstellen auf pH = 8,45
- ad 500 mL *dd*-H<sub>2</sub>O
- Lagerung bei 4°C

### Rezeptur IX Tricin-SDS-PAGE-Anodenpuffer

- 12.11 g Tris-Base
- 400 mL *dd*-H<sub>2</sub>O
- pH mit konzentrierter HCl einstellen auf pH = 8,9
- ad 500 mL *dd*-H<sub>2</sub>O
- Lagerung bei 4°C

### Rezeptur X Tricin-SDS-PAGE-Kathodenpuffer

- 6.055 g Tris-Base
- 8.96 g Tricin

- 500 mL *dd*-H<sub>2</sub>O
- 0.5 g SDS
- Lagerung bei 4 °C

**Rezeptur XI** 2X NOVEX Probenpuffer

- 3.0 mL einer 3.0 M Tris-HCl-Lösung (pH = 8,45) oder von VIII auf der vorherigen Seite
- 2.4 mL Glycerin
- 0.8 mL SDS
- 1.5 mL einer 0.1 %igen ((m/m) ) Lösung von *Coomassie-Brilliantblau* (Abbildung 11.5<sup>5</sup>) in *dd*-H<sub>2</sub>O
- 0.5 mL einer 0.1 %igen ((m/m) ) Lösung von Phenolrot in *dd*-H<sub>2</sub>O
- ad 10 mL *dd*-H<sub>2</sub>O

**Rezeptur XII** Coomassie: Färbelösung

- 2 g Coomassie Blau
- 250 mL *dd*-H<sub>2</sub>O
- 75 mL Eisessig langsam zugeben
- 500 mL Ethanol
- ad 1000 mL *dd*-H<sub>2</sub>O

**Rezeptur XIII** Coomassie: Entfärbelösung

- 800 mL *dd*-H<sub>2</sub>O
- 7.5 mL Eisessig
- 100 mL Ethanol
- ad 1000 mL *dd*-H<sub>2</sub>O

**Rezeptur XIV** Silberfärbung: Fixierer

- 30 % v/v Ethanol
- 10 % v/v Essigsäure
- Rest *dd*-H<sub>2</sub>O

**Rezeptur XV** Silberfärbung: Färbelösung

- 0.1 % m/m AgNO<sub>3</sub>
- *dd*-H<sub>2</sub>O

**Rezeptur XVI** Silberfärbung: Entwickler

- 3 % m/m Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 0.02 % v/v Formaldehyd
- Rest *dd*-H<sub>2</sub>O

**Rezeptur XVII** Silberfärbung: Stop

---

<sup>5</sup>Seite 166

## A Rezepturen

- 1 % v/v Essigsäure
- Rest *dd*-H<sub>2</sub>O

### **Rezeptur XVIII** ELISA-Waschpuffer

- 500 mL PBS
- 0.25 mL TWEEN-20

### **Rezeptur XIX** ELISA-Assay Puffer (IFN- $\alpha$ )

- 2.5 g BSA
- 0.25 mL TWEEN-20
- ad 500 mL PBS

## B Protokolle & Vorschriften

Die folgenden Protokolle sind Schritt-für-Schritt-Versuchsanleitungen

### Silberfärbung

Protokoll nach Heukeshoven<sup>[142]</sup>

Schritt	Lösung	Dauer
Fixieren	Fixierlösung (Rezeptur <b>XIV</b> <sup>1</sup> )	> 3 h
Waschen 2x	10 % v/v Ethanol	10 min
Waschen 3x	Wasser	10 min
Färben	Färbelösung (Rezeptur <b>XV</b> <sup>2</sup> )	30 min
Waschen	Wasser	15 sec
Entwickeln	Entwickler (Rezeptur <b>XVI</b> <sup>3</sup> )	5 min-10 min
Stop	Stop (Rezeptur <b>XVII</b> <sup>4</sup> )	10 min
Waschen 3x	Wasser	10 min

### ELISA: IFN- $\alpha$

1. Platten mit Probenlösung inkubieren (am Besten über Nacht)
2. *Coating antibody* 0.5 mL in 9.5 mL PBS pro Platte  $\rightarrow$  100  $\mu$ l/ Well
3. Platten mit Folie abdecken und über Nacht in den Kühlschrank stellen.
4. Blocken
  - a) Einmal mit 300  $\mu$ l Waschpuffer (siehe Rezeptur **XVIII**<sup>5</sup>) waschen
  - b) 250  $\mu$ l Assay Puffer (siehe Rezeptur **XIX**<sup>6</sup>)
  - c) Abdecken und 2.5 h bei Raumtemperatur stehen lassen
5. Standard-Reihe vorbereiten
  - a) 10  $\mu$ l Standardprotein + 990  $\mu$ l Assay Puffer (entspricht dem 500 Wert)

<sup>5</sup>Seite 202

<sup>6</sup>Seite 202

## B Protokolle & Vorschriften

- b) in 7 Eppendorf Caps je 500  $\mu\text{l}$  Assay Puffer vorlegen und beschriften: 250, 125, 63, 32, 16, 8, blank
- c) Geometrische Verdünnung erstellen von „500“ 500  $\mu\text{l}$  in „250“, mischen, davon dann wieder 500  $\mu\text{l}$  in „125“ usw. („blank“ ist reiner Assay Puffer!)
6. Proben während dessen auf dem Schüttler auftauen lassen
7. die Platten zwei Mal mit 300  $\mu\text{l}$  Waschpuffer waschen
8. je 90  $\mu\text{l}$  Assay Puffer pro *Well* vorlegen und je 10  $\mu\text{l}$  Probe hinzupipettieren (gilt für eine Verdünnung der Probe im Verhältnis 1:10 — entsprechend anpassen)
9. 2.75  $\mu\text{l}$ /Platte HRP-Konjugat in 5.5 mL Assay Puffer lösen
10. je 50  $\mu\text{l}$ / *Well*
11. 2h abgedeckt auf dem Schüttler stehen lassen
12. Substrat vorbereiten: 12 mL einer 1:1-Mischung der Substratkomponenten A (6 mL) und B (6 mL)
13. Platten drei Mal mit 300  $\mu\text{l}$  Waschpuffer waschen
14. je 100  $\mu\text{l}$  Substrat/ *Well*
15. 15 min im Dunkeln stehen lassen
16. Wenn die Färbereaktion weit genug fortgeschritten ist wird durch Zugabe von je 100  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  die Reaktion gestoppt.
17. Absorption messen

# C Veröffentlichungen

## Posterpräsentationen

Käsmayr D., Weberskirch, R. „*Design and synthesis of star polymers as carriers for immunologically active compounds*“ Makromolekulares Kolloquium in Freiburg, Februar 2006

Richter C., Bekeredjian-Ding I., Kaesmayr D., Besch R., Endres S. and Hartmann G. „*Controlling nanoparticle formation of CpG-A Oligonucleotides*“ 1st Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, New York, USA, September 2005

## Veröffentlichungen

Richter C., Bekeredjian-Ding I., Kaesmayr D., Besch R., Endres S. and Hartmann G. „*Controlling nanoparticle formation by CpG-A oligonucleotides*“, in Vorbereitung





## D Originaldaten und Übersichten

Auf den folgenden Seiten sind die in dieser Arbeit besprochenen Polymere zusammengestellt. Danach folgen Datentabellen für in der Arbeit verwendete Abbildungen.

Tabelle D.1: Liste der hergestellten linearen Polymere.

Nummer	Name <sup>a</sup>	FG <sub>Seite</sub>	FG <sub>Ende</sub>	<sup>b</sup> $\overline{M}$		PDI
				$\overline{M}_{\text{theor}}$ g/mol	$\overline{M}_{n\text{GPC}}$ g/mol	
(L1)	1-20-N		NH	1802	3100	1.10
(L2)	1-20-A		Acr.	1788	3000	1.06
(L3)	1-20-S		Mal.	1927	3100	1.11
(L4)	1-15-S		Mal.	1501	3300	1.07
(L5)	1-30-S		Mal.	2778	5200	1.03
(L6)	1-45-S		Mal.	4054	7000	1.04
(L7)	1-60-S		Mal.	5331	8800	1.03
(L8*)	1-5:C2F-[35:C2+60:O2*]-S	60 COOMe	Mal.	14001	6300	1.15 → (L8) <sup>d</sup>
(L8)	1-5:C2F-[35:C2+60:O2]-S	60 COOH	Mal.	13156	6300	1.18 ← (L8*)
(L9*)	1-[20:C2+20:N*]-N	20 NHBoc	NH	5351	6500	1.14 → (L9)
(L9)	1-[20:C2+20:N]-N	20 NH <sub>2</sub>	NH	5069	5600	1.14 ← (L9*)

<sup>a</sup> siehe Definition auf Seite 74<sup>b</sup> berechnet aus eingestellter Kettenlänge ( $[M]_0/[I]_0$ ), Initiator und Terminator<sup>c</sup> gerundet auf 100 g/mol<sup>d</sup> NMR-spektroskopisch ermittelte Werte auf der Basis des Signals der Methylgruppe des Initiators

**Tabelle D.2:** Liste der hergestellten Sternpolymere.

Nummer	Name <sup>a</sup>	$FG_{Seite}$	$FG_{Ende}$	$\bar{M}_n$		PDI
				$\bar{M}_{n,theor}$ g/mol	$\bar{M}_{n,GPC}$ g/mol	
(S1)	4-15-A		4 Acr.	5458	4100	1.16 <sup>d</sup>
(S2)	4-15-S		4 Mal.	6014	4000	1.12 <sup>e</sup>
(S3)	4-15-O		4 COOH	5706	3600	1.13
(S4)	4-15-N		4 NH	5514	3900	1.13
(S5)	4-30-N		4 NH	10620	2500	1.13
(S6)	4-45-N		4 NH	15726	2100	1.08
(S7)	4-4:C2F-30-S		4 Mal.	13924	7100	1.06
(S8*)	4-30:C1-[15:C2+15:O2*]-S	60 COOMe	4 Mal.	26498	5200	1.11 → (S8)
(S9*)	4-30:C1-[30:C2+30:O2*]-S	120 COOMe	4 Mal.	41876	4000	1.20 → (S9)
(S10*)	4-30:C1-[45:C2+45:O2*]-S	180 COOMe	4 Mal.	57254	5900	1.52 → (S10)
(S11*)	4-67:C1-[52:C2+28:O2*]-S	112 COOH	4 Mal.	61934	5900	1.21 → (S11)
(S8)	4-30:C1-[15:C2+15:O2]-S	60 COOH	4 Mal.	25652	5100	1.13 ← (S8*)
(S9)	4-30:C1-[30:C2+30:O2]-S	120 COOH	4 Mal.	40184	5200	1.40 ← (S9*)
(S10)	4-30:C1-[45:C2+45:O2]-S	180 COOH	4 Mal.	54716	6300	1.18 ← (S10*)
(S11)	4-67:C1-[52:C2+28:O2]-S	112 COOH	4 Mal.	60355	6200	1.12 ← (S11*)
(S12*)	4-15:C1-[45:C2+15:N*]-C	60 NHBoc		37766	5100	1.33 → (S12) <sup>f</sup>
(S13*)	4-30:C1-[15:C2+15:N*]-C	60 NHBoc		30980	6700	1.20 → (S13) <sup>f</sup>
(S14*)	4-30:C1-[45:C2+15:N*]-C	60 NHBoc		42872	4900	1.20 → (S14) <sup>f</sup>
(S15*)	4-60:C1-[45:C2+15:N*]-C	60 NHBoc		53084	5900	1.33 → (S15) <sup>f</sup>
(S16*)	4-60:C1-[30:C2+30:N*]-C	120 NHBoc		61556	11800	1.26 → (S16) <sup>f</sup>
(S17*)	4-30:C1-[10:C2+5:N*]-N	60 NHBoc	4 NH	19386	3200	1.10 → (S17)
(S17)	4-30:C1-[10:C2+5:N]-C	60 NH <sub>2</sub>	4 NH	17704	2800	1.09 → (S17*)
(S18*)	4-4:C2F-60:C1-[30C2+30O2*]-C	120 COOMe		54363	11000	1.4 <sup>g</sup>
(S18)	4-4:C2F-60:C1-[30C2+30O2]-C	120 COOH		52671	10000	1.4

<sup>a</sup>siehe Definition auf Seite 74

<sup>b</sup>berechnet aus eingestellter Kettenlänge ( $[M]_0/[I]_0$ ), Initiator und Terminator; gerundet auf 3 signifikante Stellen

<sup>c</sup>gerundet auf 100 g/mol

<sup>d</sup>selber Ansatz wie (S2); Lösung vor Termination geteilt und anderes Terminationsreagenz zugegeben

<sup>e</sup>selber Ansatz wie (S1); Lösung vor Termination geteilt und anderes Terminationsreagenz zugegeben

<sup>f</sup>Die geschützten Aminopolymere sind nicht in DMAc löslich und daher ist keine GPC-Analytik möglich

<sup>g</sup>NMR-spektroskopisch ist nur Stoffmengen-Verhältnis der einzelnen Monomere bestimmbar

Tabelle D.3: Liste der hergestellten Bürstenpolymere.

Nummer	Name	$FG_{Ende}$	$\overline{M}_n$		PDI	Ausbeute	$FG/g^c$	
			$\overline{M}_n^{theoret^a}$ g/mol	$\overline{M}_n^{GPC^b}$ g/mol				g/mol
(B1)	PS-50(MeOx) <sub>30</sub> -S	50 Mal.	158 160	559 900	4800 <sup>d</sup>	2.75	1.7 g (85%)	0.350
(B2)	PS-50(MeOx) <sub>30</sub> -A	50 Acr.	151 200	80 900	4900 <sup>d</sup>	2.51	0.8 g (40%)	0.350
(B3)	PS-50(MeOx) <sub>60</sub> -S	50 Mal.	285 810	80 600	7800 <sup>d</sup>	1.40	1.4 g (70%)	0.185
(B4)	PS-50(MeOx) <sub>60</sub> -A	50 Acr.	278 850	86 300	7700 <sup>d</sup>	1.55	0.3 g (15%)	0.185
(B5)	PS-80(MeOx) <sub>60</sub> -NH	80 <sup>e</sup> NH	433 888	90 000	8200	1.7		
(B5')	PS-80(MeOx) <sub>60</sub> -NH <sub>2</sub>	80 <sup>f</sup> NH <sub>2</sub>	432 000	90 000	8200	1.7		
(B6)	PS-50(MeOx) <sub>60</sub> -NH	50 <sup>g</sup> NH	279 555	92 000	8300	1.5		
(B6')	PS-50(MeOx) <sub>60</sub> -NH <sub>2</sub>	50 <sup>f</sup> NH <sub>2</sub>	278 000	92 000	8300	1.5		
(B8)	PS-80(MeOx) <sub>60</sub> -N	80 NH	433 888	78 000	7300 <sup>d</sup>	1.19		
(B9)	PS-50(MeOx) <sub>60</sub> -N	80 NH	279 555	128 000	9100 <sup>d</sup>	1.86		

<sup>a</sup>Berechnet aus eingestellter Kettenlänge ( $[M]_0/[I]_0$ ), Initiator und Terminator; gerundet auf 3 signifikante Stellen

<sup>b</sup>gerundet auf 100 g/mol

<sup>c</sup>Anzahl funktionelle Gruppen pro Gramm Polymer

<sup>d</sup>lineares Poly(2-Methyl)oxazolin als Nebenprodukt

<sup>e</sup>terminiert mit Piperazin

<sup>f</sup>terminiert mit Hydrazin

**Tabelle D.4:** Elutionszeiten der DNA-Größenmarker in der wässrigen GPC. Daten zur Abbildung 5.41.

Verwendete Säule: *Polymer Laboratories* PL Rapide Aqua OH.

Eluent: 50 mM Phosphat-Puffer pH = 7.0 + 1.0 M NaCl. Detektion bei 260 nm.

Größenstandard	Größe	$V_{el}$
Produktname	bp	mL
GeneRuler	100	5,3
	300	5,0
	500	4,5
	1500	3,3
FastRuler	50	5,3
	200	5,0
	400	4,5
	850	4,1
	1500	3,5

**Tabelle D.5:** Elutionszeiten der einzelnen Verbindungen als Reinstoffe gelöst in DMF in der wässrigen GPC.

Verwendete Säule: *Polymer Laboratories* PL Rapide Aqua OH.

Eluent: 50 mM Phosphat-Puffer pH = 7.0 + 1.0 M NaCl. Detektion bei 260 nm.

Verbindung	$V_{el}$
(L8)	5.194
(S8)	5.079
(S18)	5.152
HATU	5.919
BOP	6.184
2006-SS-DNA <sup>a</sup>	4.203
2006-anti <sup>b</sup>	4.856
2006-SH	4.881
2006-NH <sub>2</sub>	4.903
chromosomale DNA	3.072

<sup>a</sup>Ein Dimer der DNA-SH durch Bildung einer Disulfidbrücke

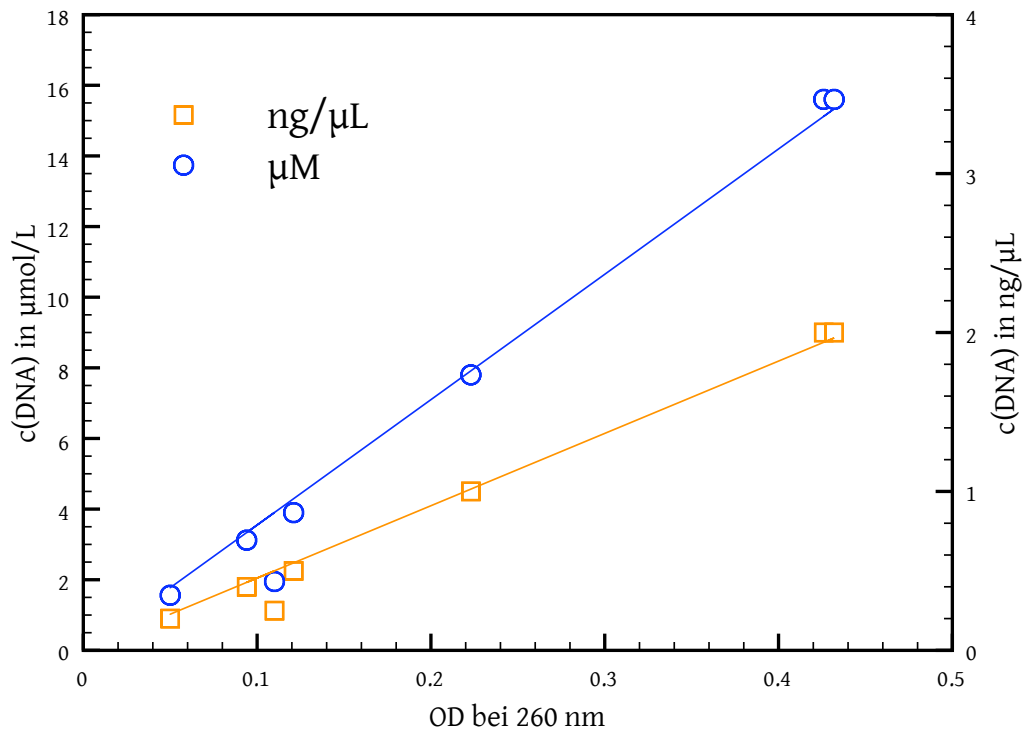
<sup>b</sup>Der Gegenstrang zu der DNA-Sequenz

**Tabelle D.6:** Daten zur Abbildung 5.43.

Fraktion	$c_{(DNA)}$	
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	
1	5,67	
2	1,40	
3	57,00	
4	0,52	
5	0,52	
6	2,78	
7	51,76	
8	1,70	
9	55,56	
10	0,48	
11	0,32	

**Tabelle D.7:** Daten zur Abbildung D.1.

Verdünnung	OD 260	$c_{(DNA)}$	
		$\mu\text{M}$	$\text{ng}/\mu\text{l}$
100	0,426	2	15,6
100	0,432	2	15,6
200	0,223	1	7,8
400	0,121	0,5	3,9
500	0,094	0,4	3,12
800	0,11	0,25	1,95
1000	0,05	0,2	1,56



**Abbildung D.1:** Kalibriergeraden zur Umrechnung der OD, gemessen bei 260 nm in die entsprechenden DNA-Konzentrationen. Gemessen mit dem Oligonukleotid 2006-NH<sub>2</sub>.

Kalibriergeraden:

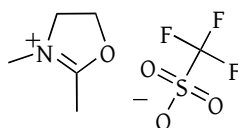
$$c(DNA) = OD_{260} \cdot 35.494 \text{ ng}/\mu\text{L} = OD_{260} \cdot 4.5505 \mu\text{M} \text{ (erhalten durch lineare Regression);}$$

für beide Geraden gilt:  $R^2 = 0.98$

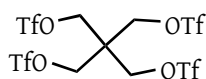




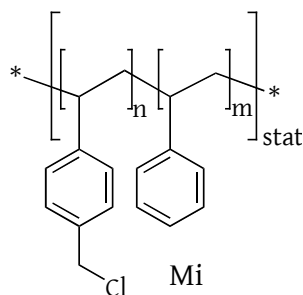
## E Übersicht: relevante Strukturformeln



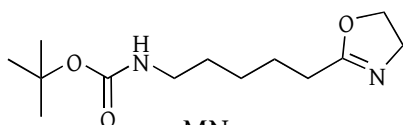
I1



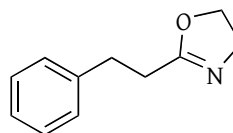
I4



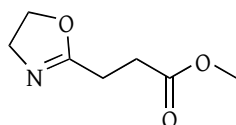
Mi



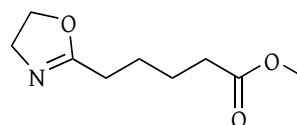
MN



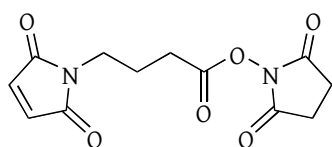
MF



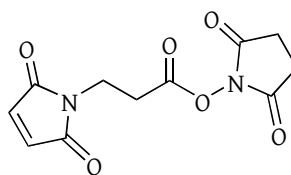
MO2



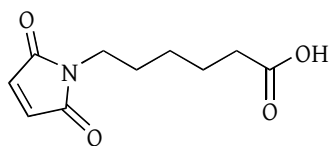
MO4



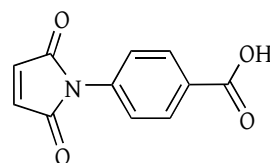
MBS



MPS



TS



TSar



# Wichtige Begriffe aus der Immunologie

**Adaptive Immunantwort:** (auch: Adaptive Immunität; Erworbene Immunantwort).

Sie besteht in der Reaktion von antigenspezifischen Lymphozyten auf ein Antigen sowie in der Bildung eines Immungedächtnisses. Die Adaptive Immunantwort wird erreicht durch eine Selektion von bestimmten Lymphozyten-Klonen und steht durch die notwendige Dauer damit in der Reaktionskette zeitlich hinter der nativen Immunantwort. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Abschnitt 3.4 (vgl. Native Immunantwort).

**Adjuvans:** Ein Adjuvans ist ein Stoff, der die Immunreaktion auf ein Antigen verstärkt, wenn er mit diesem vermischt wird.

**Antigen:** Ein Antigen ist ein Molekül, welches spezifisch an einen Antikörper binden kann. Der Name stammt von der Eigenschaft dieses Moleküls, die Produktion von Antikörpern zu stimulieren. Allerdings stimulieren nicht alle Antigene als reine Stoffe die Produktion von Antikörpern; die Antigene, welche dies tun, nennt man auch Immunogene. Als Antigene wirken fast ausschließlich Makromoleküle oder an Partikel gebundene Moleküle (Hapten), zum Beispiel Lipopolysaccharide an der Oberfläche von Bakterien. Ein bestimmtes Antigen induziert in der Regel die Bildung nur eines bestimmten, dazu passenden Antikörpers, der spezifisch nur an diesen Fremdstoff gebunden wird.

**Antikörper:** Antikörper (auch Immunglobuline) sind Proteine aus der Klasse der Globuline, die in Wirbeltieren als Reaktion auf bestimmte eingedrungene Fremdstoffe, als Antigene bezeichnet, gebildet werden. Sie dienen der Abwehr dieser Fremdstoffe.<sup>[169]</sup> Eine schematische Darstellung eines Antikörpers ist in Abbildung 3.4<sup>1</sup> zu sehen.

**Apoptose:** Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Es ist gewissermaßen ein „Selbstmordprogramm“ einzelner biologischer Zellen. Dieses kann von außen angeregt werden (etwa durch Immunzellen) oder aufgrund von zellinternen

---

<sup>1</sup>Seite 27

Prozessen ausgelöst werden (etwa nach starker Schädigung der Erbinformation). Im Gegensatz zum anderen bedeutenden Mechanismus des Zelltods, der Nekrose, wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt, ist Teil des Stoffwechsels der Zelle. Dadurch unterliegt diese Form des Zelltods strenger Kontrolle und es wird gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrundegeht. Die Apoptose unterscheidet sich von den anderen Formen des programmierten Zelltods dadurch, dass bei ihr eine Gruppe von Enzymen, die proteolytische Aktivität aufweisen, sogenannte Caspasen, eine zentrale Rolle spielen.[169]

**B-Zellen:** Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Abschnitt 3.4.2

**Chemokine:** Als Chemokine bezeichnet man chemotaktisch wirkende Zytokine (*chemo-attractant cytokines*), die von vielen Zelltypen, u.a. von Phagozyten und dendritischen Zellen, aber auch von Gewebezellen, sezerniert werden können. Chemokine können Leukozyten anlocken und aktivieren, sie spielen daher eine wichtige Rolle als Mediatoren bei der Regulation einer gerichteten Leukozytenwanderung und den dadurch ausgelösten Entzündungsprozessen. Die Einwanderung der Leukozyten in ein Entzündungsgebiet wird durch Chemokin-Gradienten im Gewebe gelenkt (Chemotaxis).[169]

**Endosom:** Endosomen sind die bei der Endocytose entstehenden membranumschlossenen Vesikel. Es gibt sog. frühe und späte Endosomen. Eine Ansäuerung durch spezielle Protonenpumpen bewirkt eine Loslösung der in den Endosomen gebundenen Moleküle von den jeweiligen Membranrezeptoren. Diese Rezeptoren können ausgeschleust und zurück zur Zellmembran transportiert werden, um einem weiteren endocytotischen Vorgang zur Verfügung zu stehen. Siehe auch Abschnitt 3.6.

**Granulozyten:** Granulozyten sind Leukozyten und machen etwa 60% aller Leukozyten aus. Granulozyten werden im Knochenmark gebildet und ins Blut abgegeben. Ihre Lebensdauer beträgt zwei bis drei Tage. Sie können die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern. Ihre Funktion liegt vor allem in der unspezifischen Abwehr (Native Immunantwort) von Bakterien, Parasiten und Pilzen. Weitere Details finden sich auf Seite 13.

**Hapten:** Haptene sind Moleküle, die an einen Antikörper binden, aber selbst keine adaptive Immunantwort auslösen können. Dazu müssen sie kovalent an einen makromolekularen Träger gebunden werden. Der Begriff Hapten beschreibt mehr

die chemische Oberfläche, die von einem Antikörper erkannt wird, während der Begriff Antigen das gesamte Molekül beschreibt, welches das Hapten auf seiner Oberfläche trägt.

**Interferon:** Interferone vom Typ-I sind die antiviral agierenden Zytokine IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\omega$ . Hauptproduzenten von IFN- $\alpha$  sind die Plasmazytoiden dendritischen Zellen, welche 1000fach mehr davon produzieren als andere Zellen. Die antiviralen Effekte beruhen auf einer Hemmung der viralen Proteinsynthese in der Wirtszelle. Neben diesem antiviralen Effekt hat Interferon auch noch eine Reihe weiterer immunmodulierender Wirkungen.

**Komplement:** Das Komplement, welches aus einer bestimmte Klasse von Blutproteinen besteht, ist in der Lage, sich an körperfremde sowie körpereigene Strukturen zu binden. Werden körpereigene Strukturen umlagert, schütten diese ein Protein aus, das Komplement-Moleküle deaktiviert. Dadurch wird eine Schädigung des eigenen Organismus verhindert. Um erkannte körperfremde Proteine zu bekämpfen, bedient sich das Komplement hauptsächlich zweier Strategien: Es ist in der Lage, die Zellwände des Eindringlings zu schädigen, wodurch die Zelle zerstört wird, und hat außerdem die Möglichkeit Fresszellen zu aktivieren, welche die Zellen verschlingen, die mit gebundenem Komplement markiert sind.

**Makrophagen:** Makrophagen sind eine der drei Sorten von Freßzellen. Sie sind weit verbreitet in den Geweben des Körpers und spielen eine kritische Rolle im angeborenen Immunsystem. Ihre Vorgängerzellen sind die Monozyten, welche im Blut zirkulieren und sich kontinuierlich in Makrophagen ausdifferenzieren um schließlich in die Gewebe migrieren.

**Native Immunantwort:** (auch: nicht-adaptive Immunabwehr, angeborene oder innate Immunabwehr) Dies ist die evolutionär älteste Form der Immunabwehr, die den Krankheitserreger unmittelbar nach Kontakt mit dem Organismus ausschaltet. Beteiligte Zellen sind Granulozyten, Makrophagen und Natürliche Killer-Zellen. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Abschnitt 3.3 (vgl. Adaptive Immunantwort).

**Neutrophile:** Eine Unterklasse der Granulozyten.

**Natürliche Killer-Zellen:** Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sind antigen-unspezifisch und daher Teil des angeborenen Immunsystems, in dem sie eine Rolle ähnlich der T-Killerzellen spielen: sie töten abnormale Zellen des Organismus,

## Wichtige Begriffe aus der Immunologie

wie z.B. Tumorzellen und Zellen, die mit bestimmten Viren (z.B. *Herpes simplex*) infiziert sind.

**Palindrom:** Palindrome sind im üblichen Sprachgebrauch Worte oder Sätze, welche von links oder von rechts gelesen denselben Text ergeben: *Anna, Reittier, Ein Neger mit Gazelle zagt im Regen nie.*

In der Biochemie sind DNA-Palindrome so definiert, daß die Sequenz des Gegenstrangs identisch mit der Originalsequenz ist: 5'-TAT ATA-3' hybridisiert mit 3'-ATA TAT-5'. Ein weiteres Beispiel: 5'-GTC GAT ATC GAC-3'

**Pathogene:** Pathogen (griechisch *παθηος* = Krankheit, *γερμειν* = entstehen) bezeichnet die Eigenschaft eines Objekts, als Krankheitserreger zu fungieren.

**Phagozytose:** Die Aufnahme von größeren Nahrungspartikeln bis hin zu kleineren Zellen in eine einzelne eukaryotische Zelle. Siehe auch Abschnitt 3.6.

**Phosphorylierung:** Die durch Proteinkinasen enzymatisch katalysierte Reaktion einer Alkoholgruppe eines Proteins zu einer Phosphat-Gruppe.

**Proteinkinase:** Proteinkinasen phosphorylieren alkoholische Gruppen an Proteinen, wie sie in den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin vorkommen. Meist ist mit dieser Phosphorylierung eine Änderung der Raumstruktur des Zielproteins und damit seiner Funktion verbunden. In vielen Signalkaskaden werden Proteine durch Proteinkinasen an- oder ausgeschaltet.

**somatische Rekombination:** Die somatische Rekombination ist ein genetischer Umlagerungsprozess, der für die Variabilität von antikörperproduzierenden Zellen (B-Zellen) sowie von T-Zell-Rezeptoren sorgt. Es handelt sich um einen komplizierten Prozess, bei dem die DNA-Abschnitte der Gene für die leichten und schweren Ketten der Antikörper und T-Zell-Rezeptoren neu und zufällig miteinander kombiniert werden, sodass in den variablen Bereichen der Antikörper neue antigenerkennende Proteinabschnitte erzeugt werden. Sie ist der wichtigste Bestandteil der Adaptiven Immunantwort.[169]

**Stammzellen:** Stammzellen sind Körperzellen, die noch nicht ausdifferenziert sind. Das heißt, sie liegen noch nicht in einer Form vor, die sie für ihre Verwendung im Organismus spezialisiert (zum Beispiel als Hautzelle oder Leberzelle), vielmehr ist ihre spätere Verwendung noch offen. Stammzellen sind in der Lage, ständig neue, organspezifische Tochterzellen zu erzeugen und sich dabei selbst zu erhalten.

**T-Zellen:** Eine ausführliche Beschreibung findet sich in Abschnitt [3.4.1](#)

**T-Zell-Rezeptor:** Der T-Zell-Rezeptor ist ein großer Komplex aus Proteinen, der auf der Oberfläche von T-Zellen sitzt und die so genannte zelluläre Immunität vermittelt. Das heißt, er ist die Antigen-erkennende Struktur der T-Zellen, ähnlich wie Antikörper die löslichen Antigen-erkennenden Proteine der B-Zellen sind.[\[169\]](#)

**Zytokine:** Ein Zytokin ist ein Glycoprotein, welches regulierende Funktionen für das Wachstum und die Differenzierung von Körperzellen hat. Viele Zytokine spielen außerdem eine wichtige Rolle für immunologische Reaktionen. Man unterscheidet vier Klassen von Zytokinen: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Tumornekrosefaktoren (TNF).





# Literaturverzeichnis

- [1] Borman S. *Chemical & Engineering News*, **2006**. 84(25): 56.
- [2] Mullin R. *Chemical & Engineering News*, **2006**. 84(25): 30.
- [3] Bourquin C., Schreiber S., Beck S., Hartmann G. und Endres S. *International Journal of Cancer*, **2006**. 118(11): 2790.
- [4] Heckelsmiller K., Rall K., Beck S., Schlamp A., Seiderer J., Jahrsdorfer B., Krug A., Rothenfusser S., Endres S. und Hartmann G. *Journal of Immunology*, **2002**. 169(7): 3892.
- [5] Heckelsmiller K., Beck S., Rall K., Sipos B., Schlamp A., Tuma E., Rothenfusser S., Endres S. und Hartmann G. *European Journal of Immunology*, **2002**. 32(11): 3235.
- [6] Epstein S.L., Kong W.P., Mispion J.A., Lo C.Y., Tumpey T.M., Xu L. und Nabel G.J. *Vaccine*, **2005**. 23(46-47): 5405.
- [7] „GSK reports significant advance in H5N1 pandemic flu vaccine programme.“ Technischer Bericht, GlaxoSmithKline, **2006**.
- [8] McNeela E. und Mills K. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**. 51: 43.
- [9] Jenner E. *The Challenge of Epidemiology: Issues and Selected Readings*, **2004**. 1(1): 31. HINWEIS: Dieser Artikel ist ein Reprint des Originals.
- [10] „The global eradication of smallpox: final report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication.“ Technischer Bericht, World Health Organisation, Geneva, **1980**.
- [11] Cohen J. *Science*, **1994**. 266: 1674.
- [12] Zetterstrom R. *Acta Paediatrica*, **2006**. 95(5): 514.
- [13] Rappuoli R. *Nature Medicine*, **2004**. 10(11): 1177.

- [14] Saliou P. und Girard M. *Therapie*, **2005**. 60(3): 201.
- [15] Schubert M. „Schematische Zeichnung der Organe mit Bedeutung für das Immunsystem.“, **2006**.  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Immun-Organ.png>.
- [16] Janeway C.A., Travers P., Walport M. und Shlomchik M.J. *Immunobiology* (Garland Publishing, New York, **2001**), 5 Auflage. ISBN 0 8153 3642 X.
- [17] Gay N. und Keith F. *Nature*, **1991**. 351(6325): 355.
- [18] Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. und Hoffmann J. *Cell*, **1996**. 86: 973.
- [19] Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. und Janeway C.J. *Nature*, **1997**. 388: 394.
- [20] Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdörfer B., Giese T., Endres S. und Hartmann G. *Journal of Immunology*, **2002**. 168: 4531.
- [21] Takeda K., Kaisho T. und Akira S. *Annual Reviews in Immunology*, **2003**. 21: 335.
- [22] Takeda K. und Akira S. *International Journal of Immunology*, **2005**. 17(1): 1.
- [23] Takeda K. *Journal of Endotoxin Research*, **2005**. 11(1): 51.
- [24] Zhang D., Zhang G., Hayden M.S., Greenblatt M.B., Bussey C., Flavell R.A. und Ghosh S. *Science*, **2004**. 303: 1522.
- [25] Barton G. und Medzhitov R. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **2002**. 270: 81.
- [26] Underhill D. *European Journal of Immunology*, **2003**. 33: 1767.
- [27] Anderson W., Hyer H. und Rudy T. *Industrial Engineering Chemistry Research*, **2000**. 39: 4011.
- [28] Ozinsky A., Underhill D., Fontenot J., Hajjar A., Smith K., Wilson C., Schroeder L. und Aderem A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2000**. 97: 13766.
- [29] Akira S. und Takeda K. *Nature Reviews: Immunology*, **2004**. 4: 499.
- [30] Ishii K., Coban C. und Akira S. *Journal of Clinical Immunology*, **2005**. 25(6).

- [31] Barton F. und Medzithov R. *Science*, **2003**. 300: 1524.
- [32] Dunne A. und O'Neill L. *FEBS Letters*, **2005**. 579: 3330.
- [33] O'Neill L. *Nature Reviews: Immunology*, **2004**. S. Poster.
- [34] Flynn D.C. *Oncogene*, **2001**. 20: 6270.
- [35] O'Bryan J., Mohny R. und Oldham C. *Oncogene*, **2001**. 20(44): 6300.
- [36] Li P. und Xu J. *Journal of Peptide Research*, **2001**. 58: 129.
- [37] Krieg A. *Annual Reviews in Immunology*, **2002**. 20: 709.
- [38] Nauts H. und McLaren J. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1990**. 267: 483.
- [39] Coley W. *Clinical Orthopedics and Related Research*, **1991**. S. 3–11. HINWEIS: Dieser Artikel ist ein Reprint des Originals.
- [40] Tokunaga T., Yamamoto H., Shimada S., Abe H., Fukuda T., Fujisawa Y., Furuntani Y., Yano O., Kataoka T. und Sudo T. *Journal of the National Cancer Institute*, **1984**. 72: 955.
- [41] Gurunathan S., Klinman D. und Seder R. *Annual Reviews in Immunology*, **2000**. 18: 927.
- [42] Yamamoto S., Yamamoto T., Kataoka T., Kuramoto E., Yano O. und Tokunaga T. *Journal of Immunology*, **1992**. 148: 4072.
- [43] Yamamoto S., Yamamoto T., Shimada S., Kuramoto E., Yano O. und Kataoka T. *Microbiology and Immunology*, **1992**. 36: 983.
- [44] Chu R., Targoni O., Krieg A., Lehmann P. und Harding C. *Journal of Experimental Medicine*, **1997**. 186: 1623.
- [45] Lipford G., Bauer M., Blank C., Reiter R., Wagner H. und Heeg K. *European Journal of Immunology*, **1997**. 27: 2340.
- [46] Davis H., Weeratna R., Waldschmidt T., Tygrett L., Schorr J. und Krieg A. *Journal of Immunology*, **1998**. 160: 870.
- [47] Moldoveanu Z., Loce-Homan L., Huang W. und Krieg A. *Vaccine*, **1998**. 16: 1216.

- [48] Sun S., Cai Z., Langlade-Demoyen P., Kosaka H., Brunmark A., Jackson M., Peterson P. und Sprent J. *Immunity*, **1996**. 4: 555.
- [49] Hartmann G. und Krieg A. *Journal of Immunology*, **2000**. 164(2): 944.
- [50] Krieg A., Yi A., Matson S., Waldschmidt T., Bishop G., Teasdale R., Koretzky G. und Klinman D. *Nature*, **1995**. 374(6522): 6546.
- [51] Rankin R., Pontarollo R., Iannou X., Krieg A., Hecker R., Babiuk L. und van Drunen Littel-van den Kurk S. *Antisense Nucleic Acid Drug Development*, **2001**. 11: 333.
- [52] Kerkmann M. *Differenzierung zweier Klassen von CpG-Oligonukleotiden anhand ihrer Struktur und ihrer Wirkung auf plasmazytoide dendritische Zellen*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, **2004**.
- [53] Costa L., Kerkmann M., Hartmann G., Endres S., Bisch P., Heckl W. und Thalhammer S. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2004**. 313: 1065.
- [54] Hartmann G., Battiany J., Poeck H., Wagner M., Kerkmann M., Rothenfusser S. und Endres S. *European Journal of Immunology*, **2003**. 33(6): 1633.
- [55] Richter C. *Immunstimulatorische DNA: Design Nukleinsäure-basierter Nanopartikel unter Einsatz wirksamer Strukturelemente von CpG-A- und CpG-C- Oligodesoxynukleotiden*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, **2006**.
- [56] Ballas Z., Rasmussen W. und Krieg A. *Journal of Immunology*, **1996**. 157: 1840.
- [57] Rothenfusser S., Hornung V., Ayyoub M., Britsch S., Towarowski A., Krug A., Sarris A., Lubenow N., Speiser D., Endres S. und Hartmann G. *Blood*, **2004**. 103: 2162.
- [58] Agrawal S., Iadarola P., Tamsamami J., Zhao Q. und Shaw D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1996**. 6(18): 2219.
- [59] Dalpke A., Zimmermann S., Albrecht I. und Heeg K. *Immunology*, **2002**. 106: 102.

- [60] Bartz H., Mendoza Y., Gebker M., Fischborn T., Heeg K. und Dalpke A. *Vaccine*, **2004**. 23: 148.
- [61] Roberts T., Sweet M., Hume D. und Stacey K. *Journal of Immunology*, **2005**. 174: 605.
- [62] Farrar M. und Schreiber R. *Annual Reviews in Immunology*, **1993**. 11: 571.
- [63] Pestka S. *Biopolymers*, **2000**. 55: 254.
- [64] Isaacs A., Lindenmann J. und Valentine R. *Proceedings of the Royal Society London B Biological Sciences*, **1957**. 147(927): 268.
- [65] Isaacs A. und Lindenmann J. *Proceedings of the Royal Society London B Biological Sciences*, **1957**. 147(927): 258.
- [66] Katze M., He Y. und Gale M. *Nature Reviews: Immunology*, **2002**. 2(9): 675.
- [67] Biron C. *Current opinion in Microbiology*, **1999**. 2: 374.
- [68] Biron C. *Immunity*, **2001**. 14: 661.
- [69] Ortaldo J., Mantovani A., Hobbs D., Rubinstein M., Pestka S. und Herberman R. *International Journal of Cancer*, **1983**. 31: 285.
- [70] Zhang X., Sun S., Hwang I., Tough D. und Sprent J. *Immunity*, **1998**. 8: 591.
- [71] Ito T., Amakawa R., Inaba M., Ikehara S., Inaba K. und Fukuhara S. *Journal of Immunology*, **2001**. 166: 2961.
- [72] Marrack P., Kappler J. und Mitchell T. *Journal of Experimental Medicine*, **1999**. 189: 521.
- [73] Coley Pharmaceutical Group I. „Product Pipeline.“, **2006**.  
<http://www.coleypharma.com/coley/pipeline>.
- [74] Wikipedia. „Membrantransport.png.“, **2006**.  
<http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Membrantransport.png>.
- [75] Khalil I.A., Kogure K., Akita H. und Harashima H. *Pharmacological Reviews*, **2006**. 58(1): 32.
- [76] Friend D., Papahadjopoulos D., und Debs R. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1996**. 1278: 41.

*Literaturverzeichnis*

- [77] Labat-Moleur F., Steffan A., Brisson C., Perron H., Feugeas O., Furstenberger P., Oberling F., Brambilla E. und Behr J. *Gene Therapy*, **1996**. 3: 1010.
- [78] Zuhorn I., Kalicharan R. und Hoekstra D. *Journal of Biological Chemistry*, **2002**. 277: 18021.
- [79] Conner S. und Schmid S. *Nature*, **2003**. 422: 37.
- [80] Amyere M., Mettlen M., van der Smissen P., Platek A., Payrastre B., Veithen A. und Courtoy P. *International Journal of Medical Microbiology*, **2002**. 291: 487.
- [81] Lamaze C. und Schmid S. *Current Opinion in Cell Biology*, **1995**. 7: 573.
- [82] Takei K. und Haucke V. *Trends in Cell Biology*, **2001**. 11: 385.
- [83] Parton R., Joggerst B., und Simons K. *Journal of Cell Biology*, **1994**. 127: 1199 .
- [84] Wagner E., Plank C., Zatloukal K., Cotten M. und Birnstiel M. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1992**. 89: 7934 .
- [85] Kakudo T., Chaki S., Futaki S., Nakase I., Akaji K., Kawakami T., Maruyama K. und Kamiya Hand Harashima H. *Biochemistry*, **2004**. 43: 5618 .
- [86] Macfarlane D. und Manzel L. *J. Immunol.*, **1998**. 160: 1122.
- [87] Bauer M., Heeg K. und Wagner H. *Immunology*, **1999**. 97: 699.
- [88] Roberts T.L., Dunn J.A., Terry T.D., Jennings M.P., Hume D.A., Sweet M.J. und Stacey K.J. *The Journal of Immunology*, **2005**. 175: 3569 .
- [89] Mammen M., Choi S.K. und Whitesides G. *Angewandte Chemie*, **1998**. 110: 2908.
- [90] Mammen M., Choi S.K. und Whitesides G. *Angewandte Chemie International Edition*, **1998**. 37: 2754.
- [91] Karush F. *Comprehensive Immunology*, **1987**. 5: 85.
- [92] Heldin C. *Cell*, **1995**. 80: 213.
- [93] Fritz H., Maier M. und Bayer E. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1997**. 195: 272.

- [94] Wagner E. und Kloeckner J. *Advances in Polymer Science*, **2006**. 192: 135 .
- [95] Oupicky D., Konák C., Ulbrich K., Wolfert M. und Seymour L. *Journal of Controlled Release*, **2000**. 65: 149.
- [96] Funhoff A., van Nostrum C., Koning G., Schuurmans-Nieuwenbroek N., Crommelin D. und Hennink W. *Biomacromolecules*, **2004**. 5: 32. HINWEIS: proton sponge effect is not really valid? hat das schon wer zitiert?
- [97] Banerjee P., Reichardt W., Weissleder R. und A. Bogdanov J. *Bioconjugate Chemistry*, **2004**. 15: 960. HINWEIS: 07/15/2005 14:30:33 Notes: - - - Protocols: - DNA - Polymer complex / conjugate - Analytik PEI - Next Actions - - -
- [98] Heise C. und Bier F. *Topics in Current Chemistry*, **2006**. 261: 1 .
- [99] Watson K., Park S.J., Im J.H., Nguyen S. und Mirkin C. *Journal of the American Chemical Society*, **2001**. 123: 5592.
- [100] Won J.I., Meagher R. und Barron A. *Electrophoresis*, **2005**. 26: 2138.
- [101] Aoi K. und Okada M. *Progress in Polymer Science*, **1996**. 21: 151.
- [102] Kobayashi S. und Uyama H. *Journal of Polymer Science A*, **2002**. 40: 192.
- [103] Zarka M., Nuyken O. und Weberskirch R. *Chem. Eur. J.*, **2003**. 9: 3228.
- [104] Zarka M. *Neue amphiphile Blockcopolymer für die mizellare Katalyse*. Doktorarbeit, Technische Universität München, **2004**.
- [105] Levy A. und Litt M. *Journal of Polymer Science A*, **1968**. 6: 1883.
- [106] Cesana S. *Functionalization of poly(2-oxazoline)s with cyclic RGD peptides*. Doktorarbeit, Technische Universität München, **2004**.
- [107] Cesana S., Auernheimer J., Jordan R., Kessler H. und Nuyken O. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2006**. 207(2): 183.
- [108] Kobayashi S., Uyama H., Higuchi N. und Saegusa T. *Macromolecules*, **1990**. 23: 54.
- [109] Witte H. und Seeliger W. *Justus von Liebig's Annalen der Chemie*, **1974**. S. 996.
- [110] Bekereditjan-Ding I. persönliche Mitteilung.

- [111] Ringsdorf H. *Journal of Polymer Science: Symposium*, **1975**. 51: 135.
- [112] Veronese F. und Morpurgo M. *Il Farmaco*, **1999**. 54: 497.
- [113] Duncan R., Ringsdorf H. und Satchi-Fainaro R. *Advances in Polymer Science*, **2006**. 192: 1 .
- [114] Hoffmann A., Stayton P., Bulmus V., Chen C. und Chen J. In *Sixth World Biomaterials Congress 2000* (John Wiley & Sons, **2000**) .
- [115] Morpurgo M., Veronese F., Kachensky D. und Harris J. *Bioconjugate Chemistry*, **1996**. 7: 363.
- [116] Morpurgo M., Bayer E. und Wilchek M. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **1999**. 38: 17.
- [117] Sumitomo. Eur. Patent No. 0,340,741.
- [118] Parrish B., Breitenkamp R.B. und Emrick T. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**. 127(20): 7404.
- [119] Speers A. und Cravatt B. *Chemistry & Biology*, **2004**. 11: 535.
- [120] Wang Q., Chan T., Hilgraf R., Fokin V., Sharpless K. und Finn M. *Journal of the American Chemical Society*, **2003**. 125: 3192.
- [121] Jezek J. und Houghten R. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1994**. 59: 691.
- [122] Hudson D. *Journal of Organic Chemistry*, **1988**. 53: 617.
- [123] Miranda L. und Alewood P. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1999**. 96: 1181.
- [124] Miranda L. und Alewood P. *Peptide Science*, **2000**. 55(3): 217.
- [125] Humphrey J. und Chamberlin A. *Chem. Rev.*, **1997**. 97: 2243.
- [126] Ghosh S., Kao P., McCue A. und Chappelle H. *Bioconjugate Chemistry*, **1990**. 1: 71.
- [127] Green T. und Wuts P. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Kapitel Protective groups for carboxyl groups, S. 433–435, 728–731 (Wiley-Interscience, New York, **1999**).



- [128] Green T. und Wuts P. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Kapitel Protective groups for amino groups, S. 518–525, 736–739. (Wiley-Interscience, New York, **1999**).
- [129] Beard C., Baum K. und Grakauskas V. *Journal of Organic Chemistry*, **1973**. 38(21): 3673.
- [130] Wörndle A. *Amphiphile, lösliche Polymere als Träger in der metallorganischen Katalyse*. Doktorarbeit, Technische Universität München, **2005**.
- [131] Wieland P., Stoeckel N. und Nuyken O. *Journal of Macromolecular Science A*, **2003**. 40(11).
- [132] Power-Billard K., Wieland P., Schaefer M., Nuyken O. und Manners I. *Macromolecules*, **2004**. 37(2090).
- [133] Groß A. *Polymerisation von 2-Phenyl- und 2-Nonyl-2-oxazolin*. Doktorarbeit, Universität Bayreuth, **1994**.
- [134] Schönfelder D. *Palladiumkomplexe auf Basis von N-heterocyclischen Carbenliganden an amphiphilen Poly(2-oxazolin)en für C-C-Kupplungsreaktionen in der Mizellaren Katalyse*. Doktorarbeit, Technische Universität München, **2004**.
- [135] Weberskirch R. persönliche Mitteilung.
- [136] Luxenhofer R. unveröffentlichte Ergebnisse.
- [137] Righetti P. und Gelif C. *Journal of Chromatography B*, **1996**. 699: 63.
- [138] Laemmli U. *Nature*, **1970**. 227: 680.
- [139] Hinck A. „Protocol for SDS-Tricine-PAGE.“, **2004**.  
[http://hincklab.uthscsa.edu/html/protocols/tricine\\_sds.shtml](http://hincklab.uthscsa.edu/html/protocols/tricine_sds.shtml).
- [140] Raines G., Aumann H., Sykes S. und Street A. *Thrombosis Research*, **1990**. 60: 201.
- [141] Rabilloud T. *Electrophoresis*, **1990**. 11: 785.
- [142] Heukeshoven J. und Dernick R. *Electrophoresis*, **1985**. 6: 103.
- [143] Oakley B., Kirsch D. und Morris N. *Analytical Biochemistry*, **1980**. 105: 361.

- [144] Switzer C., Merrill C. und Shifrin S. *Analytical Biochemistry*, **1979**. 98: 231.
- [145] Morrissey J. *Analytical Biochemistry*, **1981**. 117: 307.
- [146] Lüdtkke K. *Fluoreszenzmarkierte Poly(2-oxazolin)e*. Doktorarbeit, Technische Universität München, **2005**.
- [147] Heuer D., Saha S. und Archer L. *Electrophoresis*, **2003**. 24: 3314.
- [148] Stellwagen N. *Electrophoresis*, **1997**. 18: 34.
- [149] Righetti P., Borst B. und Snyder R. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **1981**. 4: 347.
- [150] Stellwagen N. und Holmes D. *Electrophoresis*, **1992**. 13: 601.
- [151] Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Krieglstein J. und Kissel T. *Biomaterials*, **2003**. 24: 1121.
- [152] Brothers H., Piehler L. und Tomalia D. *Journal of Chromatography A*, **1998**. 214: 233.
- [153] Amarego W.L.F. und Perrin D.D. *Purification of Laboratory Chemicals* (Butterworth-Heinemann, New York, **2002**), 4 Auflage.
- [154] Gottlieb H., Kotlyar V. und Nudelman A. *Journal of Organic Chemistry*, **1997**. 62: 7512.
- [155] Righetti P. und Gelif C. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, S. 1–29 (Wiley-VCH Verlag GmbH, **2000**).
- [156] Righetti P. *Journal of Chromatography A*, **2005**. 1079: 24.
- [157] Chrambach A. und Rodbard D. *Science*, **1971**. 172: 440.
- [158] Rodbard D. und Chrambach A. *Analytical Biochemistry*, **1971**. 40: 95.
- [159] Tietz D. und Chrambach A. *Electrophoresis*, **1986**. 7: 241.
- [160] Gallagher S. In *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, **1999**).
- [161] Mülhardt C. *Laborjournal*, **2004**. S. online.  
<http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v26.html>.

- [162] MolecularProbes. „SYBR Nucleic Acid Gel Stains.“ pdf, **2003**.
- [163] Adkins S. und Burmeister M. *Analytical Biochemistry*, **1996**. 240: 17.
- [164] Jin L.T. und Choi J.K. *Electrophoresis*, **2004**. 25: 2429.
- [165] Connolly B. und Rider P. *Nucleic Acid Research*, **1985**. 13: 4485.
- [166] Sproat B., Beijer B., Rider P. und Neuner P. *Nucleic Acid Research*, **1987**. 15: 837.
- [167] Zuckermann R., Corey D. und Shultz P. *Nucleic Acid Research*, **1987**. 15: 5305.
- [168] Li P. *Nucleic Acid Research*, **1987**. 15: 5257.
- [169] Anonym. *Wikipedia*, **2006**. <http://de.wikipedia.de>.